

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: B4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Katedra zootechnických věd

Vedoucí katedry: prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Výskyt a biologické vlastnosti *Cryptosporidium* avian genotyp III

Autor bakalářské práce: Veronika Zikmundová

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

Školitel specialista: Ing. Nikola Holubová

České Budějovice, 2019

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

V Českých Budějovicích dne 12. dubna 2019

.....
Veronika Zikmundová

Mé poděkování patří prof. Ing. Martinu Kváčovi za jeho trpělivost, cenné rady a odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat školitelce specialiste, Ing. Nikole Holubové za pomoc při práci v laboratoři. Děkuji také všem pracovníkům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za ochotu a přátelské jednání. Mé poděkování patří také mým kamarádům a rodině za podporu při studiu.

Tato práce vznikla za finanční podpory grantu Grantové agentury České republiky (GAČR 18-12364S, řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.) a grantů Grantové agentury Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (002/2016/Z, řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D. a 017/2018/Z řešitelka: Ing. Nikola Holubová).

Abstrakt

Tato práce se zabývala studií diverzity kryptosporidií u v zajetí chovaných ptáků patřících do řádu papoušci. Vzorky trusu byly testovány na přítomnost kryptosporidií pomocí mikroskopického vyšetření a molekulárních metod, konkrétně sekvenováním částí genů kódujících malou podjednotku rRNA, aktin a HSP70. Kryptosporidové infekce byly detekovány u 27 papoušků ze 402 studovaných. Nejčastější detekovanou kryptosporidií v této studii byl *Cryptosporidium avian* genotyp III (22), dále pak *C. baileyi* (4) a *C. avium* (1). V experimentálních podmínkách jsme prokázali, že *Cryptosporidium avian* genotyp III je infekční pro korely s délkou prepatentní periody šest dní (DPI), ale neinfekční pro andulky vlnkované, kuřata nebo SCID myši. Experimentálně infikované korely byly infekční po dobu trvání studie (30 DPI) a vylučovaly oocysty o intenzitě infekce v rozmezí od 4 000 do 30 000 oocyst na gram trusu (OPG). Přirozeně infikovaná korela, která byla zdrojem oocyst pro účely této studie, vylučovala oocysty s intenzitou infekce v rozmezí od 10 000 do 30 000 OPG po dobu více než pěti měsíců. *Cryptosporidium avian* genotyp III infikuje proventrikulus a ventrikulus svých ptačích hostitelů a oocysty měří $7,4 \times 5,8 \mu\text{m}$. U žádného z ptáků, který byl infikován *Cryptosporidium avian* genotypem III, nedošlo k rozvinutí klinických příznaků kryptosporidiózy. Genetická a biologická data získaná v této práci prokázala, že *Cryptosporidium avian* genotyp III je odlišný od ostatních druhů rodu *Cryptosporidium* a bylo navrženo uznat tuto kryptosporidii jako samostatný druh a pojmenovat ji jako *Cryptosporidium proventriculi*.

Klíčová slova

Cryptosporidium avian genotyp III; experimentální infekce; velikost oocyst; PCR; prevalence; taxonomie

Abstract

The diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive parrots were studied. Faecal samples of pet birds from Psittaciformes were screened for the presence of *Cryptosporidium* by microscopy and sequencing of the small-subunit rRNA, actin and 70 kDa heat shock protein genes. *Cryptosporidium* infections were detected in 27 of 402 Psittaciformes. *Cryptosporidium* avian genotype III as the most prevalent *Cryptosporidium* (22), while *C. baileyi* (4) and *C. avium* (1) were detected in four, respectively two cases. *Cryptosporidium* avian genotype III was infectious for cockatiels under experimental conditions, with prepatent period of six days post-infection (DPI), but not for budgerigars, chickens or SCID mice. Experimentally infected cockatiels remained infection for the duration of the study (30 DPI), with an infection intensity ranging from 4,000 to 30,000 oocysts per gram (OPG). Naturally infected cockatiels shed oocysts with an infection intensity ranging from 10,000 to 30,000 OPG. *Cryptosporidium* avian genotype III infects the proventriculus and ventriculus, and oocysts measure 7.4×5.8 µm. None of the birds, infected with *Cryptosporidium* avian genotype III, developed clinical signs. Genetic and biological data support the establishment of avian genotype III as separate species of the genus *Cryptosporidium* and we propose the name *Cryptosporidium proventriculi* sp. n.

Key words

Cryptosporidium avian genotype III; Experimental infections; Oocyst size; PCR; Prevalence; Taxonomy

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Literární přehled.....	10
2.1	Rod <i>Cryptosporidium</i>	10
2.2	Historie kryptosporidií parazitujících u ptáků.....	10
2.3	Kryptosporidie a kryptosporidióza ptáků	11
2.4	Druhy a genotypy kryptosporidií parazitujících u papoušků	12
2.4.1	<i>Cryptosporidium meleagridis</i>	12
2.4.2	<i>Cryptosporidium baileyi</i>	13
2.4.3	<i>Cryptosporidium galli</i>	15
2.4.4	<i>Cryptosporidium avium</i>	16
2.4.5	<i>Cryptosporidium parvum</i>	16
2.4.6	<i>Cryptosporidium</i> avian genotyp II	17
2.4.7	<i>Cryptosporidium</i> avian genotyp III.....	17
3	Cíle.....	20
4	Materiál a metody	21
4.1	Materiál	21
4.1.1	Biologické vzorky	21
4.1.2	Oocysty pro experimentální infekce	21
4.1.3	Laboratorní zvířata a jejich chov.....	21
4.2	Metody.....	22
4.2.1	Zpracování vzorků	22
4.2.2	Purifikace oocyst.....	22
4.2.3	Barvení oocyst kryptosporidií	24
4.2.4	Morfometrická analýza oocyst.....	26
4.2.5	Ověření životaschopnosti oocyst.....	26
4.2.6	Design experimentálních infekcí	27
4.2.7	Hodnocení intenzity infekce	27
4.2.8	Izolace DNA z trusu.....	27
4.2.9	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	29
4.2.10	Gelová elektroforéza	29
4.2.11	Izolace z gelu.....	30
4.2.12	Sekvenování	31
4.2.13	Fylogenetické analýzy.....	31

4.2.14	Histologické vyšetření.....	32
4.2.15	Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) ..	34
4.2.16	Statistické analýzy.....	35
5	Výsledky	36
5.1	Výskyt a diverzita kryptosporidií u papoušků.....	36
5.2	Biologické vlastnosti Cryptosporidium avian genotyp III	41
5.2.1	Morfometrie oocyst.....	41
5.2.2	Průběh a intenzita infekce	42
5.2.3	Klinické příznaky	43
6	Diskuze	45
7	Závěry.....	49
8	Přehled použité literatury a zdrojů	50
9	Přílohy	62

1 Úvod

Rod *Cryptosporidium* je tvořen výhradně parazitickými druhy a genotypy, které infikují lidi a hospodářská a volně žijící zvířata a vykazují širokou škálu biologické rozmanitosti, zejména v lokalizaci infekce a hostitelské specifitě. Většina druhů a genotypů kryptosporidií je hostitelsky specifická, tedy infikuje pouze omezené množství hostitelských druhů. Onemocněním, kryptosporidiózou, mohou být postiženy všechny věkové kategorie, ale obecně jsou mladší jedinci infikováni častěji než dospělí. Klinické příznaky se liší v závislosti na věku, zdravotním stavu infikovaného hostitele a genetických predispozicích.

S intenzivním výzkumem došlo na konci 20. století k výraznému zvýšení počtu prozkoumaných druhů a genotypů kryptosporidií, avšak u většiny chybí základní informace o jejich biologii. S těmito nedostatky se však nepotýkáme jen u genotypů, ale i u platně popsáných druhů (Holubová a kol. 2016).

Zatímco studiu kryptosporidií u savců a člověka je věnována větší pozornost, u ptáku a u ostatních obratlovců tomu tak zdaleka není. Za posledních 50 let byly popsány pouze 4 platné druhy kryptosporidií, které jsou hostitelsky specifické pro ptáky: *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin 1955), *Cryptosporidium baileyi* (Current a kol. 1986), *Cryptosporidium galli* (Pavlásek 1999) a *Cryptosporidium avium* (Holubová a kol. 2016), přičemž je na základě molekulárních údajů a terénního výzkumu zřejmé, že ptáci jsou parazitováni velkým množstvím různých druhů kryptosporidií.

Cryptosporidium avian genotyp III je kryptosporidie převážně parazitující u ptáků patřících do řádu papoušci (Psittaciformes). Přestože tento genotyp patří mezi žaludeční druhy kryptosporidií, u nichž jsou často popisovány klinické příznaky onemocnění, infekce způsobené tímto genotypem se nikterak neprojevují (Ravich a kol. 2014).

Cílem naší práce bylo zaměřit se na studium *Cryptosporidium avian* genotyp III a doplnit informace o tomto ptačím genotypu.

2 Literární přehled

2.1 Rod *Cryptosporidium*

Kryptosporidie, patřící do kmene Apicomplexa, infikují gastrointestinální epitel všech hlavních skupin obratlovců (Kvác a kol. 2014a) a způsobují onemocnění zvané kryptosporidióza, která může být chronická, ale i život ohrožující (Checkley a kol. 2015).

Taxonomické zařazení rodu *Cryptosporidium* je kontroverzní po mnoho let, s řadou taxonomických revizí (O'Donoghue 1995; Šlapeta 2013). Dlouho byly kryptosporidie řazeny mezi kokcidie, kvůli jejich morfologické podobnosti oocyst a vývojovému cyklu (Fayer a Xiao 2008). Díky molekulárním analýzám však bylo prokázáno, že kryptosporidie jsou příbuzné s gregarinami (Carreno a kol. 1999). Rod *Cryptosporidium* patří do kmene Apicomplexa, pro který je charakteristická přítomnost apikálního komplexu, alespoň v některém vývojovém stádiu v rámci vývojového cyklu. Vzhledem k tomu, že kryptosporidie se řadí mezi gregariny, můžeme očekávat, že počet druhů a genotypů bude značně růst, jelikož jsou považovány za nejrozmanitější skupinu protozoí (Thompson a kol. 2016).

2.2 Historie kryptosporidií parazitujících u ptáků

Již z počátku 19. století se datuje první zmínka o kryptosporidiích. Roku 1866 byl popsán životní cyklus *Cryptosporidium baileyi* u domácích kuřat (*Gallus gallus* f. *domestica*) (Current a kol. 1896). Významným milníkem je však až rok 1907, kdy parazitolog a lékař Ernest Edward Tyzzer našel prvoka parazitujícího v žaludku laboratorní myši (*Mus musculus*) a pojmenoval ho *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). V roce 1910 navrhl tento druh jako typový druh nového rodu *Cryptosporidium* (Tyzzer 1910). V roce 1912 stejný autor popsal další druh kryptosporidie infikující tenké střevo myši a nazval ho *Cryptosporidium parvum* (Tyzzer 1912). Druhý datovaný záznam o kryptosporidiových infekcích ptáků pochází z roku 1929, kdy Tyzzer popsal kryptosporidie u mladých kuřat v epitelu céca (Tyzzer 1929). Tyto kryptosporidie však nebyly uvedeny jako samostatný druh, protože připomínaly již dříve popsany druh *C. muris* (Tyzzer 1929). Až do roku 1954 nebyl ptačím kryptosporidiím připisován prakticky žádný lékařský či veterinární význam. V roce 1955 byl popsán první druh kryptosporidie parazitující u ptáků,

konkrétně u krůt (*Meleagris gallopavo*) a byl pojmenován *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin 1955). Třetí platný ptačí druh kryptosporidií popsal o 44 let později Pavlásek (1999) z proventrikulu kuřat a nazval ji *Cryptosporidium galli*. V roce 2003 jeho studii revidoval Ryan a kol. (2003a). První zmínka o *Cryptosporidium* avian genotyp III se objevila v roce 2010 ve studii z Japonska, kdy byl tento parazit popsán u korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*), kterou publikovali Abe a Makino (2010). O šest let později ve své práci Holubová (2016) doplnila informace o tomto genotypu a jmenovala ho plnohodnotným druhem s názvem *Cryptosporidium avium*.

Existuje také mnoho genotypů rodu *Cryptosporidium* popsáných u ptáků, které jsou mnohem mladší než platné druhy tohoto parazita. V roce 2001 byl poprvé identifikován ptačí genotyp *Cryptosporidium* duck genotyp z trusu kachny proužkované (*Anas superciliosa*) (Morgan a kol. 2001). O dva roky později byl u sluky lesní (*Scolopax rusticola*) zaznamenán výskyt *Cryptosporidium* Woodcock genotyp, který dodnes není dobře prozkoumán (Ryan a kol. 2003a). Při dalším intenzivním výzkumu kryptosporidií byly hned následující rok nalezeny další genotypy, a to hned čtyři, *Cryptosporidium* goose genotyp I–IV, u volně žijící husy kanadské (*Branta canadensis*) (Jellison a kol. 2004; Zhou a kol. 2004). Ng a kol. v roce 2006 identifikovali *Cryptosporidium* avian genotyp I–VI (Ng a kol. 2006). *Cryptosporidium* avian genotyp I byl detekován u kanára divokého (*Serinus canaria*) a *Cryptosporidium* avian genotyp IV u kruhoočka japonského (*Zosterops japonicus*). Mezi jedny z nejnověji popsáných genotypů patří *Cryptosporidium* avian genotyp VI, který byl poprvé popsán v roce 2016 u vlhovce červenokřídlého (*Agelaius phoeniceus*) (Chelladurai a kol. 2016).

2.3 Kryptosporidie a kryptosporidióza ptáků

Kryptosporidie jsou hlavní příčinou protozoálních infekcí u ptáků (Nakamura a Meireles 2015). Druhy a genotypy kryptosporidií infikují široké spektrum ptáků a liší se velikostí oocyst a místem infekce (McLauchlin a kol. 2000). Kryptosporidióza se vyskytuje ve třech hlavních formách: respirační, střevní a ledvinová, a to s klinickými nebo subklinickými projevy (Santín 2013). V dýchacím aparátu byly podle studií nalezeny oocysty *C. baileyi*, v trávicím traktu zase oocysty druhu *C. meleagridis*, *C. baileyi*, *C. galli* a *C. avium* a ve vylučovací

soustavě pouze druhy *C. baileyi* a *C. avium* (Current a kol. 1986; Holubová a kol. 2016; Slavin 1955; Pavlásek 1999). Ng a kol. (2006) uvedli ve své studii výskyt klinických příznaků, jako je průjem a anorexie, u ptáků pocházejících z České republiky. Tito ptáci byli pozitivní na výskyt *C. galli*, *C. baileyi* a *C. avium*.

U papoušků se kryptosporidióza projevuje jako akutní nemoc trávicího a respiračního traktu. Kryptosporidie jako je *C. galli* způsobuje chronické onemocnění proventrikulu, které může vést k smrtelnému stavu jedince. Klinický význam žaludeční kryptosporidiózy u papoušků je stále málo pochopen a je spojen s klinickými a subklinickými infekcemi (Makino a kol. 2010; Ravich a kol. 2014). Navíc infekce ptáků parazity rodu *Cryptosporidium* jsou často doprovázeny i dalšími infekcemi způsobenými jinými parazitárními, bakteriálními nebo virovými patogeny (Ravich a kol. 2014). Citlivější a specifické molekulární techniky se tak staly nezbytnými prostředky pro diagnostiku žaludeční a střevní kryptosporidiózy u ptáků (Ferrari a kol. 2018).

2.4 Druhy a genotypy kryptosporidií parazitujících u papoušků

Z celkového počtu čtyř druhů a 16 genotypů kryptosporidií, které můžeme najít u ptáků, byly u papoušků detekovány druhy: *Cryptosporidium meleagridis*, *Cryptosporidium baileyi*, *Cryptosporidium galli*, *Cryptosporidium avium*, *Cryptosporidium parvum* a dva genotypy: *Cryptosporidium avian* genotyp II a III. Těmto kryptosporidiím se budu věnovat v následujícím textu.

2.4.1 *Cryptosporidium meleagridis*

Morfologie: Oocysty *C. meleagridis* měří $4,8 \pm 0,02 \times 4,2 \pm 0,03$ μm (Sréter a kol. 2000) a jsou téměř k nerozeznání od oocyst druhu *C. parvum* (Slavin 1955). Oocysty jsou sférické, nepravidelně sférické nebo lehce protáhlé. Uvnitř oocysty jsou přítomny čtyři sporozoity a zbytkové reziduum. Mikropyle není přítomno (Lindsay a kol. 1989a).

Hostitelská specifita: Oocysty *C. meleagridis* izolované z kuřat jsou infekční pro několik druhů savců (Mammalia), včetně králíků, myší, potkanů a skotu (Darabus 1997). Přirozená infekce *C. meleagridis* byla prokázána u ptáků čeledi bažantovití (Phasianidae) (Máca a Pavlásek 2015) a u ptáku řádu hrabaví (Galliformes), měkkozobí (Columbiformes), papoušci, pěvci (Passeriformes)

a vrubozobí (Anseriformes) (Abe a Iseki 2004; Darabus a Olariu 2003; Jellison a kol. 2004; Morgan a kol. 2000; O'Donoghue 1995; Sreter a Varga 2000). U ptáků z čeledi bažantovití byl tento druh kryptosporidie popsán u orebice rudé (*Alectoris rufa*) (Máca a Pavlásek 2015). Příznaky kryptosporidiózy u papoušků byly také zaznamenány u agapornisů (*Agapornis* sp.), alexandrů malých (*Psittacula krameri*), andulek vlnkovaných (*Melopsittacus undulatus*) a korel chocholatých (Belton a Powell 1987; Goodwin a Krabill 1989; Lindsay a kol. 1990; Morgan a kol. 2000). Pavlásek (1994a) popsal přítomnost tohoto druhu u kakadu moluckého (*Cacatua moluccensis*).

Lokalizace: *Cryptosporidium meleagridis* infikuje především tenké střevo (Current a kol. 1986; Pavlásek 1994b). Ovšem studie, která se zabývala experimentální infekcí *C. meleagridis* u kuřat, prokázala infekci také v ileu, céku, kolonu a Fabriciově burze (Bermudez a kol. 1988; Current a kol. 1986; Lindsay a kol. 1989a).

Patogenita a klinické příznaky: Klinická infekce je charakterizována sníženým přírůstkem hmotnosti, průjmem a distenzí tenkého střeva plynem či hlenem (Gharagozlou a kol. 2006; Goodwin 1988). U kuřat infikovaných *C. meleagridis* dochází ke zkrácení střevních klků a změně povrchové vrstvy slizničního epitelu (Akiyoshi a kol. 2003).

Zoonotický potenciál: *Cryptosporidium meleagridis* je třetí nejčastější patogenní druh napadající lidskou populaci v rozvojových zemích (Cama a kol. 2008). V zemích jako je například Peru a Thajsko je *C. meleagridis* zodpovědná za 10-20 % kryptosporidiových infekcí u lidí (Chalmers a Giles 2010; Elwin a kol. 2012; Insulander a kol. 2013; Xiao a Feng 2008). Řada studií ukázala, že *C. meleagridis* je významnou příčinou kryptosporidiózy u imunokompetentních i imunokompromitovaných jedinců (Cama a kol. 2003; McLauchlin a kol. 2000; Xiao a Feng 2008).

2.4.2 *Cryptosporidium baileyi*

Vývojový cyklus: Current a kol. (1986) ve své publikaci podrobně popsal vývojový cyklus *C. baileyi*. V prvních třech dnech infekce se vývojová stádia u kuřat objevila v oblasti mikrovilů ilea a tlustého střeva. Už 4. den po infekci byla poprvé detekována infekce Fabriciovy burzy a kloaky. Pozorované oocysty byly buď

tenkostěnné nebo tlustostěnné, kterých bylo více (Current a kol. 1986). Během 12 hodin od podání infekce byli detekováni meronti prvního typu s 8 merozoity a měřili $5,0 \times 4,9 \mu\text{m}$. Meronti druhého typu se 4 merozoity se vyvinuli po 48 hodinách po infekci a měřili $5,1 \times 5,1 \mu\text{m}$. Za dalších 24 hodin, respektive 72 hodin po podání infekce, byli detekováni meronti třetího typu s 8 merozoity o rozměrech $5,2 \times 5,1 \mu\text{m}$. Mikrogamonti měřili $4,00 \times 4,00 \mu\text{m}$ a produkovali přibližně 16 mikrogamet, z kterých vznikly makrogamety o rozměrech $4,7 \times 4,7 \mu\text{m}$. Tyto vzniklé makrogamety sporolují v hostitelských buňkách a tvoří se z nich dva typy oocyst. Odolnější oocysty jsou tvořeny silnou stěnou ($6,3 \times 5,2 \mu\text{m}$) a jsou vylučovány trusem. Druhý typ oocyst má tenkou stěnu a dokáže praskat v těle hostitele, kde pomocí svých sporozoitů napadá další enterocyty (Current a kol. 1986).

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

Hostitelská specifita: Přírozená infekce byla popsána u mnoha druhů ptačích hostitelů, mezi které patří bulbul (*Pycnonotus* spp.), holub domácí (*Columba livia* f. *domestica*), chocholouš obecný (*Galerida cristata*), jeřáb bělošijí (*Grus vipio*), kachna divoká (*Anas platyrhynchos*), kardinál dominikánský (*Paroaria dominicana*), kur domácí, křepelka japonská (*Coturnix coturnix japonica*), majna obecná (*Acridotheres tristis*), orebice rudá, pštros dvouprstý (*Struthio camelus*), rýžovník šedý (*Padda oryzivora*), snovač jacksonův (*Ploceus jacksoni*), straka americká (*Pica pica*), šafránka velká (*Sicalis flaveola*), timálie čínská (*Leiothrix lutea*) a zebříčka pestrá (*Taeniopygia guttata*) (Baroudi a kol. 2013; Li a kol. 2015; Máca a Pavlásek 2015; Nakamura a kol. 2009; Ng a kol. 2006; Qi a kol. 2011; Sevá a kol. 2011; Wang a kol. 2010, 2011, 2012, 2014b). Ryan a kol. (2003a) zaznamenali výskyt tohoto druhu u zástupců řádu papoušků a to u amazoňana zelenolícího (*Amazona dufresniana*) a alexandra malého.

Lokalizace: *Cryptosporidium baileyi* se vyvíjí hlavně v respiračním traktu (Current a kol. 1986). Infekce postihuje spojivky, nosohltan, průdušnici, vzdušné vaky, tenké, slepé a tlusté střevo, kloaku, Fabriciovu burzu, ledviny a močový aparát (Lindsay a Blagburn 1990).

Patogenita a klinické příznaky: U infikovaných brojlerových kuřat byl autory popsán snížený přírůstek hmotnosti, větší výskyt infekcí vzdušných vaků a zvýšená mortalita (Goodwin a kol. 1996; Gorham a kol. 1987). Příčina vysoké morbidity a mortality je spojována hlavně s onemocněním dýchacího aparátu (Lindsay a Blackburn 1990).

2.4.3 *Cryptosporidium galli*

Vývojový cyklus: O vývojovém cyklu tohoto druhu je známo velmi málo, byly pozorovány pouze stádia trofozoitů a makrogamontů v proventrikulu (Fayer a Xiao 2008).

Morfologie: Oocysty tohoto druhu jsou elipsoidní, plně vysporulované, postrádají sporocysty a měří $8,3 \times 6,3 \mu\text{m}$ ($8,0\text{--}8,5 \times 6,2\text{--}6,4 \mu\text{m}$). Morfologicky jsou si podobné s *C. baileyi*, ale jsou větší (Pavlásek 1999).

Hostitelská specifita: Přirozená infekce byla zaznamenána u ptáků řádu hrabaví, papoušci, pěvci, plameňáci (Phoenicopteriformes) a zoborožci (Bucerotiformes). Nejpočetnější skupinu tvoří pěvci, mezi které patří: astrild rudokrký (*Emblema picta*), brkoslav severní (*Bombycilla garrulus*), drozd rezavobřichý (*Turdus rufigiventris*), hýl křivčí (*Pinicola enucleator*), kanár divoký, kardinál dominikánský, kněžík šedobílý (*Sporophila schistacea*), louskač menší (*Oryzoborus angolensis*), panenka hnědoprsá (*Lonchura castaneothorax*), pásovník krátkoocasý (*Peophila cincta*), saltator zelenokřídý (*Saltator similis*), stehlík obecný (*Carduelis carduelis*), šafránka velká, timálie stříbrouchá (*Leiothrix argentauris*) (Nakamura a kol. 2009; Ng a kol. 2006; Pavlásek 1999, 2001; Qi a kol. 2011; Ryan a kol. 2003b; Sevá a kol. 2011). Ng a kol. (2006) do hostitelské specifity *C. galli* přiřadili zástupce řádu zoborožci a plameňáci, a to dvojzoborožce velkého (*Buceros rhinoceros*) a plameňáka karibského (*Phoenicopterus ruber ruber*). Přirozená infekce *C. galli* byla prokázána také u ptáků z řádu hrabaví a papoušci: jeřábek lesní (*Tetrastes bonasia rupestris*), kur domácí, tetřev hlušec (*Tetrao urogallus*), neoféma tyrkysová (*Neophema pulchella*) a korela chocholatá (Ng a kol. 2006; Ryan a kol. 2003b).

Lokalizace: *Cryptosporidium galli* výhradně infikuje proventrikulus (Blagburn a kol. 1990; Morgan a kol. 2001).

Patogenita a klinické příznaky: Druh *C. galli* je schopen infikovat mladé a dospělé ptáky a způsobit chronickou žaludeční infekci (Silva a kol. 2010). Infekce způsobené

C. galli jsou subklinické nebo spojené s anorexií, úbytkem hmotnosti a chronickým zvracením (Makino a kol. 2010; Ravich a kol. 2014).

2.4.4 *Cryptosporidium avium*

Morfologie: Oocysty měří $6,26 \times 4,86 \mu\text{m}$. Poměr délky k šířce je 1,29 μm a jsou menší než oocysty *C. baileyi* (Holubová a kol. 2016).

