

**Jihočeská univerzita v Českých
Budějovicích**

Přírodovědecká fakulta

**DIVERZITA KRYPTOSPORIDIÍ
U PĚVCŮ**

Bakalářská práce

Zlata Limpouchová

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

Školitel specialista: Ing. Nikola Holubová

České Budějovice, 2019

Limpouchová, Z., (2019): Diverzita kryptosporidií u pěvců.
[Diversity of *Cryptosporidium* parasitizing in Passeriformes, Bc. Thesis, in Czech] –
74 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech
Republic

Annotation:

This study was aimed on research of biology and diversity of *Cryptosporidium* in perching birds (Passeriformes). Presence of *Cryptosporidium* oocyst and specific DNA in faecal samples was detected by microscopy and molecular methods using nested PCR. Biological properties and intensity of infection of *Cryptosporidium* were examined and described in both experimentally and naturally infected animals.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47 b 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 3. dubna 2019

.....

Zlata Limpouchová

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala hlavně svému školiteli prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za odborné vedení mé práce, trpělivost a cenné rady. Dále děkuji mé školitelce specialiste Ing. Nikole Holubové, za pomoc při práci. Děkuji také všem pracovníkům Laboratoře veterinární a lékařské protistologie, Parazitického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za jejich ochotu. Dále děkuji ornitologům z Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích za poskytnutí vzorků od ptáků z volné přírody. V neposlední řadě děkuji mé rodině, příteli a přátelům za velikou podporu při studiu a psaní bakalářské práce.

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

Tato práce byla finančně podpořena grantovým projektem GACR 18-12364S (řešitel prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.)

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.2.1. Taxonomie kryptosporidií	5
2.2.2. Vývojový cyklus kryptosporidií	6
2.2.3. Kryptosporidie a kryptosporidióza ptáků	7
2.2.4. Prevence a terapie kryptosporidiózy u ptáků	20
3. CÍLE PRÁCE	22
4. MATERIÁL A METODIKA	23
4.1. Materiál	23
4.1.1 Získávání biologického materiálu z ptáků	23
4.1.2 Zvířata pro experimentální infekce	23
4.2 Metody	24
4.2.1. Barvení nátěru trusu anilin-karbol-methyl-violetí dle Miláčka a Vítovce (1985)	24
4.2.2 Značení oocyst pomocí monoklonálních protilátek (Crypto Cell, Cellabs, Australie)	25
4.2.3 Hodnocení intenzity infekce OPG	26
4.2.4 Izolace DNA z trusu	26
4.2.5 Izolace DNA z tkáně	27
4.2.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	28
4.2.7 Gelová elektroforéza	30
4.2.8 Izolace fragmentů DNA z gelu	31
4.2.9 Sekvenování a fylogenetické analýzy	32
4.2.10 Purifikace oocyst	32
4.2.11 Design experimentu	34
4.2.12 Odběr vzorků, orgánů a tkání	34
5. VÝSLEDKY	38
5.1. Výskyt a prevalence <i>Cryptosporidium</i> spp. u volně žijících pěvců	38
5.2. Diverzita <i>Cryptosporidium</i> spp. u pěvců	38
5.3. Biologické vlastnosti <i>Cryptosporidium galli</i> izolát 36114	43
5.3.1. Morfometrie oocyst	43
5.3.2. Hostitelská specifita	44
5.3.3. Klinické příznaky a patogenita	45

5.3.4. Lokalizace infekce <i>Cryptosporidium galli</i> izolát 36114.....	45
6. DISKUZE.....	47
7. ZÁVĚRY	51
8. LITERATURA	52

1. ÚVOD

Pěvci (Passeriformes) jsou považováni za nejvyvinutější řád z třídy ptáků, především kvůli jejich schopnosti vytvářet hlasové projevy díky hlasovému ústrojí zvanému syrinx. Pěvci se dělí na dva podřády, křikaví a zpěvní. V těchto dvou podřádech najdeme zástupce rozdělené do 83 čeledí, 1161 rodů a 5712 druhů (Veselovský 2001).

Ptáci, stejně jako ostatní živočichové, se potýkají s celou řadou infekčních onemocnění, které jsou vyvolány různými viry, bakteriemi či parazity. Tato práce se zabývá jedním z mnoha parazitárních onemocnění vyskytujících se u všech teplokrevných i studenkrevných obratlovců, kryptosporidiózou. Toto onemocnění vyvolává parazit rodu *Cryptosporidium*, patřící do kmene Apicomplexa (Carreno et al. 1999).

Paraziti rodu *Cryptosporidium* jsou v posledních dvaceti letech intenzivně studováni, avšak více než 70 % všech studií se zaměřuje výhradně na druhy a genotypy parazitující člověka a hospodářská zvířata, kteří však představují jen zlomek rozmanitosti těchto parazitů (Kváč et al. 2014). Z celkového počtu více než ~900 studií se méně než 5 % zabývá kryptosporidii ptáků (zdroj: Web of Science). V posledních několika málo letech se těmito kryptosporidii zabývá stále více vědců ve světě, mezi něž patří i vědecká laboratoř v Českých Budějovicích, ve které jsem tuto práci vypracovala.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Pěvci

Pěvci (Passeriformes) patří k nejpočetnějšímu ptačímu řádu. Zástupci tohoto řádu mají uzpůsobené nohy k sezení na větvi, a proto tyto ptáky považujeme za stromové. Pěvci obývají širokou škálu stanovišť od hustých lesů až po otevřené louky a živí se hlavně ovocem, semeny a bezobratlými živočichy (Caccio et al. 2014).

Trávicí trakt

K příjmu potravy slouží ptákům zobák, který je pokrytý srostlými rohovitými ploténkami. Ptáci nemají měkké patro a ve středu tvrdého patra se nachází trojúhelníková štěrbina vnitřních nozder zvaná choan. Dalším orgánem v ústní dutině je jazyk, který podepírá jazylka. Na spodině ústní dutiny je štěrbinovitý otvor do hltanu, před kterým má většina ptáků rohovité papily, obrácené špičkami směrem do jícnu, takže usnadňují polykání a zabraňují tomu, aby se polykaná potrava vracela zpět. Například alka krabí (*Alle alle*) a hýl růžový (*Carpodacus roseus*) mají na spodině ústní prohlubně, které usnadňují transport potravy. U většiny ptáků jsou dobře vyvinuty slinné žlázy (*glandulae salivales*), které slouží k produkci slin a usnadňují tak polykání. Po ústní dutině následuje hltan (*pharynx*), poté jícen (*oesophagus*). Jícen má u ptáků větší průměr než u savců a nachází se v pravé části krku. Jícen se u většiny ptáků rozšiřuje ve vole (*ingluvies*). Pěvci, stejně jako kachny a kormoráni, mají vole ve tvaru tkalcovského člunku. Funkcí volete je shromažďovat potravu. To umožňuje ptákům nasbírat větší množství potravy najednou. Vole mají jak ptáci živící se rostlinnou potravou, tak i ptáci živící se živočišnou potravou. Krmiví ptáci do volete shromažďují potravu, kterou poté vyvrhují do zobáku mláďat. Dalším důležitým orgánem trávicího traktu je žaludek, který má u ptáků dva oddíly: přední část tvoří žláznatý žaludek (*proventriculus*) a zadní část svalnatý žaludek (*ventriculus*). Vnitřní stěna žláznatého žaludku je složena do podélných záhybů a obsahuje četné žlázy. V této části se vytváří slizovitý sekret, který chrání sliznici žaludku před vlastním natrávením. Druhý typ žláz produkuje kyselinu chlorovodíkovou a trávicí enzym pepsinogen, který se vlivem kyseliny přetváří na pepsin. Ve žláznatém žaludku ptáků dochází k trávení nejen svaloviny, ale i menších kostí.

Svalnatý žaludek odpovídá vývojově žaludku plazů a savců. Na obvodu svalnatého žaludku je systém čtyř pruhovaných svalů: dva protistojné mohutné svaly, které svým stahem drtí potravu, a dva mezi nimi uložené slabší svaly žaludku, jejichž úkolem je posunovat potravu do míst nejvyššího tlaku silných svalů. Výstelka svalnatého žaludku se u ptáků mění podle toho, jakou potravu konzumují. Na svalnatý žaludek navazuje střevo, které je kratší než u savců. První oddíl střevního traktu je tenké střevo skládající se z dvanáctníku (*duodenum*), který se nachází hned za žaludkem a tvoří protáhlou kličku, ve které se nachází slinivka břišní (*pankreas*), jejíž 1–3 vývody ústí do vzestupné větve dvanáctníku. Slinivka je důležitá pro trávení bílkovin, cukrů a tuků, jelikož vyměšuje potřebné enzymy. Slinivka také sekretuje hormon inzulin, který snižuje hladinu cukru v krvi, a hormon glukagon, který naopak hladinu cukru zvyšuje. Další částí tenkého střeva je lačník (*jejunum*) a kyčelník (*ileum*). Na přechodu mezi tenkým a tlustým střevem se u ptáků vyvinula dvě slepá střeva (*caeca*). Ve slepých střevech dochází ke kvašení a pomocí symbiotických bakterií jsou schopni ptáci trávit celulózu a hemicelulózu na mastné kyseliny. Ve špičkách slepého střeva se nacházejí střevní mandle (*tonsillae caecales*). Slepá střeva jsou uzavíratelná samostatnými svěrači a vyprazdňují se řídkěji než tlusté střevo. Výměšek je tmavý a k vyměšování dochází obvykle před náhlým vzletem. Ve slepých střevech se také zachycuje voda, dusíkaté látky a pravděpodobně zde dochází i k syntéze vitaminů (Hudec et al. 1994; Veselovský 2001).

Tlusté střevo (*colon*), ve kterém dochází k resorpci vody a zahuštění tráveniny, je krátké a přímé, a ústí do kloaky. Kloaka představuje zakončení trávicí trubice se společným vyústěním vývodných cest močových a pohlavních a je rozdělena do tří oddílů, které jsou odděleny okružními řasami. První část koprodeum (*coprodaeum*) má vakovitý tvar a shromažďují se v ní výkaly. Do prostředního oddílu, urodeum (*urodaeum*), ústí na malých bradavkách oba močovody a vývody pohlavních žláz. Konečná část proktodeum (*proctodaeum*) je uzavřena okružním řitním svalem a na své hřbetní straně má u mládřat kapsovitý útvar Fabriciovu burzu (*bursa Fabricii*). Jakmile pták dospěje, bursa, která má i funkci brzlíku, zakrňuje až zcela zmizí. V kloace se z výkalů odčerpává ještě voda a některé minerální látky. Kloaka je ukončena uzavíratelným otvorem (*anus*). Výkaly vycházejí z kloaky

současně s močí, která je u ptáků velmi hustá, kašovitá a na trusu vytváří bílý povlak (Hudec et al. 1994; Veselovský 2001).

Migrace pěvců

Díky výborným letovým schopnostem mohou pěvci, stejně jako ostatní ptáci, každoročně létat z areálu hnízdění do zimovišť. Ne všichni pěvci jsou ale tažní, máme i pěvce stálé (Hudec et al. 1994; Veselovský 2001). Mezi střeoevropské stálé pěvce patří například brhlík lesní (*Sitta europaea*), chocholouš obecný (*Galerida cristata*), strnad obecný (*Emberiza citrinella*), vrabec domácí (*Passer domesticus*) a městská populace kosa černého (*Turdus merula*). Zvláštní skupinou ptáků jsou ptáci potulní, u kterých existují populace odlétající na kratší vzdálenosti od místa hnízdění zejména v podzimní a zimní době (Hudec et al. 1994; Jourdain et al. 2007; Veselovský 2001). Do této skupiny patří někteří pěnkavovití (Fringillidae) a sýkory (*Parus* spp.), ale i mezi nimi se občas najdou jedinci, kteří se od místa narození vzdálí daleko (Hudec et al. 1994; Veselovský 2001). Sťahovací ptáci jsou ti, co z hnízdního areálu pravidelně každoročně odlétají na zimoviště a z něho se poté v následujícím jaře vrací zpět do své domoviny. Tahové cesty dělíme podle délky tahu na dlouhé a krátké. Typickými tažnými pěvci s dlouhou tahovou cestou jsou žluvy (*Oriolus* spp.), které jsou u nás na hnízdištích jen 3–4 měsíce, od května do srpna. Dále do této skupiny patří pěnice (*Sylvia* spp.), ťuhýci (*Lanius* spp.), vlaštovky (*Hirundo* spp.), jirčičky (*Delichon* spp.) a lejskové (*Ficedula* spp.). Východosibiřské populace euroasijských druhů pěvců-pěnic (*Sylvia* spp.), rákosníků (*Acrocephalus* spp.), pěvušek (*Prunella* spp.), vlaštovek (*Hirundo* spp.) a drozdů (*Turdus* spp.) zimují v jižní a jihovýchodní Asii. Evropští pěvci s dlouhou tahovou trasou na africký kontinent musejí překonávat vzdálenost až 5000 km. Z Evropských pěvců je to pěnice slavíková (*Sylvia borin*) nebo rákosník zpěvný (*Acrocephalus palustris*), kteří zimují až v Jižní Africe. Pěvci překonávají obvykle vzdálenosti kolem 5000 km během 100 dní. Mezi zástupce sťahovacích pěvců s krátkou tahovou cestou ve střední Evropě patří konipasi (*Motacilla* spp.), drozdí (*Turdus* spp.), skřivani (*Alauda* spp.), budníčci menší (*Phylloscopus collybita*) a špačci (*Sturnus* spp.). Tažnost ptáků ale také závisí na pohlaví, část populace může být tedy stálá a část tažná. Samice většinou odlétají a samci přezimují. V Evropě je takovým příkladem kos černý (*Turdus merula*) a pěnkava obecná (*Fringilla coelebs*) (Hudec et al. 1994; Jourdain et al. 2007; Veselovský 2001).

Příklady přenosu infekcí

Schopnost ptáků migrovat na velké vzdálenosti je důležitá i z pohledu možnosti přenosu různých patogenů. Například u čírek modrých (*Anas querquedula*), které se během zimy shlukují na stejných mokřinách, byl prokázán snazší přenos viru ptačí chřipky na hospodářsky chované ptáky (Jourdain et al. 2007). Obdobně stěhovaví ptáci mohou přenášet také virus newcastleské choroby, ptačí pneumoviry, kachní virus, virus Západonilské horečky nebo virus koňské encefalomyelitidy (Dhama et al. 2008; Jourdain et al. 2007; Prosser et al. 2009; Takekawa et al. 2010). Dále mohou přenášet i bakteriální patogeny jako jsou *Borrelia burgdorferi*, *Chlamyphila psittaci*, *Campylobacter* spp., *Pasteurella multocida* nebo *Salmonella* spp. (Dhama et al. 2008; Jourdain et al. 2007). Kromě virů a bakterií mohou být migrující ptáci zdrojem celé řady původců parazitárních onemocnění, jako jsou právě kryptosporidie nebo bičenky poševní (*Trichomonas vaginalis*) či hlístice (*Nematoda*) (Jourdain et al. 2007; Lawson et al. 2011; Leung et al. 2016).

2.2. Kryptosporidie

Kryptosporidie jsou celosvětově rozšíření paraziti infikující epitelální buňky gastrointestinálního traktu všech tříd obratlovců. Jednotlivé druhy kryptosporidií se liší. Některé druhy infikují výhradně žaludek, zatímco jiné infikují primárně střeva. Druhy se navzájem liší i svou hostitelskou specifikou. Některé druhy infikují širokou řadu hostitelů, zatímco jiné jsou specializovány jen na určité skupiny obratlovců nebo infikují pouze jeden hostitelský druh (Fayer et al. 2007).

2.2.1. Taxonomie kryptosporidií

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou eukaryotické organismy patřící do rodu Apicomplexa. Charakteristickým znakem tohoto kmene je přítomnost apikálního komplexu, který slouží k infekci hostitelské buňky (Fayer et al. 1997). Kryptosporidie byly dlouhou dobu řazeny mezi kokcidie na základě jejich podobnosti vývojového cyklu (Fayer et al. 1997). To, že je toto řazení chybné, ukázaly molekulární analýzy, které potvrdily, že kryptosporidie jsou příbuzné s gregarinami (Carreno et al. 1999).

2.2.2. Vývojový cyklus kryptosporidií

Vývojový cyklus kryptosporidií byl dosud detailně zkoumán pouze u omezeného množství druhů kryptosporidií. U druhů parazitujících u savců byl vývojový cyklus popsán u *C. parvum*, *C. muris* a *C. proliferans* (Melicherová et al. 2013; Tyzzer 1907, 1910, 1912). U kryptosporidií ptáků je znám pouze vývojový cyklus *C. baileyi* (Current et al. 1986).

Životní cyklus kryptosporidií je poměrně komplikovaný a je rozdělen do čtyř fází – excystace (uvolnění sporozoitů z oocysty v místě infekce), merogonie (nepohlavní rozmnožování), gametogonie (pohlavní rozmnožování) a sporogonie (tvorba oocysty) (Fayer et Xiao 2007; Thompson et al. 2005; Tyzzer 1910). Obecně se předpokládá, že nejsou podstatné rozdíly ve vývojovém cyklu jednotlivých druhů kryptosporidií (Current et Blagburn 1990). Nicméně u kostnatých ryb byl popsán odlišný vývojový cyklus, respektive lokalizace vývojových stadií v porovnání s ostatními hostiteli (Ryan et al. 2015; Sunnotel et al. 2006). Zatímco u rybích druhů kryptosporidií, *Cryptosporidium molnari* a *Cryptosporidium huwi*, jsou vývojová stádia uvnitř žaludeční sliznice, případně uvnitř buněk střevního epitelu, u ostatních druhů a genotypů rodu *Cryptosporidium* jsou vývojová stádia lokalizována na povrchu epitelu (Alvarez-Pellitero et al. 2002; Current et Blagburn 1990; Ryan et al. 2015).

Vývojový cyklus *Cryptosporidium baileyi*

Jak bylo výše zmíněno, jediný známý vývojový cyklus kryptosporidií ptačích hostitelů je vývojový cyklus *C. baileyi*, který byl popsán u kuřat (*Gallus gallus*) různého stáří (Current et al. 1986). Vývojový cyklus je u jednodenních kuřat ukončen do 3 dnů. Délka patentní periody u kuřat infikovaných ve věku dvou dnů se pohybuje v rozmezí 4–24 dnů. U kuřat infikovaných ve věku jeden a šest měsíců se patentní perioda pohybuje v rozmezí 4–14 dnů (Current et al. 1986).

