

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Diverzita kryptosporidií parazitujících u divokých kachen

Bakalářská práce

Veronika Tomancová

Školitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Školitel specialista: Ing. Nikola Holubová

České Budějovice, 2017

Tomancová, V., (2017): Diverzita kryptosporidií parazitujících u divokých kachen. [Diversity of *Cryptosporidium* parasitizing in wild ducks, Bc. Thesis, in Czech] – **59 pp.**, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This study investigated the diversity of *Cryptosporidium* in wild ducks (*Anas platyrhynchos*) in the Czech Republic. A total of 298 faecal samples were collected at 7 localities. Samples were examined for the presence of *Cryptosporidium* using microscopy (following aniline-carbol-methyl violet staining) and sequence analysis of PCR amplified products. Thirty two wild ducks were tested positive for *Cryptosporidium* spp. DNA. Only 8 positive ducks were also microscopically positive. Phylogeny analyses of the *Cryptosporidium* 18S rRNA, actin, and HSP70 genes revealed presence of *C. avium* (n=4), *C. baileyi* (n=6), avian genotype III (n=5), duck genotype I (n=9) and novel genotype named duck genotype II (n=8). *Cryptosporidium* duck genotype I and II were not infectious for laboratory BALB/c mice (*Mus musculus*) and budgerigars (*Melopsittacus undulatus*), but it was infectious for domestic ducks (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*). The course of infection in ducks did not differ between genotypes. The patent period in ducks was >30 DPI and ducks started to shed oocysts of both genotypes 4 DPI. Infection intensity was low for both genotypes reaching 2,000–10,000 OPG. Histological examination revealed the presence of life stages of duck genotype I and II in small intestine. Naturally or experimentally infected birds showed no clinical signs of cryptosporidiosis, and no pathology was detected.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě 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 12. prosince 2017

.....

Podpis

V první řadě bych chtěla poděkovat své rodině za finanční a psychickou podporu při studiu. Dále bych ráda poděkovala svému školiteli prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za odborné vedení mé práce, cenné rady a trpělivost. Děkuji také mé školitelce specialiste, Ing. Nikole Holubové, za pomoc při práci se zvířaty. Poté bych ráda poděkovala pracovníkům Laboratoře veterinární a lékařské protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. jmenovitě RNDr. Bohumilu Sakovi, Ph.D. a RNDr. Daně Květoňové za pomoc při práci v laboratoři a přátelskou atmosféru. Děkuji také mým přátelům Janě Eliášové, Tomáši Jaroňovi, Václavu Dlouhému a Adéle Navrátilové.

Práce je součástí programu Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu, BC AV ČR, v.v.i.

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem GAČR 15-01090S (řešitel prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

Obsah	
1. ÚVOD.....	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1. Řád vrubozobí (Anseriformes)	2
2.1.1. Kachna divoká holoarktická (<i>Anas platyrhynchos platyrhynchos</i>)	2
2.2.2. Taxonomie.....	6
2.2.3. Vývojový cyklus.....	6
2.3.1. Druhy kryptosporidií parazitujících u ptáků.....	8
2.3.2. Genotypy kryptosporidií parazitující u ptáků	12
3. CÍLE PRÁCE.....	13
4. MATERIÁL A METODIKA	14
4.1. Materiál	14
4.1.1. Biologický materiál	14
4.2. Metodika.....	15
4.2.1. Zpracování biologických vzorků.....	15
4.2.2. Purifikace oocyst	15
4.2.3. Barvení oocyst kryptosporidií pomocí anilin-karbol-methyl-violeti (Miláček a Vítovec 1985)	17
4.1.2. Molekulární metody.....	17
4.1.2.3. Izolace DNA	17
4.1.2.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	18
4.1.3. Gelová elektroforéza.....	20
4.1.4. Izolace z gelu	21
4.1.5. Sekvenování.....	22
4.1.6. Fylogenetické analýzy	22
4.1.7. Experimentální infekce	22
5. VÝSLEDKY	25

5.1. Prevalence kryptosporidií u divokých kachen	25
5.2. Genotypizace	26
5.3. Morfologie oocyst.....	30
5.4. Hostitelská specifita <i>Cryptosporidium</i> duck genotyp I a II	31
6. DISKUZE	34
7. ZÁVĚRY	37
8. LITERATURA	38

1. ÚVOD

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou epicelulární jednobuněční paraziti parazitující u celé řady obratlovců včetně člověka. Nacházejí se především v oblasti mikroklků epitelu trávicího traktu a epitelu dýchacích cest (Current a kol. 1986; Lindsay a kol. 1987; Bermudez a kol. 1988). Ve výjimečných případech se mohou vyskytovat v jiných orgánech jako je kloaka či bursa Fabricii u ptáků (Current a kol. 1986). Rod *Cryptosporidium* patří spolu s více než 300 dalšími rody do kmene Apicomplexa, který zahrnuje přibližně 4 800 pojmenovaných druhů. Některé druhy rodu *Cryptosporidium* jsou hostitelsky specifické, zatímco jiné infikují mnoho hostitelských druhů (Fayer a Xiao 2008). Do současné doby bylo popsáno 36 druhů a více než 200 genotypů kryptosporidií. Přes stále vzrůstající zájem o studium těchto parazitů, je výzkum směřován především na kryptosporidie a kryptosporidiózu savců, zatímco kryptosporidióza ostatních obratlovců, včetně ptáků není středem pozornosti.

I přes obrovskou rozmanitost zástupců v třídě ptáků oproti třídě savců, byly doposud 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 známé jako *Cryptosporidium avian genotype V*) (Holubová a kol. 2016).

Právě proto jsme se zaměřili na studium ptačích genotypů. Cílem této práce je částečně doplnit informace o ptačích genotypech, které by mohly pomoci popsat nové druhy.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Řád vrubozobí (*Anseriformes*)

Ptáci řádu vrubozobých jsou středně velcí až velcí ptáci. Mezi nejmenší vrubozobé patří čírka obecná (*Anas cracca*) a největším druhem je labuť velká (*Cygnus olor*). Zobák vrubozobých nese po okrajích čelistí napříč postavené rohovité výrůstky, jejichž stavba je vysoce přizpůsobena přijímané potravě a způsobu výživy (Hudec a kol. 1994). Jejich zobák je široký a plochý. Rohovité zoubky fungují jako síto, kterým procezuji vodu, a uvnitř pak zůstane potrava (Dmitrijev 1991). Husy a kachny jsou býložravé formy, hledající potravu většinou i mimo vodu na loukách a na polích s obilím (Hudec a kol. 1994). Silně vyvinutý je svalnatý žaludek. Slepá střeva jsou dlouhá, jenom u rybožravých morčáků jsou zakrnělá. V souvislosti s životem ve vodním prostředí mají vesměs dobře vyvinutou kostrční žlázu, která produkuje hojně maz; všichni vrubozobí věnují mnoho péče kromě čištění i důkladnému promašťování peří (Hudec a kol. 1994).

System, rozšíření a fylogeneze

Řád vrubozobí zahrnuje dvě čeledi: pahasovité (*Anseranatidae*) a kachnovité (*Anatidae*). Pahasovité jsou čeledí s jediným druhem, pahasou strakatou (*Anseranas semipalmata*), žijící v australské oblasti. Čeleď kachnovitých obsahuje 146 druhů kachen, morčáků, hus a labutí, rozšířených ve všech světadílech mimo Antarktidu. Na území České republiky a Slovenska bylo dosud popsáno 41 druhů (Hudec a kol. 1994).

Význam vrubozobých

Druhy vrubozobých vyskytující se u nás tvoří vyhledávanou lovnou zvěř. Odstřel v České republice činí ročně mnoho tisíc kusů. Významnými druhy jsou zejména kachna divoká (*Anas platyrhynchos*), čírka obecná (*Anas cracca*), lžičák pestrý (*Anas clypeata*), polák velký (*Aythya ferina*) a lokálně i husa velká (*Anser anser*) (Hudec a kol. 1994).

2.1.1. Kachna divoká holoarktická (*Anas platyrhynchos platyrhynchos*)

Kachna divoká je jedna z nerozšířenějších kachen. Je to předek kachny domácí. Obývá parky, vodní kanály ve městech, eutrofická jezera, lesní bažiny ale i mořské vody. Kachna divoká má širokou škálu hnízdišť: křoviny, stromové díry, umělá hnízda v blízkosti budov nebo na nich (Svensson a kol. 1999). Rozšíření kachny divoké je holoarktické (Obrázek 1). Je to částečně tažný druh, který se v České republice čteně vyskytuje a pravidelně zimuje. Nejhojněji hnízdí v oblastech rybníků, ale i kolem nezamrzajících potoků a řek (Hudec a kol. 1994, Harrison a Greensmith 1993).

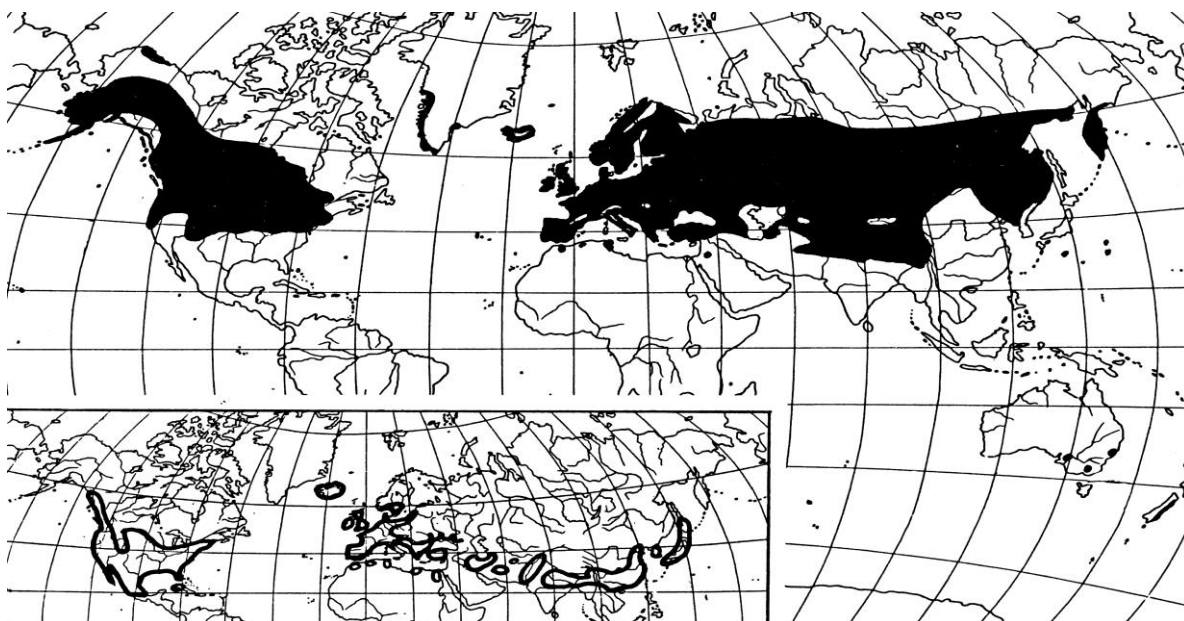
Význam kachny divoké

Kachna divoká je významná jako lovný pták pro své chutné maso. Ročně se u nás uloví kolem 30-100 000 kachen divokých. Kachny jsou loveny na společných honech nebo při večerní čekané „na tahu“ (Hudec a kol. 1994).

Pokles početnosti kachny divoké vedl v mnoho státech, včetně České republiky, k zakládání intenzivních chovů a vypouštění odchovaných jedinců pro lovecké účely (Pechmanová a Kreisinger 2015). Na území České republiky byly kachny divoké vypouštěny od začátku 50. let z polodivokého chovu i domácího chovu (Točka 1972; Musil a kol. 2001; Kubešová 2002). Intenzivní chovy se začaly rozmáhat od začátku 80. let 20. století (Šťastný a Bejček 1989; Musil a kol. 2001; Musil a Cepák 2004).

V zemědělství někdy způsobují škody tím, že se volně žijící kachny přizívají na rybníčních kachních farmách, kde mohou přispět k přenosu infekcí (Hudec a kol. 1994).

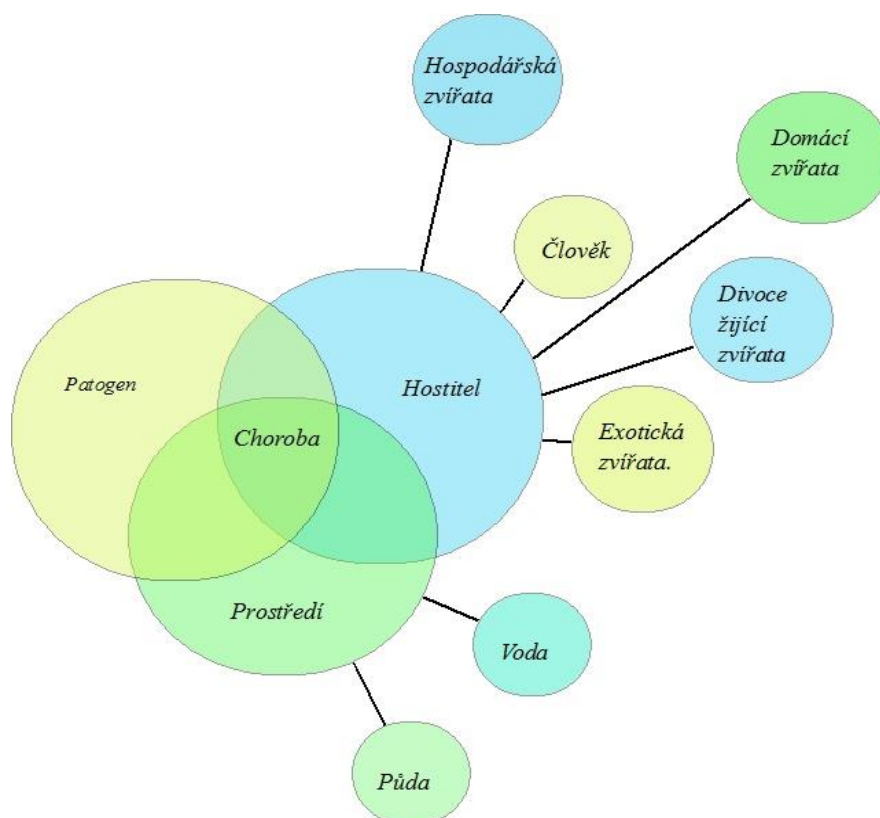
Obrázek 1. Areál rozšíření kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) (Hudec a kol. 1994; upraveno).



2.2. Kryptosporidie

Kryptosporidie jsou celosvětově jednou z hlavních příčin průjmových onemocnění nejen u mláďat různých druhů zvířat, ale také u dětí a osob s poruchami imunitního systému a zvláště potom pacientů s AIDS (Fayer 2000; Chen a LaRusso 2002). Většina lidských infekcí je přisuzována lidskému druhu *C. hominis* a zoonotickému *C. parvum* (Checklay a kol. 2015). Většina druhů a genotypů kryptosporidií má úzkou hostitelskou specifitu (Kváč a kol. 2014a). Infekce je přenášena hlavně fekálně-orální cestou a je zahájena, když se sporozoiti uvolňují z oocyst přítomných ve vodě, v potravě, přímým kontaktem se zvířetem nebo infikovanou osobou (Bouzid a kol. 2013). Přenos infekce je uskutečňován oocystami vylučovanými stolicí a exkrementy zvířat do vnějšího prostředí (Putignani a Menichella 2010; Obrázek 2).