Hostitelská specifita: Mezi přirozené hostitele patří agapornis růžohrdlý (*Agapornis roseicollis*), amazoňan modročelý (*Amazona aestiva*), kakadu inka (*Lophochroa leadbeateri*), kakariki rudočelý (*Cyanoramphus novaeseelandiae*), korela chocholátá (Abe a Makino 2010; Curtiss a kol. 2015; Holubová a kol. 2016; Nakamura a kol. 2014; Qi a kol. 2011; Wang a kol. 2014; Zhang a kol. 2015). Experimentálními i přirozenými hostiteli je kur domácí a andulka vlnkovaná (Holubová a kol. 2016).

Lokalizace: K místům infekce patří ileum, cékum, ledviny, močovod a kloaka (Curtiss a kol. 2015; Holubová a kol. 2016).

Patogenita a klinické příznaky: Přirozeně nebo experimentálně infikovaní ptáci nevykazují žádné známky kryptosporidiózy a ani u nich nejsou detekovány žádné patologické změny (Holubová a kol. 2016). Vývojová stádia *C. avium* byla odhalena v ileu a céku pomocí skenovací elektronové mikroskopie. Nicméně Curtiss a kol. (2015) popsal klinické příznaky způsobené *C. avium* u sedmiletého kakadu inka. U papouška se projevila letargie a anorexie a následné histopatologické vyšetření po jeho smrti prokázalo chronický zánět ledvin, močovodu a kloaky. Přítomnost *C. avium* byla prokázána pomocí molekulárních metod (Curtiss a kol. 2015).

2.4.5 *Cryptosporidium parvum*

Tato kryptosporidie patří mezi nejrozšířenější kryptosporidie s nejnižší hostitelskou specifitou. *Cryptosporidium parvum* je infekční zejména pro telata do věku 8 týdnů (Langkjær a kol. 2007). *Cryptosporidium parvum* není považováno za hlavní příčinu onemocnění u ptáků, ale existuje mnoho zpráv o detekci specifické DNA ve výkalech asymptomatických ptáků z několika řádů (Nakamura a kol. 2009; Oliveira a kol. 2017; Reboredo-Fernández a kol. 2015). Oocysty *C. parvum* byly nalezeny v korele chocholáté, papoušičkách (*Forpus* sp.) a v alexandrovi malém (Ferrari a kol. 2018; Nakamura a kol. 2009).

2.4.6 *Cryptosporidium avian* genotyp II

Morfologie: Oocysty tohoto genotypu měří $6,5 \times 6,6 \mu\text{m}$ a jsou proto větší než oocysty *C. baileyi* ($6,4 \times 4,8 \mu\text{m}$) (Ng a kol. 2006).

Hostitelská specifita: Tento genotyp kryptosporidie byl nalezen u alexandra velkého (*Psittacula eupatria*), aratigy sluneční (*Aratinga solstitialis*), eklektuse různobarevného (*Electus roratus*), kakadu růžového (*Eolophus roseicapilla*), korely chocholaté a kakadu inka, papouška Alexandřina (*Polytelis alexandrae*) (Nakamura a kol. 2009; Ng a kol. 2006; Nguyen a kol. 2013; Meireles a kol. 2006; Santos a kol. 2005; Sevá a kol. 2011; Wang a kol. 2014).

Lokalizace: *Cryptosporidium avian* genotyp II infikuje kloaku, rektum a Fabriciovu burzu (Makino a kol. 2010; Nakamura a Meireles 2015).

Patogenita a klinické příznaky: Experimentální infekcí pštrova dvouprstého byla zjištěna přítomnost vývojových stádií *Cryptosporidium avian* genotypu II v epitelu kloaky a Fabriciovy burzy (Santos a kol. 2005).

2.4.7 *Cryptosporidium avian* genotyp III

Morfologie: Průměrná velikost oocyst *Cryptosporidium avian* genotyp III je v rozmezí $7,5 \times 6,0 \mu\text{m}$ (Ng a kol. 2006).

Hostitelská specifita: Tato kryptosporidie se nejčastěji vyskytuje u zástupců řádu papoušci, ale byla detekována i u ptáků patřících do řádů pěvci, šplhavci (Piciformes), dlouhokřídli (Charadriiformes) a vrubozobí (tabulka 1).

Lokalizace: Molekulární a histopatologické výsledky prokazují, že *Cryptosporidium avian* genotyp III prolifерuje v duktálním epitelu proventrikulárních žláz (Makino a kol. 2010; Ravich a kol. 2014).

Patogenita a klinické příznaky: Ng a kol. (2006) nezaznamenal ve své studii u australských ptáků pozitivních na *Cryptosporidium avian* genotyp III žádné klinické příznaky jako je průjem, dušnost, kašel nebo kýchání (Makino a kol. 2010).

Tabulka 1. Výskyt *Cryptosporidium* avian genotyp III u ptáků patřících do řádů papoušci (Psittaciformes)¹, pěvci (Passeriformes)², šplhavci (Piciformes)³, dlouhokřídlí (Charadriiformes)⁴ a vrubozobí (Anseriformes)⁵ popsany na základě detekce specifické DNA v trusu.

Hostitel (vědecké jméno)	Země	Lokus [GenBank číslo]	počet vyšetřených/ pozitivních	Reference
Amazoňan modročelý¹ (<i>Amazona aestiva</i>)	Brazílie	SSU*	NS/1	Nakamura a kol. (2014)
Aymara pruhovaný¹ (<i>Bolborhynchus lineola</i>)	Brazílie	SSU [MF462155]	34/1	Ferrari a kol. (2018)
Korela chocholátá¹ (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	Austrálie	SSU [DQ650343]	NS/3	Ng a kol. (2006)
		SSU [GQ227480] [§]	8/1	Nakamura a kol. (2014)
	Brazílie	SSU [GQ227481]	64/1	Nakamura a kol. (2009)
		SSU [GU074385-87]	NS/3	Gomes a kol. (2012)
		SSU [GQ227480] [§]	70/9	Ferrari a kol. (2018)
	Čína	SSU [HM116385]	39/2	Qi a kol. (2011)
	Indie	SSU [KX668210]	NS	Nepublikováno
		SSU [AB694729] [§]	10/1	Iijima a kol. (2018)
	Japonsko	SSU [AB471645] COWP [AB471653] Aktin [AB471659]	4/1	Abe a Makino (2010)
Knežík šedomodrý² (<i>Sporophila caerulea</i>)	Brazílie	SSU*	10/1	Nakamura a kol. (2014)
Papoušičci¹ (<i>Forpus</i> sp.)	Brazílie	SSU [MF462156]	78/12	Ferrari a kol. (2018)
Kakadu růžový¹ (<i>Eolophus roseicapilla</i>)	Austrálie	Aktin [DQ650349]	NS/1	Ng a kol. (2006)
Kanár divoký² (<i>Serinus canaria</i>)	Brazílie	SSU*	498/12	Camargo a kol. (2018)
		SSU*	13/2	Nakamura a kol. (2014)
Agapornis¹ (<i>Agapornis</i> sp.)	Brazílie	SSU [GQ227480] [§]	14/3	Ferrari a kol. (2018)
	USA	SSU [KJ661334]	18/2	Ravich a kol. (2014)
Agapornis růžohlavý¹ (<i>Agapornis lilianae</i>)	Japonsko	SSU [identické s AB694729]	5/1	Iijima a kol. (2018)
Neoféma¹ (<i>Neophema</i> sp.)	Brazílie	SSU*	91/1	Ferrari a kol. (2018)
Papoušiček šedokřídlý¹ (<i>Forpus coelestis</i>)	Japonsko	SSU [AB694729] [§]	3/1	Iijima a kol. (2018)
	Brazílie	SSU [GQ227480]	14/1	Nakamura a kol. (2009)
Agapornis růžohrdlý¹ (<i>Agapornis roseicollis</i>)	Japonsko	SSU [AB471641]	37/13	Makino a kol. (2010)
		Aktin [AB471655]		
		SSU [AB694729] [§]	29/5	Iijima a kol. (2018)

Tabulka 1. (pokračování). Výskyt *Cryptosporidium* avian genotyp III u ptáků patřících do řádů papoušci (Psittaciformes)¹, pěvci (Passeriformes)², šplhavci (Piciformes)³, dlouhokřídli (Charadriiformes)⁴ a vrubozobí (Anseriformes)⁵ popsány na základě detekce specifické DNA v trusu.

Papoušek zpěvavý¹ (<i>Psephotus haematonotus</i>)	Brazílie	SSU*	21/1	Ferrari a kol. (2018)
Aratiga sluneční¹ (<i>Aratinga solstitialis</i>)	Austrálie	SSU [DQ650342]	NS/1	Ng a kol. (2006)
Saltator zelenokřídlý² (<i>Saltator similis</i>)	Brazílie	SSU*	152/1	Nakamura a kol. (2014)
Rýžovník šedý² (<i>Padda oryzivora</i>)	Brazílie	SSU [GU074384]	NS/1	Gomes a kol. (2012)
Kraska červenezobá² (<i>Urocissa erythrorhyncha</i>)	Čína	SSU [HM116386]	1/1	Qi a kol. (2011)
Strnavec ranní² (<i>Zonotrichia capensis</i>)	Brazílie	SSU*	NS/1	Nakamura a kol. (2014)
Kněžík² (<i>Sporophila</i> sp.)	Brazílie	SSU*	NS/1	Nakamura a kol. (2014)
Arassari zlatý³ (<i>Pteroglossus bailloni</i>)	Brazílie	SSU [KU885389]	2/1	Novaes a kol. (2018)
Tukan bledohrdlý³ (<i>Ramphastos tucanus</i>)	Brazílie	SSU [KU885388]	4/2	Novaes a kol. (2018)
Tukan obrovský³ (<i>Ramphastos toco</i>)	Brazílie	SSU [KU885387]	28/5	Novaes a kol. (2018)
Racek hnědohlavý a chechtavý⁴ (<i>Chroicocephalus brunnicephalus</i> and <i>ridibundus</i>)	Thajsko	SSU [AB694729] [§]	70/2	Koompaong a kol. (2014)
Vodní ptáci^{5,#}	Španělsko	SSU [KT880495-97]	265/4	Cano a kol. (2016)

NS nespecifikováno; # druh ptáka nebyl určen; * na základě duplexní real-time PCR amplifikující SSU gen *Cryptosporidium* avian genotyp III; § neuvedeno v GenBank, pouze uvedena 100% shoda se sekvencí v databázi GenBank

3 Cíle

- Pomocí molekulárních metod provést srovnání izolátů získaných ze zájmově chovaných papoušků v České republice s izoláty ze světa.
- Popsat genetickou a biologickou charakteristiku *Cryptosporidium* avian genotyp III.
- Popsat průběh infekce *Cryptosporidium* avian genotyp III u vybraných hostitelů, popsati lokalizaci vývojového cyklu a patogenitu pro hostitele.
- Popsat morfometrii oocyst.
- Porovnat získané výsledky s publikovanými údaji.

4 Materiál a metody

4.1 Materiál

4.1.1 Biologické vzorky

V letech 2016–2018 bylo vyšetřeno celkem 402 vzorků trusu ptáků řádu papoušci pocházejících z 9 chovů z České republiky a 2 chovů ze Slovenska (tabulka P1 v příloze). Každý vzorek byl odebrán z podložky ptačí klece, ihned po vykání zvířete, a trus byl umístěn do samostatných plastových mikrozkušavek bez fixačního prostředku. Při odebrání vzorků byla zaznamenána konzistence stolice (řídká, pokud měla podobu nádoby a pevná, pokud byl zachován původní tvar). Každému zvířeti byl odebrán vzorek trusu pouze jednou denně. Všechna zvířata byla vyšetřena bez předchozí znalosti jejich zdravotního stavu. Všechny vzorky byly skladovány při teplotě 4 °C, dokud nebyly použity k další analýze.

4.1.2 Oocysty pro experimentální infekce

Pro experimentální infekce byly použity oocysty izolátu *Cryptosporidium* avian genotyp III, získané ze čtyř přirozeně infikovaných korel z České republiky. Tyto oocysty byly použity k infekci dospělé korely, která byla negativní na přítomnost oocyst a specifické DNA *Cryptosporidium* spp.

4.1.3 Laboratorní zvířata a jejich chov

K experimentům byly použity andulky vlnkované, korely chocholaté, kur domácí a myši domácí. Každá experimentální skupina se skládala z pěti zvířat. Dále byly tři zvířata od každého hostitelského druhu použita jako negativní kontrolní skupina. Tři týdny před experimentálními infekcemi byla zvířata každý druhý den testována na přítomnost oocyst a specifické DNA *Cryptosporidium* spp., s výjimkou kuřat, která byla líhnuta za kontrolovaných podmínek v laboratoři. Andulky a korely, negativní na přítomnost kryptosporidií, pocházely od chovatelů z České republiky a SCID myši byly zakoupeny (Charles River, Německo). Všechna zvířata byla krmena sterilizovaným krmivem a napájena sterilizovanou vodou *ad libitum*. Ošetřovatelé zvířat nosili jednorázové kombinézy, ochranné návleky na boty a sterilní rukavice pokaždé, když vstoupili do experimentální místnosti. Veškerá podestýlka, výkaly a jednorázové ochranné oděvy byly uloženy do plastových pytlů

a spáleny. Všechna zvířata byla umístěna ve zvěřinci Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i.

Jednodenní a dvaceti jednadenní kuřata byla chována v plastových nádobách se savou podložkou. Nádoby umístěné ve zvěřinci byly čištěny 1× denně. V prvních pěti dnech byly použity lampy jako zdroj tepla. Laboratorní SCID myši byly chovány v plastových chovných nádobách (TOP-VELAZ, Praha, Česká republika) s podestýlkou z dřevěných pilin. Dospělé andulky a korely byly chovány samostatně v klecích. Podložku tvořil papír pro snadnější odebrání čerstvého trusu.

4.2 Metody

4.2.1 Zpracování vzorků

U čerstvě odebraných vzorků či vzorků skladovaných v dichromanu draselném, byla nejprve provedena purifikace oocyst pro experimentální infekce, dále specifické barvení, morfologické analýzy a izolace DNA pro genotypizaci.

4.2.2 Purifikace oocyst

Vzorek trusu obsahující oocysty kryptosporidií byl homogenizován v deionizované vodě ve třecí misce a přečištěn na sacharózovom gradientu. Sediment obsahující oocysty byl následně přečištěn pomocí cesium chloridového gradientu.

Sacharózový gradient (Arrowood a Stearling 1987)

Zásobní roztoky:

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

Postup:

1. Trus byl zhomogenizován ve třecí misce a vzniklá suspenze byla preceděna přes jemné (čajové) sítko.

2. Do 4 silnostěnných skleněných centrifugačních zkumavek o objemu 100 ml byl pomocí pasturovy pipety navrstven gradient:
 1. vrstva: 30 ml Sheater 1+2
 2. vrstva: 30 ml Sheater 1+4
 3. vrstva: 15 ml vzorku trusu
3. Zkumavky byly vyváženy a vloženy do centrifugy na dobu 20 minut při 4 °C a 1370 g.
4. Horní zbarvená vrstva (cca 1/3) byla odsáta a zbylý supernatant byl přenesen do nové čisté zkumavky.
5. Zkumavky byly doplněny dH₂O a centrifugovány při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g.
6. Polovina objemu zkumavky byla odsáta a vzorky byly doplněny dH₂O.
7. Vzorky byly opakovaně vloženy do centrifugy po dobu 20 minut při 4 °C a 1370 g.
8. Do čisté zkumavky byly přeneseny sedimenty a následně uchovány při 4 °C v PBS.

Cesium chloridový gradient (Arrowood a Donalson 1996)

Zásobní roztoky:

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

Postup:

1. Po přečištění oocyst na sacharózovém gradientu byly oocysty centrifugovány 10 minut při 1450 g a 4 °C.
2. Vzniklý supernatant byl odebrán a sediment obsahující oocysty byl resuspendován v PBS.
3. Do čisté 2 ml mikrozkušavky bylo napipetováno 1 ml CsCl a navrstveno 0,5 ml roztoku oocyst v PBS.
4. Vzorek byl centrifugován po dobu 3 minut při 16 000 g a při 20 °C.
5. Do čisté 50 ml centrifugační zkumavky byl přepipetován supernatant a vzniklý sediment byl vyhozen.
6. Vzorek byl naředěn dH₂O a při 4 °C byl centrifugován 20 minut při 1370 g.

7. Ze zkumavky byl odsán supernatant na objem 5 ml.
8. Vzorek byl doplněn dH₂O, obsah byl zvortexován a vložen do centrifugy na 20 minut při 20 °C a při 1370 g.
9. K vymytí CsCl byl opakován 3–4× krok č. 8
10. Oocysty byly uchovány při 4 °C v dH₂O.

4.2.3 Barvení oocyst kryptosporidií

Na podložním skle byl proveden tenký nátěr trusu, zafixován pomocí methanolu a protažením plamenem. Vzorky byly obarveny metodou anilin-karbol-methyl-violetí (Miláček a Vítovec 1985), metodou dle Ziehl-Neelsena (Henriksen at Pohlenz 1981) a byla provedena detekce pomocí protilátek.

Barvení oocyst kryptosporidií pomocí anilin-karbol-methyl-violeti dle Miláčka a Vítovce (1985)

Zásobní roztoky:

- Roztok methyl-violeti (methylviolet 0,6 g; anilin 1 ml; fenol 1 g; alkohol 30 ml; deonizovaná voda 70 ml)
- 2% kyselina sírová
- Roztok tartrazinu (1% tartrazin v 1% kyselině octové)

Postup:

1. Tenký nátěr trusu na podložním sklíčku byl fixován methanolem a protažením plamenem.
2. Zchladlý zaschlý nátěr byl barven roztokem methylvioleti 30 minut.
3. Nátěr byl opláchnut pod tekoucí vodou.
4. V 2% kyselině sírové byla provedena diferenciaci po dobu 4 minut.
5. Nátěr byl opláchnut pod tekoucí vodou.
6. Nátěr byl dobarven roztokem tartrazinu po dobu 5 minut.
7. Nátěr byl opláchnut pod tekoucí vodou a následně usušen.
8. Po zaschnutí byl vzorek prohlížen mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Barvení dle Ziehl-Neelsena v modifikaci dle Henriksena a Pohlenze (1981)

Zásobní roztoky:

- Roztok karbolfuchsinu (rozpuštěné fenolové krystaly 2,5 ml; 100% ethanol 5 ml; práškový basický fuchsin 0,5 g, deionizovaná voda 50 ml)
- 1% kyselý alkohol (koncentrovaná kyselina solná 1 ml; 70% ethanol 99 ml)
- 0,8% fast green zeleň (světlá zeleň – prášek light green 0,8 g; deionizovaná voda 100 ml)

Postup:

1. Do roztoku karbolfuchsinu byl vložen zafixovaný vzorek na 2–3 hodiny.
2. Vzorek byl opláchnut pod tekoucí vodou.
3. V 1% kyselém alkoholu bylo provedeno odbarvení, dokud nepřestala z nabarveného vzorku odtékat červená barva.
4. Vzorek byl opláchnut pod tekoucí vodou.
5. Vzorek byl barven světlou zelení po dobu 1 minuty.
6. Vzorek byl opláchnut pod tekoucí vodou a následně usušen.
7. Po zaschnutí byl vzorek prohlížen mikroskopem při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.

Značení oocyst kryptosporidií specifickými protilátkami (FITC)

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

Součásti kitu:

- Crypto Cel Reagent
- Positive Control Slide
- Mounting Fluid

Postup:

1. Pomocí metody cesium chloridového gradientu bylo přečištěno 20 µl vzorku a následně naneseno na podložní sklo.
2. Vzorek byl osušen při laboratorní teplotě.
3. Zaschlý vzorek byl fixován methanolem 5 minut a poté byl opět osušen.
4. Na fixovaný vzorek bylo přidáno 25 µl Crypto Cel Reagent.

5. Vzorek byl ponechán ve vlhké komůrce po dobu 30 minut a inkubován ve tmě při 37 °C.
6. V roztoku PBS byl vzorek opatrně oplachován po dobu 1 minuty.
7. Ke vzorku byla přidána kapka Mounting Fluid a při přiložení krycího skla na vzorek byly odstraněny bubliny.
8. Vzorek byl osušen.
9. Vzorky byly prohlíženy mikroskopem s UV lampou při zvětšení 1000× za použití imerzního oleje.
10. Vzorek byl uchován ve tmě při 2–8 °C po dobu 24 hodin.

4.2.4 Morfometrická analýza oocyst

Morfologie a morfometrie purifikovaných oocyst *Cryptosporidium* avian genotyp III byly zkoumány pomocí diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie (DIC), barvení anilin-karbol-methyl violetí, barvení dle Ziehl-Neelsena (ZN; Henriksen a Pohlenz 1981) a pomocí značení oocyst kryptosporidií specifickými protilátkami (FITC). Pro morfologickou a morfometrickou analýzu byla použita digitální analýza obrazu (Olympus cellSens Entry 2.1, Olympus Corporation, Shinjuku, Tokio, Japonsko) a Olympus Digital Color Camera DP73. U experimentálně infikovaných korel byla délka a šířka oocyst ($n = 100$) měřena pomocí metody diferenciálního interferenčního kontrastu při zvětšení 1000×. Jako kontrola byly použity oocysty *C. baileyi* ($n = 100$) a *C. avium* ($n = 50$) z experimentálně infikovaných kuřat a andulek, měřené pomocí stejného mikroskopu.

4.2.5 Ověření životaschopnosti oocyst

Životaschopnost oocyst byla testována s použitím barvení propidium jodidem (PI) (Sauch a kol. 1991). Mrtvé oocysty při excitaci světlem o vlnové délce 590 nm emitují červenou fluorescenci.

Zásobní roztoky:

- Roztok propidium jodidu (1 mg PI v 1 ml 0,1 M PBS; pH 7,2)

Postup:

1. Ke 100 μ l suspenze přečištěných oocyst bylo přidáno 10 μ l zásobního roztoku PI.
2. Směs byla promíchána a 30 minut barvena ve tmě při laboratorní teplotě.
3. Následně byla centrifugována 3 minuty při 16 000 g, 20 °C.

4. Oocysty byly promyty 2× v dH₂O.
5. Oocysty byly pozorované fluorescenčním mikroskopem s filtrem o vlnové délce 590 nm a zvětšením 1000×.

4.2.6 Design experimentálních infekcí

Od přirozeně infikovaných korel byl odebírán trus, který byl následně přečištěn na cesium chloridovém gradientu přes sítko o velikosti 40 µm. Takto získaná infekční dávka byla podána experimentálním zvířatům. Všechna laboratorní zvířata byla infikována pomocí jícni sondy izolátem *Cryptosporidium* avian genotyp III v dávce 1×10^4 oocyst/zvíře v 200 µl dH₂O. Od všech nainfikovaných zvířat byl odebírán trus do označených mikrozkmavek po dobu 30 dní po infekci. Vzorky byly vyšetřeny mikroskopicky pomocí barvicí metody anilin-karbol-methyl violet'. U vzorků byla dále provedena izolace DNA a následná amplifikace genu SSU. Intenzita infekce byla hlášena jako počet oocyst na gram stolice (OP G) stolice.

4.2.7 Hodnocení intenzity infekce

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

Postup:

1. Podložní sklo bylo zváženo s přesností na 3 desetinná místa.
2. Na předem zváženém skle byl proveden nátěr trusu.
3. Sklo s nátěrem bylo znovu zváženo s přesností na 3 desetinná místa.
4. Byla vypočítána hmotnost nátěru.
5. Byly spočítány oocysty na skle.
6. Byl vypočítán počet oocyst na 1 gram trusu.

4.2.8 Izolace DNA z trusu

Izolace byla provedena pomocí komerčního kitu Exgene Stool DNA mini (GeneAll Biotechnology, Korea).

Součásti kitu:

- FL pufr
- PB pufr
- NW pufr

- EzPass kolona
- Kolona typ G
- 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavky

Postup:

1. Do mikrozkumavky (Safe-Lock-Tube) byl přidán vzorek trusu (200 mg), skleněné (0,5 mm) a zirkonové (1,0 mm) kuličky, 1 ml FL pufu. Následně byl vzorek homogenizován vortexováním a rozbíjen 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s v přístroji FastPrep®24 Instrument (MP Biomedicals).
2. Vzorky byly inkubovány 5 minut při laboratorní teplotě a centrifugovány 5 minut při 16 000 g.
3. Supernatant byl přenesen na EzPass kolonku, centrifugován 1 minutu při 16 000 g.
4. Ze sběrné zkumavky byl vylit odpad a na kolonku bylo napipetováno 100 µl EB pufu. Vzorek byl ponechán inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a následně centrifugován 1 minutu při 16 000 g.
5. Z mikrozkumavky (EzPass) byla vyhozena kolonka a do sběrné zkumavky bylo připipetováno 500 µl PB pufu, pomocí pipety bylo provedeno promíchání a poté byl obsah přenesen na MiniSpin column (zelená kolonka se sběrnou zkumavkou).
6. Zelená kolonka byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g a poté byl odstraněn filtrát ze sběrné zkumavky.
7. Na střed EzPass kolonky bylo napipetováno 500 µl pufu NW a vloženo do centrifugy na 1 minutu při 16 000 g.
8. Sběrné zkumavky byly vyhozeny a zelená kolonka byla přenesena na čistou mikrocentrifugační zkumavku.
9. Na kolonku bylo napipetováno 200 µl EB pufu, ponecháno inkubovat 1 minutu a centrifugováno 1 minutu při 16 000 g.
10. Z mikrozkumavky byla odstraněna kolona a filtrát s vyizolovanou DNA byl skladován v mrazícím boxu při teplotě -20 °C.

4.2.9 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Přítomnost specifické DNA kryptosporidií byla detekována pomocí metody nested PCR amplifikující část genu kódujícího malou podjednotku rRNA (SSU; ~830 bp; Jiang a kol. 2005; Xiao a kol. 1999), aktin (~1066 bp; Sulaiman a kol. 2002) a 70 kDa Heat Shock Protein (HSP70; ~1950 bp; Sulaiman a kol. 2000).