Oocysty *C. baileyi* jsou z hostitele vylučovány sporulované, tedy infekční a mají hladkou stěnu s podélným švem (suturou), která směřuje z jednoho pólu oocysty k druhému do třetiny délky oocysty. Při excystaci se tento šev otvírá, stěna oocysty se zhroutí vně oocysty a vytvoří se otvor, kterým uniknou sporozoiti (Current et al. 1986).

V prvních třech dnech po infekci jsou nalezena vývojová stádia *C. baileyi* v kyčelníku a tlustém střevě. Od 4. dne po infekci dochází k rozšíření infekce do kloaky a Fabriciovy burzy. Meronti typu I s osmi merozoity se poprvé objevují 12 hodin po infekci a měří $5,0 \times 4,9 \mu\text{m}$. Meronti typu II se čtyřmi merozoity a velkým granulovaným reziduem se vyvíjejí 48 hodin po infekci a měří $5,1 \times 5,1 \mu\text{m}$. Meronti typu III s osmi krátkými merozoity a velkým homogenním reziduem se poprvé vyvíjejí 72 hodin po infekci a měří $5,2 \times 5,1 \mu\text{m}$ (Current et al. 1986).

Merozoiti III. typu vstupují do fáze pohlavního rozmnožování, dávají vzniknout buď vícejaderným mikrogamontům měřícím $4,0 \times 4,0 \mu\text{m}$, z nichž vzniká 16 mikrogamet, nebo jednojaderným makrogamontům ($4,7 \times 4,7 \mu\text{m}$). Mikrogameta oplodní makrogametu vzniklou z makrogamonta a dochází ke vzniku oocysty ($6,3 \times 5,2 \mu\text{m}$), která sporuluje v hostiteli (Current et al. 1986).

2.2.3. Kryptosporidie a kryptosporidióza ptáků

První zmínka o kryptosporidiových infekcích u ptáků pochází z roku 1929, kdy Tyzzer popsal výskyt kryptosporidií u domácí drůbeže a byl přesvědčen, že se jedná o druh *Cryptosporidium parvum* (poznámka, druh popsaný v roce 1912 z myši domácí (*Mus musculus*)). V roce 1955 popsal Slavin kryptosporidii s oocystami morfologicky podobnými s *C. parvum* a způsobující úhyny mladých krůt jako nový samostatný druh *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin 1955). Po téměř 30 letech od popisu *C. meleagridis* byl popsán druhý druh ptačích kryptosporidií, *Cryptosporidium baileyi* (Current et al. 1986). V roce 1999 byl popsán třetí druh kryptosporidie hostitelsky specifické pro ptáky, *Cryptosporidium galli*, parazitující v proventrikulu hrabavé drůbeže (Pavlásek 1999) a o čtyři roky později byla doplněna další molekulární a biologická data (Ryan et al. 2003a). Jako poslední platný druh byl popsán druh *Cryptosporidium avium* (dříve znám jako *Cryptosporidium avian* genotyp V) u papoušků (Holubová et al. 2016).

Do současné doby byly popsány čtyři výše zmíněné druhy a 21 genotypů kryptosporidií infikujících ptáky, které můžeme rozdělit do dvou monofyletických, morfologicky odlišných skupin, a to kryptosporidie infikující střeva nebo žaludek hostitele. Některé druhy a genotypy střevních kryptosporidií infikují také epitel plic, Fabriciovy burzy nebo ledviny (Tabulka 1).

Tabulka 1. Lokalizace vývojového cyklu jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií parazitujících u ptáků.

Druh/genotyp kryptosporidie	Lokalizace		Reference
	v trávicím traktu	mimo trávicí trakt	
<i>C. meleagridis</i>	tenké, slepé a tlusté střevo	-	Slavin et al. 1995
<i>C. baileyi</i>	tenké a tlusté střevo	spojivka, plíce, nosohltan, průdušnice, průdušky, kloaka, Fabriciova burza	Current et al. 1986
<i>C. galli</i>	žláznatý žaludek	-	Pavlásek et al. 1999; Ryan et al. 2003a
<i>C. avium</i>	tenké a tlusté střevo	ledviny, močovod, kloaka	Holubová et al. 2016
avian genotyp I	střevo	-	Ng. et al. 2006
avian genotyp II	střevo	-	Meireles et al. 2006; Ng. et al. 2006
avian genotyp III	žaludek	-	Ng. et al. 2006
avian genotyp IV	žaludek	-	Ng. et al. 2006
avian genotyp VI	žláznatý žaludek	-	Chelladurai et al. 2016
avian genotyp VII	střevo	-	Helmy et al. 2017
avian genotyp VIII	střevo	-	Helmy et al. 2017
avian genotyp IX	střevo	-	Helmy et al. 2017
duck genotyp	dvanáctník, lačník, kyčelník	-	Morgan et al. 2001
Euroasian woodcock genotyp	žláznatý žaludek	-	Ryan et al. 2003b
goose genotyp I	střevo	-	Xiao et al. 2002
goose genotyp II	dvanáctník, lačník, kyčelník	-	Jellison et al. 2004, Zhou et al. 2004
goose genotyp III	střevo	-	Jellison et al. 2004
goose genotyp IV	střevo	-	Jellison et al. 2004
finch genotyp I	žaludek	-	Morgan et al. 2001
finch genotyp II	žaludek	-	Morgan et al. 2001
finch genotyp III	žaludek	-	Morgan et al. 2001
LC310796	střevo	-	Makino et al. 2018

***Cryptosporidium baileyi* Current, Upton et Haynes, 1986**

Cryptosporidium baileyi bylo popsáno roku 1986 u brojlerových kuřat (Current et al. 1986).

Hostitelská specifita: *Cryptosporidium baileyi* patří mezi druhy se širokou hostitelskou specifikou. Přirozené infekce tímto druhem byly popsány u celé řady hostitelů patřících do různých řádů (Abe a Iseki 2004; Fayer et al. 2007; Chvala et al. 2006; Jellison et al. 2004; Kimura et al. 2004; Lindsay et Blagburn 1990; Nakamura 2009; Pavlásek 1993; Qi et al. 2011; Ryan et al. 2003b). Seznam ptačích hostitelů *C. baileyi* patřících do jednotlivých řádů je uveden níže.

Řád pěvci (Passeriformes)

V řádu pěvci bylo *C. baileyi* detekováno u amadiny Gouldové (*Erythrura gouldiae*), bulbula šedobřichého (*Pycnonotus cyaniventris*), chocholouše obecného (*Galerida cristata*), kanára divokého (*Serinus canarius*), majny chocholaté (*Acridotheres cristatellus*), majny obecné (*Acridotheres tristis*), rýžovníka šedého (*Lonchura oryzivora*), snovače Jacksonova (*Ploceus jacksoni*), straky obecné (*Pica pica*), šafránky velké (*Sicalis flaveola*), timálie čínské (*Leiothrix lutea*), vlvovce červenohřbetého (*Cacicus haemorrhous*), vlvovce chocholatého (*Psarocolius decumanus*) a zebřičky pestré (*Taeniopygia guttata*) (Fayer et al. 2007; Li et al. 2016; Nakamura 2009; Ng et al. 2006; Qi et al. 2011; Ryan et al. 2003b).

Řád papoušci (Psittaciformes)

U ptáků patřících do řádu papoušci byla infekce nalezena u alexandra malého (*Psittacula krameri*), amazoňana zelenolícího (*Amazona viridigenalis*) a korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) (Abe a Iseki 2004).

Řád dlouhokřídlí (Charadriiformes)

Infekce *C. baileyi* byla detekována pouze u racka chechtavého (*Larus ridibundus*) (Pavlásek 1993).

Řád krátkokřídlí (Gruiformes)

V rámci tohoto řádu byla infekce *C. baileyi* nalezena pouze u jeřába bělošíjého (*Grus vipio*) a jeřába popelavého (*Grus grus*) (Ng et al. 2006).

Řád veslonozí (Pelecaniformes)

Z řádu veslonozí bylo *C. baileyi* nalezeno u kormoránů (*Phalacrocorax* spp.) (Jellison et al. 2004).

Řád hrabaví (Galliformes)

V rámci řádu hrabaví byly infekce *C. baileyi* detekovány u koroptve polní (*Perdix perdix*), krocana domácího (*Meleagris gallopavo* f. *domestica*), křepelky japonské (*Coturnix japonica*) a kura domácího (*Gallus gallus* f. *domestica*) (Kimura et al. 2004).

Řád vrubozobí (Anseriformes)

Z řádu vrubozobí bylo *C. baileyi* nalezeno u hus domácích (*Anser anser* f. *domestica*) a kachen divokých (*Anas platyrhynchos*) (Chvala et al. 2006; Laatanma et al. 2017).

Řád pštrosi (Struthioniformes)

U ptáků patřících do řádu pštrosi bylo *C. baileyi* detekováno u pštrosa dvouprstého (*Struthio camelus*) (Wang et al. 2011).

Experimentálně bylo *C. baileyi* přeneseno do bažanta obecného (*Phasianus colchicus*), kachny domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*), křepelky japonské (*Coturnix japonica*) a orebice čukar (*Alectoris chukar*) (Current et al. 1986; Lindsay et Blagburn 1990; Lindsay et al. 1987).

Vývojový cyklus: viz kapitola 2.4.1.

Lokalizace: Tato nejčastěji diagnostikovaná ptačí kryptosporidie postihuje nejen trávicí trakt svého hostitele, ale také spojivku, plíce, nosohltan, průdušnice, průdušky, střevo, kloaku a Fabriciovu burzu (Abbassi et al. 1999; Current et al. 1986; Lindsay et Blagburn 1990).

Morfologie a morfometrie: Oocysty *C. baileyi* měří 6,0–7,2 μm (průměr 6,3 μm) \times 4,8–5,4 μm (průměr 5,2 μm) s poměrem délky k šířce 1,4 (1,1–1,8) (Current et al. 1986).

Klinické příznaky a patogenita: Ke klinickým příznakům patří potíže s dýcháním, kýchaní a výtok z nosu. Na následky této infekce jedinci často uhynou (van Zeeland et al. 2008). Vysoká mortalita způsobená infekcí dýchacího traktu byla zaznamenána u brojlerových kuřat (Lindsay et Blagburn 1990).

Diferenciální diagnostika: Morfologie a morfometrie oocyst kryptosporidií není spolehlivým diagnostickým znakem. *Cryptosporidium baileyi* lze odlišit od ostatních druhů a genotypů kryptosporidií na základě částečných sekvencí genů kódujících malou podjednotku rRNA (SSU), 70 kDa heat shock protein (HSP70), protein stěny oocysty (COWP) a aktin (Morgan et al. 2001; Sulaiman et al. 2000, 2002; Xiao et al. 1999).

Zoonotický potenciál: *Cryptosporidium baileyi* pravděpodobně není infekční pro člověka. V roce 1991 byl popsán případ infekce *C. baileyi* u člověka, ale přítomnost *C. baileyi* byla prokázána pouze mikroskopicky. Vzhledem k tomu, že morfologie a morfometrie oocyst kryptosporidií není spolehlivým diagnostickým znakem, nelze spolehlivě určit o jakou kryptosporidii se skutečně jednalo (Ditrich et al. 1991).

***Cryptosporidium meleagridis* Slavin, 1955**

Cryptosporidium meleagridis bylo popsáno roku 1955 u krůt (Slavin 1955). Pravděpodobně se jedná o kryptosporidii, jejíchž původními hostiteli byli savci, a která se mezi ptáky dostala pozřením infikované kořisti (Xiao et al. 2002).

Hostitelská specifita: *Cryptosporidium meleagridis* je infekční nejen pro ptáky, ale i pro savce včetně člověka (Morgan et al. 2000a). Přírozenými ptačími hostiteli *C. meleagridis* jsou pěvci, papoušci, měkkozobí a hrabaví (Akiyoshi et al. 2003; Baroudi et al. 2013; Darabus et al. 2003; Huber et al. 2007; Li et al. 2015; Máca et Pavlásek 2015; Morgan et al. 2000a, 2001; Qi et al. 2011; Ryan et al. 2003b; Sreter et al. 2000; Wang et al. 2012, 2014). Seznam ptačích hostitelů *C. meleagridis* patřících do jednotlivých řádů je uveden níže.

Řád pěvci (Passeriformes)

Z řádu pěvci bylo *C. meleagridis* detekováno u brkoslava severního (*Bombycilla garrulus*) (Qi et al. 2011).

Řád papoušci (Psittaciformes)

Z řádu papoušků byla přirozená infekce prokázána u alexandra malého (*Psittacula krameri*) a korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) (Abe et Makino 2010; Morgan et al. 2000).

Řád měkkozobí (Columbiformes)

Infekce *C. meleagridis* byla detekována u holuba skalního (*Columba livia*) a hrdličky východní (*Streptopelia orientalis*) (Qi et al. 2011).

Řád hrabaví (Galliformes)

Z řádu hrabavých byla infekce *C. meleagridis* popsána u krůt domácích (*Meleagris gallopavo* f. *domestica*), kura domácího (*Gallus gallus* f. *domestica*) a orebice rudé (*Alectoris rufa*) (Baroudi et al. 2013; Máca et Pavlásek 2015).

Experimentálně bylo *C. meleagridis* úspěšně přeneseno na krůtata (*Meleagris gallopavo* f. *domestica*) a kuřata (*Gallus gallus* f. *domestica*), králíky (*Oryctolagus cuniculus* f. *domesticus*), myši (*Mus musculus*), potkany (*Rattus norvegicus*), prasata (*Sus scrofa* f. *domestica*) a telata (*Bos taurus*) (Akiyoshi et al. 2003; Darabus et Olariu 2003; Huang et al. 2003; O'Donoghue 1995).

Vývojový cyklus: Detailní vývojový cyklus *C. meleagridis* není znám. U 30denních krůt infikovaných *C. meleagridis* byla vývojová stádia nalezena nejvíce v kyčelníku a Fabriciově burze (Tacconi et al. 2001), ale infekce *C. meleagridis* postihla také slepé střevo a tračník (Bermudez et al. 1988; Current et al. 1986; Lindsay et al. 1989).

Morfologie a morfometrie: Oocysty *C. meleagridis* měří 4,5–6,0 μm (průměr 5,2) \times 4,2–5,3 μm (průměr 4,6) s poměrem délky k šířce 1,1 (1,0–1,3) (Sreter et al. 2000).

Klinické příznaky a patogenita: *Cryptosporidium meleagridis* způsobuje infekci gastrointestinálního traktu a projevuje se v různých stupních enteritidy (Gharagozlu et al. 2006; Ryan et al. 2003b). Jedinci s kryptosporidiózou trpí hubnutím a vodnatými průjmy (Gharagozlu et al. 2006; Slavin 1955).

Diferenciální diagnostika: Morfologie a morfometrie oocyst kryptosporidií není spolehlivým diagnostickým znakem. *Cryptosporidium meleagridis* má morfometricky identické oocysty s *C. parvum*, za které bylo často v minulosti zaměňováno (Champlaud et al. 1998; Sreter et Varga 2000). *Cryptosporidium*

meleagridis lze odlišit od ostatních druhů a genotypů kryptosporidií na základě částečných sekvencí genů kodujících SSU, HSP70, COWP a aktin. Jednotlivé izoláty *C. meleagridis* je možné od sebe odlišit na základě sekvence genů kódujících 60 kDa glykoprotein (GP60) (Leoni et al. 2006; Morgan et al. 2000a, 2001; Sreter et al. 2000; Sulaiman et al. 2000, 2002; Xiao et al. 1999, 2000, 2002).

Zoonotický potenciál: *Cryptosporidium meleagridis* je jediným ptačím druhem infikujícím savce včetně člověka (Alves et al. 2003; Cama et al. 2003; McLauchlin et al. 2000; Xiao et al. 2004). U člověka je *C. meleagridis* třetím nejčastěji se vyskytujícím druhem (Cama et al. 2003; Coupe et al. 2005; Enemark et al. 2002; Gatei et al. 2002, 2003, 2006a, 2006b; Guyot et al. 2001; Leoni et al. 2003, 2006; Matos et al. 2004; McLauchlin et al. 2000; Morgan et al. 2000b; Muthusamy et al. 2006; Pedraza-Diaz et al. 2001; Tiangtip et al. 2002; Xiao et al. 2001; Xiao et al. 2004; Yagita et al. 2001).

***Cryptosporidium galli* Pavlásek, 1999**

Cryptosporidium galli bylo popsáno Pavláskem roku 1999 v proventrikulu kuřat a poté roku 2003 revidováno Ryanovou a kolektivem (Pavlásek 1999; Ryan et al. 2003a).

Cryptosporidium galli bylo nalezeno u různých ptačích řádů. Nejvíce se však vyskytuje u pěvců a papoušků (Akiyoshi et al. 2003; Darabus 1997; Darabus et al. 2003; Sréter et al. 2000).

Hostitelská specifita: *Cryptosporidium galli* bylo nalezeno u zástupců pěti řádů (níže).

Řád pěvci (Passeriformes)

Infekce způsobená *C. galli* byla zjištěna u mnoha ptačích druhů patřících do řádu pěvci a to u amadiny diamantové (*Stagonopleura guttata*), astrilda rudokrkého (*Emblema pictum*), brkoslava severního (*Bombycilla garrulus*), čížka žlutého (*Carduelis tristis*), drozda rezavobřichého (*Turdus rufiventris*), hýla křivčího (*Pinicola enucleator*), kanára divokého (*Serinus canarius*), kardinála dominikánského (*Paroaria dominicana*), kněžíka šedobílého (*Sporophila schistacea*), louskače menšího (*Oryzoborus angolensis*), panenky hnědoprsé

(*Lonchura castaneothorax*), pěnkavy obecné (*Fringilla coelebs*), saltatora zelenokřídleho (*Saltator similis*), sojkovce drozdovitého (*Garrulax canorus*), šafránky velké (*Sicalis flaveola*) a vlhovce červenokřídleho (*Agelaius phoeniceus*) (Fayer et al. 2007; Chelladurai et al. 2016; Li et al. 2016; Morgan et al. 2001; Nakamura et al. 2009; Ng et al. 2006; Qi et al. 2011; Ryan et al. 2003a; Séva Ada et al. 2011).

Řád papoušci (Psittaciformes)

U papoušků bylo *C. galli* nalezeno u Aymary pruhované (*Bolborhynchus lineola*), kanára divokého (*Serinus canaria*), korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) neofémy tyrkysové (*Neophema pulchella*) a rozely pestré (*Platycercus eximus*) (Antunes et al. 2008; Ferrari et al. 2018; Iijima et al. 2018).

