



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra zootechnických věd

Diplomová práce

**Kryptosporidiové infekce volně žijících a zájmově chovaných
holubů**

Autorka práce: Bc. Veronika Zikmundová

Vedoucí práce: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

Školitel specialista: Ing. Nikola Holubová

České Budějovice

2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

Podpis

Abstrakt

Předmětem této práce bylo vyhodnocení výskytu a prevalence infekce kryptosporidií u domácích a divokých holubů (Columbiformes). Celkem 603 vzorků, (389 od domácích a 214 od divokých holubů) ze 14 farem a 11 lokalit, bylo odebráno během dvou let (2019–2021) v České republice, Chorvatsku a na Slovensku. Vzorky byly mikroskopicky (barvení metodou anilin-karbol-methyl-violetí) a molekulárně vyšetřeny na přítomnost kryptosporidií. Celkově bylo 0,5 % (3/603) mikroskopicky a 2,8 % (17/603) molekulárně pozitivních na *Cryptosporidium* spp. Fylogenetické analýzy genových sekvencí kódujících malou podjednotku rRNA odhalily přítomnost šesti druhů kryptosporidií, *C. meleagridis* (n = 6), *C. parvum* (n = 4), *C. baileyi* (n = 2), *C. muris* (n = 2), *C. ornithophilus* (n = 2) a *C. galli* (n = 1). Subtypizace izolátů na základě analýzy částečných sekvencí genu kódujícího gp60 prokázala přítomnost *C. parvum* subtypu IIa a nového subtypu *C. meleagridis* subtyp IIIk. Izolát *Cryptosporidium meleagridis* subtyp IIIk získaný z přirozeně infikovaného holuba, který byl použit pro experimentální pokusy, byl infekční pro kuřata kura domácího (*Gallus gallus* f. *domesticus*) a neinfekční pro SCID myši. Kuřata začala vylučovat oocysty 4 dny po infekci. Infekce byla detekována v duodenu, ileu a kolonu. Statistická analýza prokázala častější výskyt kryptosporidiiových infekcí u zájmově chovaných holubů ($\chi^2 = 14,5919$; stupně volnosti = 1; $P > 0,001$). Žádný z přirozeně nebo experimentálně infikovaných ptáků v této studii nevykazoval klinické příznaky kryptosporidiózy. Výsledky této studie prokázaly, že jsou zájmově chovaní a zdivočelí holubi infikováni kryptosporidiemi a mohli by představovat zdravotní riziko pro člověka i domácí zvířata.

Klíčová slova: Columbiformes; kryptosporidióza; PCR; holubi

Abstract

The object of this thesis was an evaluation of occurrence and prevalence of *Cryptosporidium* infection in domestic and wild pigeons (Columbiformes). A total of 603 samples (389 domestic and 214 wild pigeons) from 14 farms and 11 locations were collected during two consecutive years (from 2019 to 2021) in the Czech Republic, Croatia and Slovakia. Samples were examined for infection with species of *Cryptosporidium* using microscopic (following aniline-carbol-methyl violet staining) and molecular tools. Overall, 0,5 % (3/603) and 2,8 % (17/603) of animals were positive for *Cryptosporidium* by microscopy and PCR, respectively. Phylogenetic analyses based on the small subunit of the rRNA gene revealed the presence of six *Cryptosporidium* species, namely *C. meleagridis* (n = 6), *C. parvum* (n = 4), *C. baileyi* (n = 2), *C. muris* (n = 2), *C. ornithophilus* (n = 2), *C. galli* (n = 1). Subtyping of isolates of *C. parvum* and *C. meleagridis* based on sequence analysis of the 60-kDa glycoprotein gene revealed that they belong to the IIa and novel IIIk family, respectively. The isolate of *Cryptosporidium meleagridis* subtype family IIIk obtained from naturally infected pigeons and used for experiments was infectious for chickens (*Gallus gallus* f. *domesticus*) but not for SCID mice. The chickens began to shed oocysts 4 days after infection. The infection was detected in the duodenum, ileum and colon. *Cryptosporidium* spp. infection has been found frequently in domestic pigeons compared to wild life ($\chi^2 = 14,5919$; d.f. = 1, $P > 0,001$). None of the naturally or experimentally infected birds developed clinical signs of cryptosporidiosis in the present study. Results of this study show that animals bred in hobby breeding and wild pigeons are infected by cryptosporidia and they should represent health risk for humans and domestic animals.

Keywords: Columbiformes; cryptosporidiosis; PCR; pigeons

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. za jeho trpělivost, ochotu a odborné vedení. Velké poděkování patří i školitelce specialiste Ing. Nikole Holubové za pomoc při zpracování vzorků a práci v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat všem pracovníkům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za ochotu a přátelské jednání. V neposlední řadě patří poděkování kamarádům, rodině za podporu při studiu a chovatelům holubů za jejich vlídný přístup a čas.

Tato diplomová práce byla finančně podpořena projektem GAJU 028/2019/ z Grantové agentury Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.)

Obsah

Úvod.....	8
1 Literární přehled.....	9
1.1 Holubi.....	9
1.2 Rod <i>Cryptosporidium</i>	10
1.3 Historie kryptosporidií	11
1.4 Vývojový cyklus kryptosporidií	12
1.5 Kryptosporidiové infekce ptáků	14
1.6 Kryptosporidiové infekce holubů	14
1.6.1 <i>Cryptosporidium meleagridis</i>	15
1.6.2 <i>Cryptosporidium baileyi</i>	18
1.6.3 <i>Cryptosporidium galli</i>	20
1.6.4 <i>Cryptosporidium parvum</i>	22
1.6.5 <i>Cryptosporidium hominis</i>	23
1.6.6 <i>Cryptosporidium muris</i>	25
1.6.7 <i>Cryptosporidium ornithophilus</i>	26
2 Cíle	28
3 Materiál a metody	29
3.1 Biologický materiál	29
3.2 Zvířata pro laboratorní infekce	29
3.3 Metody.....	29
3.3.1 Barvení oocyst kryptosporidií	29
3.3.2 Hodnocení intenzity infekce	31
3.3.3 Izolace DNA z trusu	32
3.3.4 Izolace DNA z tkáně	33
3.3.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	34
3.3.6 Gelová elektroforéza	35
3.3.7 Izolace fragmentů DNA z gelu	36
3.3.8 Sekvenování	37
3.3.9 Fylogenetické analýzy.....	37
3.3.10 Purifikace oocyst	38
3.3.11 Design experimentu	39
3.3.12 Histologické vyšetření.....	40
3.3.13 Statistická analýza.....	42
4 Výsledky	44

4.1	Výskyt kryptosporidií u holubů.....	44
4.2	Intenzita infekce	46
4.3	Diverzita kryptosporidií u holubů	46
4.4	Infektivita <i>Cryptosporidium meleagridis</i> pro kuřata a SCID myši	49
5	Diskuze.....	50
6	Závěry	56
7	Seznam použité literatury.....	57
8	Seznam obrázků	82
9	Seznam tabulek	83

Úvod

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou jednobuněční paraziti, kteří infikují převážně gastrointestinální trakt obojživelníků, plazů, ptáků, ryb a savců včetně člověka (O'Donoghue, 1995). Kryptosporidie způsobují onemocnění zvané kryptosporidióza a její klinické příznaky jsou závislé na imunitním systému hostitele. Mezi typické příznaky kryptosporidiózy patří průjem, letargie, apatie, deprese, anorexie, zpomalení růstu a smrt (Alvarez-Pellitero a Sitjà-Bobadilla, 2002). Infekce v oblasti tenkého střeva jsou způsobovány střevními druhy kryptosporidií (např. *C. parvum*) a záněty žaludečních žláz způsobují žaludeční druhy (např. *C. muris*) (Anderson, 1987; Fayer, 2003; Pospischil et al., 1987). Tradiční taxonomická klasifikace kryptosporidií byla založena na morfologii oocyst, hostitelské specifitě a lokalizaci místa infekce (Fayer et al., 1990). Malý počet oocyst získaných ze vzorků však často znesnadňoval identifikaci druhů, a proto je současný systém založen pouze na molekulární genotypizaci kryptosporidií (Jellison et al., 2002; Perz a LeBlancq, 2001; Xiao et al., 2000a; 2001a). V současné době jsou jednotlivé druhy kryptosporidií od sebe nejčastěji odlišovány na základě částečných sekvencí genů kódujících malou ribozomální podjednotku rRNA (SSU; Jiang et al., 2005; Xiao et al., 1999), aktin (Sulaiman et al., 2002), 70 kDa heat shock protein (HSP70; Sulaiman et al., 2000), 60 kDa glykoprotein (gp60; Alves et al., 2003; Peng et al., 2001), *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP; Spano et al., 1997; Xiao et al., 2000b), případně dalších genů.

Holubi žijí bok po boku spolu s lidmi a zvířaty ve volné přírodě. Nacházejí se po celém světě s výjimkou pólů. Většina ptáků byla chována nejen pro produkci masa a vajec, ale i pro jejich trus, který sloužil jako bohaté hnojivo pro pěstování různých plodin v suchém podnebí a na neúrodné půdě. Díky vytrvalosti a schopnosti létat na dlouhé vzdálenosti byla tato zvířata využívána pro přepravu zpráv během světových válek. V současnosti jsou nejčastějším důvodem chovu holubů hobby chovy (Gibbs et al., 2010; Harlin, 2000; Kokoszyński et al., 2020; Piasecki, 2006).

Z důvodu přímého nebo nepřímého kontaktu s lidmi, je důležité sledovat kryptosporidiové infekce u volně žijících a zájmově chovaných holubů, protože mohou představovat potenciální zdroj těchto parazitů pro člověka a jím chovaná zvířata.

1 Literární přehled

1.1 Holubi

Označení holub se v české taxonomii používá pro třicet rodů z čeledi holubovití (Columbidae) a z řádu měkkozobí (Columbiformes). Druh, se kterým se často setkáváme ve městech a příměstských oblastech, je zdivočelý holub domácí (*Columba livia* f. *domestica*), který byl vyšlechtěn z holuba skalního (*Columba livia*) (Šťastný et al., 2006). Během posledních desetiletí jejich populace exponenciálně vzrostla a v mnoha evropských městech dosáhla hustoty vyšší než 2000 ptáků/km² (Sacchi et al., 2002; Senar et al., 2009). Čeleď holubovití zahrnuje rody jako jsou například *Caloenas*, *Columba*, *Columbina*, *Ducula*, *Gallicolumba*, *Goura* a *Streptopelia* (Hoyo et al., 1997; Soares et al., 2016). Nejpočetnější rod *Columba* má více než 50 druhů po celém světě. Tito ptáci vykazují širokou variabilitu barvy opeření, velikosti těla i místa výskytu (Haro et al., 2005). Spolu s rodem *Streptopelia* bývají nejčastěji zbarveni v odstínech šedé a hnědé s kovovými odlesky. Asijské druhy rodu *Ducula* a *Goura* se řadí mezi ty největší s hmotností až 2 kg. Mezi nejmenší zástupce, o hmotnosti 30 g, patří některé druhy rodu *Streptopelia* a *Columbina* (Hoyo et al., 1997).

Holubi jsou pravděpodobně prvním druhem ptáků, kteří byli lidmi domestikováni (Johnston a Janiga, 1995). V minulosti byli holubi chováni z emocionálních, náboženských (jako obětní ptáci) a kulturních důvodů, ale nejčastěji k přenosu zpráv během válek (Gugolek et al., 2016; Kaszperuk et al., 2018). Tradice konzumace mladých holoubat sahá až do starověkého Egypta a v následujících stoletích se chov holubů rozšířil do Evropy, Severní Ameriky a Asie. V současné době je na světě největším producentem holubího masa Čína s roční produkcí přibližně 680 milionů holoubat. Podíl Číny na světovou produkci je přibližně 80 % (Jiang et al., 2019). Další významní producenti holubího masa jsou USA a Kanada. Američtí chovatelé produkují přibližně 2,5 milionu holoubat ročně (Miąsko a Łukasiewicz, 2016). Mezi nejvýznamnější evropské producenty patří Velká Británie, Francie a Itálie (Pomianowski et al., 2009). Celosvětově se holubí maso získává hlavně porážkou holoubat ve věku 28–30 dní a 400–700 g tělesné hmotnosti v závislosti na plemeni a chovné metodě (Abdel-Azeem et al., 2016; Fik et al., 2016; Kaszperuk et al., 2018; Rémignon, 2004). Navzdory mnoha výhodám holubího masa není spolu s droby příliš populární mezi spotřebiteli v České republice. Důvodem je omezená

dostupnost masa z malého počtu holubích farem, nedostatek holubích jatek, vymírání tradice konzumace holubů a relativně vysoká cena ve srovnání s masem brojlerových kuřat (Brzoska, 2019). Chov této specializované drůbeže je v mnoha zemích jen pro osobní potřebu jako forma přivýdělku. Hobby chov okrasných a poštovních holubů, kteří se účastní organizovaných soutěží, je v řadě zemí stále oblíbenější (Kokoszyński et al., 2020).

V mnoha evropských městech mají holubi příznivé životní podmínky. Prostředí s dostatkem potravních příležitostí a absence dravců jsou hlavními faktory podílejícími se na rozrůstání jejich populace (Amoruso et al., 2014). Zdivočelí holubi jsou v městských oblastech považováni za škůdce kvůli poškozování architektonického dědictví a rizika přenosu nemocí na jiné druhy zvířat, včetně lidí. Z tohoto důvodu se často provádějí opatření zahrnující chemickou sterilizaci, odstraňování vajec, používání repelentů, dravých ptáků nebo samotný odchyt jedinců (Albonetti et al., 2015; Senar et al., 2009). Preventivní metody zahrnují mechanické opatření, které tvoří hrotový systém na stavebách a omezují vstup na nocoviště a hnízdiště. Chemická sterilizace holubů pomocí mořeného obilí byla u nás v roce 1983 zakázána z důvodu rozšiřování aktivních látek s cytostatickými účinky v terénu (Motyčka et al., 1992; Škoudlín 1986). Používání repelentních gelů nepůsobí stoprocentně a je v rozporu s welfare zvířat, protože se mohou nalepit na peří ptáků a tím je zranit (Stock a Haag-Wackernagel, 2014). Mezi radikální opatření patří snižování populace holubů odstřelem. Ročně se tak podaří zlikvidovat 10 000 až 20 000 holubů, avšak bez výrazného snížení populace (Motyčka et al., 1992; Škoudlín, 1986).

1.2 Rod *Cryptosporidium*

Kryptosporidie jsou jednobuněční eukaryotní prvoci, kteří mají DNA obsaženou v jádře s dvojitou membránou (Fayer a Xiao, 2007). Původně byly kryptosporidie řazeny mezi kokcidie, kvůli podobnosti vývojového cyklu v gastrointestinálním traktu (Fayer et al., 1997; Tyzzer, 1910). Fylogenetické analýzy provedené později však potvrdily příbuznost kryptosporidií s gregarinami (Gregarinasina) (Carreno et al., 1999), se kterými je spojuje společná nepřítomnost plastidového genomu (Zhu et al., 2000), antigenní příbuznost zjištěná pomocí monoklonálních protilátek (Bull et al., 1998), a také podobnost některých stádií vývojového cyklu (Hijawi et al., 2001). Tato vzájemná podobnost byla prokázána i na základě sekvencí genu

kódujícího malou ribozomální podjednotku rRNA (SSU) (Carreno et al., 1999). Na základě dalších analýz byly kryptosporidie zařazeny do čeledi Cryptosporiidae a kmene Apicomplexa (Zhu et al., 2000). Kmen Apicomplexa zahrnuje, spolu s rodem *Cryptosporidium*, více než dalších 300 rodů (Fayer, 2007). Pro tento kmen je charakteristická přítomnost apikálního komplexu, alespoň v některém vývojovém stádiu vývojového cyklu (Thompson et al., 2016).

V rámci rodu *Cryptosporidium* rozeznáváme dvě morfologicky odlišné skupiny: žaludeční a střevní kryptosporidie (Xiao et al., 2004). Střevní kryptosporidie mají menší kulaté oocysty (např. *C. parvum* $5 \times 4,5 \mu\text{m}$; Tyzzer, 1912). Žaludeční druhy kryptosporidií mají oocysty větší než ty střevní a jsou oválné (např. *C. andersoni* $7,4 \times 5,5 \mu\text{m}$; Lindsay et al., 2000). Onemocnění vyvolané kryptosporidiiemi se nazývá kryptosporidióza. Jedná se o zoonotické onemocnění, které zapříčiňuje průjmy u imunokompetentních a imunokompromitovaných jedinců (Chalmers a Davies, 2010; Kotloff et al., 2013).

1.3 Historie kryptosporidií

Od té doby, co americký parazitolog Ernest Edward Tyzzer popsal rod *Cryptosporidium*, uplynulo více než sto let. Tyzzer detekoval asexuální a sexuální stádia parazita infikujícího žaludeční žlázy laboratorních myší (*Mus musculus*) a pojmenoval ho *Cryptosporidium muris* (Tyzzer, 1907). O tři roky později Tyzzer publikoval detailní popis morfologie vývojových stádií včetně kreseb a fotografií parazita a kryptosporidie byly uznány jako samostatný rod (Tyzzer, 1910). V roce 1912 popsal nový druh parazita v tenkém střevě myši a nazval ho *Cryptosporidium parvum*. Tento druh kryptosporidie se od *C. muris* lišil tím, že měl menší oocysty a u myši spíše infikoval tenké střevo (Tyzzer, 1912). Během 70. a 90. let se předpokládalo, že u savců se vyskytují pouze dva druhy: *C. muris* infikující žaludeční sliznici savců s velkými oocystami a *C. parvum* parazitující ve střevě všech savců s menšími oocystami (Tzipori et al., 1980). V průběhu času byly oocysty z různých druhů zvířat včetně lidí identifikovány a publikovány jako *C. parvum*-like nebo jednoduše *Cryptosporidium*. Se vzrůstajícím počtem pacientů nakažených virem HIV, začali lidé věnovat větší pozornost těmto oportunistickým patogenům a lidské kryptosporidióze. Celkem bylo v této době v literatuře zmíněno 159 případů kryptosporidiózy u imunokompetentních pacientů a 71 případů u imunodeficitních pacientů (Casemore et al., 1985). Souvislost mezi infekcí

postihující člověka a skot byla prokázána ve 26 případech, ale přenos infekce ze zvířete na člověka nebyl potvrzen v žádném z případů. Později byly hlášeny zprávy o přenosu infekce z člověka na člověka vylučující zoonotický přenos a byla potvrzena hypotéza Casemoreho a Jacksona (1984). Molekulární studie pak prokázaly, že tyto dva způsoby přenosu infekce na člověka se týkaly dvou genotypů: human genotyp, přenášený z člověka na člověka a bovine genotyp, přenášený ze zvířat na člověka, přičemž skot byl primárním rezervoárem infekce. První genotyp byl nakonec pojmenován *Cryptosporidium hominis* a druhý genotyp byl nadále identifikován jako *C. parvum* (Morgan-Ryan et al., 2002).

Kromě savčích kryptosporidií byl v roce 1955 popsán druh *Cryptosporidium meleagridis*, který byl příčinou častého úhynu ptáků, konkrétně mladých krůt (*Meleagris gallopavo*) (Slavin, 1955). Až v roce 1986 byl popsán další, v pořadí druhý, druh kryptosporidie infikující ptáky, konkrétně kura domácího (*Gallus gallus f. domestica*) a pojmenován *Cryptosporidium baileyi* (Current et al., 1986). Až po více než 90 letech od prvního popisu kryptosporidie byl popsán třetí druh, *Cryptosporidium galli*, hostitelsky specifický pro ptáky, zvláště pak pro hrabavou drůbež (Pavlásek, 1999; Ryan et al., 2003a). *Cryptosporidium galli* bylo pravděpodobně popsáno i v proventrikulu amadiny vlnkované (*Staganoplura bella*) (Blagburn et al., 1990) a pojmenováno jako *C. blagburni* pro druh infikující pěnkvav (Morgan et al., 2001). Na základě genotypizací kryptosporidií bylo však prokázáno, že jsou kryptosporidie stejného druhu a tento druh je považován za neplatný. Mezi další, v nedávné době popsané, ptačí druhy kryptosporidií patří *Cryptosporidium avium* (dříve *Cryptosporidium avian* genotyp V), *Cryptosporidium proventriculi* (dříve známý jako *Cryptosporidium avian* genotyp III) a *Cryptosporidium ornithophilus*, který byl dříve pojmenován jako *Cryptosporidium avian* genotyp II (Holubová, 2016; 2019; 2020a).

Holubi mohou být hostitelé řady kryptosporidií, nicméně žádný z dosud popsaných druhů není hostitelsky adaptovaný na holuby (více v kapitole 1.6).

1.4 Vývojový cyklus kryptosporidií

Životní cyklus je u všech druhů rodu *Cryptosporidium* podobný a probíhá v epitelálních buňkách gastrointestinálního traktu hostitele (Current a Blagburn, 1990), případně v dalších orgánech jako jsou ledviny nebo plíce (Lindsay et al., 1990; Plutzer a Karanis, 2009). Vývojový cyklus kryptosporidií lze rozdělit do šesti

hlavních vývojových fází: excystace (uvolnění infekčních sporozoitů), merogonie (nepohlavní rozmnožování v hostitelských buňkách), gametogonie (tvorba mikro- a makrogamet), pohlavní rozmnožování (spojení mikro- a makrogamet), tvoření stěny oocyst (k produkci odolného stádia vůči vnějšímu prostředí a odpovědnému za přenos infekce z jednoho hostitele na druhého) a sporogonie (tvorba infekčních sporozoitů) (Current a Garcia, 1991). Kryptosporidie mají monoxenní životní cyklus (Tzipori a Ward, 2002; Tzipori a Widmer, 2008).