Primární produkt PCR obsahoval z celkových 50 μ l reakčního objemu: 2 μ l templátové DNA, 2,5 U Taq DNA polymerázy (Dream Taq Green DNA Polymerase, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0,5 \times PCR buffer (SSU) nebo 1 \times PCR buffer (aktin a HSP70; Thermofisher Scientific), 6 mM MgCl₂ (SSU) nebo 3 mM MgCl₂ (aktin a HSP70), 200 μ M deoxyribonukleosidu trifosfát, 100 mM každého primeru a 2 μ L bovinního sérového albuminu (BSA; 10 mg ml⁻¹; New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Pro amplifikaci sekundárního PCR produktu bylo složení reakční směsi podobné jako pro primární PCR s tím rozdílem, že zde byly použity 2 μ l primárního produktu PCR, koncentrace MgCl₂ byla 3 mM a nebylo přidáno BSA. Jako negativní kontrola byla použita PCR voda a jako pozitivní kontrola byla použita DNA *C. parvum*.

4.2.10 Gelová elektroforéza

Výsledný sekundární PCR produkt byl detekován na 1% agarózovém gelu s přídavkem ethidium-bromidu (EtBr) a vizualizován pomocí UV záření (302 nm) transiluminátorem (Ultra-Lum Inc, USA) a dokumentován (High Performance UV Transilluminator, Biotech, Česká republika).

Zásobní roztoky:

- 50 \times TAE pufr (Tris báze 242 g; ledová kyselina octová 47,1 ml; 0,5 M EDTA 100 ml; pH 8,00)
- Agarosa (Biotech, Česká republika)
- Ethidium bromid (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 100 bp DNA Ladder (Fermentas International Inc., Kanada)

Postup:

1. Do forem byly připraveny hřebeny.
2. Byl připraven 1% agarózový gel, v baňce byla smíchána agaróza s TAE pufrům, a poté vložena do mikrovlnné trouby.

3. Baňka byla ochlazena pod studenou tekoucí vodou na teplotu přibližně 50 °C.
4. Do tekutého gelu v baňce byly napipetovány 2 µl ethidium bromidu.
5. Roztok byl v baňce promíchán a nalit do forem, kde byl ponechán ztuhnout.
6. Po ztuhnutí byly hřebeny vyndány a gel vložen do elektroforetické vany s TAE pufrem.
7. Do první jamky v gelu bylo napipetováno 10 µl ladderu, do dalších 20 µl naamplifikovaného produktu sekundární PCR.
8. Elektroforéza byla spuštěna při napětí 90 V na dobu potřebnou pro separaci fragmentu DNA (cca 50 minut).
9. Výsledek elektroforézy byl vizualizovaný pomocí UV transiluminátoru a byl pořízen snímek výsledného gelu.

4.2.11 Izolace z gelu

Fragmenty DNA po elektroforetické separaci vhodné k osekvenování byly vyizolovány pomocí kitu Gen Elute (Sigma) podle doporučení výrobce.

Součásti kitu:

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

Postup:

1. Fragment DNA byl vyříznut z gelu čistým skalpelem a dán do připravené eppendorfky.
2. Do eppendorfky s fragmentem gelu bylo přidáno 500 µl Gel Solubilization Solution.
3. Eppendorfka byla ponechána v inkubátoru po dobu 10 minut při 50 °C a každé 2–3 minuty byla provedena kontrola s promícháním gelu.
4. PCR voda na eluci byla vložena do inkubátoru na teplotu 65 °C.
5. Na již sestavenou kolonu (Binding Column G) bylo napipetováno 500 µl Column Preparation Solution a kolona byla vložena do centrifugy na 1 minutu při 16 000 g.
6. Ke vzniklému žlutému roztoku bylo připipetováno 150 µl isopropanolu a promícháno.

7. Na kolonu byl přenesen veškerý objem vzorku pomocí pipety a kolona byla centrifugována po dobu 1 minuty při 16 000 g.
8. Ze sběrné zkumavky byl vylit odpad a zkumavka byla opět použita s kolonou.
9. Na kolonu bylo připipetováno 700 µl Wash Solution G a centrifugováno po dobu 1 minuty při 16 000 g.
10. Ze sběrné zkumavky byl vylit odpad a zkumavka byla opět použita s kolonou.
11. Kolona byla centrifugována 1 minutu při 16 000 g bez jakýchkoli přísadků roztoků.
12. V centrifuze byla kolona otočena o 180 ° a znovu centrifugována 3 minuty při 16 000 g.
13. Do 1,5 ml eppendorfky byla vložena kolona a provedena eluce napipetováním 30 µl PCR vody předehřáté na 65 °C přímo na střed kolony.
14. Eppendorfka byla inkubována 1 minutu při laboratorní teplotě a poté centrifugována 1 minutu při 16 000 g.

4.2.12 Sekvenování

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit a sekvenátoru ABI123130 za použití sekundárních primerů.

4.2.13 Fylogenetické analýzy

Analýza nukleotidových sekvencí byla v této studii získána pomocí programu Chromas Pro v 2.4.1 (Technelysium, Pty Ltd, Jižní Brisbane, Austrálie). Získané sekvence byly porovnány se sekvencemi uloženými v GenBank. Sekvence byly porovnány pomocí MAFFT verze 7 s automatickým srovnávacím výběrem (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Nejvhodnější fylogenetický model byl vybrán v programu MEGA 7.

Metodou Maximum likelihood (ML) byly vypočteny fylogenetické vztahy mezi jednotlivými druhy a genotypy kryptosporidií. Bootstrapový konsenzus výsledného stromu byl získán na základě 1 000 opakování. Fylogramy byly vytvořeny pomocí programu MEGA7 a byly ručně upraveny pomocí CorelDrawX7. Sekvence SSU, aktinu a HSP70 získané v této studii byly uloženy v GenBank pod přístupovými čísly MK311133–MK311180.

4.2.14 Histologické vyšetření

Po usmrcení experimentálních zvířat (20 DPI) infikovaných izolátem *Cryptosporidium* avian genotyp III jim byly odebrány vzorky vnitřních orgánů (jícen, ventrikulus, proventrikulus, tenké a tlusté střevo). Na každý orgán byla použita nová sada pitevních nástrojů, aby nedošlo ke kontaminaci jednotlivých vzorků. Vzorky byly fixovány ve 4% roztoku formaldehydu. Zhotovené řezy (5 µm) byly zpracovány parafínovou metodou a tkáň nabarveny hematoxylin-eosinem, metodou PAS a Wolbachovou modifikací Giemsova barvení.

Zásobní roztoky:

- I. vzestupná alkoholová odvodňovací řada (70% alkohol; 80% alkohol; 96% alkohol; aceton; xylen 2×)
- Parafínová řada (4 následné roztoky parafínu, 1:3, 1:1, 3:1, 100% parafín)
- Alkoholová sestupná řada, odparafínovací řada (xylen; alkohol 96%, alkohol 80%; alkohol 70%, deionizovaná voda)
- II. Vzestupná zavodňovací řada (70% alkohol; 80% alkohol; 96% alkohol; karboxylen; xylen)
- Kanadský balzám

Postup:

1. U vzorku bylo provedeno odvodňování I. vzestupnou alkoholovou řadou a po 60 minutách byl vyměněn roztok.
2. V xylenu byly vzorky ponechány 90 minut.
3. Vzorky byly prosyceny parafínem (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. Po zalití vzorků čistým tekutým parafínem byly vytvořeny malé bločky.
5. Pomocí mikrotomu byly nakrájeny 5 µm histologické řezy a ty přeneseny na podložní skla, kde byly ponechány 24 hodin na plotně o teplotě 42 °C.
6. Řezy byly odparafínovány v xylenu a sestupnou alkoholovou řadou vždy po 5 minutách.
7. Vzorky byly barveny příslušným barvením a poté pokračovalo odvodňování II. alkoholovou vzestupnou řadou vždy po 5 minutách.
8. Preparáty byly zality do kanadského balzámu a usušeny při teplotě 42 °C.
9. Vzorky byly prohlíženy mikroskopem (Olympus IX70) s vhodným zvětšením.

Barvení hematoxylin-eosin

Zásobní roztoky:

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

Postup:

1. Vzorky byly vloženy na 10 minut do hematoxylinu.
2. Vzorky byly oplachovány 10 minut pod tekoucí vodou.
3. Vzorky byly barveny 5 minut v eosinu.

Barvení dle Wolbacha

Zásobní roztoky:

- Roztok Giemsa (zásobní roztok – 4 ml kalafuny do 100 ml 96% ethanolu; pracovní roztok – 1 ml zásobního roztoku do 100 ml 96% ethanolu)
- Roztok kalafuny (zásobní roztok – 10 g kalafuny do 100 ml 96% ethanolu; pracovní roztok – 1 ml zásobního roztoku do 100 ml 96% ethanolu)

Postup:

1. Vzorky byly barveny roztokem Giemsa přes noc.
2. Vzorky byly opláchnuty deionizovanou vodou.
3. Vzorky byly opláchnuty 96% ethanolem.
4. Vzorky byly ponořeny do pracovního diferenciálního roztoku kalafuny na několik sekund.
5. Vzorky byly opláchnuty 96% ethanolem a poté pokračovalo odvodňování II. alkoholovou vzestupnou řadou.

Barvení PAS

Zásobní roztoky:

- Schiffovo reagens (H₂O 100 ml; basický fuchsin 1 g; 1N kyselina chlorovodíková 10 ml; pyrosiřičitan draselný 1g; aktivní uhlí 0,5 g)
- Siřičitá voda (1N kyselina chlorovodíková 5 ml; pyrosiřičitan draselný 0,5 g; dH₂O 100 ml)

Postup:

1. Bylo provedeno odparafinování řezů.
2. Řezy byly vloženy na 10 minut do roztoku kyseliny jodisté (0,8 g do 100 ml dH₂O).
3. Řezy byly opláchnuty pod tekoucí vodou po dobu 10 minut.
4. Vzorky byly na 30 minut vloženy do Schiffova reagens.
5. Vzorky byly ponořovány na 5 minut ve 2 láních sířičité vody a poté oplachovány 15 min pod tekoucí vodou.
6. Řezy byly na 1–2 minuty ponořeny do hematoxylinu.
7. Řezy byly opláchnuty v 96% alkoholu, butylalkoholu a xylenu.

4.2.15 Příprava preparátů pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM)**Zásobní roztoky:**

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

Postup:

1. Vzorky střevní sliznice byly fixovány přes noc při 4 °C v 2,5% glutaraldehydu ve fosfátovém pufru.
2. Vzorky byly promyty ve fosfátovém pufru 3×15 minut.
3. Po dobu 2 hodin byly vzorky fixovány ve 2% oxidu osmičelém ve fosfátovém pufru.
4. Vzorky byly promyty 3×15 minut ve fosfátovém pufru.
5. U vzorků byla provedena dehydratace vzestupnou acetonovou řadou pomocí metody kritického bodu (CPD). V tlakové komoře byly vzorky, pomocí kapalného CO₂ vysušeny.
6. Vysušené vzorky byly pomocí oboustranné lepicí pásky nalepeny na hliníkový terčík a poté pozlaceny.
7. Nalepené vzorky byly prohlíženy pomocí elektronového mikroskopu JOEL JSM-7401F-FE SEM

4.2.16 Statistické analýzy

Hypotéza testovaná v analýze morfometrie oocyst byla taková, že dvourozměrné střední vektory měření jsou stejné ve dvou srovnávaných populacích. K testování nulové hypotézy byl použit test T2 Hotelling. Všechny analýzy byly provedeny v programu R 3.5.0. (<https://www.r-project.org/>).

5 Výsledky

5.1 Výskyt a diverzita kryptosporidií u papoušků

Celkem bylo vyšetřeno 402 vzorků trusu pocházejících od ptáků řádu papoušci. Přítomnost specifické DNA kryptosporidií byla pomocí PCR prokázána celkem ve 27 (6,7 %) vzorcích. Pomocí mikroskopického vyšetření vzorků trusu barvených anilin-karbol-methyl violetí byly oocysty kryptosporidií detekovány pouze ve 13 (3,2 %) vzorcích trusu. Všechny mikroskopicky pozitivní vzorky byly také molekulárně pozitivní.

Z celkového počtu 27 pozitivních vzorků trusu jednotlivých ptáků jsme úspěšně získali 27 částečných sekvencí SSU, aktinu a HSP70 genu specifických pro rod *Cryptosporidium* (tabulka 2). Fylogenetické analýzy založené na sekvenci SSU získaných v této práci a sekvencích uložených v GenBank prokázaly přítomnost 2 druhů, *C. avium* a *C. baileyi*, a jednoho genotypu *Cryptosporidium* avian genotyp III, ve vyšetřovaných vzorcích (Obrázek 1–3). Následné analýzy sekvencí genů pro aktin a HSP70 ukázaly shodné výsledky s analýzami (SSU) (tabulka 2). Zatímco *C. avium* bylo detekováno pouze u jednoho papouška z chovu CZE/3, *Cryptosporidium baileyi* bylo detekováno u čtyř papoušků pocházejících za tři různých chovů CZE/1, CZE/5, CZE/7. V této studii byla však dominantní kryptosporidií *Cryptosporidium* avian genotyp III. Tato kryptosporidie byla nalezena v 8 chovech papoušků CZE/1, CZE/2, CZE/3, CZE/5, CZE/6, CZE/7, CZE/8; SK/2.

Z celkového počtu 4 ptáků pozitivních na *C. baileyi*, pouze 1 (25 %) vylučoval oocysty detekované mikroskopicky s intenzitou infekce méně než 2 000 OPG. Z 23 ptáků pozitivních pro *Cryptosporidium* avian genotyp III, 11 (48 %) vykazovalo mikroskopicky detekovatelné oocysty s intenzitou infekce v rozmezí od 2000 do 30 000 OPG.

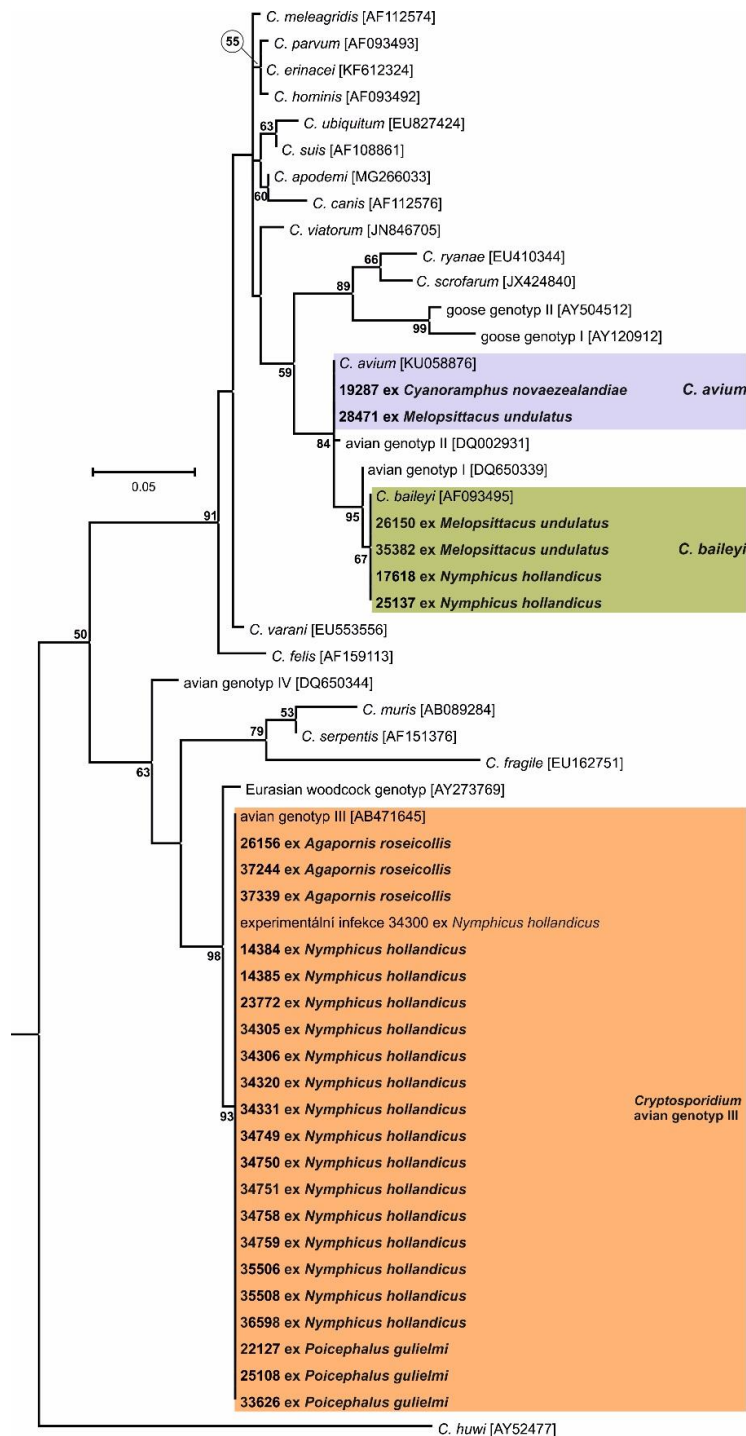
Přítomnost oocyst *Cryptosporidium* avian genotyp III byla prokázána u 15 korel chocholatých, 3 papoušků konžských, 3 agapornisů různohrdlých a u andulky vlnkované, z nichž 12 korel chocholatých vykazovalo intenzitu infekce v rozmezí 2 000 do 30 000 OPG a agapornis různohrdlý vylučoval oocysty v intenzitě menší než 4 000 OPG (tabulka 2).

U žádného z přirozeně infikovaného papouška nebyly v době odběru trusu pozorovány klinické příznaky kryptosporidiózy, ani nebyly hlášeny žádné klinické změny chovatelem. Žádný z monitorovaných ptáků neměl v době sledování průjem.

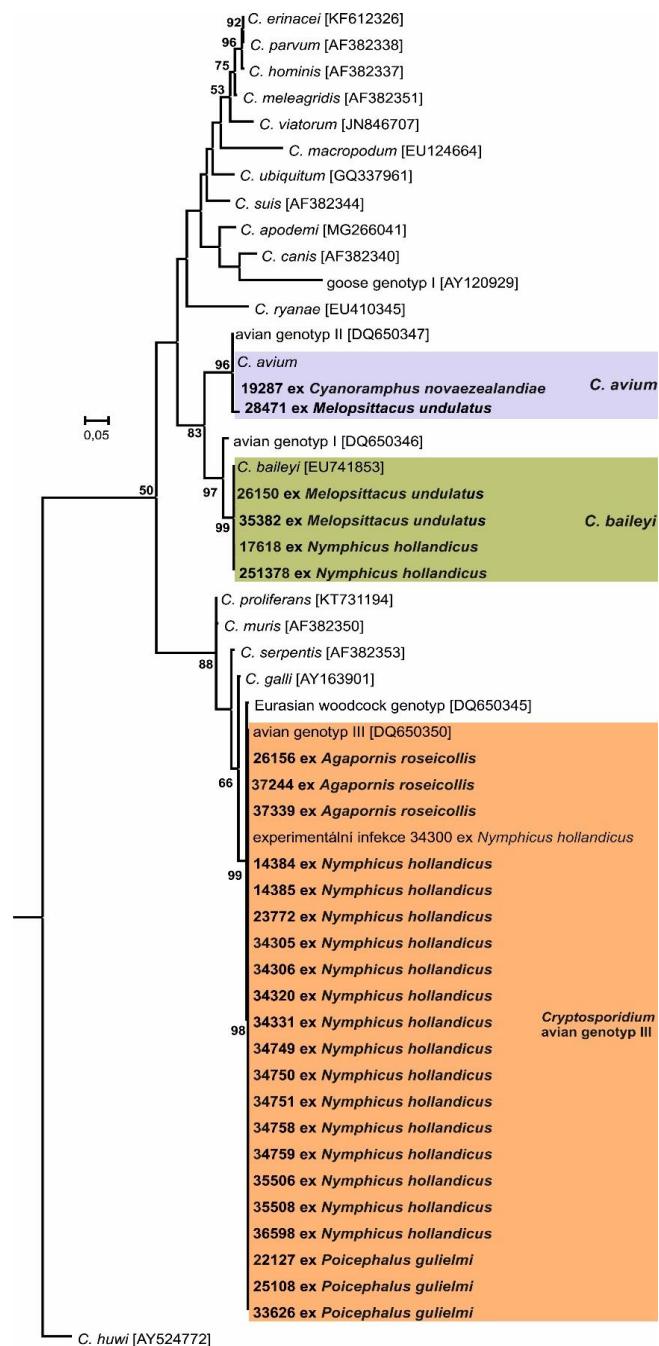
Tabulka 2. Druhy a genotypy kryptosporidií zjištěné v této studii vycházely z amplifikace ribozomální rRNA (SSU), aktinu 70 kDa HSP70 a mikroskopického vyšetření u ptáků z řádu papoušků (Psittaciformes) z České republiky (CZE) a ze Slovenska (SVK). Intenzita infekce *Cryptosporidium* spp. je vyjádřena jako počet oocyst na gram stolice (OPG).

Hostitel (vědecké jméno)	Počet vyšetřených/ pozitivních	ID pozitivních zvířat	Země/číslo chovu	Mikroskopicky pozitivní (OPG)	Genotypizace <i>Cryptosporidium</i> spp.	
					SSU, AKTIN	HSP70
Andulka vlnkovaná (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	8/1	28471	CZE/3	Ne	Avian III	Avian III
	9/1	26150	CZE/1	Ne	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
	7/1	35382	CZE/5	Ne	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
		34758		Ano (2 000)	Avian III	Avian III
	18/3	23772	CZE/1	Ne	Avian III	Avian III
		25137		Ano (2 000)	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
	6/1	35508	CZE/2	Ne	Avian III	Avian III
		34306		Ne	Avian III	Avian III
	10/2	34320	CZE/5	Ano (30 000)	Avian III	Avian III
		34759		Ano (2 000)	Avian III	Avian III
Korela chocholatá (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	6/2	35506	CZE/6	Ano (16 000)	Avian III	Avian III
		14384		Ano (2 000)	Avian III	Avian III
	14/3	14385	CZE/7	Ano (6 000)	Avian III	Avian III
		17618		Ne	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
		34751		Ano (8 000)	Avian III	Avian III
	25/4	34331	CZE/8	Ano (6 000)	Avian III	Avian III
		34749		Ne	Avian III	Avian III
		34750		Ano (4 000)	Avian III	Avian III
20/2	34305	SVK/2	Ano (24 000)	Avian III	Avian III	
	36598		Ano (8 000)	Avian III	Avian III	
Kakariki rudočelý (<i>Cyanoramphus novaeseelandiae</i>)	4/1	19287	CZE/3	Ne	<i>C. avium</i>	<i>C. avium</i>
Papoušek konžský (<i>Poicephalus gularis</i>)		22127		Ne	Avian III	Avian III
	27/3	33626	CZE/8	Ne	Avian III	Avian III
		25108		Ne	Avian III	Avian III
Agapornis růžohrdlý (<i>Agapornis roseicollis</i>)	6/1	26156	CZE/1	Ne	Avian III	Avian III
	4/1	37339	CZE/7	Ano (4 000)	Avian III	Avian III
	6/1	37244	SVK/2	No	Avian III	Avian III

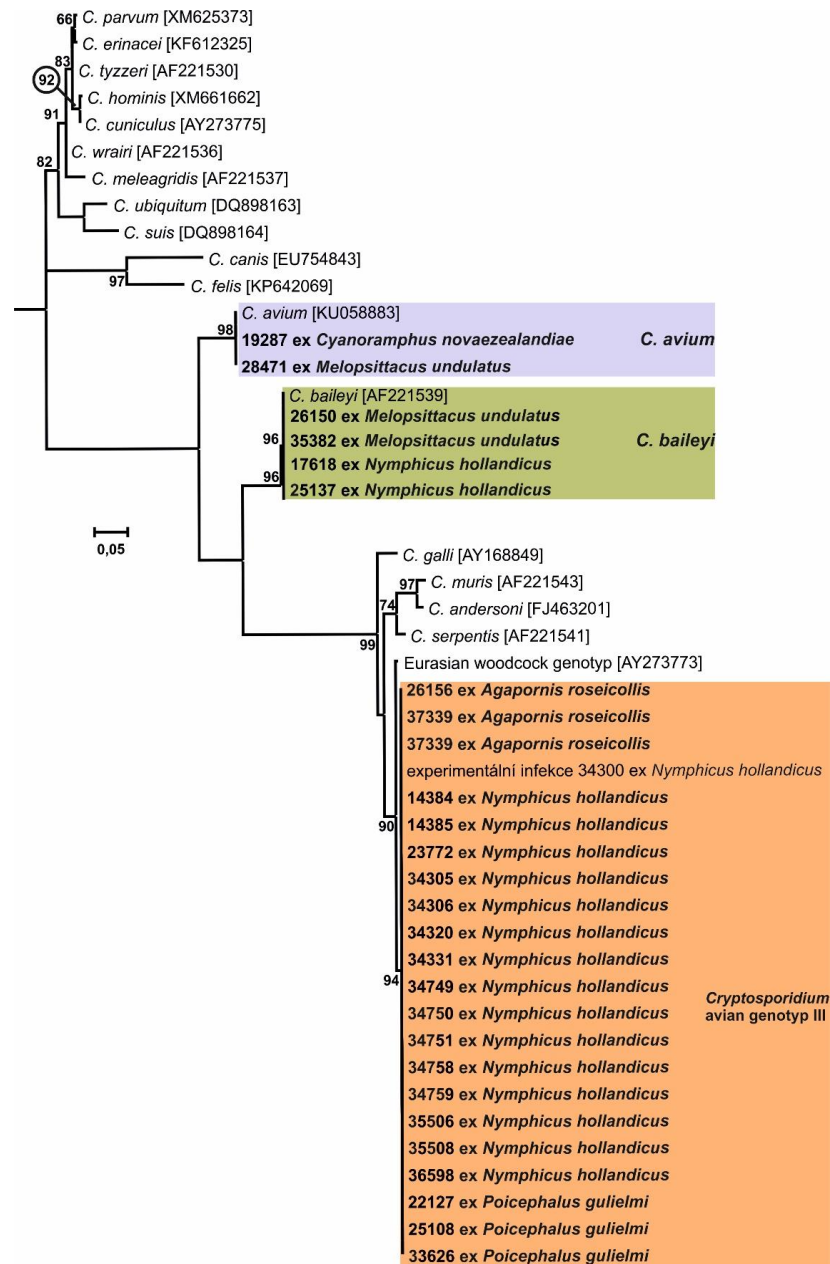
Obrázek 1. Fylogenetický strom ukazující vztahy mezi izoláty kryptosporidií získaných v této bakalářské práci (zvýrazněno) a dalšími druhy rodu *Cryptosporidium* zkonstruovaný na základě částečných sekvencí genu kódujícího malou podjednotku rRNA metodou maximální pravděpodobnosti (ML) a Tamura 3-parametrovým modelem v programu MEGA 7. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapů ML vyšší než 50 %. Měřítko délky větví je uvedeno u stromu. Jako outgroup byla použita sekvence *Plasmodium falciparum* [JQ627151].