Obrázek 2. Možné cesty přenosu kryptosporidií (Putignani a Menichella 2010, vlastní úprava)



2.2.1. Historie

V roce 1907 Ernest Edward Tyzzer popsal první kryptosporidie v žláznatém žaludku myši (*Mus musculus*) a tento parazit byl pojmenován *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). Následně, o několik let později, byl popsán další druh, *Cryptosporidium parvum*, v tenkém střevě laboratorních myší (Tyzzer 1912). V roce 1979 bylo zahájeno studium kryptosporidií v České republice, přispěly k tomu nálezy u telat a jehňat (Pavlásek 1999). Doposud bylo uznáno 36 druhů kryptosporidií. Seznam platných druhů je uveden v tabulce 1.

Tabulka 1. Seznam platných druhů rodu *Cryptosporidium*

Druh	Reference	Hostitelé	Lokalizace
<i>C. andersoni</i>	Lindsay a kol. 2000	skot	slez
<i>C. avium</i>	Holubová a kol. 2016	ptáci	střevo, vzdušné vaky, ledviny
<i>C. baileyi</i>	Current a kol. 1986	drůbež	bursa Fabricii
<i>C. bovis</i>	Fayer a kol. 2005	skot	tenké střevo
<i>C. canis</i>	Fayer a kol. 2001	psi	tenké střevo
<i>C. cichlidis</i>	Paperna a Vilenkin 1996	ryby	střevo
<i>C. cuniculus</i>	Robinson a kol. 2010	králíci	střevo
<i>C. ducismarci</i>	Traversa D. 2010	želvy	střevo
<i>C. erinacei</i>	Kváč a kol. 2014b	ježci	střevo
<i>C. fayeri</i>	Ryan a kol. 2008	klokani	střevo
<i>C. felis</i>	Iseki 1979	kočky	tenké střevo
<i>C. fragile</i>	Jirků a kol. 2008	obojživelníci	žaludek
<i>C. galli</i>	Ryan a kol. 2003b	ptáci	žláznatý žaludek
<i>C. homai</i>	Zahedi a kol. 2017	morče	Střevo
<i>C. hominis</i>	Morgan-Ryan a kol. 2002	lidé	střevo
<i>C. huwi</i>	Ryan a kol. 2003	ryby	žaludek, tenké střevo
<i>C. macropodum</i>	Power a Ryan 2008	klokani	střevo
<i>C. meleagridis</i>	Slavin 1955	ptáci	tenké střevo
<i>C. molnari</i>	Alvarez-Pellitero a Sitjá-Bobadilla 2002	ryby	žaludek, tenké střevo
<i>C. muris</i>	Tyzzer 1910	hlodavci	žaludek
<i>C. parvum</i>	Tyzzer 1912	savci	tenké střevo
<i>C. proliferans</i>	Kváč a kol. 2016	hlodavci	žaludek
<i>C. reichenklinkei</i>	Paperna a Vilenkin 1996	čichavci	střevo
<i>C. ryanae</i>	Fayer a kol. 2008	skot	střevo
<i>C. rubeyi</i>	Li a kol. 2015	veverky	střevo
<i>C. scophthalmi</i>	Alvarez-Pellitero a kol. 2004	platýzi	střevo
<i>C. scrofarum</i>	Kváč a kol. 2013	prasata	střevo
<i>C. serpentis</i>	Levine 1980	plazi	žaludek
<i>C. suis</i>	Ryan a kol. 2004	prasata	žaludek, tenké střevo
<i>C. testudinis</i>	Ježková a kol. 2016	želvy	žaludek
<i>C. tyzzeri</i>	Ren a kol. 2014	myši	tenké střevo
<i>C. ubiquitousum</i>	Li a kol. 2014	ovce, kozy	střevo
<i>C. varanii</i>	Pavlásek a Ryan 2008	plazi	střevo
<i>C. viatorum</i>	Elwin a kol. 2012	lidé	střevo
<i>C. wrairi</i>	Vetterling a kol. 1971	morčata	tenké střevo
<i>C. xiaoi</i>	Fayer a Santín 2009	ovce	střevo

2.2.2. Taxonomie

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou epicelulární paraziti kmene Apicomplexa. Pro zástupce tohoto kmene je charakteristická přítomností apikálního komplexu sloužícího k infekci. Dlouho byly kryptosporidie řazeny mezi kokcidie díky morfologické podobnosti a vývojovému cyklu (Fayer a Xiao 2008). Následně pomocí molekulární analýzy malé ribozomální podjednotky byla zjištěna příbuznost ke gregarinám (Carreno a kol. 1999). V současné době jsou kryptosporidie řazeny do třídy Gregarinomorpha, řádu Cryptogregaria a čeledi Cryptosporidiidae (Cavalier-Smith 2014).

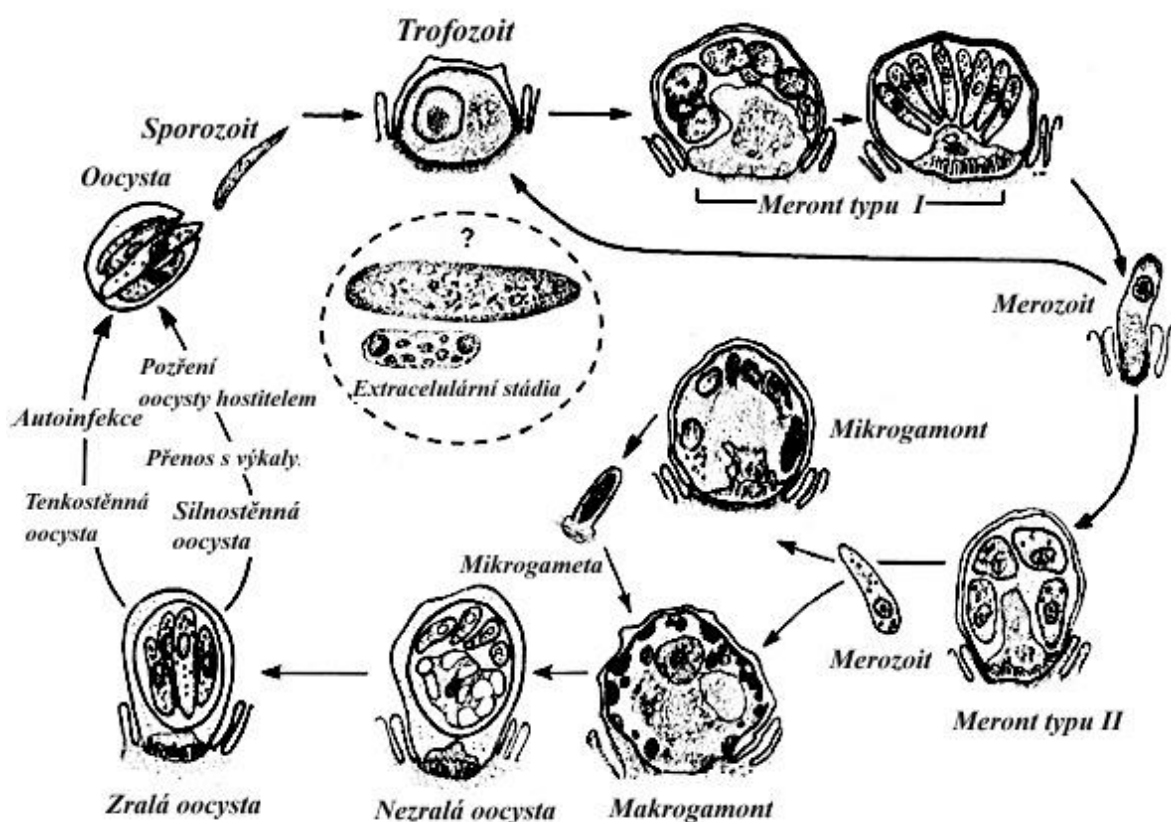
2.2.3. Vývojový cyklus

Vývojový cyklus probíhá většinou v gastrointestinálním traktu hostitele stejně jako u rodů *Eimeria*, *Isospora* a *Cyclospora* (Fayer a Xiao 2008). Životní cyklus má čtyři hlavní fáze – excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie. První krok k infekci je excystace. Z oocysty se uvolňují sporozoiti, kteří se epicelulárně přemění na trofozoity. Jádro trofozoita se rozdělí a nastává nepohlavní rozmnožování (merogonie) a vznikají meronti, kteří jsou dvojího typu. Meronti typu I vytváří šest nebo osm merozoitů, kteří infikují další hostitelské buňky a vyvíjejí se v další meronty typu I nebo II. Typ II spouští sexuální rozmnožování (gametogonii). Při gametogonii vznikají gamonti, samčí mikrogamonti a samičí makrogamonti. Z mikrogamontů vznikají mikrogamety, které oplodní makrogamety vzniklé z makrogamontů. Z oplodněné makrogamety vzniká oocysta (Obrázek 3; Fayer a Xiao 2008).

Oocysty sporulují *in situ* a z hostitele jsou vylučovány výkaly, respiračním nebo nasálním sekretem (Current 1985, Current a Snyder 1988).

Oocysty jsou dvojího typu: tenkostěnné a silnostěnné. Přibližně 80 % oocyst je silnostěnných, které jsou vylučovány z těla hostitele a slouží k šíření infekce na nové hostitele. Tenkostěnné oocysty nejsou až na výjimky vylučovány z těla hostitele, ale excystují v těle a způsobují autoinfekci (Current a Reese 1986).

Obrázek 3. Schématické znázornění životního cyklu kryptosporidií (Fayer a Xiao 2008; upraveno)



2.3. Kryptosporidie a kryptosporidióza ptáků

První ptačí kryptosporidie byly poprvé nalezeny v roce 1929 ve slepém střevě kuřat. Vzhledem k morfológické podobnosti s *Cryptosporidium muris*, nebyly popsány jako samostatný druh (Tyzzer 1907, 1910, 1929). V současné době jsou dle kódu zoologické nomenklatury uznány 4 druhy kryptosporidií infikující ptáky, konkrétně *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin 1955), *Cryptosporidium baileyi* (Current a kol. 1986), *Cryptosporidium galli* (Pavlásek 1999; Ryan a kol. 2003b) a *Cryptosporidium avium* (Holubová a kol. 2016). Kromě těchto uznaných druhů se u ptáků vyskytuje 16 genotypů, u kterých chybí základní informace, aby byly uznány jako platné druhy (Blagburn a kol. 1990; Lindsay a kol. 1991; Morgan a kol. 2001; Ryan a kol. 2003a; Jellison a kol. 2004; Zhou a kol. 2004; Meireles a kol. 2006; Ng a kol. 2006; Nakamura a kol. 2009; Abe a Makino 2010; Qi a kol. 2011; Gomes a kol. 2012; Cano a kol. 2016; Chelladurai a kol. 2016).

Kryptosporidióza je jedno z nejrozšířenějších parazitárních onemocnění domácích a volně žijících ptáků (O'Donoghue 1995; Sreter a Varga 2000). Ptačí kryptosporidie byly nalezeny v trávicím traktu (*C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. galli* a *C. avium*), dýchacím aparátu (*C. baileyi*) a vylučovací soustavě (*C. baileyi*, *C. avium*) (Current 1986; Slavin 1955; Pavlásek 1999; Holubová a kol. 2016).

2.3.1. Druhy kryptosporidií parazitujících u ptáků

Cryptosporidium meleagridis

Cryptosporidium meleagridis bylo poprvé popsáno u krůt (*Meleagris gallopavo* f. *domestica*) (Slavin 1955).

Vývojový cyklus: U tohoto druhu není vývojový cyklus popsán.

Morfologie: Oocysty měří 5,20 × 4,60 μm (Slavin 1955).

Hostitelská specifita: Mezi hostitele patří různé druhy ptáků, někteří savci a člověk.

Přirozená infekce *C. meleagridis* byla prokázána u několika řádů ptáků, jmenovitě u hrabavých, papoušků, pěvců, měkkozobých a vrubozobých (O'Donoghue 1995; Morgan a kol. 2000; Sreter a Varga 2000; Darabus a Olariu 2003; Abe a Iseki 2004; Jellison a kol. 2004).

Experimentální studie ukázaly, že *C. meleagridis* je vyjma brojlerových kuřat a krůt infekční také pro telata, prasata, králíky, potkany a myši (O'Donoghue 1995; Akiyoshi a kol. 2003; Darabus a Olariu 2003; Huang a kol. 2003).

Patogenita a klinické příznaky: U kuřat infikovaných *C. meleagridis* byla zjištěna infekce v ileu, céku, kolonu a Fabriciově burze (Bermudez a kol. 1988). Kuřata měla zkrácené střevní klky a změněné epiteliální povrchové vrstvy (Akiyoshi a kol. 2003). Infekce *C. meleagridis* je spojována s průjmami a hubnutím (Slavin 1955; Gharagozlou a kol. 2006).

Zoonotický potenciál: Pouze u tohoto druhu ptačích kryptosporidií je známo, že je infekční také pro savce včetně člověka (McLauchlin a kol. 2000; Alves a kol. 2003; Cama a kol. 2003; Xiao a Ryan 2004; Wang a kol. 2014).

U člověka je *C. meleagridis* třetí nejčastěji se vyskytující kryptosporidií (McLauchlin a kol. 2000; Morgan a kol. 2000; Guyot a kol. 2001; Pedraza-Diaz a kol. 2001; Yagita 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; Coupe a kol. 2005; Muthusamy a kol. 2006).

Cryptosporidium baileyi

Druh *C. baileyi* byl poprvé detekován u brojlerových kuřat a jako samostatný druh popsán roku 1986 (Current a kol. 1986). *Cryptosporidium baileyi* je převládající druh ptačích kryptosporidií a je to významný patogen (Yuan a kol. 2014). Tato kryptosporidie je nejvíce prozkoumána ze všech ptačích druhů a genotypů.

Vývojový cyklus: V prvních třech dnech, kdy byla kuřata infikována, byla nalezena vývojová stádia v oblasti mikrovilů ilea a tlustého střeva. Infekce Fabriciovy burzy a kloaky se objevila 4. den po infekci. Byly pozorovány jak tenkostěnné oocysty tak tlustostěnné, kterých bylo více (Current a kol. 1986). Meronti I. typu ($5,0 \times 4,9 \mu\text{m}$) s 8 merozoity se vyvíjí během 12 hodin. Meronti II. typu ($5,1 \times 5,1 \mu\text{m}$) s 4 merozoity a III. typu ($5,2 \times 5,1 \mu\text{m}$) vznikají po 48 hodinách respektive 72 hodinách po infekci. Mikrogamonti ($4,0 \times 4,0 \mu\text{m}$) produkují přibližně 16 mikrogamet, z nichž se vyvíjejí makrogamety ($4,7 \times 4,7 \mu\text{m}$). Z makrogamety vznikají dva typy oocyst, které sporulují v hostitelských buňkách. Rezistentní forma tlustostěnných oocyst ($6,3 \times 5,2 \mu\text{m}$) je vylučována výkaly. Tenkostěnné oocysty uvolněné z hostitelské buňky napadají pomocí svých sporozoitů další enterocyty (Current a kol. 1986).

Morfologie: Oocysty měří $6,3 \times 5,2 \mu\text{m}$ a jsou větší než oocysty *C. meleagridis* (Current a kol. 1986).