K přenosu infekce dochází pozřením vysporulovaných oocyst vnímavým hostitelem, které v hostiteli excystují (Chappell et al., 2003). Mezi faktory, které podmiňují excystaci patří: tělesná teplota hostitele, redukční potenciál, koncentrace oxidu uhličitého, žlučové soli a trypsin (Fayer a Leek, 1984; Reduker a Speer, 1985; Robertson et al., 1993). Každá oocysta obsahuje 4 infekční sporozoity, kteří se po pozření stanou pohybliví a aktivně napadají epiteliální buňky gastrointestinálního traktu (Chalmers a Davies, 2010). Na rozdíl od kokcií se nezanořují do cytoplazmy (Ortega et al., 1997), ale zůstávají uloženy intracelulárně mimo cytoplazmu. Poté se sporozoiti mění na jednojaderné trofozoity uzavřené v parazitoformní vakuole (Elliot et al., 2001). Jádro trofozoita se rozdělí a dochází k nepohlavnímu rozmnožování – merogonii. V další fázi merozoiti podstupují dva odlišné replikační cykly. Pro meront typu I je charakteristické asexuální množení a vznik 8 merozoitů. Meronti typu II tvoří 4 merozoity a vstupují do sexuální fáze – gametogonie (Tzipori a Ward, 2002). Při pohlavním množení dochází ke vzniku samčích mikrogamontů a samičích makrogamontů. Po uvolnění mikrogamet z mikrogamontů a přeměně makrogamontů na makrogamety dochází k následnému oplození a vzniku zygoty (Sunnotel et al., 2006). Zygota prochází sporogonií, při které dochází k produkci silnostěnných nebo tenkostěnných oocyst obsahujících čtyři sporozoity (Current a Reese, 1986). Silnostěnné oocysty se dostávají do lumen střeva a společně s výkaly opouštějí organizmus hostitele, což umožňuje šíření infekce na další vnímavé jedince (Smith a Rose, 1998). K autoinfekci dochází prostřednictvím tenkostěnných oocyst, které excystují, jakmile jsou odděleny od epitelu a cyklus začíná znovu (Current a Reese, 1986; Siński a Behnke, 2004).

1.5 Kryptosporidiové infekce ptáků

Kryptosporidíóza je jednou z nejčastějších protozoálních infekcí divokých a domestikovaných ptáků (Sréter a Varga, 2000). Dosud byl výskyt těchto parazitů popsán u více než 30 druhů ptáků po celém světě (Ryan, 2010). Množství studií zabývajících se diverzitou kryptosporidií ptáků je v porovnání se studii provedenými na savcích, zvláště pak na hospodářsky chovaných zvířatech, omezené. Zejména stěhovaví vodní ptáci mohou přenášet oocysty kryptosporidií a infikovat své hnízdiště, šířit oocysty do prostředí včetně pitné vody, a vytvářet tak i riziko pro domácí zvířata (Graczyk et al., 1998a).

Ptačí kryptosporidíóza se může projevit jako respirační forma (Dhillon et al., 1981) a střevní forma (Adejimi a Oke, 2011). V některých případech se kryptosporidíóza může dokonce projevit i jako forma ledvinová, která může být pro hostitele fatální (Hoerr et al., 1986). U drůbeže se objevují subklinické příznaky spojené se špatným přírůstkem hmotnosti a snížením výnosu vajec a produkce masa (Goodwin et al., 1996; Sréter a Varga, 2000).

K dnešnímu dni bylo uznáno šest druhů kryptosporidií specifických pro ptáky: *C. meleagridis* infikující tenké, slepé a tlusté střevo (Slavin, 1955), *C. baileyi* většinou spojené s infekcí dýchacích cest (Current et al., 1986; Molina-López et al., 2010; Van Zeeland et al., 2008), *C. galli* parazitující v epitelálních buňkách proventrikulu (Ryan et al., 2003a), *C. avium* detekované v tlustém střevě (Holubová et al., 2016), *C. proventriculi* infikující proventrikulus a ventrikulus (Holubová et al., 2019) a *C. ornithophilus* s místy infekce ve slepém střevě, tračníku a Fabriciově burze (Holubová et al., 2020a; Santos et al., 2005).

1.6 Kryptosporidiové infekce holubů

Při blízkém kontaktu holubů s lidmi a jinými domácími nebo divokými ptáky může snadno dojít k potenciálnímu zoonotickému přenosu (Graczyk et al., 2008). Holubi žijící v městských parcích mohou být zdrojem zoonotických druhů a genotypů kryptosporidií, které mohou být vážnou příčinou onemocnění u osob s oslabenou imunitou, dětí a starších lidí (Qi et al., 2011). Holubi mohou představovat zdravotní riziko pro lidi, protože mohou nejen šířit zoonotické patogeny, ale sloužit i jako rezervoár pro mnoho parazitárních onemocnění (Cooper, 1984; Kaminjolo et al., 1988; Lallo et al., 2012; Piasecki, 2006). Subklinické příznaky

kryptosporidiových infekcí holubů jsou často spojené se sníženým přírůstkem hmotnosti a omezenou schopností letu na dlouhé vzdálenosti (Radfar et al., 2012).

Přirozené infekce kryptosporidii byly u holubů poprvé popsány v roce 1994 (Borodina et al., 1994; Özkul a Aydin, 1994). Klinické příznaky onemocnění byly pozorovány u 10 dnů starého holouběte (Özkul a Aydin, 1994). Holub vykazoval známky sklíčenosti, byl vyhublý a neaktivní. Pitva potvrdila výskyt *Cryptosporidium* sp. v apikální části intestinálních epitelových buněk tenkého střeva. O tři roky později Rodríguez et al. (1997) identifikovali kryptosporidie u tří mladých holubů s charakteristickými průjmy a úbytkem tělesné hmotnosti. Zjištěná prevalence *Cryptosporidium* sp. v Iránu byla 1,2 % (Bahrami et al., 2012), 2,5 % (Mirzaghavami et al., 2016), 2,94 % (Radfar et al., 2012), a 18 % v Brazílii (Santos et al., 2020). Žádná z těchto studií však nebyla založena na molekulární detekci specifické DNA, a proto nevíme o jaké druhy nebo genotypy kryptosporidií se ve zmíněných studiích jednalo. Překvapivý nález u holubů popsali ve Španělsku Abreu-Acosta et al. (2009), jejichž studie pomocí molekulárních metod prokázala přítomnost *C. hominis*. Není však zcela zřejmé, jestli mohou být holubi hostiteli této kryptosporidie a k jejich nákaze došlo na místě souvisejícím s hygienickými aktivitami lidí, nebo mohou působit pouze jako mechanické vektory (Graczyk et al., 2008). V dalších studiích byly u holubů popsány druhy *C. meleagridis* (Kabir et al., 2020; Koompapong et al., 2014; Li et al., 2015; 2016; Qi et al., 2011; Reboredo-Fernández et al., 2015; Seixas et al., 2019), *C. baileyi* (Altamini a Al-Zubaidi, 2020; Jasim a Marhoon, 2015; Kabir et al., 2020; Li et al., 2015), *C. galli* (Seixas et al., 2019) a *C. parvum* (Altamini a Al-Zubaidi, 2020; Jasim a Marhoon, 2015; Oliveira et al., 2017a).

Níže se budu blíže věnovat druhům kryptosporidií detekovaných u holubů.

1.6.1 *Cryptosporidium meleagridis*

Morfologie: Oocysty *C. meleagridis* jsou kulaté nebo lehce protáhlé s velikostí 4,5–6,0 × 4,2–5,3 μm a jsou velmi podobné oocystám *C. parvum* (Lindsay et al., 1989; Slavin, 1955).

Lokalizace: Infekce *C. meleagridis* postihuje především dolní část tenkého střeva a epiteliální buňky ilea, céka a Fabriciovy burzy (Baroudi et al., 2013; Bermudez et al., 1988; Tacconi et al., 2001).

Patogenita a klinické příznaky: U zvířat se infekce *C. meleagridis* projevuje snížením přírůstku hmotnosti, průjmami, dochází ke zkrácení střevních klků a změně povrchové vrstvy slizničního epitelu (Gharagozlou et al., 2006; Goodwin et al., 1988). Klinická infekce *C. meleagridis* se u lidí projevuje akutním vodnatým průjmem, bolestí břicha, nevolností, zvracením a horečkou (Chappell et al., 2011; Insulander et al., 2012).

Hostitelská specifita: Přirozená infekce *C. meleagridis* byla zaznamenána u širokého spektra ptačích druhů, ale byla detekována i u psa v České republice (Hajdušek et al., 2004). Seznam ptačích hostitelů *C. meleagridis* je rozdělen do řádů níže.

- **Řád hrabaví (Galliformes):** Infekce *C. meleagridis* byla detekována u krůt domácích, křepelky šupinkaté (*Callipepla squamata*), křepelky japonské (*Coturnix japonica*), kura domácího a orebice rudé (*Alectoris rufa*) (Baroudi et al., 2013; Goodwin et al., 1988; Huber et al., 2007; Máca a Pavlásek, 2015; Nakamura et al., 2009; Pagès-Manté et al., 2007; Silverlås et al., 2012; Soltane et al., 2007; Tacconi et al., 2001; Wang et al., 2008; 2012; 2014a).
- **Řád papoušci (Psittaciformes):** U papoušků se infekce prokázala u alexandra malého (*Psittacula krameri*), kakadua moluckého (*Cacatua moluccensis*) a korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) (Abe a Iseki, 2004; Abe a Makino, 2010; Morgan et al., 2000a; Pavlásek, 1994a).
- **Řád pěvci (Passeriformes):** K infekci *C. meleagridis* byl z pěvců vnímavý brkoslav severní (*Bombycilla garrulus*) (Qi et al., 2011).

Experimentální studie prokázaly, že oocysty *C. meleagridis* mohou infikovat zvířata, jako jsou králíci (*Oryctolagus cuniculus* f. *domesticus*), krůty domácí, kuřata domácí, prasata (*Sus scrofa* f. *domestica*), telata (*Bos taurus*) a taky hlodavce, zejména myši domácí a potkany (*Rattus norvegicus*) (Akiyoshi et al., 2003; Darabus a Olariu, 2003; Huang et al., 2003; O'Donoghue, 1995).

Prevalence a výskyt u holubů: Ve městě Čeng-čou nacházejícího se v čínské provincii Che-nan byly z místního zverimexu odebrány vzorky trusu různých druhů ptáků. U holubů plemene pávík (n = 21) a hrdliček východních (*Streptopelia orientalis*) (n = 2) se potvrdila přítomnost *C. meleagridis* s prevalencí 8,7 %

(Qi et al., 2011). V Thajsku bylo ze třech různých lokací vytvořeno 7 setů se vzorky domestikovaných holubů. Jeden set obsahoval 10 vzorků a pouze u jednoho setu (25 %) byla detekována přítomnost *C. meleagridis* (Koompapong et al., 2014). V jižní Číně v provincii Kuang-tung byly v období od června roku 2012 do března 2013 odebrány vzorky holubího trusu (n = 244) ze čtyř chovných farem holubů domácích. Na farmě Chaozhou bylo detekováno jedno pozitivní zvíře a zjištěná prevalence byla 0,4 %. Životoschopné oocysty z výkalů měřily $4,51\text{--}5,79 \times 4,21\text{--}5,12 \mu\text{m}$ s poměrem mezi délkou a šířkou 1,04–1,28 (Li et al., 2015). Ze čtyř záchranných stanic v Galicii na severozápadě Španělska byly odebrány vzorky trusu od různých druhů ptáků. Pomocí molekulárních metod byla prokázána vnímavost hrdličky divoké (*Streptotelia turtur*) (n = 2) na *C. meleagridis* (50 %) (Reboredo-Fernández et al., 2015). V další studii bylo pomocí PCR a následné sekvenace detekováno *C. meleagridis* (25 %) u rok starého holuba skalního (Li et al., 2016). Mezi další ptáky, kteří mohou být potencionálním zdrojem infekce u lidí, je hrdlička černouchá (*Zenaida auriculata*), u které byl popsán výskyt *C. meleagridis* ve městě Londrina v Brazílii. Ze 194 vzorků bylo 30 zvířat (15,3 %) pozitivních na *Cryptosporidium* spp., přičemž zde nebyla zjištěna závislost na pohlaví ($P > 0,05$). Pouze 13 vzorků (86,7 %) bylo úspěšně sekvenováno a potvrzeno jako *C. meleagridis* (Seixas et al., 2019). Prevalence s hodnotou 25 % byla zjištěna i na trzích s ptactvem v Dháce ve městě Bangladéš, kde byl ze 4 vzorků 1 pozitivní na *C. meleagridis* (Kabir et al., 2020).

Zoonotický potenciál: *Cryptosporidium meleagridis* je považováno za jeden z hlavních původců lidské kryptosporidiózy (Baroudi et al., 2013). Některé studie prokázaly vysoké procento výskytu *C. meleagridis* u lidí. Na Pobřeží slonoviny byli pacienti vykazující známky kryptosporidiózy testováni a u 9/12 pacientů (75 %) byla prokázána infekce *C. meleagridis* (Berrilli et al., 2012). Výsledky studií zahrnující pacienty pozitivní na vir HIV se pohybovaly v hodnotách 11,3 % v severní Indii (Sharma et al., 2013), 20 % v Thajsku (Gatei et al., 2002) a 8,8 % v Peru. U dětí testovaných v Peru se infekce *C. meleagridis* prokázala u 8,2–8,7 % dětí (Cama et al., 2007; 2008; Xiao et al., 2001b).

1.6.2 *Cryptosporidium baileyi*

Morfologie: Oocysty *C. baileyi* měří 6,0–7,2 × 4,8–5,4 μm s poměrem délky k šířce 1,1–1,8 (Current et al., 1986) a jsou větší než oocysty druhu *C. meleagridis* (Fayer a Xiao, 2007).

Lokalizace: *Cryptosporidium baileyi* infikuje hlavně dýchací ústrojí (Current et al., 1986). Přirozená infekce byla zaznamenána ve spojivkách, nosohltanu, průdušnici, vzdušných vacích, tenkém střevě, slepém střevě, tlustém střevě, kloace, Fabriciově burze, ledvinách a močových cestách (Lindsay et al., 1990).

Patogenita a klinické příznaky: *Cryptosporidium baileyi* může způsobovat závažnou infekci v burze Fabriciově, což je orgán zodpovědný za humorální imunitu u ptáků (Scott, 2004). Ke klinickým příznakům patří potíže s dýcháním, kýčání, výtok ze zobáku a následný úhyn (Van Zeeland et al., 2008). U sokolů a sov *C. baileyi* podněcuje vznik onemocnění doprovázeného respiratorními a nervovými příznaky, záněty uší, proventrikulitidou a úhynem (Bougiouklis et al., 2013; Molina-López et al., 2010; Nakagun et al., 2017; Van Zeeland et al., 2008).

Hostitelská specifita: U druhu *C. baileyi* byla popsána celá řada ptačích hostitelů patřících do různých řádů, které jsou popsány níže.

- **Řád dlouhokřídlí (Charadriiformes):** Infekce byla nalezena u racka chechtavého (*Larus ridibundus*) (Pavlásek, 1993; Ryan et al., 2003b).
- **Řád hrabaví (Galliformes):** V rámci řádu hrabaví byly infekce *C. baileyi* potvrzeny u bažanta obecného (*Phasianus colchicus*), koroptve polní (*Perdix perdix*), křepelky japonské, křepelky proměnlivé (*Syonicus australis*), kura domácího, orebice rudé a tetřeva červeného (*Lagopus lagopus scotic*) (Baroudi et al., 2013; Coldwell et al., 2012; Huber et al., 2007; Iijima et al., 2018; Máca a Pavlásek, 2016; 2015; Morgan et al., 2001; Nakamura et al., 2009; Ng et al., 2006; Ryan et al., 2003b; Wang et al., 2012; 2014a).
- **Řád kondoři (Cathartiformes):** Z tohoto řádu bylo *C. baileyi* nalezeno u kondora havranovitého (*Coragyps atratus*) (Nakamura et al., 2009).
- **Řád krátkokřídlí (Gruiformes):** Z řádu krátkokřídlí byla infekce potvrzena u jeřába bělošjého (*Grus vipio*) (Ng et al., 2006).
- **Řád papoušci (Psittaciformes):** U ptáků patřících do řádu papoušci byla infekce nalezena u alexandra malého, amazoňana modrolícího (*Amazona*

dufresniana), ara ararauny (*Ara ararauna*), aratingy kropenaté (*Psittacara leucophthalmus*) a korely chocholaté (Abe a Iseki, 2004; Li et al., 2016; Oliveira et al., 2017b; Ryan et al., 2003b).

- **Řád pěvci (Passeriformes):** Z nejpočetnějšího řádu pěvci bylo *C. baileyi* detekováno u amadiny Gouldové (*Erythrura gouldiae*), bulbula šedobřichého (*Pycnonotus cyaniventris*), chocholouše obecného (*Galerida cristata*), kanára divokého (*Serinus canaria*), kardinála dominikánského (*Paroaria dominicana*), kněžíka plavohrdlého (*Sporophila frontalis*), majny chocholaté (*Acridotheres cristatellus*), majny obecné (*Acridotheres tristis*), rýžovníka šedého (*Padda oryzivora*), snovače Jacksonova (*Ploceus jacksoni*), stehlíka obecného (*Carduelis carduelis*), straky obecné (*Pica pica*), šafránky velké (*Sicalis flaveola*), timálie čínské (*Leiothrix lutea*), vlvovce červenohřbetého (*Cacicus haemorrhous*), vlvovce chocholatého (*Psarocolius decumanus*), zebříčky pestré (*Taeniopygia guttata*) (Iijima et al., 2018; Li et al., 2016; Nakamura et al., 2009; Ng et al., 2006; Qi et al., 2011; Ryan et al., 2003b; Sevá et al., 2011).
- **Řád pštrosi (Struthioniformes):** Infekce *C. baileyi* byla popsána u pštrosa dvourstého (*Struthio camelus*) (Qi et al., 2014; Ryan et al., 2003b; Wang et al., 2011).
- **Řád sokoli (Falconiformes):** Infekce *C. baileyi* byla detekována u raroha loveckého (*Falco rusticolus*) a raroha velkého (*Falco cherrug*) (Bougiouklis et al., 2013; Van Zeeland et al., 2008).
- **Řád sovy (Strigiformes):** V rámci řádu sovy bylo *C. baileyi* nalezeno u sovce sněžní (*Bubo scandiacus*) a výřečka malého (*Otus scops*) (Molina-López et al., 2010; Nakagun et al., 2017).
- **Řád šplhavci (Piciformes):** Ze šplhavců bylo *C. baileyi* popsáno pouze u tukana bělolícího (*Rhamphastus vitellinus*) (Ryan et al., 2003b).
- **Řád vrubozobí (Anseriformes):** *Cryptosporidium baileyi* bylo detekováno u bernešky velké (*Branta canadensis*), husy domácí (*Anser anser* f. *domestica*), husy labutí (*Anser cygnoides*), husice rezavé (*Tadorna ferruginea*), kachny domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*), morčáka prostředního (*Mergus serrator*) (Amer et al., 2010; Cunha et al., 2017;

Huber et al., 2007; Chvala et al., 2006; Jellison et al., 2004; Ryan et al., 2003b; Schulze et al., 2012).

Prevalence a výskyt u holubů: V provincii Kádísíja v Iráku byla ze vzorků trusu od divokých holubů zjištěná přítomnost *Cryptosporidium* spp. a ve 26,7 % byl potvrzen se výskyt *C. baileyi* (Jasim a Marhoon, 2015). Na farmě Huizho nacházející se v jižní Číně byl zjištěn výskyt *C. baileyi* u holubů s prevalencí 0,4 %. Vyloučené oocysty měřily $5,56\text{--}6,62 \times 4,92\text{--}5,25 \mu\text{m}$ s poměrem mezi délkou a šířkou 1,06–1,27 (Li et al., 2015). V provincii Babil v Iráku provedli odchyt divokých holubů a pomocí molekulárních metod identifikovali 11 vzorků (11/100) pozitivních na kryptosporidie. Sekvence určila výskyt *C. baileyi* u 9 vzorků (81,8 %) (Altamini a Al-Zubaidi, 2020). Prevalence 25 % (n = 4) byla zjištěna u holubů na trzích v Bangladéši (Kabir et al., 2020).

Zoonotický potenciál: V dřívějších studiích se *C. baileyi* vyskytovalo výhradně u zvířat, nicméně nedávná studie popsala infekci *C. baileyi* u imunokompetentní ženy s plicním hamartomem v Polsku (Kopacz et al., 2020).

1.6.3 *Cryptosporidium galli*

Morfologie: Qi et al. (2011) změřili oocysty o velikosti $7.6\text{--}8.3 \times 5.5\text{--}6.3 \mu\text{m}$ a byly o něco menší, než velikost oocyst *C. galli* ($8.0\text{--}8.5 \times 6.2\text{--}6.4 \mu\text{m}$) uváděná Ryanovou et al. (2003a).

Lokalizace: Výskyt *Cryptosporidium galli* je popsán u široké škály ptáků, kde infikuje epiteliální buňky proventrikulu (Ryan et al., 2003b).