Obrázek 2. Fylogenetický strom ukazující vztahy mezi izoláty kryptosporidií, získaných v této bakalářské práci (zvýrazněno), a dalšími druhy rodu *Cryptosporidium* zkonstruovaný na základě částečných sekvencí genu kódujícího aktin metodou maximální pravděpodobnosti (ML) a general time reversible modelem v programu MEGA 7. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapů ML vyšší než 50 %. Měřítko délky větví je uvedeno u stromu. Jako outgroup byla použita sekvence *Plasmodium falciparum* [M22719].



Obrázek 3. Fylogenetický strom ukazující vztahy mezi izoláty kryptosporidií, získaných v této bakalářské práci (zvýrazněno), a dalšími druhy rodu *Cryptosporidium* zkonstruovaný na základě částečných sekvencí genu kódujícího 70 kDa Heat Shock Protein metodou maximální pravděpodobnosti (ML) a Tamura 3-parametrovým modelem v programu MEGA 7. Čísla u jednotlivých uzlů udávají hodnotu bootstrapů ML vyšší než 50 %. Měřítko délky větví je uvedeno u stromu. Jako outgroup byla použita sekvence *Plasmodium falciparum* [NC 004328.2].

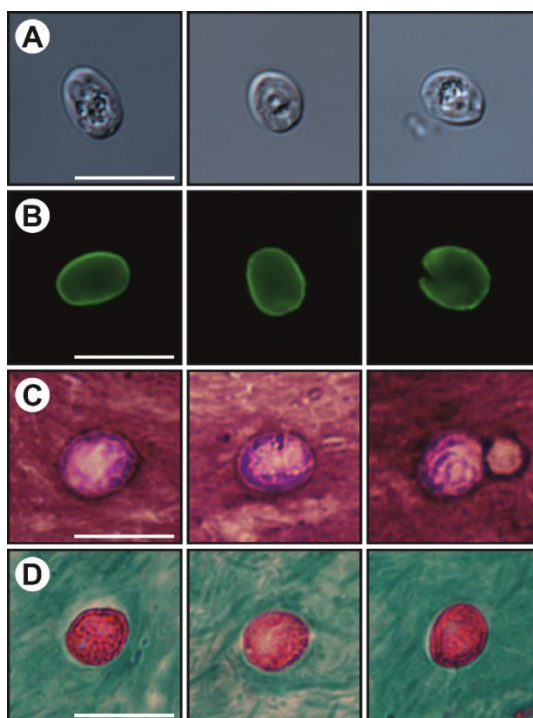


5.2 Biologické vlastnosti *Cryptosporidium avian* genotyp III

5.2.1 Morfometrie oocyst

Oocysty *Cryptosporidium avian* genotyp III jsou u hostitele vylučovány zcela vysporulované a obsahují 4 sporozoity a reziduální tělísko. Oocysty, *Cryptosporidium avian* genotyp III vyloučené přirozeně infikovanou korelou, měřily 6,70–8,40 μm ($\bar{x} \pm SD = 7,35 \pm 0,41 \mu\text{m}$) \times 5,10–6,3 μm ($\bar{x} \pm SD = 5,70 \pm 0,32 \mu\text{m}$) s poměrem mezi délkou a šířkou 1,08–1,41 ($\bar{x} \pm SD = 1,23 \pm 0,11$) a byly morfometricky shodné s oocystami získanými z experimentálně infikovaných korel, které měřily 6,60–8,40 μm ($\bar{x} \pm SD = 7,37 \pm 0,44 \mu\text{m}$) \times 5,00–6,40 μm ($\bar{x} \pm SD = 5,80 \pm 0,35 \mu\text{m}$) s poměrem mezi délkou a šířkou 1,06–1,43 ($\bar{x} \pm SD = 1,25 \pm 0,10$) (Obrázek 4). Oocysty *Cryptosporidium avian* genotyp III jsou větší než oocysty *C. avium* a *C. baileyi* ($P < 0,001$) a nepatrně menší než oocysty *C. galli*. Morfologie a morfometrie jiných vývojových stádií není známa.

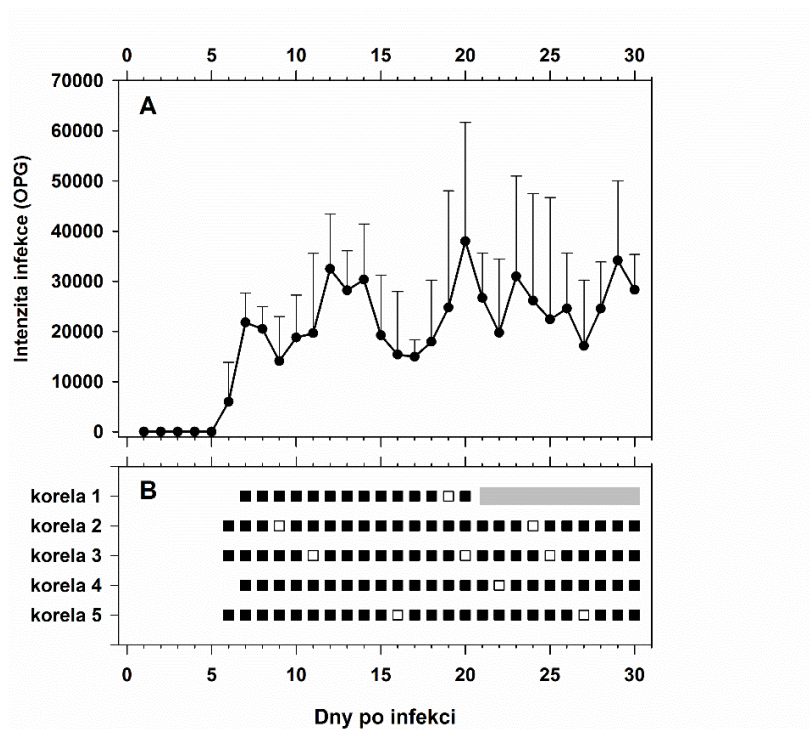
Obrázek 4. Oocysty *Cryptosporidium avian* genotyp III zobrazené různými barvicími technikami: (A) diferenciální interferenční kontrast; (B) anti-*Cryptosporidium* FITC-konjugované protilátky; (C) barvení anilin-karbol-methyl violetí; (D) barvení dle Ziehl-Neelsena. Měřítko 10 μm .



5.2.2 Průběh a intenzita infekce

Přirozeně infikované korely (č. 34305, 34320, 34751 a 35506) byly zdrojem oocyst *Cryptosporidium* avian genotyp III používaných při pokusných infekcích (tabulka 2). Vylučovaly oocysty po dobu delší než pět měsíců. Oocysty, u kterých byla provedena metoda barvení pomocí propidium iodidu (PI), měly více než 90 % životaschopnosti. Na základě mikroskopického, histologického a molekulárního vyšetření gastrointestinálního traktu bylo zjištěno, že SCID myši, andulky vlnkované a kuřata nejsou vnímavý k infekci *Cryptosporidium* avian genotyp III. Oocysty *Cryptosporidium* avian genotyp III byly infekční pouze pro korely, u kterých byly oocysty a specifická DNA poprvé detekovány v šesti dnech po infekci (DPI). Po dobu trvání experimentu byla u všech zvířat prokázána přítomnost specifické DNA *Cryptosporidium* avian genotyp III v trusu (obrázek 5). Oproti tomu přítomnost oocyst v trusu pomocí mikroskopického vyšetření byla intermitentní. Prepatentní perioda u korely chocholaté byla 6 dnů (obrázek 5). Patentní perioda u experimentálně infikovaných korel byla nejméně 30 DPI, u přirozeně infikovaných korel více než 5 měsíců. Nejvyšší intenzita infekce byla zaznamenána 20 DPI, a to s hodnotou 60 000 OPG.

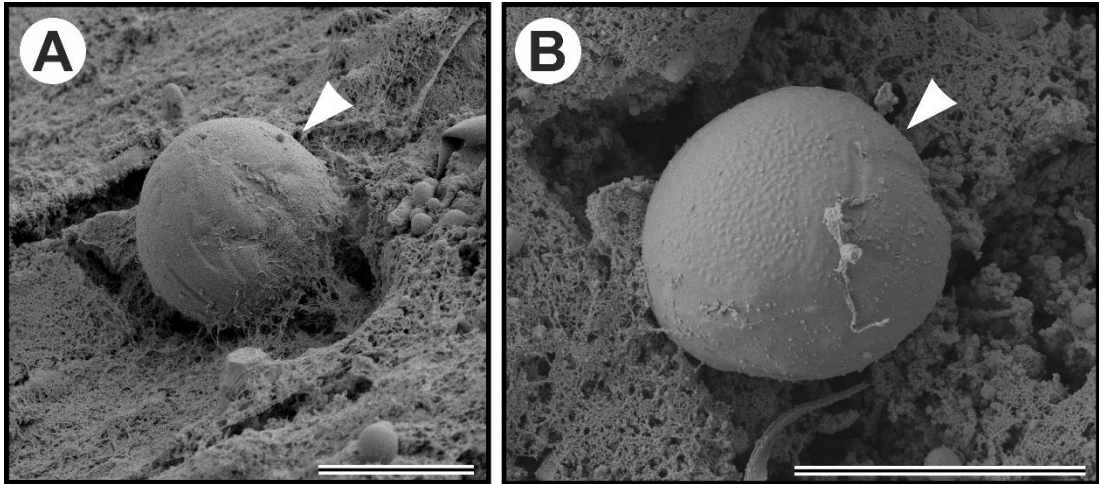
Obrázek 5. Průběh infekce *Cryptosporidium* avian genotyp III u korel chocholatých (*Nymphicus hollandicus*). **A)** Intenzita infekce je vyjádřena jako počet oocyst na gram stolice (OPG) **B)** každodenní sbírání trusu založené na mikroskopickém a molekulárním vyšetření; každý čtverec označuje detekci specifické DNA, černý čtverec označuje mikroskopickou detekci oocyst a šedý obdélník označuje usmrcení a pitvu.



5.2.3 Klinické příznaky

V průběhu experimentu nebyly pozorovány žádné příznaky kryptosporidiové infekce u žádné z korel. Taktéž nebyly u zvířete pitvaného 20 DPI pozorovány žádné makroskopické změny na vnitřních orgánech. Vývojová stadia *Cryptosporidium* avian genotyp III nebyla detekována pomocí histologických metod. Vyšetření pomocí elektronové skenovací mikroskopie prokázalo přítomnost vývojových stádií v proventrikulu a ventrikulu (obrázek 6). Histopatologické změny v souvislosti s infekcí *Cryptosporidium* avian genotyp III nebyly pozorovány.

Obrázek 6. Přítomnost vývojových stádií *Cryptosporidium* avian genotyp III (hrot šipky) v **A)** proventikulu a **B)** ventrikulu u experimentálně infikované korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) detekované elektronovým skenovacím mikroskopem. Měřítko 10 μ m.



6 Diskuze

Druhy a genotypy kryptosporidií infikují širokou škálu ptačích druhů (Ryan 2010). Obdobně jako u savčích kryptosporidií, také v rámci ptačích druhů a genotypů kryptosporidií byla zaznamenána variabilita v hostitelské specifitě (Nakamura a Meireles 2015). Zatímco druhy *C. meleagridis*, *C. galli* a *C. baileyi* mají nízkou hostitelskou specifitu a infikují velké množství druhů ptáků napříč několika ptačími řády, například druh *C. avium* a většina ptačích genotypů, včetně studovaného *Cryptosporidium* avian genotyp III, vykazují úzkou hostitelskou specifitu (Holubová a kol. 2016; Nakamura a Meireles 2015).

Cryptosporidium avian genotyp III byl popsán u méně než 30 různých druhů ptáků patřících do řádu papoušci, pěvci, šplhavci a vrubozobí. Nicméně tento genotyp byl nejčastěji detekován právě u papoušků (Cano a kol. 2016; Ferrari a kol. 2018; Koompapong a kol. 2014; Li a kol. 2015; Ravich a kol. 2014). Papoušci jsou vyjma *Cryptosporidium* avian genotyp III dále parazitováni i dalšími druhy a genotypy kryptosporidií (Abe a Makino 2010; Ferrari a kol. 2018; Nakamura a Meireles 2015; Qi a kol. 2011).

V souladu s výsledky Ng a kol. (2006), Ferrari a kol. (2018) jsme prokázali, že *Cryptosporidium* avian genotyp III byl dominantní kryptosporidií parazitující u v zajetí chovaných papoušků sledovaných v této práci (22 z 27 pozitivních). Naopak Abe a Makino (2010), Nakamura a kol. (2009), Nakamura a kol. (2014) uvádějí, že výskyt *Cryptosporidium* avian genotyp III u papoušků je stejný jako výskyt ostatních druhů kryptosporidií: *C. meleagridis*, *C. baileyi* a *C. galli*. V naší provedené studii bylo *C. baileyi* detekováno jako druhá nejčastější kryptosporidie u papoušků. Ve shodě s publikovanými údaji jsme detekovali nízký výskyt druhu *C. avium*, který je považován za hostitelsky specifický pro papoušky (Abe a Makino 2010; Curtiss a kol. 2015; Holubová a kol. 2016; Nakamura a kol. 2014; Qi a kol. 2011; Zhang a kol. 2015). Na rozdíl od prací Abe a Makino (2010), Ferrari a kol. (2018) Nakamura a kol. (2014) Ng a kol. (2006) jsme v naší studii nedetekovali další druhy (*C. canis*, *C. galli*, *C. meleagridis* a *C. parvum*) a genotypy (avian genotyp II) kryptosporidií, které byly v minulosti u papoušků nalezeny.

V této práci jsme potvrdili, že *Cryptosporidium* avian genotyp III je parazit, který primárně parazituje u zástupců řádu papoušci. Dále jsme identifikovali

papouška konžského a agapornise růžohrdlého jako nové hostitele *Cryptosporidium* avian genotyp III, což opět svědčí o adaptaci této kryptosporidie na zástupce řádu papoušci.

Kryptosporidie mohou způsobovat průjmová onemocnění a ohrozit zdraví a život hostitele (Cheun a kol. 2010; Khan a kol. 2017; Tzipori a kol. 1981a,b,c; Vinayak a kol. 2016), nicméně infekce všech druhů a genotypů kryptosporidií je spojována s klinickými příznaky onemocnění (Čondlová a kol. 2018; Holubová a kol. 2016; Horčíčková a kol. 2018; Ježková a kol. 2016; Kváč a kol. 2013). Kryptosporidióza se u ptáků projevuje v různých klinických formách v závislosti na druhu kryptosporidie a na místě infekce (Nakamura a Meireles 2015). Navzdory poměrně velkému počtu studií a popisů několika genotypů *Cryptosporidium* spp., jsou znalosti o průběhu kryptosporidiových infekcí u ptáků omezené (Nakamura a Meireles 2015).

Nejlépe prostudovaný druh kryptosporidie u ptáků je *C. galli* infikující proventrikulus svých hostitelů (Antunes 2008; Blagburn a kol. 1990; Pavlásek 1999; Ryan a kol. 2003b). Na rozdíl od žaludečních kryptosporidií, které infikují savce a nezpůsobují morbiditu a mortalitu, je *C. galli* spojen s klinickým onemocněním a vysokou mortalitou u ptáků (Blagburn a kol. 1987; Blagburn a kol. 1990; Morgan a kol. 2001; Pavlásek 1999, 2001). Přestože, v souladu s prací Ng a kol. (2006), jsme v této práci potvrdili, že *Cryptosporidium* avian genotyp III nezpůsobuje žádné klinické onemocnění či úmrtnost u přirozeně nebo experimentálně infikovaných ptáků, Ravich a kol. (2014) popsali kryptosporidiózu u 31 ptáků s lokalizací infekce v proventrikulu a ventrikulu. Navíc popsali, že kryptosporidie byly s největší pravděpodobností příčinou úmrtí 10 z těchto ptáků. Na druhou stranu Ravich a kol. (2014) identifikovali *Cryptosporidium* avian genotyp III pouze u dvou ptáků, u kterých byla provedena genotypizace, ale z práce není zcela jasné, zda tito ptáci patřili mezi těch 10 ptáků, kteří uhynuli na kryptosporidiózu. Příčina smrti těchto ptáků mohla být zapříčiněna i jinými druhy kryptosporidií. Makino a kol. (2010) popsal u přirozeně infikovaných agapornisů růžohrdlých klinické změny (původce kryptosporidiové infekce byl určen). U 20 z 37 ptáků se objevily gastrointestinální příznaky onemocnění, jako je chronické zvracení, meléna a úbytek hmotnosti. Radiografické vyšetření následně ukázalo rozšířený isthmus a zesílení proventrikulárních stěn u 16 z 20 symptomatických ptáků. Nekropsie

a histopatologické vyšetření u tří mrtvých ptáků ukázalo zvětšení proventrikulu a isthmu s hypertrofií sliznice pozorovanou v sagitální rovině. U všech tří postižených ptáků byla charakteristická nápadná ztráta hmotnosti se silně atrofovanými hrudními svaly. Histopatologicky byla pozorována rozsáhlá hyperplazie duktálního epitelu proventrikulárních žláz. Histopatologické změny popsané Makino a kol. (2010) jsou podobné těm, které uvedli Blagburn a kol. (1990) a Morgan a kol. (2001) u australské amadiny diamantové (*Stagonopleura guttata*) infikované *C. galli*. Na rozdíl od těchto studií nebyly u námi experimentálně infikovaných ptáků *Cryptosporidium* avian genotypem III zjištěny žádné histopatologické změny. Tento rozdíl lze však vysvětlit i délkou probíhající infekce. Zatímco naše experimenty trvaly po omezenou dobu 30 dnů, přirozeně infikovaní ptáci mohli být infikováni i několik měsíců.

Průběh infekce, včetně prepatentní a patentní periody je v současné době znám pouze u čtyř platných ptačích druhů (Current a kol. 1986; Holubová a kol. 2016; Ryan a kol. 2003b; Slavin 1955). Délka prepatentní periody *Cryptosporidium* avian genotyp III (6 DPI) byla podobná druhům *C. meleagridis* a *C. baileyi*, které infikují střevo (4–8 dnů; Hornok a kol. 1999; Lindsay a kol. 1988; Rhee a kol. 1991; Tůmová a kol. 2002), a zároveň mnohem kratší než 25 dnů, kterou popsal Pavlásek (2001) u kuřat infikovaných *C. galli*.

Oocysty *Cryptosporidium* avian genotyp III jsou morfometricky identické s těmi, které popsali ve své studii Ng a kol. (2006). Ačkoliv jsou menší než u *C. galli* (Ryan a kol. 2003b) a *Cryptosporidium* woodcock genotyp (Ryan a kol. 2003a), rozdíl je zanedbatelný a není prakticky použitelný pro diferenciaci druhů při mikroskopickém vyšetření (Horčíčková a kol. 2018). Pomocí fylogenetických analýz provedených v této práci jsme prokázali, že *Cryptosporidium* avian genotyp III je geneticky odlišný od platných druhů rodu *Cryptosporidium*. *Cryptosporidium* avian genotyp III sdílí 98,4% a 94,5% sekvenční identitu s *Cryptosporidium* woodcock genotypem a s *C. galli* na SSU lokusu. Na lokus kódující aktin je sekvenční shoda s *Cryptosporidium* woodcock genotypem 98,9 % a s *C. galli* 96,9 %. Například pro srovnání, sekvenční shoda SSU mezi *C. muris* a *C. andersoni* je 99,3 % a mezi *C. tyzzeri* a *C. parvum* je 99,4 %. Tatáž shoda mezi *C. muris* a *C. andersoni* je 96,6 % nebo mezi *C. tyzzeri* a *C. parvum* v sekvenci genu kódující aktin je 98,7 % (Ježková a kol. 2016).

Výsledky morfometrických, genetických a biologických analýz provedených v této práci prokázaly, že *Cryptosporidium* avian genotyp III je odlišný od ostatních druhů rodu *Cryptosporidium*. Na základě těchto zjištění a v souladu s kritérii Mezinárodního kódu zoologické nomenklatury a s minimálními požadavky pro popis druhu v rámci rodu *Cryptosporidium* (Egyed a kol. 2003; Jirků a kol. 2008; Xiao a kol. 2004) jsme navrhli uznat tuto kryptosporidii jako samostatný druh a pojmenovat ho *Cryptosporidium proventriculi*.

Publikace, vycházející mimo jiné i z této práce, a v níž byl *Cryptosporidium* avian genotyp III popsán jako samostatný druh, je přiložena k této práci (příloha).

7 Závěry

- U papoušků jsme detekovali *C. baileyi*, *C. avium* a *Cryptosporidium avian* genotyp III.
- *Cryptosporidium avian* genotyp III byl dominantní kryptosporidií u papoušků.
- *Cryptosporidium avian* genotyp III byl poprvé nalezen u papouška konžského a agapornise růžohrdlého.
- *Cryptosporidium avian* genotyp III byl infekční pouze pro korely a neinfekční pro andulky vlnkované, kura domácího a SCID myši.
- *Cryptosporidium avian* genotyp III infikuje proventrikulus a ventrikulus.
- Prepatentní a patentní perioda *Cryptosporidium avian* genotyp III u experimentálně infikovaných korel chocholatých je 6, respektive 30 dnů. Patentní perioda u přirozeně infikovaných korel je delší než 5 měsíců.
- Oocysty *Cryptosporidium avian* genotyp III jsou větší než oocysty *C. avium* a *C. baileyi* a nepatrně menší než *C. galli*.
- *Cryptosporidium avian* genotyp III lze molekulárně odlišit od ostatních druhů a genotypů rodu *Cryptosporidium* na genech kódujících malou podjednotku rRNA, aktin a 70 kDa Heat Shock Protein.
- Genetická a biologická data získaná v této práci ukázala, že *Cryptosporidium avian* genotyp III je samostatným druhem rodu *Cryptosporidium* a bylo navrženo jeho přejmenování na *Cryptosporidium proventriculi*.

8 Přehled použité literatury a zdrojů

- Abe N., Iseki M. (2004):** Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR – amplified small subunit ribosomal RNA gene. *Parasitology Research*, 92: 523-526.
- Abe N., Makino I. (2010):** Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels, Japan. *Parasitology Research*, 106: 1491-1497.
- Akiyoshi D.E., Dilo J., Pearson C., Chapman S., Tumwine J., Tzipori S. (2003):** Characterization of *Cryptosporidium meleagridis* of human origin passaged through different host species. *Infection and Immunity*, 71: 1828-1832.
- Antunes R.G., Simoes D.C., Nakamura A.A., Meireles M.V. (2008):** Natural infection with *Cryptosporidium galli* in canaries (*Serinus canaria*), in a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*), and in lesser seed-finches (*Oryzoborus angolensis*) from Brazil. *Avian Diseases*, 52: 702-705.
- Arrowood M.J., Donaldson K. (1996):** Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 43: 89S.
- Arrowood M.J., Sterling C.R. (1987):** Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. *The Journal of Parasitology*, 73: 314-319.
- Baroudi D., Khelef D., Goucem R., Adjou K.T, Adamu H., Zhang H., Xiao L. (2013):** Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. *Veterinary Parasitology*, 196: 334-340.
- Belton D.J., Powell I.B. (1987):** Cryptosporidiosis in lovebirds (*Agapornis* sp.) New Zealand Veterinary Journal, 35: 15.
- Bermudez A.J., Ley D.H., Levy M.G., Ficken M.D., Guy J.S., Gerig T.M. (1988):** Intestinal and bursal cryptosporidiosis in turkeys following inoculation with *Cryptosporidium* sp. isolated from commercial poults. *Avian Diseases*, 32: 445-450.

- Blagburn B.L., Lindsay D.S., Hoerr F.J., Atlas A.L., Toivio-Kinnucan M. (1990):** *Cryptosporidium* sp. infection in the proventriculus of an Australian diamond firetail finch (*Staganopleura bella*: Passeriformes, Estrildidae). Avian Diseases, 34: 1027-1030.
- Blagburn B.L., Lindsay D.S., Giambrone J.J., Sundermann C.A., Hoerr F.J. (1987):** Experimental cryptosporidiosis in broiler chickens. Poultry Science, 66: 442-449.
- Cama V.A., Bern C., Roberts J., Cabrera L., Sterling C.R., Ortega Y., Gilman R.H., Xiao L. (2008):** *Cryptosporidium* species and subtypes and clinical manifestations in children, Peru. Emerging Infectious Diseases, 14: 1567-1574.
- Cama V.A., Bern C., Sulaiman I.M., Gilman R.H., Ticona E., Vivar A., Kawai V., Vargas D., Zhou L., Xiao L.H. (2003):** *Cryptosporidium* species and genotypes in HIV-positive patients in Lima, Peru. Journal of Eukaryotic Microbiology, 50: 531-533.
- Camargo V.D., Santana B.N., Ferrari E.D., Nakamura A.A., Nagata W.B., Nardi A.R.M., Meireles M.V. (2018):** Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in captive canaries (*Serinus canaria*) using different diagnostic methods. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 27: 61-66.
- Cano L., de Lucio A., Bailo B., Cardona G.A., Muadica A.S.O., Lobo L., Carmena D. (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., Schinitzler B.E., Jeffries A.C., Tenter A.M., Johnson A.M., Barta J.R. (1999):** *Cryptosporidium* is more closely related to gregarines than to coccidian as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitology Research, 85: 899-904.
- Current W.L., Upton S.J., Haynes T.B. (1986):** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. s. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. The Journal of protozoology, 33: 289-296.