Hostitelská specifita: *Cryptosporidium baileyi* bylo detekováno u mnoha ptačích hostitelů: racka chechtavého (*Larus ridibundus*), jeřába popelavého (*Grus grus*), kormoránů (*Phalacrocorax* spp.), tukana bělolícího (*Rhamphastus vittelinus*), stehlíka obecného (*Carduelis carduelis*), snovače jacksonova (*Ploceus jacksoni*), bulbula šedobřichého (*Pycnonotus vitellinus*), vlhovce červenohřbetého (*Cacicus haemorrhous*), vlhovce chocholatého (*Psarocolius decumanus*), korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*), amazoňana zelenolícího (*Amazona viridigenalis*), alexandra malého (*Psittacula krameri*), kura domácího (*Gallus gallus* f. *domestica*), krocana domácího (*Meleagris gallopavo* f. *domestica*), koroptve polní (*Perdix perdix*), křepelky japonské (*Coturnix japonica*), kachny divoké (*Anas platyrhynchos*), husy domácí (*Anser anser* f. *domestica*) a pštrosa dvouprstého (*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).

Experimentálně byly úspěšně nakaženi následující druhy ptáků: kachna domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*), křepelka japonská (*Coturnix japonica*), bažant obecný (*Phasianus colchicus*), orebice čukar (*Alectoris chukar*) a krůta domácí (*Meleagris gallopavo* f. *domestica*) (Current a kol. 1986; Lindsay a kol. 1987, 1989; Lindsay a Blagburn 1990; Cardozo a kol. 2005; Máca a Pavlásek 2016).

Lokalizace: Přirozená infekce *C. baileyi* byla zaznamenána ve spojivkách, nosohltanu, průdušnici, vzdušných vacích, tenkém, slepém a tlustém střevě, kloace, Fabriciově burze, ledvinách a močovém aparátu (Lindsay a Blagburn 1990).

Vysoká morbidita a mortalita u ptáků je spojována s infekcí dýchacího aparátu, především u brojlerových kuřat (Lindsay a Blackburn 1990).

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

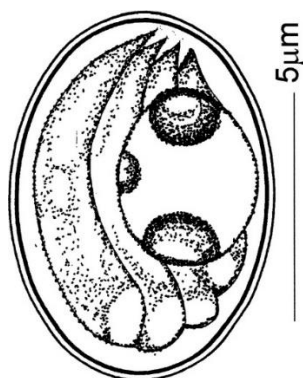
Cryptosporidium galli

Druh *Cryptosporidium galli* byl poprvé popsán u kuřat v roce 1999 (Pavlásek 1999). Ryan a kol. (2003b) se tomuto druhu věnovali podrobněji a doplnili další, zejména molekulární a biologické informace.

Vývojový cyklus: Byly pozorovány pouze stádia trofozoitů a makrogamontů v proventriculu (Fayer a Xiao 2008).

Morfologie: Oocysty jsou elipsoidního tvaru měřící $8,3 \times 6,3 \mu\text{m}$ s poměrem délky k šířce 1,30. Oocysty jsou strukturálně podobné *C. baileyi*, ale jsou podstatně větší (Pavlásek 1999). Uvnitř oocyst se nachází zbytkové reziduální tělísko o velikosti $3,6 - 4,0 \mu\text{m}$ obsahující 3 granula. Dvě z těchto granulí jsou větší (přibližně $1,6 \mu\text{m}$) a jsou umístěna proti sobě. Zbylé granulum je menší (přibližně $0,5 - 0,8 \mu\text{m}$). Celé reziduální tělísko je obklopeno 4 sporozoity banánovitěho tvaru (Obrázek 4; Pavlásek 1999).

Obrázek 4. Oocysta *Cryptosporidium galli*



Hostitelská specifita: Oocysty *C. galli* byly pozorovány u různých exotických a volně žijících ptáků jako jsou bažantovití (Phasianidae), pěnkavovití (Frigillidae) a vlhovcovití (Icteridae) (Ryan a kol. 2003b).

Lokalizace: *Cryptosporidium galli* infikuje proventriculus, avšak nikoli dýchací cesty, jak je tomu u *C. baileyi*.

Patogenita a klinické příznaky: Kryptosporidíóza způsobená *C. galli* je spojena s akutním průjmem a vysokou mortalitou (Blagburn a kol. 1990; Pavlásek 1999; Morgan a kol. 2001). U infikovaných pěnkav byla prokázána nekróza a hyperplazie žláz proventriculu epiteliálních buněk spojená s velkým počtem oocyst připojených k povrchu žlázových epiteliálních buněk. Postižení ptáci pravděpodobně trpěli dehydratací v důsledku gastrointestinální poruchy (Blagburn a kol. 1990; Morgan a kol. 2001).

Zoonotický potenciál: Tento druh je výhradně ptačí parazit.

Cryptosporidium avium

Cryptosporidium avium dříve znám jako *Cryptosporidium avian* genotyp V bylo poprvé detekováno u korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) v Japonsku (Abe a Makino 2010).

Vývojový cyklus: Vývojový cyklus není dosud znám.

Morfologie: Oocysty měří 6,26 × 4,86 μm. Poměr délky k šířce je 1,29 μm (Holubová a kol. 2016).

Hostitelská specifita: Mezi přirozené hostitele patří kakariki rudočelý (*Cyanoramphus novozealandiae*), korela chocholatá (*Nymphicus hollandicus*), kur domácí (*Gallus gallus* f. *domestica*), amazoňan modročelý (*Amazona aestiva*), kakadu inka (*Lophochroa leadbeateri*) a andulka vlnkovaná (*Melopsittacus undulatus*) (Abe a Makino 2010; Curtiss a kol. 2015; Holubová a kol. 2016). Experimentálně byl infikován kur domácí (*Gallus gallus* f. *domestica*) a andulka vlnkovaná (*Melopsittacus undulatus*) (Holubová a kol. 2016).

Patogenita a klinické příznaky: Pomocí elektronové mikroskopie byla odhalena přítomnost *C. avium* na mikrokleích kyčelníku a slepého střeva bez známek patologických změn (Holubová a kol. 2016). V roce 2015 byla u apatického kakadu inka s anorexií detekována infekce v játrech, močovodu a kloace. Byl to zatím jediný případ, kdy se objevily klinické příznaky (Curtiss a kol. 2015). Při experimentálních infekcích se ani u jednoho jedince klinické příznaky neobjevily (Holubová a kol. 2016).

Zoonotický potenciál: Tento druh je výhradně ptačí parazit.

2.3.2. Genotypy kryptosporidií parazitující u ptáků

Vyjma výše uvedených druhů jsou ptáci parazitováni minimálně dalšími 17 genotypy kryptosporidií, které byly popsány u více než 30 druhů ptáků. Konkrétně se jedná o avian genotyp I-IV a VI, goose genotyp I-IV, goose genotyp Id, duck genotyp, duck genotyp b a Euroasian Woodcock genotyp (Morgan a kol. 2001; Ryan a kol. 2003a; Zhou a kol. 2004; Ryan 2010; Holubová a kol. 2016; Cano a kol. 2016). Jednotlivé genotypy a jejich hostitelská specifita je uvedena v tabulce 2.

Tabulka 2. Hostitelská specifita genotypů ptačích kryptosporidií.

Genotyp	Hostitel	Lokalizace	Autor
avian genotyp I	kanár červený (<i>Serinus canaria</i>), páv korunkatý (<i>Pavo cristatus</i>)	střevo	Ng a kol. 2006; Nakamura a kol. 2009
avian genotyp II	kakadu inka (<i>Cacatua leadbeateri</i>), electus různobarvý (<i>Eclectus rotatus</i>), korela chocholatá (<i>Nymphicus hollandicus</i>), kakadu růžový (<i>Eolophus roseicapilla</i>), aratinga sluneční (<i>Aratinga sositialis</i>), alexandr velký (<i>Psittacula eupatria</i>), pštros dvouprstý (<i>Struthio camelus</i>), aratinga kropenatý (<i>Psittacara leucophthalmus</i>)	střevo	Ng a kol. 2006; Meireles a kol. 2006; Nakamura a kol. 2009; Séva a kol. 2011
avian genotyp III	korela chocholatá (<i>Nymphicus hollandicus</i>), kakadu růžový (<i>Eolophus roseicapilla</i>), aratinga sluneční (<i>Aratinga sositialis</i>), kraska červenozobá (<i>Urocissa erythrorhyncha</i>), rýžovník šedý (<i>Lonchura oryzivora</i>), agapornis růžohrdlý (<i>Agapornis roseicollis</i>), berneška velká (<i>Branta canadensis</i>)	žaludek	Ng a kol. 2006; Nakamura a kol. 2009; Abe a Makino 2010; Qi a kol. 2011; Gomes a kol. 2012; Jellison a kol. 2004
avian genotyp IV	kruohoočko japonské (<i>Zosterops japonica</i>)	žaludek	Ng et al. 2006
avian genotyp VI	vlhovec červenokřídlý (<i>Agelaius phoeniceus</i>)	žaludek	Chelladurai a kol. 2016
goose genotyp I	husa kanadská (<i>Branta canadensis</i>)	střevo	Zhou a kol. 2004
goose genotyp II	husa kanadská (<i>Branta canadensis</i>)	střevo	Jellison a kol. 2004
goose genotyp III	husa kanadská (<i>Branta canadensis</i>)	střevo	Jellison a kol. 2004
goose genotyp IV	husa kanadská (<i>Branta canadensis</i>)	střevo	Jellison a kol. 2004
goose genotyp Id	vodní ptáci - není specifikováno, o jaké druhy se jedná	střevo	Cano a kol. 2016
duck genotyp	turpan černý (<i>Melanitta nigra</i>), husa kanadská (<i>Branta canadensis</i>)	střevo	Morgan a kol. 2001; Zhou a kol. 2004
duck genotyp b	vodní ptáci - není specifikováno, o jaké druhy se jedná	střevo	Cano a kol. 2016
Euroasian Woodcock genotyp	sluka lesní (<i>Scolopax rusticola</i>)	žaludek	Ryan a kol. 2003a
finch genotyp I	amadina vlnkovaná (<i>Stagonoplura bella</i>)	žaludek	Blagburn a kol. 1990;
finch genotyp II	amadina vlnkovaná (<i>Stagonoplura bella</i>)	žaludek	Lindsay a kol. 1991
finch genotyp III	amadina vlnkovaná (<i>Stagonoplura bella</i>)	žaludek	Lindsay a kol. 1991

3. CÍLE PRÁCE

- Kriticky zpracovat literární rešerši k tématu.
- Popsat výskyt a diverzitu kryptosporidií u divokých kachen na vybraných lokalitách.
- V případě záchytu nových nebo málo charakterizovaných genotypů popsat základní biologické vlastnosti (lokalizace vývojového cyklu, průběh infekce, morfologie oocyst, patogenita).

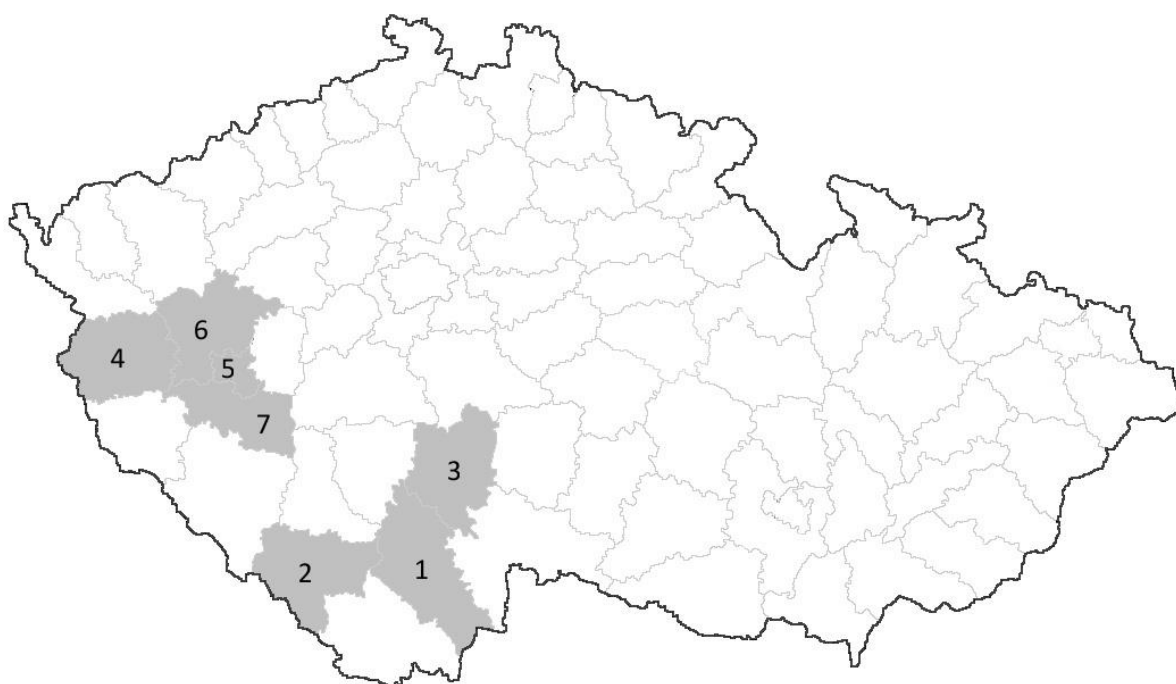
4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Materiál

4.1.1. Biologický materiál

Jako biologický materiál byly použity obsahy střev kachen divokých (*Anas platyrhynchos*) pocházející od mysliveckých sdružení v období honů z různých lokalit (obrázek 5). Některé z těchto kachen byly zakoupeny v obchodu se zvěřinou. Získané izoláty kryptosporidií byly použity pro experimentální infekce.

Obrázek 5. Lokality (okresy) odběru divokých kachen pro účely této práce



1 České Budějovice, 2 Prachatice, 3 Tábor, 4 Tachov, 5 Plzeň-město, 6 Plzeň-sever, 7 Plzeň-jih

4.1.2. Experimentální zvířata

Při experimentech *in vivo* byla infikována kachna domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*), andulka vlnkovaná (*Melopsittacus undulatus*) a BALB/c myš (*Mus musculus*).

4.1.3. Chov experimentálních zvířat

Všechna experimentální zvířata, vyjma kachen starších 14 dnů, byla umístěna v akreditovaném zvěřinci Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. Kachny byly po dvou

týdnech přemístěny do pokusných stájí Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích kvůli zachování welfare. Krmení a voda byly k dispozici *ad libitum*.

Kachna domácí: kachňata do věku 14 dní byla umístěna v plastových nádobách se savou podložkou, po dvou týdnech byla přemístěna do pokusných stájí s betonovou podlahou s podestýlkou tvořenou slámou a měla k dispozici umělé brouzdaliště s vodou.

Andulka vlnkovaná: andulky byly chovány jednotlivě v klecích s papírovou podložkou pro snadnější odběr čerstvého trusu.

BALB/c myši: myši byly chovány v plastových nádobách. Podestýlka byla tvořena pilinami.

4.2. Metodika

4.2.1. Zpracování biologických vzorků

Z jednotlivých kadáverů divokých kachen byly v laboratoři odebrány obsahy střev k dalšímu zpracování. Část obsahu střev byla použita k izolaci DNA a vytvoření nátěrů na podložní skla (4.1.2). Zbytky obsahů střev byly jednotlivě uchovávány v dichromanu draselném pro případné experimentální infekce.

4.2.2. Purifikace oocyst

Vzorky trusu pozitivní na kryptosporidie byly homogenizovány v třecí misce a přečištěny na sacharózovém gradientu. Poté bylo provedeno dočištění pomocí cesium chloridového gradientu.