Patogenita a klinické příznaky: Žaludeční infekce *C. galli* mohou být subklinické nebo spojené s klinickými příznaky charakterizovanými apatií, průjemem, úbytkem hmotnosti a sporadickým úhynem (Antunes et al., 2008; Blagburn et al., 1990; Clubb, 1997; Morgan et al., 2001; Silva et al., 2010). Chronická gastritida se potvrdila u kanárů, louskačů a korel s následným úhynem (Antunes et al., 2008).

Hostitelská specifita: Přirozená infekce *C. galli* byla zaznamenána u ptáků z různých řádů popsaných níže.

- **Řád hrabaví (Galliformes):** Z řádu hrabaví byl k infekci *C. galli* vnímavý jeřábek lesní (*Tetrastes bonasia rupestris*), kur domácí a tetřev hlušec (*Tetrao urogallus*) (Ng et al., 2006; Ryan et al., 2003a).

-
- **Řád papoušci (Psittaciformes):** U papoušků bylo *C. galli* popsáno u amazoňana vínorudého (*Amazona vinacea*), aymary pruhované (*Bolborhynchus lineola*), korely chocholaté, neofémy tyrkysové (*Neophema pulchella*) a tiriky zelené (*Brotogeris tirica*) (Iijima et al., 2018; Nakamura et al., 2009; 2014; Ng et al., 2006).
 - **Řád pěvci (Passeriformes):** U pěvců bylo *C. galli* nalezeno u astrilda rudokrkého (*Emblema pictum*), biskoupka ultramarínového (*Cyanocompsa brissonii*), brkoslava severního, drozda rezavobřichého (*Turdus rufiventris*), hýla křivčího (*Pinicola enucleator*), chůvičky japonské (*Lonchura striata* f. *domestica*), kanára divokého, kardinála dominikánského, kardinála šedého (*Paroaria coronata*), kněžika černobradého (*Sporophila caerulescens*), kněžika mokřadního (*Sporophila collaris*), kněžika šedobílého (*Sporophila schistacea*), louskače menšího (*Oryzoborus angolensis*), louskače tlustozobého (*Oryzoborus maximiliani*), panenky hnědoprsé (*Lonchura castaneothorax*), pásovníka krátkoocasého (*Peophila cincta*), rýžovníka šedého, saltatora zelenokřídlého (*Saltator similis*), stehlíka obecného, strnadce ranního (*Zonotrichia capensis*), šafránky velké, timálie stříbrouché (*Leiothrix argentauris*), vlhovce červenokřídlého (*Agelaius phoeniceus*), vlhovce chopi (*Gnorimopsar chopi*), zebřičky pestré (Antunes et al., 2008; Chelladurai et al., 2016; Iijima et al., 2018; Nakamura et al., 2009; 2014; Ng et al., 2006; Qi et al., 2011; Sevá et al., 2011; Silva et al., 2010).
 - **Řád plameňáci (Phoenicopteriformes):** Z řádu plameňáci byla infekce *C. galli* detekována u plameňáka amerického (*Phoenicopus ruber ruber*) (Ng et al., 2006).
 - **Řád zoborožci (Bucerotiformes):** Infekce *C. galli* byla popsána u dvojzoborožce velkého (*Buceros rhinoceros*) (Ng et al., 2006).

Prevalence a výskyt u holubů: Výskyt *C. galli* byl potvrzen u hrdličky černouché. Ve studii bylo pouze 15 vzorků úspěšně sekvenovaných, a z toho 2 vzorky (13,3 %) byly na 99 % podobné *C. galli* (Seixas et al., 2019).

Zoonotický potenciál: Tento druh kryptosporidie nemá zoonotický potenciál a nepředstavuje riziko pro veřejné zdraví.

1.6.4 *Cryptosporidium parvum*

Morfologie: Tvar oocyst *C. parvum* je elipsovité o velikosti $4,5 \times 5,0 \mu\text{m}$ (Upton a Current, 1985).

Lokalizace: *Cryptosporidium parvum* může infikovat celý intestinální trakt, ale především infikuje vrcholky klků tenkého střeva (Cacció et al., 2002).

Patogenita a klinické příznaky: U infikovaných zvířat je typickým příznakem vodnatý průjem bez přítomnosti krve. Patologické změny trávicího traktu se projevují zánětem střevního epitelu, atrofií klků (Thompson et al., 2005) a následně jejich zkracováním (Lumadue et al., 1998). U člověka se infekce *C. parvum* projevuje zejména průjmy (Cama et al., 2007; 2008).

Hostitelská specifita: *Cryptosporidium parvum* vyvolává parazitické onemocnění hlavně u skotu, ovcí, koz a může infikovat i prasata a myši (Akiyoshi et al., 2002; Giles et al., 2001; Morgan et al., 1999). Hostitelem této kryptosporidie jsou i ptáci ze sedmi řádů uvedených níže.

- **Řád brodiví (Ciconiiformes):** Infekce *C. parvum* byla detekována u čápa bílého (*Ciconia ciconia*) (Majewska et al., 2008).
- **Řád dlouhokřídlí (Charadriiformes):** V rámci řádu dlouhokřídlí bylo *C. parvum* popsáno pouze u dytíka úhorního (*Burhinus oedicnemus*) (Zylan et al., 2008).
- **Řád dravci (Accipitriformes):** Výskyt *C. parvum* byl identifikován u káněte lesního (*Buteo buteo*), krahujce obecného (*Accipiter nisus*), luňáka hnědého (*Milvus migrans*) a včelojeda lesního (*Pernis apivorus*) (Reboredo-Fernandez et al., 2015).
- **Řád hrabaví (Galliformes):** Infekce způsobená *C. parvum* byla zjištěna u krocana divokého, křepelky polní (*Coturnix coturnix*) a kura domácího (Jasim a Marhoon, 2015; McEvoy a Giddings, 2009).
- **Řád papoušci (Psittaciformes):** U papoušků bylo *C. parvum* nalezeno u alexandra malého, korely chocholaté a u rodů papoušičků (*Forpus* sp.) (Ferrari et al., 2018; Nakamura et al., 2009).
- **Řád pěvci (Passeriformes):** Z řádu pěvci byla přirozená infekce prokázána u havrana polního (*Corvus frugilegus*), chůvičky japonské, straky obecné

a vrány černé (*Corvus corone*) (Gomes et al., 2012; Majewska et al., 2008; Reboredo-Fernández et al., 2015).

- **Řád vrubozobí (Anseriformes):** Z řádu hrabavých byla infekce *C. parvum* popsána u bernešky velké, kachničky mandarinské (*Aix galericulata*), kachny divoké (*Anas platyrhynchos*), labutě velké (*Cygnus olor*) a morčáka velkého (*Mergus merganser*) (Graczyk et al., 1998b; Jasim a Marhoon, 2015; Majewska et al., 2008; Zhou et al., 2004).

Vnímavost kura domácího k infekci *C. parvum* byla nedávno experimentálně potvrzena (Holubová et al., 2020b).

Prevalence a výskyt u holubů: Přítomnost *C. parvum* u holubů byla potvrzena v provincii Kádísíja v Iráku z celkové prevalence *Cryptosporidium* sp. 26,7 % (Jasim a Marhoon, 2015). Ze dvou chovů v Brazílii bylo odebráno 100 vzorků trusu od poštovních holubů a přítomnost oocyst odpovídajících *C. parvum* byla prokázána mikroskopicky u 4 vzorků a pomocí amplifikace genu malé podjednotky rRNA u 7 vzorků (Oliveira et al., 2017a). V Iránské provincii Bábíl bylo vyšetřeno také 100 holubů a výskyt kryptosporidií byl potvrzen u 11 ptáků, *C. parvum* bylo detekováno u dvou zvířat (Altamini a Al-Zubaidi, 2020).

Zoonotický potenciál: *Cryptosporidium parvum* je druh fylogeneticky příbuzný s *C. hominis* a oba tyto druhy hrají významnou roli ve výskytu kryptosporidiózy u lidí (Alves et al., 2000; 2001; Awad-el-Kariem et al., 1995; 1998; Gasser et al., 2001; Ogunkolade et al., 1993; Palmer et al., 2003; Xiao a Ryan, 2004). V Evropě jsou *C. parvum* a *C. hominis* zodpovědní za více než 95 % lidské kryptosporidiózy (Coupe et al., 2005; Llorente et al., 2007; Sopwith et al., 2005).

1.6.5 *Cryptosporidium hominis*

Morfologie: Chen a Huang (2012) ve své studii detekovali oocysty *C. hominis* u mléčného skotu, které měřily $5,18 \times 4,98 \mu\text{m}$ s poměrem mezi délkou a šířkou 1,09. Pacient s onemocněním AIDS vylučoval oocysty o velikosti $4,86 \times 5,2 \mu\text{m}$ (Morgan-Ryan et al., 2002).

Lokalizace: *Cryptosporidium hominis* běžně infikuje tenké a tlusté střevo člověka (Casemore et al., 1997; Morgan-Ryan et al., 2002). U experimentálně infikovaných

selat byla infekce primárně lokalizována v tlustém střevě s minimální infekcí v tenkém střevě (Sheoran et al., 2012).

Patogenita a klinické příznaky: U dětí způsobuje *C. hominis* vodnaté průjmy, bolesti hlavy a břicha (Adler et al., 2017). Infekce zvířat *C. hominis* jsou obvykle lehké a asymptomatické. Studie zaměřená na telata nepotvrdila žádné zažívací nebo respirační potíže či zhoršený celkový stav zvířat odpovídající klinické kryptosporidíóze (Razakandrainibe et al., 2018).

Hostitelská specifita: U ptáků, nepatřících mezi holubovité, byl zatím hlášen jen jeden výskyt *C. hominis*, a to u bernešky velké, kde oocysty prošly trávicím traktem husy bez vzniku místa infekce (Zhou et al., 2004). Většina zpráv o infekci *C. hominis* je především popsána u člověka a primátů, konkrétně u kotula veverovitého (*Saimiri sciureus*), makaka jávského (*Macaca fascicularis*), makaka rhesuse (*Macaca mulatta*), paviána anubi (*Papio anubis*) a šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes*) (Feng et al., 2011; Karim et al., 2014; Li et al., 2011; Liu et al., 2015; Parsons et al., 2015; Srichareern et al., 2016; Ye et al., 2012; 2014). Přirozená infekce *C. hominis* se potvrdila i u dugonga indického (*Dugong dugon*) (Morgan et al., 2000b). Experimentální infekce ukázaly, že *C. hominis* není infekční pro myši, krysy, kočky nebo psy (Morgan-Ryan et al., 2002). Další studie ukázaly, že mohou být tímto druhem infikována také jehňata (Ebeid et al., 2003; Giles et al., 2001), selata (Akiyoshi et al., 2002; Giles, 2006; Widmer et al., 2000), telata (Akiyoshi et al., 2002; Giles, 2006; Guk et al., 2004; Tanriverdi et al., 2003) a pískomilové (Baishanbo et al., 2005).

Prevalence a výskyt u holubů: Abreu-Acosta et al. (2009) ve své studii ve městě Santa Cruz de Tenerife, nacházející se na Kanárských ostrovech, popsal výskyt *C. hominis* u zdivočelých a domácích holubů (5,9 %, n = 34).

Zoonotický potenciál: *Cryptosporidium hominis* je významný patogen u lidí a je zodpovědný za polovinu ohnisek kryptosporidíózy na celém světě (Hunter et al., 2004; McLauchlin et al., 2000; Peng et al., 1997; Sulaiman et al., 1998).

Níže se budu blíže věnovat druhům kryptosporidií detekovaných u holubů v této práci.

1.6.6 *Cryptosporidium muris*

Morfologie: Oocysty *C. muris* měří 7,5–9,8 (průměr 8,4 μm) × 5,5–7,0 (průměr 6,3 μm) (Iseki, 1986).

Lokalizace: Tento parazit lokalizovaný v žaludečních žlázách infikuje především hlodavce nezávisle na věku a pohlaví (Torres et al., 2000; Tyzzer, 1910).

Patogenita a klinické příznaky: Myši, u kterých bylo detekováno *C. muris* nevykazují žádné klinické příznaky (Angus et al., 1985, Aydin a Özgül, 1996).

Hostitelská specifita: U ptáků bylo v roce 2006 popsáno *C. muris* jako původce onemocnění lelkouna soviho (*Podargus stridoides*) z řádu lelkové (Caprimulgiformes) (Ng et al., 2006). V Číně byly oocysty tohoto druhu potvrzeny u pštrosů dvourstých (Qi et al., 2014). Přirozené infekce byly zachyceny u zvířat z řádu hlodavci a třídy savci popsané níže.

- **Řád hlodavci (Rodentia):** Z hlodavců byla infekce *C. muris* zaznamenána u burunduka páskovaného (*Eutamias sibiricus*), divokých krys (*Rattus* sp.), myši domácí, myši středozevní (*Mus spretus*), myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*), myšice lesní (*Apodemus flavicollis*), myšice východní (*Apodemus speciosus*), norníka rudého (*Clethrionomys glareolus*) a potkanů (*Rattus tanezumi*) (Čondlová et al., 2019; Hůrková et al., 2003; Chalmers et al., 1997; Murakoshi et al., 2013; Ng-Hublin et al., 2013; Torres et al., 2000; Zhao et al., 2019).
- **Třída savci (Mammalia):** U savců se infekce prokázala u bandikuta králíkovitého (*Macrotis lagotis*), damana skalního (*Procavia capensis*), kočky domácí (*Felis catus*), makaka jávského, psa domácího (*Canis familiaris*), prasete divokého (*Sus scrofa*), velblouda dvouhrbého (*Camelus bactrianus*) (Aydin a Özkul, 1996; Dubey et al., 2002; Lupo et al., 2008; Morgan et al., 2000c; Pavlásek a Ryan, 2007; Philip et al., 2008; Warren et al., 2003; Xiao et al., 1999; Zintl et al., 2007).

Z hospodářských zvířat byla experimentálně prokázána vnímavost *C. muris* pro jehňata a kůzlata (Kváč et al., 2008). K infekci nebyla vnímavá prasata, která byla infikována oocystami z divoké myši domácí (Kváč et al., 2012).

Zoonotický potenciál: Za poslední roky bylo hlášeno několik případů výskytu *C. muris* u HIV pozitivních a zdravých osob v Egyptě (Al-Brikan et al., 2008), Francii (Guyot et al., 2001), Indonésii (Katsumata et al., 2000), Jižní Indii (Muthusamy et al., 2006), Keni (Gatei et al., 2002), Peru (Palmer et al., 2003) a Thajsku (Tiangtip a Jongwutiwes, 2002). I když bylo dosud popsáno jen několik případů infekcí *C. muris*, žaludeční kryptosporidióza se vyskytuje mnohem častěji, než se předpokládalo, zejména u pacientů s onemocněním HIV (Lumadue et al., 1998). Ačkoli většina žaludečních kryptosporidiových infekcí u HIV pozitivních osob jsou patrně způsobeny z důvodu imunosuprese *C. parvum* nebo *C. hominis*, podíl *C. muris* na lidské kryptosporidióze je pravděpodobně podceňován (Palmer et al., 2003).

1.6.7 *Cryptosporidium ornithophilus*

Morfometrie: Holubová et al. (2020a) uvádí velikost oocyst *C. ornithophilus* v průměru $6,1 \times 5,1 \mu\text{m}$.

Lokalizace: *Cryptosporidium ornithophilus* způsobuje infekce ve slepém střevě, tračníku a Fabriciově burze (Holubová et al., 2020a; Santos et al., 2005).

Patogenita a klinické příznaky: Žádný z přirozeně nebo experimentálně infikovaných ptáků ve studii Holubové et al. (2020a) nevykazoval klinické příznaky.

Hostitelská specifita: *Cryptosporidium ornithophilus* byl nalezen u ptáků z řádu hrabaví, papoušci a pštrosi uvedených níže.

- **Řád hrabaví (Galliformes):** Infekce způsobená *C. ornithophilus* byla detekována pouze u kura domácího (Wang et al., 2014a).
- **Řád papoušci (Psittaciformes):** *C. ornithophilus* bylo nalezeno u papoušků konkrétně u alexandra velkého (*Psittacula eupatria*), aratingy kropenaté, aratingy sluneční (*Aratinga solstitialis*), eklektuse různobarvého (*Eclectus roratus*), kakadu inka (*Cacatua leadbeateri*), kakadu růžového (*Eolophus roseicapilla*), korely chocholaté, papouška Alexandřina (*Polytelis alexandrae*) (Ng et al., 2006; Sevá et al., 2011).
- **Řád pštrosi (Struthioniformes):** Infekce *C. ornithophilus* byla detekována u pštrosa dvouprstého (Meireles et al., 2006; Nakamura et al., 2009; Nguyen et al., 2013).

Zoonotický potenciál: *Cryptosporidium ornithophilus* nebylo dosud identifikováno u žádných jiných obratlovců než u ptáků.

2 Cíle

- Popsat výskyt a prevalenci kryptosporidií přirozeně infikujících domácí a volně žijící / zdivočelé holuby na území České republiky, případně dalších států Evropy.
- Pomocí molekulárních metod určit druh a genotyp kryptosporidií a pomocí parazitologických metod stanovit intenzitu infekce.
- Pomocí molekulárních metod provést srovnání izolátů získaných v rámci diplomové práce se studii provedenými ve světě.
- Určit zoonotický potenciál nalezených druhů a genotypů.

3 Materiál a metody

3.1 Biologický materiál

Pro účely diplomové práce byly v letech 2019–2021 sbírány vzorky trusu volně žijících a zájmově chovaných holubů po celé České republice, na Slovensku a v Chorvatsku. Individuální vzorky byly vloženy do mikrozkmavek a skladovány v lednici při 4 °C bez další fixace a konzervace. Část vzorků byla použita k izolaci DNA a vytvoření nátěrů na podložní skla. Vzorky, u kterých byla detekována přítomnost kryptosporidií, byly použity pro experimentální infekce.

3.2 Zvířata pro laboratorní infekce

K experimentům bylo použito sedm jedno-denních kuřat kura domácího a tři osmítýdenní SCID myš. Všechna zvířata byla umístěna ve zvěřinci Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. Kuřata byla chována v plastových chovných nádobách se savou podložkou. V prvních pěti dnech byly použity infralampy jako zdroj tepla. Imunodeficientní SCID myši byly chovány v plastových nádobách pro hlodavce s podestýlkou z dřevěných pilin. Všechna zvířata byla krmena sterilizovaným krmivem odpovídajícím druhu zvířete a sterilizovanou vodou *ad libitum*. Chovné nádoby umístěné ve zvěřinci byly čištěny každý den.

3.3 Metody

3.3.1 Barvení oocyst kryptosporidií

Všechny vzorky trusu volně žijících holubů, zájmově chovaných holubů a experimentálně infikovaných zvířat byly obarveny metodou anilin-karbol-methyl-violetí (Miláček a Vítovec, 1985) a metodou dle Ziehl-Neelsena (Henriksen a Pohlenz, 1981). U experimentálně infikovaných zvířat byla navíc provedena detekce oocyst pomocí specifických protilátek (Arrowood a Sterling, 1989).

Barvení oocyst kryptosporidií pomocí anilin-karbol-methyl-violetí (Miláček a Vítovec, 1985)

Zásobní roztoky:

- Roztok methylvioleti (0,6 g methylvioleti; 1 ml anilinu; 1 g fenolu; 30 ml alkoholu; 70 ml dH₂O (deionizované vody))
- Roztok 2% H₂SO₄
- Roztok tartrazinu (1% tartrazin v 1% kyselině octové)

Postup:

1. Na podložní sklo byl proveden tenký nátěr trusu.
2. Sklíčko s nátěrem bylo zafixováno methanolem v plameni.
3. Zafixovaný nátěr byl barven v roztoku methylvioleti po dobu 30 minut.
4. Sklíčko bylo opláchnuto pod tekoucí vodou.
5. V 2% kyselině sírové byla provedena diferenciacie po dobu 2 minut.
6. Nátěr byl opláchnut pod tekoucí vodou a vložen do roztoku tartrazinu na 3–5 minut.
7. Nátěr byl opláchnut pod tekoucí vodou a následně usušen.
8. Vzorky byly prohlíženy světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Barvení dle Ziehl-Neelsena (Henriksen a Pohlenz, 1981)**Zásobní roztoky:**

- Roztok karbolfuchsinu (2,5 ml rozpuštěných fenolových krystalů; 5 ml 100% ethanolu; 0,5 g práškového basickeho fuchsinu; 50 ml dH₂O)
- 1% kyselý alkohol (1 ml koncentrované kyseliny solné; 100 ml 70% ethanolu)
- 0,8% fast green zeleň (0,8 g prášku light green (světlá zeleň); 100 ml dH₂O)

Postup:

1. Trus byl pomocí špejle rozetřen na podložní sklo.
2. Vzorek byl fixován v 95–100% methanolu po dobu 10 minut.
3. Vzorek byl barven roztokem karbolfuchsinu po dobu 30 minut.
4. Vzorek byl opláchnut pod tekoucí vodou.
5. V 1% kyselém alkoholu bylo provedeno odbarvení, dokud nepřestala ze vzorku odtékat červená barva.
6. Vzorek byl omyt pod tekoucí vodou.
7. Vzorek byl dobarven světlou zelení po dobu 1 minuty.
8. Vzorek byl opláchnut pod tekoucí vodou a následně usušen při laboratorní teplotě.
9. Vzorek byl prohlížen světelným mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Značení oocyst kryptosporidií specifickými protilátkami (FITC) (Arrowood a Sterling, 1989)

Pro detekci byl použit komerční kit Crypto Cel (Cellabs Pty Ltb, Brookvale, NSW 2100 Austrálie).