- Curtiss J.B., Leone A.M., Wellehan J.F. Jr., Howerth E.W., Farina L.L. (2015):** Renal and Cloacal cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* avian genotype V) in a Major Mitchell's cockatoo (*Lophochroa Leadbeateri*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine, 46: 934-937.
- Čondlová Š., Horčíčková M., Havrdová N., Sak B., Hlásková L., Perec Matysiak A., Kicia M., McEvoy J., Kváč M. (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 Medicina Veterinara, 7: 155-160.
- Darabus G., Olariu R. (2003):** The homologous interspecies transmission of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium meleagridis*. Polish Journal of Veterinary Sciences, 6: 225-228.
- Egyed Z., Sréter T., Széll Z., Varga I. (2003):** Characterization of *Cryptosporidium* spp. - recent developments and future needs. Veterinary Parasitology, 111: 103-114.
- Elwin K., Hadfield S.J., Robinson G., Chalmers R.M. (2012):** The epidemiology of sporadic human infections with unusual cryptosporidia detected during routine typing in England and Wales, 2000-2008. Epidemiology Infection, 40: 673-683.
- Fayer R., Xiao L. (2008):** Diagnostics. In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. 2nd ed. Boca Raton, Publishing CRC Press: 192-200 pp.
- Ferrari E.D., Nakamura A.A., Nardi A.R.M., Santana B.N., da Silva D.C., Nagata W.B., Bresciani K.D.S., Meireles M.V. (2018):** *Cryptosporidium* spp. in caged exotic psittacines from Brazil. Evaluation of diagnostic methods and molecular characterization. Experimental Parasitology, 184: 109-114.
- Gharagozlou M.J., Dezfoulian O., Rahbari S., Bokaie S., Jahanzad I., Razavi A.N.E. (2006):** Intestinal cryptosporidiosis in turkeys in Iran. Journal of Veterinary Medicine, Physiology, Pathology, Clinical Medicine, 53: 282-285.

- Gomes R.S., Huber F., da Silva S., do Bomfim T.C. (2012):** *Cryptosporidium* spp. parasitize exotic birds that are commercialized in markets, commercial aviaries, and pet shops. *Parasitology Research*, 110: 1363-1370.
- Goodwin M.A., Krabill V.A. (1989):** Diarrhea associated with small-intestinal cryptosporidiosis in a budgerigar and in a cockatiel. *Avian Diseases*, 33: 829-833.
- Goodwin M.A., Steffens W.L., Russell I.D., Brown J. (1988):** Diarrhea associated with intestinal cryptosporidiosis in turkeys. *Avian Diseases*, 32: 63-67.
- Goodwin M.A., Brown J., Resurreccion R.S., Smith J.A. (1996):** Respiratory coccidiosis (*Cryptosporidium baileyi*) among northern Georgia broilers in one company. *Avian Diseases*, 40: 572-575.
- Gorham S.L., Mallinson E.T., Synder D.B., Odor E.M. (1987):** Cryptosporidia in the bursa of Fabricius. A correlation with mortality rates in broiler chickens. *Avian Pathology*, 16: 205-211.
- Henriksen S.A., Pohlenz J.F.L. (1981):** Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 22: 594-596.
- Holubová N., Sak B., Horčíčková M., Hlásková L., Květoňová D., Menchaca S., Mcevoy J., Kváč M. (2016):** *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitology Research*, 115: 2243-2251.
- Horčíčková M., Čondlová Š., Holubová N., Sak B., Květoňová D., Hlásková L., Konečný R., Sedláček F., Clark M., Giddings C., McEvoy J., Kváč M. (2018):** Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitology*, 146: 220-233.
- Hornok S., Szell Z., Shibalova T.A., Varga I. (1999):** Study on the course of *Cryptosporidium baileyi* infection in chickens treated with interleukin-1 or indomethacin. *Acta Veterinaria Hungarica*, 47: 207-216.
- Chalmers R.M., Giles M. (2010):** Zoonotic cryptosporidiosis in the UK - challenges for control. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 1487-1497.
- Checkley W., White, A.C.Jr., Jaganath D., Arrowood M.J., Chalmers R.M., Chen X., Fayer R., Griffiths J.K., Guerrant R.L., Hedstrom L., Huston C.D., Kotloff K.L., Kang G., Mead R.J., Miller M., Petri W.A.Jr., Priest J.W., Roos**

- D.S, Striepen B., Thomson R.C., Ward H.D., Van Voorhis W.A., Xiao L., Zhu G., Houpt E.R. (2015):** A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *The Lancet Infectious Diseases*, 15: 85-94.
- Chelladurai J.J., Clark M.E., Kváč M., Holubová N., Khan E., Stenger B.L.S., Giddings C.W., McEvoy J. (2016):** *Cryptosporidium galli* and novel *Cryptosporidium* avian genotype VI in North American red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Parasitology Research*, 115: 1901-1906.
- Cheun H., Cho S., Lee J., Lim Y., Jeon J., Yu J., Kim T., Lee W., Cho S., Lee D., Park M., Jeong H., Chen D., Ji Y., Kwon M. (2010):** Infection status of hospitalized diarrheal patients with gastrointestinal protozoa, bacteria, and viruses in the Republic of Korea. *Korean Journal Parasitology*, 48: 113-120.
- Iijima Y., Itoh N., Phrompraphai T., Ito Y., Kimura Y., Kameshima S. (2018):** Molecular prevalence of *Cryptosporidium* spp. among companion birds kept in pet shops in Japan. *Korean Journal of Parasitology*, 56: 281-285.
- Insulander M., Silverlås C., Lebbad M., Karlsson L., Mattsson J.G., Svenungsson B. (2013):** Molecular epidemiology and clinical manifestations of human cryptosporidiosis in Sweden. *Epidemiology Infection*, 141: 1009-1020.
- Jellison K.L., Distel D.L., Hemond H.F., Schauer D.B. (2004):** Phylogenetic analyses of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada Geese (*Branta canadensis*): evidence for five novel genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 452-458.
- Ježková J., Horčíčková M., Hlásková L., Sak B., Květoňová D., Novák J., Hofmannová L., McEvoy J., Kváč M. (2016):** *Cryptosporidium testudinis* sp. n., *Cryptosporidium ducismarci* Traversa, 2010 and *Cryptosporidium* tortoise genotype III (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in tortoises. *Folia Parasitologica* 63:035.
- Jiang J., Alderisio K.A., Xiao L. (2005):** Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event. Water samples from three watersheds in New York. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4446-4454.

- Jirků M., Valigurová A., Koudela B., Krížek J., Modrý D., Šlapeta J. (2008):** New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogene. *Folia Parasitologica*, 55: 81-94.
- Khan A., Shaik J.S., Grigg M.E. (2017):** Genomics and molecular epidemiology of *Cryptosporidium* species. *Acta Tropica* 184: 1-14.
- Koompapong K., Mori H., Thammasonthijarern N., Prasertbun R., Pintong A. R., Popruk S., Rojekittikhun W., Chaisiri K., Sukthana Y., Mahittikorn A. (2014):** Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in seagulls, pigeons, dogs, and cats in Thailand. *Parasite* 21:52.
- Kváč M., McEvoy J., Stenger B., Clark M. (2014a):** Cryptosporidiosis in other vertebrates. In: Cacciò SM, Widmer G (Eds), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. 1st edn. Springer, Wien, pp. 237-326.
- Kváč M., Ondráčková Z., Květoňová D., Sak B., Vítovec J. (2007):** Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Veterinary Parasitology*, 143: 229–233.
- Kváč M., Kestránová M., Pinkova M., Květoňová D., Kalinová J., Wagnerová P., Kotková M., Vítovec J., Ditrich O., McEvoy J., Stenger B., Sak B. (2013):** *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology*, 191: 218–227.
- Langkjaer R.B., Vigre H., Enemark H.L., Maddox-Hyttel C. (2007):** Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology*, 134: 339-350.
- Li W., Li Y., Song M., Lu Y., Yang J., Tao W., Jiang Y., Wan Q., Zhang S., Xiao L. (2015):** Prevalence and genetic characteristics of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon bienersi* and *Giardia duodenalis* in cats and dogs in Heilongjiang province, China. *Veterinary Parasitology*, 208: 125-134.
- Lindsay D.S., Blagburn B.L., Sundermann C.A. (1989a):** Morphometric comparison of the oocysts of *Cryptosporidium meleagridis* and *Cryptosporidium baileyi* from birds. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 56: 91-92.

- Lindsay D.S., Blagburn B.L., Hoerr F.J. (1990):** Small intestinal cryptosporidiosis in cockatiels associated with *Cryptosporidium baileyi*-like oocysts. Avian Diseases, 34: 791-793.
- Lindsay D.S., Blagburn B.L., Sundermann C.A., Giambrone, J.J. (1988):** Effect of broiler chicken age on susceptibility to experimentally induced *Cryptosporidium baileyi* infection. American Journal of Veterinary Research, 49: 1412-1414.
- Máca O., Pavlásek I. (2015):** First finding of spontaneous infections with *Cryptosporidium baileyi* and *C. meleagridis* in the red-legged partridge *Alectoris rufa* from an aviary in the Czech Republic. Veterinary Parasitology, 209: 164-168.
- Makino I., Abe N., Reavill D.R. (2010):** *Cryptosporidium* avian genotype III as a possible causative agent of chronic vomiting in peach-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*). Avian Diseases, 54: 1102-1107.
- McLauchlin J., Amar C., Pedraza-Diaz S., Nichols G.L. (2000):** Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom. Results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1,705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. Journal of Clinical Microbiology, 38: 3984-3990.
- Meireles M.V., Soares R.M., Santos M.M.A.B., Gennari S.M. (2006):** Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). Journal of Parasitology, 92: 623-626.
- Miláček P., 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.
- Morgan U.M., Monis P.T., Xiao L., Limor J., Sulaiman I., Raidal S., O'Donoghue P., Gasser R., Murray A., Fayer R., Blagburn B.L., Lal A.A., Thompson R.C.A. (2001):** Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* from birds. International Journal for Parasitology, 31: 289-296.
- Morgan U.M., Xiao L., Limor J., Gelis S., Raidai S.R., Fayer R., Lal A., Elliot A., Thompson R.C.A. (2000):** *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian

- ringnecked parrot (*Psittacula krameri*). Australian Veterinary Journal, 78: 182-183.
- Nakamura A.A., Homem C.G., da Silva A.M.J., Meireles M.V. (2014):** Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. Veterinary Parasitology, 205: 7-13.
- Nakamura A.A., Meireles M.V. (2015):** *Cryptosporidium* infections in birds – a review. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, 24: 253-267.
- Nakamura A.A., Simões D.C., Antunes R.G., da Silva D.C., Meireles M.V. (2009):** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. Veterinary Parasitology, 166: 47-51.
- Ng J., Pavlásek I., Ryan U. (2006):** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. Applied and Environmental Microbiology, 72: 7548-7553.
- Nguyen S.T., Fukuda Y., Tada C., Huynh V.V., Nguyen D.T., Nakai Y. (2013):** Prevalence and molecular characterization of *Cryptosporidium* in ostriches (*Struthio camelus*) on a farm in central Vietnam. Experimental Parasitology, 133: 8-11.
- Novaes R.S., Pires M.S., Sudre A.P., do Bomfim T.C.B. (2018):** Captive-bred neotropical birds diagnosed with *Cryptosporidium* avian genotype III. Acta Tropica 178: 297-302.
- O'Donoghue P.J. (1995):** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. International Journal for Parasitology, 25: 139-195.
- Oliveira B.C.M., Ferrari E.D., Panegossi M.F.C., Nakamura A.A., Corbucci F.S., Nagata W.B., dos Santos B.M., Gomes J.F., Meireles M.V., Widmer G., Bresciani K.D.S. (2017):** First description of *Cryptosporidium parvum* in carrier pigeons (*Columba livia*). Veterinary Parasitology, 243: 148-150.
- Pavlásek, I. (1999):** Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity and the environment. Remedica Klin. Microbiology, 3: 290-301.
- Pavlásek, I. (1994a):** Intestinal cryptosporidiosis. First diagnosis in turkeys (*Meleagris gallopavo*), fowls (*Gallus gallus* f. *dom.*) and a salmon-crested

- cockatoo (*Cacatua moluccensis*) in the Czech Republic. *Veterinary Medicine (Praha)*, 44: 152-153.
- Pavlásek I. (1994b):** Localization of endogenous developmental stages of *Cryptosporidium meleagridis* Slavin, 1955 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Veterinary Medicine (Praha)*, 39: 33-42.
- Pavlásek I. (2001):** Findings of Cryptosporidia in the stomach of hens and of exotic and wild birds. *Veterinary Medicine (Praha)*, 51: 103-108.
- Qi M., Wang R., Ning C., Li X., Zhang L., Jian F., Sun Y., Xiao L. (2011):** *Cryptosporidium* spp. in pet birds: genetic diversity and potential public health significance. *Experimental Parasitology*, 128: 336-340.
- Ravich M.L., Reavill D.R., Hess L., Childress A.L., Wellehan J.F.X. (2014):** Gastrointestinal cryptosporidiosis in captive psittacine birds in the United States: a case review. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 28: 297-303.
- Reboredo-Fernández A., Ares-Mazás E., Cacciò S.M., Gómez-Couso H. (2015):** Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest Spain). *Parasitology* 146, 917-925.
- Rhee J.K., Seu Y.S., Park B.K. (1991):** Isolation and identification of *Cryptosporidium* from various animals in Korea. III. Identification of *Cryptosporidium baileyi* from Korean chicken. *Korean J. Parasitol*, 29: 315-324.
- Ryan U., Xiao L., Read C., Zhou L., Lal A.A., Pavlásek I. (2003a):** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4302-4307.
- Ryan U. (2010):** *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Experimental Parasitology*, 124: 113-120.
- Ryan U.M., Xiao L., Read C., Sulaiman M., Monis P., Lal A.A., Fayer R., Pavlásek I. (2003b):** A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlásek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *The Journal of Parasitology*, 89: 809-813.
- Santín M. (2013):** Clinical and subclinical infections with *Cryptosporidium* in animals. *New Zealand Veterinary Journal*, 61: 1-10.

- Santos M.M., Piero J.R., Meireles M.V. (2005):** *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: Clinical, morphological and molecular studies. Brazilian Journal of Poultry Science, 7: 103-117.
- Sauch J.F., Flanigan D., Galvin M.L., Berman D., Jakubowski W. (1991):** Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. Applied and Environmental Microbiology, 57: 3243-3247.
- Sevá A.P., Funada M.R., Richtzenhain L., Guimarães M.B., Souza S.O., Allergretti L., Sinhorini J.A., Duarte V.V., Soares R.M. (2011):** Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brasil. Veterinary Parasitology, 175: 113-117.
- Silva D.C., Homem C.G., Nakamura A.A., Teixeira W.F., Perri S.H., Meireles M.V. (2010):** Physical, epidemiological, and molecular evaluation of infection by *Cryptosporidium galli* in Passeriformes. Parasitology Research, 107: 271-277.
- Slavin D. (1955):** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). Journal of Comparative Pathology, 65: 262-266.
- Sréter T., Kovács G., da Silva A.J., Pieniazek N.J., Széll Dobos-Kovács M., Márialigeti K., Varga I. (2000):** Morphologic, host specificity, and molecular characterization of a Hungarian *Cryptosporidium meleagridis* isolate. Applied and Environmental Microbiology, 66: 735-738.
- Sréter T., Varga I. (2000):** Cryptosporidiosis in birds—a review. Veterinary Parasitology, 87: 261-279.
- Sulaiman I.M., Lal A.A., Xiao L.H. (2002):** Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. Journal of Parasitology, 88: 388-394.
- Sulaiman I.M., Morgan U.M., Thompson R.C., Lal A.A., Xiao L. (2000):** Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70 kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. Applied and Environmental Microbiology, 66: 2385-2391.
- Šlapeta J. (2013):** Cryptosporidiosis and *Cryptosporidium* species in animals and humans. A thirty colour rainbow. International Journal for Parasitology, 43: 957-970.

- Thompson R.C.A, Koh W.H., Clode P.L. (2016):** *Cryptosporidium* – What is it? Food and Waterborne Parasitology, 4: 54-61.
- Tůmová E., Skřivan M., Marounek M., Pavlásek I., Ledvinka Z. (2002):** Performance and oocyst shedding in broiler chickens orally infected with *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium meleagridis*. Avian Diseases, 46: 203-207.
- Tyzzer 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.
- Tyzzer 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.
- Tyzzer E.E. (1912):** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.). a coccidium found in the small intestine of the common mouse. Archiv für Protistenkunde, 26: 394-414.
- Tyzzer E.E. (1929):** Coccidiosis in gallinaceous birds. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 10: 269.
- Tzipori S., McCartney E., Lawson G. H., Rowland A. C., Campbell I. (1981a):** Experimental infection of piglets with *Cryptosporidium*. Research in Veterinary Science, 31: 358-368.
- Tzipori S., Angus K. W., Grey E. W., Campbell I., Alan F. (1981b):** Diarrhea in lambs experimentally infected with *Cryptosporidium* isolated from calves. American Journal of Veterinary Research, 42: 1400-1404.
- Tzipori S., Angus K. W., Campbell I., Sherwood D. (1981c):** Diarrhea in young red deer associated with infection with *Cryptosporidium*. The Journal of Infectious Diseases, 144: 170-175.
- Vinayak S., Pawlowic M. C., Sateriale A., Brooks C. F., Studstill C. J., BarPeled Y., Cipriano M. J., Striepen B. (2016):** Genetic modification of the diarrheal pathogen *Cryptosporidium parvum*. Nature, 523: 477-480.
- Wang R., Jian F., Sun Y., Hu Q., Zhu J., Wang F., Ning C., Zhang L., Xiao L. (2010):** Large-scale survey of *Cryptosporidium* spp. in chickens and Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) in Henan, China: prevalence and molecular characterization. Avian Pathology, 39: 447-451.

- Wang R., Qi M., Jingjing Z., Sun D., Ning C., Zhao J., Zhang L., Xiao L. (2011):** Prevalence of *Cryptosporidium baileyi* in ostriches (*Struthio camelus*) in Zhengzhou, China. *Veterinary Parasitology*, 175: 151-154.
- Wang R., Wang F., Zhao J., Qi M., Ning C., Zhang L., Zhang Xiao L. (2012):** *Cryptosporidium* spp. in quails (*Coturnix coturnix japonica*) in Henan, China: molecular characterization and public health significance. *Veterinary Parasitology*, 187: 534-537.
- Wang L., Xue X., Li J., Zhou Q., Yu Y., Du A. (2014b):** Cryptosporidiosis in broiler chickens in Zhejiang Province, China: molecular characterization of oocysts detected in fecal samples. *Parasite*, 21: 36.
- Xiao L., Feng Y. (2008):** Zoonotic cryptosporidiosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 52: 309-332.
- Xiao L., Escalante L., Yang C., Sulaiman I., Escalante A.A., Montali R.J., Fayer R., Lal A.A. (1999a):** Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1578-1583.
- Xiao L., Ryan U.M. (2004):** Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 17: 483-490.
- Zhang X.X., Zhang N.Z., Zhao G.H., Zhao Q., Zhu X.Q. (2015):** Prevalence and genotyping of *Cryptosporidium* in ffectionin pet parrots in North China. *BioMed Reseach International*, 2015: 549798.
- Zhou L., Kassa H., Tischler M.L., Xiao L. (2004):** Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 4211-4215.

9 Přílohy

Tabulka P1. *Cryptosporidium* spp. u ptáků řádu papoušci (Psittaciformes) v České republice (CZE) a na Slovensku (SVK) na základě PCR vyšetření trusu.

Země/číslo chovu	Hostitel (vědecký název)	Počet vyšetřených/ pozitivních	ID pozitivních zvířat	
CZE/1	Agapornis růžohrdlý (<i>Agapornis roseicollis</i>)	6/1	26156	
	Amazoňan modročelý (<i>Amazona aestiva</i>)	2/0		
	Andulka vlnkovaná (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	9/1	26150	
	Korela chocholatá (<i>Nymphicus hollandicus</i>)			23772
			18/3	25137
				34758
	Papoušek senegalský (<i>Poicephalus senegalus</i>)	4/0		
Papoušek šedý (<i>Psittacus erithacus</i>)	1/0			
CZE/2	Amazoňan modročelý (<i>Amazona aestiva</i>)	4/0		
	Andulka vlnkovaná (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	7/0		
	Ara ararauna (<i>Ara ararauna</i>)	2/0		
	Korela chocholatá (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	6/1	35508	
	Papoušek senegalský (<i>Poicephalus senegalus</i>)	3/0		
	Papoušek šedý (<i>Psittacus erithacus</i>)	2/0		
CZE/3	Agapornis růžohrdlý (<i>Agapornis roseicollis</i>)	3/0		
	Amazoňan modročelý (<i>Amazona aestiva</i>)	4/0		
	Andulka vlnkovaná (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	8/1	28471	
	Kakariki rudočelý (<i>Cyanoramphus novaezealandiae</i>)	4/1	19287	
	Korela chocholatá (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	8/0		
	Papoušek zpěvavý (<i>Psephotus haematonus</i>)	5/0		
CZE/4	Agapornis růžohrdlý (<i>Agapornis roseicollis</i>)	1/0		
	Andulka vlnkovaná (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	5/0		
	Kakadu bílý (<i>Cacatua alba</i>)	5/0		
	Korela chocholatá (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	5/0		
	Papoušek senegalský (<i>Poicephalus senegalus</i>)	2/0		
CZE/5	Andulka vlnkovaná (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	7/1	35382	
	Korela chocholatá (<i>Nymphicus hollandicus</i>)		34306	
			34320	
CZE/6	Agapornis růžohrdlý (<i>Agapornis roseicollis</i>)	2/0		
	Amazoňan modročelý (<i>Amazona aestiva</i>)	1/0		
	Andulka vlnkovaná (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	6/0		
	Korela chocholatá (<i>Nymphicus hollandicus</i>)			34759
			6/2	35506
	Papoušek senegalský (<i>Poicephalus senegalus</i>)	2/0		
	Papoušek šedý (<i>Psittacus erithacus</i>)	2/0		
CZE/7	Agapornis růžohrdlý (<i>Agapornis roseicollis</i>)	4/1	37339	
	Agapornis škraboškový (<i>Agapornis personatus</i>)	3/0		
	Amazoňan modročelý (<i>Amazona aestiva</i>)	4/0		
	Andulka vlnkovaná (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	4/0		
	Korela chocholatá (<i>Nymphicus hollandicus</i>)			14384
			14/3	14385
				17618
Papoušek senegalský (<i>Poicephalus senegalus</i>)	2/0			
Papoušek šedý (<i>Psittacus erithacus</i>)	3/0			

Tabulka P1 pokračování. *Cryptosporidium* spp. u ptáků řádu papoušci (Psittaciformes) v České republice (CZE) a na Slovensku (SVK) na základě PCR vyšetření trusu.

Země/číslo chovu	Hostitel (vědecký název)	Počet vyšetřených/ pozitivních	ID pozitivních zvířat	
CZE/8	Agapornis růžohrdlý (<i>Agapornis roseicollis</i>)	3/0		
	Agapornis škraboškový (<i>Agapornis personatus</i>)	5/0		
	Alexandr malý (<i>Psittacula krameri</i>)	4/0		
	Amazoňan modročelý (<i>Amazona aestiva</i>)	5/0		
	Andulka vlnkovaná (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	8/0		
	Ara ararauna (<i>Ara ararauna</i>)	4/0		
	Kakadu bílý (<i>Cacatua alba</i>)	4/0		
	Kakadu růžový (<i>Eolophus roseicapilla</i>)	5/0		
	Kakariki rudočelý (<i>Cyanoramphus novaezealandiae</i>)	2/0		
	Korela chocholátá (<i>Nymphicus hollandicus</i>)		25/4	34331
				34749
				34750
				34751
Papoušek konžský (<i>Poicephalus gulielmi</i>)		27/3	22127	
			25108	
			33626	
Papoušek senegalský (<i>Poicephalus senegalus</i>)	5/0			
Papoušek šedý (<i>Psittacus erithacus</i>)	4/0			
CZE/9	Alexandr malý (<i>Psittacula krameri</i>)	2/0		
	Amazoňan modročelý (<i>Amazona aestiva</i>)	2/0		
	Andulka vlnkovaná (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	7/0		
	Kakadu bílý (<i>Cacatua alba</i>)	3/0		
	Kakariki rudočelý (<i>Cyanoramphus novaezealandiae</i>)	2/0		
	Korela chocholátá (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	7/0		
	Papoušek senegalský (<i>Poicephalus senegalus</i>)	4/0		
	Papoušek šedý (<i>Psittacus erithacus</i>)	4/0		
	Papoušek zpěvavý (<i>Psephotus haematonus</i>)	6/0		
SVK/1	Agapornis růžohrdlý (<i>Agapornis roseicollis</i>)	6/0		
	Amazoňan modročelý (<i>Amazona aestiva</i>)	3/0		
	Andulka vlnkovaná (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	10/0		
	Korela chocholátá (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	5/0		
	Papoušek senegalský (<i>Poicephalus senegalus</i>)	5/0		
	Papoušek šedý (<i>Psittacus erithacus</i>)	4/0		
SVK/2	Agapornis růžohrdlý (<i>Agapornis roseicollis</i>)	6/1	37244	
	Amazoňan modročelý (<i>Amazona aestiva</i>)	2/0		
	Andulka vlnkovaná (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	7/0		
	Kakadu bílý (<i>Cacatua alba</i>)	3/0		
	Kakadu růžový (<i>Eolophus roseicapilla</i>)	2/0		
	Korela chocholátá (<i>Nymphicus hollandicus</i>)		20/2	34305
				36598
	Papoušek senegalský (<i>Poicephalus senegalus</i>)	3/0		
Papoušek šedý (<i>Psittacus erithacus</i>)	4/0			

Publikace: “Nikola Holubová, **Veronika Zikmundová**, Zlata Limpouchová, Bohumil Sak, Roman Konečný, Lenka Hlásková, Dušan Rajský, Zaneta Kopacz, John McEvoy, Martin Kváč. 2019. *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. European Journal of Protistology, 69: 70-87.“ vzniklá na základě výsledků této bakalářské práce.