Řád plameňáci (Phoenicopteriformes)

Z řádu plameňáci bylo *C. galli* popsáno u plameňáka růžového (*Phoenicopus ruber*) (Ng et al. 2006).

Řád hrabaví (Galliformes)

Infekce *C. galli* byla detekována u bažanta obecného (*Phasianus colchicus*), kura domácího (*Gallus gallus* f. *domestica*) a tetřeva hlušce (*Tetrao urogallus*) (Máca et Pavlásek 2016; Marhoon et al. 2015).

Řád měkkozobí (Columbiformes)

Infekce *C. galli* byla detekována u hrdličky černouché (*Zenaida auriculata*) (Seixas et al. 2017).

Řád zoborožci (Bucerotiformes)

V rámci řádu zoborožci bylo *C. galli* popsáno u dvojzoborožce velkého (*Buceros rhinoceros*) (Ng et al. 2006).

Vývojový cyklus: Vývojový cyklus *C. galli* není popsán.

Morfologie a morfometrie: Oocysty mají elipsoidní tvar a měří 8,0–8,5 µm (průměr 8,3 µm) × 6,2–6,4 µm (průměr 6,3 µm). Poměr délky k šířce je 1,3. Uvnitř oocyst je zbytkové tělísko, které měří 3,6–4,0 µm a obsahuje obvykle 3 granula. Dvě z těchto granul jsou obvykle větší (1,6 µm) a jsou proti sobě. Zbývající granulum je menší

(0,5–0,8 µm). Zbytkové tělísko je obklopeno čtyřmi sporozoity ve tvaru banánů (Pavlásek 1999).

Klinické příznaky a patogenita: *Cryptosporidium galli* infikuje proventrikulus (Morgan et al. 2001) a je hlavní příčinou průjmu a úhynů (Blagburn et al. 1990). Studie provedená Morganovou a kol. (2001) ukázala, že amadina diamantová (*Stagonopleura guttata*) infikovaná *C. galli* trpěla dehydratací v důsledku poruchy gastrointestinálního traktu a na tyto následky kryptosporidiózy uhynula.

Diferenciální diagnostika na molekulární úrovni: Přestože oocysty *C. galli* jsou významně větší než oocysty ostatních druhů kryptosporidií parazitujících u ptáků, mohou být zaměněny s oocystami *Cryptosporidium avian* genotyp IV (níže, Ng et al. 2006). *Cryptosporidium galli* lze odlišit od ostatních druhů a genotypů kryptosporidií na základě částečných sekvencí genů kódujících SSU, HSP70 a aktin (Ryan et al. 2003 a).

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

Cryptosporidium avium Holubová, Sak, Horčíčková, Hlásková, Květoňová, Menchaca, McEvoy et Kváč, 2016

Cryptosporidium avium, dříve známý jako *Cryptosporidium avian* genotyp V, byl poprvé popsán u korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) v Japonsku (Abe et Makino 2010). V roce 2016 byly doplněny morfologické, biologické a molekulární vlastnosti nezbytné k popsání nového druhu (Holubová et al. 2016).

Hostitelská specifita: Infekce byla nalezena u ptáků patřících do řádů papoušci a hrabaví.

Řád papoušci (Psittaciformes)

Přirozenými hostiteli jsou agapornis růžohrdlý (*Agapornis roseicollis*), amazoňan modročelý (*Amazona aestiva*), andulka vlnkovaná (*Melopsittacus undulatus*), kakadu inka (*Lophochroa leadbeateri*), kakariki rudočelý (*Cyanoramphus novaezealandiae*) a korela chocholátá (*Nymphicus hollandicus*) (Abe et Makino 2010; Curtiss et al. 2015; Nakamura et al. 2014; Qi et al. 2011; Zhang et al. 2015).

Řád hrabaví (Galliformes)

Z řádu hrabavých bylo *C. avium* popsáno u kura domácího (*Gallus gallus* f. *domestica*) (Wang et al. 2014).

Experimentálně bylo *C. avium* infekční pro různé věkové skupiny kura domácího (*Gallus gallus* f. *domesticus*) a andulky vlnkované (*Melopsittacus undulatus*) (Holubová et al. 2016).

Vývojový cyklus: Vývojový cyklus *C. avium* není znám.

Morfologie a morfometrie: Oocysty měří 5,3–6,9 μm (v průměru 6,7 μm) \times 4,3–5,5 μm (v průměru 4,9 μm) s poměrem délky k šířce 1,29 (1,14–1,47) (Holubová et al. 2016).

Klinické příznaky a patogenita: Infekce *C. avium* postihuje kyčelník, slepé střevo, kloaku, ledviny a močovod (Holubová et al. 2016). Ptáci infikovaní *C. avium* nevykazují žádné klinické příznaky kryptosporidiózy (Holubová et al. 2016; Ng et al. 2006).

Diferenciální diagnostika: Oocysty *C. avium* nelze morfometricky odlišit od oocyst dalších ptačích druhů a genotypů kryptosporidií jako například *C. baileyi* a *Cryptosporidium* avian genotyp II (Holubová et al. 2016; Meireles et al. 2006; Ng et al. 2006; Qi et al. 2011). Na molekulární úrovni lze *C. avium* odlišit od ostatních druhů a genotypů kryptosporidií na základě částečných sekvencí genů kódujících SSU, HSP70 a aktin (Holubová et al. 2016).

Zoonotický potenciál: *Cryptosporidium avium* je výhradně ptačí druh a nepostihuje žádné jiné obratlovce.

***Cryptosporidium* avian genotyp I**

Infekce způsobená *Cryptosporidium* avian genotypem I byla diagnostikována pouze u kanára divokého (*Serinus canaria*) a páva korunkatého (*Pavo cristatus*) (Nakamura et al. 2009; Ng et al. 2009). V současné době nejsou známy žádné bližší informace o biologických vlastnostech této kryptosporidie.

Diferenciální diagnostika: *Cryptosporidium* avian genotyp I byl odlišen od ostatních druhů a genotypů kryptosporidií na základě částečných sekvencí genů kódujících SSU a aktin (Nakamura et al. 2009).

Zoonotický potenciál: *Cryptosporidium* avian genotyp I nebyl dosud identifikován u žádných jiných obratlovců než u ptáků.

***Cryptosporidium* avian genotyp II**

Cryptosporidium avian genotyp II byl nalezen u pštrosů a dále několika druhů papoušků konkrétně u alexandra velkého (*Psittacula eupatria*), aratingy kropenaté (*Aratinga leucophthalma*), aratingy sluneční (*Aratinga solstitialis*), elektuse různobarvého (*Eclectus roratus*), kakadu inka (*Cacatua leadbeateri*), kakadu růžového (*Eolophus roseicapilla*), korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) a papouška alexandřina (*Polytelis alexandrae*) (Meireles et al. 2006; Ng et al. 2006; Nguyen et al. 2013; Santos et al. 2005; Seva et al. 2011).

Diferenciální diagnostika: Stejně jako *Cryptosporidium* avian genotyp I byl i *Cryptosporidium* avian genotyp II odlišen od ostatních druhů a genotypů kryptosporidií na základě částečných sekvencí genů kódujících SSU a aktin (Nakamura et al. 2009).

Zoonotický potenciál: *Cryptosporidium* avian genotyp II nebyl dosud identifikován u žádných jiných obratlovců než u ptáků.

***Cryptosporidium* avian genotyp III**

Cryptosporidium avian genotyp III byl nalezen u několika druhů papoušků jako je agapornis růžohrdlý (*Agapornis roseicollis*), aratinga sluneční (*Aratinga solstitialis*), kakadu růžový (*Eolophus roseicapilla*) a korela chocholatá (*Nymphicus hollandicus*). Dále byl nalezen u zástupců z řádu pěvci, a to u krásky červenozobé (*urocissa*

erythrorhyncha) a rýžovníka šedého (*Padda oryzivora*) (Gomes et al. 2012; Makino et al. 2010; Nakamura et al. 2009; Nakamura et al. 2014; Ng et al. 2006; Qi et al. 2011).

Klinické příznaky a patogenita: U agapornise růžohrdlého infikovaného *Cryptosporidium* avian genotypu III bylo popsáno zvracení a úbytek váhy (Makino et al. 2010).

Diferenciální diagnostika: *Cryptosporidium* avian genotyp III byl odlišen od ostatních druhů a genotypů kryptosporidií na základě částečných sekvencí genů kódujících SSU a aktin. Nejvíce příbuzný je k Eurasian woodcock genotypu, *C. serpentis* a *C. galli* (Ng et al. 2006).

Zoonotický potenciál: *Cryptosporidium* avian genotyp III nebyl dosud identifikován u žádných jiných obratlovců než u ptáků.

***Cryptosporidium* avian genotyp IV**

Cryptosporidium avian genotyp IV byl popsán u kruhoočka japonského (*Zosterops japonicus*) z České republiky, u něhož byly jako příznaky kryptosporidiózy pozorovány průjem a anorexie (Ng et al. 2006). *Cryptosporidium* avian genotyp IV byl odlišen od ostatních druhů a genotypů kryptosporidií na základě částečných sekvencí genů kódujících SSU a aktin (Ng et al. 2006). V současné době nejsou známy žádné bližší informace o biologických vlastnostech této kryptosporidie.

***Cryptosporidium* avian genotyp VI**

Cryptosporidium genotyp VI byl popsán u vlhovce červenokřídlého (*Agelaius phoeniceus*) (Chelladurai et al. 2016). *Cryptosporidium* avian genotyp VI byl odlišen od ostatních druhů a genotypů kryptosporidií na základě částečných sekvencí genů kódujících SSU a aktin (Ng et al. 2006). V současné době nejsou známy žádné bližší informace o biologických vlastnostech této kryptosporidie.

***Cryptosporidium* avian genotyp VII-IX**

Cryptosporidium genotypy VII-IX byly nalezeny u kuřat a krůt v Německu a byly odlišeny od ostatních druhů a genotypů kryptosporidií na základě částečných sekvencí genů kódujících SSU (Helmy et al. 2017). Další informace nejsou známy.

***Cryptosporidium* duck genotyp**

Cryptosporidium duck genotyp byl popsán u řádu vrubozobých, konkrétně u kachny tmavé (*Anas rubripes*) (Morgan et al. 2001) a husy kanadské (*Branta canadensis*) (Zhou et al. 2004) a byl odlišen od ostatních druhů a genotypů kryptosporidií na základě částečných sekvencí genů kódujících SSU a HSP70 (Morgan et al. 2001; Zhou et al. 2004). V současné době nejsou známy žádné bližší informace o biologických vlastnostech této kryptosporidie.

***Cryptosporidium* Eurasian woodcock genotyp**

Cryptosporidium Eurasian woodcock genotyp byl popsán u sluky lesní (*Scolopax rusticola*) a byl odlišen od ostatních druhů a genotypů kryptosporidií na základě částečných sekvencí genů kódujících SSU a aktin (Ng et al. 2006). U sluky lesní infikované tímto genotypem nebyly pozorovány žádné příznaky kryptosporidiózy (Ng et al. 2006).

V současné době nejsou známy žádné bližší informace o biologických vlastnostech této kryptosporidie.

***Cryptosporidium* goose genotyp I–IV**

V trusu husy kanadské (*Branta canadensis*) získaných z 13 lokalit v Ohio a v Illinois byly detekovány dva nové ptačí genotypy, goose genotyp I a goose genotyp II. *Cryptosporidium* goose genotyp II je fylogeneticky příbuzný goose genotypu I a duck genotypu. V dalších studiích na huse kanadské (*Branta canadensis*) byly popsány goose genotyp III a goose genotyp IV (Jellison et al. 2004). *Cryptosporidium* goose genotypy I–IV byly odlišeny od ostatních druhů

a genotypů kryptosporidií na základě částečných sekvencí genů kódujících SSU (Jellison et al. 2004; Zhou et al. 2004). Klinické příznaky infekce nebyly popsány ani u jednoho z těchto genotypů (Jellison et al. 2004; Zhou et al. 2004).

***Cryptosporidium* finch genotyp I–III**

Cryptosporidium finch genotypy I–III byly popsány u amadiny Gouldové (*Erythrura gouldiae*) (Morgan 2001).

2.2.4. Prevence a terapie kryptosporidiózy u ptáků

Kryptosporidióza je časté parazitární onemocnění obratlovců včetně ptáků. Proto by neměla být opomíjena ani prevence a terapie kryptosporidiových infekcí.

Vzhledem k tomu, že dosud neexistují žádné 100% účinné veterinární léčivé přípravky (Fayer et al. 2007), je prevence primárně založena na zabránění přenosu infekčních oocyst na jedince, a to buď prostorovou izolací, nebo inaktivací oocyst v prostředí.

Oocysty vylučované infikovanými zvířaty jsou vždy sporulované a plně infekční. Navíc jsou velmi odolné a zůstávají infekce schopné po dlouho dobu. Laboratorní studie ukázaly, že oocysty skladované ve vodných roztocích o teplotě 15–20 °C přežijí až 3 měsíce a ve vodných roztocích o teplotě 4–6 °C až jeden rok (Tzipori 1983). Z toho plyne, že běžné teplotní podmínky, ve kterých jsou chovány hospodářsky významní a zájmoví ptáci nejsou pro kryptosporidie devitalizující. Jednou z možností, jak inaktivovat oocysty kryptosporidií je zahřívání oocyst, respektive prostředí, ve kterém se nacházejí na teplotu 65 °C po dobu alespoň 30 minut (Tzipori 1983). Účinné je také vyschnutí trvající nejméně 4 hodiny (Robertson et al. 1992). Také zmrazení oocyst výrazně snižuje jejich životaschopnost, ale některé oocysty zůstávají infekční i jeden měsíc při teplotě -22 °C (Robertson et al. 1992).

Nejčastěji používané dezinfekční prostředky nejsou účinné při použití v koncentracích doporučených výrobcem (Sundermann et al. 1987). Komerčně dostupné desinfekční prostředky na bázi amoniaku jsou účinné při použití

v koncentraci 50 % (v/v), ale více než 5 % oocyst zůstává životaschopných. Podobně při použití desinfekčních prostředků na bázi chloru (5,25% chlornan sodný) zůstává více než 15 % oocyst životaschopných (Sundermann et al. 1987).

Jak bylo zmíněno, v současné době není žádná účinná chemoterapie pro léčbu kryptosporidiózy ptáků. V mnoha studiích byla otestována řada léčiv na ptačí kryptosporidiózu, ale žádná se však neukázala jako účinná. Experimentální studie ukázaly, že nejčastěji používané antikokcidiální látky, ať už používané samostatně nebo v kombinaci s dihydrochinolinovým antioxidačním duokvinem, nezabránily respiračnímu onemocnění u kuřat, která byla inokulována oocystami *C. baileyi* (Lindsay et Blagburn, 1990; Varga et al. 1995). Stejně tak veterinární léčivé přípravky na bázi oxytetracyklinu, neomycinu a furazolidonu neměly žádný vliv na léčbu střevního onemocnění u křepela virginského (*Colinus virginianus*) infikovaného *Cryptosporidium* sp. (Hoerr et al. 1986). U kuřat infikovaných *C. baileyi* byla nadále testována účinnost látek halofuginon, salinomycin, lasalocid a monensin, ale ani tyto látky neměly žádný léčebný účinek (Lindsay et al. 1987). Další studie zkoumala účinky vyvolané lidským rekombinantním interleukinem-1 beta (hrIL-1 beta) a inhibítorem prostaglandinu indomethacinem na průběh infekce *C. baileyi* u kuřat (Hornok et al. 1999). Parenterální aplikace hrIL-1 beta snížila vylučování oocyst na 6 %, infekce měla podobný průběh u léčených a kontrolních ptáků (Hornok et al. 1999). Aplikace indometacinu zamíchaného do krmiva kuřat infikovaných *C. baileyi* snižovala množství vylučovaných oocyst na 13,7 % a zkrátila trvání infekce (Hornok et al. 1999).

3. CÍLE PRÁCE

- Zpracovat literární rešerši o tématu
- Popsat diverzitu a prevalenci kryptosporidií u volně žijících pěvců v České republice
- V případě záchytu nových genotypů kryptosporidií popsat jejich morfologii, lokalizaci v hostiteli a hostitelskou specifitu
- Porovnat dosažené výsledky s literaturou a vyvodit závěry s ohledem na epizootologii kryptosporidióz

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Materiál

Pro parazitologické vyšetření byl použit trus pěvců z České republiky (lokality v okolí Českých Budějovic a Třeboně), Chorvatska (Vranské jezero), Jihoafrické republiky (okolí města Sovenga) a Nového Zélandu (okolí města Christchurch).

4.1.1 Získávání biologického materiálu z ptáků

Ve spolupráci s ornitology byli pěvci odchyťováni do ornitologických sítí. Ptáci byli poté vloženi do čistých ornitologických pytlíků nebo do jednorázových papírových sáčků a ihned po vykání byli puštěni zpět do volné přírody. V případě potřeby byli vybraní jedinci dopraveni do zvěřince Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. a umístěni do ptačích klecí a voliér odpovídajících velikostí podle zákona 246/1992 Sb. Zákon na ochranu zvířat proti týrání ve znění pozdějších předpisů.

Individuální vzorky trusu byly umístěny do jednorázových, sterilních uzavíratelných mikrozkmavek, opatřeny popisem a uskladněny v lednici při teplotě 4° C až do doby dalšího zpracování (4.2.1.–4.2.3).

4.1.2 Zvířata pro experimentální infekce

K experimentálním pokusům bylo použito devět dospělých kusů sýkory koňadry (*Parus major*), pět jedno-denních kuřat kura domácího (*Gallus gallus f. domestica*) a pět osmitýdenních SCID myši (*Mus musculus*).

Všechna zvířata použitá k experimentálním účelům byla chována ve zvěřinci Parazitologického ústavu BC AVČR, v.v.i. Sýkory byly chovány v ptačích klecích velikostně odpovídajících potřebám chovaných ptáků. Kuřata byla chována v plastových chovných nádobách a SCID myši byly chovány v chovných nádobách pro hlodavce. Všechna zvířata byla krmena a napájena *ad libitum* sterilním krmením odpovídajícím druhu zvířete a sterilní vodou. Zdravotní stav zvířat byl kontrolován dvakrát denně, klece a chovné nádoby byly denně čištěny.

4.2 Metody

4.2.1. Barvení nátěru trusu anilin-karbol-methyl-violetí dle Miláčka a Vítovce (1985)

Přítomnost oocyst kryptosporidií ve vzorcích trusu byla prokazována pomocí specifického barevní nátěru anilin-karbol-methyl violetí dle Miláčka a Vítovce (1985).