Sacharózový gradient (Arrowood a Stearling 1987)

Použité chemikálie:

- zásobní Sheaterův roztok (259 ml deionizované vody; 405 g cukru; 7,29 g fenolu)
- 1% roztok PBS Tween (1% Tween 20 v PBS (1 l dH₂O; 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na₂HPO₄ × 12H₂O; 2,4 g KH₂PO₄))
- pracovní Sheaterovy roztoky
 - 1+2 (1 díl zásobní Sheaterův roztok + 2 díly PBS Tween)
 - 1+4 (1 díl zásobní Sheaterův roztok + 4 díly PBS Tween)

Pracovní postup:

1. Vzorek byl zbaven příměsí, naředěn destilovanou vodou a přecezen přes sítko.
2. Do skleněné centrifugační zkumavky o objemu 100 ml byl pomocí pasteuovy pipety navrstven následující gradient

1. vrstva: 30 ml Sheaterova roztoku 1+2
2. vrstva: 30 ml Sheaterova roztoku 1+4
3. vrstva: 15 ml vzorku
3. Zkumavky byly centrifugovány při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
4. Vrchní zbarvená vrstva byla odsáta a zbytek supernatantu byl přenesen do čisté litrové umělohmotné centrifugační nádoby.
5. Nádoba byla doplněna deionizovanou vodou a centrifugována při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
6. Polovina objemu byla odsáta a vzorky byly doplněny deionizovanou vodou. Poté byly vzorky opakovaně centrifugovány při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
7. Sedimenty byly přeneseny do čisté zkumavky a uchovány při 4 °C v PBS.

Cesium chloridový gradient (Arrowood a Donaldson 1996)

Použité chemikálie:

- roztok cesium chloridu (1,15 g/ml)
- PBS (0,025 M; pH 7,2)

Pracovní postup:

1. Sediment obsahující oocysty byl resuspendován v PBS.
2. Do čisté 2 ml mikrozkušavky byl napipetován 1 ml CsCl.
3. Na roztok CsCl bylo navrstveno 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
4. Vzorek byl centrifugován při 20 °C po dobu 3 minuty při 16 000 g.
5. Supernatant byl přepipetován do 50 ml centrifugační zkumavky, sediment byl vyhozen.
6. Zkušavka byla doplněna deionizovanou vodou a při 20 °C byla centrifugována po dobu 20 minut při 1 370 g.
7. Supernatant byl odsán na objem 5 ml.
8. Zkušavka byla doplněna deionizovanou vodou, obsah byl zvortexován a při teplotě 20 °C byl centrifugován 20 minut při 1 370 g. Tento krok byl opakován 3 – 4×, aby se vymyl roztok CsCl.
9. Oocysty byly uchovávány při 4 °C v deionizované vodě.

4.2.3. Barvení oocyst kryptosporidií pomocí anilin-karbol-methyl-violeti (Miláček a Vítovec 1985)

Použité chemikálie:

- Roztok methylvioleti (methylviolet 0,6 g; anilin 1 ml; fenol 1 g; alkohol 30 ml; deionizovaná voda 70 ml)
- Roztok 2% H₂SO₄
- Roztok tartrazinu (1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové)

Pracovní postup:

1. Tenký nátěr trusu byl fixován methanolem v plameni.
2. Zaschlý nátěr byl barven methylvioletí po dobu 30 minut.
3. Nátěry byly opláchnuty vodou.
4. Byla provedena diferenciací 2% kyselinou sírovou po dobu 4 minut.
5. Nátěry byly opláchnuty vodou.
6. Nátěry byly dobarveny roztokem tartrazinu po dobu 5 minut.
7. Nakonec bylo vše opláchnuto vodou a usušeno.

Hodnocení intenzity infekce:

U mikroskopicky pozitivních vzorků byla intenzita infekce vyjádřena jako počet oocyst v gramu trusu (OPG; Kváč a kol. 2007).

4.1.2. Molekulární metody

4.1.2.3. Izolace DNA

Z odebraných vzorků trusu byla provedena izolace DNA pomocí komerčně dodávaného kitu GeneAll® Exgene™ Stool DNA mini.

Použitý materiál:

- skleněné a zirkonové kuličky
- mikrozkušavka Safe-Lock Tube
- FL pufr
- mikrozkušavky EzPass s bílou kolonkou
- mikrozkušavky mini spin column se zelenou kolonkou
- EB pufr
- PB pufr

- NW pufr

Pracovní postup:

1. Do Safe-Lock Tube byly přidány skleněné (0,5 mm) a zirkonové (1,0 mm) kuličky. Do takto nachystaných mikrozkušavek byl přidán biologický materiál. Ke směsi byl napipetován 1 ml FL pufru. Vzorky byly homogenizovány votřesováním a následně bylo provedeno rozbití oocyst v přístroji FastPrep®24 Instrument (MP Biomedicals) po dobu 1 minuty při rychlosti 5,5 m/s.
2. Mikrozkušavky byly inkubovány 5 min. při laboratorní teplotě a centrifugovány 5 minut při 16 000 g.
3. Veškerý supernatant byl přepipetován na EzPass kolonku se sběrnou zkumavkou.
4. Kolonka byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g, odpad byl vylit ze sběrné zkumavky.
5. Na kolonku bylo napipetováno 100 µl EB pufru, ponecháno inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifugováno 1 minutu při 16 000 g.
6. Z mikrozkušavek EzPass byla odstraněna bílá kolonka a do sběrné zkumavky bylo připipetováno 500 µl PB pufru.
7. Všechn obsah sběrné zkumavky byl přenesen na mini spin column (zelená kolonka se sběrnou zkumavkou).
8. Mini spin column byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g, odpad ze sběrné zkumavky byl vylit.
9. Na střed kolonky bylo napipetováno 500 µl NW pufru.
10. Kolonka byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g, sběrné zkumavky byly vyhozeny a zelené kolonky byly přeneseny na čistou mikrozkušavku.
11. Nakonec bylo na kolonku napipetováno 200 µl EB pufru, ponecháno inkubovat 1 minutu a centrifugováno 1 minutu při 16 000 g.

4.1.2.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro amplifikaci části genu kódujícího malou ribozomální podjednotku rRNA (SSU), actin a heat shock protein (HSP70) byla použita nested PCR.

Použitý materiál:

- PCR mikrozkušavky

Použité chemikálie:

- AmpONE™ HS-Taq premix od firmy GeneAll Biotechnology
- Primery (forward, reverse)
- DNA
- PCR H₂O

Postup:

Molekulární charakterizace kryptosporidií byla provedena pomocí nested PCR amplifikující část SSU (cca 830 bp; Xiao a kol. 1999), aktinu (cca 1095 bp; Xiao a kol. 2002) a HSP70 (cca 1950 bp; Sulaiman a kol. 2000). Nukleotidové sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 3. Požadované úseky byly amplifikovány v termocycleru. Složení reakčních směsí je uvedeno v tabulce 4. Amplifikační program pro termocycler zahrnoval počáteční denaturaci při 95 °C po dobu 3 minut, 35 cyklů skládajících se z denaturace při 95 °C po dobu 45 s, specifické nasedací teploty primerů po dobu 45 s, extenze při 72 °C po dobu 60 s a závěrečného dosyntetizování řetězce při 72 °C po dobu 10 minut. Jako pozitivní kontroly byly použity DNA *Cryptosporidium muris* a *C. parvum*.

Tabulka 3. Sety primerů pro molekulární analýzy včetně nasedacích teplot.

SSU

Primární PCR - 55 °C

F1 5' - TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG - 3'

R1 5' - CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA - 3'

Sekundární PCR - 55 °C

F2 5' - GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG - 3'

R2 5' - AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A - 3'

Actin

Primární PCR - 50 °C

F1 5' - ATG RGW GAA GAA GWA RYW CAA GC-3'

R1 5' - AGA ARC AYT TTC TGT GKA CAA T -3'

Sekundární PCR - 45 °C

F2 5' - CAA GCW TTR GTT GAY AA -3'

R2 5' - TTT CTG TGK ACA ATW SWT GG -3'

HSP70

Primární PCR

F1 5'- ATG TCT GAA GGT CCA GCT ATT GGT ATT GA - 3'

R1 5'- TTA GTC GAC CTC TTC AAC AGT TGG - 3'

Sekundární PCR

F2 5'- TMT TCA TST GTT GGT GTA TGG AGA AA - 3'

R2 5'- CAA CAG TTG GAC CAT TAG ATC C - 3'

Tabulka 4. Složení reakční směsi pro PCR

PCR	Objem (μl)
Premix (HS-Taq DNA polymerase, dNTP, MgCl ₂ , loading dye and stabilizer).	10
Primer F (10 μM)	0,5
Primer R (10 μM)	0,5
DNA	2
PCR voda	7

4.1.3. Gelová elektroforéza

Amplifikované fragmenty DNA byly separovány pomocí gelové elektroforézy. Byl použit 1% agarózový gel obsahující 0,2 μg/ml ethidium-bromidu. Gel byl vyvíjen při 90 V po dobu asi 50 minut a vizualizován pomocí transiluminátoru při vlnové délce 320 nm.

Použité chemikálie:

- 50× TAE pufr (242 g tris báze; 457,1 ml ledové kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA; pH=8,00)
- Agaróza (Biotech)
- Ethidium bromid (Sigma–Aldrich)
- 100 bp DNA Ladder (Biogen)
- DNA zkoumaných vzorků

Pracovní postup:

1. Agaróza byla navážena a smíchána s 1% TAE puftrem, poté zahřáta v mikrovlnné troubě.
2. Baňka s agarózou a TAE puftrem byla ochlazena pod tekoucí studenou vodou na teplotu asi 50 °C.
3. Do baňky byly přidány 2 μl ethidium bromidu.
4. Roztok byl nalit do nosiče, byly vloženy hřebeny, gel byl ponechán ztuhnout.

5. Poté byly hřebeny vytaženy a ztuhlý gel byl vložen do elektroforetického tanku s 1% TAE pufrem.
6. Do první jamky v gelu bylo napipetováno 5 μ l ladderu, do dalších 20 μ l PCR produktu.
7. Napětí bylo nastaveno na 90 V a po asi 50 minutách došlo k separaci všech fragmentů.
8. DNA fragmenty byly vizualizovány pomocí transiluminátoru a byl pořízen snímek výsledného gelu.

4.1.4. Izolace z gelu

Extrakce z gelu byla provedena pomocí komerčně dodávaného kitu Gen Elute (Sigma).

Použitý materiál:

- mikrozkušavky
- zkumavky Binding Column G

Pracovní postup:

1. Byl vyříznut fragment DNA z gelu čistým skalpelem a tento fragment byl dán do připravené mikrozkušavky.
2. Do mikrozkušavky s fragmentem gelu bylo připipetováno 500 μ l Gel Solubilization Solution.
3. Mikrozkušavka byla inkubována 10 minut při 50 °C, rozpouštění bylo kontrolováno každé 2–3 minuty.
4. K tomu byla inkubována PCR voda na eluci na 65 °C.
5. Byla sestavena Binding Column G, na kolonu bylo napipetováno 500 μ l Column Preparation Solution a to bylo centrifugováno 1 minutu při 16 000 g.
6. Ke vzorku bylo připipetováno 150 μ l isopropanolu a promícháno.
7. Veškerý objem vzorku byl přepipetován na kolonu a byl centrifugován 1 minutu při 16 000 g.
8. Odpad ze sběrné zkumavky byl vylit a opět byla zkumavka použita s kolonou.
9. Na kolonu bylo připipetováno 700 μ l Wash Solution G a centrifugováno 1 minutu při 16 000 g.
10. Odpad byl vylit ze sběrné zkumavky a opět zkumavka byla použita s kolonou.
11. Zkumavky byly centrifugovány 1 minutu při 16 000 g bez přidavku jakýchkoliv roztoků.

12. Zkumavky byly otočeny v centrifuze o 180 ° a centrifugovány znovu 3 minuty při 16 000 g.
13. Kolona byla vložena do nové 1,5 ml mikrozkušavky a byla provedena eluce napipetováním 30 µl PCR vody předehřáté na 65 °C přímo na střed kolony. Mikrozkušavky byly inkubovány 1 minutu při laboratorní teplotě a poté centrifugovány 1 minutu při 16 000 g.

4.1.5. Sekvenování

Sekvenování sekundárního PCR produktu bylo provedeno pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit a sekvenátoru ABI123130 za použití sekundárních primerů.

4.1.6. Fylogenetické analýzy

Nukleotidové sekvence byly analyzovány pomocí programu Chromas Pro v 1.32 (www.technilysium.com.au/chromas.html) a dále pomocí programů ClustalX (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/SlustalIX/>) a BioEdit. Sekvence byly porovnány pomocí MAFFT verze 7 s automatickým srovnávacím výběrem (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi uloženými v GenBank. Nejvhodnější fylogenetický model byl vybrán v programu MEGA 6. Fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií byly vypočteny na základě vybraného modelu analýzou maximální pravděpodobnosti (ML). Bootstrapový konsenzus výsledného stromu byl získán na základě 1 000 opakování. Fylogenetické stromy byly do finální podoby upraveny pomocí programu Corel XIII.

4.1.7. Experimentální infekce

Inoculum

Pro experimentální infekce byly použity purifikované oocysty *Cryptosporidium* duck genotype I a *Cryptosporidium* duck genotype II získané z přirozeně infikovaných kachen divokých získaných v rámci této práce.

Infekce zvířat

Každé zvíře (5 v každé skupině) bylo infikováno perorálně dávkou 1×10^4 oocyst *Cryptosporidium* duck genotype I nebo *Cryptosporidium* duck genotype II. Jako negativní kontrola byla použita 3 zvířata stejného druhu a věkové kategorie. U kontrolních, neinfikovaných zvířat byly dodržovány stejné podmínky jako u infikovaných zvířat, která

byla chována odděleně. Vzorky trusu byly odebírány 1× denně. Každý experiment byl ukončen po 30 dnech.

Odběr vzorků pro parazitologické vyšetření

Odběry byly prováděny každých 24 hodin po dobu 30 dnů. Vzorky čerstvého trusu byly odebírány hned po vykání z připravených sterilních beden a uchovávány při teplotě 4 °C v 50 ml zkumavkách, které byly označeny číslem zvířete a datem odběru. Poté byly vytvořeny nátěry pro mikroskopické vyšetření a z části byla vyizolována DNA. Zbytky trusu byly skladovány při 4 °C.

Histologické vyšetření

Vzorky vnitřních orgánů (plíce, trachea, jícn, žaludek, duodenum, jejunum, ileum, slepá střeva, kolon, kloaka, ledviny, játra) experimentálně infikovaných zvířat byly fixovány ve 4% roztoku formaldehydu. Histologické řezy byly zpracovány standardní parafinovou metodou. Histologické řezy tkáně byly nabarveny hematoxylin-eosinem.

Použité chemikálie:

- I. vzestupná alkoholová odvodňovací řada (70% alkohol; 80% alkohol; 96% alkohol; aceton; xylen a xylen)
- parafinová řada (4 následné roztoky parafiny, 1:3, 1:1, 3:1, 100% parafin)
- alkoholová sestupná řada odparafinovací řada (xylen; alkohol 96%, alkohol 80%, alkohol 70%; dH₂O)
- II vzestupná zavodňovací řada (70% alkohol; 80% alkohol; 96% alkohol; karboxylen; xylen)
- kanadský balzám

Pracovní postup:

1. Vzorky byly odvoňovány I. vzestupnou řadou po 60 minutách byl vyměněn roztok.
2. V posledním roztoku byl nechán 90 minut.
3. Byl prosycen parafinem (2 – 4 hodiny v parafinu I; 4 – 6 hodin v parafinu II; 8 – 12 hodin v parafinu III, 8 – 12 hodin ve 100% parafinu)
4. Vzorky byly zality do čistého parafinu, byly vytvořeny bločky. Poté byly zhotoveny 5 µm silné histologické řezy a připraveny preparáty na podložní sklíčko a byly nechány 24 hodin na plotně o teplotě 42 °C.