Cryptosporidium proventriculi sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds

Nikola Holubová^{a,b}, Veronika Zikmundová^b, Zlata Limpouchová^{a,c}, Bohumil Sak^a, Roman Konečný^b, Lenka Hlásková^a, Dušan Rajský^d, Zaneta Kopacz^e, John McEvoy^f, Martin Kváč^{a,b,*}

^aInstitute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, v.v.i., České Budějovice, Czech Republic

^bFaculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic

^cFaculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic

^dFaculty of Forestry, Department of Applied Zoology and Game Management, Technical University in Zvolen, Zvolen, Slovakia

^eDepartment of Biology and Medical Parasitology, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland

^fVeterinary and Microbiological Sciences Department, North Dakota State University, Fargo, USA

Received 31 January 2019; received in revised form 14 March 2019; accepted 19 March 2019
Available online 26 March 2019

Abstract

Cryptosporidiosis is a common parasitic infection in birds that is caused by more than 25 *Cryptosporidium* species and genotypes. Many of the genotypes that cause avian cryptosporidiosis are poorly characterized. The genetic and biological characteristics of avian genotype III are described here and these data support the establishment of a new species, *Cryptosporidium proventriculi*. Faecal samples from the orders Passeriformes and Psittaciformes were screened for the presence of *Cryptosporidium* by microscopy and sequencing, and infections were detected in 10 of 98 Passeriformes and in 27 of 402 Psittaciformes. *Cryptosporidium baileyi* was detected in both orders. *Cryptosporidium galli* and avian genotype I were found in Passeriformes, and *C. avium* and *C. proventriculi* were found in Psittaciformes. *Cryptosporidium proventriculi* was infectious for cockatiels under experimental conditions, with a prepatent period of six days post-infection (DPI), but not for budgerigars, chickens or SCID mice. Experimentally infected cockatiels shed oocysts more than 30 DPI, with an infection intensity ranging from 4,000 to 60,000 oocysts per gram (OPG). Naturally infected cockatiels shed oocysts with an infection intensity ranging from 2,000 to 30,000 OPG. *Cryptosporidium proventriculi* infects the proventriculus and ventriculus, and oocysts measure $7.4 \times 5.8 \mu\text{m}$. None of the birds infected *C. proventriculi* developed clinical signs.

© 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: *Cryptosporidium* avian genotype III; Experimental infections; Oocyst size; PCR; Prevalence; Taxonomy

Introduction

Cryptosporidium parasites belong to the phylum Apicomplexa and infect the gastrointestinal tract of a broad range of vertebrate species (Smith et al. 2007; Sreter and Varga 2000). Currently, 41 species of *Cryptosporidium* are recognized in

*Corresponding author at: Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. České Budějovice, Czech Republic.

E-mail address: kvac@paru.cas.cz (M. Kváč).

fish, amphibians, reptiles, birds, and mammals (Kváč et al. 2014; Liu et al. 2013; Qi et al. 2011). In contrast, more than 70 genotypes have been described that await the morphological and biological characterization necessary to describe them as separate species (Chalmers et al. 2018; Ryan et al. 2014; Xiao et al. 1999; Xiao and Ryan 2004).

To date, four avian *Cryptosporidium* spp. have been described in birds: *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin 1955), *Cryptosporidium baileyi* (Current et al. 1986), *Cryptosporidium galli* (Ryan et al. 2003b) and *Cryptosporidium avium* (Holubová et al. 2016). In addition, 21 *Cryptosporidium* genotypes have been identified in more than 30 avian species worldwide (Ryan 2010), and these appear to be avian specific. They include avian genotypes I–IV and VI–IX (Helmy et al. 2017), goose genotypes I–IV (Zhou et al. 2004) and Id (Cano et al. 2016), duck genotypes I and II (Jellison et al. 2004; Morgan et al. 2001; Zhou et al. 2004) and duck genotype b (Cano et al. 2016), Eurasian Woodcock genotype (Ryan et al. 2003a), Finch genotypes I–III (Morgan et al. 2000) and YS-2017 genotype from owls (Makino et al. 2018). Mammal-specific *Cryptosporidium* spp., including *C. andersoni*, *C. hominis*, *C. muris*, *C. parvum*, *C. canis*, have been reported rarely in birds (Ferrari et al. 2018; Helmy et al. 2017; Nakamura et al. 2009; Ng et al. 2006; Oliveira et al. 2017; Qi et al. 2014; Santín et al. 2004).

Cryptosporidium meleagridis, *C. baileyi* and *C. galli* infect the intestine, lungs, and proventriculus, respectively, and have been found in several avian orders, suggesting low host specificity in avian hosts (Baroudi et al. 2013; Jellison et al. 2004; Li et al. 2015; Ng et al. 2006; Wang et al. 2014). In contrast, *C. avium*, which is closely related to *C. baileyi* and infects the same site, appears to be restricted to hosts in the order Psittaciformes (Holubová et al. 2016; Slavin 1955). Most avian *Cryptosporidium* genotypes have been detected in a small number of avian hosts, but the data are insufficient to support the conclusion that they have a narrow host range, similar to *C. avium* (Nakamura and Meireles 2015). The present study aimed to address this deficiency for *Cryptosporidium* avian genotype III, which infects the proventriculus and ventriculus of birds belonging to five orders of class Aves (Table 1). We use experimental infections to confirm that avian genotype III has a different host range than *C. galli*, and we also show that it differs from *C. galli* in other biological characteristics, oocyst morphology, and nucleotide sequence at multiple loci. Based on these and other reported data, we propose that *Cryptosporidium* avian III be recognized as a new *Cryptosporidium* species, *Cryptosporidium proventriculi* sp. n.

Material and Methods

Specimens studied

Faecal samples from pet birds owned by private breeders in the Czech Republic (n = 10), Slovakia (n = 2) and Poland (n = 3) were sampled. Each sample was collected from the

floor of the bird cage immediately after defecation and placed into a separate plastic tube without fixative. The faecal consistency (loose if it took the form of the container and solid if it maintained its original shape) was noted at the time of sampling. Each animal was sampled only once. All animals were screened without previous knowledge of parasitological status. A total of 402 and 98 samples were obtained from birds in the order Psittaciformes and Passeriformes, respectively (Table 2). All samples were stored at 4 °C until used for further analysis.

Origin of specimens for transmission studies

Isolates of *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (previously known as *Cryptosporidium* avian genotype III) were obtained from four naturally infected adult cockatiels (*Nymphicus hollandicus*) (Czech Republic). *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. oocysts from positive birds were pooled and used to infect an adult cockatiel, which was negative for *Cryptosporidium* DNA by PCR and was sourced from a breeder that had no *Cryptosporidium*-positive birds. Oocysts from the infected cockatiel were purified using caesium chloride gradient centrifugation (Arrowood and Donaldson 1996) and used for oocyst morphometry and infectivity studies (see Transmission studies).

Parasitological examination and oocyst preparation

All animal faeces were screened for *Cryptosporidium* oocysts using faecal smears stained with aniline-carbol-methyl violet (ACMV) (Miláček and Vítovec 1985). Faecal specimens were collected daily and stored in a 2.5% potassium dichromate solution at 4–8 °C.

Cryptosporidium oocysts from cockatiels were purified using caesium chloride gradient centrifugation prior to morphometric analyses and transmission studies (Kilani and Sekla 1987). The viability of oocysts was examined using propidium iodide (PI) staining by a modified assay of Sauch et al. (1991). Briefly, examined oocysts were washed in distilled water (DW; 10,000 oocysts in 10 µl) and mixed with 0.1 µl of PI (1% solution, SIGMA). After 30 min of incubation at room temperature in the dark, the oocysts were washed twice with DW. Oocyst viability was examined using fluorescence microscopy (filter 420 nm, Olympus IX70). Oocysts with red fluorescence were considered to be dead, and those without fluorescence were considered viable.

Oocyst morphometry

The morphology and morphometry of *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. oocysts were examined using differential interference contrast (DIC) microscopy, brightfield microscopy following ACMV and modified Ziehl-Neelsen (ZN; Henriksen and Pohlenz 1981) staining and fluorescence microscopy following labelling with genus-specific FITC-

Table 1. Occurrence of *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (formerly known as *Cryptosporidium* avian genotype III) in birds from orders Psittaciformes¹, Passeriformes², Piciformes³, Charadriiformes⁴ and Anseriformes⁵ demonstrated on the basis of molecular tools amplifying partial sequences of *Cryptosporidium* small-subunit rRNA (SSU), actin and *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) genes.

Host (scientific name)	Country	Loci for genotyping [GenBank Acc. No.]	No. of screened/ positive	References
Blue-fronted parrot ¹ (<i>Amazona aestiva</i>)	Brazil	SSU ^b	NS/1	Nakamura et al. (2014)
Barred parakeet ¹ (<i>Bolborhynchus lineola</i>)	Brazil	SSU [MF462155]	34/1	Ferrari et al. (2018)
Cockatiel ¹ (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	Australia	SSU [DQ650343]	NS/3	Ng et al. (2006)
	Brazil	SSU [identical with GQ227480] SSU [GQ227481] SSU [GU074385-87] SSU [identical with GQ227480]	8/1 64/1 NS/3 70/9	Nakamura et al. (2014) Nakamura et al. (2009) Gomes et al. (2012) Ferrari et al. (2018)
	China	SSU [HM116385]	39/2	Qi et al. (2011)
	India	SSU [KX668210]	NA	unpublished
	Japan	SSU [identical with AB694729] SSU [AB471645] COWP [AB471653] Actin [AB471659]	10/1 4/1	Iijima et al. (2018) Abe and Makino (2010)
<i>Forpus</i> sp. ¹	Brazil	SSU [MF462156]	78/12	Ferrari et al. (2018)
Galah ¹ (<i>Eolophus roseicapilla</i>)	Australia	Actin [DQ650349]	NS/1	Ng et al. (2006)
		SSU ^b	13/2	Nakamura et al. (2014)
Lovebird ¹ (<i>Agapornis</i> sp.)	Brazil	SSU [identical with GQ227480]	14/3	Ferrari et al. (2018)
	USA	SSU [KJ661334]	18/2	Ravich et al. (2014)
Lilian's lovebird ¹ (<i>Agapornis lilianae</i>)	Japan	SSU [identical with AB694729]	5/1	Iijima et al. (2018)
<i>Neophema</i> sp. ¹	Brazil	SSU ^b	91/1	Ferrari et al. (2018)
Pacific parrotlet ¹ (<i>Forpus coelestis</i>)	Japan	SSU [identical with AB694729]	3/1	Iijima et al. (2018)
Peach-faced lovebird ¹ (<i>Agapornis roseicollis</i>)	Brazil	SSU [GQ227480]	14/1	Nakamura et al. (2009)
	Japan	SSU [AB471641] Actin [AB471655] SSU [identical with AB694729]	37/13 29/5	Makino et al. (2010) Iijima et al. (2018)
Red-rumped parrot ¹ (<i>Psephotus haematonotus</i>)	Brazil	SSU*	21/1	Ferrari et al. (2018)
Sun parakeet ¹ (<i>Aratinga solstitialis</i>)	Australia	SSU [DQ650342]	NS/1	Ng et al. (2006)
Double-collared seedeater ² (<i>Sporophila caerulea</i>)	Brazil	SSU ^b	10/1	Nakamura et al. (2014)
Green winged saltator ² (<i>Saltator similis</i>)	Brazil	SSU*	152/1	Nakamura et al. (2014)
Island canary ² (<i>Serinus canaria</i>)	Brazil	SSU ^b	498/12	Camargo et al. (2018)
Java sparrow ² (<i>Padda oryzivora</i>)	Brazil	SSU [GU074384]	NS/1	Gomes et al. (2012)
Red-billed blue magpie ² (<i>Urocissa erythrorhyncha</i>)	China	SSU [HM116386]	1/1	Qi et al. (2011)
Rufous-collared sparrow ² (<i>Zonotrichia capensis</i>)	Brazil	SSU*	NS/1	Nakamura et al. (2014)
<i>Sporophila</i> sp. ²	Brazil	SSU*	NS/1	Nakamura et al. (2014)

Table 1 (Continued)

Host (scientific name)	Country	Loci for genotyping [GenBank Acc. No.]	No. of screened/ positive	References
Saffron toucanet ³ (<i>Pteroglossus bailloni</i>)	Brazil	SSU [KU885389]	2/1	Novaes et al. (2018)
Red-billed toucan ³ (<i>Ramphastos tucanus</i>)	Brazil	SSU [KU885388]	4/2	Novaes et al. (2018)
Toco toucan ³ (<i>Ramphastos toco</i>)	Brazil	SSU [KU885387]	28/5	Novaes et al. (2018)
Seagull ⁴ (<i>Chroicocephalus brunnicephalus</i> and <i>ridibundus</i>)	Thailand	SSU [identical with AB694729]	70/2	Koompapong et al. (2014)
Waterbird ^{5,a}	Spain	SSU [KT880495-97]	265/4	Cano et al. (2016)

NS not specified.

^abird species was not determined.

^bbased on the duplex real-time PCR targeting the SSU gene in *Cryptosporidium* avian genotype III.

conjugated antibodies (IFA; *Cryptosporidium* IF Test, Cryptocel, Cellabs Pty Ltd., Brookvale, Australia).

Morphology and morphometry were determined using digital analysis of images (Olympus cellSens Entry 2.1, Olympus Corporation, Shinjuku, Tokyo, Japan) collected using an Olympus Digital Colour camera DP73 microscope. Length and width of oocysts (n = 100) from experimentally infected cocktails were measured under DIC at 1000 × magnification and these measurements were used to calculate the length-to-width ratio. As a control, the morphometry of *C. baileyi* (n = 100) and *C. avium* (n = 50) from experimentally infected chickens (*Gallus gallus* f. *domestica*) and budgerigars (*Melopsittacus undulatus*), respectively, were measured by the same person using the same microscope. Photomicrographs of *C. proventriculi* sp. n. oocysts observed by DIC, ACMV, ZN and IFA were deposited as a photo type at the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Czech Republic.

Molecular characterization

DNA was extracted from 200 mg of faeces, 10,000 purified oocysts, or 200 mg of tissue by bead disruption for 60 s at 5.5 m/s using 0.5 mm glass beads in a FastPrep[®] 24 Instrument (MP Biomedicals, CA, USA) followed by isolation/purification using a commercially available kit in accordance with the manufacturer's instructions (Exgene[™] Stool DNA mini, GeneAll Biotechnology Co. Ltd, Seoul, Korea). Purified DNA was stored at −20 °C prior to being used for PCR. A nested PCR approach was used to amplify a partial region of the small ribosomal subunit rRNA (~830 bp; SSU; Xiao et al. 1999), actin (~1950 bp; Sulaiman et al. 2000), and 70 kilodalton heat shock protein genes (~515 bp; HSP70; Chelladurai et al. 2016). For the SSU fragment, primary amplification was employed with the primers 5'TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG3' and 5'CCC ATT TCC TTC

GAA ACA GGA3' followed by secondary amplification with the primers 5'GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG3' and 5'AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A3'. For the actin fragment, primary amplification was employed with the primers 5'ATC RGW GAA GAA GWA RYW CAA GC3' and 5'AGA ARC AYT TTC TGT GKA CAA T3' followed by secondary amplification with the primers 5'CAA GCW TTR GTT GTT GAY AA3' and 5'TTT CTG TGK ACA ATW SWT GG3'. For the HSP70 fragment, primary amplification was employed the primers 5'GCT CGT GGT CCT AAA GAT AA3') and 5'ACG GGT TGA ACC ACC TAC TAA T3' followed by secondary amplification with the primers 5'ACA GTT CCT GCC TAT TTC3') and 5'GCT AAT GTA CCA CGG AAA TAA TC3'.

The primary PCR mixtures contained 2 µl of template DNA, 2.5 U of Taq DNA Polymerase (DreamTaq Green DNA Polymerase, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.5 × PCR buffer (SSU) or 1 × PCR buffer (actin and HSP70; Thermofisher Scientific), 6 mM MgCl₂ (SSU) or 3 mM MgCl₂ (actin and HSP70), 200 µM each deoxynucleoside triphosphate, 100 mM each primer and 2 µL non-acetylated bovine serum albumin (BSA; 10 mg ml⁻¹; New England Biolabs, Beverly, MA, USA) in 50 µl reaction volume. The secondary PCR mixtures were similar to those described above for the primary PCR, with the exception that 2 µl of the primary PCR product was used as the template, the MgCl₂ concentration was 3 mM and no BSA was used. DNA of *C. parvum* and molecular grade water were used as positive and negative controls, respectively.

Secondary PCR products were detected by agarose gel electrophoresis, visualized by ethidium bromide staining and extracted using Gen Elute Gel Extraction Kit (Sigma, St. Louis, MO, USA). Purified secondary products were sequenced in both directions with an ABI 3130 genetic analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA) using the secondary PCR primers and the BigDye1 Terminator V3.1

Table 2. *Cryptosporidium* species and genotypes from this study, detected by amplification of small subunit ribosomal rRNA (SSU), actin and 70 kDa Heat Shock Protein (HSP70) gene fragments in birds from the orders Psittaciformes and Passeriformes from the Czech Republic (CZK), Poland (POL) and Slovakia (SVK). Infection intensity of *Cryptosporidium* spp. is expressed as the number of oocysts per gram of faeces (OPG).

Order	Host (scientific name)	Number of screened/ positive	ID of positive animal	Country/ No. breed	Microscopical positivity (OPG)	Genotyping at the gene loci	
						SSU, ACTIN	HSP70
Psittaciformes	African grey parrot (<i>Psittacus erithacus</i>)	1/0	NA	CZE/1	NA	NA	NA
		2/0	NA	CZE/2	NA	NA	NA
		2/0	NA	CZE/6	NA	NA	NA
		3/0	NA	CZE/7	NA	NA	NA
		4/0	NA	CZE/8	NA	NA	NA
		4/0	NA	CZE/9	NA	NA	NA
		4/0	NA	SVK/1	NA	NA	NA
		4/0	NA	SVK/2	NA	NA	NA
	Blue-and-yellow macaw (<i>Ara ararauna</i>)	2/0	NA	CZE/2	NA	NA	NA
		4/0	NA	CZE/8	NA	NA	NA
	Blue-fronted parrot (<i>Amazona aestiva</i>)	2/0	NA	CZE/1	NA	NA	NA
		4/0	NA	CZE/2	NA	NA	NA
		4/0	NA	CZE/3	NA	NA	NA
		1/0	NA	CZE/6	NA	NA	NA
		4/0	NA	CZE/7	NA	NA	NA
		5/0	NA	CZE/8	NA	NA	NA
		2/0	NA	CZE/9	NA	NA	NA
		3/0	NA	SVK/1	NA	NA	NA
		2/0	NA	SVK/2	NA	NA	NA
		Budgerigar (<i>Melopsittacus undulatus</i>)	8/1	28471	CZE/3	No	<i>C. avium</i>
	9/1		26150	CZE/1	No	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
	7/1		35382	CZE/5	No	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
	7/0		NA	CZE/2	NA	NA	NA
	5/0		NA	CZE/4	NA	NA	NA
	6/0		NA	CZE/6	NA	NA	NA
	4/0		NA	CZE/7	NA	NA	NA
	8/0		NA	CZE/8	NA	NA	NA
	7/0		NA	CZE/9	NA	NA	NA
	10/0		NA	SVK/1	NA	NA	NA
	7/0	NA	SVK/2	NA	NA	NA	
	Cockatiels (<i>Nymphicus hollandicus</i>)	18/3	34758	CZE/1	Yes (2,000)	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
			23772		No	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
		25137		Yes (2,000)	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>	
	6/1	35508	CZE/2	No	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>	

Table 2 (Continued)

Order	Host (scientific name)	Number of screened/ positive	ID of positive animal	Country/ No. breed	Microscopical positivity (OPG)	Genotyping at the gene loci	
						SSU, ACTIN	HSP70
		10/2	34306	CZE/5	No	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
			34320		Yes (30,000)	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
		6/2	34759	CZE/6	Yes (2,000)	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
			35506		Yes (16,000)	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
		14/3	14384	CZE/7	Yes (2,000)	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
			14385		Yes (6,000)	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
			17618		No	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
		25/4	34751	CZE/8	Yes (8,000)	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
			34331	CZE/8	Yes (6,000)	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
			34749	CZE/8	No	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
			34750	CZE/8	Yes (4,000)	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
		20/2	34305	SK/2	Yes (24,000)	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
			36598	SK/2	Yes (8,000)	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
		8/0	NA	CZE/3	NA	NA	NA
		5/0	NA	CZE/4	NA	NA	NA
		7/0	NA	CZE/9	NA	NA	NA
		5/0	NA	SK//1	NA	NA	NA
	Red-crowned parakeet (<i>Cyanoramphus novaezealandiae</i>)	4/1	19287	CZE/3	No	<i>C. avium</i>	<i>C. avium</i>
		2/0	NA	CZE/8	NA	NA	NA
		2/0	NA	CZE/9	NA	NA	NA
	Red-fronted parrot (<i>Poicephalus gulielmi</i>)	27/3	22127	CZE/8	No	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
			33626	CZE/8	No	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
			25108	CZE/8	No	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
	Red-rumped parrots (<i>Psephotus haematonotus</i>)	5/0	NA	CZE/3	NA	NA	NA
		6/0	NA	CZE/9	NA	NA	NA
	Rose-breasted cockatoo (<i>Eolophus roseicapilla</i>)	5/0	NA	CZE/8	NA	NA	NA
		2/0	NA	SK/2	NA	NA	NA
	Rose-ringed parakeet (<i>Psittacula krameri</i>)	4/0	NA	CZE/8	NA	NA	NA
		2/0	NA	CZE/9	NA	NA	NA

Table 2 (Continued)

Order	Host (scientific name)	Number of screened/ positive	ID of positive animal	Country/ No. breed	Microscopical positivity (OPG)	Genotyping at the gene loci	
						SSU, ACTIN	HSP70
Passeriformes	Rosy-faced lovebird (<i>Agapornis roseicollis</i>)	6/1	26156	CZE/1	No	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
		4/1	37339	CZE/7	Yes (4,000)	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
		6/1	37244	SK/2	No	<i>C. proventriculi</i>	<i>C. proventriculi</i>
		3/0	NA	CZE/3	NA	NA	NA
		1/0	NA	CZE/4	NA	NA	NA
		2/0	NA	CZE/6	NA	NA	NA
		3/0	NA	CZE/8	NA	NA	NA
		6/0	NA	SK/1	NA	NA	NA
		Senegal parrots (<i>Poicephalus senegalus</i>)	4/0	NA	CZE/1	NA	NA
		3/0	NA	CZE/2	NA	NA	NA
		2/0	NA	CZE4	NA	NA	NA
		2/0	NA	CZE/6	NA	NA	NA
		2/0	NA	CZE/7	NA	NA	NA
		5/0	NA	CZE/8	NA	NA	NA
		4/0	NA	CZE/9	NA	NA	NA
		5/0	NA	SK1	NA	NA	NA
		3/0	NA	SK/2	NA	NA	NA
	White cockatoos (<i>Cacatua alba</i>)	5/0	NA	CZE/4	NA	NA	NA
		4/0	NA	CZE/8	NA	NA	NA
		3/0	NA	CZE/9	NA	NA	NA
		3/0	NA	SK/2	NA	NA	NA
	Yellow-collared lovebird (<i>Agapornis personatus</i>)	3/0	NA	CZE/7	NA	NA	NA
		5/0	NA	CZE/8	NA	NA	NA
	Gouldian finch (<i>Erythura gouldiae</i>)	10/1	22153	POL/1	No	<i>C. galli</i>	NA
		8/1	37242	POL/2	No	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
		5/0	NA	CZE/1	NA	NA	NA
	6/0	NA	CZE/5	NA	NA	NA	
	7/0	NA	CZE/10	NA	NA	NA	
Island canary (<i>Serinus canaria</i>)	25/3	30887	CZE/10	No	avian genotype I	avian genotype I	
		31040		No	avian genotype I	avian genotype I	
		31056		No	avian genotype I	avian genotype I	

Table 2 (Continued)

Order	Host (scientific name)	Number of screened/ positive	ID of positive animal	Country/ No. breed	Microscopical positivity (OPG)	Genotyping at the gene loci	
						SSU, ACTIN	HSP70
	Lesser goldfinch (<i>Carduelis psaltria</i>)	10/1	19900	POL/1	No	<i>C. galli</i>	NA
		5/1	24068	CZE/10	Yes (6,000)	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
		3/1	NA	CZE/1	NA	NA	NA
		5/0	NA	CZE8	NA	NA	NA
		3/0	NA	CZE/9	NA	NA	NA
	Zebra finch (<i>Taeniopygia guttata</i>)	3/1	19418	CZE/10	Yes (10,000)	<i>C. baileyi</i>	<i>C. baileyi</i>
		4/2	24067	POL/3	No	<i>C. galli</i>	NA
		4/0	37242	POL/3	No	<i>C. galli</i>	NA

cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in 10 µl reactions.

Phylogenetic analyses

The nucleotide sequences of each gene obtained in this study were edited using the ChromasPro 2.4.1 software (Technelysium, Pty, Ltd., South Brisbane, Australia) and aligned with each other and with reference sequences from GenBank using MAFFT version 7 online server with automatic selection of alignment mode (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). Phylogenetic analyses were performed and best DNA/Protein phylogeny models were selected using the MEGA7 software (Guindon and Gascuel 2003; Tamura et al. 2011). Phylogenetic trees were inferred by the maximum likelihood (ML) method, with the substitution model that best fit the alignment selected using the Bayesian information criterion. The Tamura 3-parameter model (Tamura 1992) was selected for SSU and HSP70 alignments, and the general time reversible model (Tavaré 1986) was selected for actin alignment. Bootstrap support for branching was based on 1000 replications. Phylograms were drawn using the MEGA7 and were manually adjusted using CorelDrawX7. Sequences of SSU, actin and HSP70 derived in this study have been deposited in GenBank under accession numbers MK311133–MK311180.

Transmission studies

Animals

Groups of adult cockatiels, adult budgerigars (*Melopsittacus undulatus*), one-days-old and 21-day-old chickens (*Gallus gallus* f. *domestica*), and eight-week-old SCID mice (*Mus musculus*; strain C.B-17), each consisting of five animals,

were used for experimental infection studies. In addition, three animals from each host species were used as negative control. Three weeks prior to experimental infections, animals were screened every other day for the presence of specific DNA and oocysts of *Cryptosporidium* spp., except chickens, which were hatched under monitored conditions in the laboratory. Cockatiels and budgerigars originated from breeders with *Cryptosporidium*-free birds (Czech Republic) and SCID mice from Charles River (Germany).

Animal care

To prevent environmental contamination with oocysts, laboratory rodents were housed in plastic cages (TOP-VELAZ, Prague, Czech Republic). Chickens were housed in the plastic boxes that were appropriately sized for their age. An external source of heat was used in the first five days. Budgerigars and cockatiels were kept in bird cages, appropriate to animal species. All animals were supplied with a sterilized diet and sterilized water *ad libitum*.

