

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.

**Kuřecí embrya jako inkubátor pro pomnožení  
parazitů rodu *Cryptosporidium***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

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

Školitel specialista: Ing. Nikola Holubová

Vypracovala: Tereza Schulzová

České Budějovice, 2020

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 6. dubna 2020

.....

Tereza Schulzová

## Poděkování

Děkuji prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., vedoucímu bakalářské práce, za trpělivost, vstřícnost a odborné vedení mé práce. Dále děkuji mé školitelce specialistce Ing. Nikole Holubové za pomoc v laboratoři a užitečné rady. Děkuji také pracovníkům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie Parazitologického ústavu, BC AV ČR, v.v.i. za ochotu a v neposlední řadě děkuji mé rodině za porozumění a podporu.

Tuto bakalářskou práci finančně podpořila Grantová agentura České republiky (číslo grantu 18-12364S, řešitel prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.) a Grantová agentura Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (GAJU 040/2019/Z, řešitelka Ing. Nikola Holubová).

## **ABSTRAKT**

Cílem této práce bylo zjistit, do jaké míry může infekce kuřat ve stadiu embrya zvýšit produkci oocyst rodu *Cryptosporidium* následně vylíhnutými kuřaty. Devítidenní kuřecí embrya a jednodenní kuřata byla experimentálně infikována různými dávkami oocyst *Cryptosporidium baileyi* a *Cryptosporidium parvum*. Po vylíhnutí měla všechna kuřata prokazatelnou infekci a velikost infekční dávky neměla vliv na průběh infekce. Kuřata infikovaná jako embrya vylučovala oocysty ihned po vylíhnutí a v průběhu infekce vylučovala výrazně více oocyst než kuřata infikovaná ve stáří jednoho dne. U kuřat infikovaných jako embrya byl druh *C. baileyi* nalezen ve všech orgánech s výjimkou mozku, s nejvyšší infekcí v průdušnici a jícnu, a *C. parvum* byl nalezen pouze v gastrointestinálním traktu a průdušnici, s nejvyšší infekcí ve střevech a kloace. U jednodenních kuřat byl druh *C. baileyi* nalezen pouze v gastrointestinálním traktu a průdušnici, s nejvyšší infekcí ve střevech. Kuřata infikovaná *C. baileyi* jako embrya uhynula do 16 dnů po vylíhnutí. Všechna ostatní kuřata infekci ztratila během 13–25 dnů. Na základě těchto zjištění by mohla být infekce kuřecích embryí využita jako finančně efektivní laboratorní model pro produkci kryptosporidií.

## **KLÍČOVÁ SLOVA:**

*Cryptosporidium baileyi*; *Cryptosporidium parvum*; infekce; kuřecí embryo; vejce

## **ABSTRACT**

This study aimed to determine the extent to which infection at the embryo stage can enhance the propagation of *Cryptosporidium* oocysts in chickens. Nine-day-old chicken embryos and one-day-old chickens were experimentally infected with different doses of *Cryptosporidium baileyi* and *Cryptosporidium parvum* oocysts. Post hatching, all chickens had demonstrable infections, and the infection dose had no effect on the course of infection. Chickens infected as embryos shed oocysts immediately after hatching and, over the course of the infection, they shed significantly more oocysts than infected one-day-old chickens. In chickens infected as embryos, *C. baileyi* was found in all organs except the brain, with highest infections in the trachea and oesophagus, and *C. parvum* was found only in the gastrointestinal tract and trachea, with highest infections in the gut and cloaca. In one-day-old infected chickens, *C. baileyi* was found only in the gastrointestinal tract and trachea, with highest infections in the gut. Chickens infected as embryos with *C. baileyi* died within 16 days of hatching. All other chickens cleared the infection within 13–25 days. Based on these findings, infection of chicken embryos could serve as a cost effective and simple model for the propagation of *Cryptosporidium* spp.

## **KEYWORDS:**

*Cryptosporidium baileyi*; *Cryptosporidium parvum*; inoculation; chicken embryo; egg

## Obsah

1	ÚVOD .....	8
2	LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	9
2.1	Kur domácí .....	9
2.2	Historie kryptosporidií .....	9
2.3	Taxonomie kryptosporidií .....	9
2.4	Vývojový cyklus kryptosporidií .....	10
2.5	Hostitelská, tkáňová a věková specifita kryptosporidií.....	10
2.6	Přenos infekce .....	11
2.7	Patogenita a klinické příznaky kryptosporidiových infekcí .....	12
2.8	Léčba kryptosporidiových infekcí .....	12
2.9	Kryptosporidie a kryptosporidióza u kura domácího.....	13
2.9.1	<i>Cryptosporidium baileyi</i> .....	13
2.9.2	<i>Cryptosporidium parvum</i> .....	14
2.10	<i>In-vitro</i> a <i>in-vivo</i> kultivace .....	14
3	CÍLE PRÁCE .....	16
4	MATERIÁL A METODIKA.....	17
4.1	Materiál.....	17
4.1.1	Zvířata pro pokus .....	17
4.1.2	Oocysty kryptosporidií pro experimentální účely .....	17
4.2	Metody.....	18
4.2.1	Čištění oocyst na sacharózovém gradientu (Arrowood et Stearling 1987) .....	18
4.2.2	Čištění oocyst na cesium chloridu (Arrowood et Donaldson 1996) .....	18
4.2.3	Ošetření infekční dávky .....	19
4.2.4	Stanovení intenzity infekce.....	19
4.2.5	Inkubace a líhnutí vajec.....	20
4.2.6	Barvení oocyst dle Miláčka a Vítovce (Miláček et Vítovec 1985).....	20
4.2.7	Izolace DNA z trusu .....	20
4.2.8	Izolace DNA z tkáně.....	21
4.2.9	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	22
4.2.10	Gelová elektroforéza .....	22
4.2.11	Izolace z gelu.....	23
4.2.12	Sekvenace .....	24

4.2.13	Design experimentu .....	24
4.2.14	Statistická analýza .....	25
5	VÝSLEDKY .....	26
5.1	Molekulární charakteristika používaných izolátů kryptosporidií.....	26
5.2	Průběh infekce u kuřat inokulovaných ve stadiu embrya .....	26
5.3	Průběh infekce u kuřat infikovaných ve stáří jednoho dne.....	27
5.4	Šíření kryptosporidií v těle a v orgánech.....	30
5.5	Produkce oocyst .....	31
6	DISKUZE .....	34
7	ZÁVĚR .....	37
8	PŘEHLED LITERATURY.....	38

## 1 ÚVOD

Rod *Cryptosporidium* (Apicomplexa) zahrnuje výhradně paraziticky žijící protista infikující převážně epitelální buňky gastrointestinálního traktu hostitelů patřících do všech tříd obratlovců (Monis et Thompson 2003). Kryptosporidie jsou velmi častou příčinou průjmových onemocnění člověka, zejména dětí, starších osob a pacientů s různým stupněm imunodeficience (Canning 1990).

Přestože jsou kryptosporidie intenzivně zkoumány více než tři desetiletí, není v současné době k dispozici 100% účinný lék (Wang et al. 2018). Pro rozvoj vědního oboru včetně vývoje účinné léčby nebo pochopení hostitelské specifity je důležitý dostatečný počet modelových organismů a infekčních oocyst, což představuje zásadní problém ve výzkumu kryptosporidií. V současné době není k dispozici žádná univerzální metoda *in-vitro* kultivace kryptosporidií a nedostatek oocyst ztěžuje úzká hostitelská specifita kryptosporidií (Arrowood 2002). K vědeckým účelům lze dosud využít pouze dva druhy kryptosporidií, *C. parvum* a *C. muris*, které jsou komerčně dostupné (Kváč et al. 2008).

V roce 2014 bylo publikováno úspěšné pomnožení *C. baileyi*, druhu hostitelsky specifického pro ptáky, a *C. parvum*, druhu specifického pro savce, v embryích kura domácího (Huang et al. 2014). Tento výzkum nebyl dosud nijak intenzivně vědecky rozvíjen.

Dosud nezodpovězenou a neotestovanou otázkou zůstává, zda jsou embrya kuřat vnímavá k infekci hostitelsky nespecifických druhů a genotypů kryptosporidií. Vzhledem k tomu, že v řadě epidemiologických studií byly u ptáků v malém procentu případů detekovány savčí druhy a genotypy kryptosporidií (Ng et al. 2006; Zhou et al. 2004) lze předpokládat, že za určitých podmínek mohou být ptáci vnímaví k různým druhům a genotypům kryptosporidií. Výše uvedená domněnka byla testována v této práci.



## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Kur domácí

Pochází z kura bankivského, který se divoce vyskytuje v jihovýchodní Asii. Domestikovaný kur je velmi adaptabilní na podmínky prostředí a systém chovu, má vysokou reprodukční schopnost, ranou pohlavní dospělost a také vysokou intenzitu růstu. Má schopnost rychlé přeměny rostlinné hmoty na živočišnou (maso, vejce) s velice dobrými nutričními hodnotami. U slepic existují dva užitkové směry, nosný a masný, lišící se stavbou těla a fyziologickými funkcemi (Ledvinka 2009).

### 2.2 Historie kryptosporidií

Za objevitele kryptosporidií je považován E. E. Tyzzer, který roku 1907 našel tyto prvky ve sliznici žaludku u laboratorních myší a pojmenoval je *C. muris* (Tyzzer 1907). Roku 1912 detekoval a popsal druh nalezený v tenkém střevě myši, jehož oocysty byly výrazně menší než u *C. muris*, a pojmenoval ho *C. parvum* (Tyzzer 1912). O několik let později popsal další druh nalezený u kuřat, velmi podobný druhu *C. parvum* (Tyzzer 1929). V roce 1955 Slavin popsal druh způsobující mortalitu v chovech krůt a pojmenoval ho *C. meleagridis* (Slavin 1955).

Velký zájem o kryptosporidie vzrostl až v roce 1976 s prvními případy nákazy u lidí (Meisel et al. 1976; Nime et al. 1976) a při masivní epidemii kryptosporidiózy v americkém městě Milwaukee, kde došlo díky přítomnosti oocyst ve vodě k nákaze u více jak 400 tisíc lidí (MacKenzie et al. 1994). Doposud je známo 44 druhů a více než 100 genotypů kryptosporidií (Holubová et al. 2019; Kváč et al. 2016).

### 2.3 Taxonomie kryptosporidií

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou eukaryotické organismy z kmene Apicomplexa. Mají apikální komplex, díky kterému dochází k infekci hostitelské buňky. Jejich životní cyklus se velmi podobá vývojovému cyklu kokcií, a tak mezi ně byly jeden čas řazeny. Oocysty kryptosporidií jsou ale na rozdíl od oocyst kokcií infekční ihned po vyloučení z těla hostitele (Fayer et al. 1997; Xiao et al. 2015). Na základě molekulárních analýz byla prokázána příbuznost kryptosporidií s gregarinami (Carreno et al. 1999).

## 2.4 Vývojový cyklus kryptosporidií

Vývojový cyklus kryptosporidií je monoxenní a skládá se ze 4 fází: excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie. Po vniknutí oocyst do příslušného hostitele dojde k excystaci, což je uvolnění sporozoitů z oocysty (Fayer et Leek 1984). Uvolnění infekční sporozoiti napadají epitelální buňky tenkého střeva a sliznici žaludku, případně respiračního traktu (Current et Garcia 1991). Dále probíhá merogonie, neboli asexuální množení, kdy dochází ke vzniku dvou typů merontů; meronti typu I a meronti typu II (Hijawi et al. 2004). Meront typu I má 6–8 jader a vytváří 6–8 merozoitů. Merozoiti z merontu typu I napadají další epitelální buňky a množí se nepohlavním dělením. Z merozoitu typu I následně vzniká meront typu II, který má 4 jádra a vytváří 4 merozoity. Merozoiti z merontu typu II napadají nové hostitelské buňky, v nichž se transformují na pohlavní stádia a dochází u nich k pohlavnímu rozmnožování (gamogonie). Při gamogonii vznikají gamonti, které lze rozdělit na samčí mikrogamonty a samičí makrogamonty. Z mikrogamontu se uvolňují pohyblivé mikrogamety, které oplodní makrogamety vzniklé z makrogamontů a dochází k formování zygoty. Vzniklá zygota prodělá sporogonii, což je vznik oocysty. U střevních kryptosporidií mohou vzniknout 2 typy oocyst. Silnostěnné oocysty se vyskytují více, jsou vylučovány z těla hostitele spolu s výkaly nebo výtoky z dýchacího traktu a díky tomu dochází k infekci jiných zvířat. Tenkostěnné oocysty, které se vyskytují výrazně méně, nejsou nijak vylučovány z těla hostitele. Excystují uvnitř a dochází k takzvané autoinfekci (Current et Reese 1986).