5. Preparáty byly odparafinovány alkoholovou sestupnou zavodňovací řadou vždy po 5 minutách.
6. Vzorky byly nabarveny (barvení hematoxylin-eosin) a po barvení bylo pokračováno v odvodňování II. alkoholovou vzestupnou řadou vždy po 5 minutách, v karboxylenech byly ponechány 1 minutu.
7. Vzorky byly zamontovány do kanadského balzámu a byly ponechány k sušení při teplotě 42 °C.
8. Poté byly prohlíženy mikroskopem (Olympus IX70) pod vhodným zvětšením.

Barvení hematoxylin-eosin

1. Vzorky byly barveny 10 minut (0,5 g hematoxylinu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + 500 ml dH₂O + 25 g síranu hlinito-amonného + 0,1 g jodičnanu sodného + 20 ml kyseliny octové).
2. 10 minut byly oplachovány pod tekoucí vodou.
3. 5 minut byly barveny vzorky v eosinu (0,5 g eosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + 250 ml dH₂O + 10 ml kyseliny octové).

5. VÝSLEDKY

5.1. Prevalence kryptosporidií u divokých kachen

Z celkového množství 298 divokých kachen byla přítomnost oocyst kryptosporidií prokázána pouze u 8 zvířat. Specifická DNA kryptosporidií byla prokázána celkem ve 32 (10,7 %) vzorcích. Všechny mikroskopicky pozitivní vzorky byly současně PCR pozitivní. Kryptosporidie byly detekovány na 6 ze sedmi lokalit (tabulka 5). Za pozornost stojí, že u mikroskopicky pozitivních vzorků byl následně detekován pouze jeden druh kryptosporidie - *C. baileyi* (tabulka 5).

Tabulka 5. Výskyt a diverzita kryptosporidií u volně žijících kachen divokých na základě mikroskopické a molekulární detekce části genů kódujících malou ribosomální podjednotku rRNA (SSU), aktin a 70k kDa Heat shock protein (HSP70).

Lokalita	Počet vyšetřených vzorků	Mikroskopicky /PCR pozitivní vzorky	<i>Cryptosporidium</i> spp.	SSU	actin	HSP70
1	123	2/8	<i>C. baileyi</i> *	+ ¹	+ ¹	+ ¹
			avian genotyp III	+ ²	+ ²	-
			duck genotyp I	+ ¹	+ ¹	+ ¹
			duck genotyp II	+ ⁴	+ ⁴	+ ³
2	4	2/2	<i>C. baileyi</i> *	+ ¹	+ ¹	+ ¹
			avian genotyp III	+ ¹	+ ¹	-
3	6					
4	151	2/20	<i>C. baileyi</i> *	+ ²	+ ²	+ ²
			<i>C. avium</i>	+ ⁴	+ ⁴	+ ³
			avian genotyp III	+ ²	+ ²	-
			duck genotyp I	+ ⁷	+ ⁶	+ ⁶
5	7	1/2	duck genotyp II	+ ⁵	+ ⁴	+ ⁴
			<i>C. baileyi</i> *	+ ²	+ ²	+ ²
6	5	0				
7	2	0	avian genotyp III	+ ¹	+ ¹	-

+ pozitivní PCR výsledek; - negativní PCR výsledek; horní index indikuje množství úspěšně sekvenovaných PCR ampliconů z pozitivních zvířat; * mikroskopicky pozitivní

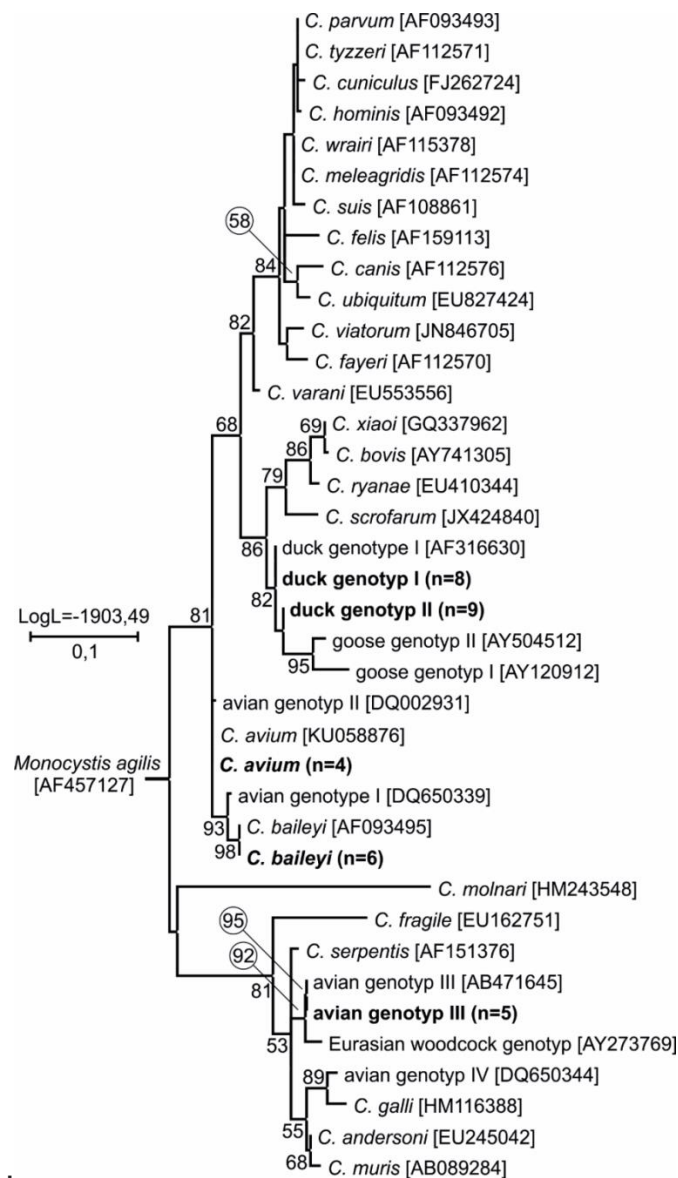
5.2. Genotypizace

Specifická DNA kryptosporidií byla prokázána celkem u 32 kachen. Pro následné fylogenetické analýzy bylo využito 32, 30 a 23 sekvencí kódujících SSU, actin a HSP70 gen. Ve zbylých případech bylo zřejmé, že se jedná o sekvence náležící k některému z druhů nebo genotypů kryptosporidií, ale kvůli nízké kvalitě sekvencí nebylo možné provést genotypizaci (tabulka 5). U žádného ze vzorků pozitivních na *Cryptosporidium avium* genotyp III se nepodařilo získat sekvenci genu kódujícího HSP70.

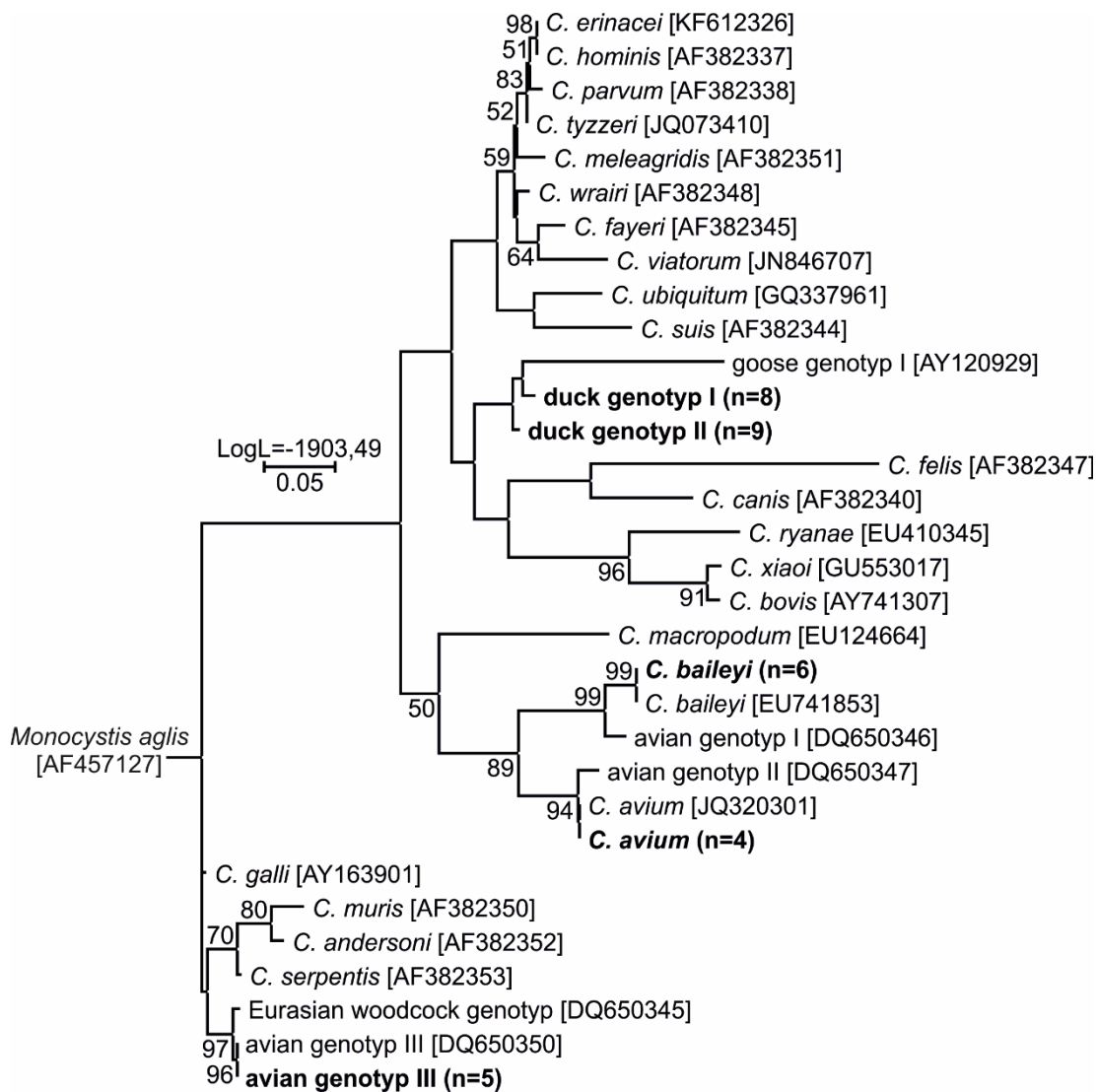
Fylogenetická analýza na základě SSU prokázala přítomnost čtyř již dříve popsáných druhů a genotypů kryptosporidií, jmenovitě *C. baileyi* (n=6), *C. avium* (n=4), *Cryptosporidium avian* genotyp III (n=5), *Cryptosporidium duck* genotyp I (n=8) a jednoho dosud nepopsaného genotypu, který jsme nazvali *Cryptosporidium duck* genotyp II (n=9; tabulka 5). Všechny získané sekvence příslušící k detekovaným taxonům byly vzájemně identické a 100% shodné se sekvencemi uloženými v databázi GenBank (obrázek 6).

Maximum likelihood stromy vytvořené na základě sekvencí kódujícího actin (obrázek 7) a HSP70 (obrázek 8) podporují fylogenetickou pozici detekovaných druhů a genotypů kryptosporidií v této práci. Navíc v této práci jsme jako první popsali sekvence těchto genů u *Cryptosporidium duck* genotypu I a II a použili je pro fylogenetické analýzy.

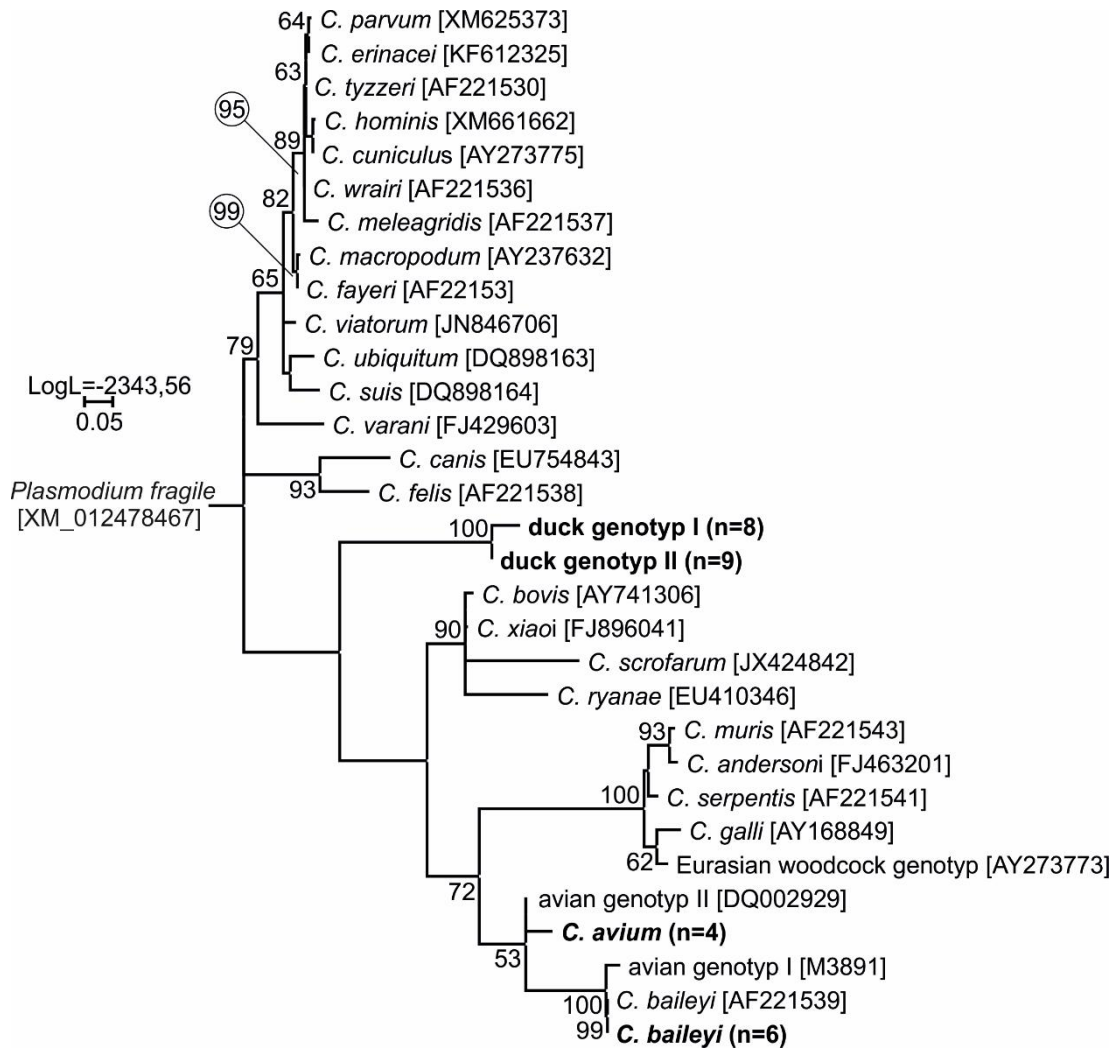
Obrázek 6. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z kachen divokých (*Anas platyrhynchos*) v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího malou ribozomální podjednotku vytvořený metodou maximum likelihood. Sekvence získané v této studii jsou tučně zvýrazněny. Procentuální hodnoty bootstrapů nad 50% jsou uvedeny u jednotlivých uzlů.