Chemikálie:

- roztok methylvioleti
 - 0,6 g methyl violeti
 - 1 ml anilinu
 - 1 g fenolu
 - 30 ml alkoholu
 - 70 ml deionizované vody
- roztok 2% kyseliny sírové
- tartrazin (1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové)

Pracovní postup:

1. Na podložní sklíčko udělat slabý nátěr trusu.
2. Sklíčko s nátěrem zafixovat methanolem v plameni.
3. Zafixovaná sklíčka barvit v roztoku methylvioleti po dobu 30 minut.
4. Sklíčka opláchnout vodou.
5. Diferencovat v 2 % kyselině sírové po dobu 1 minuty.
6. Sklíčka opláchnout vodou a dobarvit v tartrazinu po dobu 10 minut.
7. Sklíčka opláchnout vodou a usušit.
8. Prohlížet skla světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Vyhodnocení:

Oocysty kryptosporidií se barví temně fialově na žlutém, žlutohnědém nebo světle fialovém pozadí (záleží na typu vzorku).

4.2.2 Značení oocyst pomocí monoklonálních protilátek (Crypto Cell, Cellabs, Austrálie)

Oocysty kryptosporidií ve vzorcích trusu byly detekovány pomocí fluorescenčně značených monoklonálních protilátek proti stěně oocysty.

Chemikálie:

- Crypto Cell reagent – fluorescenčně značené specifické monoklonální protilátky proti stěně oocysty
- Mounting fluid

Pracovní postup:

1. Na jamkové sklo kápnout 20 μ l vzorku a nechat zaschnout.
2. Fixovat 5 minut v metanolu, nechat zaschnout při laboratorní teplotě.
3. Přidat 10 μ l Crypto Cell Reagentu.
4. Sklíčko inkubovat v temnu ve vlhké komůrce po dobu 30 minut při teplotě 37 °C.
5. Sklíčko omýt 1 minutu v PBS.
6. Sklíčko osušit (může být uchováno 24 hodin při 2–8 °C).
7. Před prohlížením kápnout na sklíčko 10 μ l mouting fluid, překrýt krycím sklíčkem.
8. Prohlížet skla fluorescenčním mikroskopem s filtrem WB 515 nm při zvětšení 1000 \times za použití imerzního oleje.

Vyhodnocení:

Oocysty kryptosporidií mají zelenou fluorescenci na tmavém pozadí.

4.2.3 Hodnocení intenzity infekce OPG

U mikroskopicky pozitivních vzorků byla intenzita infekce stanovena jako počet oocyst na gram trusu (OPG) (Kváč et al. 2007).

Pracovní postup:

1. Podložní sklo před nátěrem zvážit na 3 desetinná místa.
2. Na zvážená skla udělat nátěr trusu.
3. Sklo s nátěrem trusu opět zvážit na 3 desetinná místa.
4. Vypočítat hmotnost nátěru.
5. Spočítat počet oocyst na skle obarveném anilin-karbol-methyl violetí.
6. Vypočítat počet oocyst na 1 gram trusu.

4.2.4 Izolace DNA z trusu

Celková genomová DNA byla vyizolována z trusu pomocí komerčně dodávaného kitu GeneAll® Exgene™ Stool DNA mini (GeneAll Biotechnology, co., Ltd., Soul, Jižní Korea).

Materiál: 1,5 ml mikrozkušavky Safe-Lock Tube, skleněné kuličky, zirkonové kuličky, FL pufr, 0,7 ml mikrozkušavky EzPass, 0,7 ml mikrozkušavky mini spin kolonky, EB pufr, PB pufr, NW pufr

Pracovní postup:

1. Vzorek trusu dát do Safe-Lock Tube, přidat 0,5 ml skleněných kuliček (0,5 mm) a 3 zirkonové kuličky (1,0 mm).
2. Ke vzorku napipetovat 1 ml FL pufru.
3. Zvortexovat a zhomogenizovat vzorek v Bead Beateru (FastPrep MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
4. Po homogenizaci nechat vzorek inkubovat při laboratorní teplotě 5 minut.
5. Centrifugovat 5 minut při 14 000 g.
6. Veškerý supernatant přepipetovat na mikrozkušavku EzPass, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.

7. Vylít odpad ze sběrné části EzPass mikrozkušavky, napipetovat 100 µl EB pufru na kolonku, 1 minutu inkubovat při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
8. Vyhodit kolonku, do sběrné mikrozkušavky napipetovat 500 µl PB pufru, promíchat pipetováním, přenést všechnen obsah na mini spin kolonku, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
9. Vylít obsah ze sběrné mikrozkušavky a na střed kolony napipetovat 500 µl NW pufru, centrifugovat 1 minutu.
10. Vylít obsah ze sběrné mikrozkušavky a opět centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
11. Přenést kolonku na čistou mikrozkušavku a napipetovat 200 µl EB pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifugovat 1 minutu při 14 000 g.
12. Vyizolovanou DNA v mikrozkušavce skladovat při teplotě -20 °C.

4.2.5 Izolace DNA z tkáně

Izolace z tkáně (vzorky orgánů) byla provedena pomocí DNeasy Blood & Tissue kitu (QIAGEN). Tkáň byla vyizolována z důvodu detekce specifické DNA kryptosporidií v jednotlivých orgánech.

Materiál: Tkáň, 1,5 ml mikrozkušavky, skleněné a zirkonové kuličky, mini spin kolonka, ATL pufr, proteináza K, AL pufr, EtOH, AW 1 pufr, AW 2 pufr, AE pufr

Pracovní postup:

1. Do mikrozkušavky nastříhat asi 10 mg tkáně.
2. Přidat 0,5 ml skleněných kuliček (0,5 mm) a 3 zirkonové kuličky (1,0 mm).
3. Připipetovat 180 µl ATL pufru, vortexovat.
4. Homogenizovat vzorek pomocí beadbeateru (FastPrep MP Biomedicals) 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
5. Centrifugovat přibližně 10 sekund při 6 000 g, připipetovat 20 µl proteinázy K.
6. Inkubovat 1 hodinu při 56 °C, během inkubace pravidelně míchat.

7. Centrifugovat 10 sekund při 6 000 g.
8. Připipetovat 200 µl AL pufru, vortexovat.
9. Připipetovat 200 µl 96 % EtOH, vortexovat, centrifugovat 10 sekund při 6 000 g.
10. Veškerý supernatant přepipetovat na Mini spin kolonku, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g.
11. Vylít odpad ze sběrné zkumavky.
12. Připipetovat 500 µl AW1 pufru, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g, odstranit odpad ze sběrné zkumavky.
13. Připipetovat 500 µl AW2 pufru, centrifugovat 1 minutu při 14 000 g, odstranit odpad ze sběrné zkumavky.
14. Sběrné zkumavky vyhodit, nahradit je novými mikrozksamavkami, přímo na membránu kolony napipetovat 200 µl AE pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 8 000 g.
15. Vyizolovanou DNA v mikrozksamavce skladovat při teplotě -20 °C.

4.2.6 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Vyizolovaná DNA byla použita pro amplifikaci genů kódujících malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) (Jiang et al. 2005), aktin (Sulaiman et al. 2002) a 70 kDa Heat Shock Protein (HSP70) (Chelladurai et al. 2016).

Celkový objem jednotlivých reakčních směsí činil pro primární i sekundární PCR reakci 30 µl. V každé reakci byla využita negativní kontrola (PCR voda) a pozitivní kontrola (*Cryptosporidium parvum* a *Cryptosporidium muris*).

Pro primární i sekundární PCR reakci byl namíchán mastermix, který byl posléze rozpipetován do mikrozksamavek, do kterých byla přidána vyizolovaná DNA z vyšetřovaných vzorků. Vše vortexováno, centrifugováno a vloženo do cycleru na příslušnou teplotu. V tabulce 2 jsou zaznamenány sekvence specifických primerů pro jednotlivé geny.

Tabulka 2. Nukleotidové sekvence specifických primerů pro amplifikaci částečné sekvence genů kodujících malou podjednotku rRNA (SSU), aktin a 70 kDa Heat Shock Protein (HSP70).

SSU (Jiang et al. 2005)

Primární reakce – nasedací teplota 50 °C

F1 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'

R1 3'-AGGACAAAGTTCCTTTACCC-5'

Sekundární reakce – nasedací teplota 55 °C

F2 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'

R2 5'-AAGGAGTAAGGAACAACCTCCA-3'

AKTIN (Sulaiman et al. 2002)

Primární reakce – nasedací teplota 50 °C

F1 5'-ATGRGWGAAGAAGWARYWCAAGC-3'

R1 3'-TAACA KGTGTCTTTYACRAAGA-5'

Sekundární reakce – nasedací teplota 45 °C

F2 5'-CAAGCWTRGTTGTTGAYAA-3'

R2 3'-GGTWSWTAACA KGTGTCTTT-5'

HSP70 (Chelladurai et al. 2016)

Primární reakce – nasedací teplota 50 °C

HSP70AvAF1 5'-GCT CGT GGT CCT AAA GAT AA-3'

HSP70AvAR1 5'-ACG GGT TGA ACC ACC TAC TAA-3'

Sekundární reakce – nasedací teplota 50 °C

HSP70AvAF2 5'-ACA GTT CCT GCC TAT TTC-3'

HSP70AvAR2 5'-GCT AAT GTA CCA CGG AAA TAA TC-3'

4.2.7 Gelová elektroforéza

Chemikálie:

- 50× TAE pufr (242 g tris báze, 47,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA)
- agaróza (Biotech, Heidelbergr, Německo)
- ethidium-bromid (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, USA)
- 100 bp DNA Ladder (O'Gene Ruler™, Biogen, Londýn, Velká Británie)

Příprava gelu:

1. Pro gelovou elektroforézu byl připraven 1% agarozový gel.
2. Naváženou agarozu smíchat s naměřeným TAE pufrém v Erlenmeyerově baňce a dát do mikrovlnné trouby, dokud se všechna agaróza nerozpustí.
Nosič malý: 0,4 g / 40 ml TAE pufr
Nosič střední: 0,8 g / 80 ml TAE pufr
Nosič velký: 1,2g / 120 ml TAE pufr
3. Erlenmeyerovu baňku s gelem ochladit pod tekoucí vodou na teplotu, kdy je udržitelná v ruce.
4. Přidat 1 µl EtBr (0,2 µg/ml), roztok promíchat.
5. Nalít agarozový gel do nosiče, vložit hřeben a gel nechat 5–10 minut ztuhnout.
6. Po ztuhnutí vložit gel do elektroforetické vany tak, aby starty ležely u záporné elektrody.
7. Po vyjmutí hřebenu nanést do vzniklých jamek PCR produkty, do první jamky nanést velikostní marker (100 bp) (O'Gene Ruler™, Biogen, Londýn, Velká Británie).
8. Nechat gel vyvíjet

4.2.8 Izolace fragmentů DNA z gelu

Produkty gelové elektroforézy byly vyizolovány pomocí komerčního kitu Gen Elute (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) podle níže uvedeného postupu.

Materiál: 1,5 ml mikrozkušavky, Binding kolonka G, Gel Solubilization Solution, PCR voda, Column Preparation Solution, isopropanol, Wash Solution G

Pracovní postup:

1. Vyříznout fragment DNA z gelu a vložit do mikrozkušavky.
2. Do mikrozkušavky s fragmentem připipetovat 500 μ l Gelu Solubilization Solution a nechat inkubovat 10 minut při 50 °C.
3. Kontrolovat rozpouštění a každé 2–3 minuty promíchat.
4. Dát inkubovat PCR vodu na 65 °C.
5. Sestavit Binding kolonku G, napipetovat 500 μ l Column Preparation Solution a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
6. Ke vzorku s DNA napipetovat 150 μ l isopropanolu, promíchat a veškerý objem přenést na Binding kolonku G.
7. Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
8. Vylít odpad ze sběrné zkumavky a sběrnou zkumavku opět použít s kolonou, na kolonu napipetovat 700 μ l Wash Solution G, centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
9. Vylít odpad ze sběrné zkumavky a opět ji použít s kolonou, centrifugovat bez přídavku jakýchkoli roztoků 1 minutu při 16 000 g.
10. Mikrozkušavku v centrifuze otočit o 180° a centrifugovat 3 minuty při 16 000 g.
11. Vložit kolonu do nové mikrozkušavky a provést eluci 30 μ l PCR vody předehřáté na 65 °C, inkubovat 1 minutu, centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
12. Získaný fragment DNA v mikrozkušavce uchovávat v lednici při teplotě 4 °C do té doby, než známe výsledky sekvencí.

4.2.9 Sekvenování a fylogenetické analýzy

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány za použití sekundárních primerů. K sekvenaci byl použit ABI BigDye Terminator v 3.1. Cycle Sequencing kit a sekvenátor ABI3130. Výsledné sekvence byly ručně upraveny v programu ChromasPro v 2.15. a uspořádány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank pomocí online serveru MAFFT verze 7 s automatickým výběrem seřazování strategie (MAFFT, <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) (Kato et Standley 2013). Následně byly sekvence ručně zkontrolovány v programu BioEdit 7.0.5.3. (Hall 1999) (BioEdit Sequence Alignment Editor) a byly provedeny fylogenetické analýzy za použití programu MEGA 6.0. (Tamura et al. 2013). Fylogenetické vztahy byly vytvořeny pomocí metody Maximum likelihood (ML) substitučním modelem, který nejlépe vyhovuje testovaným souborům sekvencí na základě Bayesiánského informačního kritéria. Podpora všech větví pro všechny modely byla získána 1000 bootstrapovými replikacemi. Fylogenetické stromy byly do finální podoby upraveny pomocí programu CorelDraw X7 (Corel Corporation, Ottawa Kanada).

4.2.10 Purifikace oocyst

Trus pozitivní na kryptosporidie byl homogenizován v třecí misce a přečištěn na sacharózovém gradientu (4.2.10.1.) a dočištěn pomocí cesium chloridového gradientu (4.2.10.2.).

4.2.10.1 Sacharózový gradient (Arrowood et Stearling 1987)

Chemikálie:

- Sheaterův roztok: deionizovaná voda (dH_2O), cukr (259 ml deionizované vody a 405 g cukru)
- PBS Tween: PBS, Tween (1% Tween 20 v PBS (1 l deionizované vody; 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$; 2,4 g KH_2PO_4))

Pracovní postup:

1. Trus homogenizovat v třecí misce a přecedit přes sítko.
2. Do zkumavek navrstvit gradient
 1. vrstva 30 ml Sheater 1+2 (1 díl Sheater + 2 díly PBS Tween)
 2. vrstva 30 ml Sheater 1+4 (1 díl Sheater + 4 díly PBS Tween)
 3. vrstva 15 ml vzorku
3. Centrifugovat 20 minut při 1370 g.
4. Slít supernatant do čistých zkumavek, sediment vyhodit.
5. Doplnit zkumavky se supernatantem deionizovanou vodou a centrifugovat 20 minut při 1370 g.
6. Vodní vývěvou odsát obsah zkumavek na ½ a poté doplnit deionizovanou vodou a centrifugovat 20 minut při 1370 g. Tento omývací proces provést 2×.
7. Sedimenty uchovat v PBS při 4 °C.

4.2.10.2 Cesium chloridový gradient (Arrowood et Donaldson 1996)

Chemikálie:

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

Pracovní postup:

1. Do mikrozkušavky napipetovat 1 ml CsCl.
2. Na roztok CsCl navrstvit 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
3. Centrifugovat při 20 °C 3 minuty při 16 000 g.
4. Supernatant přepipetovat do 50 ml zkumavek, sediment vyhodit.
5. Zkušavku doplnit dH₂O a centrifugovat při 20 °C 20 minut při 1370 g.
6. Odsát supernatant na objem 5 ml.
7. Doplnit zkušavku dH₂O, vortexovat a centrifugovat při 20 °C 20 minut při 1370 g. Tento proces opakovat 3×.
8. Oocysty uchovat v dH₂O při 4 °C.

4.2.11 Design experimentu

Každé zvíře bylo perorálně infikováno dávkou 500 000 oocyst resuspendovaných v 200 µl deionizované vody. Trus experimentálních zvířat byl individuálně odebírán od 2. dne po infekci (DPI) po dobu 30 dnů. Trus byl následně vyšetřen na přítomnost oocyst kryptosporidií mikroskopicky pomocí specifického barvení. Z každého vzorku byla vyizolována DNA a provedena amplifikace genu SSU.

Ptáci, kteří byli vnímaví k infekci, byli usmrceni v den největší intenzity infekce. Odebrané jednotlivé části orgánů byly podrobeny dalším vyšetřením pomocí molekulárních a histologických metod.

4.2.12 Odběr vzorků, orgánů a tkání

Trus pro parazitologické vyšetření byl odebírán od experimentálních zvířat každých 24 hodin po dobu 30 dnů po infekci. Trus byl odebírán do 2 ml zkumavek (každá zkumavka měla řádné označení o jaké zvíře jde a z jakého dne trus pochází) a uskladňován při 4 °C. Z trusu byl nadále udělán nátěr na podložní sklíčko a část trusu byla použita na izolaci DNA.

4.2.12.1 Příprava histologických preparátů

Vzorky vnitřních orgánů (plíce, trachea, jícen, proventrikulus, ventrikulus dvanáctník, lačník, kyčelník, slepá střeva, kolon, kloaka, ledviny, játra) experimentálně infikovaných zvířat byly odebrány 14. den ze sýkor koňader a 25. den z kurů domácích a 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)
- 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 odvodňovat I. vzestupnou řadou, po 60 minutách vyměnit roztok.
2. V posledním roztoku nechat 90 minut.
3. Prosytit 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 zalít do čistého parafinu, vytvořit bločky. Poté zhotovit 5 µm silné histologické řezy a připravit preparáty na podložní sklíčko a nechat 24 hodin na plotně o teplotě 42 °C.
5. Preparáty odparafinovat alkoholovou sestupnou zavodňovací řadou vždy po 5 minutách.
6. Vzorky nabarvit (barvení hematoxylin-eosin) a po barvení pokračovat v odvodňování II. alkoholovou vzestupnou řadou vždy po 5 minutách, v karboxylenech ponechat 1 minutu.
7. Vzorky zamontovat do kanadského balzámu a ponechat k sušení při teplotě 42 °C.
8. Poté prohlížet mikroskopem (Olympus IX70) vhodným zvětšením.

Barvení hematoxylin-eosin

Chemikálie:

- hematoxylin
- dH₂O
- síran hlinito-amonný
- jodičnan sodný
- kyselina octová
- eosin

Pracovní postup:

1. Vzorky barvit 10 minut v hematoxylinu (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 oplachovat pod tekoucí vodou.
3. 5 minut barvit vzorky v eosinu (0,5 g eosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) + 250 ml dH₂O + 10 ml kyseliny octové).