## 2.5 Hostitelská, tkáňová a věková specifita kryptosporidií

Hostitelské specifitě kryptosporidií je v posledních letech věnována velká pozornost. Na jejím základě lze rozeznat některé druhy a genotypy, které jsou si navzájem velikostně a strukturálně podobné (Fayer et Xiao 2007). Některé druhy kryptosporidií mají nízkou hostitelskou specifitu, to znamená, že mohou infikovat více hostitelů. Například druh *C. parvum* byl detekován u myši, skotu, ovcí, koní a mnoho dalších savců včetně člověka. Jsou ale i kryptosporidie, které jsou infekční pouze pro jeden daný druh zvířat, tzn., jsou hostitelsky specifické. Například druh *C. erinacei* je infekční pro ježky, i když je znám jeden případ infekce člověka, nebo *C. wrairi* pro morčata (Tyzzer

1912; Kváč et al. 2014; Vetterling et al. 1971). Většina kryptosporidií infikuje omezenou skupinu sobě blízkých příbuzných hostitelů (Fayer et Xiao 2007).

Kryptosporidie primárně parazitují v gastrointestinálním traktu svých hostitelů. Dle afinity k jednotlivým částem trávicí trubice je dělíme na žaludeční a střevní kryptosporidie, kterých je výrazně více (Anderson 1987). Mezi žaludeční řadíme např. *C. muris*, *C. proliferans* či *C. serpentis* (Tyzzer 1910; Kváč et al. 2016; Levine 1980). Mezi střevní druhy parazitující v tenkém střevě patří *C. scrofarum*, *C. meleagridis* nebo *C. tyzzeri* (Kváč et al. 2013; Slavin 1955; Ren et al. 2012) a mezi parazitující v tlustém střevě *C. suis*, *C. microti* nebo *C. occultus* (Vítovec et al. 2006; Horčíčková et al. 2018; Kváč et al. 2018). Druh *C. parvum* může parazitovat jak v tlustém, tak v tenkém střevě (Tzipori et al. 1981). Existují však i druhy, které parazitují mimo trávicí trubici, jako např. *C. avium*, které postihuje vedle tenkého a tlustého střeva i ledviny, močovod a kloaku (Holubová et al. 2016), či druh *C. baileyi*, který má výraznou afinitu k dýchacímu systému (Current et al. 1986). Oocysty žaludečních kryptosporidií mají oválný tvar a větší velikost, naopak střevní kryptosporidie mají tvar kulatý a jejich velikost je výrazně menší (Morgan et al. 1999; Xiao et al. 2004).

Většina druhů a genotypů kryptosporidií nemá věkovou hostitelskou specifitu. Například *C. avium* je infekční pro všechny věkové kategorie kuřat, avšak u mladších kuřat má infekce horší průběh (Holubová et al. 2018). Druh *C. scrofarum* je dosud jedinou známou kryptosporidií, která není infekční pro mláďata, v tomto případě selata (Jeníková et al. 2011; Kváč et al. 2009b). U druhu *C. parvum* byla popsána věková specifita v závislosti na hostiteli. Zatímco u myši do věku 14 dnů vyvolává tento druh infekci ve 100 % případů, dospělé myši jsou vnímavé jen velmi málo. Obdobně tomu je u skotu, zatímco kumulativní prevalence u telat dosahuje 100 %, dospělá zvířata jsou vnímavá jen ojediněle (Fayer et al. 2006; Santín et al. 2004).

## 2.6 Přenos infekce

K přenosu infekce dochází fekálně-orální cestou, kontaminovanými potravinami a vodou (Bouzid et al. 2013). K nakažení stačí malá infekční dávka, okolo 10 oocyst (Current et Long 1983; Yousof et al. 2017). Kryptosporidiové infekce se řadí mezi zoonózy. Oocysty jsou velmi odolné vůči chemickým dezinfekcím, vysoké koncentraci

soli, odolají i nízkým teplotám či chloraci pitné vody (Totková et al. 2008; Xiao et Fayer 2008). Z výše uvedených způsobů přenosu infekce se hostitel nejčastěji nakazí kontaminovanou vodou (Thurston-Enriquez et al. 2002). Ta ohrožuje např. hejna divoké drůbeže a vzhledem k tomu, že *C. baileyi* může infikovat celou řadu ptáků, mohou hrát volně žijící ptáci důležitou roli v epidemiologii kryptosporidiózy u domácích chovů (Sréter et Varga 2000). Dalším zdrojem nákazy mohou být mléčné výrobky, které byly špatně pasterované či syrová zelenina a ovoce (Fayer et al. 2000).

## **2.7 Patogenita a klinické příznaky kryptosporidiových infekcí**

Klinické příznaky kryptosporidiové infekce se projevují v závislosti na věku. U lidí jsou nejčastěji infikované děti a starší osoby (Jaggi et al. 1994; Neill et al. 1996). Průběh nemoci má celkově horší dopad na mladší jedince (Lindsay et Blagburn 1990). Potíže mohou být středního až těžkého charakteru, obzvláště nebezpečné jsou pro lidi trpící HIV. U těch hrozí chronické příznaky až smrt. U zdravých lidí je průběh nemoci krátkodobý (Parsons et al. 2015). Průběh infekce záleží zejména na imunitním stavu hostitele a druhu kryptosporidie (Tzipori et Ward 2002). Hlavním klinickým příznakem je dehydratace a přetrvávající vodnatý průjem, který lze pozorovat jak u zvířat, tak u lidí (Angus 1990). Další příznaky mohou být bolest břicha, horečka, malátnost, nechutenství, zvracení, únava či ztráta hmotnosti (Thompson et al. 2005). Infekce způsobená žaludečními kryptosporidiiemi je většinou bez příznaků (Taylor et al. 1999). Fayer et al. (2005) uvádějí délku prepatentní periody okolo 10 dnů. To se však může lišit v závislosti na věku a druhu hostitele, stejně jako množství vylučovaných oocyst a celková doba infekce (Fayer et al. 2005; Sréter et Varga 2000).

## **2.8 Léčba kryptosporidiových infekcí**

V současné době není znám žádný 100% účinný lék a terapie většinou probíhá pomocí rehydratace, nutriční podpory a zajištění iontové rovnováhy organismu (Rossle et Latif 2013). U druhu *C. baileyi* byl experimentálně použit toltrazuril (kokcidiostatikum) a jeho účinnost byla 52 %. Tento lék by mohl v kombinaci s dalšími kontrolními opatřeními pomoci při eliminaci kryptosporidiózy z populací ptáků v zájmovém chovu (Sréter et al. 1999).

## 2.9 Kryptosporidie a kryptosporidióza u kura domácího

První kryptosporidiová infekce u ptáků byla popsána Tyzzerem již v roce 1929, kdy byl u kuřat detekován druh podobný *C. parvum* (Tyzzer 1929). Na základě dnešních poznatků víme, že je kryptosporidióza jednou z nejčastějších parazitárních infekcí u domácích a divokých ptáků (Sréter et Varga 2000) a v chovech drůbeže se může řadit mezi hlavní příčiny morbidity a mortality (Current et Garcia 1991). Mezi druhy a genotypy rodu *Cryptosporidium* identifikované u kura domácího pomocí technik molekulární diagnostiky patří tyto druhy: *C. meleagridis* (Slavin 1955), *C. baileyi* (Current et al. 1986), *C. galli* (Pavlásek 1999) a *C. avium* (Holubová et al. 2016) a tyto genotypy: *Cryptosporidium* avian genotyp I a *Cryptosporidium* avian genotyp II (Nakamura et al. 2009). Dále byly u kura domácího hlášeny infekce kryptosporidii, které jsou pro ptáky hostitelsky nespecifické: *C. andersoni* (Ng et al. 2006) a *C. parvum* (Graczyk et al. 1998). Kryptosporidióza se u ptáků projevuje nejčastěji ve dvou klinických formách: respirační a střevní (Lindsay et Blagburn 1990). Kuřata po prodělání infekce získají imunitu v takové míře, kdy se stávají zcela rezistentními proti další případné infekci (Matsui et al. 1992; Sréter et al. 1995). Infekce způsobená *C. meleagridis* a *C. galli* působí negativně na gastrointestinální trakt a projevuje se různými stupni enteritidy (Gharagozlou et al. 2006). Na rozdíl od *C. baileyi* je produkce oocyst u ptáků infikovaných *C. meleagridis* poměrně nízká (Lindsay 1997). Při experimentu s *C. avium* nevykazoval žádný jedinec klinické příznaky infekce (Holubová a kol. 2016). U genotypů *Cryptosporidium* avian genotyp I a *Cryptosporidium* avian genotyp II též nebyly přítomny klinické příznaky, jen výjimečně anorexie a průjmy (Ng et al. 2006).

Vzhledem k tomu, že jsem se ve své práci zabývala pouze *C. baileyi* a *C. parvum*, blíže se o těchto druzích zmíním níže.

### 2.9.1 *Cryptosporidium baileyi*

Druh *C. baileyi* byl v roce 1986 vyizolován z burza Fabricii brojlerových kuřat (Current et al. 1986). V tomto orgánu, který je odpovědný za humorální imunitu u ptáků, způsobuje závažnou infekci (Scott 2004). Infikuje však i další části organismu, včetně spojivky, nosohltanu, průdušnice, průdušek, vzduchových vaků, střev, ledvin a

močových cest a projevuje se ve třech klinických formách: respirační onemocnění, enteritida a onemocnění ledvin. Při vypuknutí choroby je obvykle přítomna pouze jedna z těchto forem (Lindsay et Blagburn 1990). U kuřat nakažených *C. baileyi* bývají nižší přírůstky tělesné hmotnosti než u zdravých kusů (Guy et al. 1988). Při experimentu s inokulací kuřat přímo do oka došlo k infekci spojivky, nebyly však přítomny žádné jiné klinické příznaky (Lindsay et al. 1987).

Mezi hostitele patří např. korela chocholátá, jeřáb bělošijí, kondor havranovitý, kachna pekingská, straka obecná, křepelka japonská, pštros dvouprstý, či zpěvný pták timálie čínská. Velikost oocyst je  $6,4 \times 4,8 \mu\text{m}$  (Cacciò et Widmer 2014). *Cryptosporidium baileyi* je nejčastěji detekovaným druhem kryptosporidie u ptáků (Yuan et al. 2014). Goodwin et al. (1996) ukázali, že hraje významnou roli při respiračních onemocněních brojlerů a má tak na svědomí velké ekonomické ztráty. Roku 1998 bylo prokázáno, že infekce slepic ve snáškovém období druhem *C. baileyi* má za následek částečnou ochranu jejich potomků před tímto parazitem (Hornok et al. 1998).

### **2.9.2 *Cryptosporidium parvum***

Tento druh byl popsán E. E. Tyzzerem v tenkém střevě myši (Tyzzer 1912). Má ze všech druhů kryptosporidií nejmenší hostitelskou specifitu, jelikož je nejčastěji hlášeným druhem u savců, především u skotu, ovcí a lidí, ale bylo hlášeno mnoho případů u jiných druhů hostitelů (Tzipori et al. 1981). U ptáků byl popsán u celé řady druhů patřících do řádů Accipitriformes, Anseriformes, Charadriiformes, Galliformes, Passeriformes a Psittaciformes (Gomes et al. 2012; Graczyk et al. 1998; McEvoy et Giddings 2009; Nakamura et al. 2009; Reboredo-Fernandez et al. 2015; Zhou et al. 2004; Zylan et al. 2008). Velikost oocyst je  $4,5 \times 5,0 \mu\text{m}$  a infekce je lokalizována v tenkém a tlustém střevě, kde způsobuje atrofii střevních klků a záněty střevního epitelu (Cacciò et Widmer 2014; Thompson et al. 2005).

### **2.10 *In-vitro* a *in-vivo* kultivace**

Při metodách *in-vivo* probíhá pokus na živém organismu a lze tak pozorovat jeho přímou reakci. Vědci pracují na tom, aby se při metodách *in-vitro* tkáně chovaly stejně, jako za podmínek *in-vivo* (Bhanushali et al. 2010). U kryptosporidií lze metodou *in-vivo*

množit například druhy *C. muris* či *C. parvum*, a to na několika zvířecích modelech (např. myši, selata, telata a pískomilové) (Kváč et al. 2009a; Petry et al. 1995; Vítovec et Koudela 1992).