Obrázek 7. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z kachen divokých (*Anas platyrhynchos*) v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího actin vytvořený metodou maximum likelihood. Sekvence získané v této studii jsou tučně zvýrazněny. Procentuální hodnoty bootstrapů nad 50 % jsou uvedeny u jednotlivých uzlů.



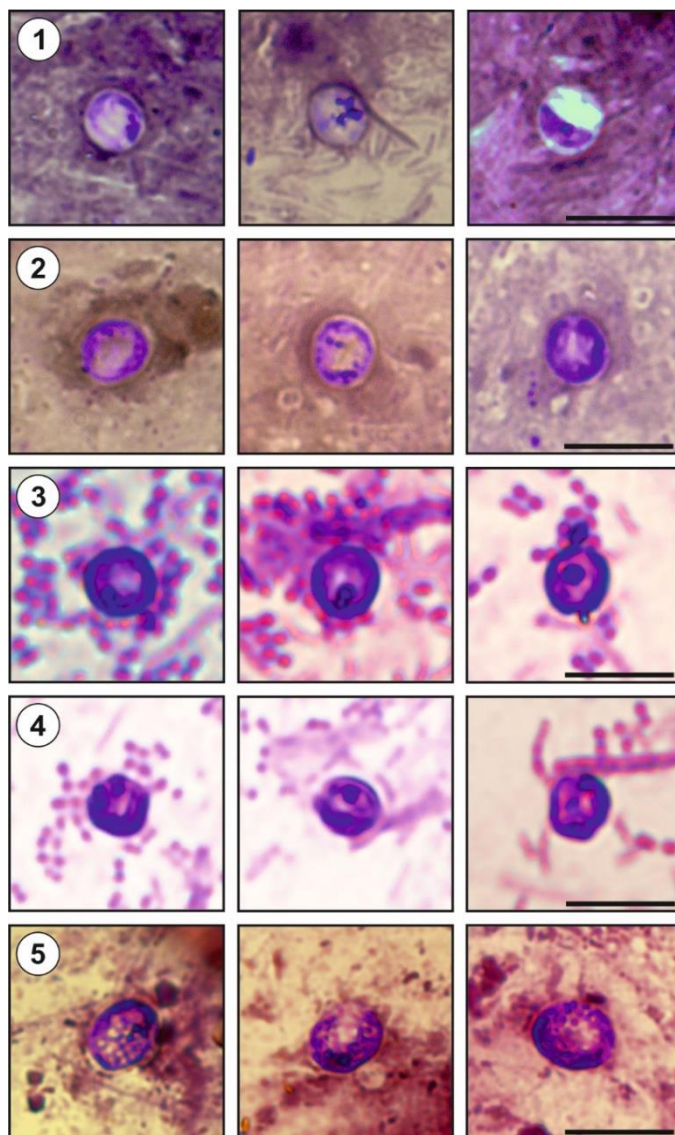
Obrázek 8. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z kachen divokých (*Anas platyrhynchos*) v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího 70 kDa Heat shock protein vytvořený metodou maximum likelihood. Sekvence získané v této studii jsou tučně zvýrazněny. Procentuální hodnoty bootstrapů nad 50 % jsou uvedeny u jednotlivých uzlů.



5.3. Morfologie oocyst

Oocysty *C. baileyi*, *C. avium*, *Cryptosporidium* duck genotyp I a II mají sférické oocysty. Velikost oocyst těchto kryptosporidií se překrývá a jsou morfometricky neodlišitelné mezi sebou. U oocyst *Cryptosporidium* duck genotyp I a II se výrazně barví reziduální tělísko oocysty. Oocysty *Cryptosporidium* avian genotyp III jsou oválné s typickou strukturou pro žaludeční kryptosporidie a větší než výše uvedené oocysty střevních druhů a genotypů (obrázek 9).

Obrázek 9. Oocysty 1) *Cryptosporidium baileyi*, 2) *Cryptosporidium avium*, 3) *Cryptosporidium* duck genotyp I, 4) *Cryptosporidium* duck genotyp II a 5) *Cryptosporidium* avian genotyp III barvené anilin-karbol-methyl-violetí. Měřítko 5 μm .



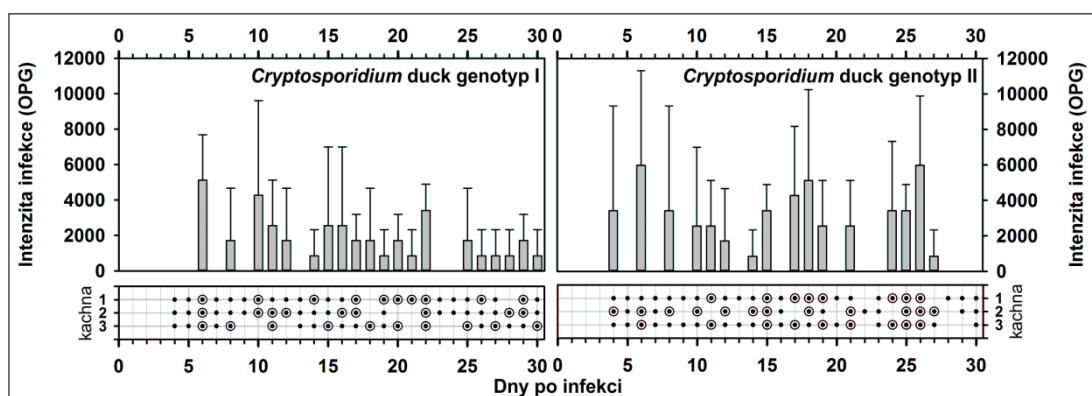
5.4. Hostitelská specifita *Cryptosporidium* duck genotyp I a II

Mikroskopická vyšetření a molekulární analýzy neprokázaly přítomnost oocyst a specifické DNA *Cryptosporidium* duck genotyp I a II v trusu experimentálně inokulovaných laboratorních myší a andulek. Taktéž histologická vyšetření neprokázala přítomnost žádných vývojových stádií kryptosporidií v žádném z vyšetřovaných orgánů. Naopak oba genotypy byly infekční pro všechny experimentálně infikované kachny domácí.

Specifická DNA *Cryptosporidium* duck genotyp I a II byla zachycena 4 dny po infekci (DPI). První záchyt oocyst *Cryptosporidium* duck genotyp I byl zaznamenán 6 DPI a u *Cryptosporidium* duck genotyp II 4 DPI. Kachny infikované jak *Cryptosporidium* duck genotyp I, tak *Cryptosporidium* duck genotyp II vylučovaly oocysty intermitentně po celou dobu sledování (30 DPI). Intenzita infekce vyvolaná oběma izoláty byla srovnatelná; maximálně 11 000 OPG (obrázek 10).

Sekvence SSU, actin and HSP70 kryptosporidií získané z experimentálně infikovaných kachen byly identické s infekčními dávkami.

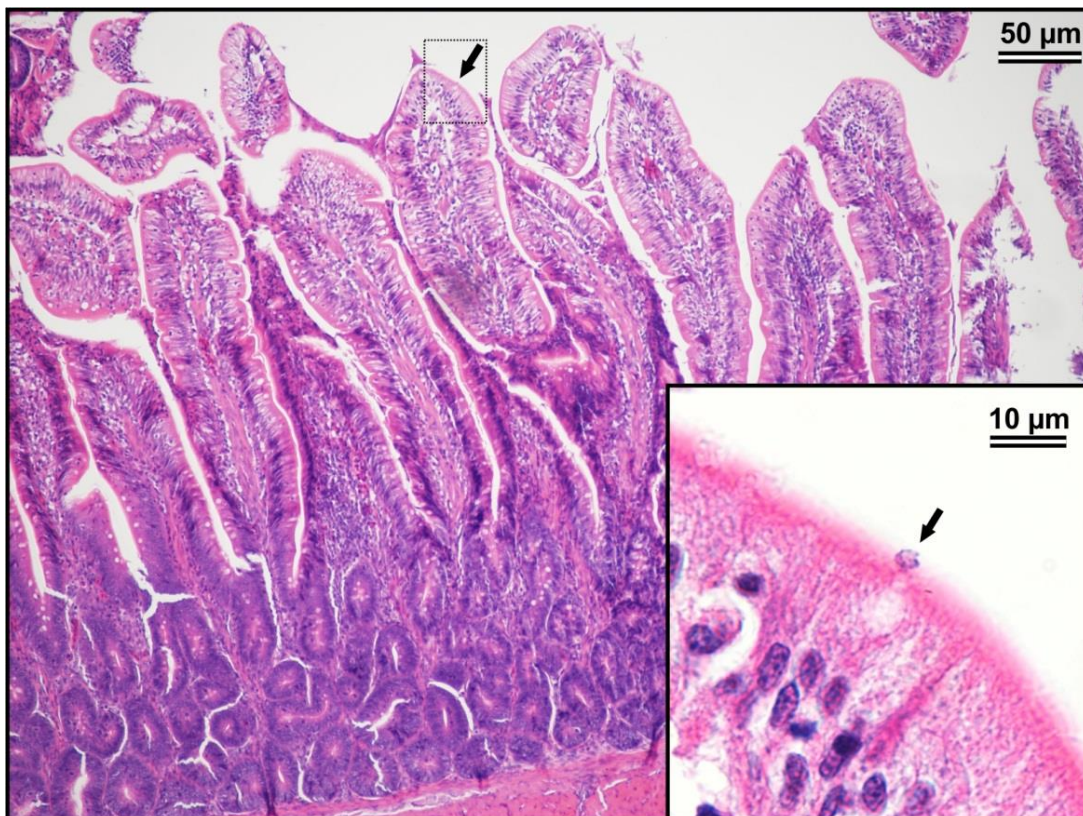
Obrázek 10. Průběh infekce *Cryptosporidium* duck genotyp I a *Cryptosporidium* duck genotyp II u kachen domácích (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*) na základě mikroskopického a molekulárního vyšetření. Kruh indikuje mikroskopickou přítomnost oocyst a tečka indikuje detekci specifické DNA.



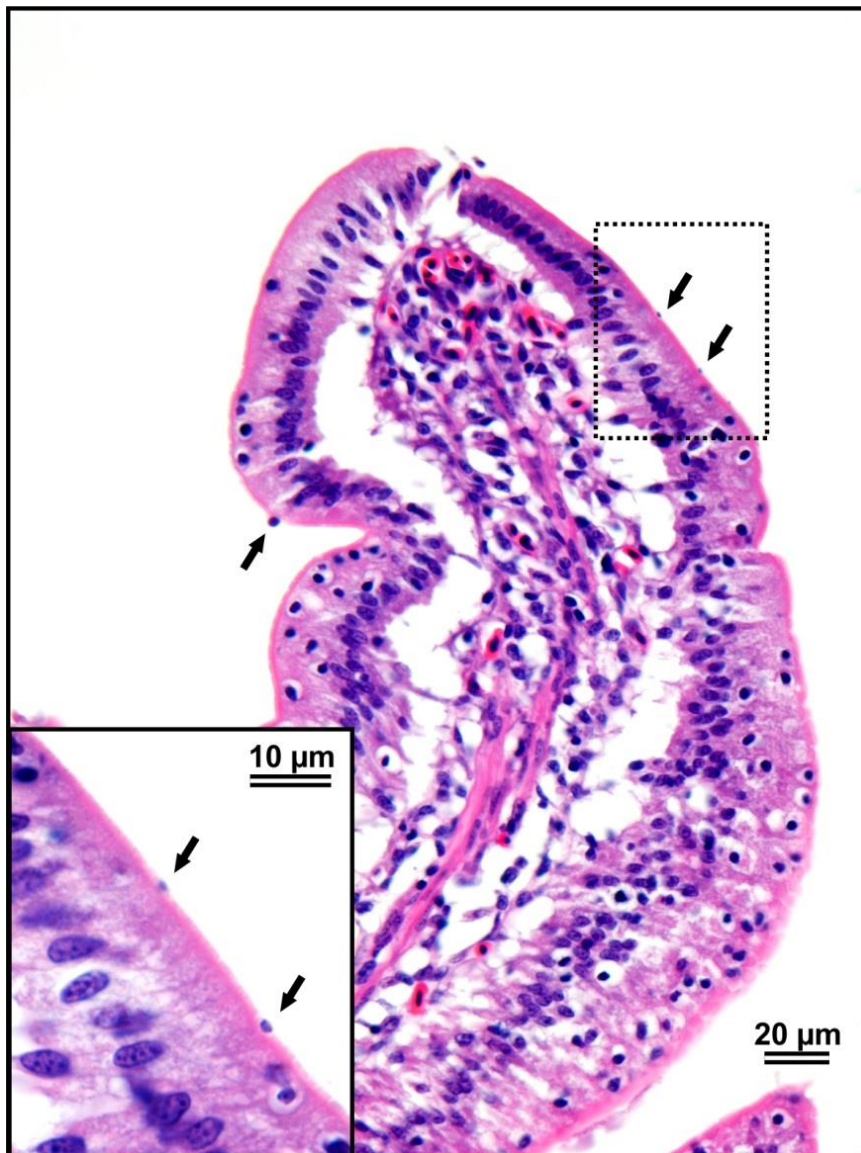
U kachen infikovaných *Cryptosporidium* duck genotyp I a *Cryptosporidium* duck genotyp II nebyly pozorovány žádné příznaky infekce, zejména netrpěly průjemem a nevykazovaly příznaky kryptosporidiózy.

Histopatologická vyšetření prokázala přítomnost vývojových stádií *Cryptosporidium* duck genotyp I a *Cryptosporidium* duck genotyp II přichycených na slizničním epitelu duodena (obrázky 11 a 12), ilea a jejuna. Výskyt vývojových stádií byl sporadický a odpovídal intenzitě infekce oocyst nalezených v trusu zvířete. Nebyly pozorovány žádné patologické změny na orgánech.

Obrázek 11. Vývojová stádia *Cryptosporidium* duck genotyp I (šipky) na slizničním epitelu duodena u experimentálně infikované kachny domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*) detekované v histologických řezech barvených hematoxylin-eosinem.



Obrázek 12. Vývojová stádia *Cryptosporidium* duck genotyp II (šipky) na slizničním epitelu duodena u experimentálně infikované kachny domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*) detekované v histologických řezech barvených hematoxylin-eosinem.