Součásti kitu:

- Crypto Cel Reagent
- Positive Control Slide
- Mounting Fluid

Postup:

1. Na podložní skličko bylo nanášeno 20 μ l vzorku oocyst předčištěného na cesium chloridovém gradientu.
2. Vzorek byl ponechán schnout při laboratorní teplotě.
3. Vzorek byl fixován po dobu 5 minut v methanolu a nechán oschnout při laboratorní teplotě.
4. Na vzorek bylo přidáno 25 μ l Crypto Cel Reagent.
5. Vzorek byl vložen do vlhké komůrky a inkubován ve tmě při 37 °C po dobu 30 minut.
6. Vzorek byl opatrně opláchnut v roztoku PBS.
7. Skličko bylo usušeno a uchováno při 2–8 °C.
8. Před mikroskopováním byla ke vzorku přidána kapka Mounting Fluid a po přiložení krycího skla na vzorek byly odstraněny bubliny.
9. Sklička byla prohlížena fluorescenčním mikroskopem s filtrem WB 515 nm při zvětšení 1000 \times za použití imerzního oleje.

3.3.2 Hodnocení intenzity infekce

U mikroskopicky pozitivních vzorků byla intenzita infekce vyjádřena počtem oocyst v gramu trusu (OPG) (Kváč et al., 2007).

Postup:

1. Před provedením nátěru bylo podložní sklo zváženo s přesností na 0,001 g.
2. Na podložní sklo byl proveden nátěr trusu.
3. Sklo bylo znovu zváženo s přesností na 0,001 g.
4. Byla vypočítána hmotnost nátěru.

-
5. Byl spočítán počet oocyst na skle obarveném anilin-karbol-methyl violetí.
 6. Byl vypočítán počet oocyst na 1 gram trusu.

3.3.3 Izolace DNA z trusu

Celková genomová DNA z trusu byla izolována za použití komerčního kitu GeneAll® Exgene™ Stool DNA mini (GeneAll Biotechnology, co., Ltd., Soul, Jižní Korea).

Součásti kitu:

- FL pufr
- PB pufr
- NW pufr
- EzPass column (bílá kolona)
- Mini spin column (zelená kolona)
- 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky

Postup:

1. Vzorek trusu (200 mg) byl dán do Safe-Lock-Tube mikrozukavky s přidavkem 0,5 ml skleněných kuliček (0,5 mm), 3 zirkonových kuliček (1,0 mm) a 1 ml FL pufru.
2. Následně byl vzorek homogenizován přístrojem FastPrep® 24 MP (Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) po dobu 1 minuty při rychlosti 5,5 m/s.
3. Mikrozukavka byla inkubována 5 minut při laboratorní teplotě a následně centrifugována 5 minut při 16 000 g.
4. Veškerý supernatant byl přepipetován na EzPass kolonku (bílá kolonka) a vzorek byl centrifugován 1 minutu při 16 000 g.
5. Filtrát ze sběrné zkumavky byl vylit do odpadu a na kolonku bylo napipetováno 100 µl EB pufru. Vzorek byl inkubován 1 minutu při laboratorní teplotě a znovu centrifugován 1 minutu při 16 000 g.
6. K filtrátu z EzPass kolonky bylo napipetováno 500 µl PB pufru, pomocí pipety bylo provedeno promíchání.
7. Všechn obsah sběrné zkumavky byl přenesen na MiniSpin column (zelená kolonka).
8. Zelená kolonka byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g a poté byl vylit odpad ze sběrné zkumavky.

-
9. Na střed kolonky bylo napipetováno 500 μ l pufru NW a vzorek byl centrifugován po dobu 1 minuty při 16 000 g.
 10. Vzorek byl znovu centrifugován 1 minutu při 16 000 g, aby došlo k úplnému odstranění zbytků NW pufru.
 11. Zelená kolonka byla přenesena na čistou mikrocentrifugační zkumavku.
 12. Na kolonku bylo napipetováno 200 μ l EB pufru, inkubováno 1 minutu a následně centrifugováno 1 minutu při 16 000 g.
 13. Z mikrozukavky byla odstraněna kolona a purifikovaná DNA byla skladována v mrazícím boxu při teplotě -20 °C.

3.3.4 Izolace DNA z tkáně

Celková genomová DNA z tkáně byla izolována za použití komerčního kitu DNeasy Blood & Tissue (QIAGEN).

Součásti kitu:

- ATL pufr
- proteináza K
- EtOH
- AL pufr
- AW1 pufr
- AW2 pufr
- AE pufr

Postup:

1. Do mikrozukavky bylo nastříháno asi 10 mg tkáně a přidáno 0,5 ml skleněných kuliček (0,5 mm) a 3 zirkonové kuličky (1,0 mm).
2. Ke vzorku bylo připipetováno 180 μ l ATL pufru a vzorek byl vortexován.
3. Vzorek byl homogenizován pomocí FastPrep® 24 MP Biomedicals 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s.
4. Byla provedena centrifugace po dobu 10 sekund při 6 000 g a ke vzorku bylo připipetováno 20 μ l proteinázy K.
5. Vzorek byl inkubován v termobloku 1 hodinu při 56 °C, během inkubace byl vzorek pravidelně promícháván.
6. Vzorek byl vložen do centrifugy na 10 sekund při 6 000 g.

-
7. Do mikrozkušavky bylo připipetováno 200 μ l AL pufru a vzorek byl zvortexován.
 8. Bylo připipetováno 200 μ l 96% EtOH a vzorek byl zvortexován.
 9. Vzorek byl následně centrifugován 10 sekund při 6 000 g.
 10. Vzniklý supernatant byl přenesen na Mini spin kolonku.
 11. Mini spin kolonka byla centrifugována 1 minutu při 8 000 g a filtrát ze sběrné zkumavky byl vylit.
 12. Na kolonku bylo napipetováno 500 μ l AW1 pufru a mikrozkušavka byla centrifugována po dobu 1 minuty při 8 000 g.
 13. Filtrát ze sběrné zkumavky byl vylit.
 14. Na kolonku bylo připipetováno 500 μ l AW2 pufru a vzorek byl centrifugován po dobu 1 minuty při 14 000 g.
 15. Kolona byla přenesena na čistou mikrozkušavku.
 16. Na střed kolony bylo napipetováno 200 μ l AE pufru, vzorek byl inkubován 1 minutu při laboratorní teplotě a následně centrifugován 1 minutu při 8 000 g.
 17. Vyizolovaná DNA byla skladována v mikrozkušavce při teplotě -20 °C.

3.3.5 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Přítomnost specifické DNA kryptosporidií byla detekována pomocí nested PCR amplifikující část genu kódujícího malou podjednotku rRNA (SSU; Jiang et al., 2005; Xiao et al., 1999) a 60 kDa glykoprotein (gp60; Alves et al., 2003; Peng et al., 2001). Jako negativní kontrola byla použita PCR voda a jako pozitivní kontrola byla použita DNA *Cryptosporidium* chipmunk genotyp I. Nukleotidové sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 3.1.

DNA byla amplifikována v termocykleru za použití programu:

- počáteční denaturace po dobu 3 minut při 95 °C;
- 35 cyklů zahrnující denuraci po dobu 45 sekund při 95 °C;
- specifické nasedací teploty primerů trvající 45 sekund;
- extenze 1 minutu při 72 °C;
- finální extenze 10 minut při 72 °C.

Tabulka 3.1: Sety primerů pro molekulární analýzy včetně nasedacích teplot.

SSU	
Primární PCR – nasedací teplota 50 °C	
F1	5'- TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG - 3'
R1	5'- CCC ATT TCC TTC AAA CAG GA - 3'
Sekundární PCR – nasedací teplota 55 °C	
F2	5'- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG - 3'
R2	5'- AAG GAG CAA CAC ACA CAC - 3'

gp60	
Primární PCR – nasedací teplota 50 °C	
F1	5'- GAG ATT GTC GCT CGT TAT CG - 3'
R1	5'- GAT TGC AAA AAC GGA AGG - 3'
Sekundární PCR – nasedací teplota 50 °C	
F2	5'- ATA GTC TCC GCT GTA TTC - 3'
R2	5'- GGA AGG AAC GAT GTA GCT - 3'

Mix pro primární produkt PCR obsahoval z celkových 50 µl reakčního objemu: 2 µl genomové DNA, 2,5 U Taq DNA polymerázy (Dream Taq Green DNA Polymerase, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0,5× PCR buffer pro amplifikaci SSU a 1× PCR buffer (gp60), 6 mM MgCl₂ (SSU) a 3 mM MgCl₂ (gp60), 200 µM deoxyribonukleosidu trifosfát, 100 mM každého z primerů a 2 µL bovinního sérového albuminu (BSA; 10 mg ml⁻¹; New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu bylo složení reakční směsi následovné. Místo templátové DNA byly použity 2 µl primárního produktu PCR, koncentrace MgCl₂ byla 3 mM a nebylo přidáno BSA.

3.3.6 Gelová elektroforéza

PCR produkt ze sekundární reakce byl detekován na 1% agarózovém gelu s přidavkem ethidium-bromidu (EtBr). Poté byla provedena vizualizace pomocí transiluminátoru při vlnové délce 320 nm.

Zásobní roztoky:

- 50× TAE pufr (Tris báze 242 g; ledová kyselina octová 47,1 ml; 0,5 M EDTA 100 ml; pH 8,00)
- Agarósa (Biotech, Heidelberg, Německo)
- Ethidium bromid (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 100 bp DNA Ladder (O'Gene Ruler™, Biogen, Londýn, Velká Británie)

Postup:

1. Do nosiče byly připraveny hřebeny.
2. V Erlenmeyerově baňce byla smíchána navážená agaróza s TAE pufrem (na 1g agarózy 100 ml TAE pufru).
3. Baňka byla vložena do mikrovlnné trouby a po rozpuštění agarózy ochlazena pod tekoucí vodou na přibližnou teplotu 50 °C.
4. Do baňky s gelem byl napipetován 1 µl ethidium bromidu (0,2 µg/ml) a roztok byl následně promíchán.
5. Obsah baňky byl nalit do připraveného nosiče s hřebeny a gel byl ponechán ztuhnout (15–20 minut).
6. Hřebeny byly vyjmuty a gel vložen do elektroforetické vany s TAE pufrem.
7. Do první jamky v gelu bylo naneseno 10 µl velikostního markeru (100 bp, O'Gene Ruler™, Biogen, Londýn, Velká Británie), do dalších jamek 20 µl produktu sekundární PCR.
8. Napětí bylo nastaveno na 90 V po dobu potřebnou k separaci fragmentů DNA (cca 50 minut).
9. DNA fragmenty byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru a byl pořízen snímek výsledného gelu.

3.3.7 Izolace fragmentů DNA z gelu

Produkty gelové elektroforézy byly vyizolovány pomocí komerčně dodávaného kitu Gen Elute (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) podle doporučení výrobce.

Součásti kitu:

- Column Preparation Solution
- Gel Solubilization Solution
- Wash Solution Concentrate G
- Elution Solution

Postup:

1. Z agarózového gelu byl čistým skalpelem vyříznut fragment DNA a vložen do připravené mikrozkušavky.
2. Do mikrozkušavky bylo připipetováno 500 µl Gel Solubilization Solution.

-
3. Mikrozkušavka byla inkubována po dobu 10 minut při teplotě 50 °C a každé 2–3 minuty byla promíchána.
 4. PCR voda na eluci byla ponechána v inkubátoru při 65 °C.
 5. Na sestavenou Binding Column G bylo napipetováno 500 µl Column Preparation Solution a kolona byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g.
 6. K rozpuštěnému gelu bylo připipetováno 150 µl isopropanolu a promícháno.
 7. Na kolonu (Binding Column G) byl nanesen veškerý objem vzorku a kolona byla centrifugována po dobu 1 minuty při 16 000 g.
 8. Ze sběrné mikrozkušavky byl vylit odpad, a ta byla znovu použita s kolonou.
 9. Na kolonu bylo napipetováno 700 µl Wash Solution G a centrifugováno po dobu 1 minuty při 16 000 g.
 10. Ze sběrné mikrozkušavky byl vylit odpad, a ta byla znovu použita s kolonou, následně byla centrifugována bez jakýchkoli přísad roztoků po dobu 1 minuty při 16 000 g.
 11. V centrifuze byla mikrozkušavka otočena o 180° a centrifugována 3 minuty při 16 000 g.
 12. Do nové 1,5 ml mikrozkušavky byla vložena kolona a na střed kolony bylo napipetováno 30 µl PCR vody předehřáté na 65 °C.
 13. Mikrozkušavka byla inkubována 1 minutu při laboratorní teplotě a poté centrifugována 1 minutu při 16 000 g.
 14. Získaný fragment DNA v mikrozkušavce byl skladován v lednici při teplotě 4 °C.

3.3.8 Sekvenování

Sekvenování sekundárních PCR produktů bylo provedeno pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit a sekvenátoru ABI123130 za použití sekundárních primerů v komerčních firmách. (SeqMe, Dobříš, Česká republika; nebo Eurofins, Praha, Česká republika).

3.3.9 Fylogenetické analýzy

Získané sekvence byly spojeny pomocí programu Chromas Pro v 2.4.1 (Technelysium, Pty Ltd, Jižní Brisbane, Austrálie) a následně porovnány se sekvencemi uloženými v GenBank. Dataset zarovnaných sekvencí byl ručně zkontrolován v programu BioEdit a výsledný alignment byl vytvořen pomocí online

serveru MAFFT verze 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server>). Nejvhodnější fylogenetický model pro analýzu byl vybrán pomocí softwaru MEGA X. Metodou Maximum likelihood (ML) byl zkonstruován fylogenetický strom se substitučním modelem, který byl vybrán pomocí Bayesiánského informačního kritéria. Bootstrapový konsenzus výsledného stromu byl získán na základě 1 000 opakování. Finální podoba fylogenetických stromů byla ručně upravena pomocí programu CorelDraw X7 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada).

3.3.10 Purifikace oocyst

Trus s oocystami byl rozmělněn v třecí misce s deionizovanou vodou. Pomocí sacharózového gradientu byly oocysty přečištěny a vzniklý sediment byl dočištěn pomocí cesium chloridového gradientu.

Sacharózový gradient (Arrowood a Sterling, 1987)

Zásobní roztoky:

- Sheaterův cukerný roztok: dH₂O, cukr (259 ml dH₂O a 405 g cukru)
- 1% PBS Tween (1% Tween 20 v PBS (1 l dH₂O; 80 g NaCl; 2 g KCl; 14,4 g Na₂HPO₄ × 12 dH₂O; 2,4 g KH₂PO₄))
- Pracovní Sheaterovy roztoky:
roztok 1: 1+2 (1 díl Sheater + 2 díly PBS Tween)
roztok 2: 1+4 (1 díl Sheater + 4 díly PBS Tween)

Postup:

1. Trus byl zbaven příměsí přecezením přes jemné (čajové) sítko.
2. Pomocí Pasteurovy pipety byl do 4 silnostěnných skleněných zkumavek o objemu 100 ml navrstven gradient:
 1. vrstva: 30 ml Sheater 1+2
 2. vrstva: 30 ml Sheater 1+4
 3. vrstva: 15 ml vzorku
3. Zkumavky byly vyváženy a centrifugovány při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
4. Vrchní zbarvená vrstva byla odsáta a zbytek supernatantu byl přenesen do čisté zkumavky.
5. Zkumavky byly doplněny deionizovanou vodou a centrifugovány po dobu 20 minut při 4 °C a 1370 g.

-
6. Horní polovina zkumavky byla odsáta a vzorky byly doplněny deionizovanou vodou.
 7. Vzorky byly centrifugovány po dobu 20 minut při 4 °C a 1370 g.
 8. Sediment byl přenesen do čisté zkumavky a následně uchován při 4 °C v PBS.

Cesium chloridový gradient (Arrowood a Donaldson, 1996)

Zásobní roztoky:

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

Postup:

1. Oocysty byly po přečištění na sacharózovém gradientu centrifugovány 10 minut při 1450 g a 4 °C.
2. Supernatant byl odebrán a sediment s oocystami byl resuspendován v PBS.
3. Do čisté mikrozkušavky o objemu 2 ml byl napipetován 1 ml CsCl.
4. Do zkumavky s CsCl bylo navrstveno 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
5. Vzorek byl centrifugován 3 minuty při 16 000 g a 20 °C.
6. Supernatant byl přepipetován do čisté 50 ml centrifugační zkumavky.
7. Zkušavka byla doplněna deionizovanou vodou a centrifugována 20 minut při 4 °C a 1370 g.
8. Supernatant byl odsán na konečný objem 5 ml.
9. Vzorek byl doplněn deionizovanou vodou, vortexován a centrifugován 20 minut při 20 °C a 1370 g. Tento proces byl opakován 3×.
10. Oocysty byly uchovány v deionizované vodě při 4 °C.

3.3.11 Design experimentu

Každé laboratorní zvíře bylo infikováno pomocí jícnové sondy dávkou 500 oocyst *C. meleagridis* resuspendovaných v 200 µl dH₂O. Od všech experimentálních zvířat byl individuálně odebírán trus do mikrozkušavek po dobu 30 dnů po infekci, pokud nedošlo k předčasnému usmrcení pozitivního jedince za účelem pitvy (viz kapitola 3.3.4). Každý vzorek byl vyšetřen na přítomnost oocyst kryptosporidií pomocí barvicí metody anilin-karbol-methyl violet' (viz kapitola 3.3.1) a na přítomnost specifické DNA kryptosporidií pomocí amplifikace genu SSU metodou PCR (viz kapitola 3.3.5).

3.3.12 Histologické vyšetření

Vzorky vnitřních orgánů (proventrikulus, ventrikulus, dvanáctník, lačník, kyčelník, slepá střeva, kolon, ledviny, plíce, srdce a průdušnice) experimentálně infikovaných kurů domácích byly odebrány 12 DPI (dnů po infekci) a fixovány ve 4% roztoku formaldehydu. Byla použita parafinová metoda a řezy tkáně byly nabarveny hematoxylin-eosinem a periodic acid shiff (PAS) barvením.

Zásobní roztoky a chemikálie:

- I. vzestupná alkoholová odvodňovací řada (70% alkohol; 80% alkohol; 96% alkohol; aceton; xylen 2×)
- Parafinová řada (4 následné roztoky parafínu, 1:3; 1:1; 3:1; 100% parafín)
- Alkoholová sestupná řada, odparafinovací řada (xylen; alkohol 96%, alkohol 80%; alkohol 70%, dH₂O)
- II. vzestupná odvodňovací řada (70% alkohol; 80% alkohol; 96% alkohol; karboxylen; xylen)
- Kanadský balzám

Postup:

1. Vzorky byly odvodňovány I. vzestupnou alkoholovou řadou a po uplynutí 60 minut byl roztok vyměněn.
2. V posledním roztoku (xylen) byly vzorky ponechány 90 minut.
3. U vzorků bylo provedeno prosycení parafinem (2–4 hodiny v parafínu I; 4–6 hodin v parafínu II; 8–12 hodin v parafínu III, 8–12 hodin ve 100% parafínu).
4. Vzorky byly zality čistým parafinem a byly vytvořeny histologické bločky.
5. Pomocí mikrotomu byly zhotoveny 5 µm silné histologické řezy a umístěny na podložní sklíčka.
6. Vzorky byly ponechány 24 hodin na plotně o teplotě 42 °C.
7. U preparátu bylo provedeno odparafinování v xylen a sestupnou alkoholovou řadou vždy po 5 minutách.
8. Vzorky byly nabarveny hematoxylin-eosinem nebo periodic acid shiff (PAS) a poté bylo provedeno odvodňování II. alkoholovou vzestupnou řadou vždy po 5 minutách, v karboxylenech byly preparáty ponechány 1 minutu.

-
9. Zhotovené preparáty byly zamontovány do kanadského balzámu a sušeny při teplotě 37 °C.
 10. Vzorky byly prohlíženy mikroskopem (Olympus IX70) vhodným zvětšením.

Barvení hematoxylin-eosinem

Zásobní roztoky:

- Roztok hematoxylinu (0,5 g hematoxylin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 500 ml dH₂O; 25 g síran hlinito-amonný; 0,1 g jodičnan sodný; 20 ml kyselina octová)
- Roztok eosinu (0,5 g eosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA); 250 ml dH₂O; 10 ml kyselina octová)

Postup:

1. Byly připraveny odparafinované řezy.
2. Vzorky byly barveny 10 minut v roztoku hematoxylinu.
3. Vzorky byly vloženy pod tekoucí vodu po dobu 10 minut.
4. Vzorky byly vloženy do roztoku eosinu na 5 minut.

Barvení periodic acid shiff (PAS)

Zásobní roztoky:

- Schiffovo reagens (100 ml H₂O; 1 g basický fuchsin; 10 ml 1N kyselina chlorovodíková; 1 g pyrosiřičitan draselný; 0,5 g aktivní uhlí)
- Siřičitá voda (5 ml 1N HCl; 0,5 g pyrosiřičitan draselný; 100 ml dH₂O)
- Roztok kyseliny jodisté (0,8 g ve 100 ml destilované H₂O)

Postup:

1. Byly připraveny odparafinované řezy.
2. Řezy byly vloženy do roztoku kyseliny jodisté po dobu 10 minut.
3. Řezy byly vloženy pod tekoucí vodu po dobu 10 minut.
4. Vzorky byly vloženy do Schiffova reagens po dobu 30 minut.
5. Vzorky byly oplachovány 5 minut v lázních siřičité vody.
6. Vzorky byly vloženy pod tekoucí vodu na 15 min.
7. Řezy byly ponořeny do hematoxylinu na 1–2 minuty.
8. Vzorky byly opláchnuty v 96% alkoholu, butylalkoholu a xylenu.