Při metodách *in-vitro* se jedná o kultivaci mimo tělo hostitele za pomoci buněčných kultur. Bez buněčných linií není možné provést ideální kultivaci, i když byly úspěšné kultivace tímto způsobem publikovány v roce 2004, opakované pokusy v dalších laboratořích byly neúspěšné (Girouard et al. 2006; Hijjawi et al. 2004). *In-vitro* kultivace v posledních letech velmi pokročily, ale stále chybí metody pro získání většího počtu oocyst (Karanis 2017). Pokud by se podařilo vytvořit spolehlivý model pro *in-vitro* kultivaci kryptosporidií, pomohlo by to v mnoha studiích ohledně vývojového cyklu a případné léčby kryptosporidiózy (Hijjawi 2010).

První úspěšná *in-vitro* kultivace nepohlavních vývojových stádií rodu *Cryptosporidium* byla popsána v roce 1983 (Woodmansee et Pohlenz 1983). Vývoj na buněčných kulturách byl dále dokumentován u *C. parvum* (Flanigan et al. 1991), *C. andersoni* (Hijjawi et al. 2002), *C. muris* (Choi et al. 2004) nebo *C. hominis* (Hijjawi et al. 2010), ale nedošlo k produkci oocyst nebo nebyly publikované metody nikdy úspěšně zopakovány.

V roce 2016 byla publikována studie, v které byla pro kultivaci *C. hominis* použita technologie imitující střevo. Kryptosporidie byly úspěšně kultivovány po dobu několika týdnů, nicméně metoda je finančně velmi nákladná (Morada et al. 2016). Jako slibná se jeví také metoda založená na kultivaci kryptosporidií na COLO-680N buňkách, ale dosud se ji nikomu nepodařilo zopakovat (Miller et al. 2018).

V roce 1986 popsali Current a Long (1983) úplný vývoj izolátu ze člověka a telete v endodermálních buňkách chorioalantoidní membrány u kuřecích embryí, kdy získané oocysty byly infekční pro myši. Lindsay et al. (1989), Wunderlin et al. (1997) a Huang et al. (2014) popsali kompletní vývoj *C. baileyi* v embryích kuřat při inokulaci sporozoitů či oocyst přímo do alantoidní dutiny nebo alantoidní tekutiny. V alantoické tekutině každého kuřecího embrya byl zjištěn nejvyšší počet oocyst po 168 hodinách od inokulace. Tyto studie naznačují, že by v kuřecích embryích mohly kryptosporidie dokončit svůj vývojový cyklus a mohly by představovat vhodný hostitelský organismus/model pro další studie kryptosporidií.

### 3 CÍLE PRÁCE

- Popsat možnost kultivace různých druhů a genotypů kryptosporidií v kuřecích embryích.
- Pomocí experimentálních pokusů prověřit hypotézu, že kuřecí embrya jsou vnímavá k infekci různými druhy a genotypy kryptosporidií.
- U úspěšně infikovaných zvířat ověřit molekulárními metodami identitu izolátů a pomocí parazitologických a statistických metod popsat efektivnost metody.
- Na základě experimentálních infekcí popsat průběh infekce u jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií, popsat lokalizaci vývojového cyklu a patogenitu pro hostitele.



## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Zvířata pro pokus

Pro laboratorní pokus byly použity osm týdnů staré SCID myši (*Mus musculus*; C.B-17/IcrHsd-Prkdcscid; The Jackson Laboratory, USA), jednodenní kuřata, oplodněná vejce kura domácího (*Gallus gallus* f. *domestica*) (Ústrašice, státní podnik Mezinárodní testování drůbeže) a jednodenní kachny (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*) (Chlumec nad Cidlinou, Perena s.r.o.). Kuřata a kachňata byla chována v oddělených chovných nádobách, každá byla vybavena infralampou (do 7 dnů věku), krmivem a vodou *ad libitum*. Kuřata byla krmena krmnou směsí K1, kachňata krmnou směsí VKCH1 (Výkup Mladé, Švabinského, České Budějovice) a myši krmnou směsí ALTROMIN (Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Německo). Jako podestýlka byly použity jednorázové podložky s hydrofilním jádrem (Sentina® Inko Form, Lohmann & Rauscher, Česká republika). Nádoby byly čištěny společně s odběrem vzorků každý den. Imunodeficientní SCID myši byly chovány v Parazitologickém ústavu v Českých Budějovicích, Biologické centrum Akademie věd, v.v.i. (PaU). Oplozená vejce byla vložena do líhni (4.2.5).

#### 4.1.2 Oocysty kryptosporidií pro experimentální účely

Oocysty *C. baileyi* a *C. parvum* byly získány z přirozeně infikovaných domácích kachen (Veselí nad Lužnicí) a telete (Hartmanice). Byly udržovány v laboratorních podmínkách v jednodenních kachnách a osm týdnů starých SCID myších v PaU. Oocysty z kachen a SCID myší byly purifikovány na cesium chloridovém gradientu (4.2.2.). Purifikované oocysty byly poté ošetřeny chlornanem sodným (4.2.3.) a použity pro infekci jednodenních kuřat, kuřecích embryí v 9. dni vývoje, jednodenních kachen a SCID myší. Účelem experimentu bylo zjistit, zda by kuřata infikovaná kryptosporidiiemi jako embrya (ještě před maturací imunitního systému) mohla produkovat více oocyst než kuřata infikovaná po vylíhnutí. Pro zjištění byly použity druhy *C. baileyi*, který kuřata infikuje přirozeně a druh *C. parvum*, který je pro kuřata považován za neinfekční.

## 4.2 Metody

### 4.2.1 Čištění oocyst na sacharózovém gradientu (Arrowood et Stearling 1987)

*Příprava roztoků:*

- Sheaterův roztok: 259 ml deionizované vody + 405 g cukru + 7,29 g fenolu
- PBS Tween: do 1 litru PBS přidat 0,5 ml Tween 20
- Pracovní Sheaterův roztok: 1:2 (1 díl Sheater + 2 díly PBS Tween); 1:4 (1 díl Sheater + 4 díly PBS Tween)

*Postup:*

- Trus homogenizovat ve třecí misce a zbavit ho větších příměsí (přes sítko)
- Do skleněných zkumavek navrstvit gradient (plastovou pasterkou)
  1. vrstva 30 ml Sheater 1:2
  2. vrstva 30 ml Sheater 1:4
  3. vrstva 15 ml vzorku
- Centrifugovat 20 minut při 1370 g
- Horní zbarvenou vrstvu odsát vodní vývěvou a obsah zkumavek přenést do čistých zkumavek
- Objem zkumavek doplnit PBS (0,025 M; pH 7,2) a centrifugovat 20 minut při 1370 g
- Vodní vývěvou odsát obsah zkumavek na ½ a poté doplnit PBS a centrifugovat 20 minut při 1370 g (tento krok provést 2×)
- Sedimenty přenést do jedné sběrné zkumavky a uchovávat při 4 °C s přidavkem antibiotik

### 4.2.2 Čištění oocyst na cesium chloridu (Arrowood et Donaldson 1996)

*Chemikálie:* roztok cesium chloridu (CsCl; 1,15 g/ml), PBS (0,025 M; pH 7,2)

*Postup:*

- Do mikrozkušavky napipetovat 1 ml CsCl
- Na roztok CsCl navrstvit 0,5 ml roztoku oocyst v PBS
- Centrifugovat při 20 °C po dobu 3 minuty při 14000 g

- Přepipetovat supernatant do 50 ml zkumavek a zbylý sediment vyhodit
- Zkumavku doplnit deionizovanou vodou, centrifugovat při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g
- Vodní vývěvou odsát supernatant na objem 5 ml
- Doplnit zkumavku deionizovanou vodou, vortexovat, centrifugovat při 4 °C po dobu 20 minut při 1370 g (tento proces opakovat 3×)
- Oocysty uchovávat v PBS při 4–8 °C

#### **4.2.3 Ošetření infekční dávky**

*Postup:*

- Infekční dávku oocyst před použitím ošetřit 4,7% chlornanem sodným (Savo)
- Přechištěné oocysty (4.2.2) resuspendovat v 5 ml 4,7% chlornanu sodného a inkubovat v 50 ml zkumavkách 15 minut na ledu za pravidelného míchání
- Chlornan sodný vymýt z infekční dávky v nadbytku deionizované vody a za opakované centrifugace
- Zkumavku doplnit deionizovanou vodou, centrifugovat při 4 °C 20 minut při 1370 g
- Vodní vývěvou odsát supernatant na objem 2 ml
- Doplnit zkumavku deionizovanou vodou, vortexovat, centrifugovat při 4 °C 20 minut při 1370 g (tento proces opakovat 5×)
- Oocysty použít k inokulaci

#### **4.2.4 Stanovení intenzity infekce**

Intenzita infekce byla hodnocena jako počet oocyst na gram (OPG) čerstvého trusu (Kváč et al. 2007). Pro výpočet byl použit celkový počet oocyst na podložním sklíčku a hmotnost nátěru.

*Postup:*

- Podložní mikroskopická skla byla zvážena s přesností na 0,001 g
- Po provedení nátěru trusu bylo každé sklo převáženo a byla vypočtena hmotnost trusu (nátěru)

- Po obarvení nátěru (4.2.6) byly spočítány všechny oocysty na skle a bylo vypočteno OPG

#### 4.2.5 Inkubace a líhnutí vajec

Oplozená slepičí vejce byla vložena do líhni Brinsea ovation 28 EX a Brinsea Octagon 20 Advance s automatickým obracečem. Vejce byla inkubována při teplotě 37,5 °C a vlhkosti 45 % po dobu 19 dnů. Poté byly dva dny před líhnutím hodnoty změněny na teplotu 37 °C a vlhkost 65 %. Po vylíhnutí byla kuřata přemístěna do sterilních plastových nádob (4.1.1).

#### 4.2.6 Barvení oocyst dle Miláčka a Vítovce (Miláček et Vítovec 1985)

*Chemikálie:* methanol, roztok methylvioleti (0,6 g methylvioleti, 1 ml anilinu, 1 g fenolu, 30 ml alkoholu-ethanolu, 70 ml deionizované vody), 2% kyselina sírová, 1% roztok tartrazinu v 1% kyselině octové

*Postup:*

- Podložní skříčko ponořit do methanolu a ihned ho zafixovat v plamenu
- Skříčko vložit do stojánku a vnořit do roztoku methylvioleti na 30 minut
- Opláchnout stojánek pod tekoucí vodou a vložit do 2% kyseliny sírové, diferencovat 2 minuty
- Opláchnout pod tekoucí vodou a vložit do roztoku tartrazinu na 3–5 minut
- Opláchnout pod tekoucí vodou a dát sušit
- Prohlížet nátěr při 1000 násobném zvětšení za použití imerzního oleje

#### 4.2.7 Izolace DNA z trusu

Extrakce DNA z trusu byla provedena pomocí komerčního kitu GeneAll® Exgene™ Stool DNA mini (GeneAll Biotechnology, co., Ltd., Soul, Jižní Korea).

*Postup:*

- Vzorek trusu (200 mg) dát do Safe-Lock Tube, přidat skleněné a zirkonové kuličky a napipetovat 1–1,3 ml FL pufu, homogenizovat vortexováním a rozbít v přístroji FastPrep®24 (MP Biomedicals, CA, USA) 1 minutu při 5,5 m/s
- Inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě, centrifugovat 5 minut při 16000 g

- Přepipetovat veškerý supernatant na EzPass kolonku (bílá kolonka)
- Centrifugovat 1 minutu při 16000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky
- Na kolonku napipetovat 100µl EB pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu při 16000 g
- Vyhodit bílou kolonku a připipetovat 500µl PB pufru do sběrné zkumavky, promíchat pipetováním
- Všechn obsah sběrné zkumavky přenést na mini spin column (zelená kolonka)
- Centrifugovat 1 minutu při 16000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky
- Napipetovat 500µl NW pufru na střed kolony
- Centrifugovat 1 minutu při 16000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky
- Opět centrifugovat 1 minutu při 16000 g, odstranit zbytky pufru, přenést kolonku na čistou eppendorfku
- Napipetovat 200 µl EB pufru na kolonku, inkubovat 1 minutu, centrifugovat 1 minutu při 16000 g
- Purifikovanou DNA uchovat při -20 °C před použitím metody PCR

#### 4.2.8 Izolace DNA z tkáně

Izolace z tkáně byla provedena pomocí DNeasy Blood & Tissue kitu (QIAGEN).