6. DISKUZE

Studie provedené jak na volně žijících, tak i domácích zvířatech ukázaly, že většina kryptosporidií má úzkou hostitelskou specifitu. Například druhy *C. suis* a *C. scrofarum* jsou hostitelsky adaptovány na domácí a volně žijící prasata, *C. bovis* na skot, *C. muris* na hlodavce nebo *C. rubeyi* na veřky (Tyzzer 1910; Ryan a kol. 2004; Fayer a kol. 2005; Kváč a kol. 2013; Li a kol. 2015). Na druhou stranu druhy jako *C. parvum* nebo *C. ubiquitum* jsou hostitelsky nespecifické, parazitující u velkého množství hostitelů (Lindsay a kol. 1988, Lindsay a kol. 1989; Fayer a kol. 2010). Ačkoliv byly ptačí kryptosporidie popsány v 17 z 26 ptačích řádů, u většiny genotypů není známa hostitelská specifita (O'Donoghue 1995; Morgan a kol. 2001; Kuhn R. C. a kol. 2002; Jellison a kol. 2004; Zhou a kol. 2004; Ng J. a kol. 2006; Plutzer a Tomor 2009; Ryan 2010; Cano a kol. 2016). V naší studii jsme detekovali přirozené infekce vyvolané *C. baileyi*, *C. avium*, *Cryptosporidium* avian genotyp III a *Cryptosporidium* duck genotyp I a II. *C. baileyi* je považováno za druh se širokou hostitelskou specifitou, který byl posán u více než 29 druhů ptáků patřících do 12 řádů. Naopak přirozená infekce druhem *C. avium* u divokých kachen nebyla dosud popsána. Do současné doby byl tento druh považován za hostitelsky specifický pouze pro papoušky (Nakamura a Meireles 2015; Holubová a kol. 2016). Nález tohoto druhu u kachen rozšiřuje hostitelské spektrum. Přítomnost *Cryptosporidium* duck genotyp I u vyšetřovaných zvířat nebyl s ohledem na výskyt tohoto genotypu v kachnách, husách a dalších vodních ptácích bez bližší specifikace překvapivý (Morgan a kol. 2001; Zhou a kol. 2004; Cano a kol. 2016). Dosud publikované práce a výsledky této studie naznačují, že *Cryptosporidium* duck genotyp I je hostitelsky specifický pro vrubozobé. *Cryptosporidium* duck genotyp II, poprvé popsáný v této studii, lze považovat za hostitelsky specifický pro kachny. *Cryptosporidium* avian genotyp III, které je často detekováno u papoušků a pěvců (Ng a kol. 2006, Nakamura a kol. 2009; Abe a Makino 2010; Qi a kol. 2011; Gomes a kol. 2012), bylo nalezeno již dříve u vrubozobých, ale pouze u bernešky velké (*Branta canadensis*) a nikoli kachny divoké (Jellison a kol. 2004).

Na rozdíl od řady jiných studií jsme nedetekovali specifickou DNA kryptosporidií, které jsou hostitelsky specifické pro savce; *C. parvum*, *C. andersoni*, *C. muris* a *C. hominis* (Crazsycy a kol. 1998; Zhou a kol. 2004; Ng a kol. 2006; Qi a kol. 2014). S ohledem na fakt, že vnímavost ptáků k těmto druhům kryptosporidií

nebyla experimentálně potvrzena, lze se domnívat, že přítomnost specifické DNA těchto kryptosporidií je výsledkem pasáže oocyst zaživacím traktem hostitele. Nepřítomnost výše uvedených druhů kryptosporidií v naší studii je možno vysvětlit omezeným kontaktem vyšetřovaných kachen s kontaminovanou vodou, zvláště v případě, že většina divokých kachen byla odchována za účelem odstřelu.

Kryptosporidie jsou často považovány za parazity vyvolávající průjmová onemocnění ohrožující zdraví a život hostitele (Tzipori a kol. 1981a; Tzipori a kol. 1981b; Tzipori a kol. 1981c; Cheun a kol. 2010; Vinayak a kol. 2016; Zhang a kol. 2016; Khan a kol. 2017). Klinický průběh infekce je často spojován s různým stupněm imunodeficiency nebo s oslabením organismu (Malebranche a kol. 1983; Current a kol. 1983; Navin a Juranek 1984; Adamu a kol. 2014). U imunokompetentních jedinců je však kryptosporidióza poměrně vzácná. Z celkového počtu desítek druhů a stovek genotypů, byl klinický průběh infekce popsán jen u několika málo kryptosporidií, respektive hostitelů. Mezi zástupce druhů kryptosporidií, které vyvolávají kryptosporidiózu, patří *C. parvum*, *C. hominis*, *C. meleagridis*, *C. canis*, *C. felis*, *C. cuniculus* nebo *C. viatorum*. Většina uvedených klinických onemocnění vyvolaná těmito kryptosporidiiemi však připadá na člověka, psy, kočky nebo hospodářská zvířata (Poonacha a Pippin 1982; Current a Garcia 1991; Hunter a kol. 2004; Satoh a kol. 2006; Chalmers a Davies 2010; Chalmers a kol. 2011; Adamu a kol. 2014; Beser a kol. 2015; Nakamura a Meireles 2015; de Lucio a kol. 2017). U volně žijících druhů zvířat jsou průjmová onemocnění způsobená kryptosporidiiemi poměrně vzácná (Hamnes a kol. 2007; Ravaszova a kol. 2012; Prediger a kol. 2017; Wait a kol. 2017). Kryptosporidióza ptáků je nejčastěji spojována s infekcemi vyvolanými *C. meleagridis* a *C. baileyi*; (Tůmová a kol. 2002; Abe a Iseki 2004; Holubová a kol. 2016). U kachen přirozeně infikovaných *C. baileyi*, *C. avium*, *Cryptosporidium* avian genotyp III nebyly v této práci detekovány žádné příznaky kryptosporidiózy, což je v souladu s dosud publikovanými pracemi, tedy, že infekce vyvolané těmito kryptosporidiiemi jsou často subklinické (Nakamura a Meireles 2015; Holubová a kol. 2016). Taktéž přirozené infekce způsobené *C. meleagridis* a *C. baileyi* u volně žijících vrubozobých nejsou spojovány s klinickým onemocněním (Jellison a kol. 2004). V námi provedené studii jsme nedetekovali žádné příznaky průjmových onemocnění kachen infikovaných *Cryptosporidium* duck genotyp I a II. Obdobně u *Cryptosporidium* goose genotyp I a II, které jsou

fylogeneticky příbuzné ke *Cryptosporidium* duck genotyp I a II, nebyly popsány žádné klinické příznaky u volně žijících vrubozobých (Zhou a kol. 2004). Z několika málo studií zabývajících se průběhem infekcí u kryptosporidií můžeme říci, že prepatentní a patentní perioda je odlišná mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií. U druhů patřících mezi střevní kryptosporidie jako *C. baileyi* a *C. meleagridis* byly oocysty detekovány od 3. – 4. dne po infekci, avšak u *C. avium* byla prepatentní perioda až 12 dní (Current a kol. 1986; Bermudez a kol. 1988; Zha a Jiang 1994; Holubová a kol. 2016). V rámci naší studie byla zjištěna prepatentní perioda u *Cryptosporidium* duck genotyp I a II 4 dny, což je podobné *C. baileyi*. U *C. galli* jakožto zástupce žaludečního druhu, byly jeho oocysty zachyceny mnohem později než u ostatních druhů a genotypů a to až 25. den po infekci (Pavlásek 2001). Z výsledků této studie a dříve publikovaných dat vyplývá, že průběh infekce je závislý nejenom na druhu a genotypu kryptosporidie, ale na hostiteli (Holubová a kol. 2016).

V rámci studií zabývajících se také experimentálními infekcemi u zvířat jsou prováděna histologická vyšetření, které napomáhají určit výskyt vývojových stádií oocyst ve vnitřních orgánech. U *C. baileyi* byla tato vývojová stádia oocyst detekována v burze Fabricii (Current a kol. 1986). U žaludečních druhů a genotypů jako je *C. galli* a *Cryptosporidium* avian genotyp III byla parazitární infekce pozorována v proventrikulu (Pavlásek 2001; Ravich a kol. 2014). U námi získaných genotypů, konkrétně *Cryptosporidium* duck genotyp I a II byla vývojová stádia oocyst nalezena v tenkém střevě stejně jako u *C. avium* a *C. meleagridis* (Bermudez a kol. 1988; Holubová a kol. 2016).

7. ZÁVĚRY

- Byl detekován nový genotyp kryptosporidie parazitující u kachen, *Cryptosporidium* duck genotyp II.
- Divoké kachny jsou přirozeným hostitelem *C. avium*, *C. baileyi*, *Cryptosporidium* avian genotyp III, *Cryptosporidium* duck genotyp I a *Cryptosporidium* duck genotyp II.
- Oocysty *Cryptosporidium* duck genotyp I a II nelze odlišit od ostatních druhů a genotypů střevních kryptosporidií.
- *Cryptosporidium* duck genotyp I a II jsou hostitelsky specifické pro kachny divoké a domácí.
- Infekce způsobené *Cryptosporidium* duck genotyp I a II nejsou spojeny s klinickým onemocněním.
- Vývojový cyklus *Cryptosporidium* duck genotyp I a II je lokalizován v tenkém střevě.

8. LITERATURA

- Abe N., Iseki M. (2004).** Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR – amplified small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitol. Res.* 92: 523-526.
- Abe N., Makino I. (2010).** Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels, Japan. *Parasitol. Res.* 106: 1491-1497.
- Adamu H., Petros B., Zhang G., Kassa H., Amer S., Ye J., Feng Y., Xiao L. (2014).** Distribution and Clinical Manifestations of *Cryptosporidium* Species and Subtypes in HIV/AIDS Patients in Ethiopia. *PloS Negl. Trop. Dis.* 8: e2831.
- 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.
- Alvarez-Pellitero P., Sitjá-Bobadilla A. (2002).** *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *Int. J. Parasitol.* 32: 1007-1021.
- Alvarez-Pellitero P., Quiroda M. I., Sitjá-Bobadilla A., Redondo M. J., Pelenzuela O., Padrós F., Vázquez S., Nieto J. M. (2004).** *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. *Dis. Aquat. Organ.* 62: 133-145.
- Alves M., Xiao L., Sulaiman I., Lal A. A., Matos O., Antunes F. (2003).** Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2744-2747.
- 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: 89.
- Arrowood M. J., Sterling C. R. (1987).** Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. *The Journal of Parasitology*, 73: 314-319.
- 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.

Beser J., Toresson L., Eitrem R., Troell K., Winiiecka-Krusnell J., Lebbad M. (2015). Possible zoonotic transmission of *Cryptosporidium felis* in a household. Infect. Ecol. Epidemiol. 5: 28463.

Blagburn B. L., Lindsay D. S., Hoerr F. J., Atlas A. L., Toivio-Kinnucan M. (1990). *Cryptosporidium* sp. infection in the proventriulus of an Australian diamond firetail finch (*Staganoplura bella*: Pesseriformes, Estrerildidae). Avian Dis. 34: 1027-1030.

Bouزيد M., Hunter P. R., Chalmers R. M., Tyler K. M. (2013). *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. Clin. Microbiol. Rev. 26: 115-134.

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.

Cano L., de Lucio A., Bailo B., Gardona G. A., Muadica A. S., Lobo L., Carmena D. (2016). Identification and genotyping of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. isolates in aquatic birds in the Salburua wetlands, Álava, Nothrn Spain. Vet. Parasitol. 221: 144-148.

Cardozo S. V., Teixeira Filho W. L., Lopes C. W. (2005). [Experimental transmission of *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) isolated of broiler chickens to Japanese quail (*Coturnix japonica*)]. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 14: 119-124.

Carreno R. A., Martin D. S., Barta J. R. (1999). *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than coccidia as shown by phylogenetic analysis of apixomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitol. Res. 85: 899-904.

Cavalier-Smith T. (2014). Gregarine site-heterogeneous 18S rDNA trees, revision of gregarine higher classification, and the evolutionary diversification of Sporozoa. Eur. J. Parasitol. 50: 472-495.

- 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.
- Craczyk T. K., Fayer R., Trout J. M., Lewis E. J., Farley C. A., Sulaiman I., Lal A. A. (1998).** *Giardia* sp. cysts and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in the feces of migratory Canada geese (*Branta canadensis*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2736-2738.
- Current W. L. (1985).** Cryptosporidiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187: 1334-1338.
- Current W. L., Reese N. C. (1986).** A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *J. Protozool.* 33: 98-108.
- Current W. L., Garcia L. S. (1991).** Cryptosporidiosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 325-358.
- Current W. L., Reese N. C., Ernst J. V., Bailey W. S., Melvin B., Heyman M. D., Weinstein W. M. (1983).** Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons — Studies of an outbreak and experimental transmission. *N. Engl. J. Med.* 308: 1252-1257.
- Current W. L., Snyder D. B. (1988).** Development of and serologic evaluation of acquired immunity to *Cryptosporidium baileyi* by broiler chickens. *Poult. Sci.* 67: 720-729.
- 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 interspecies transmission of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Pol. J. Vet. Sci.* 6: 225-228.
- de Lucio A., Bailo B., Aquilera M., Cardona G. A., Fernandés-Crespo J. C., Carmana D. (2017).** No molecular epidemiological evidence supporting

household transmission of zoonotic *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. from pet dogs and cats in the province of Álava, Northern Spain. *Acta Trop.* 170: 48-56.

Dmitrijev J. (1991). Ptáci, známí i neznámí, lovení, chránění. Lidové nakladatelství, Praha.

Elwin K., Hadfield S. J., Robinson G., Crouch N. D., Chalmers R. M. (2012). *Cryptosporidium viatorum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) among travellers returning to Great Britain from Indian subcontinent, 2007-2011. *Int. J. Parasitol.* 42: 675-682.

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 (2000). Presidential address. Global change and emerging infectious diseases. *J. Parasitol.* 86: 1147-1181.

Fayer R., Santín M. (2009). *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet. Parasitol.* 164: 192-200.

Fayer R., Santín M., Macarisin D. (2010). *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 172: 23-32.

Fayer R., Santín M., Trout J. M. (2008). *Cryptosporidium ryanae* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet. Parasitol.* 156: 191-198.

Fayer R., Santín M., Xiao L. (2005). *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91: 624-629.

Fayer R., Trout J. M., Xiao L., Morgan U. M., Lai A. A., Dubey J. P. (2001). *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87: 1415-1422.

Fayer, R., Xiao, L. (2008). Diagnosis, In *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2nd ed. Boca Raton, Publishing CRC Press: 192-200 pp.

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 infection living in Kenya, Malawi, Brasil, the United Kingdom and Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* 41: 1458-1462.

Gatei W., Suputtamongkoi 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.

Gharagozlou M. J., Dezfoulian O., Rahbari S., Bokaie S., Jahanzad I., Razavi A. N. (2006). Intestinal cryptosporidiosis in turkeys in Iran. *J. Vet. Med. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 53: 282-285.

Gomes R. S., Huber F., da Silva S., do Bomfim T. C. (2012). *Cryptosporidium* spp. parasitize exotic birds that are commercialized in markets, commercial aviaries, and pet shops. *Parasitol. Res.* 110: 1363-1370.

Guyot K., Fullet-Dumoulin A., Lelievre E., Sarfati S., Rabodonirina M., Nevez G., Gaillies J. C., Camus D., Dei-Cas E. (2001). Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3472-3480.

Hannes I. S., Gjerde B. K., Forberg T., Robertson L. J. (2007). Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Vet. Parasitol.* 143: 347-353.

Harrison C., Greensmith A. (1993). *Birds of the World*, Dorling Kindersley Limited, London

Holubová N., Sak B., Horčíčková, M., Hlásková, L., Květoňová, D., Menchaca, S., Mcevoy, J., Kváč, M. (2016). *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitol. Res.* 115: 2243-2251.

Huang K., Akiyoshi D. E., Feng X., Tzipori S. (2003). Development of patent infection in immunosuppressed C57/BI6 mice with a single *Cryptosporidium meleagridis* oocyst. *J. Parasitol.* 89: 620-622.

Hudec K. a kolektiv (1994). Fauna ČR a SR, Ptáci – Aves, Díl I (2., přepracované a doplněné vydání). ACADEMIA nakladatelství AV ČR, Praha.