Barvení periodic acid shiff (PAS)

Chemikálie:

- Schiffovo reagens (100 ml H₂O, 1 g basický fuchsin, 10 ml 1N kyselina chlorovodíková, 1 g pyrosiřičitan draselný, 0,5 g aktivního uhlí)
- siřičitá voda (5 ml 1N kyseliny chlorovodíkové, 0,5 g pyrosiřičitan draselný, 100 ml destilované H₂O)
- roztok kyseliny jodisté (0,8 g ve 100 ml destilované H₂O)
- hematoxylin
- 96% alkohol
- butylalkohol
- xylen

Postup:

1. Připravit odparifinované řezy.
2. Řezy vložit do roztoku kyseliny jodisté na 10 minut.
3. Oplachovat 10 minut pod tekoucí vodou.
4. Vložit do Schiffova reagens na 30 minut.
5. Oplachovat 5 minut v lázni siřičité vody.
6. Oplachovat 15 minut pod tekoucí vodou.
7. Ponořit do hematoxylinu na 1–2 minuty.
8. Opláchnout v 96% alkoholu, butylalkoholu a xylenu.

Montování nabarvených řezů

Postup:

1. Na preparát na podložním skle kápnout kapku kanadského balzámu.
2. Přiložit krycí sklíčko tak, aby se nevytvořily vzduchové bubliny.
3. Případné bublinky vytlačit mírným tlakem na krycí sklíčko.
4. Hotový preparát vložit do termostatu (37 °C), kde zaschne montovací medium.

4.2.12.2 Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii

Chemikálie:

- 3 % glutaraldehyd
- 0,1M kakodylátový pufr
- 2 % oxid osmičelý
- Acetonová řada (25 %, 75 % a 100 % roztok)

Pracovní postup:

1. Fixovat vzorky sliznice orgánů v glutaraldehydu v kakodylátovém pufru při 4 °C přes noc.
2. Promýt vzorky v kakodylátovém pufru 3× 15 minut.
3. Fixovat vzorky v oxidu osmičelém v kakodylátovém pufru po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě.
5. Promýt vzorky v kakodylátovém pufru 3× 15 minut.
6. Po dehydrataci vzestupnou acetonovou řadou vzorky vysušit metodou kritického bodu (CPD).
7. Vysušené vzorky nalepit pomocí oboustranné lepící pásky na hliníkový terčík.
8. Nalepené vzorky pozlatit a prohlížet pomocí elektronového mikroskopu JOEL JSM-7401F-FE SEM.

5. VÝSLEDKY

V průběhu let 2017–2019 bylo získáno celkem 757 vzorků trusu volně žijících pěvců, z toho 338, 344, 20 a 55 vzorků v České republice, Chorvatsku, na Novém Zélandu a v Jihoafrické republice.

5.1. Výskyt a prevalence *Cryptosporidium* spp. u volně žijících pěvců

Z celkového počtu 757 vyšetřených vzorků bylo 12 a 20 vzorků trusu pozitivních na přítomnost oocyst, respektive specifické DNA kryptosporidií. Všechny vzorky, u nichž byla prokázána přítomnost oocyst mikroskopickým vyšetřením, byly také pozitivní na přítomnost specifické DNA kryptosporidií. Z celkového počtu 45 vyšetřených druhů pěvců byly kryptosporidiové infekce detekovány pouze u 8 druhů, konkrétně u čížka lesního (*Carduelis spinus*), mlynaříka dlouhoocasého (*Aegithalos caudatus*), pěvušky modré (*Prunella modularis*), u tří drozdů zpěvných (*Turdus philomelos*), pěnkavy obecné (*Fringilla coelebs*), u deseti sýkor koňader (*Parus major*) z České republiky, vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) z Chorvatska, amadiny páskované (*Amadina fasciata*) z Jihoafrické republiky a vrabce polního (*Passer montanus*) z Nového Zélandu (Tabulka 3 a Tabulka P1- příloha).

5.2. Diverzita *Cryptosporidium* spp. u pěvců

Z celkového počtu 20 pozitivních vzorků bylo získáno 20 částečných sekvencí genu kódujícího SSU kryptosporidií, 19 částečných sekvencí genu kódujícího aktin a 17 částečných sekvencí genu kódujícího HSP70. Fylogenetické analýzy genu SSU prokázaly přítomnost tří různých sekvencí SSU. Sekvence SSU získaná z vlaštovky obecné (ID 40314) vytvořila dobře podpořenou skupinu s žaludečními kryptosporidiemi, *C. muris* a *C. proliferans*, parazitujícími u savců. Sekvence námi získaného genotypu, pracovně nazvaného „swallow genotyp“ se od *C. muris* a *C. proliferans* lišila v 15 nukleotidových pozicích (97,2–98,0% sekvenční identita). Sedm sekvencí bylo identických s *C. baileyi* (GenBank referenční číslo AF093495) a dvanáct sekvencí klastrovalo k druhu *C. galli*, přičemž pouze dva izoláty, z vrabce polního (identifikační číslo vzorku (ID) 26178) a amadiny páskované (ID 21515), byly identické s dříve publikovanými sekvencemi (např. HM116388, obrázek 1). Ostatní sekvence klastrující k *C. galli* vytvořily dvě dobře podpořené skupiny (Obrázek 1). Sekvenční identita mezi jednotlivými izoláty klastrujícími k *C. galli*

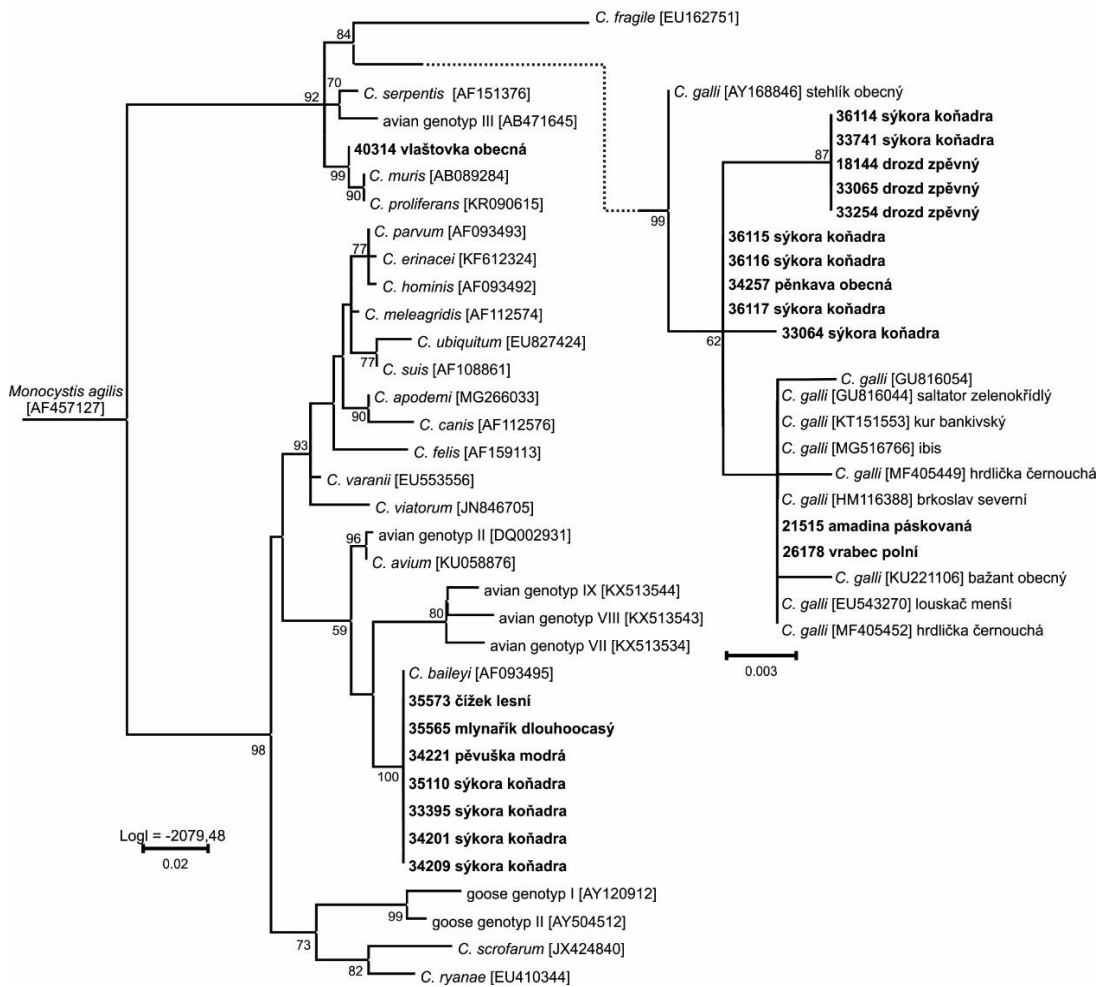
se pohybovala v rozmezí 98,9–99,5 %. Na rozdíl od fylogenetických analýz SSU, analýzy založené na sekvencích genů kódujících aktin a HSP70 ukázaly 100% identitu všech tzv. *C. galli* izolátů (obrázky 2–3). Obdobně všechny izoláty označené jako *C. baileyi* měly vzájemně identické sekvence genů pro aktin a HSP70 geny a současně byly shodné s referenčními sekvencemi uloženými v Genbank (obrázky 2–3). U swallow genotypu se nám nepodařilo amplifikovat sekvence genů kódujících aktin a HSP70.

Intenzita infekce u mikroskopicky pozitivních vzorků se pohybovala v rozmezí od 1500 do 7500 oocyst na gram trusu (Tabulka 3).

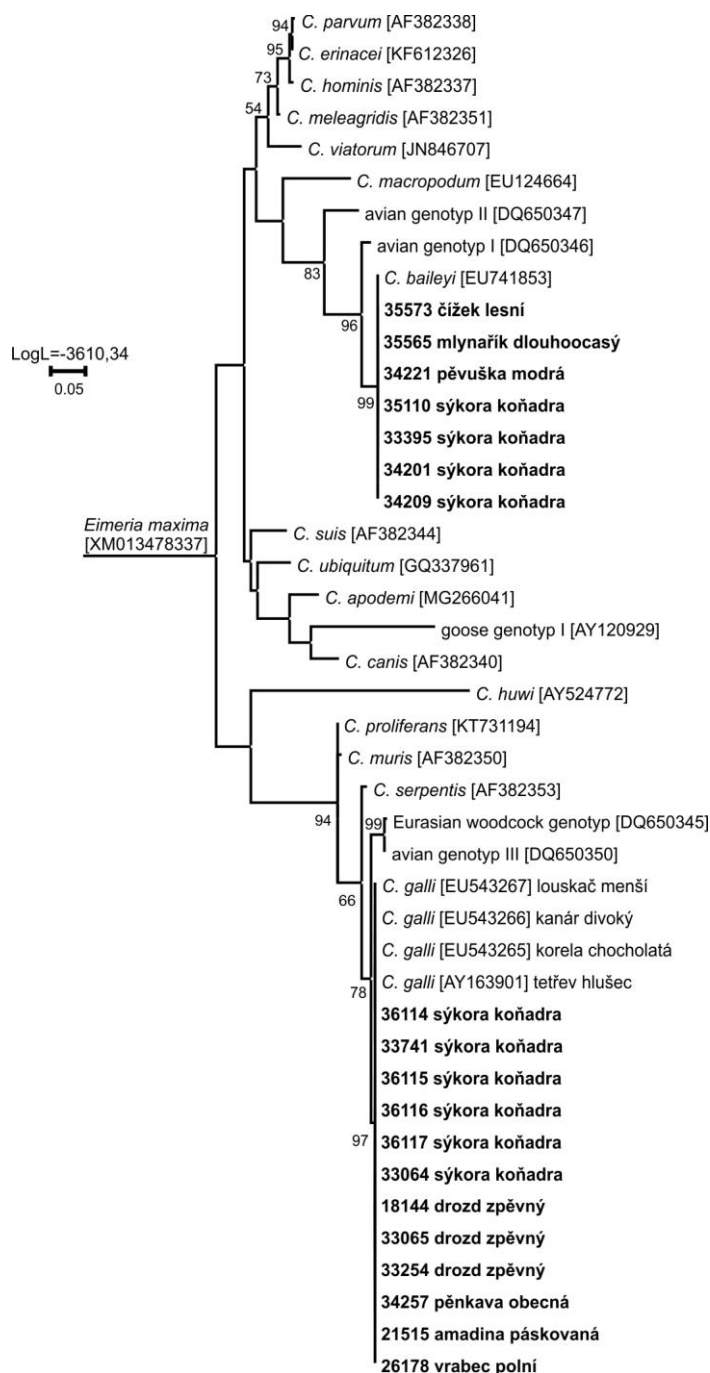
Tabulka 3. Druhy a genotypy kryptosporidií detekované u přirozeně infikovaných druhů pěvců na základě částečných sekvencí genů kódujících malou podjednotku rRNA (SSU), aktin a 70 kDa Heat Shock Protein (HSP70), včetně lokality odchyty a hostitele.

Hostitel	Identifikační číslo vzorku	Lokalita	Mikroskopické vyšetření (počet oocyst na gram trusu)	Genotypizace		
				SSU	aktin	HSP70
čížek lesní	35573	CZE	2909	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
mlynařík	35565	CZE	1455	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
dlouhoocasý	34221	CZE	0	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
pěvuška modrá	35110	CZE	1455	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
sýkora koňadra	33395	CZE	4364	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
sýkora koňadra	34201	CZE	0	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
sýkora koňadra	34209	CZE	1455	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
drozd zpěvný	33254	CZE	0	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>
drozd zpěvný	18144	CZE	0	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>
drozd zpěvný	33065	CZE	0	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>
pěnkava obecná	34257	CZE	1455	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>
sýkora koňadra	33741	CZE	2909	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>
sýkora koňadra	36114	CZE	1455	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>
sýkora koňadra	36115	CZE	7273	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>
sýkora koňadra	36116	CZE	2909	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>
sýkora koňadra	36117	CZE	1455	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>
sýkora koňadra	33064	CZE	1455	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>
vrabec polní	26178	NZL	0	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>	NS
amadina páskovaná	21515	ZAF	0	<i>C. galli</i>	<i>C. galli</i>	NS
vlaštovka obecná	40314	HRV	0	swallow genotype	NS	NS

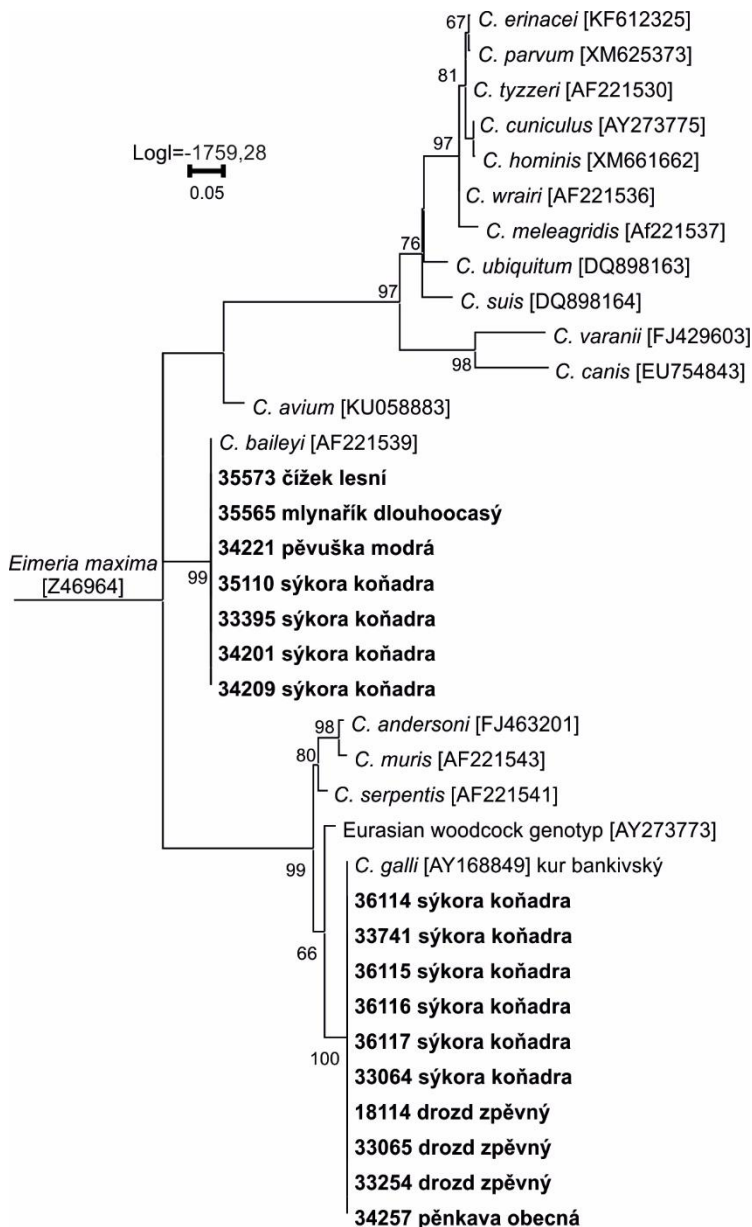
Obrázek 1. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z pěvců v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu kódujícího malou ribozomální podjednotku vytvořený metodou Maximum likelihood spočítaný dle modelu Tamura 3-parameter (T92+G+I). Sekvence získané v této studii jsou tučně zvýrazněny.



Obrázek 2. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z pěvců v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu pro aktin vytvořený metodou Maximum likelihood spočítaný dle modelu General Time Reversible (GTR+G+I). Sekvence získané v této studii jsou tučně zvýrazněny.



Obrázek 3. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z pěvců v této práci s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genu pro 70 kDa Heat Shock Protein (HSP70) vytvořený metodou Maximum likelihood spočítaný dle modelu Tamura 3-parameter (T92+G+I). Sekvence získané v této studii jsou tučně zvýrazněny.