*Postup:*

- Do mikrozkušavky nastříhat asi 10 mg tkáně, přisypat skleněné kuličky (0,5 mm) a 2–3 zirkonové kuličky (1,5 mm)
- Připipetovat 180 µl ATL pufru a vortexovat
- Rozbít vzorek a tím ho homogenizovat v přístroji FastPrep®24 (MP Biomedicals, CA, USA) 1 minutu při 5,5 m/s
- Centrifugovat 10 sekund při 16000 g, připipetovat 20 µl proteinázy K
- Inkubovat 1 hodinu při 56 °C, během inkubace pravidelně míchat
- Centrifugovat 10 sekund, připipetovat 200 µl AL pufru, vortexovat
- Připipetovat 200 µl 96% EtOH, vortexovat, centrifugovat 45 sekund (10000 g)
- Veškerý supernatant přepipetovat na Mini spin kolonku, centrifugovat 3 minuty (10000 g), vylít odpad ze sběrné zkumavky

- Připipetovat 500 µl AW1 pufru, centrifugovat 1 minutu (16000 g), odstranit odpad ze sběrné zkumavky
- Připipetovat 500 µl AW2 pufru, centrifugovat 1 minutu (16000 g), odstranit odpad ze sběrné zkumavky
- Sběrné zkumavky vyhodit, nahradit je novými mikrozkušavkami, přímo na membránu kolony napipetovat 200 µl AE pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě, centrifugovat 1 minutu (10000 g)

#### 4.2.9 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Byl použit nested PCR protokol pro amplifikaci částečné oblasti genu kódujícího malou podjednotku rRNA (SSU; Xiao et al. 1999) a 60 kDa glykoprotein (gp60; Alves et al. 2003; Peng et al. 2001).

##### SSU

Set primerů pro primární reakci:

F1 5'-TTCTAGAGCTAATACATGCG-3'

R1 5'-CCCATTTCTTCAAACAGGA-3'

Set primerů pro sekundární reakci:

F2 5'-GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAAG-3'

R2 5'-AAGGAGCAACACACACAC-3'

##### gp60

Set primerů pro primární reakci:

F1 5'-ATAGTCTTCGCTGTATTC-3'

R1 5'-GGAAGGAACGATGTATCT-3'

Set primerů pro sekundární reakci:

F1 5'-TCCGCTGTATTCTCAGCC-3'

R2 5'-GCAGAGGAACCAGCATC-3'

#### 4.2.10 Gelová elektroforéza

*Chemikálie:* TAE pufr, agaróza, Ethidium-bromid (EtBr), 100 bp DNA Ladder

*Postup:*

- V baňce smíchat TAE pufr s naváženou agarózou a vložit do mikrovlnné trouby, dokud nevznikne homogenní směs
  - Nosič malý: 0,4 g / 40 ml TAE pufr
  - Nosič střední: 0,8 g / 80 ml TAE pufr
  - Nosič velký: 1,2g / 120 ml TAE pufr
- Ochladit pod tekoucí vodou, přidat 1  $\mu$ l EtBr a opatrně promíchat
- Vylít obsah baňky do připraveného nosiče, použít vhodný hřeben a nechat ztuhnout (15–20 minut)
- Vyjmout hřeben a vložit gel do elektroforetické vany s TAE pufrem
- Do první jamky nanést 10  $\mu$ l ladderu, do dalších jamek 20  $\mu$ l sekundárních PCR produktů
- Nechat gel vyvíjet, aby došlo k separaci fragmentů DNA
- Po skončení procesu (20–30 minut) použít UV transiluminátor

#### **4.2.11 Izolace z gelu**

Fragmenty DNA byly vyizolovány pomocí komerčního kitu Gen Elute (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

*Postup:*

- Skalpelem vyříznout z gelu fragmenty DNA a vložit je do 1,5 ml mikrozkušavky
- Do zkumavky s fragmentem gelu připipetovat 500  $\mu$ l Gel Solubilization Solution (na 100 mg gelu 300  $\mu$ l)
- Inkubovat 10 minut při 50 °C, kontrolovat rozpouštění a promíchat každé 2–3 minuty
- Dát inkubovat PCR vodu na eluci na 65 °C
- Sestavit Binding Column G, napipetovat 500  $\mu$ l Column Preparation Solution a centrifugovat 1 minutu při 16000 g
- Připipetovat ke vzorku 150  $\mu$ l isopropanolu a promíchat

- Přepipetovat veškerý objem vzorku na kolonku (Binding Column G) a centrifugovat 1 minutu při 16000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky
- Připipetovat 700 µl Wash Solution G a centrifugovat 1 minutu při 16000 g
- Vylít odpad ze sběrné zkumavky a centrifugovat 1 minutu při 16000 g
- Otočit zkumavku v centrifuze o 180° a centrifugovat znovu 3 minuty
- Vložit kolonku do nové 1,5 ml zkumavky a provést eluci napipetováním 30 µl PCR vody předeřáté na 65 °C přímo na střed kolony
- Inkubovat 1 minutu a poté centrifugovat 1 minutu při 16000 g

#### 4.2.12 Sekvence

Purifikované sekundární produkty byly sekvenovány v obou směrech pomocí sekundárních PCR primerů v komerční společnosti (Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Německo). Sekvence získané ve studii byly porovnány se sekvencemi v GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

#### 4.2.13 Design experimentu

Infekce různými infekčními dávkami *C. baileyi* a *C. parvum* byly provedeny u skupin jednodenních kuřat (45 ks) a kuřecích embryí (45 ks). Deset vajec s kuřecími embryi a deset jednodenních kuřat bylo použito jako negativní kontrola. Prosvěcovací lampou probíhala kontrola životaschopnosti kuřat, a to 9 dní po infekci. Mrtví a nevyvíjející se jedinci byli z experimentu vyřazeni.

Byly použity 3 infekční dávky různé velikosti od obou druhů kryptosporidií. Infekční dávka obsahovala buď  $10^4$ ,  $10^5$  nebo  $10^6$  oocyst *C. baileyi* či *C. parvum* v 50 µl deionizované vody. Infekčnost oocyst byla vyzkoušena na 3 ks jednodenních kachen a 3 ks osm týdnů starých SCID myši. Ty byly orálně infikovány společně s jednodenními kuřaty pomocí žaludeční sondy. Pro infekci embryí byl do skořápky v místě alantoické dutiny vyvrtán otvor o průměru 2 mm pomocí sterilního vrtáku. Do alantoické dutiny byla injikována infekční dávka a otvor byl uzavřen pomocí sterilního tekutého Histoplastu-S (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo). Vejce a kuřata infikovaná různými druhy kryptosporidií nebo infekční dávkou byla umístěna v samostatných klecích/líhních. Po vylíhnutí kuřat byl každý den kontrolován zdravotní



stav a zároveň probíhal odběr vzorků s jejich zpracováním. Odběr vzorků trusu probíhal každý den od 1. dne infekce/vylíhnutí po dobu 30 dnů vždy od 10 kuřat z každé skupiny. Trus byl odebírán do mikroskopické misky, ze které byl udělán nátěr na podložní sklíčko. Všechny vzorky byly popsány dle příslušného označení každého kuřete. Mikroskopické misky byly uchovávány při 4–8 °C v chladničce, podložní sklíčka byla zafixována v plameni a obarvena metodou dle Miláčka a Vítovce (4.2.6) a byl proveden výpočet OPG (Kváč et al. 2007). Byla sledována maximální doba intenzity infekce ( $t_{max}$ ) a maximální koncentrace intenzity infekce ( $C_{max}$ ). Intenzita infekce byla uváděna jako počet oocyst na gram (OPG) čerstvého trusu (4.2.4). Dvě kuřata z každé skupiny byla usmrcena ihned po vylíhnutí a následně každý 3. den experimentu, vzorky orgánů a trusu byly dále laboratorně zpracovány pro přítomnost specifické DNA.

#### **4.2.14 Statistická analýza**

Kumulovaná hodnota intenzity infekce byla stanovena prostřednictvím AUC, tj. plochy pod křivkou, prostřednictvím trapezoidálního pravidla. Současně byla hodnocena délka prepatentní a patentní periody,  $t_{max}$  a  $C_{max}$ . Následně byla použita jednofaktorová analýza rozptylu, případně neparametrický přístup prostřednictvím metody DISCO (Rizzo and Szekely 2010) v případě porušení normality dat. Za účelem vícenásobného srovnávání byl v případě signifikantního výsledku použit tzv. Dunnův post-hoc test, přičemž byla použita Benjamini-Hochbergova korekce s cílem kontrolovat předepsanou hodnotu FDR. Pro dvouvýběrové testy byl využit Mannův-Whitneyův test. Veškeré nutné výpočty byly realizovány prostřednictvím programovacího prostředí R 3.6.1. (R Core Team 2019).

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Molekulární charakteristika používaných izolátů kryptosporidií

Použité izoláty *C. baileyi* a *C. parvum* byly 100% identické se sekvencí SSU izolátu *C. baileyi* z kuřete [GenBank, č. AF093495] a izolátu *C. parvum* z telete [AF093493]. Nukleotidové sekvence gp60 u *C. parvum* potvrdily příslušnost použitého izolátu k subtypu IIAA16G1R1, který byl popsán u skotu, ovcí a lidí [KJ158747, JX258866 a AM937009]. Jednodenní kachny infikované *C. baileyi* a osm týdnů staré SCID myši infikované *C. parvum* (pozitivní kontroly) začaly vylučovat oocysty po 4–5, respektive po 10–12 dnech po infekci, čímž byla potvrzena infektivita používaných izolátů. Nukleotidové sekvence SSU a gp60 získané z infikovaných zvířat byly totožné se sekvencemi získaných z infekčních dávek.

### 5.2 Průběh infekce u kuřat inokulovaných ve stadiu embrya

Všechna kuřecí embrya infikovaná *C. baileyi* a *C. parvum* se vylíhla živá a hmotnost infikovaných kuřat se výrazně nelišila od negativních kontrol ( $F=0,4806$ ;  $p$ -hodnota= $0,6236$ ). Jedno kuře, které se vylíhlo z embrya, infikovaného dávkou  $10^6$  oocyst *C. baileyi*, bylo 5. den po vylíhnutí usmrceno, kvůli nízké hmotnosti a špatnému zdravotnímu stavu.

Mikroskopická a molekulární analýza ukázala přítomnost oocyst a specifické DNA ve vzorcích trusu všech infikovaných kuřat již do 5 hodin po vylíhnutí. Nebyl zjištěn žádný rozdíl v intenzitě infekce mezi skupinami, které byly infikovány různými infekčními dávkami ( $F_{\text{disco}}=1,051$ ;  $p$ -hodnota= $0,3820$ ; obrázek č. 1). Zatímco kuřata infikovaná druhem *C. baileyi* vylučovala mikroskopicky detekovatelné množství oocyst každý den po celou dobu experimentu, kuřata infikovaná oocystami *C. parvum* vylučovala přerušovaně (obrázek č. 1). Specifická DNA *C. parvum* byla však detekována téměř denně až do 27 dnů po vylíhnutí (obrázek č. 1). Všechna kuřata infikovaná druhem *C. parvum* ztratila infekci během 13–25 dnů a přežila až do konce experimentu (tabulka č. 1). Zdravotní stav kuřat infikovaných *C. parvum* se nelišil od negativních kontrol. Naproti tomu všechna kuřata infikovaná *C. baileyi* uhynula nebo byla usmrcena kvůli špatnému zdraví a to během 5–16 dní po vylíhnutí. Všechna kuřata

infikovaná *C. baileyi* jako embrya byla v průběhu experimentu anorektická, neměla chuť k jídlu, chyběla jim aktivita a dostatečné opeření. Kromě toho 48 hodin před smrtí došlo k nahromadění trusu na vnější straně kloaky, což kuřatům znesnadňovalo defekaci.