Hunter P. R., Hughes S., Woodhouse S., Raj N., Syed Q., Chalmers R. S., Verlander N. Q., Goodacre J. (2004). Health sequelae of

- human cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *Clin. Infect. Dis.* 39: 504-510.
- Chalmers R. M., Davis A. P. (2010).** Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Exp. Parasitol.* 124: 138-146.
- Chalmers R. M., Elwin K., Hadfield S. J., Robinson J. (2011).** Sporadic Human Cryptosporidiosis Caused by *Cryptosporidium cuniculus*, United Kingdom, 2007–2008. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 536-538.
- Checkley W., White, A. C. Jr., Jaganath D., Arrowood M. J., Chalmers R. M., Chen X., Fayer R., Griffiths J. K., Guerrant R. L., Hedstrom L., Huston C. D., Kotloff K. L., Kang G., Mead R. J., Miller M., Petri W. A. Jr., Priest J. W., Roos D. S., Striepen B., Thomson R. C., Ward H. D., Van Voorhis W. A., Xiao L., Zhu G., Houpt E. R. (2015).** A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *Lancet Infect. Dis.* 15: 85-94.
- Chelladurai J. J., Clark M. E., Kvač 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.* 115: 1901-1906.
- Chen X. M., LaRusso N. F. (2002).** Cryptosporidiosis and the pathogenesis of AIDS-cholangiopathy. *Semin. Liver Dis.* 22: 277-289.
- Cheun H., Cho S., Lee J., Lim Y., Jeon J., Yu J., Kim T., Lee W., Cho S., Lee D., Park M., Jeong H., Chen D., Ji Y., Kwon M. (2010).** Infection Status of Hospitalized Diarrheal Patients with Gastrointestinal Protozoa, Bacteria, and Viruses in the Republic of Korea. *Korean J. Parasitol.* 48: 113-120.
- Chvala S., Fragner K., Hackl R., Hess M., Weissenböck H. (2006).** *Cryptosporidium* infection in domestic geese (*Anser anser* f. *domestica*) detected by in situ hybridization. *J. Comp. Pathol.* 134: 211-218.
- Iseki (1979).** *Cryptosporidium felis* sp. n. (Protozoa: Eimeriorina) from the Domestic cat. *Japanese Journal of Parasitology.* 28: 285-307.
- Jelisson K. L., Distel D. L., Hemond H. F., Schauer D. B. (2004).** Phylogenetic analysis of the hypervariableregion 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.

Ježková J., Horčíčková M., Hlásková L., Sak B., Květoňová D., Novák J., Hofmannová L., McEvoy J., Kváč M. (2016). *Cryptosporidium testudinis* sp. n., *Cryptosporidium ducismarci* Traversa, 2010 and *Cryptosporidium tortoise* genotype III (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in tortoises. *Folia Parasitol.* 63.

Jirků M., Valigurová A., Koudela B., Krížek J., Modrý D., Slapeta J. (2008). New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogene. *Folia Parasitol.* 55: 81-94.

Khan A., Shaik J. S., Grigg M. E. (2017). Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Trop.* doi: 10.1016/j.actatropica.2017.10.023.

Kimura A. Suzuki Y., Matsui T. (2004). Identification of the *Cryptosporidium* isolate from chickens in Japan by sequence analyses. *J. Vet. Med. Sci.* 76: 879-881.

Kubešová L. (2002). Intenzivní chovy divokých kachen. Diplomová práce, Ústav ochrany lesů a myslivosti, Lesnická a dřevařská fakulta, Mendelova Univerzita v Brně.

Kuhn R. C., Channah M. R., Oshima K. H. (2002). Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild ducks along the Rio Grande River Valley in Southern New Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 161-165.

Kváč M., McEvoy J., Stenger B., Clark M. (2014a). Cryptosporidiosis in other vertebrates. In: Cacciò SM, Widmer G (Eds) *Cryptosporidium: parasite and disease*, 1st edn. Springer, Wien, pp 237-326.

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. *PlosOne* 11:e0147090.

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., 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. Parasit. 143: 229-233.

Kváč M., Hofmannová L., Hlásková L., Květoňová D., Vítovec J., McEvoy J., Sak B. (2014b). *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. Vet. Parazit. 201: 9-17.

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.

Levine N. D. (1980). Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. J. Parasitol. 66: 830-834.

Li X., Pereira Md., Larsen R., Xiao C., Phillips R., Striby K., McCowan B., Atwill E. R. (2015). *Cryptosporidium rubeyi* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in multiple Spermophilus ground squirrel species. Int. J. Parasitol Parasites Wildl. 4: 343-350.

Lindsay D. S., Blagburn B. L., Hoerr F. J. (1987). Experimentally induced infections in turkeys with *Cryptosporidium baileyi* isolated from chickens. Am. J. Vet. Res. 48: 104-108.

Lindsay D. S., Blagburn B. L., Hoerr F. J., Smith P. C. (1991). Cryptosporidiosis in zoo and pet birds. J. Protozool. 38: 180S-181S.

Lindsay D. S., Blagburn B. L., Sundermann C. A., Hoerr F. J. (1989). Experimental infections in domestic ducks with *Cryptosporidium baileyi* isolated from chickens. Avian Dis. 33: 69-72.

Lindsay D. S., Hendrix C. M., Blagburn B. L. (1988). Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in opossums (*Didelphis virginiana*). J. Wildl. Dis. 24: 157-159.

- Lindsay D. S., Upton S. J., Owens D. S., Morgan U. M., Mead J. R., Blagburn B. L. (2000).** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. J. Eukaryot. Microbiol. 47: 91-95.
- Lindsay D. S., Blagburn B. L. (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. (2016).** First finding 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.
- Malebranche R., Guérin J. M., Laroche A. C., Elie R., Spira T., Drotman P., Arnoux E., Pierre G. D., Pean-Guichard C., Morisset P. H., Mandeville R., Seemayer T., Dupuy J. M. (1983).** Acquired immunodeficiency syndrome with severe gastrointestinal manifestations in Haiti. Lancet. 2: 873-878.
- 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.
- McLauchlin 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.
- Mireless 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.
- Miláček P., Vítovec J. (1985).** Differential staining of cryptosporidia by aniline-carol-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., Raidai 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., Limor J., Sulaiman I., Raidal S., O'Donoghue P., Gasser R., Murray A., Fayer R., Blagburn B. L., Lal A.**

- A., Thompson R. C. (2001).** Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. *Int. J. Parasitol.* 31: 289-296.
- Morgan-Ryan U. M., Fall A., Ward L. A., Hijjawi N., Sulaiman I., Fayer R., Thompson R. C., Olson M., Lal A., Xiao L. (2002).** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 49: 433-440.
- Musil P., Cepák J. (2004).** Vývoj početnosti hnízdicích populací vodních ptáků v ČR a jeho možné příčiny. *Ochrana přírody* 59: 294-297.
- Musil P., Cepák J., Hudec K., Zárybnický J. (2001).** The long-trends in the breeding waterfowl populations in the Czech Republic. OMPO a Institute of Applied Ecology, Kostelec nad Černými lesy.
- Muthusamy D., Rao S. S., Ramani S., Monica B., Banerjee I., Anraham O. C., Mathai D. C., Primrose B., Muliyl 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., Meireles M. V. (2015).** *Cryptosporidium* in birds—a review. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 24: 253-267.
- 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.
- Navin T. R., Juranek D. D. (1984).** Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic, and parasitologic review. *Rev. Infect. Dis.* 6: 313-27.
- Ng J., Pavlásek I., Ryan U. (2006).** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts (*Struthio camelus*) on a farm in central Vietnam. *Exp. Parasitol.* 133: 8-11.
- O'Donoghue P. J. (1995).** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 25: 139-195.
- Paperna I., Vilenkin M. (1996).** Cryptosporidiosis in the gourami *Trichogaster leeri*: Description of a new species and a proposal for a new genus, *Piscicryptosporidium*, for species infecting fish. 27: 95-101.

- Pavlásek I. (1993).** The black-headed gull (*Larus ridibundus* L.), a new host for *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Vet. Med.* 38: 629-638.
- Pavlásek I., Ryan U. (2008).** *Cryptosporidium varanii* takes precedence over *C. saurophilum*. *Exp. Parasitol.* 118: 434-437.
- Pavlásek, I. (1999).** Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity and the environment. *Rem. Klin. Microbiol.* 3: 290-301.
- Pavlásek I. (2001).** Findings of Cryptosporidia in the stomach of hens and of exotic and wild birds. *Veterinářství* 51: 103-108.
- Pedraza-Diaz 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.
- Pechmanová H., Kreisinger J. (2015).** Rizika vypouštění kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) z umělých chovů do volně žijících populací. *Sylvia* 51: 2-21.
- Plutzer J., Tomor B. (2009).** The role of aquatic birds in the environmental dissemination of human pathogenic *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Hungary. *Parasitol. Int.* 58: 227-231.
- Poonacha K. B., Pippin C. (1982).** Intestinal cryptosporidiosis in a cat. *Vet. Pathol.* 19: 708-710.
- Power M. L., Ryan U. M. (2008).** A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *J. Parasitol.* 94: 1114-1117.
- Prediger J., Horčíčková M., Hofmannová L., Sak B., Ferrari N., Mazzamuto M. V., Romeo C., Wauters L. A., McEvoy J., Kváč M. (2017).** Native and introduced squirrels in Italy host different *Cryptosporidium* spp. *Eur. J. Parasitol.* 61: 64-75.
- Putignani L., Mechinella D. (2010).** Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *cryptosporidium*. *Interdiscipt. Perspect. Infect. Dis.* doi: 10.1155/2010/753512.

- 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.
- Ravaszova P., Halanova M., Goldova M., Valencakova A., Malcekova B., Hurníková Z., Halan M. (2012).** Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in red foxes and brown bear in the Slovak Republic. *Parasitol. Res.* 110: 469-471.
- 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.
- Ren X., Zhao J., Zhang L., Ning C., Jian F., Wang R., Lv C., Wang Q., Arrowood M. J., Xiao L. (2012).** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp. Parasitol.* 130: 274-281.
- Robinson G., Wright S., Elwin K., Hadfield S. J., Katzer F., Bartley P. M., Hunter P. R., Nath M., Innes E. A., Chalmers R. M. (2010).** Re-description of *Cryptosporidium cuniculus* Inman and Takeuchi, 1979 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): morphology, biology and phylogeny. *Int. J. Parasitol.* 40: 1539-1548.
- Ryan U. (2010).** *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Exp. Parasitol.* 124: 113-120.
- Ryan U. M., Monis P., Enemark H. L., Sulaiman I., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thomson R. C., Xiao L. (2004).** *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J. Parasitol.* 90: 769-773.
- 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. M., Xiao L., Read C., Sulaiman I. M., Monis P., Lal A. A., Fayer R., Pavlásek I. (2003b).** A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *J. Parasitol.* 89: 809-813.

- Ryan U. M., Monis P., Enemark H. L., Sulaiman I., Samarasinghe B., Read C., Buddle R., Robertson I., Zhou L., Thompson R. C., Xiao L. (2004),** *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *J. Parasitol.* 90: 769-773.
- Ryan U.M., Papparini A., Tonq K., Yanq 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.
- 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.
- Satoh M., Matsubara-Nihei Y., Sakasi T., Nakai Y. (2006).** Characterization of *Cryptosporidium canis* isolated in Japan. 99: 746-748.
- Séva A. P., Funada M. R., Richtzenhain L., Guimarães M. B., Souza S. O., Allergretti L., Sinhorini J. A., Duarte V. V., Soares R. M. (2011).** Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brasil. *Vet. Parasitol.* 175: 113-117.
- Slavin, D. (1955).** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.* 65: 262-266.
- Sreter T., Varga I. (2000).** Cryptosporidiosis in birds—a review. *Vet. Parasitol.* 87: 261-279.
- Sulaiman I. M., Morgan U. M., Thomson R. C. A., Lal A. A., Xiao L. (2000).** Phylogenetic Relationships of *Cryptosporidium* Parasites Based on the 70-Kilodalton Heat Shock Protein (HSP70) Gene (2000). *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2385-2391.
- Svensson L., Grant Peter J., Mullarney K., Zetterström D. (1999).** BIRD GUIDE, Harper Collins *Publishers*, London.
- Šťastný K., Bejček V. (1989).** Hospodaříme správně s vodní pernatou zvěří? *Myslivost* 7: 154-155.
- Tiangip R., Jongwutiwes S. (2002).** Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV infected patients in Thailand. *Trop. Med. Int. Health* 7: 357-364.

- Točka I. (1972).** Možnosti chovu polodivokých kačic v podmienkach Slovenska. *Folia Venatoria* 2: 329-335.
- Traversa D. (2010).** Evidence for a new species of *Cryptosporidium* infecting tortoises: *Cryptosporidium ducismarci*. *Parasit. Vectors*. 3: 21.
- 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.
- Tyzzar, E. E. (1907).** A sporozoon found in the peptic flanda of the common mouse. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 5: 12-13.
- Tyzzar, E. E. (1910).** An extracullar coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. Et sp. nov.). of the gastric glands of the common mouse. *J. Med. Res.* 23: 487-510.
- Tyzzar, E. E. (1912).** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.). a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26: 394-414.
- Tyzzar, E. E. (1929).** Coccidiosis in gallinaceous birds. *Am. J. Hygiene.* 10: 269.
- Tzipori S., McCartney E., Lawson G. H., Rowland A. C., Campbell I. (1981a).** Experimental infection of piglets with *Cryptosporidium*. *Ret. Vet. Sci.* 31: 358-368.
- Tzipori S., Angus K. W., Campbell I., Sherwood D. (1981c).** Diarrhea in young red deer associated with infection with *Cryptosporidium*. *J. Infect. Dis.* 144: 170-175.
- Tzipori S., Angus K. W., Grey E. W., Campbell I., Alan F. (1981b).** Diarrhea in lambs experimentally infected with *Cryptosporidium* isolated from calves. *Am. J. Vet. Res.* 42: 1400-1404.
- Vetterling J. M., Jervis H. R., Merrill T. G., Sprinz H. (1971).** *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the quinea pig *Cavia porcellus*, with an emendation of the genus. *J. Protozool.* 18: 243-247.
- Vinayak S., Pawlowic M. C., Sateriale A., Brooks C. F., Studstill C. J., Bar-Peled Y., Cipriano M. J., Striepen B. (2016).** Genetic modification of the diarrheal pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Curr. Protoc. Microbiol.* 46: 20.

- Wait L. F., Fox S., Peck S., Power M. L. (2017).** Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*). PloS One 12: e0174994.
- 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., Ryan U. M. (2004).** Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. Curr. Opin. Infect. Dis. 17: 483-490.
- Xiao L., Escalante L., Yang C., Sulaiman I., Escalante A. A., Montali R. J., Fayer R., Lal A. A. (1999).** Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on small-subunit rRNA gene locus. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1578-1583.
- Xiao L., Sulaiman I. M., Ryan U. M., Zhou L., Atwill E. R., Tischler M. L., Zhang X., Fayer R., Lal A. A. (2002).** Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implication for taxonomy and public health. Int. J. Parasitol. 32: 1773-1785.
- 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.
- Yuan L., Yan W., Wang T., Qian W., Ding K., Zhang L., Han L., Shao X. (2014).** Effects of different inoculation routes on the parasit sites of *Cryptosporidium baileyi* infection in chickens. Exp. Parasitol. 145: 152-156.
- Zahedi A., Durmic Z., Gofton A.W., Kueh S., Austen J., Lawson M., Callahan L., Jardine J., Ryan U. (2017).** *Cryptosporidium homai* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporididae) from the guinea pig (*Cavia porcellus*). Vet. Parasitol. 245: 92-101.
- Zha H. B., Jiang J. S. (1994).** Life cycle of *Cryptosporidium meleagridis* in quails. Acta Vet. Zootechn. Sinica 25: 273-278.

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.