Animal caretakers wore new disposable coveralls, shoe covers, and gloves every time they entered the experimental room. All wood-chip bedding, faeces, and disposable protective clothing were sealed in plastic bags, removed from the experimental room and incinerated. All housing, feeding and experimental procedures were conducted under protocols

approved by the Institute of Parasitology, Biology Centre and Central Commission for Animal Welfare, Czech Republic (Protocols No. 115/2013 and 35/2018).

Experimental design

Each animal was inoculated orally by stomach tube with 10,000 purified viable oocysts suspended in 200 µl of distilled water. Animals serving as negative controls were inoculated orally by stomach tube with 200 µl of distilled water. Faecal samples from all animals were screened daily

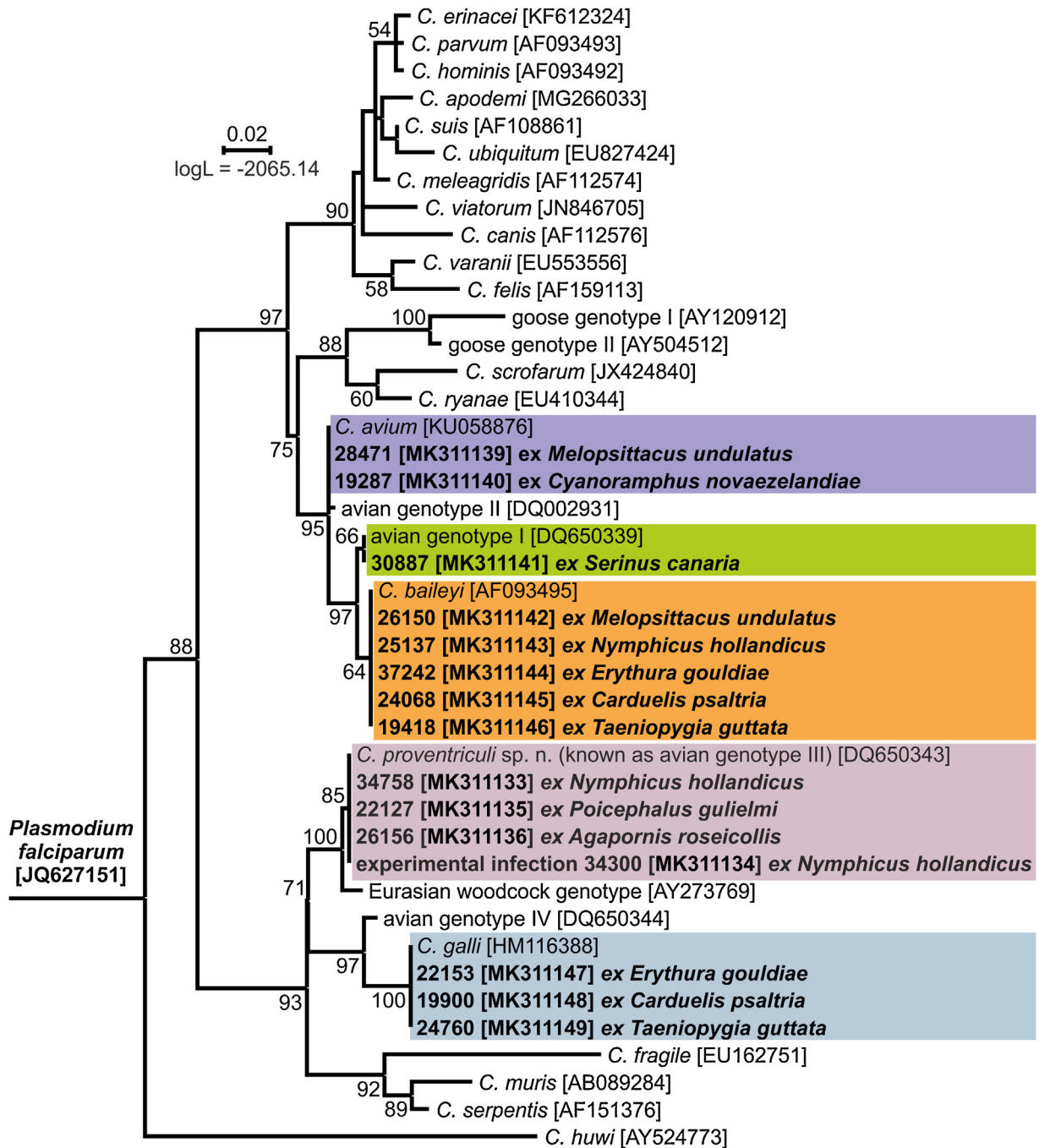


Fig. 1. Maximum likelihood tree based on partial small subunit ribosomal RNA gene sequences of *Cryptosporidium*, including sequences obtained in this study (bolded). The alignment contained 458 base positions in the final dataset. Numbers at the nodes represent the bootstrap values with more than 50% bootstrap support from 1000 pseudoreplicates. The branch length scale bar, indicating the number of substitutions per site, is given in the tree. Sequences from this study are identified by isolate number (e.g. 22127).

for the presence of *Cryptosporidium* oocyst using ACMV staining and the presence of *Cryptosporidium* specific DNA was confirmed using nested PCR targeting the SSU gene. All experiments were terminated 30 days post infection (DPI). Infection intensity was reported as the number of oocysts per gram (OPG) of faeces, as previously described by Kváč et al. (2007). In addition, faecal consistency and colour and general health status were examined daily.

Histopathological and scanning electron microscopy examinations

An animal from each host group that was positive for *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. was euthanized at 20 DPI (this time was selected based on preliminary results; data not shown). The oesophagus, ventriculus, proventriculus and entire small and large intestine was divided into 1 cm sections

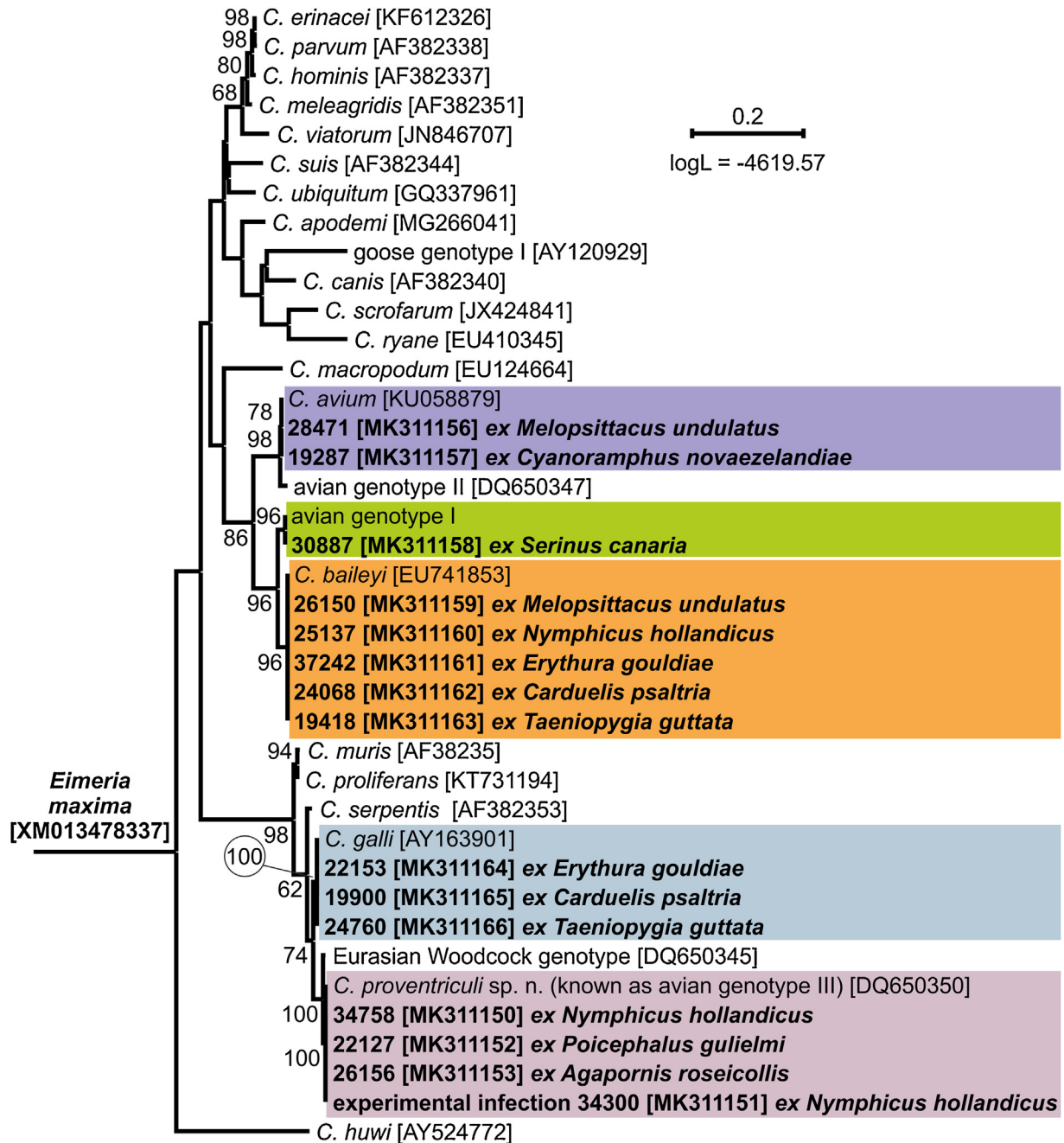


Fig. 2. Maximum likelihood tree based on partial sequences of gene coding actin of *Cryptosporidium*, including sequences obtained in this study (highlighted and bolded). The alignment contained 969 base positions in the final dataset. Numbers at the nodes represent the bootstrap values with more than 50% bootstrap support from 1000 pseudoreplicates. The branch length scale bar, indicating the number of substitutions per site, is given in the tree. Sequences from this study are identified by isolate number (e.g. 22127).

and samples were processed for histology, scanning electron microscopy (SEM) and DNA sequencing. Specimens for histology were fixed in 4% buffered formalin and processed by the standard paraffin method. Sections (5 μ m) for histology were stained with haematoxylin and eosin, Wolbach's modified Giemsa stain and periodic acid–Schiff stains. Specimens for SEM were fixed overnight at 4 $^{\circ}$ C in 2.5% glutaraldehyde

in 0.1 M phosphate buffer, washed three times for 15 min in the same buffer, post-fixed in 2% osmium tetroxide in 0.1 M phosphate buffer for 2 h at room temperature and finally washed three times for 15 min in the same buffer. After dehydration in a graded acetone series, specimens were dried using the critical point technique, coated with gold and examined using a JEOL JSM-7401F-FE SEM.

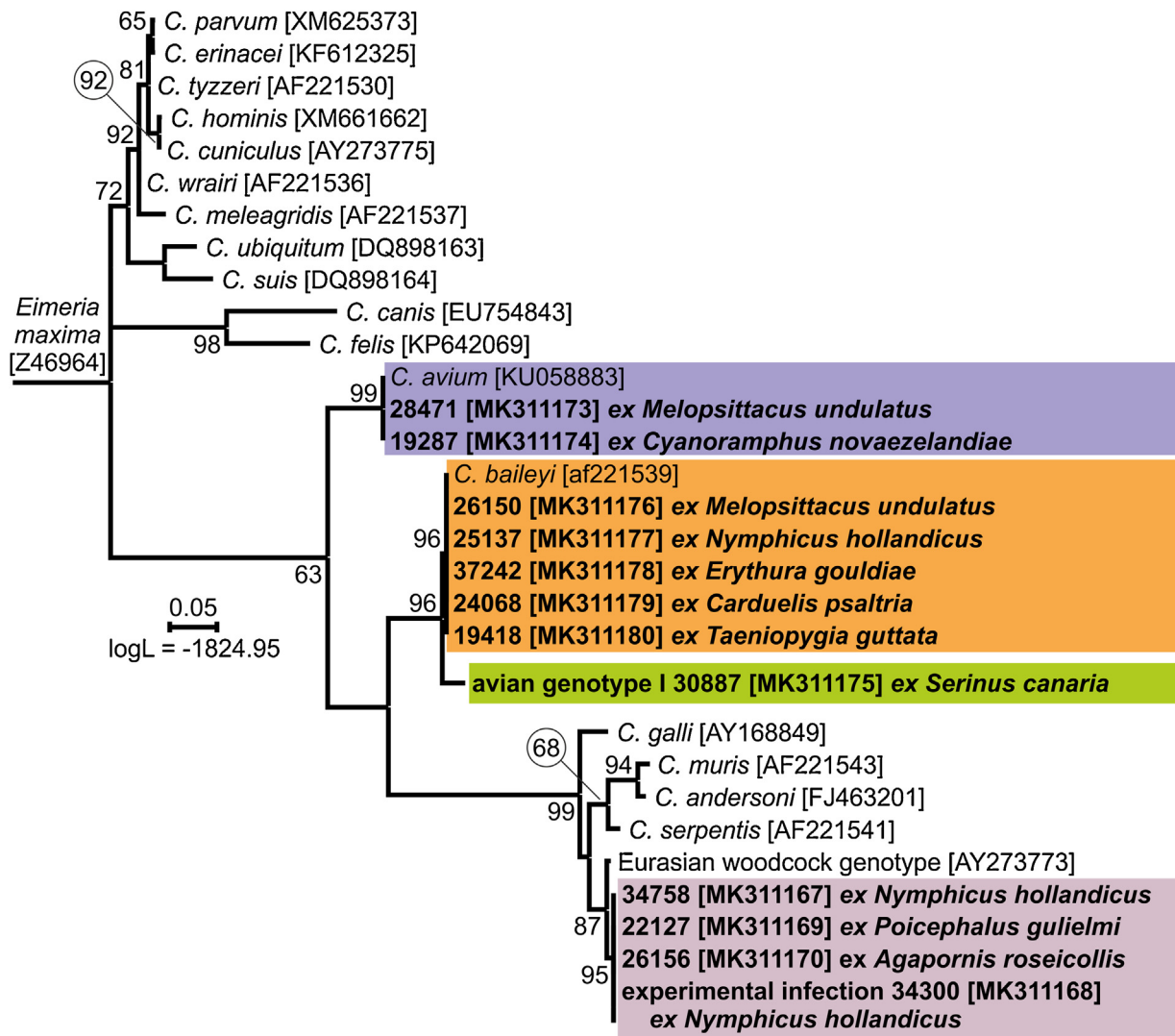


Fig. 3. Maximum likelihood tree based on partial sequences of gene coding 70 kDa Heat Shock Protein of *Cryptosporidium*, including sequences obtained in this study (highlighted and bolded). The alignment contained 488 base positions in the final dataset. Numbers at the nodes represent the bootstrap values with more than 50% bootstrap support from 1000 pseudoreplicates. The branch length scale bar, indicating the number of substitutions per site, is given in the tree. Sequences from this study are identified by isolate number (e.g. 22127).

Statistical analysis

The hypothesis tested in the analysis of oocyst morphology was that two-dimensional mean vectors of measurement are the same in the two populations being compared. Hotelling's T² test was used to test the null hypothesis. Analyses were performed using the program R 3.5.0 (<https://www.r-project.org/>).

Results

Out of 500 faecal samples from Psittaciformes and Passeriformes birds, 37 (7.4%) were positive for the presence of specific DNA of *Cryptosporidium* spp. and 15 (3.0%) were microscopically positive for the presence of oocysts of

Cryptosporidium sp. (Table 2). All microscopically positive samples were also positive using PCR.

Out of 37 birds positive for *Cryptosporidium*, 37, 37 and 33 were genotyped by sequence analysis of SSU, actin and HSP70 genes, respectively (Table 2). The remaining four positive samples failed to amplify at the HSP70 locus. Sequence analysis revealed the presence of five different *Cryptosporidium* spp., clustering with *C. avium*, *C. baileyi*, *C. galli*, *Cryptosporidium* avian genotype I and *Cryptosporidium* avian genotype III in ML trees inferred from sequences of SSU, actin and HSP70 (Figs. 1–3). *Cryptosporidium* avian genotype III is described here as a new species, *Cryptosporidium proventriculi* sp. n., and this name will be used in the following text.

Cryptosporidium avian genotype I (n=3) and *C. galli* (n=4) were found only in Passeriformes birds, and infected birds did not shed microscopically detectable oocysts

(Table 2). *Cryptosporidium baileyi* (n=7) was detected in species from the orders Psittaciformes and Passeriformes, with infection intensities less than 10,000 OPG. *Cryptosporidium avium* was detected in two species from the order Psittaciformes. *Cryptosporidium proventriculi* sp. n., which was also exclusive to Psittaciformes, was detected in 21 birds from three species (Table 2), and was the most abundant species detected in this study. Out of 21 birds positive for *C. proventriculi* sp. n., 12 (57%) shed microscopically detectable oocysts, with an infection intensity ranging from 2,000 to 30,000 OPG. Naturally infected cockatiels (ID Nos. 34305, 34320, 34751 and 35506), which were the source of oocysts used in experimental infections, shed oocysts for more than five months (data not shown). None of the monitored birds had diarrhoea at the time of the screening.

Cryptosporidium proventriculi sp. n.

Fifteen cockatiels (12.1%), three red-fronted parrots (11.0%) and three rosy-faced lovebirds (9.7%) were positive for the presence of *C. proventriculi* sp. n. DNA, of which 12 cockatiels and one rosy-faced lovebird shed oocysts detectable by microscopy, with infection intensity ranging from 2,000 to 30,000 OPG (Table 2). Oocyst used for experimental infections had >90% viability, determined by PI staining. SCID mice, budgerigars and chickens were not susceptible to infection with *C. proventriculi* sp. n. oocysts, as determined by PCR and microscopic examination of faecal samples and histological and molecular examination of gastrointestinal tract tissue.

Oocysts of *C. proventriculi* sp. n. were infectious for all cockatiels, with oocysts and specific DNA first detected at six DPI (Fig. 4). Following first detection, specific DNA of *C. proventriculi* sp. n. was detected in the faeces of all animals for the duration of the experiment. In contrast, oocysts were detected by microscopy almost every day (Fig. 4). The infection intensity of *C. proventriculi* sp. n. in cockatiels ranged from 4,000 to 60,000 OPG. Infected birds showed no symptoms of disease and a cockatiel necropsied at 20 DPI had no macroscopic signs of cryptosporidiosis. Developmental stages of *C. proventriculi* sp. n. were not detected by histology, but scanning electron microscopy showed the presence of developmental stages attached to the microvilli in the proventriculus and ventriculus (Fig. 5). Pathological changes were not observed.

At the SSU locus, all isolates of *C. proventriculi* sp. n., from naturally and experimentally infected birds, shared 100% identity with each other and with *Cryptosporidium avium* genotype III from different Psittaciformes hosts worldwide (e.g. HM116385, KX668210 or HM116386; see Table 1 for more details). At the actin locus, all *C. proventriculi* sp. n. isolates shared 100% identity with each other and with GenBank sequences of *Cryptosporidium avium* genotype III obtained from peach-faced lovebirds and cockatiels (e.g. AB471655–AB471658, AB471659 or DQ650350). Par-

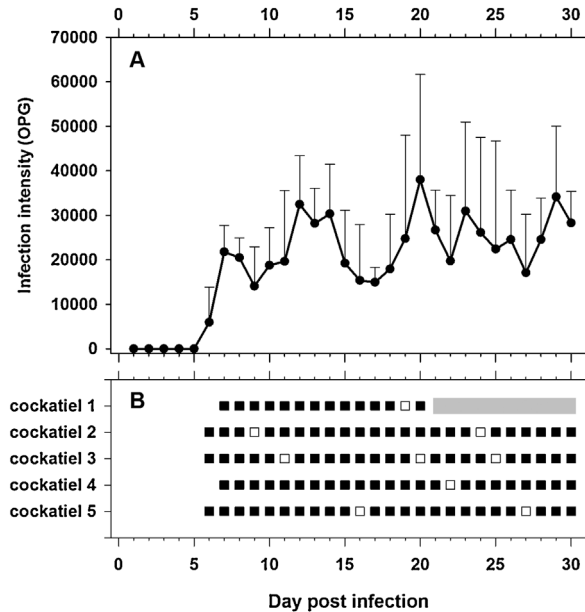


Fig. 4. Course of infection of *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. in experimentally infected cockatiels (*Nymphicus hollandicus*). **A)** Infection intensity as number of oocysts per gram of the faeces (OPG) and **B)** daily shedding of *C. proventriculi* based on coprological and molecular examination of faeces; any square indicates detection of specific DNA, black square indicates microscopic detection of oocysts and grey rectangle indicates sacrifice and dissection.

tial sequences of the HSP70 locus shared 100% identity with each other and shared 98.7% identity with *Cryptosporidium* Eurasian woodcock genotype (AY273773), which was the most similar sequence reported in GenBank.

Taxonomic summary

Description: Oocysts are shed fully sporulated with four sporozoites and an oocyst residuum.

Oocysts of *C. proventriculi* sp. n. originated from naturally infected cockatiels measured $6.70\text{--}8.40\ \mu\text{m}$ (mean \pm S.D. = $7.35 \pm 0.41\ \mu\text{m}$) \times $5.10\text{--}6.3\ \mu\text{m}$ (mean \pm S.D. = $5.70 \pm 0.32\ \mu\text{m}$) with a length/width ratio of 1.08–1.41 (mean \pm S.D. = 1.23 ± 0.11) and were morphometrically identical to those recovered from experimentally infected cockatiels measured $6.60\text{--}8.40\ \mu\text{m}$ (mean \pm S.D. = $7.37 \pm 0.44\ \mu\text{m}$) \times $5.00\text{--}6.40\ \mu\text{m}$ (mean \pm S.D. = $5.80 \pm 0.35\ \mu\text{m}$) with a length/width ratio of 1.06–1.43 (mean \pm S.D. = 1.25 ± 0.10) (Fig. 6). Morphology and morphometry of other developmental stages are unknown.

Type host: cockatiel (*Nymphicus hollandicus*)

Other natural hosts: barred parakeet (*Bolborhynchus lineola*), blue-fronted parrot (*Amazona aestiva*), Forpus sp., galah (*Eolophus roseicapilla*), green-winged saltator (*Serinus canaria*), lovebird (*Agapornis* sp.), java sparrow (*Padda oryzivora*), peach-faced lovebird (*Agapornis roseicollis*), red-billed blue magpie (*Urocissa erythrorhyncha*), red-billed toucan (*Ramphastos tucanus*), red-fronted par-

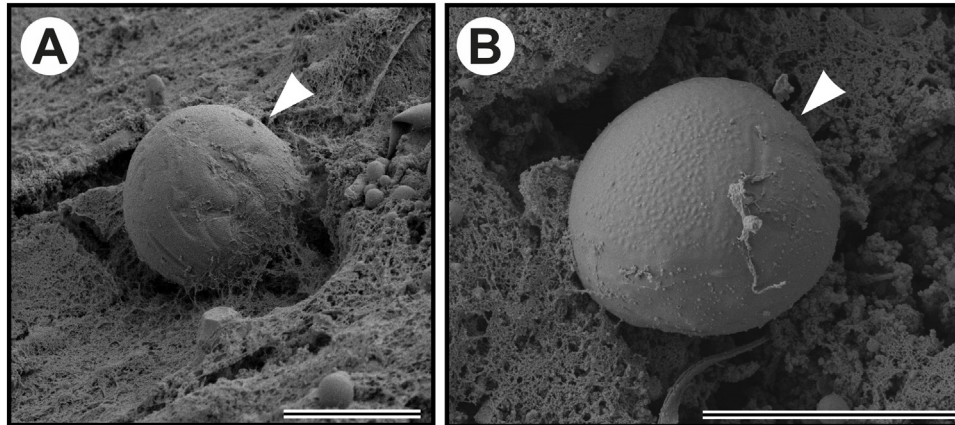


Fig. 5. Scanning electron photomicrograph of the **A**) proventriculus and **B**) ventriculus of a cockatiel (*Nymphicus hollandicus*). Attached developmental stage of *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (arrowhead). Bar = 10 μ m.

rot (*Poicephalus gularis*), rosy-faced lovebird (*Agapornis roseicollis*), rufous-collared sparrow (*Zonotrichia capensis*), saffron toucanet (*Pteroglossus bailloni*), seagull (*Chroicocephalus brunnicephalus* and *ridibundus*), *Sporophila* sp., sun parakeet (*Aratinga solstitialis*) and toco toucan (*Ramphastos toco*) (see [Tables 1 and 2](#)).

Type locality: České Budějovice (Czech Republic)

Other localities: Czech Republic (České Budějovice 48°58'29" N, 14°28'29" E; Lanžhot 48°43'28.03" N, 16°58'0.97" E; Osek u Plzně 49°26'36.33" N, 14°18'0.43" E; Strakonice 49°15'41.39" N, 13°54'8.63" E and Tvrdonice 48°45'37.81" N, 16°59'40.03" E), Slovakia (Košice 48°42'0" N, 21°15'0" E and Žilina 49°13'22" N, 18°44'24" E), Poland (Wrocław 51°7'0" N, 17°2'0" E).

Site of infection: proventriculus and ventriculus ([Fig. 5](#))

Distribution: Australia, Brazil, China, India, Japan, Poland, Slovakia, Spain, Thailand and USA

Prepatent period: 6 DPI (cockatiel)

Patent period: at least 30 DPI in experimentally infected cockatiels and more than 5 months in naturally infected cockatiels.

Type material/hapanotype: Tissue samples in 10% formaldehyde and histological sections of infected ventriculus (nos. 176/2017 and 177/2017) and proventriculus (nos. 199/2017); genomic DNA isolated from faecal samples of naturally (isolation no. 34320) and experimentally (isolation no. 34300) infected cockatiel; genomic DNA isolated from proventriculus and ventricular and of experimentally infected cockatiel (isolation nos. 34300); digital photomicrographs nos. DIC 1–13/34300, MV 1–11/34300, IF 1–9/34300, HI 176–177, 199/2017 and SEM 199/2017) and faecal smear slides with oocysts stained by ACMV staining from experimentally infected cockatiel (nos. 10/34300, 11/34300 and 12/34300). Specimens deposited at the Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Czech Republic.

Reference sequences: Partial sequences of SSU, actin and HSP70 genes were deposited at GenBank under Acc.

Nos. MK311133, MK311150 and MK311167, respectively.