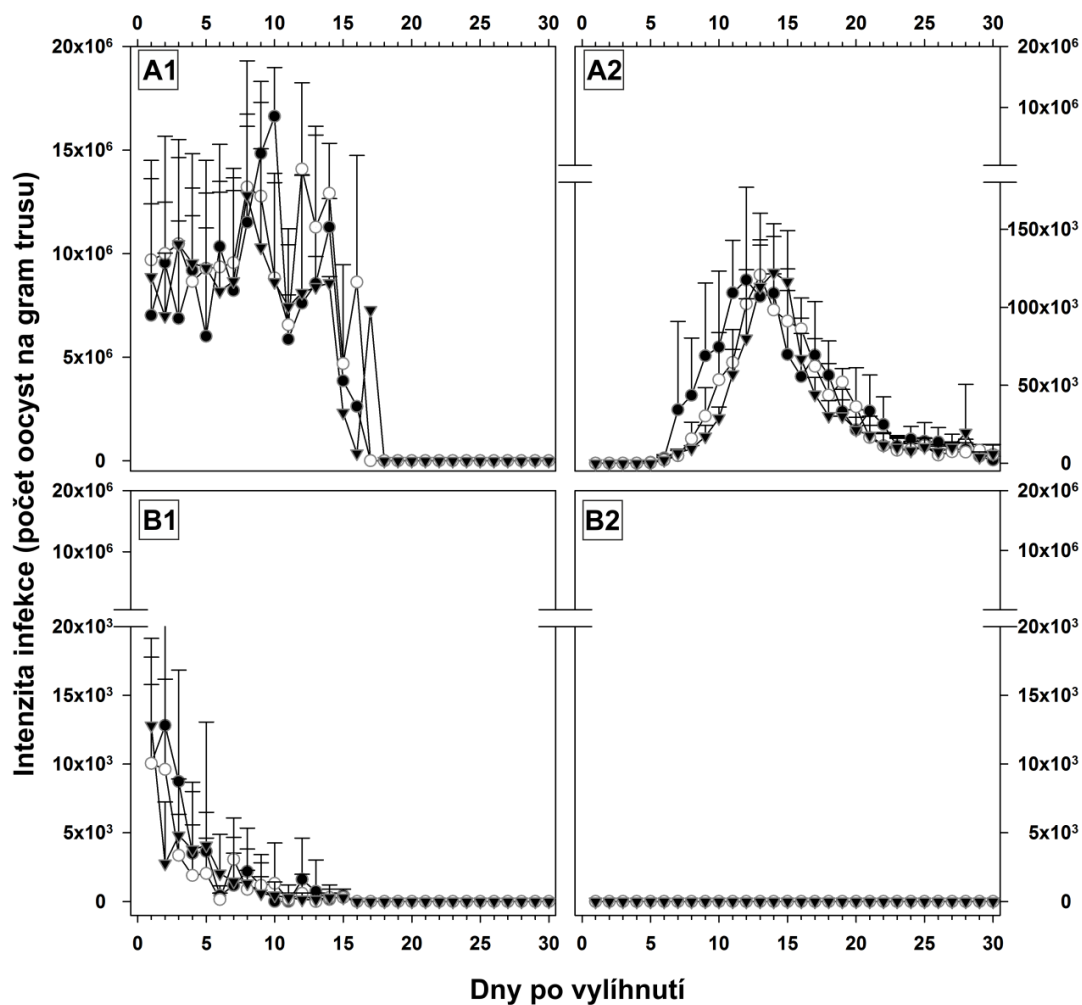
U kuřat infikovaných *C. baileyi* byla nejvyšší produkce oocyst, měřená jako AUC, pozorována u jedinců inokulovaných infekční dávkou  $10^5$  oocyst, ale AUC se významně nelišilo mezi skupinami, které dostávaly různé infekční dávky ( $F_{\text{disco}}=0,4480$ ; p-hodnota=0,896). Infekční dávka neměla žádný vliv na AUC ani u kuřat infikovaných *C. parvum* ( $F=2,3422$ ; p-hodnota=0,1153; tabulka č. 1). Nejvyšší  $C_{\text{max}}$  (maximální koncentrace infekce) byla pozorována u kuřat infikovaných dávkou  $10^6$  oocyst, ale rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné ( $F_{\text{disco}}=1,6220$ ; p-hodnota=0,1049 pro *C. baileyi*,  $F_{\text{disco}}=1,819$ ; p-hodnota=0,009 pro *C. parvum*).  $T_{\text{max}}$  (maximální doba intenzity infekce) nebyla ovlivněna výší infekční dávky ( $F_{\text{disco}}=1,051$ ; p-hodnota=0,3820 pro *C. baileyi*,  $F_{\text{disco}}=0,9750$ ; p-hodnota=0,4086 pro *C. parvum*; tabulka č. 1). Nebyl zjištěn žádný rozdíl v přežití kuřat inokulovaných jako embrya různými dávkami infekce *C. baileyi* ( $F=0,0520$ ; p-hodnota=0,9948) nebo *C. parvum* ( $F_{\text{disco}}=0,5640$ ; p-hodnota=0,7043).

### 5.3 Průběh infekce u kuřat infikovaných ve stáří jednoho dne

Mikroskopická a molekulární analýza prokázala přítomnost oocyst a/nebo specifické DNA ve vzorcích trusu všech infikovaných zvířat (tabulka č. 1, obrázek č. 1). Infikovaná jednodenní kuřata začala vylučovat oocysty *C. baileyi* 4–6 dnů po infekci. Kuřata infikovaná dávkou  $10^6$  oocyst *C. baileyi* začala vylučovat oocysty významně dříve, než kuřata infikovaná nižšími dávkami ( $F_{\text{disco}}=3,2960$ ; p-hodnota=0,0139; tabulka č. 1). Kuřata infikovaná druhem *C. parvum* neprodukovala mikroskopicky detekovatelné oocysty, ale specifická DNA *C. parvum* byla detekována v trusu a byla detekována dříve u kuřat infikovaných dávkou  $10^6$  oocyst než u kuřat infikovaných nižšími dávkami ( $F_{\text{disco}}=3,9560$ ; p-hodnota=0,0089; tabulka č. 1., obrázek č. 1). Na rozdíl od kuřat infikovaných *C. baileyi* jako embrya, která všechna uhynula, kuřata infikovaná ve věku jednoho dne přežila všechna. Největší produkce oocyst (AUC) a nejčasnější dosažení  $t_{\text{max}}$  bylo pozorováno u kuřat infikovaných dávkou  $10^6$  oocyst *C. baileyi* ( $F= 3,7899$ ; p-hodnota=0,0354 a  $F_{\text{disco}}=3,7210$ ; p-hodnota=0,0069, tabulka č. 1).

Zatímco délka infekce se nelišila u ptáků infikovaných různými infekčními dávkami *C. baileyi* ( $F_{\text{disco}}=0,2650$ ; p-hodnota=0,5125), ptáci infikovaní dávkou  $10^4$  oocyst *C. parvum*, nejnižší testovanou dávkou infekce, ztratili infekci dříve než ptáci infikovaní vyššími dávkami ( $F_{\text{disco}}=3,2700$ ; p-hodnota=0,0249).

**Obrázek č. 1:** Intenzita infekce a počet oocyst na gram trusu (OPG) u experimentálně infikovaných kuřat od 1 až po 30 dnů po vylíhnutí. **(A)** *Cryptosporidium baileyi* a **(B)** *Cryptosporidium parvum* u kuřat infikovaných množstvím oocyst  $10^4$  (černý trojúhelník),  $10^5$  (bílý kruh) nebo  $10^6$  (černý kruh) jako **(1)** devítidenní embrya nebo **(2)** jednodenní – již vylíhnutá kuřata.



**Tabulka č. 1:** Inkubační doba, délka infekce a ukazatele intenzity infekce u kuřat infikovaných jako devítidenní embrya nebo jednodenní kuřata infekční dávkou  $10^4$ ,  $10^5$  nebo  $10^6$  oocyst *Cryptosporidium baileyi* nebo *Cryptosporidium parvum*. Infekce byly detekovány mikroskopickým (MIK) a molekulárním (PCR) vyšetřením trusu po dobu od vylíhnutí do 30 dnů věku.

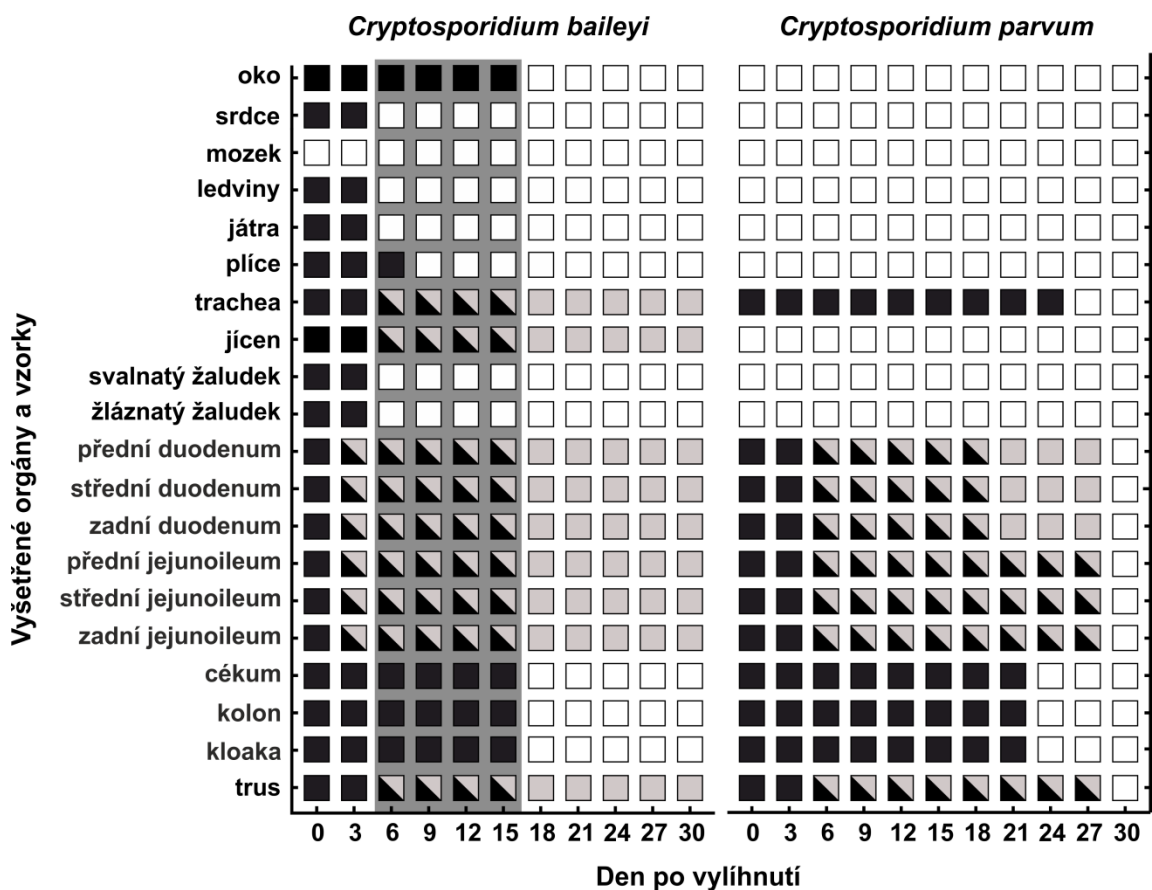
Parazit	Infekční dávka	Infekce	Inkubační doba		Délka infekce		AUC ( $\times 10^6$ )	$t_{\max}$ (den)	$C_{\max}$ ( $\times 10^6$ )
			MIK	PCR	MIK	PCR			
			Dny (střední $\pm$ standardní odchylka)						
<i>C. baileyi</i>	$10^4$	orálně	5-6 (5,20 $\pm$ 0,42)		>30	>30	0,860	13	0,120
		embryo	0*	0*	8-16 <sup>#</sup> (10,80 $\pm$ 2,48)		136,264	7	12,610
	$10^5$	orálně	4-6 (5,40 $\pm$ 0,70)		>30	>30	0,950	12	0,120
		embryo	0*	0*	8-15 <sup>#</sup> (10,80 $\pm$ 2,52)		159,952	11	14,070
	$10^6$	orálně	4-5 (4,70 $\pm$ 0,78)		>30	>30	1,112	11	0,120
		embryo	0*	0*	5-15 <sup>#</sup> (10,20 $\pm$ 2,82)		139,913	9	16,620
<i>C. parvum</i>	$10^4$	orálně	ND	4-6 (5,20 $\pm$ 0,63)	ND	17-25 (21,10 $\pm$ 3,11)	ND	ND	ND
		embryo	0*	0*	5-18 (10,30 $\pm$ 4,11)	15-24 (20,10 $\pm$ 4,23)	0,034	5	0,007
	$10^5$	orálně	ND	4-5 (4,60 $\pm$ 0,52)	ND	21-27 (24,10 $\pm$ 1,66)	ND	ND	ND
		embryo	0*	0*	6-16 (10,50 $\pm$ 3,44)	13-25 (20,50 $\pm$ 4,62)	0,034	5	0,010
	$10^6$	orálně	ND	4-5 (4,20 $\pm$ 0,42)	ND	23-27 (24,50 $\pm$ 1,58)	ND	ND	ND
		embryo	0*	0*	5-18 (10,80 $\pm$ 5,59)	15-25 (21,70 $\pm$ 5,01)	0,046	5	0,010