Montování nabarvených řezů

Postup:

1. Obarvené řezy byly odvodněny II. alkoholovou vzestupnou řadou.
2. Kanadský balzám byl kápnut na podložní sklo s řezy.
3. Řezy byly přikryty dostatečně velkým krycím sklíčkem.
4. Vzniklé vzduchové bubliny byly vytlačeny mírným tlakem na krycí sklo.
5. Hotový preparát byl vložen do termostatu na teplotu 37 °C, kde kanadský balzám zaschne.

Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM)

Zásobní roztoky:

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

Postup:

1. V 2,5% glutaraldehydu v kakodylátovém pufru byly fixovány přes noc vzorky sliznice orgánů při 4 °C.
2. Vzorky byly promyty v kakodylátovém pufru 3× 15 minut.
3. Vzorky byly fixovány ve 2% oxidu osmičelém v kakodylátovém pufru po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě.
4. Vzorky byly promyty v kakodylátovém pufru 3× 15 minut.
5. Po dehydrataci vzestupnou acetonovou řadou byly vzorky vysušeny metodou kritického bodu (CPD).
6. Pomocí oboustranné lepící pásky byly vysušené vzorky nalepeny na hliníkový terčík a pozlaceny.
7. Vzorky byly prohlíženy pomocí elektronového mikroskopu JOEL JSM-7401F-FE SEM

3.3.13 Statistická analýza

Byla vypočtena prevalence jako podíl počtu jedinců s kryptosporidiovou infekcí k počtu všech vyšetřených jedinců, vyjádřeno v procentech. Byly stanoveny rozdíly v prevalenci kryptosporidií mezi zdivočelými a zájmově chovanými holuby. Analýza

byla prováděna pomocí programu Epi Info (TM) 7.1.1.14 (Centers for Disease Control and Prevention, GA, USA).

4 Výsledky

4.1 Výskyt kryptosporidií u holubů

Celkem bylo vyšetřeno 603 vzorků trusu pocházejících od zdivočelých ($n = 214$) a zájmově chovaných holubů ($n = 389$) z 25 lokalit. Kryptosporidie byly detekovány v šesti ze 14 chovů a na třech z 11 venkovních lokalit. Specifická DNA kryptosporidií byla prokázána pomocí PCR celkem v 17 (2,8 %) vzorcích, z toho u 14 (82,4 %) zájmově chovaných a 3 (17,6 %) zdivočelých holubů. Pomocí mikroskopického vyšetření vzorků trusu barvených anilin-karbol-methyl violetí byly oocysty kryptosporidií detekovány pouze ve 3 (0,5 %) vzorcích trusu od zájmově chovaných holubů. Všechny mikroskopicky pozitivní vzorky byly také současně molekulárně pozitivní (tabulka 4.2 a 4.3). Vzorky trusu holubů pocházející z Chorvatska a Slovenska byly negativní na přítomnost kryptosporidií. Statistická analýza prokázala častější výskyt kryptosporidiiových infekcí u zájmově chovaných holubů ($\chi^2 = 14,5919$; stupně volnosti = 1; $P > 0,001$).

Tabulka 4.2: Druhy kryptosporidií detekované pomocí PCR/sekvenace malé podjednotky rRNA (SSU) a 60 kDa glykoproteinu (gp60) u volně žijících (D) a chovaných (CH) holubů v České republice (CZE), Slovensku (SVK) a Chorvatsku (HRV). Intenzita infekce kryptosporidií je vyjádřena jako počet oocyst na gram trusu (OPG).

Stát	Lokalita	Typ	Počet odebraných/ pozitivních	ID pozitivních zvířat	Mikroskopická pozitivita (OPG)	Genotypizace	
						SSU	gp60
CZE	Bedihošť	CH	10/0	-	-	-	-
CZE	Bohdalov	CH	48/1	47329	-	<i>C. parvum</i>	IIa
CZE	České Budějovice	D	27/1	48347	-	<i>C. meleagridis</i>	IIIk
CZE	Děčín	D	20/2	51779	-	<i>C. galli</i>	-
				51794	-	<i>C. meleagridis</i>	IIIk
CZE	Domažlice	D	15/1	52478	-	<i>C. parvum</i>	IIa
CZE	Hlinsko	CH	29/3	52490	-	<i>C. parvum</i>	IIa
				52494	-	<i>C. parvum</i>	IIa
				52482	-	<i>C. baileyi</i>	-
CZE	Holubeč	CH	84/4	47511	-	<i>C. ornithophilus</i>	-
				47475	25 000	<i>C. meleagridis</i>	IIIk
				47477	-	<i>C. meleagridis</i>	IIIk
				47478	10 000	<i>C. meleagridis</i>	IIIk
CZE	Horoměřice	CH	11/0	-	-	-	-

Tabulka 4.3 (pokračování tab. 4.2): Druhy kryptosporidií detekované pomocí PCR/sekvenace malé podjednotky rRNA (SSU) a 60 kDa glykoproteinu (gp60) u volně žijících (D) a chovaných (CH) holubů v České republice (CZE), Slovensku (SVK) a Chorvatsku (HRV). Intenzita infekce kryptosporidií je vyjádřena jako počet oocyst na gram trusu (OPG).

Stát	Lokalita	Typ	Počet odebraných/ pozitivních	ID pozitivních zvířat	Mikroskopická pozitivita (OPG)	Genotypizace	
						SSU	gp60
CZE	Kaplice	CH	32/0	-	-	-	-
		D	9/0	-	-	-	-
CZE	Kdyně	CH	41/3	47518	-	<i>C. muris</i>	-
				47552	-	<i>C. muris</i>	-
				47550	-	<i>C. ornithophilus</i>	-
CZE	Klatovy	D	23/0	-	-	-	-
CZE	Kosmonosy	D	25/0	-	-	-	-
CZE	Křižanov	CH	11/0	-	-	-	-
CZE	Mikulov	D	9/0	-	-	-	-
CZE	Opatovice nad Labem	CH	10/0	-	-	-	-
CZE	Praha	D	14/0	-	-	-	-
CZE	Újezd	CH	10/0	52363	-	<i>C. meleagridis</i>	IIIk
CZE	Vídeň	D	28/0	-	-	-	-
CZE	Vimperk	CH	41/2	52396	5 000	<i>C. baileyi</i>	-
CZE	Vítanov	CH	30/0	-	-	-	-
CZE	Vrbatův Kostelec	CH	15/0	-	-	-	-
CZE	Všemíný	CH	17/0	-	-	-	-
HRV	Vranské jezero	D	37/0	-	-	-	-
SVK	Dunajská Streda	D	7/0	-	-	-	-

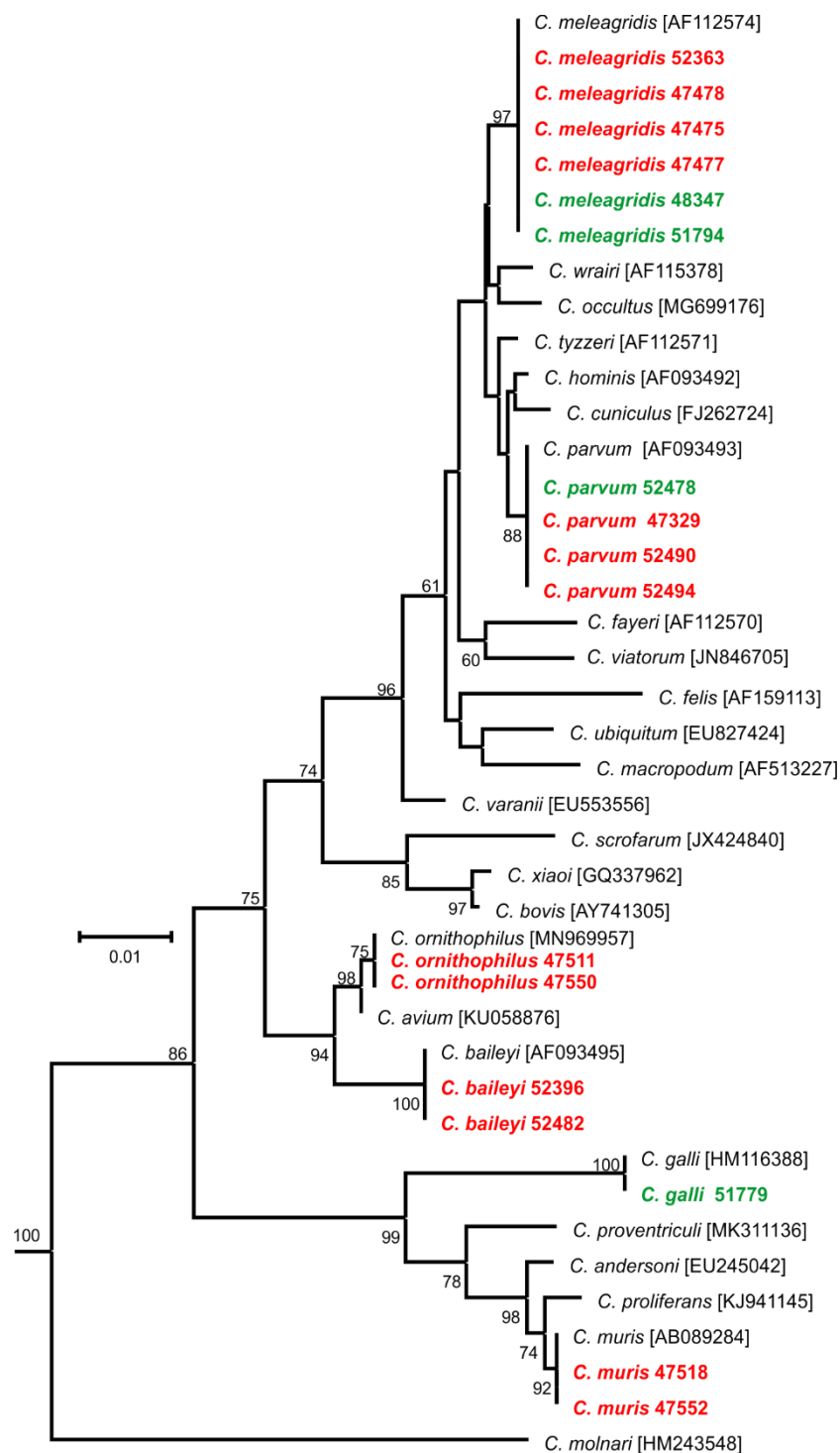
4.2 Intenzita infekce

Intenzita infekce u tří mikroskopicky pozitivních holubů se pohybovala v rozmezí od 5 000 do 25 000 OPG. Dva holubi ze stejného chovu vylučovali oocysty *C. meleagridis* o intenzitě od 10 000 do 25 000 OPG (tabulka 4.2 a 4.3). Holub pozitivní na přítomnost infekce *C. baileyi* vylučoval oocysty o intenzitě 5 000 OPG. Žádný z přirozeně infikovaných holubů nevykazoval v době odběru klinické projevy kryptosporidiózy, ani nebyly hlášeny žádné klinické změny chovatelem. Žádný vzorek trusu nevykazoval v době odběru známky průjmu.

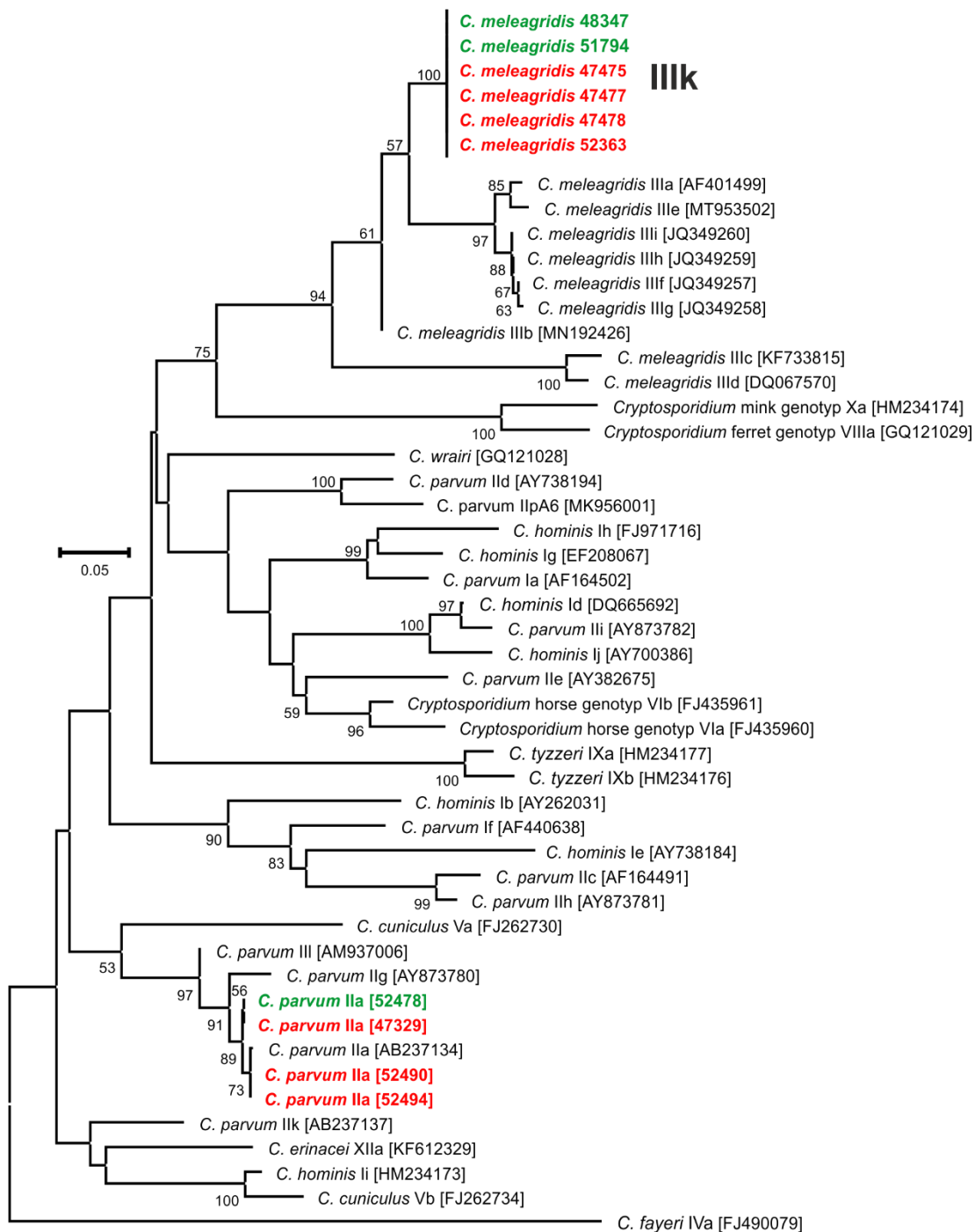
4.3 Diverzita kryptosporidií u holubů

Všechny vzorky obsahující specifickou DNA kryptosporidií byly úspěšně genotypizovány na genech kódujících SSU a gp60 (tabulka 4.2 a 4.3). Fylogenetické analýzy založené na sekvenci SSU získaných v této práci a sekvencích uložených v GenBank prokázaly přítomnost 6 druhů (obrázek 4.1). Druhy *C. baileyi* (n = 2), *C. muris* (n = 2) a *C. ornithophilus* (n = 2) byly detekovány pouze u holubů v zájmových chovech. Druh *C. galli* (n = 1) byl detekován ve vzorcích od divokých holubů. Dominantními druhy v této studii byly druhy *C. meleagridis* (n = 6) a *C. parvum* (n = 4), které byly potvrzeny u chovných i divokých holubů.

Analýza částečných sekvencí genu kódujícího gp60 prokázala přítomnost nového subtypu *C. meleagridis* subtypu IIIk a *C. parvum* subtypu IIa (obrázek 4.2).



Obrázek 4.1: Fylogenetický strom vztahů izolátů kryptosporidií získaných v této diplomové práci (tučně) a sekvencí uložených v genové bance (GenBank) zkonstruovaný na základě sekvencí genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU) a vytvořený metodou Maximum likelihood. V hranatých závorkách jsou uvedeny identifikační čísla sekvencí v GenBank. Měřítko délky větví je uvedeno u stromu. Červené znázornění značí zájmové chovy a zelené znázorňuje zdivočelé holuby.



Obrázek 4.2: Fylogenetický strom vztahů izolátů kryptosporidií získaných v této diplomové práci (tučně) a sekvencí uložených v genové bance (GenBank) zkonstruovaný na základě částečných sekvencí genu kódujícího 60 kDa glykoprotein a vytvořený metodou Maximum likelihood. hranatých závorek jsou uvedena identifikační čísla sekvencí v GenBank. Měřítko délky větví je uvedeno u stromu. Červené znázornění značí zájmové chovy a zelené znázorňuje zdivočelé holuby.

4.4 Infektivita *Cryptosporidium meleagridis* pro kuřata a SCID myši

Vzhledem k nízkému množství získaných životaschopných oocyst z přirozeně infikovaných holubů byla hostitelská specifita experimentálně testována pouze u *Cryptosporidium meleagridis* (izolát 47475, tabulka 4.2). U žádné ze tří experimentálně inokulovaných SCID myši nebyla v průběhu experimentu zjištěna přítomnost oocyst nebo specifické DNA *C. meleagridis* v trusu. Oocysty *C. meleagridis* byly infekční pouze pro kuřata, u kterých byla prokázána přítomnost specifické DNA pomocí PCR a mikroskopicky 4., respektive 6. DPI. Kuřata vylučovala oocysty intermitentně až do 15 DPI. Intenzita infekce se pohybovala v rozmezí od 2 000 do 10 000 OPG.

V průběhu experimentu nebyly pozorovány žádné příznaky kryptosporidiové infekce u žádného zvířete. Taktéž nebyly u zvířete pitvaného 12 DPI pozorovány žádné makroskopické změny na vnitřních orgánech. Vyšetření tkání gastrointestinálního traktu experimentálně infikovaných kuřat histologickými metodami prokázalo přítomnost vývojových stadií v zadní části duodenu, ileu a kolonu. Infekce nejvíce postihla epitelální buňky ilea. V ostatních orgánech dutiny tělní nebyla detekována žádná vývojová stádia.

5 Diskuze

V této diplomové práci byla charakterizována prevalence a genetická diverzita kryptosporidií u zdivočelých a zájmově chovaných holubů na území České republiky, Slovenska a Chorvatska. Toto je první studie o výskytu kryptosporidií u holubů ve střední Evropě.

Naše studie prokázala, že prevalence kryptosporidií u 603 získaných vzorků trusu od holubů z 25 lokalit byla 2,8 %. Výsledky ukázaly, že zájmově chovaní holubi jsou častěji infikováni *Cryptosporidium* spp. (82,4 %), než divocí holubi (17,6 %). Infekce holubů kryptosporidiiemi byly popsány v několika oblastech světa, a to v Asii v Bangladéši (Kabir et al., 2020), Číně (Li et al., 2015; 2016; Qi et al., 2011), Iráku (Altamini a Al-Zubaidi, 2020; Jasim a Marhoon, 2015), Iránu (Bahrami et al., 2012; Mirzaghavami et al., 2016; Radfar et al., 2012), Thajsku (Koompapong et al., 2014), a Turkmenistánu (Borodina et al., 1994), v Evropě v Turecku (Özkul a Aydin, 1994) a ve Španělsku (Abreu-Acosta et al., 2009; Reboredo-Fernández et al., 2015; Rodríguez et al., 1997) a v Jižní Americe v Brazílii (Oliveira et al., 2017a; Santos et al., 2020; Seixas et al., 2019). Prevalence *Cryptosporidium* spp. u holubů se lišila v rámci zemí s prevalencí od 0,8 % do 50 %. Zmíněné studie se však většinou zaměřovaly pouze na zdivočelé holuby nebo na holuby chované za účelem masa či jiných produktů. Pouze Abreu-Acosta et al. (2009) odebrali vzorky od zdivočelých a chovaných holubů s výslednou prevalencí 5,9 % (34/2). Námí zjištěná celková prevalence nejvíce odpovídá výsledkům zjištěným u Radfar et al. (2012) ze vzorků od zdivočelých holubů s prevalencí 2,9 %. V porovnání s našimi výsledky prevalence u zájmově chovaných holubů (2,3 %) a divokých holubů (0,5 %), bychom mohli konstatovat podobnost s prevalencí 2,5 % u divokých holubů v Iránu (Mirzaghavami et al., 2016) a 0,8 % u chovných holubů v Číně (Li et al., 2015).

Naše výsledky o častějším výskytu kryptosporidií u chovaných holubů odpovídají pozorováním i u jiných druhů ptáků. Promořenost volně žijících ptáků se v řadě publikací pohybuje v hodnotách 2,3–8,3 % (Cano et al., 2016; Reboredo-Fernández et al., 2015; Sevá et al., 2011), zatímco u ptáků chovaných v zajetí v rozmezí od 9,1–11,1 % (Iijima et al., 2018; Li et al., 2016; Oliveira et al., 2017b). Vzhledem k tomu, že jsou ptáci chovaní v zoo nebo zverimexech často umisťováni do klecí nebo voliér po skupinách, lze vyšší promořenost vysvětlit omezeným prostorem voliér a tím snažším přenosem infekce. Nesmíme však opomenout fakt, že rozdíl

v prevalenci může být také způsoben odlišnými metodickými přístupy, různým věkem holubů, imunitou hostitele nebo roční dobou (Gatti et al., 2017; Li et al., 2015; Petersen et al., 2015).