Etymology: The species name is derived from the Latin noun ‘proventriculus’, because the described *Cryptosporidium* species predominantly inhabits this part of digestive tract of its hosts.

Differential diagnosis: Oocysts in faecal smears showed typical *Cryptosporidium* ACMV ([Fig. 6](#)) and Ziehl-Neelsen ([Fig. 6](#)) staining characteristics. Fixed *C. proventriculi* sp. n. oocysts are detectable with a FITC conjugated anti-*Cryptosporidium* oocyst wall antibody developed primarily for *C. parvum* ([Fig. 6](#)). Oocysts of *C. proventriculi* are larger than those of *C. avium* and *C. baileyi* ($P=0.001$) and marginally smaller than *C. galli*. *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. can be differentiated genetically from other *Cryptosporidium* spp. based on sequences of SSU, actin and HSP70 genes.

Discussion

Birds are naturally infected with several *Cryptosporidium* spp. While *C. meleagridis*, *C. galli* and *C. baileyi* infect a large number of birds across several avian orders, *C. avium* and most of the avian genotypes exhibit a narrow host specificity ([Holubová et al. 2016](#)). Although *C. proventriculi* sp. n. has been reported from birds in the orders Psittaciformes, Passeriformes, Piciformes and Anseriformes, it has been reported predominantly in Psittaciformes birds ([Cano et al. 2016](#); [Ferrari et al. 2018](#); [Koompaong et al. 2014](#); [Li et al. 2015](#); [Ravich et al. 2014](#)). Consistent with those reports, we found *C. proventriculi* sp. n. exclusively in Psittaciformes birds, and we identified the red-fronted parrot and rosy-faced lovebird as novel hosts in that order.

Cryptosporidiosis in birds manifests in various clinical forms depending on the species of *Cryptosporidium* and the site of infection ([Nakamura and Meireles 2015](#)). Despite the relatively large number of studies and descriptions of sev-

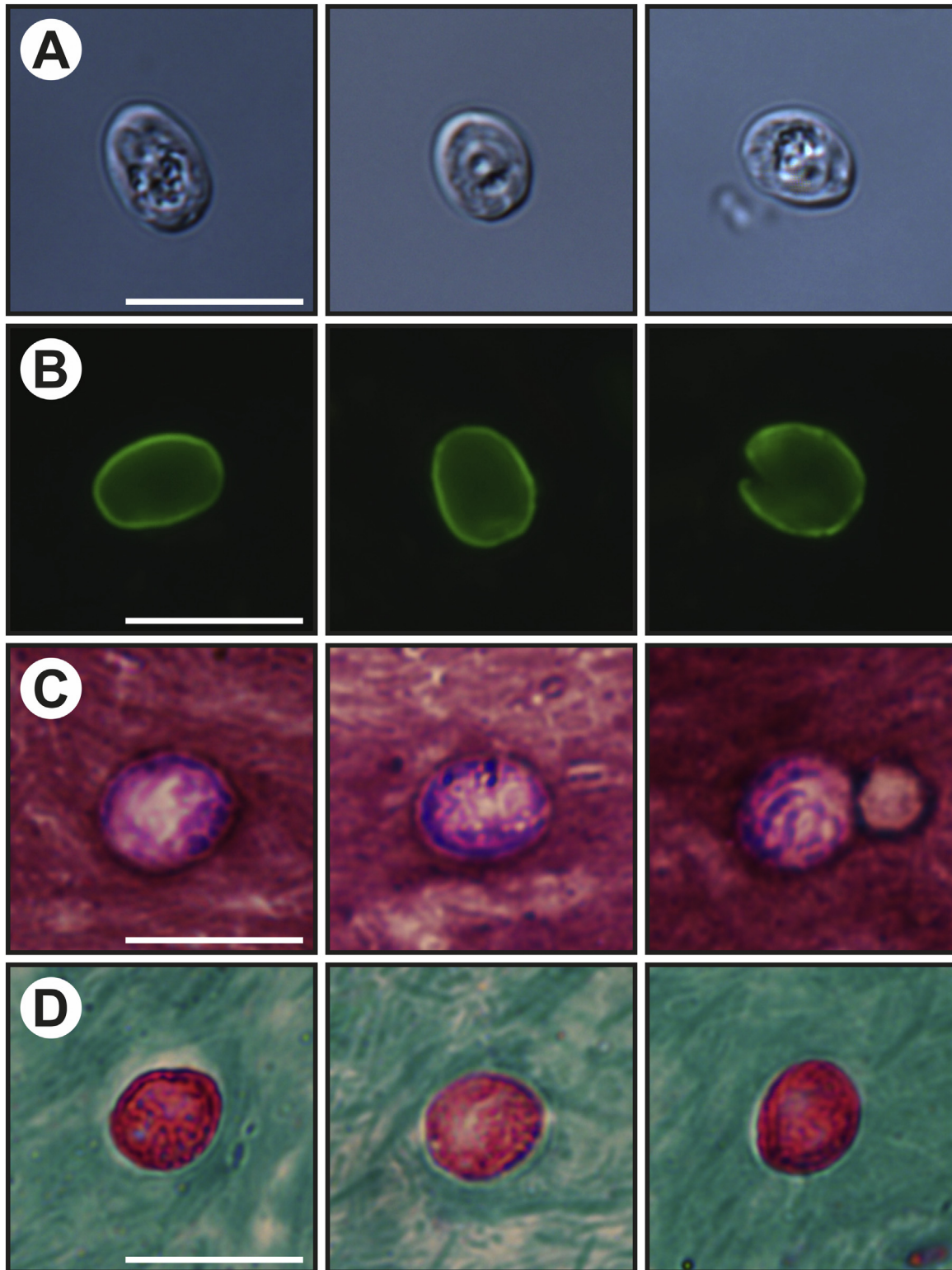


Fig. 6. *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. oocysts visualized in various preparations: **A)** differential interference contrast microscopy, **B)** labelling with anti-*Cryptosporidium* FITC-conjugated antibody, **C)** aniline-carbol-methyl violet staining and **D)** Ziehl-Neelsen staining. Bar = 10 μ m.

eral *Cryptosporidium* genotypes, knowledge of the course of infection and disease presentation of *Cryptosporidium* in birds remains quite poor. *Cryptosporidium galli* is the only well-studied gastric *Cryptosporidium* species in birds. Unlike gastric *Cryptosporidium* species infecting mammals, which generally do not cause morbidity and mortality, *C. galli* is associated with clinical disease and high mortality in birds (Blagburn et al. 1987; Blagburn et al. 1990; Morgan et al. 2001; Pavlásek 1999, 2001). However, similar to Ng et al. (2006), we found that *C. proventriculi* does not cause clinical disease or mortality in naturally or experimentally infected birds. Ravich et al. (2014) reported proventricular and ventricular cryptosporidiosis in 31 birds at necropsy and found evidence that *Cryptosporidium* was the likely cause of death in 10 of those birds. The authors identified *C. proventriculi* from samples of two birds, which were the only samples subjected to genotyping, but it is not clear whether those birds were among the 10 that likely died from cryptosporidiosis. While *C. proventriculi* could be the cause of death in those birds, infection by other *Cryptosporidium* species cannot be ruled out. Makino et al. (2010) described clinical gastrointestinal signs such as chronic vomiting, melena and weight loss in 20 out of 37 peach-faced lovebirds naturally infected with *C. proventriculi*. Radiographic examination showed enlargement of the isthmi and thickened proventricular walls in 16 of the 20 symptomatic birds. Necropsy and histopathologic examination of three dead birds showed enlargement of the proventriculus and isthmi with mucosal hypertrophy observed on the sagittal plane. The progressive weight loss with severely atrophied thoracic muscles was characteristic for all three affected birds. Histopathologically, extensive hyperplasia of the ductal epithelium of the proventricular glands was observed. Similarly, Blagburn et al. (1990) and Morgan et al. (2001) reported histopathological changes similar to those caused by *C. galli* infection in the Australian diamond firetail finch and other finches infected with *Cryptosporidium* sp. and *C. proventriculi*, respectively. In contrast, we found no histopathological changes in birds infected with *C. proventriculi*. These differences can be explained by the length of the ongoing infection. While our experiments lasted only 30 days, naturally infected birds could be infected for many months. Similarly, histopathological changes and clinical signs were observed in mammals chronically infected with the gastric species *C. proliferans*, *C. andersoni* or *C. muris* (Anderson 1987; Esteban and Anderson 1995; Kváč et al. 2016; Ozkul and Aydin 1994; Pospischil et al. 1987).

Course of infection, including prepatent and patent period, of avian-derived *Cryptosporidium* is currently known only in the four valid avian species (Current et al. 1986; Holubová et al. 2016; Ryan et al. 2003b; Slavin 1955). The prepatent period of *C. proventriculi* sp. n. (6 DPI) was similar to *C. meleagridis* and *C. baileyi*, which infect the intestine (4–8 days; Hornok et al. 1999; Lindsay et al. 1988; Rhee et al. 1991; Tůmová et al. 2002), and much shorter than the 25 days reported for *C. galli* infection in the proventriculus of chickens (Pavlásek 2001).

Oocysts of *C. proventriculi* sp. n. are morphometrically identical to those reported as *Cryptosporidium* avian genotype III (Ng et al. 2006). Although they are smaller than those of *C. galli* (Ryan et al. 2003b) and Eurasian woodcock genotype (Ryan et al. 2003a), the difference is marginal and not practically useful for differentiation (Horčíčková et al. 2018).

Cryptosporidium proventriculi sp. n. is genetically distinct from other known species of *Cryptosporidium*, sharing 98.4 and 94.5% sequence identity, respectively, with *Cryptosporidium* Eurasian woodcock genotype and *C. galli* at the SSU locus and sharing 98.9 and 96.9% identity, respectively, at the actin locus. In comparison, *C. muris* and *C. andersoni* share 96–99% identity and *C. hominis* and *C. parvum* share 98–99% identity at these loci.

In conclusion, morphological, genetic, and biological data support the establishment of *Cryptosporidium* avian genotype III as a new species. According to ICZN and criteria for naming species, we propose the name *Cryptosporidium proventriculi*.

Author contributions

N.H., M.K. and B.S. conceptualised the project; Z.K., D.R., N.H. and V.Z. collected samples; N.H., M.K., V.Z. and Z.L. carried out the research; M.K., N.H. and J.M. performed phylogenetic analysis; B.S. and R.K. performed histology and electron microscopy analysis; L.H. took care of experimental animals and M.K., N.H., J.M. wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This study was funded by the Czech Science Foundation (18-12364S), Grant Agency of University of South Bohemia (017/2018/Z) and supported by MEYS CR (LM2015062 Czech-BioImaging).

References

- Abe, N., Makino, I., 2010. Multilocus genotypic analysis of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels, Japan. *Parasitol. Res.* 106, 1491–1497. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1810-5>.
- Anderson, B.C., 1987. Abomasal cryptosporidiosis in cattle. *Vet. Pathol.* 24, 235–238.
- Arrowood, M.J., Donaldson, K., 1996. Improved purification methods for calf-derived *Cryptosporidium parvum* oocysts using discontinuous sucrose and cesium chloride gradients. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43, 89S.
- Baroudi, D., Khelef, D., Goucem, R., Adjou, K.T., Adamu, H., Zhang, H., Xiao, L., 2013. Common occurrence of zoonotic pathogen *Cryptosporidium meleagridis* in broiler chickens and turkeys in Algeria. *Vet. Parasitol.* 196, 334–340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.02.022>.

- Blagburn, B.L., Lindsay, D.S., Giambone, J.J., Sundermann, C.A., Hoerr, F.J., 1987. *Experimental cryptosporidiosis in broiler chickens*. *Poult. Sci.* 66, 442–449.
- Blagburn, B.L., Lindsay, D.S., Hoerr, F.J., Atlas, A.L., Toivio-Kinnucan, M., 1990. *Cryptosporidium* sp. infection in the proventriculus of an Australian diamond firetail finch (*Staganoplera bella*: Passeriformes, Estrildidae). *Avian Dis.* 34, 1027–1030, <http://dx.doi.org/10.2307/1591401>.
- Camargo, V.D., Santana, B.N., Ferrari, E.D., Nakamura, A.A., Nagata, W.B., Nardi, A.R.M., Meireles, M.V., 2018. Detection and molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in captive canaries (*Serinus canaria*) using different diagnostic methods. *Rev. Bras. Parasitol.* 27, 61–66, <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-296120180010>.
- Cano, L., de Lucio, A., Bailo, B., Cardona, G.A., Muadica, A.S.O., Lobo, L., Carmena, D., 2016. Identification and genotyping of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. isolates in aquatic birds in the Salburua wetlands, Alava, Northern Spain. *Vet. Parasitol.* 221, 144–148, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.03.026>.
- Chalmers, R.M., Perez-Cordon, G., Caccio, S.M., Klotz, C., Robertson, L.J., Genotyping, C., 2018. *Cryptosporidium* genotyping in Europe: The current status and processes for a harmonised multi-locus genotyping scheme. *Exp. Parasitol.* 191, 25–30, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2018.06.004>.
- Chelladurai, J.J., Clark, M.E., Kváč, M., Holubová, N., Khan, E., Stenger, B.L., Giddings, C.W., McEvoy, J., 2016. *Cryptosporidium galli* and novel *Cryptosporidium* avian genotype VI in North American red-winged black-birds (*Agelaius phoeniceus*). *Parasitol. Res.* 115, 1901–1906, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-4930-8>.
- Current, W.L., Upton, S.J., Haynes, T.B., 1986. The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *J. Protozool.* 33, 289–296, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.1986.tb05608.x>.
- Esteban, E., Anderson, B.C., 1995. *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. *J. Dairy Sci.* 78, 1068–1072, [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(95\)76723-6](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(95)76723-6).
- Ferrari, E.D., Nakamura, A.A., Nardi, A.R.M., Santana, B.N., da Silva Camargo, V., Nagata, W.B., Bresciani, K.D.S., Meireles, M.V., 2018. *Cryptosporidium* spp. in caged exotic psittacines from Brazil: Evaluation of diagnostic methods and molecular characterization. *Exp. Parasitol.* 184, 109–114, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2017.12.004>.
- Gomes, R.S., Huber, F., da Silva, S., do Bomfim, T.C., 2012. *Cryptosporidium* spp. parasitize exotic birds that are commercialized in markets, commercial aviaries, and pet shops. *Parasitol. Res.* 110, 1363–1370, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2636-5>.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704, <http://dx.doi.org/10.1080/10635150390235520>.
- Helmy, Y.A., Krucken, J., Abdelwhab, E.M., von Samson-Himmelstjerna, G., Hafez, H.M., 2017. Molecular diagnosis and characterization of *Cryptosporidium* spp. in turkeys and chickens in Germany reveals evidence for previously undetected parasite species. *PLoS One* 12, e0177150, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0177150>.
- Henriksen, S.A., Pohlenz, J.F., 1981. *Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique*. *Acta Vet. Scand.* 22, 594–596.
- Holubová, N., Sak, B., Horčíčková, M., Hlášková, L., Květoňová, D., Menchaca, S., McEvoy, J., Kváč, M., 2016. *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitol. Res.* 115, 2243–2251, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-016-4967-8>.
- Horčíčková, M., Čondlová, S., Holubová, N., Sak, B., Květoňová, D., Hlášková, L., Konečný, R., Sedláček, F., Clark, M., Giddings, C., McEvoy, J., Kváč, M., 2019. Diversity of *Cryptosporidium* in common voles and description of *Cryptosporidium alticolis* sp. n. and *Cryptosporidium microti* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Parasitology* 146, 220–233, <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182018001142>.
- Hornok, S., Szell, Z., Shibalova, T.A., Varga, I., 1999. *Study on the course of Cryptosporidium baileyi infection in chickens treated with interleukin-1 or indomethacin*. *Acta Vet. Hung.* 47, 207–216.
- Iijima, Y., Itoh, N., Phrompraphai, T., Ito, Y., Kimura, Y., Kameshima, S., 2018. Molecular prevalence of *Cryptosporidium* spp: among companion birds kept in pet shops in Japan. *Kor. J. Parasitol.* 56, 281–285, <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.2018.56.3.281>.
- Jellison, K.L., Distel, D.L., Hemond, H.F., Schauer, D.B., 2004. Phylogenetic analysis of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada geese (*Branta canadensis*): evidence for five novel genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 452–458, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.1.452-458.2004>.
- Kilani, R.T., Sekla, L., 1987. *Purification of Cryptosporidium oocysts and sporozoites by cesium chloride and Percoll gradients*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 36, 505–508.
- Koompong, K., Mori, H., Thammasonthijareern, N., Prasertbun, R., Pintong, A.R., Popruk, S., Rojekkittikhun, W., Chaisiri, K., Sukthana, Y., Mahittikorn, A., 2014. Molecular identification of *Cryptosporidium* spp. in seagulls, pigeons, dogs, and cats in Thailand. *Parasite* 21, 52, <http://dx.doi.org/10.1051/Parasite/2014053>.
- Kváč, M., Havrdová, N., Hlášková, L., Daňková, T., Kanděra, J., Ježková, J., Vítovec, J., Sak, B., Ortega, Y., Xiao, L., Modrý, D., Chelladurai, J.R., Prantlová, V., McEvoy, J., 2016. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *PLoS One* 11, e0147090, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0147090>.
- Kváč, M., Hofmannová, L., Hlášková, L., Květoňová, D., Vítovec, J., McEvoy, J., Sak, B., 2014. *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Vet. Parasitol.* 201, 9–17, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.014>.
- Kváč, M., Ondráčková, Z., Květoňová, D., Sak, B., Vítovec, J., 2007. Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Vet. Parasitol.* 143, 229–233, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.031>.
- Li, W., Li, Y., Song, M., Lu, Y., Yang, J., Tao, W., Jiang, Y., Wan, Q., Zhang, S., Xiao, L., 2015. Prevalence and genetic characteristics of *Cryptosporidium*, *Enterocytozoon bieneusi* and *Giardia duodenalis* in cats and dogs in Hei-

- longjiang province, China. *Vet. Parasitol.* 208, 125–134, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.01.014>.
- Lindsay, D.S., Blagburn, B.L., Sundermann, C.A., Giambone, J.J., 1988. Effect of broiler chicken age on susceptibility to experimentally induced *Cryptosporidium baileyi* infection. *Am. J. Vet. Res.* 49, 1412–1414.
- Liu, X., He, T., Zhong, Z., Zhang, H., Wang, R., Dong, H., Wang, C., Li, D., Deng, J., Peng, G., Zhang, L., 2013. A new genotype of *Cryptosporidium* from giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) in China. *Parasitol. Int.* 62, 454–458, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2013.06.004>.
- Makino, I., Abe, N., Reavill, D.R., 2010. *Cryptosporidium* avian genotype III as a possible causative agent of chronic vomiting in peach-faced lovebirds (*Agapornis roseicollis*). *Avian Dis.* 54, 1102–1107, <http://dx.doi.org/10.1637/9227-123009-Case.1>.
- Makino, I., Inumaru, M., Abe, N., Sato, Y., 2018. A new avian *Cryptosporidium* genotype in a 1-month-old caged brown wood owl (*Strix leptogrammica*) with severe dehydration and diarrhea. *Parasitol. Res.* 117, 3003–3008, <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-018-5951-2>.
- Miláček, P., Vítovec, J., 1985. Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 32, 50.
- Morgan, U.M., Monis, P.T., Xiao, L., Limor, J., Sulaiman, I., Raidal, S., O'Donoghue, P., Gasser, R., Murray, A., Fayer, R., Blagburn, B.L., Lal, A.A., Thompson, R.C., 2001. Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. *Int. J. Parasitol.* 31, 289–296.
- Morgan, U.M., Xiao, L., Limor, J., Gelis, S., Raidal, S.R., Fayer, R., Lal, A., Elliot, A., Thompson, R.C., 2000. *Cryptosporidium meleagridis* in an Indian ring-necked parrot (*Psittacula krameri*). *Aust. Vet. J.* 78, 182–183.
- Nakamura, A.A., Homem, C.G., da Silva, A.M., Meireles, M.V., 2014. Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. *Vet. Parasitol.* 205, 7–13, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.07.033>.
- Nakamura, A.A., Meireles, M.V., 2015. *Cryptosporidium* infections in birds—a review. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 24, 253–267, <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612015063>.
- Nakamura, A.A., Simoes, D.C., Antunes, R.G., da Silva, D.C., Meireles, M.V., 2009. Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp: from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. *Vet. Parasitol.* 166, 47–51, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.07.033>.
- Ng, J., Pavlásek, I., Ryan, U., 2006. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7548–7553, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.01352-06>.
- Novaes, R.S., Pires, M.S., Sudre, A.P., do Bomfim, T.C.B., 2018. Captive-bred neotropical birds diagnosed with *Cryptosporidium* avian genotype III. *Acta Trop.* 178, 297–302, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.013>.
- Oliveira, B.C.M., Ferrari, E.D., Panegossi, M.F.D., Nakamura, A.A., Corbucci, F.S., Nagata, W.B., dos Santos, B.M., Gomes, J.F., Meireles, M.V., Widmer, G., Bresciani, K.D.S., 2017. First description of *Cryptosporidium parvum* in carrier pigeons (*Columba livia*). *Vet. Parasitol.* 243, 148–150, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.023>.
- Ozkul, I.A., Aydin, Y., 1994. Natural *Cryptosporidium muris* infection of the stomach in laboratory mice. *Vet. Parasitol.* 55, 129–132.
- Pavlásek, I., 1999. Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum specificity and the environment. *Klin. Microbiol. Infekc. Lek.* 3, 290–301.
- Pavlásek, I., 2001. Findings of cryptosporidia in the stomach of hens and of exotic and wild birds. *Veterinářství (Czech)* 51, 103–108.
- Pospischil, A., Stiglmaier-Herb, M.T., von Hegel, G., Wiesner, H., 1987. Abomasal cryptosporidiosis in mountain gazelles. *Vet. Rec.* 121, 379–380.
- Qi, M., Huang, L., Wang, R., Xiao, L., Xu, L., Li, J., Zhang, L., 2014. Natural infection of *Cryptosporidium muris* in ostriches (*Struthio camelus*). *Vet. Parasitol.* 205, 518–522, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.06.035>.
- Qi, M., Wang, R., Ning, C., Li, X., Zhang, L., Jian, F., Sun, Y., Xiao, L., 2011. *Cryptosporidium* spp: in pet birds: genetic diversity and potential public health significance. *Exp. Parasitol.* 128, 336–340, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.04.003>.
- Ravich, M.L., Reavill, D.R., Hess, L., Childress, A.L., Wellehan Jr., J.F., 2014. Gastrointestinal cryptosporidiosis in captive psittacine birds in the United States: a case review. *J. Avian. Med. Surg.* 28, 297–303, <http://dx.doi.org/10.1647/1082-6742-28.4.297>.
- Rhee, J.K., Seu, Y.S., Park, B.K., 1991. Isolation and identification of *Cryptosporidium* from various animals in Korea: III, Identification of *Cryptosporidium baileyi* from Korean chicken. *Korean J. Parasitol.* 29, 315–324, <http://dx.doi.org/10.3347/kjp.1991.29.4.315>.
- Ryan, U., 2010. *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Exp. Parasitol.* 124, 113–120, <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.02.002>.
- Ryan, U., Fayer, R., Xiao, L., 2014. *Cryptosporidium* species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology* 141, 1667–1685, <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182014001085>.
- Ryan, U., Xiao, L., Read, C., Zhou, L., Lal, A.A., Pavlásek, I., 2003a. Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 4302–4307, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.69.7.4302-4307.2003>.
- Ryan, U.M., Xiao, L., Read, C., Sulaiman, I.M., Monis, P., Lal, A.A., Fayer, R., Pavlásek, I., 2003b. A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlásek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *J. Parasitol.* 89, 809–813, <http://dx.doi.org/10.1645/GE-74RI>.
- Santín, M., Trout, J.M., Xiao, L., Zhou, L., Greiner, E., Fayer, R., 2004. Prevalence and age-related variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Vet. Parasitol.* 122, 103–117.
- Sauch, J.F., Flanigan, D., Galvin, M.L., Berman, D., Jakubowski, W., 1991. Propidium iodide as an indicator of *Giardia* cyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 57, 3243–3247.
- Slavin, D., 1955. *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.* 65, 262–266.
- Smith, H.V., Caccio, S.M., Cook, N., Nichols, R.A., Tait, A., 2007. *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Vet. Parasitol.* 149, 29–40.
- Sreter, T., Varga, I., 2000. Cryptosporidiosis in birds—a review. *Vet. Parasitol.* 87, 261–279, [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00178-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00178-8).
- Sulaiman, I.M., Morgan, U.M., Thompson, R.C., Lal, A.A., Xiao, L., 2000. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein

- (HSP70) gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2385–2391, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.66.6.2385-2391.2000>.
- Tamura, K., 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9, 678–687.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739, <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121>.
- Tavaré, S., 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. In: Miura, R.M. (Ed.), *Some Mathematical Questions in Biology: DNA Sequence Analysis (Lectures on Mathematics in the Life Sciences)*. American Mathematical Society, New York, pp. 57–86.
- Tůmová, E., Skřivan, M., Marounek, M., Pavlásek, I., Ledvinka, Z., 2002. Performance and oocyst shedding in broiler chickens orally infected with *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Avian Dis.* 46, 203–207, [http://dx.doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0203:PAOSIB\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0203:PAOSIB]2.0.CO;2).
- Wang, Y., Yang, W., Cama, V., Wang, L., Cabrera, L., Ortega, Y., Bern, C., Feng, Y., Gilman, R., Xiao, L., 2014. Population genetics of *Cryptosporidium meleagridis* in humans and birds: evidence for cross-species transmission. *Int. J. Parasitol.* 44, 515–521, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.03.003>.
- Xiao, L., Morgan, U.M., Limor, J., Escalante, A., Arrowood, M., Shulaw, W., Thompson, R.C., Fayer, R., Lal, A.A., 1999. Genetic diversity within *Cryptosporidium parvum* and related *Cryptosporidium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3386–3391.
- Xiao, L., Ryan, U.M., 2004. Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 17, 483–490, <http://dx.doi.org/10.1097/00001432-200410000-00014>.
- Zhou, L., Kassa, H., Tischler, M.L., Xiao, L., 2004. Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4211–4215, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.7.4211-4215.2004>.