**orálně** - orální infekce jednodenních kuřat; **embryo** - infekce devítidenního kuřecího embrya; **AUC** - akumulovaná hodnota intenzity infekce;  **$t_{\max}$**  - maximální doba intenzity infekce;  **$C_{\max}$**  - maximální koncentrace intenzity infekce; \* zvířata produkovala oocysty ihned po vylíhnutí; # všechna zvířata zemřela nebo byla usmrcena kvůli špatnému zdravotnímu stavu; **ND** - není určeno

#### 5.4 Šíření kryptosporidií v těle a v orgánech

U všech kuřat, která byla infikována druhem *C. baileyi* jako embrya, byla detekována specifická DNA *Cryptosporidium* ve všech orgánech, kromě mozku, ihned po vylíhnutí. Infekce se začala vytrácet z jater, ledvin a ze žláznatého a svalnatého žaludku již od 6. dne po vylíhnutí. Všechny ostatní orgány zůstaly pozitivní, dokud zvířata neuhynula nebo nebyla usmrcena. Počet infikovaných orgánů se nelišil u ptáků inokulovaných jako embrya s různými dávkami infekce. Naopak u jednodenních kuřat infikovaných *C. baileyi* byly pozitivní pouze průdušnice, jícen, dvanáctník a jejunoileum (obrázek č. 2). U jednodenních kuřat inokulovaných *C. parvum* se infekce vyvinuly pouze v tenkém střevě, bez ohledu na dávku infekce. Naproti tomu u kuřat infikovaných *C. parvum* jako embrya se infekce vyvinula v průdušnici, slepém střevě, tlustém střevě a kloace (obrázek č. 2). DNA *C. baileyi* u kuřat inokulovaných jako embrya, byla detekována ve žláznatém a svalnatém žaludku, játrech, ledvinách, plicích, srdci a oku, ale vývojová stadia nebyla detekována v žádném z těchto orgánů. U ptáků inokulovaných *C. baileyi* jako embrya nebo ve stáří jednoho dne byla vývojová stadia detekována v mukózních nátěrech z průdušnice, jícnu a střeva. Zatímco vývojové fáze *C. parvum* byly občas pozorovány v mukózních nátěrech průdušnice a ve střevech kuřat infikovaných jako embrya, u ptáků infikovaných ve stáří jednoho dne detekovány nebyly.

**Obrázek č. 2:** Šíření infekce *Cryptosporidium baileyi* a *Cryptosporidium parvum* v orgánech a tkáních u kuřat infikovaných jako embrya (černá barva) a kuřat infikovaných ve stáří jednoho dne (světle šedá barva) dávkou  $10^4$  oocyst, na základě molekulárního vyšetření od 1 do 30 dnů po vylíhnutí. Bílé čtverečky značí, že specifická DNA nebyla detekována. Tmavě šedé pozadí označuje dobu, kdy kuřata infikovaná jako embrya druhem *C. baileyi* buď uhynula, nebo byla usmrcena.

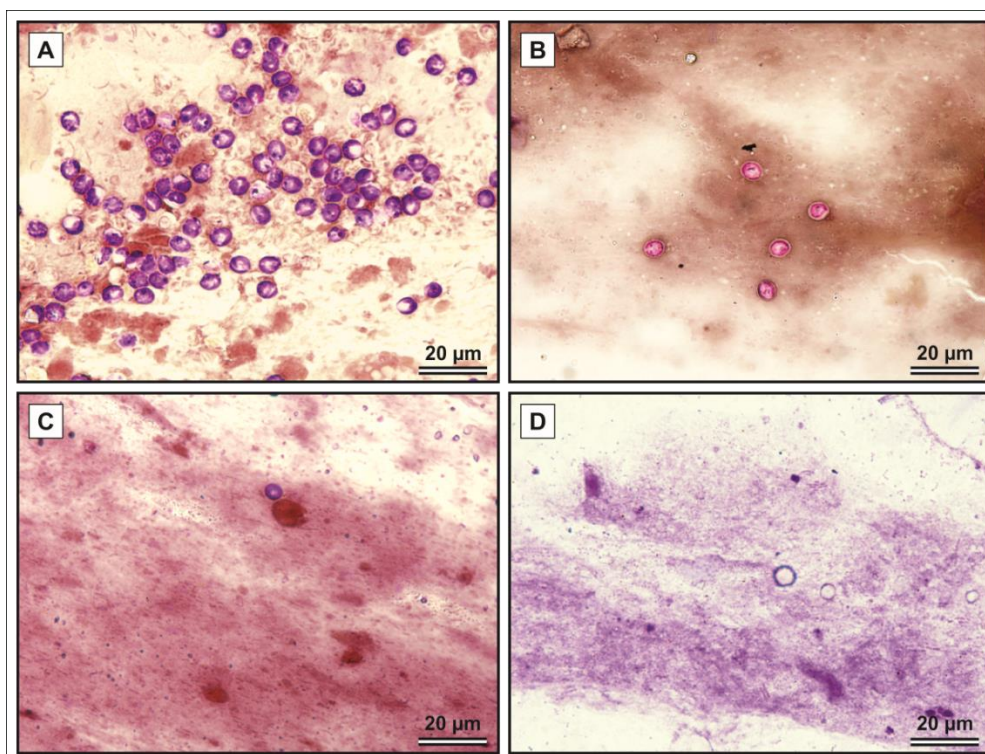


### 5.5 Produkce oocyst

Kuřata infikovaná *C. baileyi* (p- hodnota= $1,1220 \times 10^{12}$ ) a *C. parvum* (p-hodnota= $0,0278$ ) ve stáří jednoho dne produkovala výrazně méně oocyst než kuřata infikovaná jako embrya (tabulka č. 1, obrázek č. 3 a 4). Kuřata infikovaná jako embrya infekční dávkou  $10^4$  oocyst *C. baileyi* produkovala přibližně  $2,8 \times 10^9$  oocyst během 17 dní po vylíhnutí, což je asi 85krát více než produkce oocyst u kuřat infikovaných ve věku jednoho dne ( $3,0 \times 10^7$  oocyst během 21 dní po vylíhnutí; obrázek č. 4). Poměr mezi

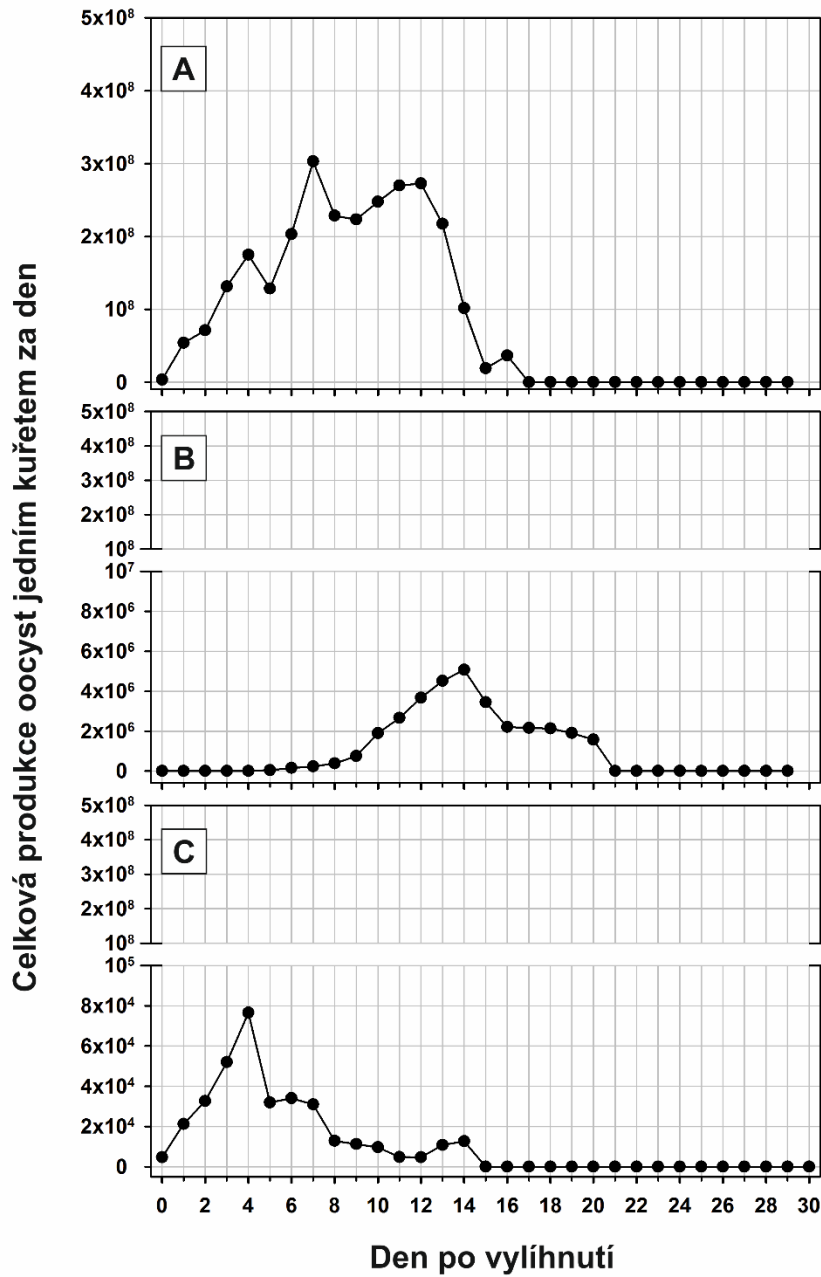
množstvím oocyst *C. baileyi* v inokulu a oocystami získanými od kuřat infikovaných jako embrya byl 1:280000, u kuřat infikovaných ve stáří jednoho dne to bylo 1:3200. Nejvyšší denní produkce oocyst *C. baileyi* u kuřat inokulovaných jako embrya byla pozorována 8. den po vylíhnutí (obrázek č. 4). Zatímco kuřata inokulována *C. parvum* ve stáří jednoho dne neprodukovala detekovatelné oocysty, kuřata inokulována jako embrya infekční dávkou  $10^4$  oocyst *C. parvum* produkovala během 15 dní po vylíhnutí přibližně  $4,0 \times 10^5$  oocyst. Poměr mezi obsahem oocyst *C. parvum* v inokulu a oocystami získanými od kuřat byl 1:35. Nejvyšší denní produkce oocyst *C. parvum* u kuřat inokulovaných jako embrya byla pozorována 5. den po vylíhnutí (obrázek č. 4).

**Obrázek č. 3:** Nátěry trusu barvené metodou dle Miláčka a Vítovce (4.2.6.) ukazující intenzitu vylučování oocyst (při zvětšení 1000×). **A)** kuře infikované *C. baileyi* jako embryo, **B)** kuře infikované *C. baileyi* ve stáří jednoho dne, **C)** kuře infikované *C. parvum* jako embryo, **D)** kuře infikované *C. parvum* ve stáří jednoho dne (nebyly nalezeny žádné oocysty). Všechna zvířata byla infikována infekční dávkou  $10^4$  oocyst a usmrcena 6 dní po vylíhnutí.





**Obrázek č. 4:** Přibližná celková produkce oocyst *Cryptosporidium* na ptáka, vypočtená z denní AUC (kumulovaná hodnota intenzity infekce) a celkové denní fekální produkce u kuřat infikovaných **A)** *C. baileyi* jako embrya, **B)** *C. parvum* jako embrya a **C)** *C. baileyi* ve stáří jednoho dne. Všechna zvířata byla infikována infekční dávkou  $10^4$  oocyst.



## 6 DISKUZE

Hlavním problémem experimentálních studií prováděných na kryptosporidiích je absence metod pro množení oocyst. V současné době neexistuje žádná univerzální *in-vitro* metoda pro množení kryptosporidií (Karanis 2017). V předešlých pracích (Current et Long 1983; Lindsay et al. 1989) se experimentálně podařilo v chorioalantoické membráně embryí kuřat popsat celý vývoj druhu *C. baileyi* získaného z ptáků a další kryptosporidie, pravděpodobně druhu *C. parvum*, získaného ze člověka a telete. Nicméně možnost vylíhnutí takto infikovaných embryí a průběh infekce po vylíhnutí nebyl v žádné z provedených studií zkoumán.