Ptáci jsou primárně infikováni druhy a genotypy kryptosporidií hostitelsky adaptovanými na ptáky (Abe a Iseki, 2004; Baroudi et al., 2013; Iijima et al., 2018; Jellison et al., 2004; Máca a Pavlásek, 2015; Nakamura et al., 2009; Ng et al., 2006; Qi et al., 2011; Ryan et al., 2003b; Sevá et al., 2011; Wang et al., 2014a). V souladu s předešlými publikacemi jsme prokázali velkou druhovou diverzitu kryptosporidií u holubů. Studie založené na molekulární genotypizaci ukázaly, že holubi jsou kromě ptačích kryptosporidií *C. meleagridis*, *C. baileyi* a *C. galli* často infikováni i savčími druhy *C. parvum* a *C. hominis* (Abreu-Acosta et al., 2009; Altamini a Al-Zubaidi, 2020; Jasim a Marhoon, 2015; Kabir et al., 2020; Koompapong et al., 2014; Li et al., 2015; 2016; Oliveira et al., 2017a; Qi et al., 2011; Reboredo-Fernández et al., 2015; Seixas et al., 2019). Z našich a dříve publikovaných výsledků vyplývá, že holubi jsou hostitelé více druhů kryptosporidií, přičemž mohou být parazitováni nebo být přenašeči kryptosporidií, které jsou hostitelsky specifické pro savce. Vyjma druhu *C. hominis*, který jsme v naší práci nedetekovali, byly u holubů v České republice nalezeny všechny výše uvedené druhy kryptosporidií. Navíc jsme detekovali další druhy, *C. muris* a *C. ornithophilus*, které doposud nebyly u holubů popsány.

O vnímavosti ptáků k infekci *C. parvum* se na základě ojedinělých infekcí u volně žijících ptáků dlouhodobě spekulovalo. Nedávno Holubová et al. (2019) prokázali vnímavost kura domácího k infekci tímto druhem kryptosporidie. K přenosu *C. parvum* může dojít interakcí s jinými hospodářskými zvířaty. Další možností, kterou je třeba vzít v úvahu, je infekce, ke které může docházet při konání soutěží, kdy se holubi mohou dostat do kontaktu s infikovanými jedinci z jiných chovů. Nejčastějším zdrojem infekce však zůstává kontaminovaná voda a potrava, přičemž primárním zdrojem oocyst je v České republice skot (Klein et al., 2008; Kváč et al., 2006; 2011; Ondráčková et al., 2009). Tomuto způsobu přenosu by odpovídal i častější výskyt u divokých holubů (40 %), než u holubů zájmově chovaných (Altamini a Al-Zubaidi, 2020; Jasim a Marhoon, 2015; Oliveira et al., 2017a). Protože je *C. parvum* nejčastější příčinou kryptosporidiových infekcí u lidí, jsou holubi možným zdrojem infekce pro majitele holubů, se kterými jsou často v každodenním kontaktu (Oliveira et al., 2017a). S ohledem na relativně vysoké prevalence kryptosporidiových infekcí a počtu oocyst v trusu některých volně

žijících ptáků, mohou být zdivočelí holubi nejen pasivními nosiči onemocnění, ale také aktivními vektory kontaminujícími vodní zdroje kryptosporidii (Graczyk et al., 1996; 1997; 1998a,b; Graczyk a Cranfield, 1998; Smith et al., 1993; Zhou et al., 2004).

V rámci genu kódujícího 60 kDa glykoprotein byla identifikována rodina glykoproteinů odpovídající *C. parvum* subtypu IIa. Dosavadní práce zaměřené na subtypizaci *C. parvum* identifikovaly 12 subtypů: 2 jsou považovány za zoonotické (IIa, IIc) a 10 jich je přenášeno většinou antroponotickou cestou (IIb, IIc, IIe–III) (Alves et al., 2003; Sulaiman et al., 2005; Trotz-Williams et al., 2006). Subtyp IIc byl zatím nalezen pouze u lidí (Alves et al., 2006; Soba a Logar, 2008). Subtyp IIa infikuje telata a IIc subtyp infikuje jehňata a kozy (Guílez et al., 2008a,b). Námí nalezený subtyp IIa se také běžně vyskytuje u lidí na venkově a je rozšířen hlavně u novorozenečích telat v mnoha zemích světa (Adamu et al., 2010; Alves et al., 2003; 2006; Feltus et al., 2006; Glaberman et al., 2002; Holzhausen et al., 2019; Chalmers et al., 2005; Izzo et al., 2011; Niine et al., 2018; Stantic-Pavlinic et al., 2003; Xiao a Feng, 2008; Xiao a Ryan, 2004).

Přítomnost *C. muris* v trusu holubů není neobvyklý. Ptáci se mohou nakazit nebo kontaminovat v důsledku kontaktu s hlodavci, kteří jsou přirozenými hostiteli tohoto druhu. (Li et al., 2015). Vzhledem k tomu, že *C. muris* bylo identifikováno především u hlodavců (Čondlová et al., 2019; García-Livia et al., 2020; Hikosaka a Nakai, 2005; Hůrková et al., 2003; Chalmers et al., 1997; Lv et al., 2009; Murakoshi et al., 2013; Ng-Hublin et al., 2013; Song et al., 2015; Tan et al., 2019; Torres et al., 2000; Zhao et al., 2019), spíše než aktivní infekci je třeba brát v úvahu jen pasivní transport oocyst nebo DNA z excystovaných oocyst zažívacím traktem hostitele, který pozřel oocysty spolu s kontaminovanou vodou nebo potravou (Chappell et al., 2015; Kváč et al., 2012; Spanakos et al., 2015).

Cryptosporidium ornithophilus a *C. galli* infikuje celou řadu ptačích hostitelů. Přesto je hostitelské spektrum těchto druhů pravděpodobně užší, než je tomu u druhu *C. baileyi* (Holubová et al., 2020a; Meireles et al., 2006; Nakamura et al., 2009; Santos et al., 2005; Sevá et al., 2011). Z 11 studií založených na molekulární detekci specifické DNA kryptosporidií u holubů, byla pouze u jedné popsána detekce *C. galli* (Seixas et al., 2019). Výskyt tohoto druhu kryptosporidie byl popsán u divokých holubů, stejně jako v naší popsané studii. Nejčastější výskyt *C. galli* byl zaznamenán u pěvců a papoušků (Antunes et al., 2008; Iijima et al., 2018; Nakamura

et al., 2009; 2014; Ng et al., 2006; Seva et al., 2011). Výskyt *C. ornithophilus* byl popsán u pštrosů, ale také u hrabavé drůbeže a papoušků (Holubová et al., 2020a; Meireles et al., 2006; Ng et al., 2006; Seva et al., 2011; Wang et al., 2014a). Tato práce rozširuje poznání o hostitelském spektru tohoto druhu kryptosporidie o holuby ze rádu měkkozobí.

Cryptosporidium baileyi je druh se širokým hostitelským spektrem. Infekce touto kryptosporidií byly popsány u velkého množství ptačích hostitelů naprıch temer všemi rády třídy ptacı (Nakagun et al., 2017; Nakamura et al., 2009; Ng et al., 2006; Qi et al., 2011; Ryan et al., 2003b; Van Zeeland et al., 2008). S ohledem na hostitelskou specifitu toto druhu kryptosporidie není její výskyt u holubů v této studii překvapivý. Na základě celé rády studií byly holubi z trhů, zverimexu nebo farem infikováni nejvíce právě *C. baileyi* (60 %). Naopak u zdivoelych holubů byl dominantní výskyt *C. meleagridis* (60 %) (Altamini a Al-Zubaidi, 2020; Jasim a Marhoon, 2015; Kabir et al., 2020; Koompapong et al., 2014; Li et al., 2015; 2016; Qi et al., 2011; Reboredo-Fernández et al., 2015; Seixas et al., 2019). U obou sledovanych skupin ptáků v naı studii byl u chovanych a divokych holubů nejvíce zastoupen druh *C. meleagridis* (31 %, respektive 50 %).

Z ptačích druhů má pouze *C. meleagridis* význam pro verejne zdraví, kvůli zootickemu a antroponickemu zposobu přenosu a relativně vysoké infekčnosti (Wang et al., 2014b). Identifikace oocyst *C. meleagridis* v pitné a rekreační vodě naznačuje možné cesty přenosu tohoto parazita naloveka i zvírata (Koloren et al., 2013; Plutzer et al., 2008). *Cryptosporidium meleagridis* nalezené v této studii patne patrí do nove subtypové rodiny, kterou jsme pojmenovali IIIk podle přijaté nomenklatury gp60 pro *Cryptosporidium* spp. (Feng et al., 2011). Před touto prací bylo identifikováno pomocí gp60 sekvenční analýzy *C. meleagridis* deset rodin subtypů (IIIa–IIIj) (Abal-Fabeiro et al., 2013; Baroudi et al., 2013; Feng et al., 2011; Stensvold et al., 2014; Xiao a Feng, 2017). Jediná provedená subtypizace *C. meleagridis* provedená u holubů byla ze vzorků z trhu v Bangladeı. Identifikovane subtypy u holubů IIIbA21G1R1 a IIIbA23G1R1 byly také detekovány u kuřat (Kabir et al., 2020). Subtyp IIIbA23G1R1, nalezený u holubů, byl dále nalezen u křepelek v Brazílií (Cunha et al., 2018) a u lidí v Peru (Wang et al., 2014b),Číně (nepublikováno), Indonésií a Thajsku (Stensvold et al., 2014). Druhý subtyp IIIbA21G1R1 byl dıvıe potvrzen u dětí s průjmem ve Wu-chanu (Wang et al.,

2017). Námi detekovaný subtyp IIIk byl detekován u obou sledovaných skupin holubů.

Ačkoli je *C. meleagridis* považováno za ptačí druh, přizpůsobila se širokému spektru hostitelů. Experimentální infekce byla úspěšná u myši, potkanů, králíků, telat, gnotobiotických prasat a lidí (Akiyoshi et al., 2003; Bermudez et al., 1988; Darabus, 1997; Darabus a Olariu, 2003; Huang et al., 2003; Chappell et al., 2011; Lindsay et al., 1989; Tůmová et al., 2002). Námi získaný izolát *C. meleagridis* nebyl infekční pro SCID myši, zatímco izolát získaný z krůt byl úspěšně přenesen na imunosuprimované myši a z myši na kuřata (Sréter et al., 2000). Hostitelská specifita *C. meleagridis* subtypu IIIk by měla být předmětem dalšího studia.

Námi zjištěná prepatentní perioda izolátu *C. meleagridis* subtyp IIIk, u infikovaných jednodenních kuřat, byla 4 DPI a odpovídá prepatentní době u experimentů, kdy kuřata začala vylučovat oocysty v rozmezí 3–6 DPI (Akiyoshi et al., 2003; Bermudez et al., 1988; Lindsay et al., 1989; Sréter et al., 2000). Prepatentní perioda zjištěná v této práci odpovídá údajům zjištěným u infekcí druhu *C. meleagridis*, *C. baileyi* a *C. ornithophilus* (4–8 dnů; Holubová, 2020a; Hornok et al., 1999; Lindsay et al., 1988; Rhee et al., 1991; Tůmová et al., 2002). Variabilitou se vyznačuje i patentní perioda, při které často dochází i k samovyléčení jedince (DuPont et al., 1995; Enemark et al., 2003; Matsui et al., 1999; Tzipori, 1983). U popsáných experimentů byla popsána patentní perioda od 12–21 DPI (Akiyoshi et al., 2003; Bermudez et al., 1988; Sréter et al., 2000; Tůmová et al., 2002), což je obdobná délka prepatentní periody, kterou jsme zjistili v našem experimentu (15 DPI). Intenzita infekce se pohybovala v nízkých hodnotách od 2 000 do 10 000 OPG. Vyšší intenzitu infekce u kuřat popsali Akiyoshi et al. (2003) a Sréter et al. (2000) v hodnotě od 5 000 000 do 7 000 000 OPG.

Stejně jako u přirozeně infikovaných kuřat a krůt, námi získaný izolát *C. meleagridis* infikoval ileum více než ostatní části střevního traktu (Baroudi et al., 2013; Gharazouglou et al., 2006; Pavlásek, 1994b). U experimentálních infekcí byla vývojová stádia *C. meleagridis* detekována také v céku, kloace a Fabriciově burze (Akiyoshi et al., 2003; Bermudez et al., 1988; Sréter et al., 2000; Woodmansee et al., 1988). Na rozdíl od Tůmové et al. (2002), kteří u experimentálně infikovaných kuřat popsali výskyt letargie a pomalejšího růstu, stejně jako Akiyoshi et al. (2003), Bermudez et al. (1988) a Sréter et al. (2000) jsme u experimentálně infikovaných kuřat nezaznamenali žádné klinické příznaky.

V této práci nebyly při odběru holubů pozorovány klinické příznaky kryptosporidiózy, ani nebyl zaznamenán průjem u žádného z pozitivních vzorků trusu. Příznaky kryptosporidiové infekce byly popsány pouze ve studiích, u kterých nebyla provedena molekulární detekce specifické DNA. U holubů byl popsán úbytek hmotnosti, průjem, střevní distenze a hyperémie, a také přítomnost vývojových stádií parazita v epitelu tenkého střeva (Özkul a Aydın, 1994; Rodríguez et al., 1997). S ohledem na to, že studie byly zaměřené pouze na kryptosporidie, lze přikládat možnou primární příčinu zdravotních problémů holubů jiným agens.

Vzhledem tomu, že bylo v naší práci detekováno šest druhů kryptosporidií, jsou holubi významným zdrojem infekce kryptosporidiiemi pro jedince stejného druhu, ale i pro člověka a jím chovaná hospodářská zvířata.

6 Závěry

- Celková prevalence u holubů v České republice byla 2,8 %, konkrétně 2,3 % u zájmově chovaných holubů a 0,5 % u divokých holubů.
- Statistické analýzy prokázaly větší výskyt kryptosporidiových infekcí u zájmově chovaných holubů ($\chi^2 = 14,5919$; stupně volnosti = 1; $P > 0,001$).
- U holubů jsme detekovali *C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. galli*, *C. parvum*, *C. muris* a *C. ornithophilus*.
- Izolát *Cryptosporidium meleagridis* z holuba byl infekční pro kuřata kura domácího a neinfekční pro SCID myši.
- *Cryptosporidium meleagridis* infikovalo duodenum, ileum a kolon kuřat kura domácího.
- Prepatentní a patentní perioda *C. meleagridis* u experimentálně infikovaných kuřat domácích jsou 4, respektive 15 dnů.
- Izoláty *C. parvum* náležely do stejné subtypové rodiny IIa.
- Izolát *C. meleagridis* náležel do nové subtypové rodiny IIIk.
- Žádné z přirozeně nebo experimentálně infikovaných zvířat v této studii nevykazovalo klinické příznaky kryptosporidiózy.
- Holubi představují významný zdroj infekce různých druhů kryptosporidií jak pro člověka, tak pro hospodářská zvířata.

7 Seznam použité literatury

- Abal-Fabeiro, J. L. et al. (2013).** Multilocus patterns of genetic variation across *Cryptosporidium* species suggest balancing selection at the gp60 locus. *Molecular Ecology*, 22:4723–4732.
- Abdel-Azeem, A. F. et al. (2016).** Early weaning of pigeon squabs. *Egyptian Poultry Science Journal*, 36(1):205–232.
- Abe, N. a Iseki, M. (2004).** Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR amplified small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitology Research*, 92(6):523–526.
- Abe, N. a Makino, I. (2010).** Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels, Japan. *Parasitology Research*, 106(6):1491–1497.
- Abreu-Acosta, N. et al. (2009).** Occurrence of *Cryptosporidium hominis* in pigeons (*Columba livia*). *Acta Parasitologica*, 54(1):1–5.
- Adamu, H. et al. (2010).** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Ethiopia. *Acta Tropica*, 115:77–83.
- Adejimi, J. O. a Oke, M. (2011).** Gastrointestinal parasites of domestic duck (*Anas platyrhynchos*) in Ibadan southwestern Nigeria. *Asian Journal of Poultry Science*, 5(1):45–60.
- Adler, S. et al. (2017).** Symptoms and risk factors of *Cryptosporidium hominis* infection in children: data from a large waterborne outbreak in Sweden. *Parasitology Research*, 116(10):2613–2618.
- Akiyoshi, D. E. et al. (2002).** Genetic analysis of a *Cryptosporidium parvum* human genotype 1 isolate passaged through different host species. *Infection and Immunity*, 70(10):5670–5675.
- Akiyoshi, D. E. et al. (2003).** Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. *Infection and Immunity*, 71(4):1828–1832.
- Albonetti, P. et al. (2015).** Efficacy of nicarbazin (Ovistop®) in the containment and reduction of the populations of feral pigeons (*Columba livia* var. *domestica*) in the city of Genoa, Italy: a retrospective evaluation. *Veterinaria Italiana*, 51(1):63–72.
- Al-Brikan, F. et al. (2008).** Multilocus genetic analysis of *Cryptosporidium* isolates from Saudi Arabia. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 38(2):645–658.

-
- Altamini, M. K. A. a Al-Zubaidi, M. T. S. (2020).** *Cryptosporidium* spp.: Conventional and molecular detection in wild pigeons (*Columba livia*) in Babylon Province, Iraq. *Plant Archives*, 20(2):1544–1548.
- Alvarez-Pellitero, P. a Sitjà-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(8):1007–1021.
- Alves, M. et al. (2000).** PCR-RFLP analysis of *Cryptosporidium parvum* isolates from HIV-infected patients in Lisbon, Portugal. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 94:291–297.
- Alves, M. et al. (2001).** Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* isolates from human HIV-infected and animal hosts. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 48:17–18.
- Alves, M. et al. (2003).** Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6):2744–2747.
- Alves, M. et al. (2006).** Distribution of *Cryptosporidium* subtypes in humans and domestic and wild ruminants in Portugal. *Parasitology Research*, 99(3):287–292.
- Amer, S. et al. (2010).** First detection of *Cryptosporidium baileyi* in Ruddy Shelduck (*Tadorna ferruginea*) in China. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 72(7):935–938.
- Amoruso, I. et al. (2014).** Estimation of feral pigeon (*Columba livia*) population size using a novel superimposed urban strata (SUS) method. *Urban Ecosystems*, 17:597–612.
- Anderson, B. C. (1987).** Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Veterinary Pathologist*, 24:235–238.
- Angus, K. W. et al. (1985).** Infectivity of a strain of *Cryptosporidium* found in the guinea-pig (*Cavia porcellus*) for guinea-pigs, mice and lambs. *Journal of Comparative Pathology*, 95(2):151–165.
- Antunes, R. G. et al. (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(4):702–705.
- Arrowood, M. J. a Donaldson, K. (1996).** Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43(5):89S.

-
- Arrowood, M. J. a Sterling, C. R. (1987).** Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. *The Journal of Parasitology*, 73(2):314–319.
- Arrowood, M. J. a Sterling, C. R. (1989).** Comparison of conventional staining methods and monoclonal antibody-based methods for *Cryptosporidium* oocyst detection. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(7):1490–1495.
- Awad-el-Kariem, F. M. et al. (1995).** Differentiation between human and animal strains of *Cryptosporidium parvum* using isoenzyme typing. *Parasitology*, 110(2):129–132.
- Awad-el-Kariem, F. M. et al. (1998).** Differentiation between human and animal isolates of *Cryptosporidium parvum* using molecular and biological markers. *Parasitology Research*, 84(4):297–301.
- Aydin, Y. a Özkul, I. A. (1996).** Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. *Veterinary Parasitology*, 66(3):257–262.
- Bahrami, A. M. et al. (2012).** Pathological study on parasitism in racing pigeons: an indication of its effects on community health. *Advances in Environmental Biology*, 6(2):726–732.
- Baishanbo, A. et al. (2005).** Infectivity of *Cryptosporidium hominis* and *Cryptosporidium parvum* genotype 2 isolates in immunosuppressed Mongolian gerbils. *Infection and Immunity*, 73(8):5252–5255.
- Baroudi, D. et al. (2013).** Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. *Veterinary Parasitology*, 196(3-4):334–340.
- Bermudez, A. J. et al. (1988).** Intestinal and bursal cryptosporidiosis in turkeys following inoculation with *Cryptosporidium* sp. isolated from commercial poults. *Avian Diseases*, 32(3):445–450.
- Berrilli, F. et al. (2012).** *Giardia duodenalis* genotypes and *Cryptosporidium* species in humans and domestic animals in Cote d’Ivoire: occurrence and evidence for environmental contamination. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(3):191–195.
- Blagburn, B. L. et al. (1990).** *Cryptosporidium* sp. infection in the proventriculus of an Australian diamond firetail finch (*Staganoplura bella*: Passeriformes, Estrildidae). *Avian Diseases*, 34:1027–1030.