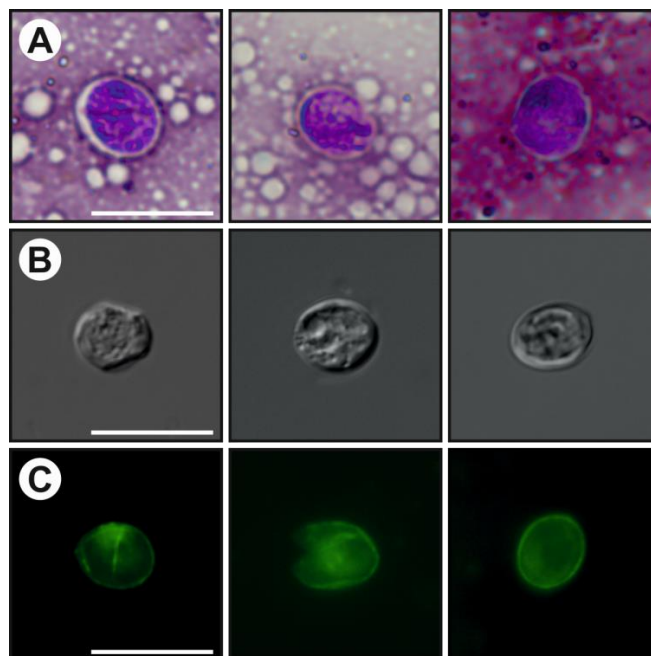
5.3. Biologické vlastnosti *Cryptosporidium galli* izolát 36114

K popisu biologických vlastností byl použit izolát z přirozeně infikované sýkory koňadry (ID 36114, tabulka 3, obrázky 1–3)

5.3.1. Morfometrie oocyst

U všech experimentálně infikovaných a vyšetřovaných druhů ptáků byly mikroskopicky zkoumány vylučované oocysty *C. galli* izolát 36114 pocházející ze sýkory koňadry. Oocysty získané z přirozeně infikované sýkory koňadry měřily 6,32–7,54 μm (průměr 7,03 μm) \times 6,02–6,81 μm (průměr 6,51 μm) s poměrem délky k šířce 1,07 (n=50) a byly velikostně identické s těmi, které byly získány z experimentálně infikovaných sýkor koňader (6,36–7,57 μm (průměr 7,06 μm) \times 6,05–6,87 μm (průměr 6,54 μm) s poměrem délky k šířce 1,08 (n=50; obrázek 4)).

Obrázek 4. Oocysty *Cryptosporidium galli* izolát 36114 **A)** barvené anilin-karbol-methyl-violetí, **B)** v diferenciálním interferenčním kontrastu a **C)** značené specifickými protilátkami proti stěně oocysty. Měřítko 5 μm .

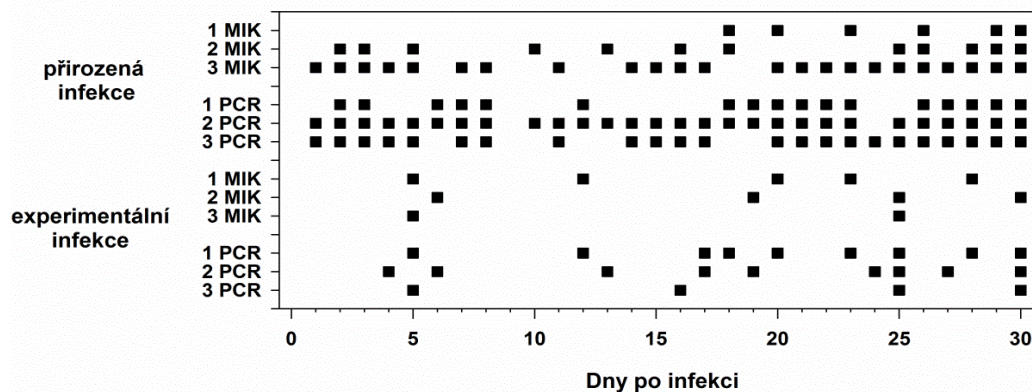


5.3.2. Hostitelská specifita

Hostitelská specifita *C. galli* izolát 36114 byla testována u sýkory koňadry (*Parus major*), u kuřat kura domácího (*Gallus gallus* f. *domestica*) a SCID myši (*Mus musculus*). Infekce způsobená *C. galli* izolát 36114 dále byla sledována u přirozeně infikovaných sýkor koňader. U každého zvířete byl sledován průběh infekce po dobu 30 dnů.

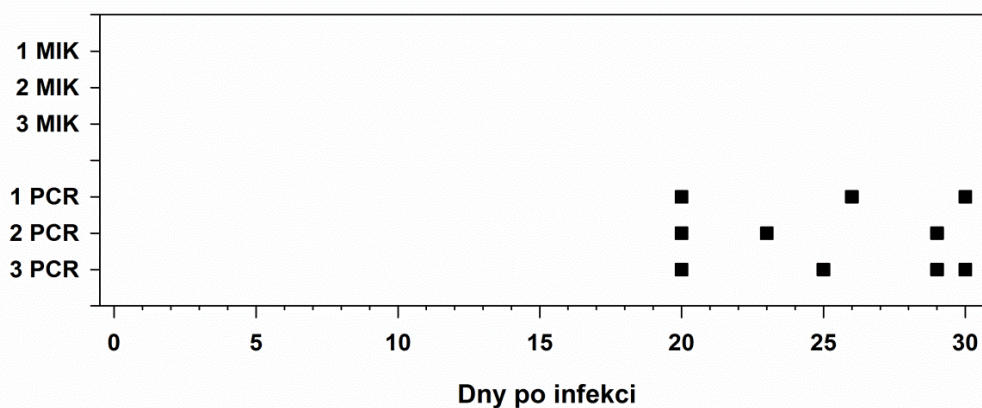
U experimentálně infikovaných sýkor koňader byly první oocysty mikroskopicky prokázány 5 dní po infekci. Molekulární vyšetření pomocí nested PCR amplifikující SSU prokázalo přítomnost specifické DNA *C. galli* izolát 36114 již 4 dny po infekci. Zatímco přirozeně infikované sýkory koňadry vylučovaly oocysty/DNA *C. galli* izolát 36114 téměř každý den, experimentálně infikované sýkory vylučovaly oocysty nepravidelně s 2 až 7 denními pauzami (obrázek 5).

Obrázek 5. Průběh infekce *Cryptosporidium galli* u přirozeně a experimentálně infikovaných sýkor koňader (*Parus major*) na základě mikroskopické detekce oocyst (MIK) a molekulární detekce specifické DNA (PCR). Čtvereček značí detekci oocyst nebo specifické DNA.



Průběh infekce u experimentálně infikovaného kura domácího (*Gallus gallus* f. *domestica*) je znázorněn na obrázku 6. Přítomnost oocyst *C. galli* izolát 36114 byla u kurů domácích prokázána pouze pomocí nested PCR. První oocysty byly molekulárně detekovány 20 dní po infekci.

Obrázek 6. Průběh infekce *Cryptosporidium galli* u experimentálně infikovaných jednodenních kuřat (*Gallus gallus* f. *domestica*) na základě mikroskopické detekce oocyst (MIK) a molekulární detekce specifické DNA (PCR). Čtvereček značí detekci oocyst nebo specifické DNA.



Vyšetření trus a tkání infikovaných SCID myši (*Mus musculus*) pomocí mikroskopických a molekulárních metod neprokázalo přítomnost vývojových stádií a specifické DNA *C. galli* izolát 36114 v průběhu celého experimentu.

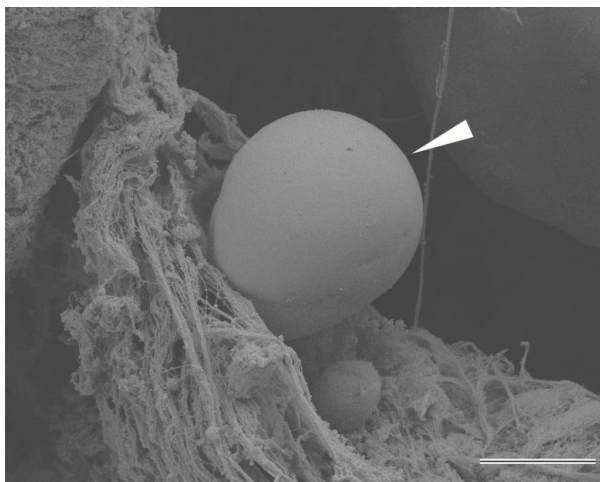
5.3.3. Klinické příznaky a patogenita

Trus všech vyšetřovaných zvířat odpovídal druhu a kategorii zvířete. V průběhu experimentů nebyly pozorovány žádné příznaky kryptosporidiózy.

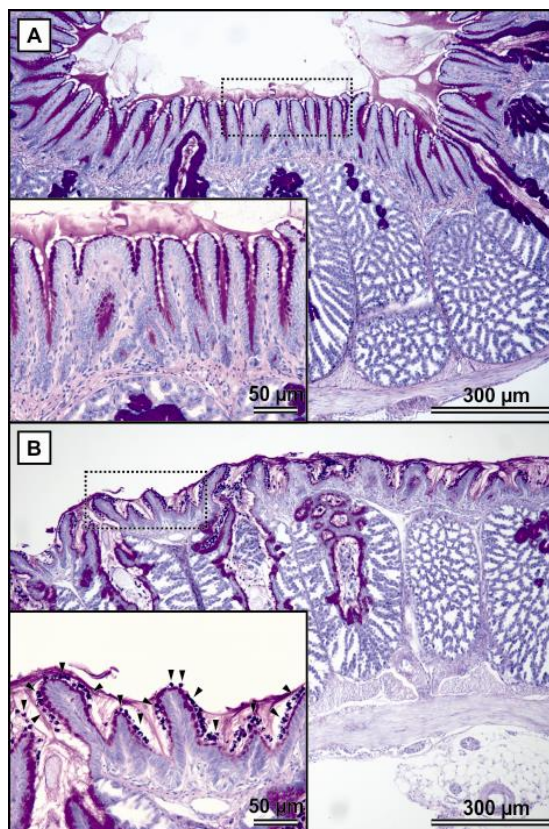
5.3.4. Lokalizace infekce *Cryptosporidium galli* izolát 36114

Molekulární analýzy prokázaly přítomnost specifické DNA *C. galli* v tkáních proventrikulu a ventrikulu experimentálně infikovaných sýkor koňader a kura domácího (*Gallus gallus* f. *domestica*). S ohledem na nízkou intenzitu infekce u kura domácího nebyla detekována vývojová stádia *C. galli* izolát 36114 pomocí histologického vyšetření a elektronové skenovací mikroskopie v žádném z vyšetřovaných orgánů. Vyšetření tkání gastrointestinálního traktu experimentálně infikovaných sýkor histologickými metodami a elektronovou skenovací mikroskopií prokázalo přítomnost vývojových stádií v proventrikulu a ventrikulu (obrázky 7 a 8). V ostatních částech zažívacího traktu a dalších orgánech dutiny tělní nebyla detekována žádná vývojová stádia.

Obrázek 7. Mikrofotografie ze skenovacího elektronového mikroskopu. Vývojové stádium *Cryptosporidium galli* izolát 36114 (šipka) na sliznici proventrikulu u přirozeně infikované sýkory koňadry (*Parus major*). Měřítko 10 μm .



Obrázek 8. Histologický řez sliznicí proventrikulu barvený periodic acid Schiff (PAS) **A)** kryptosporidií prosté sýkory koňadry a **B)** přirozeně infikované sýkory koňadry *Cryptosporidium galli* izolát 36114. Přítomnost vývojových stádií *Cryptosporidium galli* izolát 36114 na sliznici proventrikulu u přirozeně infikované sýkory koňadry ukazují šipky ve výřezu obrázku B.



6. DISKUZE

Tato studie je vůbec první prací, která se zabývá výskytem a diverzitou kryptosporidií u volně žijících ptáků patřících do řádu pěvců. Z celkového počtu 757 pěvců vyšetřených v této práci bylo pouze 20 (2,6 %) pozitivních na kryptosporidie. Ostatní práce, které se zabývaly kryptosporidiovými infekcemi v zajetí chovaných pěvců uvádějí vyšší promořenost. Li et al. (2016) a Qi et al. (2011) uvádějí obdobnou prevalenci (6,1 % a 6,7 %) u pěvců chovaných v domácnostech a prodávaných v obchodech se zvířaty v Číně. Obdobná prevalence (6,3 %) byla zaznamenána i u ptáků chovaných v zajetí v Austrálii (Ng et al. 2006). Ve studii provedené v Japonsku byla zaznamenána výrazně vyšší, 14,4% promořenost pěvců v zajetí (Iijima et al. 2018). Vyšší promořenost pěvců chovaných v zajetí lze vysvětlit omezeným prostorem, v kterém jsou ptáci chováni a častým přísunem nových, potenciálně infikovaných jedinců (na kryptosporidie se v zajetí chovaní pěvců a ostatní ptáci běžně nevyšetřují). Rozšíření kryptosporidiových infekcí v takovýchto podmínkách je pak snazší. Obdobný rozdíl v prevalenci mezi volně žijícími a hospodářsky chovanými zvířaty lze vyzorovat z mnoha studií zabývajících se kryptosporidiovými infekcemi prasat. Domácí prasata, která jsou často chována skupinově v uzavřených stájích, jsou 3–4krát častěji infikována druhem *C. suis* než divoká prasata (Atwill et al. 1997; Castro-Hermida et al. 2011; García-Preledo et al. 2013; Kváč et al. 2009, 2012, 2013; Němejc et al. 2012, 2013; Pereira et al. 1998).

V souladu s výsledky jiných autorů, kteří sledovali diverzitu kryptosporidií u pěvců chovaných v zajetí, jsme zjistili, že volně žijící pěvců jsou nejčastěji infikováni druhy *C. galli* a *C. baileyi* (Li et al. 2016; Nakamura et al. 2009; Nakamura et al. 2014). Obdobně jako ve studii provedené Iijima et al. (2018), kteří detekovali *C. galli* u 85 % pěvců, byl tento druh nejrozšířenější kryptosporidií i v naší studii (60 %). Naopak Qi et al. (2011) detekovali *C. galli* pouze v 20 % případů a jako nejrozšířenější druh kryptosporidie uvádějí *C. baileyi* s prevalencí 72 %. Pro srovnání, *C. baileyi* bylo v naší studii detekováno u 35 % pěvců. Na rozdíl od studií provedených u v zajetí chovaných pěvců, kde byly popsány i další druhy a genotypy kryptosporidií, *C. meleagridis*, *C. parvum*, *C. ubiquitum* a *Cryptosporidium* avian genotyp I a III (Gomes et al. 2012; Li et al. 2016; Nakamura et al. 2009; Qi et al. 2011), jsme u pěvců v naší studii nedetekovali žádné

jiné kryptosporidie vyjma nového genotypu pracovně nazvaného *Cryptosporidium swallow* genotyp. Vzhledem k tomu, že tento genotyp byl detekován pouze u jedné vlaštovky obecné a do současné doby nebyla provedena žádná jiná studie, která by se zabývala kryptosporidiovými infekcemi u tohoto hostitele, nechceme vyvozovat z tohoto nálezu žádné závěry.

Součástí našich experimentálních pokusů bylo prozkoumání vnitrodruhové variability *C. galli*, konkrétně byl studován izolát 36114 získaný z přirozeně infikované sýkory koňadry. Na rozdíl od Pavláška (1999) a Ryanové et al. (2003), kteří popsali velikost oocyst *C. galli* $8,25 \mu\text{m} \times 6,30 \mu\text{m}$ s poměrem délky k šířce 1,3, byly oocysty *C. galli* izolát 36114 výrazně menší ($7,06 \mu\text{m} \times 6,54 \mu\text{m}$). Navíc oocysty *C. galli* izolát 36114 byly oproti původnímu popisu *C. galli* okrouhlé s poměrem délky k šířce 1,08. Takovýto signifikantní rozdíl ve velikosti oocysty v rámci jednoho druhu není častý. Oocysty většiny druhů kryptosporidií vykazují jednotnou velikost s minimálními velikostními a morfologickými odlišnostmi (Current et al. 1986; Kváč et al. 2016; Sréter et al. 2000). Obdobná variabilita ve velikosti oocyst byla zaznamenána například u *C. andersoni*, nicméně rozdíl v poměru mezi délkou a šířkou nebyl nikdy významný jako v naší studii (Enemark et al. 2002; Hajdušek et al. 2004; Koyama et al. 2005; Kváč et al. 2003; Lindsay et al. 2000; Sréter et al. 2000; Štěpánová 2005; Upton et al. 1985; Wang et al. 2008).

Obdobně jako ve variabilitě velikosti oocyst, také v případě lokalizace byly v rámci naší práce zjištěny rozdíly mezi *C. galli* izolát 36114 a původním popisem *C. galli* (Pavlásek 1999; Ryan et al. 2003). Zatímco všechny dosud publikované práce popisovaly lokalizaci *C. galli* u kuřat, louskače menšího (*Sporophila angolensis*), kanára divokého (*Serinus canaria*), korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) a amadiny vlnkované (*Stagonopleura bella*) pouze v proventrikulu (Antunes 2008; Blagburn et al. 1990; Pavlásek 1999; Ryan et al. 2003), vývojová stádia námi použitého *C. galli* izolát 36114 byla detekována jak v proventrikulu, tak ve ventrikulu sýkory koňadry a kura domácího. Takováto variabilita v místě infekce není u kryptosporidií obvyklá. Například vývojový cyklus druhu *C. parvum*, který je infekční pravděpodobně pro všechny savce (Fayer et al. 2007), je u imunokompetentních jedinců lokalizován výlučně v tenkém střevě (Kváč et al. 2006; Tyzzer 1912). Obdobně *C. muris*, které je infekční pro celou řadu hlodavců (myši,

potkani, hraboši a pískomilové), přežvýkavců (ovce, kozy a velbloudi), šelmy (psi a kočky) a člověka nebo *C. andersoni*, které téměř výhradně parazituje u skotu, infikují výlučně žláznatý žaludek svých hostitelů (Aydin et Özkul 1996; Hůrková et al. 2003; Iseki et al. 1989; Koudelka et al. 1998; Kváč et al. 2008a; Kváč et al. 2008b; Matsui et al. 1999, 2001; Miller et Schaefer 2007; Pavlásek et Ryan 2007; Rhee et al. 1995, 1998, 1999; Satoh et al. 2003; Taylor et al. 1999). Na rozdíl od druhu *C. andersoni*, který dosud nikdy nebyl detekován v nežláznatých předžaludcích polygastrů (Kváč et Vítovec 2003) a druhů *C. muris* a *C. proliferans*, které neinfikují nežláznatou část žaludku hlodavčích hostitelů (Kváč et al. 2016), *C. galli* primárně infikuje svalnatý žaludek ptáků. Z pohledu orgánové specifity je *C. galli* izolát 36114 jediným popisem žaludeční kryptosporidie, která byla detekována jak ve žláznaté, tak i nežláznaté části žaludku.