Přítomnost specifické DNA druhu *C. parvum* byla popsána u různých druhů ptáků (Ferrari et al. 2018; Gomes et al. 2012; Helmy et al. 2017; Ng et al. 2006; Oliveira et al. 2017; Santín et al. 2004), není však dosud zcela jasné, zda jsou ptáci tímto druhem přirozeně infikováni nebo slouží pouze jako pasivní přenašeči oocyst (Plutzer et Tomor 2009; Quah et al. 2011). Graczyk et al. (1998) detekovali přítomnost oocyst druhu *C. parvum* v trusu pěti experimentálně infikovaných kusů bernešky velké (*Branta canadensis*) devět dní po infekci, ale ve své práci dospěli k závěru, že toto uvolňování mohlo být způsobeno pouze průchodem inokula přes zažívací trakt hus. Získání infekčních oocyst *C. parvum* z asymptomatického nandu pampového (*Rhea americana*) lze považovat za probíhající infekci (Krindges et al. 2013). V této bakalářské práci jsme prokázali, že kuřata infikovaná druhem *C. parvum* jako embrya produkují 35krát více oocyst, než byl obsah oocyst v inokulu, což je důkazem, že došlo k ukončení vývojového cyklu a produkci nových oocyst. Také jsme prokázali, že je možné touto cestou oocysty *C. parvum* množit. Naproti tomu kuřata infikovaná ve stáří jednoho dne neprodukovala žádné oocysty, které by byly detekovatelné mikroskopii. Ve srovnání s teletem, které může produkovat až  $10^{10}$  oocyst *C. parvum* (Nydam et al. 2001), produkuje kuře infikované ve stádiu embrya pouze  $3 \times 10^5$  oocyst. Na druhou stranu je třeba vzít v úvahu náklady spojené s ošetřováním a ustájením telat, stejně jako délku březosti skotu. V porovnání s telaty představuje kuřecí model výrazně jednodušší a levnější variantu.

Produkce oocyst *C. baileyi* u kuřat infikovaných ve stáří jednoho dne je v souladu s výsledky publikovanými v dřívějších studiích (Abbassi et al. 1999; Lindsay et Blagburn 1990). Podobně jako v našem experimentu, již dříve byla zaznamenána postupná ztráta infekce *C. baileyi* u kuřat infikovaných ve stáří jednoho dne (Sréter et al. 1995; Sréter et Varga 2000). Kromě této skutečnosti jsme také prokázali, že mají kuřata infikovaná jako embrya masivní infekci a produkují obrovské množství oocyst. V porovnání s množstvím použité infekční dávky, produkují kuřata infikovaná jako embrya 280000 krát více oocyst. Wunderlin et al. (1997) ukázal, že kuřecí embrya uvolní do vejce dvakrát více oocyst *C. baileyi* než vyprodukují kuřata, která byla infikována ve stáří dvou dnů. Přestože jsme v této práci nesledovali, kolik oocyst se vytvoří a uvolní z embrya již ve vejci, celková produkce oocyst u kuřat infikovaných jako embrya byla asi 8000 krát vyšší než u kuřat infikovaných ve stáří jednoho dne.

Naše zjištění, že průběh infekce nebyl ovlivněn velikostí infekční dávky, je v souladu s předchozími studii (Kvác et al. 2016; Yousof et al. 2017; Zambriski et al. 2013) a naznačuje, že by mohl mít tento způsob množení úspěch i s inokulem o malém počtu oocyst. Tento fakt je důležitý, protože spousta hostitelů vylučuje jen nízký počet oocyst (Holubová et al. 2016; Ortega-Mora et al. 1999; Vítovec et al. 2006). Minimální velikost infekční dávky je však nutné ještě ověřit dalšími experimenty.

V souladu s předchozími studii nebyla infekce druhem *C. parvum* a *C. baileyi* u jednodenních kuřat spojena s klinickými příznaky infekce (Ferrari et al. 2018; Gomes et al. 2012; Graczyk et al. 1998; Hatkin et al. 1990; Helmy et al. 2017; Ng et al. 2006; Oliveira et al. 2017; Santín et al. 2004). Naproti tomu u kuřat infikovaných jako embrya druhem *C. baileyi* nastala 100% úmrtnost během 16 dnů po vylíhnutí.

Jak bylo již dříve zjištěno, u ostatních ptáků a savců se *C. parvum* vyvíjí primárně v tenkém střevě. V naší práci byla detekována specifická DNA kryptosporidií pouze v duodenu a jejunoileu u kuřat infikovaných ve stáří jednoho dne (Li et al. 2013; Tzipori et al. 1983; Vítovec et Koudela 1992; Zylan et al. 2008). Naopak kuřata infikovaná jako embrya měla navíc specifickou DNA i ve slepém střevě, tlustém střevě a průdušnici. Předchozí studie ohledně infekce tlustého střeva druhem *C. parvum* byly buď u hostitelů s imunodeficiencí (Benamrouz et al. 2012b; Certad et al. 2007) nebo karcinomem (Benamrouz et al. 2012a; Osman et al. 2017; Sulzyc-Bielicka et al. 2018). Vývoj *C.*

*parvum* v průdušnici je v souladu se studiemi Azmanis et al. (2018) a Palkovič et Maroušek (1988), kteří popsali přítomnost tohoto druhu v průdušnici přirozeně a experimentálně infikovaných ptáků.

Druh *C. baileyi* má širokou tkáňovou specificitu u přirozeně i experimentálně infikovaných ptáků, s infekcí ve spojivce, nosohltanu, průdušnici, průduškách, vzduchových vacích, tenkém a tlustém střevě, slepém střevě, kloace, burze Fabricii, ledvinách a močových cestách (Abbassi et al. 1999; Hatkin et al. 1990; Lindsay et Blagburn 1990; Ryan et Xiao 2008). Podobně jako v této práci byl vývoj parazita většinou soustředěn ve střevě, burse Fabricii a kloace (Blagburn et al. 1991; Goodwin et Brown 1989; Chvala et al. 2006; Lindsay et al. 1987; Surl et al. 2003).

Citlivost kuřat infikovaných jako embrya k intenzivnějším multiorgánovým infekcím je pravděpodobně způsobena nezralostí jejich imunitního systému. Lindsay et al. (1988), Sréter et al. (1995) a Taylor et al. (1994) zjistili, že vrozená rezistence ke *C. baileyi* souvisí s věkem; starší ptáci s lépe fungujícím imunitním systémem jsou schopni zbavit se infekce podstatně dříve a vylučují celkově nižší počet oocyst. U *C. baileyi* má průběh infekce u kuřat infikovaných jako embrya velkou podobnost s vrozenou toxoplazmózou, kde se infekce šíří po celém těle, u nejvíce postižených jedinců se vyskytuje subklinické onemocnění a pokud se neléčí, infekce je spojena s vážným až smrtelným onemocněním (McAuley 2014).

## 7 ZÁVĚR

Tato studie ukázala, že kuřata vylíhnutá z infikovaných embryí produkovala mnohonásobně více oocyst *C. baileyi* a *C. parvum* než byla dávka infekce. Což naznačuje, že by kuřecí embrya mohla být alternativní, finančně a technicky efektivní model pro množení a další studium parazitů rodu *Cryptosporidium*. Budoucí studie by měly prozkoumat infekčnost jiných druhů rodu *Cryptosporidium*.

## 8 PŘEHLED LITERATURY

- Abbassi H., Coudert F., Cherel Y., Dambrine G., Brugere–Picoux J., Naciri M. 1999:** Renal Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium baileyi*) in specific-pathogen-free chickens experimentally coinfecting with Marek's disease virus. *Avian Diseases* 43: 738–744.
- Alves M., Xiao L.H., Sulaiman I., Lal A.A., Matos O., Antunes F. 2003:** Subgenotype analysis of *Cryptosporidium* isolates from humans, cattle, and zoo ruminants in Portugal. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2744–2747.
- Anderson B.C. 1987:** Abomasal Cryptosporidiosis in Cattle. *Veterinary Pathology* 24: 235–238.
- Angus K.W. 1990:** Cryptosporidiosis in ruminants. In: Dubey, J.P., Speer, C.A., Fayer, R. (Eds.), *Cryptosporidiosis in Man and Animals*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 83–103.
- Arrowood M.J., Sterling C.R. 1987:** Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *Journal of Parasitology* 73: 314–319.
- 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. 2002:** *In-vitro* cultivation of *Cryptosporidium* species. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 390–400.
- Azmanis P., di Somma A., Pappalardo L., Silvanose C.D., Bangoura B. 2018:** First detection of *Cryptosporidium parvum* in falcons (Falconiformes): Diagnosis, molecular sequencing, therapeutic trial and epidemiological assessment of a possible emerging disease in captive falcons. *Veterinary Parasitology* 252: 167–172.
- Benamrouz S., Conseil V., Creusy C., Calderon E., Dei-cas E., Certad G. 2012a:** Parasites and malignancies, a review, with emphasis on digestive cancer induced by *Cryptosporidium parvum* (Alveolata: Apicomplexa). *Parasite* 19: 101–115.

- Benamrouz S., Guyot K., Gazzola S., Mouray A., Chassat T., Delaire B., et al. . 2012b:** *Cryptosporidium parvum* infection in SCID mice infected with only one oocyst: qPCR assessment of parasite replication in tissues and development of digestive cancer. PLoS One 7: e51232.
- Bhanushali M., Bagale V., Shirode A., Joshi Y., Kadam V. 2010:** An *in-vitro* toxicity testing- a reliable alternative to toxicity testing by reduction, replacement and refinement of animals. International Journal of Advances in Pharmaceutical Sciences 15–31.
- Blagburn B.L., Lindsay D.S., Hoerr F.J., Davis J.F., Giambrone J.J. 1991:** Pathobiology of Cryptosporidiosis (*C. baileyi*) in broiler chickens. The Journal of Protozoology 38: 25S–28S.
- Bouzid M., Hunter P.R., Chalmers R.M., Tyler K.M. 2013:** *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. Clinical Microbiology Reviews 26: 115–134.
- Caccio S.M., Widmer G. 2014:** *Cryptosporidium*: parasite and disease. Springer Wien Heidelberg New York Dordrecht London, pp. 487.
- Canning E.U. 1990:** Protozoan infections. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 84 suppl 1: 19–24.
- Carreno R.A., Martin D.S., Barta J.R. 1999:** *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasitology Research 85: 899–904.
- Certad G., Ngouanesavanh T., Guyot K., Gantois N., Chassat T., Mouray A., Fleurisse L., Pinon A., Cailliez J.C., Dei-Cas E., Creusy C. 2007:** *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. Infectious Agents and Cancer 2: 22.
- Current W.L., Long P.L. 1983:** Development of human and calf *Cryptosporidium* in chicken embryos. The Journal of Infectious Diseases 148: 1108–1113.
- Current W.L., Reese N.C. 1986:** A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. The Journal of Protozoology 33: 98–108.

- Current W.L., Upton S.J., Haynes T.B. 1986:** The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology* 33: 289–96.
- Current W.L., Garcia L.S. 1991:** Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews* 4: 325–358.
- Fayer R., Leek R.G. 1984:** The effects of reducing conditions, medium, pH, temperature, and time on *in-vitro* excystation of *Cryptosporidium*. *The Journal of Protozoology* 31: 567–569.
- Fayer R., Speer C., Dubey J. (Eds.) 1997:** The general biology of *Cryptosporidium* in *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 530.
- Fayer R., Morgan U.M., Upton S.J. 2000:** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Journal for Parasitology* 30: 1305–1322.
- Fayer R., Santín M., Xiao L. 2005:** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *The Journal of Protozoology* 91: 624–629.
- Fayer R., Santín M., Trout J.M., Greiner E. 2006:** Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Veterinary Parasitology* 135: 105–12.
- Fayer R., Xiao L. (Eds.) 2007:** *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, New York, pp. 560.
- 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. *Experimental Parasitology* 184: 109–114.
- Flanigan T.P., Aji T., Marshall R., Soave R., Aikawa M., Kaetzel C. 1991:** Asexual development of *Cryptosporidium parvum* within a differentiated human enterocyte cell line. *Infection and Immunity* 59: 234–239.
- Gharagozlou M.J., Dezfoulian O., Rahbari S., Bokaie S., Jahanzad I., Razavi A.N. 2006:** Intestinal Cryptosporidiosis in turkeys in Iran. *Journal of Veterinary Medicine A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine* 53: 282–285.