-
- Borodina, O. N. et al. (1994).** The detection of the causative agent of cryptosporidiosis in man and animals in Turkmenistan. *Meditinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni*, 1:8–11.
- Bougiouklis, P. A. et al. (2013).** Otitis media associated with *Cryptosporidium baileyi* in a Saker falcon (*Falco cherrug*). *Journal of Comparative Pathology*, 148(4):419–423.
- Brzoska, F. (2019).** Squabs-fattened slaughter pigeons are exclusive poultry, part I. *Polish Poultry*, 3:77–78.
- Bull, S. et al. (1998).** Cross-reaction of an anti-*Cryptosporidium* monoklonal antibody with sporocysts of *Monocystis* species. *Veterinary Parasitology*, 77(2-3):195–197.
- Cacciò, S. et al. (2002).** Human infection with *Cryptosporidium felis*: case report and literature review. *Emerging Infectious Diseases*, 8(1):85–86.
- Cama, V. A. et al. (2007).** Differences in clinical manifestations among *Cryptosporidium* species and subtypes in HIV-infected persons. *The Journal of Infectious Diseases*, 196(5):684–691.
- Cama, V. A. et al. (2008).** *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. *Emerging Infectious Diseases*, 14(10):1567–1574.
- Cano, L. et al. (2016).** Identification and genotyping of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. isolates in aquatic birds in the Salburua wetlands, Alava, Northern Spain. *Veterinary Parasitology*, 221:144–148.
- Carreno, R. A. et al. (1999).** *Cryptosporidium* is more closely related to gregarines than to coccidian as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research*, 85:899–904.
- Casemore, D. P. a Jackson, F. B. (1984).** Hypothesis: cryptosporidiosis in human beings is not primarily a zoonosis. *Journal of Infection*, 9(2):153–156.
- Casemore, D. P. et al. (1985).** *Cryptosporidium* species a “new” human pathogen. *Journal of Clinical Pathology*, 38(12):1321–1336.
- Casemore, D. P. et al. (1997).** Cryptosporidiosis-human and animal epidemiology. In: Fayer, R. (Eds.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*, První vydání, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 65–92. ISBN 978-08-49376-95-5.
- Clubb, S. (1997).** What is your diagnosis? *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 11:41–42.

-
- Coldwell, L. et al. (2012).** *Cryptosporidium baileyi* in wild red grouse with ‘bulgy eye’. *Veterinary Record*, 170(23):603–604.
- Cooper, J. E. (1984).** A veterinary approach to pigeons. *Journal of Small Animal Practice*, 25(8):505–516.
- Coupe, S. et al. (2005).** Detection of *Cryptosporidium* and identification to the species level by nested PCR and restriction fragment length polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3):1017–1023.
- Cunha, M. J. R et al. (2017).** Molecular identification of *Enterocytozoon bienersi*, *Cryptosporidium*, and *Giardia* in Brazilian captive birds. *Parasitology Research*, 116(2):487–493.
- Cunha, M. J. R. et al. (2018).** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in poultry from Brazil. *Research in Veterinary Science*, 118:331–335.
- Current, W. L. et al. (1986).** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. s. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology*, 33(2):289–296.
- Current, W. L. a Blagburn, B. L. (1990).** *Cryptosporidium*: infections in man and domesticated animals. In: Long, P. L. (Eds.), *Coccidiosis of man and domestic animals*, První vydání, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 155–185. ISBN 978-13-15891-64-4.
- Current, W. L. a Garcia, L. S. (1991).** Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(3):325–358.
- Current, W. L. a Reese, N. C. (1986).** A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *The Journal of Protozoology*, 33(1):98–108.
- Čondlová, Š. et al. (2019).** Diversity of *Cryptosporidium* spp. in *Apodemus* spp. in Europe. *European Journal of Protistology*, 69:1–13.
- 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. a Olariu, R. (2003).** The homologous and interspecies transmission of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 6(3):225–228.
- Dhillon, A. S. et al. (1981).** Respiratory cryptosporidiosis in broiler chickens. *Avian Diseases*, 25(3):747–51.

-
- Dubey, J. P. et al. (2002).** *Cryptosporidium muris*-like infection in stomach of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Veterinary Pathology*, 39(3):363–371.
- DuPont, H. L. et al. (1995).** The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *The New England Journal of Medicine*, 332(13):855–859.
- Ebeid, M. et al. (2003).** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* genotype I in conventionally reared piglets and lambs. *Parasitology Research*, 90(3):232–235.
- Elliot, D. A. et al. (2001).** *Cryptosporidium parvum* infection requires host cell actin polymerisation. *Infection and Immunity*, 69(9):5940–5942.
- Enemark, H. L. et al. (2003).** *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the 'porcine' genotype. *Parasitology*, 126(5):407–416.
- Fayer, R. et al. (1990).** General biology of *Cryptosporidium*. In: Dubey, J. P. a Speer, C. A. (Eds.), *Cryptosporidiosis of man and animals*, První vydání, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1–29. ISBN 978-13-51071-26-0.
- Fayer, R. et al. (1997).** The general biology of *Cryptosporidium*. In: Fayer, R. (Eds.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*, První vydání, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1–41. ISBN 978-08-49376-95-5.
- Fayer, R. (2003).** *Cryptosporidium*: From molecules to disease. In: Thompson, R. C. A. a Armson, A. (Eds.), *Cryptosporidium: From molecules to disease*, První vydání, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 11–18. ISBN 978-00-80530-10-9.
- Fayer, R. (2007).** The general biology. In: Fayer, R. a Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*, Druhé vydání, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1–42. ISBN 978-14-20052-26-8.
- Fayer, R. a Leek, R. G. (1984).** The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on *in vitro* excystation of *Cryptosporidium*. *The Journal of Protozoology*, 31(4):567–569.
- Fayer, R. a Xiao, L. (2007).** Diagnostics. In: Fayer, R. a Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*, Druhé vydání, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 192–200. ISBN 978-14-20052-26-8.
- Feltus, D. C. et al. (2006).** Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12):4303–4308.
- Feng, Y. et al. (2011).** Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Experimental Parasitology*, 127(1):238–242.

-
- Ferrari, E. D. et al. (2018).** *Cryptosporidium* spp. in caged exotic psittacines from Brazil. Evaluation of diagnostic methods and molecular characterization. *Experimental Parasitology*, 184:109–114.
- Fik, M. et al. (2016).** Analyze the chosen production criteria of carrier pigeons. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 49:145–148.
- García-Livia, K. et al. (2020).** Diversity of *Cryptosporidium* spp. in wild rodents from the Canary Islands, Spain. *Parasites Vectors*, 13:445.
- Gasser, R. B. et al. (2001).** Genotyping *Cryptosporidium parvum* by single-strand conformation polymorphism analysis of ribosomal and heat shock gene regions. *Electrophor*, 22(3):433–437.
- Gatei, W. et al. (2002).** Zoonotic species of *Cryptosporidium* are as prevalent as the anthroponotic in HIV-infected patients in Thailand. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 96(8):797–802.
- Gatti, F. A. et al. (2017).** The prevalence of trichomoniasis and associated factors among women treated at a university hospital in southern Brazil. *PLOS One*, 12(3): e0173604.
- Gharagozlou, M. J. et al. (2006).** Intestinal cryptosporidiosis in turkeys in Iran. *Journal of Veterinary Medicine, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*, 53(6):282–285.
- Gibbs, D. et al. (2010).** *Pigeons and Doves A Guide to the Pigeons and Doves of the World*. Christopher Helm, London. ISBN 978-18-73403-60-0.
- Giles, M. et al. (2001).** Experimental infection of a lamb with *Cryptosporidium parvum* genotype 1. *Veterinary Record*, 149(17):523–525.
- Giles, M. (2006).** *Host specificity and molecular classification of Cryptosporidium parvum and Cryptosporidium hominis*. PhD thesis, University of London.
- Glaberman, S. et al. (2002).** Three drinking-water associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerging Infectious Diseases*, 8(6):631–633.
- Gomes, R. S. et al. (2012).** *Cryptosporidium* spp. parasitize exotic birds that are commercialized in markets, commercial aviaries, and pet shops. *Parasitology Research*, 110(4):1363–1370.
- Goodwin, M. A. et al. (1988).** Diarrhea associated with intestinal cryptosporidiosis in turkeys. *Avian Diseases*, 32(1):63–67.
- Goodwin, M. A. et al. (1996).** Respiratory coccidiosis (*Cryptosporidium baileyi*) among northern Georgia broilers in one company. *Avian Diseases*, 40(3):572–575.

-
- Graczyk, T. K. et al. (1996).** Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts are retained upon intestinal passage through a refractory avian host. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(9):3234–3237.
- Graczyk, T. K. et al. (1997).** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts is retained upon intestinal passage through a migratory waterfowl species (*Canada goose, Branta canadensis*). *Tropical Medicine and International Health*, 2:341–347.
- Graczyk, T. K. et al. (1998a).** Recovery of waterborne *Cryptosporidium parvum* oocysts by freshwater benthic clams (*Corbicula fluminea*). *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2):427–430.
- Graczyk, T. K. et al. (1998b).** *Giardia* sp. cysts and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in the feces of migratory Canada geese (*Branta canadensis*). *Applied and Environmental Microbiology*, 64(7):2736–2738.
- Graczyk, T. K. et al. (2008).** The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. *Trends in Parasitology*, 24(2):55–59.
- Graczyk, T. K. a Cranfield, M. R. (1998).** Experimental transmission of *Cryptosporidium* oocyst isolates from mammals, birds and reptiles to captive snakes. *Veterinary Research*, 29(2):187–195.
- Gugolek, A. et al. (2016).** The use of pigeons and other bird species in human recreation. *Wiadomości Zootechniczne*, 54(2):90–95.
- Guílez, J. et al. (2008a).** *Cryptosporidium* genotypes and subtypes in lambs and goat kids in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(19):6026–6031.
- Guílez, J. et al. (2008b).** *Cryptosporidium* species and subtype analysis from dairy calves in Spain. *Parasitology*, 135:1613–1620.
- Guk, S. M. et al. (2004).** Genotype and animal infectivity of a human isolate of *Cryptosporidium parvum* in the Republic of Korea. *Korean Journal of Parasitology*, 42(2):85–89.
- Guyot, K. et al. (2001).** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from humans in France. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(10):3472–3480.
- Hajdušek, O. et al. (2004).** Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in animal and human hosts from the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 122(3):183–192.
- Harlin, R. W. (2000).** Pigeon Therapeutics. *Veterinary Clinics of North America. Exotic Animal Practice*, 3(1):19–34.
-

-
- Haro, M. et al. (2005).** First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6):3153–3157.
- Henriksen, S. A. a Pohlenz, J. F. L. (1981).** Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 22:594–596.
- Hijawi, N. S. (2001).** Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *Journal of Parasitology*, 31(10):1048–1092.
- Hikosaka, K. a Nakai, Y. (2005).** A novel genotype of *Cryptosporidium muris* from large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Parasitology Research*, 97(5):373–379.
- Hoerr, F. J. et al. (1986).** Fatal cryptosporidiosis in quail. *Avian Diseases*, 30(2):421–425.
- Holubová, N. et al. (2016).** *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitology Research*, 115(6):2243–2251.
- Holubová, N. et al. (2019).** *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. *European Journal of Protistology*, 69:70–87.
- Holubová, N. et al. (2020a).** Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. *Parasites Vectors*, 13(1):340.
- Holubová, N. et al. (2020b).** A chicken embryo model for the maintenance and amplification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium baileyi* oocysts. *European Journal of Protistology*, 75:125718.
- Holzhausen, I. et al. (2019).** Distribution of *Cryptosporidium parvum* gp60 subtypes in calf herds of Saxony, Germany. *Parasitology Research*, 118(5):1549–1558.
- Hornok, S. et al. (1999).** Study on the course of *Cryptosporidium baileyi* infection in chickens treated with interleukin-1 or indomethacin. *Acta Veterinaria Hungarica*, 47(2):207–216.
- Hoyo, J. et al. (1997).** *Handbook of the birds of the world. Vol. 4. Sandgrouse to Cuckoos*. Lynx Edicions, Barcelona. ISBN 978-84-87334-22-9.
- Huang, K. et al. (2003).** Development of patent infection in immunosuppressed C57Bl/6 mice with a single *Cryptosporidium meleagridis* oocyst. *Journal of Parasitology*, 89(3):620–622.

-
- Huber, F. et al. (2007).** Genotypic characterization and phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* sp. from domestic animals in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 150(1-2):65–74.
- Hunter, P. R. et al. (2004).** Sporadic cryptosporidiosis case-control study with genotyping. *Emerging Infectious Diseases*, 10(7):1241–1249.
- Hůrková, L. et al. (2003).** Natural Infection of *Cryptosporidium muris* (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in Siberian chipmunks. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(2):441–444.
- Chalmers, R. M. et al. (1997).** The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitology Research*, 83(5):478–482.
- Chalmers, R. M. et al. (2005).** Direct comparison of selected methods for genetic categorisation of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* species. *International Journal for Parasitology*, 35(4):397–410.
- Chalmers, R. M. a Davies, A. P. (2010).** Minireview: clinical cryptosporidiosis. *Experimental Parasitology*, 124(1):138–146.
- Chappell, C. L. et al. (2003).** *Cryptosporidium parvum*: infectivity, pathogenesis and host-parasite relationship. In: Thompson, R. C. A. a Armson, A. (Eds.), *Cryptosporidium: From molecules to disease*, První vydání, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 19–49. ISBN 978-00-80530-10-9.
- Chappell, C. L. et al. (2011).** *Cryptosporidium meleagridis*: infectivity in healthy adult volunteers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85(2):238–242.
- Chappell, C. L. et al. (2015).** *Cryptosporidium muris*: infectivity and illness in healthy adult volunteers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92(1):50–55.
- Chelladurai, J. J. et al. (2016).** *Cryptosporidium galli* and novel *Cryptosporidium* avian genotype VI in North American red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Parasitology Research*, 115(5):1901–1906.
- Chen, F. a Huang, K. (2012).** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle from farms in China. *Journal of Veterinary Science*, 13(1):15–22.
- Chvala, S. et al. (2006).** *Cryptosporidium* infection in domestic geese (*Anser anser* f. *domestica*) detected by in-situ hybridization. *Journal of Comparative Pathology*, 134(2-3):211–218.

-
- Iijima, Y. et al. (2018).** Molecular prevalence of *Cryptosporidium* spp. among companion birds kept in pet shops in Japan. *Korean Journal of Parasitology*, 56(3):281–285.
- Insulander, M. et al. (2012).** Molecular epidemiology and clinical manifestations of human cryptosporidiosis in Sweden. *Epidemiology and Infection*, 141(5):1009–1020.
- Iseki, M. (1986).** Two species of *Cryptosporidium* naturally infecting house rats, *Rattus norvegicus*. *Japanese Journal of Parasitology*, 35:521–526.
- Izzo, M. M. et al. (2011).** Prevalence of major enteric pathogens in Australian dairy calves with diarrhoea. *Australian Veterinary Journal*, 89(5):167–173.
- Jasim, G. A. a Marhoon, I. A. (2015).** Prevalence and molecular analysis of *Cryptosporidium* spp. isolated from wild and domestic birds. *Acta Parasitologica Globalis*, 6(2):65–70.
- Jellison, K. L. et al. (2002).** Sources and species of *Cryptosporidium* oocysts in the Wachusett Reservoir watershed. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2):569–575.
- Jellison, K. L. et al. (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(1):452–458.
- Jiang, J. et al. (2005).** Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8):4446–4454.
- Jiang, S. G. et al. (2019).** Effects of dietary supplementation with DL-Methionine and DL-Metionyl DL-Methionine in breeding pigeons on the carcass characteristics, meat quality and antioxidant activity of squabs. *Antioxidans*, 8(10):435.
- Johnston, R. F. a Janiga, M. (1995).** *Feral Pigeons*. Oxford University Press, London. ISBN 978-01-95084-09-8.
- Kabir, M. H. B. et al. (2020).** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* species in poultry in Bangladesh. *One Health*, 9:100122.
- Kaminjolo, J. S. et al. (1988).** Parasites of the common pigeon (*Columba livia*) from the environs of Port of Spain, Trinidad. *Bulletin of Animal Health and Production in Africa*, 36(2):194–195.

-
- Karim, M. R. et al. (2014).** Multilocus typing of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* from non-human primates in China. *International Journal for Parasitology*, 44(13):1039–1047.
- Kasziperuk, K. a Rózewicz, M. (2018).** Meat use of pigeons. *Wiadomości Zootechniczne*, 4:200–210.
- Katsumata, T. et al. (2000).** Short report: possible *Cryptosporidium muris* infection in humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 62(1):70–72.
- Klein, P. et al. (2008).** Effect of *Cryptosporidium parvum* infection on the absorptive capacity and paracellular permeability of the small intestine in neonatal calves. *Veterinary Parasitology*, 152(1-2):53–59.
- Kokoszyński, D. et al. (2020).** Carcass characteristics, physicochemical properties, and texture and microstructure of the meat and internal organs of carrier and king pigeons. *Animals*, 10:1315.
- Koloren, Z. et al. (2013).** Detection of *Cryptosporidium* species in the sea and tap water samples of Black Sea, Turkey. *Journal of Parasitology*, 99(3):554–557.
- Koompapong, K. et al. (2014).** Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in seulls, pigeons, dogs, and cats in Thailand. *Parasite*, 21:52.
- Kopacz, Ž. et al. (2020).** *Cryptosporidium baileyi*, pulmonary infection in immunocompetent woman with benign neoplasm. *Emerging Infectious Diseases*, 26(8):1958–1961.
- Kotloff, K. L. et al. (2013).** Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS) a prospective, case-control study. *Lancet*, 382:209–222.
- Kváč, M. et al. (2006).** Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 137(3-4):202–9.
- Kváč, M. et al. (2007).** Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Veterinary Parasitology*, 143(3-4):229–233.
- Kváč, M. et al. (2008).** Natural infection with two genotypes of *Cryptosporidium* in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Italy. *Folia Parasitologica*, 55(2):95–99.
- Kváč, M. et al. (2011).** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: absence of *C. ryanae* and management-

associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes. *Veterinary Parasitology*, 177(3-4):378–382.

- Kváč, M. et al. (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(1):107–110.
- Lallo, M. A. et al. (2012).** *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon* (microsporidia) spores in stool from pigeons and exotic birds: microsporidia spores in birds. *Veterinary Parasitology*, 190(3-4):418–422.
- Li, J. et al. (2015).** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in domestic pigeons (*Columba livia domestica*) in Guangdong Province, Southern China. *Parasitology Research*, 114(6):2237–2241.
- Li, Q. et al. (2016).** Molecular investigation of *Cryptosporidium* in small caged pets in northeast China: host specificity and zoonotic implications. *Parasitology Research*, 115:2905–2911.
- Li, W. et al. (2011).** *Cyclospora papionis*, *Cryptosporidium hominis*, and human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* in captive baboons in Kenya. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12):4326–4329.
- Lindsay, D. S. et al. (1988).** Effect of broiler chicken age on susceptibility to experimentally induced *Cryptosporidium baileyi* infection. *American Journal of Veterinary Research*, 49(8):1412–1414.
- Lindsay, D. S. et al. (1989).** Morphometric comparison of the oocysts of *Cryptosporidium meleagridis* and *Cryptosporidium baileyi* from birds. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 56(1):91–92.
- Lindsay, D. S. et al. (1990).** Small intestinal cryptosporidiosis in cockatiels associated with *Cryptosporidium baileyi*-like oocysts. *Avian Diseases*, 34(3):791–793.
- Lindsay, D. S. et al. (2000).** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomlexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 47(1):91–95.
- Liu, X. et al. (2015).** Emergence of *Cryptosporidium hominis* monkey genotype II and novel subtype family Ik in the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*) in China. *PLoS ONE*, 10(10):0141450.
- Llorente, M. T. et al. (2007).** Genetic characterization of *Cryptosporidium* species from humans in Spain. *Parasitology International*, 56(3):201–205.

-
- Lumadue, J. A. et al. (1998).** A clinicopathologic analysis of AIDS-related cryptosporidiosis. *AIDS*, 12:2459–2466.
- Lupo, P. J. et al. (2008).** *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(6):917–921.
- Ly, C. et al. (2009).** *Cryptosporidium* spp. in wild, laboratory, and pet rodents in china: prevalence and molecular characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(24):7692–7699.
- Máca, O. a 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(3-4):164–168.
- Máca, O. a Pavlásek, I. (2016).** *Cryptosporidium* infections of ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus*) from an intensive artificial breeding programme in the Czech Republic. *Parasitology Research*, 115:1915–1922.
- Majewska, A. C. et al. (2008).** The role of free-ranging, captive, and domestic birds of Western Poland in environmental contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts. *Parasitology Research*, 104(5):1093–1099.
- Matsui, T. et al. (1999).** Infectivity to hosts of the endogenous stages of chicken and murine *Cryptosporidium*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 61:471–474.
- McEvoy, J. M. a Giddings, C. W. (2009).** *Cryptosporidium* in commercially produced turkeys on farm and postslaughter. *Letters in Applied Microbiology*, 48:302–306.
- McLauchlin, J. et al. (2000).** Molecular epidemiology analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11):3984–3990.
- Meireles, M. V. et al. (2006).** Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). *Journal of Parasitology*, 92(3):623–626.
- Miąsko, M. a Łukasiewicz, M. (2016).** Production results and slaughter performance of pigeons kept in a cage system. *Zeszyty Naukowe Towarzystwa Doktorantów Uniwersytetu Jagiellońskiego*, 13:21–33.
- Miláček, P. a Vítovec, J. (1985).** Differential staining of cryptosporidia by anilinecarol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitologica*, 32:50.
-

-
- Mirzaghavami, M. et al. (2016).** Detection of *Cryptosporidium* spp. in free ranging animals of Tehran, Iran. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(4):1528–1531.
- Molina-Lopéz, R. A. et al. (2010).** *Cryptosporidium baileyi* infection associated with an outbreak of ocular and respiratory disease in otus owls (*Otus scops*) in a rehabilitation centre. *Avian Pathology*, 39(3):171–176.
- Morgan, U. M. et al. (1999).** Molecular and biological characterisation of *Cryptosporidium* in pigs. *Australian Veterinary Journal*, 77:44–47.
- Morgan, U. M. et al. (2000a).** *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-necked parrot (*Psittacula krameri*). *Australian Veterinary Journal*, 78(3):182–183.
- Morgan, U. M. et al. (2000b).** Detection of *Cryptosporidium parvum* „human genotype“ in a dugong (*Dugong dugon*). *Journal of Parasitology*, 86(6):1352–1354.
- Morgan, U. M. et al. (2000c).** *Cryptosporidium* in domestic dogs: the „dog“ genotype. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5):2220–2223.
- Morgan, U. M. et al. (2001).** Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. *International Journal for Parasitology*, 31(3):289–296.
- Morgan-Ryan, U. M. et al. (2002).** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49(6):433–440.
- Motyčka, V. et al. (1992).** *Nezvaní hosté*. Eso, Praha. ISBN 978-80-90132-10-3.
- Murakoshi, F. et al. (2013).** Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Veterinary of Parasitology*, 196(1-2):184–188.
- Muthusamy, D. et al. (2006).** Multilocus genotyping of *Cryptosporidium* sp. isolates from human immunodeficiency virus infected individuals in South India. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2):632–634.
- Nakagun, S. et al. (2017).** Proventriculitis associated with *Cryptosporidium baileyi* in a snowy owl (*Bubo scandiacus*) and its epidemiological investigation. *Journal of Parasitology*, 103(5):451–457.
- Nakamura, A. A. et al. (2009).** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. *Veterinary Parasitology*, 166(1-2):47–51.
- Nakamura, A. A. et al. (2014).** Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. *Veterinary Parasitology*, 205(1-2):7–13.