Na rozdíl od námi popsáných průběhů infekcí vyvolaných *C. galli* izolát 36114, kdy žádné experimentálně ani přirozeně infikované zvíře nevykazovalo klinické příznaky kryptosporidiózy, infekce způsobené *C. galli* u kuřat, louskače menšího (*Sporophila angolensis*), kanára divokého (*Serinus canaria*), korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) a amadiny vlnkované (*Stagonopleura bella*) byly často spojeny s charakteristickými klinickými příznaky jako je průjem, apatie a ztráta hmotnosti. Navíc úhyn infikovaného jedince nebyl v případě kryptosporidiózy vyvolané *C. galli* neobvyklý (Antunes et al. 2008; Blagburn et al. 1990; Lindsay et al. 1991; Morgan et al. 2001; Pavlásek 1999, 2001).

Doba pro ukončení vývojového cyklu v hostiteli je dána druhem/genotypem kryptosporidie na jedné straně a druhem hostitele, jeho věkem a stavem imunitního systému na straně druhé (Fayer et Xiao 2007; Holubová et al. 2016; Kváč et al. 2016). Pokud se budeme věnovat pouze imunokompetentním jedincům, tak délka prepatentní periody se v jednom druhu hostitele infikovaném jedním druhem kryptosporidie výrazně neliší. Například vývoj *C. muris* v laboratorních myších se pohybuje v rozmezí od 7 do 12 dnů (Kváč et al. 2008b; Rhee et al. 1995, 1999), vývoj *C. andersoni* v různých hlodavcích a přežvýkavcích v rozmezí 19–24 dnů (Kváč et al. 2007; Ondráčková et al. 2007) nebo vývoj *C. parvum* v hlodavcích a telatech v rozmezí 4–7 dnů (Tzipori et al. 1983, Klein 2004). Námi zjištěná prepatentní perioda *C. galli* izolát 36114 (20 DPI) u infikovaných jednodenních kuřat

se téměř shoduje s počátkem doby vylučování *C. galli* u infikovaných devítidenních kuřat Ryanovou et al. (2003).

V této práci jsme prokázali, že námi studovaný izolát *C. galli* 36114 se v některých biologických vlastnostech liší od původního izolátu *C. galli*, který byl získán z kura domácího a použit pro popsání druhu (Pavlásek 1999; Ryan et al. 2003). Navíc, izolát *C. galli* 36114, který byl opakovaně detekován v různých druzích pěvců, lze odlišit od *C. galli* na základě částečné sekvence genu kódujícího SSU (98,9% shoda, 5 SNP). Naopak námi studovaný izolát měl identické sekvence genů kódujících aktin a HSP70. Malá mezidruhová variabilita v genech používaných ke genotypizaci kryptosporidií však není výjimečná. Například sekvence genu pro SSU druhu *C. parvum* je z 99,5 % identická s druhem *C. erinacei*, přičemž sekvence genu kódující *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) je u obou druhů identická (Kváč et al. 2014). Obdobně druhy *C. hominis* a *C. cuniculus*, jejichž sekvence SSU jsou identické z 98,9 %, jsou neodlišitelné na základě sekvencí genu kódujícího aktin.

I přes výše popsané biologické a genetické rozdíly mezi *C. galli* a *C. galli* izolát 36114 nelze jednoznačně určit, zda námi studovaný izolát představuje samostatný druh nebo variantu druhu *C. galli*.

7. ZÁVĚRY

- Promořenost volně žijících pěvců kryptosporidii byla velmi nízká.
- *Cryptosporidium baileyi* a *C. galli* jsou dominantní druhy kryptosporidii parazitující u pěvců.
- Byl popsán nový genotyp žaludeční kryptosporidie pracovně nazvaný *Cryptosporidium swallow* genotyp.
- Byla popsána vnitrodruhová variabilita *C. galli*.
 - *Cryptosporidium galli* izolát 36114 se liší v sekvenci genu kódujícím SSU a je neodlišitelný v sekvencích genů kódujících aktin a HSP70 od typového izolátu *C. galli*.
 - *Cryptosporidium galli* izolát 36114 ze sýkor koňader se morfologicky liší od typových oocyst *C. galli*.
 - *Cryptosporidium galli* izolát 36114 vykazuje odlišné biologické vlastnosti od typového izolátu *C. galli*.

8. LITERATURA

- Abbassi H., Coudert F., Cherel Y., Dambrine G., Brugere-Picoux J., Naciri M.** 1999: Renal cryptosporidiosis (*Cryptosporidium baileyi*) in specific-pathogen-free chickens experimentally coinfecting with Marek's disease virus. *Avian Diseases* 43: 738–744.
- Abe N., Iseki M.** 2004: Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR-amplified small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitology Research* 92: 523–526.
- Abe N., Makino I.** 2010: Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels, Japan. *Parasitology Research* 106: 1491–1497.
- Akiyoshi D.E., Dilo J., Pearson C., Chapman S., Tumwine J., Tzipori S.** 2003: Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. *Infection and Immunity* 71: 1828–1832.
- Alvarez-Pellitero P., Sitja-Bobadilla A.** 2002: *Cryptosporidium molnari* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. *International Journal for Parasitology* 32: 1007–1021.
- Alves M., Xiao L.H., Sulaiman I., Lal A.A., Matos O., Antunes F.** 2003: Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2744–2747.
- Antunes R.G., Simoes D.C., Nakamura A.A., Meireles M.V.** 2008: Natural infection with *Cryptosporidium galli* in canaries (*Serinus canaria*), in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*), and in lesser seed-finches (*Oryzoborus angolensis*) from Brazil. *Avian Diseases* 52: 702–705.
- Arrowood M.J., Donaldson K.** 1996: Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43: 89S.
- Arrowood M.J., Sterling C.R.** 1987: Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *Journal of Parasitology* 73: 314–319.
- Atwill E.R., Sweitzer R.A., Pereira M.G.C., Gardner I.A., Van Vuren D., Boyce W.M.** 1997: Prevalence of and associated risk factors for shedding

- Cryptosporidium parvum* oocysts and Giardia cysts within feral pig populations in California. Applied and Environmental Microbiology 63: 3946–3949.
- Aydin Y., Özkul I.A.** 1996: Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. Veterinary Parasitology 66: 257–262.
- Baroudi D., Khelef D., Goucem R., Adjou K.T., Adamu H., Zhang H., Xiao L.** 2013: Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. Veterinary Parasitology 196: 334–340.
- Bermudez A.J., Ley D.H., Levy M.G., Ficken M.D., Guy J.S., Gerig T.M.** 1988: Intestinal and bursal cryptosporidiosis in turkeys following inoculation with *Cryptosporidium* sp. isolated from commercial poults. Avian Diseases 32: 445–450.
- Blagburn B.L., Lindsay D.S., Hoerr F.J., Atlas A.L., Toivio-Kinnucan M.** 1990: *Cryptosporidium* sp. infection in the proventriculus of an Australian diamond firetail finch (*Staganoplura bella*: Passeriformes, Estrildidae). Avian Diseases 34: 1027–1030.
- Caccio S.M., Widmer G.** 2014: *Cryptosporidium*: parasite and disease. Springer Wien Heidelberg New York Dordrecht London, 487 pp.
- 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. Journal of Eukaryotic Microbiology 50: 531–533.
- Carreno R.A., Martin D.S., Barta J.R.** 1999: *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitology Research 85: 899–904.
- Castro-Hermida J.A., Garcia-Presedo I., Gonzalez-Warleta M., Mezo M.** 2011: Prevalence of *Cryptosporidium* and Giardia in roe deer (*Capreolus capreolus*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Galicia (NW, Spain). Veterinary parasitology 179: 216–219.
- 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. Journal of Clinical Microbiology 43: 1017–1023.

- Current W., Blagburn B.** 1990: *Cryptosporidium*: infections in man and domesticated animals. In: Long P. (Ed.), Coccidiosis of man and domestic animals. CRC Press, Boca Raton, FL, 235 pp.
- Current W.L., Upton S.J., Haynes T.B.** 1986: The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. The Journal of Protozoology 33: 289–296.
- Curtiss J.B., Leone A.M., Wellehan JF, Jr., Emerson J.A., Howerth E.W., Farina L.L.** 2015: Renal and Cloacal Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* Avian Genotype V) in a Major Mitchell's Cockatoo (*Lophochroa Leadbeateri*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine 46: 934–937.
- Darabus G.** 1997: Experimental studies of inter-and intraspecific transmission of *Cryptosporidium parvum* and *C. meleagridis*. Revista Romana de Medicina Veterinara 7: 155–160.
- Darabus G., Olariu R.** 2003: The homologous and interspecies transmission of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium meleagridis*. Polish Journal of Veterinary Sciences 6: 225–228.
- Dhama K., Mahendran M., Tomar S.** 2008: Pathogens transmitted by migratory birds: threat perceptions to poultry health and production. International Journal of Poultry Science 6: 516–525
- Ditrich O., Palkovič L., Štěrba J., Prokopič J., Loudová J., Giboda M.** 1991: The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. Parasitology Research 77: 44–47.
- Enemark H.L., Ahrens P., Juel C.D., Petersen E., Petersen R.F., Andersen J.S., Lind P., Thamsborg S.M.** 2002: Molecular characterization of Danish *Cryptosporidium parvum* isolates. Parasitology 125: 331–341.
- Fayer R., Speer C., Dubey J.** (Eds.) 1997: The general biology of *Cryptosporidium* in *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 530 pp.
- Fayer R., Xiao L.** (Eds.) 2007: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, New York, 560 pp.
- Ferrari E.D., Nakamura A.A., Nardi A.R.M., Santana B.N., Camargo V.S., Bresciani K.D.S., Meireles M.V.** 2018: *Cryptosporidium* spp. in caged exotic psittacines from Brazil: Evaluation of diagnostic methods and molecular characterization. Experimental Parasitology 184: 109–1114.

- García-Preledo I., Pedraza-Díaz S., González-Warleta M., Mezo M., Gómez-Bautista M., Ortega-Mora L.M., Castro-Hermida J.A.** 2013: Presence of *Cryptosporidium scrofarum*, *C. suis* and *C. parvum* subtypes IIAA16G2R1 and IIAA13G1R1 in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology* 196: 497–502.
- Gatei W., Greensill J., Ashford R.W., Cuevas L.E., Parry C.M., Cunliffe N.A., Beeching N.J., Hart C.A.** 2003: Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without human immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1458–1462.
- Gatei W., Hart C.A., Gilman R.H., Das P., Cama V., Xiao L.** 2006a: Development of a multilocus sequence typing tool for *Cryptosporidium hominis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53 Suppl 1: S43–S48.
- Gatei W., Suputtamongkol Y., Waywa D., Ashford R.W., Bailey J.W., Greensill J., Beeching N.J., Hart C.A.** 2002: Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 96: 797–802.
- Gatei W., Wamae C.N., Mbae C., Waruru A., Mulinge E., Waithera T., Gatika S.M., Kamwati S.K., Revathi G., Hart C.A.** 2006b: Cryptosporidiosis: prevalence, genotype analysis, and symptoms associated with infections in children in Kenya. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 75: 78–82.
- Gharagozlou M.J., Dezfoulian O., Rahbari S., Bokaie S., Jahanzad I., Razavi A.N.** 2006: Intestinal cryptosporidiosis in turkeys in Iran. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 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. *Parasitology Research* 110: 1363–1370.
- Guyot K., Follet-Dumoulin A., Lelievre E., Sarfati C., Rabodonirina M., Nevez G., Cailliez J.C., Camus D., Dei-Cas E.** 2001: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 3472–3480.

- Hajdušek O., Ditrich O., Šlapeta J.** 2004: Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology* 122: 183–192.
- Helmy Y.A., Krucken J., Abdelwhab E.M., von Samson-Himmelstjerna G., Hafez H.M.** 2017: Molecular diagnosis and characterization of *Cryptosporidium* spp. in turkeys and chickens in Germany reveals evidence for previously undetected parasite species. *PLoS One* 12: e0177150.
- Hoerr F.J., Current W.L., Haynes T.B.** 1986: Fatal cryptosporidiosis in quail. *Avian Diseases* 30: 421–425.
- 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. *Parasitology Research* 115: 2243–2251.
- Hornok S., Szell Z., Shibalova T.A., Varga I.** 1999: Study on the course of *Cryptosporidium baileyi* infection in chickens treated with interleukin-1 or indomethacin. *Acta Veterinaria Hungarica* 47: 207–216.
- Huang K., Akiyoshi D.E., Feng X., Tzipori S.** 2003: Development of patent infection in immunosuppressed C57Bl/6 mice with a single *Cryptosporidium meleagridis* oocyst. *Journal of Parasitology* 89: 620–622.
- Huber F., da Silva S., Bomfim T.C., Teixeira K.R., Bello A.R.** 2007: Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Veterinary Parasitology* 150: 65–74.
- Hudec K.** (Ed.) 1994: Ptáci 1. Academia, nakladatelství Akademie věd České Republiky, Praha, 671 pp.
- Hůrková L., Hajdušek O., Modrý D.** 2003: Natural infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Siberian chipmunks. *Journal of Wildlife Diseases* 39: 441–444.
- Champlaud D., Gobet P., Naciri M., Vagner O., Lopez J., Buisson J.C., Varga I., Harly G., Mancassola R., Bonnin A.** 1998: Failure to differentiate *Cryptosporidium parvum* from *C. meleagridis* based on PCR amplification of eight DNA sequences. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1454–1458.
- Chelladurai J.J., Clark M.E., Kváč M., Holubová N., Khan E., Stenger B.L., Giddings C.W., McEvoy J.** 2016: *Cryptosporidium galli* and novel

- Cryptosporidium* avian genotype VI in North American red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). Parasitology Research 115: 1901–1906.
- Chvala S., Fragner K., Hackl R., Hess M., Weissenbock H.** 2006: *Cryptosporidium* infection in domestic geese (*Anser anser* f. *domestica*) detected by in-situ hybridization. Journal of Comparative Pathology 134: 211–218.
- Iijima Y., Itoh N., Phrompraphai T., Ito Y., Kimura Y., Kameshima S.** 2018: Molecular prevalence of *Cryptosporidium* spp. among companion birds kept in pet shops in Japan. Korean Journal of Parasitology 56: 281–285.
- Iseki M., Maekawa T., Moriya K., Uni S., Takada S.** 1989: Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. Parasitology Research 75: 218–222.
- Jellison K.L., Distel D.L., Hemond H.F., Schauer D.B.** 2004: Phylogenetic analysis of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada geese (*Branta canadensis*): evidence for five novel genotypes. Applied and Environmental Microbiology 70: 452–458.
- Jiang J., Alderisio K.A., Xiao L.** 2005: Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event. Water samples from three watersheds in New York. Applied and Environmental Microbiology 71: 4446–4454
- Jourdain E., Gauthier-Clerc M., Bicout D., Sabatier P.** 2007: Bird Migration Routes and Risk for Pathogen Dispersion into Western Mediterranean Wetlands. Emerging Infectious Diseases 13: 365–372.
- Kimura A., Suzuki Y., Matsui T.** 2004: Identification of the *Cryptosporidium* isolate from chickens in Japan by sequence analyses. Journal of Veterinary Medical Science 66: 879–881.
- Klein P.** 2004: Kryptosporidióza a průjmy telat. Farmář 6: 42–43.
- Koudela B., Modrý D., Vítovec J.** 1998: Infectivity of *Cryptosporidium muris* isolated from cattle. Veterinary Parasitology 76: 181–188.
- Koyama Y., Satoh M., Maekawa K., Hikosaka K., Nakai Y.** 2005: Isolation of *Cryptosporidium andersoni* Kawatabi type in a slaughterhouse in the northern island of Japan. Veterinary Parasitology 130: 323–326.
- 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.J.J., Prantlová V., McEvoy J.** 2016: *Cryptosporidium proliferans* n.sp.

- (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. PLoS One 11:e0147090.
- Kváč M., Hofmannová L., Hlásková L., Květoňová D., Vítovec J., McEvoy J., Sak B.** 2014: *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. Veterinary Parasitology 201: 9–17.
- Kváč M., Kestránová M., Květoňová D., Kotková M., Ortega Y., McEvoy J., Sak B.** 2012: *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East-European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. Experimental Parasitology 131: 107–110.
- Kváč M., Kestránová 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*). Veterinary Parasitology 191: 218–227.
- Kváč M., Kouba M., Vítovec J.** 2006: Výskyt *Cryptosporidium parvum* a *C. andersoni* v chovech skotu v ČR. Veterinářství 56: 438–442.
- 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*). Veterinary Parasitology 143: 229–233.
- Kváč M., Sak B., Hanzlíková D., Kotilová J., Květoňová D.** 2009: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic. Parasitology Research 104: 425–428.
- Kváč M., Sak B., Květoňová D., Ditrich O., Hofmannová L., Modrý D., Vítovec J., Xiao L.** 2008a: Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. Veterinary Parasitology 153: 363–367.
- Kváč M., Sak B., Salát J., Květoňová D.** 2008b: The role of CD8+ T-lymphocytes during gastric *Cryptosporidium muris* strain TS03 infection in mice. Abstract PO65. X International workshops on opportunistic protists (IWOP-10), Boston, Massachusetts, USA, pp. 90–91.

- Kváč M., Vítovec J.** 2003: Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *Journal of Veterinary Medicine B* 50: 451–457.
- Laatamna E., Holubová N., Sak B., Kváč M.** 2017: *Cryptosporidium meleagridis* and *C. baileyi* (Apicomplexa) in domestic and wild birds in Algeria. *Folia Parasitologica* 64: 018.
- Lawson B., Robinson R.A., Neimanis A., Handeland K., Isomursu M., Agren E.O., Hammes I.S., Tyler K.M., Chantrey J., Hughes L.A.** 2011: Evidence of spread of the emerging infectious disease, finch trichomonosis, by migrating birds. *Ecology & Health* 8:143–53.
- Leoni F., Amar C., Nichols G., Pedraza-Diaz S., McLauchlin J.** 2006: Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *Journal of Medical Microbiology* 55: 703–707.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 981–992.
- Leung T.L.F., Koprivnikar J.** 2016: Nematode parasite diversity in birds: the role of host ecology, life history and migration. *Journal of Animal Ecology* 85: 1471–1480.
- Li J., Lin X., Zhang L., Qi N., Liao S., Lv M., Wu C., Sun M.** 2015: Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in domestic pigeons (*Columba livia domestica*) in Guangdong Province, Southern China. *Parasitology Research* 114: 2237–2241.
- Li Q., Li L., Tao W., Jiang Y., Wan Q., Lin Y., Li W.,** 2016: Molecular investigation of *Cryptosporidium* in small caged pets in northeast China: host specificity and zoonotic implications. *Parasitology Research* 115: 2905–2911.
- Lindsay D.S., Blagburn B.L.** 1990: Cryptosporidiosis in birds. In: Dubey J.P., Speer C.A., Fayer R. (Eds.), *Cryptosporidiosis in man and animals*. CRC Press, Boca Raton, FL, 370 pp.