-
- Ng, J. et al. (2006).** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(12):7548–7553.
- Ng-Hublin, J. S. et al. (2013).** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from wild rats and mice from rural communities in the Philippines. *Infection, Genetics and Evolution*, 16:5–12.
- Nguyen, S. T. et al. (2013).** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in ostriches (*Struthio camelus*) on a farm in central Vietnam. *Experimental Parasitology*, 133(1):8–11.
- Niine, T. et al. (2018).** *Cryptosporidium* outbreak in calves on a large dairy farm: Effect of treatment and the association with the inflammatory response and short-term weight gain. *Research in Veterinary Science*, 117:200–208.
- O'Donoghue, P. J. (1995).** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis on man and animals. *International Journal for Parasitology*, 25(2):139–195.
- Ogunkolade, B. W. et al. (1993).** Isoenzyme variation within the genus *Cryptosporidium*. *Parasitology Research*, 79(5):385–388.
- Oliveira, B. C. M. et al. (2017a).** First description of *Cryptosporidium parvum* in carrier pigeons (*Columba livia*). *Veterinary Parasitology*, 243:148–150.
- Oliveira, B. C. M. et al. (2017b).** *Cryptosporidium baileyi* in wild captive psittacines in Brazil. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 10:154–156.
- Ondráčková, Z. et al. (2009).** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in dairy cattle in South Bohemia, the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 165(1-2):141–144.
- Ortega, Y. R. et al. (1997).** Pathologic and clinical findings in patients with cyclosporiasis and a description of intracellular parasite life-cycle. *The Journal of Infectious Diseases*, 176(6):1584–1589.
- Özkul, I. A. a Aydin, Y. (1994).** Small-intestinal cryptosporidiosis in a young pigeon. *Avian Pathology*, 23(2):369–372.
- Pagès-Manté, A. et al. (2007).** An outbreak of disease associated with cryptosporidia on a red-legged partridge (*Alectoris rufa*) game farm. *Avian Pathology*, 36(4):275–278.
- Palmer, C. J. et al. (2003).** *Cryptosporidium muris*, a rodent pathogen recovered from a human in Peru. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 9(9):1174–1176.
- Parsons, M. B. et al. (2015).** Epidemiology and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in humans, wild primates, and domesticated animals in the

Greater Gombe Ecosystem, Tanzania. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(3):0003529.

- Pavlásek, I. (1993).** The black-headed gull (*Larus ridibundus* L.), a new host for *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Veterinary Medicine*, 38(10):629–638.
- Pavlásek, I. (1994a).** Intestinal cryptosporidiosis. First diagnosis in turkeys (*Meleagris gallopavo*), fowls (*Gallus gallus* f. *domestica*) and a salmon-crested cockatoo (*Cacatua moluccensis*) in the Czech Republic. *Veterinary Medicine*, 44:152–153.
- Pavlásek, I. (1994b).** Localization of endogenous developmental stages of *Cryptosporidium meleagridis* Slavin, 1955 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Veterinary Medicine*, 39:733–742.
- Pavlásek, I. (1999).** Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity and the environment. *Remedia Clinical Microbiology*, 3:290–301.
- Pavlásek, I. a Ryan, U. (2007).** The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. *Veterinary Parasitology*, 144(3-4):349–352.
- Peng, M. M. et al. (1997).** Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging Infectious Diseases*, 3(4):567–573.
- Peng, M. M. et al. (2001).** A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 28–31.
- Perz, J. F. a LeBlancq, S. M. (2001).** *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York state. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3):1154–1162.
- Petersen, H. H. et al. (2015).** *Cryptosporidium* and *Giardia* in Danish organic pig farms: seasonal and age-related variation in prevalence, infection intensity and species/genotypes. *Veterinary Parasitology*, 214(1-2):29–39.
- Philip, J. et al. (2008).** *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(6):917–921.
- Piasecki, T. (2006).** Evaluation of urban pigeon (*Columbia livia* f. *urbana*) health status in relation to their threat to human's health. *Medycyna Weterynaryjna*, 62(5):531–535.
- Plutzer, J. (2008).** Detection and characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Hungarian raw, surface and sewage water samples by IFT, PCR and sequence

analysis of the SSUrRNA and GDH genes. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211(5-6):524–33.

- Plutzer, J. a Karanis, P. (2009).** Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: an update. *Veterinary Parasitology*, 165(3-4):187–199.
- Pomianowski, J. F. et al. (2009).** Chemical composition, cholesterol content, and fatty acid profile of pigeon meat as influenced by meat-type breeds. *Poultry Science*, 88(6):1306–1309.
- Pospischill, A. et al. (1987).** Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazells. *Veterinary Record*, 112:379–380.
- Qi, M. et al. (2011).** *Cryptosporidium* spp. in pet birds: genetic diversity and potential public health significance. *Experimental Parasitology*, 128:336–340.
- Qi, M. et al. (2014).** Natural infection of *Cryptosporidium muris* in ostriches (*Struthio camelus*). *Veterinary Parasitology*, 205:518–522.
- Radfar, M. H. et al. (2012).** Biodiversity and prevalence of parasites of domestic pigeons (*Columba livia domestica*) in a selected semiarid zone of South Khorasan, Iran. *Tropical Animal Health and Production*, 44:225–229.
- Razakandrainibe, R. et al. (2018).** Common occurrence of *Cryptosporidium hominis* in asymptomatic and symptomatic calves in France. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(3):0006355.
- Reboredo-Fernández, A. et al. (2015).** Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest Spain). *Parasitology*, 142:917–925.
- Reduker, D. a Speer, C. A. (1985).** Factors influencing excystation in *Cryptosporidium* oocysts from cattle. *Journal of Parasitology*, 71(1):112–115.
- Rémignon, H. (2004).** Production of turkeys, geese, ducks and game birds. In: Mead, G. C. (Eds.), *Poultry meat processing and quality*, První vydání, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK, pp. 211–231. ISBN 978-18-55737-27-2.
- Rhee, J. K. et al. (1991).** Isolation and identification of *Cryptosporidium* from various animals in Korea. III. Identification of *Cryptosporidium baileyi* from Korean chicken. *The Korean Journal of Parasitology*, 29(2):315–324.
- Robertson, L. et al. (1993).** In vitro excystation of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology*, 106:13–19.
- Rodríguez, F. et al. (1997).** Intestinal cryptosporidiosis in pigeons (*Columba livia*). *Avian Diseases*, 41(3):748–750.

-
- Ryan, U. (2010).** *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Experimental Parasitology*, 124(1):113–120.
- Ryan, U. et al. (2003b).** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7):4302–4307.
- Ryan, U. M. et al. (2003a).** A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlásek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *Journal of Parasitology*, 89(4):809–813.
- Sacchi, R. et al. (2002).** Effects of building features on density and flock distribution of feral pigeons *Columba livia* var. *domestica* in an urban environment. *Canadian Journal of Zoology*, 80(1):48–54.
- Santos, C. C. et al. (2020).** *Cryptosporidium* spp. in *Columba livia*, Gmelin, 1789 (Columbiformes: Columbidae) free-living pigeons from urban areas in Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. *Journal of Parasitic Diseases*, 44(4):877–881.
- Santos, M. M. A. B et al. (2005).** *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: clinical, morphological and molecular studies. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 7(2):113–117.
- Scott, T. R. (2004).** Our current understanding of humoral immunity of poultry. *Poultry Science*, 83(4):574–579.
- Seixas, M. et al. (2019).** First study of *Cryptosporidium* spp. occurrence in eared doves (*Zenaida auriculata*). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28(3):489–492.
- Senar, J. C. et al. (2009).** Estima de la abundancia de palomas (*Columba livia* var.) de la ciudad de Barcelona y valoración de la efectividad del control por eliminación de individuos. *Arxius de miscel·lània zoològica*, 7(1):62–71.
- Sevá, A. P. et al. (2011).** Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 175(1-2):27–32.
- Sharma, P. et al. (2013).** Genetic diversity of *Cryptosporidium* isolates from patients in North India. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(8):601–605.
- Sheoran, A. et al. (2012).** Infection with *Cryptosporidium hominis* provides incomplete protection of the host against *Cryptosporidium parvum*. *The Journal of Infectious Diseases*, 205(6):1019–1023.
- Schulze, C. et al. (2012).** *Cryptosporidium baileyi* - infection in red-breasted merganser (*Mergus serrator*) ducklings from a zoological garden. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 125(9-10):428–431.

-
- Silva, D. C. et al. (2010).** Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. *Parasitology Research*, 107(2):271–277.
- Silverlås, C. et al. (2012).** Zoonotic transmission of *Cryptosporidium meleagridis* on an organic Swedish farm. *International Journal for Parasitology*, 42(11):963–967.
- Siński, E. a Behnke, J. M. (2004).** Apicomplexan parasites: environmental contamination and transmission. *Polish Journal of Microbiology*, 53:67–73.
- Slavin, D. (1955).** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology*, 65:262–266.
- Smith, H. V. et al. (1993).** Occurrence of oocysts of *Cryptosporidium* sp. in *Larus* spp. gulls. *Epidemiology and Infection*, 110(1):135–143.
- Smith, H. V. a Rose, J. B. (1998).** Waterborne cryptosporidiosis: current status. *Parasitology Today*, 14(1):14–22.
- Soares, A. E. R. et al. (2016).** Complete mitochondrial genomes of living and extinct pigeons revise the timing of the columbiform radiation. *BMC Evolutionary Biology*, 16:230.
- Soba, B. a Logar J. (2008).** Genetic classification of *Cryptosporidium* isolates from humans and calves in Slovenia. *Parasitology*, 135:1263–1270.
- Soltane, R. et al. (2007).** Prevalence of *Cryptosporidium* spp. (Eucoccidiorida: Cryptosporidiidae) in seven species of farm animals in Tunisia. *Parasite*, 14(4):335–338.
- Song, J. et al. (2015).** Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from wild rodents and insectivores in South Korea. *The Korean Journal of Parasitology*, 53(6):737–743.
- Sopwith, W. et al. (2005).** The changing epidemiology of cryptosporidiosis in North West England. *Epidemiology and Infection*, 133(5):785–793.
- Spanakos, G. et al. (2015).** Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in recycled waters used for irrigation and first description of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in Greece. *Parasitology Research*, 114(5):1803–1810.
- Spano, F. et al. (1997).** PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wrairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. *FEMS Microbiology Letters*, 150(2):209–217.

-
- Sréter, T. et al. (2000).** Morphologic, host specificity, and molecular characterization of a Hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2):735–738.
- Sréter, T. a Varga, I. (2000).** Cryptosporidiosis in birds-a review. *Veterinary Parasitology*, 87(4):261–279.
- Sricharern, W. et al. (2016).** Molecular detection and prevalence of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. among long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) in Thailand. *Infection, Genetics and Evolution*, 40:310–314.
- Stantic-Pavlinic, M. et al. (2003).** Cryptosporidiosis associated with animal contacts. *Wiener klinische Wochenschrift*, 115:125–127.
- Stensvold, C. R. et al. (2014).** High applicability of a novel method for gp60-based subtyping of *Cryptosporidium meleagridis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7):2311–2319.
- Stock, B. a Haag-Wackernagel, D. (2014).** Effectiveness of gel repellents on feral pigeons. *Animals*, 4(1):1–15.
- Sulaiman, I. M. et al. (1998).** Differentiating human from animal isolates of *Cryptosporidium parvum*. *Emerging and Infectious Diseases*, 4(4):681–685.
- Sulaiman, I. M. et al. (2000).** Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6):2385–2391.
- Sulaiman, I. M. et al. (2002).** Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. *Journal of Parasitology*, 88(2):388–394.
- Sulaiman, I. M. et al. (2005).** Unique endemicity of cryptosporidiosis in children in Kuwait. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6):2805–2809.
- Sunnotel, O. et al. (2006).** Under the microscope: *Cryptosporidium*. *Letters in Applied Microbiology*, 43:7–16.
- Škoudlín, J. (1986).** *Výsledky sčítání vyletujících částí pražské urbánní populace Columba livia f. domestica*. Manuskript, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta.
- Šťastný, K. et al. (1996).** *Atlas hnízdního rozšíření ptáků v České republice 1985–1989*. H&H, Jinočany. ISBN 978-80-86022-18-8.
- Tacconi, G. et al. (2001).** Retrospective ultramicroscopic investigation on naturally cryptosporidial-infected commercial turkey poults. *Avian Diseases*, 45:688–695.

-
- Tan, T. K. et al. (2019).** Occurrence of zoonotic *Cryptosporidium* and *Giardia duodenalis* species/genotypes in urban rodents. *Parasitology International*, 69:110–113.
- Tanriverdi, S. et al. (2003).** Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 130(1):13–22.
- Thompson, R. C. A. et al. (2005).** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology*, 59:77–158.
- Thompson, R. C. A et al. (2016).** *Cryptosporidium* – What is it? *Food and Waterborne Parasitology*, 4:54–61.
- Tiangtip, R. a Jongwutiwes, S. (2002).** Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Tropical Medicine and International Health*, 7(4):357–364.
- Torres, J. et al. (2000).** The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Veterinary Parasitology*, 92(4):253–260.
- Trotz-Williams, L. A. et al. (2006).** Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitology Research*, 99(4):346–352.
- Tůmová, E. et al. (2002).** Performance and oocyst shedding in broiler chickens orally infected with *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Avian Diseases*, 46(1):203–207.
- Tyzzar, E. E. (1907).** A sporozoon found in the peptic flanda of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 5:12–13.
- Tyzzar, E. E. (1910).** An extracullar coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *Journal of Medical Research*, 23:487–510.
- Tyzzar, E. E. (1912).** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.). a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde*, 26:394–414.
- Tzipori, S. et al. (1980).** *Cryptosporidium*: evidence for a single-species genus. *Infection and Immunity*, 30(3):884–886.
- Tzipori, S. et al. (1983).** Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiology Reviews*, 47:84–96.
- Tzipori, S. a Ward, H. (2002).** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection*, 4:1047–1058.
-

-
- Tzipori, S. a Widmer, G. (2008).** A hundred-year retrospective on cryptosporidiosis. *Trends in Parasitology*, 24:184–189.
- Upton, S. J. a Current, W. L. (1985).** The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *Journal of Parasitology*, 71:625–629.
- Van Zeeland, Y. R. A. et al. (2008).** Upper respiratory tract infection caused by *Cryptosporidium baileyi* in three mixed-bred falcons (*Falco rusticolus* × *Falco cherrug*). *Avian Diseases*, 52(2):357–363.
- Wang, F. et al. (2008).** Epidemiological investigation of cryptosporidiosis in quail in Henan Province. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 38:77–81.
- Wang, L. et al. (2014a).** Cryptosporidiosis in broiler chickens in Zhejiang Province, China: molecular characterization of oocysts detected in fecal samples. *Parasite*, 21:36.
- Wang, R. et al. (2011).** Prevalence of *Cryptosporidium baileyi* in ostriches (*Struthio camelus*) in Zhengzhou, China. *Veterinary Parasitology*, 175(1-2):151–154.
- Wang, R. et al. (2012).** *Cryptosporidium* spp. in quails (*Coturnix coturnix japonica*) in Henan, China: molecular characterization and public health significance. *Veterinary Parasitology*, 187(3-4):534–537.
- Wang, T. et al. (2017).** First survey of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon* in diarrhoeic children from Wuhan, China. *Infection, Genetics and Evolution*, 51:127–131.
- Wang, Y. et al. (2014b).** Population genetics of *Cryptosporidium meleagridis* in humans and birds: evidence for cross-species transmission. *International Journal for Parasitology*, 44:515–521.
- Warren, K. S. et al. (2003).** *Cryptosporidium muris* infection in bilbies (*Macrotis lagotis*). *Australian Veterinary Journal*, 81(12):739–741.
- Widmer, G. et al. (2000).** Animal propagation and genomic survey of a genotype 1 isolate of *Cryptosporidium parvum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 108(2):187–197
- Woodmansee, D. B (1988).** Subclinical cryptosporidiosis of turkeys in Iowa. *Journal of Parasitology*, 74:898–900.
- Xiao, L. et al. (1999).** Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(4):1578–1583.

-
- Xiao, L. et al. (2000a).** Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12):5492–5498.
- Xiao, L. et al. (2000b).** Sequence differences in the diagnostic target region of the oocyst wall protein gene of *Cryptosporidium* parasites. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12):5499–5502.
- Xiao, L. et al. (2001a).** Molecular characterization of *Cryptosporidium* oocysts in samples of raw surface water and wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(3):1097–1101.
- Xiao, L. et al. (2001b).** Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *Journal of Infectious Diseases*, 183(3):492–497.
- Xiao, L. et al. (2004).** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and applications for public health. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(1):72–97.
- Xiao, L. a Feng, Y. (2008).** Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52(3):309–323.
- Xiao, L. a Feng, Y. (2017).** Molecular epidemiologic tools for waterborne pathogens *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Food and Waterborne Parasitology*, 8-9:14–32.
- Xiao, L. a Ryan, U. M. (2004).** Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 17(5):483–490.
- Ye, J. et al. (2012).** Anthroponotic enteric parasites in monkeys in public park, China. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 18(10):1640–1643.
- Ye, J. et al. (2014).** Occurrence of human pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*, *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* genotypes in laboratory macaques in Guangxi, China. *Parasitology International*, 63(1):132–137.
- Zhao, W. et al. (2019).** *Cryptosporidium* spp. in wild rats (*Rattus* spp.) from the Hainan Province, China: molecular detection, species/genotype identification and implications for public health. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 9:317–321.
- Zhou, L. et al. (2004).** Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7):4211–4215.
- Zhu, G. et al. (2000).** What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50:1673–1681.

-
- Zintl, A. et al. (2007).** Prevalence of *Cryptosporidium* species in intensively farmed pigs in Ireland. *Parasitology*, 134(11):1575–1582.
- Zylan, K. et al. (2008).** An outbreak of cryptosporidiosis in a collection of Stone curlews (*Burhinus oedicnemus*) in Dubai. *Avian Pathology*, 37(5):521–526.

8 Seznam obrázků

Obrázek 4.1: Fylogenetický strom vztahů izolátů kryptosporidií získaných v této diplomové práci (tučně) a sekvencí uložených v genové bance (GenBank) zkonstruovaný na základě sekvencí genu kódujícího malou ribozomální podjednotku (SSU) a vytvořený metodou Maximum likelihood. V hranatých závorkách jsou uvedeny identifikační čísla sekvencí v GenBank. Měřítko délky větví je uvedeno u stromu. Červené znázornění značí zájmové chovy a zelené znázorňuje zdivočelé holuby..... 47

Obrázek 4.2: Fylogenetický strom vztahů izolátů kryptosporidií získaných v této diplomové práci (tučně) a sekvencí uložených v genové bance (GenBank) zkonstruovaný na základě částečných sekvencí genu kódujícího 60 kDa glykoprotein a vytvořený metodou Maximum likelihood. V hranatých závorkách jsou uvedena identifikační čísla sekvencí v GenBank. Měřítko délky větví je uvedeno u stromu. Červené znázornění značí zájmové chovy a zelené znázorňuje zdivočelé holuby. ... 48

9 Seznam tabulek

Tabulka 3.1: Sety primerů pro molekulární analýzy včetně nasedacích teplot..... 35

Tabulka 4.2: Druhy kryptosporidií detekované pomocí PCR/sekvenace malé podjednotky rRNA (SSU) a 60 kDa glykoproteinu (gp60) u volně žijících (D) a chovaných (CH) holubů v České republice (CZE), Slovensku (SVK) a Chorvatsku (HRV). Intenzita infekce kryptosporidií je vyjádřena jako počet oocyst na gram trusu (OPG)..... 44

Tabulka 4.3 (pokračování tab. 4.2): Druhy kryptosporidií detekované pomocí PCR/sekvenace malé podjednotky rRNA (SSU) a 60 kDa glykoproteinu (gp60) u volně žijících (D) a chovaných (CH) holubů v České republice (CZE), Slovensku (SVK) a Chorvatsku (HRV). Intenzita infekce kryptosporidií je vyjádřena jako počet oocyst na gram trusu (OPG)..... 45