- Lindsay D.S., Blagburn B.L., Hoerr F.J.** 1987: Experimentally induced infections in turkeys with *Cryptosporidium baileyi* isolated from chickens. American Journal of Veterinary Research 48: 104–108.
- 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 Diseases 33: 69–73.
- 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*. Journal of Eukaryotic Microbiology 47: 91–95.
- Máca O., Pavlásek I.** 2015: First finding of spontaneous infections with *Cryptosporidium baileyi* and *C. meleagridis* in the red-legged partridge (*Alectoris rufa*) from an aviary in the Czech Republic. Veterinary Parasitology 209: 164–168.
- Makino I., Inumaru M., Abe N., Sato Y.** 2018: A new avian *Cryptosporidium* genotype in a 1-month-old caged brown wood owl (*Strix leptogrammica*) with severe dehydration and diarrhea. Parasitology Research 117: 3003–3008.
- Marhoon I.A., Jasim G.A.** 2015: Molecular diagnosis and host specificity for cryptosporidiosis in some species of wild and domestic birds and study of cross transmitted to human. Biology, College of Education, Baghdad Street, Diwanyia, Diwanyia 00964, Iraq.
- Matos O., Alves M., Xiao L.H., Cama V., Antunes F.** 2004: *Cryptosporidium felis* and *C. meleagridis* in persons with HIV, Portugal. Emerging Infectious Diseases 10: 2256–2257.
- Matsui T., Fujino T., Kajima J., Tsuji M.** 2001: Infectivity and oocyst excretion patterns of *Cryptosporidium muris* in slightly infected mice. Journal of Veterinary Medical Science 63: 319–320.
- Matsui T., Fujino T., Tsuji M.** 1999 Infectivity to hosts of the endogenous stages of chicken and murine *Cryptosporidium*. Journal of Veterinary Medical Science 61: 471–474.
- 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. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3984–3990.
- Meireles M.V., Soares R.M., dos Santos M.M., Gennari S.M.** 2006: Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). *Journal of Parasitology* 92: 623–626.
- Melicherová J., Ilgová J., Kváč M., Sak B., Koudela B., Valigurová A.** 2013: Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. *Parasitology*: 141:287–303.
- Miláček P., Vítovec J.** 1985: Differential staining of *cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitologica* 32: 50.
- Miller T.A., Schaefer F.W.3rd.** 2007: Methylprednisolone acetate immune suppression produces differing effects on *Cryptosporidium muris* oocyst production depending on when administered. *Veterinary Parasitology* 149: 77–84.
- Morgan U., Weber R., Xiao L., Sulaiman I., Thompson R.C., Ndiritu W., Lal A., Moore A., Deplazes P.** 2000a: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human immunodeficiency virus-infected individuals living in Switzerland, Kenya, and the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 1180–1183.
- 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. *International Journal for Parasitology* 31: 289–296.
- Morgan U.M., Xiao L., Hill B.D., O'Donoghue P., Limor J., Lal A., Thompson R.C.** 2000b: Detection of the *Cryptosporidium parvum* "human" genotype in a dugong (*Dugong dugon*). *Journal of Parasitology* 86: 1352–1354.
- Muthusamy D., Rao S.S., Ramani S., Monica B., Banerjee I., Abraham O.C., Mathai D.C., Primrose B., Muliyl J., Wanke C.A., Ward H.D., Kang G.** 2006: Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus-infected individuals in South India. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 632–634.

- Nakamura A.A., Homem C.G., Da Silva A.M., Meireles M.V.** 2014: Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. *Veterinary Parasitology* 205: 7–13.
- Nakamura A.A., Simoes 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. *Veterinary Parasitology* 166: 47–51.
- Němejc K., Sak B., Květoňová D., Hanzal V., Jeníková M., Kváč M.** 2012: The first report on *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*) (Czech Republic). *Veterinary Parasitology* 184: 122–125.
- Němejc K., Sak B., Květoňová D., Kernerová N., Rost M., Cama V.A., Kváč M.** 2013: Occurrence of *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium scrofarum* on commercial swine farms in the Czech Republic and its associations with age and husbandry practices. *Parasitology Research* 112: 1143–1154.
- Ng J., Pavlásek I., Ryan U.** 2006: Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7548–7553.
- Nguyen S.T., Fukuda Y., Tada C., Huynh V.V., Nguyen D.T., Nakai Y.** 2013. Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in ostriches (*Struthio camelus*) on a farm in central Vietnam. *Experimental Parasitology* 133: 8–11.
- O'Donoghue P.J.** 1995: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology* 25: 139–195.
- Ondráčková Z.** 2007: Infektivita *Cryptosporidium andersoni* pro různé druhy hlodavců. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta, 42 pp.
- Pavlásek I.** 1993: [The black-headed gull (*Larus ridibundus* L.), a new host for *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae)]. *Veterinární Medicína* 38: 629–638.
- Pavlásek I.** 1999: Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum specificity and the environment. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékařství* 3: 290–301.
- Pavlásek I., Ryan U.** 2007: The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. *Veterinary Parasitology* 144: 349–352.

- 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. *The Journal of Infection* 42: 243–250.
- Pereira M. das G., Atwill E.R., Crawford M.R., Lefebvre R.B.** 1998: DNA sequence similarity between California isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1584–1586.
- Prosser D.J., Takekawa J.Y., Newman S.H., Yan B., Douglas D.C., Hou Y., Xing Z., Li T., Li Y., Zhao D., Perry W.M., Palm E.C., Zhang, D.** 2009: Satellite-marked waterfowl reveal migratory connection between H5N1 outbreak areas in China and Mongolia. *Ibis*, 151: 568 – 576.
- 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. *Experimental Parasitology* 128: 336–340.
- Rhee J.K., Kim H.C., Eun G.S.** 1998: Infection kinetics and developmental biology of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in Korean native kids and Corriedale lambs. *Korean Journal of Parasitology* 36: 171–181.
- Rhee J.K., So W.S., Kim H.C.** 1999: Age-dependent resistance to *Cryptosporidium muris* (strain MCR) infection in golden hamsters and mice. *Korean Journal of Parasitology* 37: 33–37.
- Rhee J.K., Yook S.Y., Park B.K.** 1995: Oocyst production and immunogenicity of *Cryptosporidium muris* (strain MCR) in mice. *Korean Journal of Parasitology* 33: 377–382.
- Robertson L.J., Campbell A.T., Smith H.V.** 1992: Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3494–3500.
- Ryan U., Papparini A., Tong K., Yang R., Gibson-Kueh S., O’Hara A., Lymbery A., Xiao L.** 2015: *Cryptosporidium huwi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the guppy (*Poecilia reticulata*). *Experimental Parasitology* 150: 31–35.
- Ryan U., Xiao L., Read C., Zhou L., Lal A.A., Pavlásek I.** 2003b: Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4302–4307.

- Ryan U.M., Xiao L., Read C., Sulaiman I.M., Monis P., Lal A.A., Fayer R., Pavlásek I.** 2003a: A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlásek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *Journal of Parasitology* 89: 809–813.
- Santos M.M., Piero J.R., Meireles M.V.** 2005. *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: Clinical, morphological and molecular studies. *Brazilian Journal of Poultry Science* 7: 113–117.
- Satoh M., Hikosaka K., Sasaki T., Suyama Y., Yanai T., Ohta M., Nakai Y.** 2003: Characteristics of a novel type of bovine *Cryptosporidium andersoni*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 691–692.
- Seixas M., Taroda A., Cardim S.T., Martins T.A., Martins F.D. C., Tabacow V.B.D., Barros L.D., Vidotto O., Garcia J.L.** 2017: First description of *Cryptosporidium meleagridis* in *Zenaidura macroura*. *Departamento de Medicina Veterinaria* 15:125–131.
- Seva Ada P., Funada M.R., Richtzenhain L., Guimaraes M.B., Souza Sde O., Allegretti L., Sinhorini J.A., Duarte V.V., Soares R.M.** 2011: Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. *Veterinary Parasitology* 175: 27–32.
- Slavin D.** 1955: *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology* 65: 262–266.
- Sreter T., Varga I.** 2000: Cryptosporidiosis in birds--a review. *Veterinary Parasitology* 87: 261–279.
- Sulaiman I.M., Lal A.A., Xiao L.H.** 2002: Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *Journal of Parasitology* 88: 388–394.
- Sulaiman I.M., Morgan U.M., Thompson R.C.A., Lal A.A., Xiao L.H.** 2000: Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2385–2391.
- Sundermann C.A., Lindsay D.S., Blagburn B.L.** 1987: In vitro excystation of *Cryptosporidium baileyi* from chickens. *The Journal of Protozoology* 34: 28–30.

- Sunnotel O., Lowery C.J., Moore J.E., Dooley J.S., Xiao L., Millar B.C., Rooney P.J., Snelling W.J.** 2006: *Cryptosporidium*. Letters in Applied Microbiology 43: 7–16.
- Štěpánová V.** 2005: Vnitrodruhová variabilita *Cryptosporidium andersoni*. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Biologická fakulta, 32 pp.
- Tacconi G., Pedini A.V., Gargiulo A.M., Coletti M., Piergili-Fioretta D.** 2001: Retrospective ultramicroscopic investigation on naturally cryptosporidial-infected commercial turkey poult. Avian Diseases 45: 688–695.
- Takekawa J.Y., Prosser D.J., Newman S.H., Muzaffar S.B., Hill N.J., Yan B., Xiao X., Lei F., Li T., Schwarzbach S.E.** 2010: Victims and vectors: highly pathogenic avian influenza H5N1 and the ecology of wild birds. Avian Biology Research 3: 51–73.
- Taylor M.A., Marshall R.N., Green J.A., Catchpole J.** 1999: The pathogenesis of experimental infections of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in outbred nude mice. Veterinary Parasitology 86: 41–48.
- Thompson R.C., Olson M.E., Zhu G., Enomoto S., Abrahamsen M.S., Hijjawi N.S.** 2005: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. Advances in Parasitology 59: 77–158.
- Tiangtip R., Jongwutiwes S.** 2002: Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. Tropical Medicine and International Health 7: 357–364.
- Tyzzar E.E.** 1907: A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 5: 12.
- Tyzzar E.E.** 1910: An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. Journal of Medical Research 23: 487–509.
- Tyzzar E.E.** 1912: *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.) a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Archiv für Protistenkunde 26: 394–412.
- Tzipori S.** (1983): Cryptosporidiosis in animals and humans. Microbiology Revue 47: 84–96.
- Upton S.J., Current W.L.** 1985: The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) infecting mammals. Journal of Parasitology 71: 625–629.

- van Zeeland Y.R., Schoemaker N.J., Kik M.J., van der Giessend J.W.** 2008: Upper respiratory tract infection caused by *Cryptosporidium baileyi* in three mixed-bred falcons (*Falco rusticolus* x *Falco cherrug*). *Avian Diseases* 52: 357–363.
- Varga I., Sreter T., Bekesi L.** 1995: Potentiation of ionophorous anticoccidials with Duokvin—Battery trials against *Cryptosporidium baileyi* in chickens. *Journal of Parasitology* 81: 777–780.
- Veselovský Z.** (Ed.) 2001: *Obecná ornitologie*. Academia, nakladatelství Akademie věd České Republiky, Český Těšín, 357 pp.
- Wang R., Qi M., Jingjing Z., Sun D., Ning C., Zhao J., Zhang L., Xiao L.** 2011: Prevalence of *Cryptosporidium baileyi* in ostriches (*Struthio camelus*) in Zhengzhou, China. *Veterinary Parasitology* 175: 151–154.
- Wang R., Wang F., Zhao J., Qi M., Ning C., Zhang L., Xiao L.** 2012: *Cryptosporidium* spp. in quails (*Coturnix coturnix japonica*) in Henan, China: molecular characterization and public health significance. *Veterinary Parasitology* 187: 534–537.
- Wang R., Zhang L., Ning C., Feng Y., Jian F., Xiao L., Lu B., Ai W., Dong H.** 2008: Multilocus phylogenetic analysis of *Cryptosporidium andersoni* (Apicomplexa) isolated from a bactrian camel (*Camelus bactrianus*) in China. *Parasitology Research* 102: 915–920.
- Wang Y., Yang W., Cama V., Wang L., Cabrera L., Ortega Y., Bern C., Feng Y., Gilman R., Xiao L.** 2014: Population genetics of *Cryptosporidium meleagridis* in humans and birds: evidence for cross-species transmission. *International Journal for Parasitology* 44: 515–521.
- Xiao L., Bern C., Limor J., Sulaiman I., Roberts J., Checkley W., Cabrera L., Gilman R.H., Lal A.A.** 2001: Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *Journal of Infectious Diseases* 183: 492–497.
- Xiao L., Limor J., Morgan U.M., Sulaiman I.M., Thompson R.C., Lal A.A.** 2000: Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5499–5502.
- Xiao L., Morgan U.M., Limor J., Escalante A., Arrowood M., Shulaw W., Thompson R.C., Fayer R., Lal A.A.** 1999: Genetic diversity within

- Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. Applied and Environmental Microbiology 65: 3386–3391.
- Xiao L., Ryan U.M.** 2004: Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. Current Opinion in Infectious Diseases 17: 483–490.
- 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*: implications for taxonomy and public health. International Journal for Parasitology 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. Parasitology Today 87: 950–955.
- Zhang X.X., Zhang N.Z., Zhao G.H., Zhao Q., Zhu X.Q.** 2015: Prevalence and Genotyping of *Cryptosporidium* Infection in Pet Parrots in North China. Biomed Research International 2015: 549798.
- Zhou L., Kassa H., Tischler M.L., Xiao L.** 2004: Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). Applied and Environmental Microbiology 70: 4211–4215.

Přílohy

Tabulka P1. Druhy a počty vyšetřených pěvců v rámci studie v jednotlivých státech včetně prokázání přítomnosti oocyst a specifické DNA kryptosporidií v trusu na základě mikroskopického (MIC) a molekulárního vyšetření (PCR)

Stát (počet vyšetřených zvířat)	Druh	Počet zvířat	Počet pozitivních	
			MIC	PCR
Česká republika (338)	brhlík lesní (<i>Sitta europaea</i>)	22	0	0
	budníček lesní (<i>Phylloscopus sibilatrix</i>)	13	0	0
	červenka obecná (<i>Erithacus rubecula</i>)	9	0	0
	čížek lesní (<i>Carduelis spinus</i>)	15	1	1
	drozd zpěvný (<i>Turdus philomelos</i>)	10	1	3
	mlynařík dlouhoocasý (<i>Aegithalos caudatus</i>)	15	0	1
	pěnice černohlavá (<i>Sylvia atricapilla</i>)	23	0	0
	pěnice hnědokřídlá (<i>Sylvia communis</i>)	5	0	0
	pěnkava obecná (<i>Fringilla coelebs</i>)	7	1	1
	pěvuška modrá (<i>Prunella modularis</i>)	11	0	1
	rákosník obecný (<i>Acrocephalus scirpaceus</i>)	6	0	0
	rákosník proužkovaný (<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>)	4	0	0
	sedmihlásek hajní (<i>Hippolais icterina</i>)	13	0	0
	slavík modráček (<i>Cyanecula svecica</i>)	15	0	0
	sojka obecná (<i>Garrulus glandarius</i>)	2	0	0
	sýkora koňadra (<i>Parus major</i>)	83	9	10
	sýkora modřínka (<i>Parus caeruleus</i>)	5	0	0
	vrabec domácí (<i>Passer domesticus</i>)	10	0	0
	vrabec polní (<i>Passer montanus</i>)	18	0	0
	vlaštovka obecná (<i>Hirundo rustica</i>)	47	0	0
zvonek zelený (<i>Chloris chloris</i>)	5	0	0	
Chorvatsko (344)	břehule říční (<i>Riparia riparia</i>)	3	0	0
	budníček větší (<i>Phylloscopus trochilus</i>)	4	0	0
	cetie jižní (<i>Cettia cetti</i>)	7	0	0
	cvrčilka slavíková (<i>Locustella luscinioides</i>)	1	0	0
	červenka obecná (<i>Erithacus rubecula</i>)	11	0	0
	konipas luční (<i>Motacilla flava</i>)	1	0	0
	konopka obecná (<i>Carduelis cannabina</i>)	2	0	0
	lejsek šedý (<i>Muscicapa striata</i>)	1	0	0
	pěnice černohlavá (<i>Sylvia atricapilla</i>)	29	0	0
	pěnice slavíková (<i>Sylvia borin</i>)	5	0	0
	rákosník obecný (<i>Acrocephalus scirpaceus</i>)	100	0	0
	rákosník proužkovaný (<i>Acrocephalus schoenobaenus</i>)	52	0	0
	rákosník velký (<i>Acrocephalus arundinaceus</i>)	7	0	0
	slavík modráček (<i>Luscinia svecica</i>)	8	0	0
	stehlík obecný (<i>Carduelis carduelis</i>)	4	0	0
	sýkora koňadra (<i>Parus major</i>)	1	0	0
	vlaštovka obecná (<i>Hirundo rustica</i>)	106	0	1
	vrabec pokřovní (<i>Passer hispaniolensis</i>)	2	0	0
Jihoafrická republika (55)	amadina páskovaná (<i>Amadina fasciata</i>)	8	0	1
	amadina červenohlavá (<i>Amadina erythrocephala</i>)	1	0	0
	amarant malý (<i>Lagonosticta senegala</i>)	1	0	0
	bulbul zahradní (<i>Pycnonotus barbatus tricolor</i>)	5	0	0
	drozdík oranžovohlavý (<i>Cossypha natalensis</i>)	2	0	0
	kruhoočko kapsé (<i>Zosterops pallidus</i>)	5	0	0
	motýlek angolský (<i>Uraeginthus angolensis</i>)	2	0	0
	prinie afroasijská (<i>Prinia subflava</i>)	2	0	0
	přádelník mahalský (<i>Plocepasser mahali</i>)	4	0	0
	snovač zlatý (<i>Ploceus subaureus</i>)	2	0	0
	stračka hnědohřbetá (<i>Spermestes bicolor nigriceps</i>)	4	0	0
	vlaštovka obecná (<i>Hirundo rustica</i>)	15	0	0
zvonohlík mozambijský (<i>Serinus mozambicus</i>)	4	0	0	
Nový Zéland (20)	vrabec polní (<i>Passer montanus</i>)	20	0	1
CELKEM		757	12	20