- Girouard D., Gallant J., Akiyoshi D.E., Nunnari J., Tzipori S. 2006:** Failure to propagate *Cryptosporidium* spp. in cell-free culture. *Journal of Parasitology* 92: 399–400.
- 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., Brown J. 1989:** Intestinal Cryptosporidiosis in chickens. *Avian Diseases* 33: 770–777.
- 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.
- Graczyk T.K., Fayer R., Trout J.M., Lewis E.J., Farley C.A., Sulaiman I., Lal A.A. 1998:** Giardia sp. cysts and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in the feces of migratory Canada geese (*Branta canadensis*). *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2736–2738.
- Guy J.S., Levy M.G., Ley D.H., Barnes H.J., Gerig T.M. 1988:** Interaction of reovirus and *Cryptosporidium baileyi* in experimentally infected chickens. *Avian Diseases* 32: 381–390.
- Hatkin J.M., Lindsay D.S., Giambone J.J., Hoerr F.J., Blagburn B.L. 1990:** Experimental biliary Cryptosporidiosis in broiler chickens. *Avian Diseases* 34: 454–457.
- 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.
- Hijjawi N.S., Meloni B.P., Ryan U.M., Olson M.E., Thompson R.C. 2002:** Successful *in-vitro* cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *International Journal for Parasitology* 32: 1719–1726.

- Hijjawi N.S., Meloni B.P., Ng'anzo M., Ryan U.M., Olson M.E., Cox P.T., Monis P.T., Thompson R.C. 2004:** Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *International Journal for Parasitology* 34: 769–77.
- Hijjawi N. 2010:** *Cryptosporidium*: New developments in cell culture. *Experimental Parasitology* 124: 54–60.
- Hijjawi N., Estcourt A., Yang R., Monis P., Ryan U. 2010:** Complete development and multiplication of *Cryptosporidium hominis* in cell-free culture. *Veterinary Parasitology* 169: 29–36.
- 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.
- Holubová N., Sak B., Hlásková L., Květoňová D., Hanzal V., Rajský D., Rost M., McEvoy J., Kváč M. 2018:** Host specificity and age-dependent resistance to *Cryptosporidium avium* infection in chickens, ducks and pheasants. *Experimental Parasitology* 191: 62–65.
- Holubová N., Zikmundová V., Limpouchová Z., Sak B., Konečný R., Hlásková L., Rajský D., Kopacz Z., McEvoy J., Kváč M. 2019:** *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. *European Journal of Protistology* 69: 70–87.
- Hornok S., Bitay Z., Széll Z., Varga I. 1998:** Assessment of maternal immunity to *Cryptosporidium baileyi* in chickens. *Veterinary Parasitology* 79: 203–12.
- 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.
- Huang L., Zhu H.L., Zhang S.M., Wang R.J., Liu L.M., Jian F.C., Ning C.S., Zhang L.X. 2014:** An *in-vitro* model of infection of chicken embryos by *Cryptosporidium baileyi*. *Experimental Parasitology* 147: 41–47.

- Choi M.H., Hong S.T., Chai J.Y., Park W.Y., Yu J.R. 2004:** *In-vitro* culture of *Cryptosporidium muris* in a human stomach adenocarcinoma cell line. The Korean Journal of Parasitology 42: 27–34.
- Chvala S., Fragner K., Hackl R., Hess M., Weissenbock H., 2006:** *Cryptosporidium* infection in domestic geese (*Anser anser* f. *domestica*) detected by *in-situ* hybridization. Journal of Comparative Pathology 134: 211–228.
- Jaggi N., Rajeshwari S., Mittal S.K., Mathur M.D., Baveja U.K. 1994:** Assessment of the immune and nutritional status of the host in childhood diarrhoea due to *Cryptosporidium*. Journal of Communicable Diseases 26: 181–185.
- Jeníková M., Němejc K., Sak B., Květoňová D., Kváč M. 2011:** New view on the age-specificity of pig *Cryptosporidium* by species-specific primers for distinguishing *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. Veterinary Parasitology 176: 120–125.
- Karanis P. 2017:** The truth about *in-vitro* culture of *Cryptosporidium* species. Parasitology 145: 855–864.
- Krindges M.M., Almeida A.B., Araujo D.N., Stefani L.M., da Silva A.S. 2013:** Parasitological and Molecular Detection of *Cryptosporidium parvum* in Rheas (*Rhea americana*). Acta Scientiae Veterinariae 41: 10.
- Kváč M., Ondráčková Z., Květoňová D., Sak B., Vítovec J. 2007:** Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). Veterinary Parasitology 143: 229–233.
- Kváč M., Sak B., Květoňová D., Ditrich O., Hofmannová L., Modrý D., Vítovec J., Xiao L. 2008:** Infectivity pathogenicity and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. Veterinary Parasitology 153: 363–367.
- Kváč M., Sak B., Květoňová D., Secor W.E. 2009a:** Infectivity of gastric and intestinal *Cryptosporidium* species in immunocompetent Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). Veterinary Parasitology 163: 33–38.
- Kváč M., Hanzlíková D., Sak B., Květoňová D. 2009b:** Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotyp

- e II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology* 160: 319–22.
- Kváč M., Kestránová M., Pinková M., Květoňová D., Kalinová J., Wagnerová P., Kotková M., Vítovec J., Ditrich O., McEvoy J., Stenger B., Sak B. 2013:** *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Sus scrofa*). *Veterinary Parasitology* 191: 218–27.
- Kváč M., Hofmannová L., Hlásková L., Květoňová D., Vítovec J., McEvoy J., Sak B. 2014:** *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Veterinary Parasitology* 201: 9–17.
- Kváč M., Havrdová N., Hlásková L., Daňková T., Kanděra J., Ježková J., Vítovec J., Sak B., Ortega Y., Xiao L., Modrý D., Chelladurai J.R., Prantlová V., McEvoy J. 2016:** *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *PLoS One* 11: e0147090.
- Kváč M., Vlnatá G., Ježková J., Horčíčková M., Konečný R., Hlásková L., McEvoy J., Sak B. 2018:** *Cryptosporidium occultus* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in rats. *European Journal of Protistology* 63: 96–104.
- Ledvinka Z., Zita L., Tůmová E. 2009:** Vybrané kapitoly z chovu drůbeže. Vyd. 2. V Praze: Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, katedra speciální zootechniky. ISBN 978–80–213–1921–9, pp. 86.
- Levine N.D. 1980:** Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *Journal of Parasitology* 66: 830–834.
- Li S., Li W., Yang Z., Song S., Yang J., Gong P., Zhang W., Liu K., Li J., Zhang G., Zhang X. 2013:** Infection of cattle with *Cryptosporidium parvum*: mast cell accumulation in small intestine mucosa. *Veterinary Pathology* 50: 842–848.
- Lindsay D.S., Blagburn B.L., Hoerr F.J., Giambrone J.J. 1987:** Experimental *Cryptosporidium baileyi* infections in chickens and turkeys produced by ocular inoculation of oocysts. *Avian Diseases* 31: 355–357.
- Lindsay D.S., Blagburn B.L., Ernest J.A. 1987:** Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in chickens. *Journal of Parasitology* 73: 242–244.

- 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.
- Lindsay D.S., Blagburn B.L., Sundermann C.A., Hoerr F.J. 1989:** Experimental infections in domestic ducks with *Cryptosporidium baileyi* isolated from chickens. Avian Diseases 33: 69–73.
- Lindsay D.S., Blagburn B.L. 1990:** Cryptosporidiosis in Birds. In: Dubey J.P., Speer C.A., Fayer R. (Eds.), Cryptosporidiosis in man and animals. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 370.
- Lindsay D.S. 1997:** Laboratory models of Cryptosporidiosis. In: Fayer R. (Ed.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 210–224.
- Matsui T., Morii T., Fujino T., Luzuimimda-Tadeja S., Itakura C., Tadeja S.L. 1992:** Oocyst production and immunogenicity of *Cryptosporidium* sp. in chickens. Japanese Journal of Parasitology 41: 24–29.
- MacKenzie W.R., Hoxie N.J., Proctor M.E., Gradus M.S., Blair K.A., Peterson D.E., Kazmierczak J.J., Addiss D.A., Fox K.R., Rose J.R., Davis J.P. 1994:** A massive outbreak of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. The New England Journal of Medicine 331: 161–167.
- McAuley J.B. 2014:** Congenital Toxoplasmosis. Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society 3 Suppl 1: S30–35.
- McEvoy J.M., Giddings C.W. 2009:** *Cryptosporidium* in commercially produced turkeys on-farm and postslaughter. Letters in Applied Microbiology 48: 302–306.
- Meisel J.L., Perera D.R., Meligro C., Rubin C.E. 1976:** Overwhelming watery diarrhea associated with *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. Gastroenterology 70: 1156–1160.
- Miláček P., Vítovec J. 1985:** Differential staining of *cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. Folia Parasitologica 32: 50.
- Miller C.N., Jossé L., Brown I., Blakeman B., Povey J., Yiangou L., Price M., Cinatl J.Jr., Xue W.F., Michaelis M., Tsaousis A.D. 2018:** A cell culture platform for *Cryptosporidium* that enables long-term cultivation and new tools for the

- systematic investigation of its biology. *International Journal for Parasitology* 48: 197–201.
- Monis P.T., Thompson R.C.A. 2003:** *Cryptosporidium* and *Giardia*- zoonoses: fact or fiction? *Infection, Genetics and Evolution* 3: 233–244.
- Morada M., Lee S., Gunther-Cummins L., Weiss L.M., Widmer G., Tzipori S., Yarlett N. 2016:** Continuous culture of *Cryptosporidium parvum* using hollow fiber technology. *International Journal for Parasitology* 46: 21–29.
- Morgan U.M., Xiao L., Fayer R., Lal A.A., Thompson R.C. 1999:** Variation in *Cryptosporidium*: towards a taxonomic revision of the genus. *International Journal for Parasitology* 29: 1733–1751.
- Nakamura A.A., Simoes D.C., Antunes R.G., da Silva D.C., Meireles M.V. 2009:** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. from fecal samples of birds kept in captivity in Brazil. *Veterinary Parasitology* 166: 47–51.
- Neill M.A., Rice S.K., Ahmad N.V., Flanigan T.P. 1996:** Cryptosporidiosis: an unrecognized cause of diarrhea in elderly hospitalized patients. *Clinical Infectious Diseases* 22: 168–170.
- Ng J., Pavlásek I., Ryan U. 2006:** Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7548–7553.
- Nime F.A., Burek J.D., Page D.L., Holscher M.A., Yardley J.H. 1976:** Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70: 592–598.
- Nydam D.V., Wade S.E., Schaaf S.L., Mohammed H.O. 2001:** Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp. cysts shed by dairy calves after natural infection. *American Journal of Veterinary Research* 62: 1612–1615.
- 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*). *Veterinary Parasitology* 243: 148–150.
- Ortega-Mora L.M., Requejo-Fernández J.A., Pilar-Izquierdo M., Pereira-Bueno J. 1999:** Role of adult sheep in transmission of infection by *Cryptosporidium parvum* to

- lambs: confirmation of periparturient rise. *International Journal for Parasitology* 29: 1261–8.
- Osman M., Benamrouz S., Guyot K., Baydoun M., Frealle E., Chabe M., Gantois N., Delaire B., Goffard A., Aoun A., Jurdi N., Dabboussi F., Even G., Slomianny C., Gosset P., Hamze M., Creusy C., Viscogliosi E., Certad G. 2017:** High association of *Cryptosporidium* spp. infection with colon adenocarcinoma in Lebanese patients. *PLoS One* 12: e0189422.
- Parsons M.B., Travis D., Lonsdorf E.V., Lipende I., Roellig D.M.A., Kamenya S., Zhang H., Xiao L., Gillespie T.R. 2015:** Epidemiology and Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp. in Humans, Wild Primates, and Domesticated Animals in the Greater Gombe Ecosystem, Tanzania. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9: e0003529.
- Pavlásek I. 1999:** Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékařství* 3: 290–301.
- Peng M.M., Matos O., Gatei W., Das P., Stantic-Pavlinic M., Bern C., Sulaiman I.M., Glaberman S., Lal A.A., Xiao L.H. 2001:** A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 28S–31S.
- Petry F., Robinson H.A., McDonald V. 1995:** Murine infection model for maintenance and amplification of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 1922–1924.
- Plutzer J., Tomor B. 2009:** The role of aquatic birds in the environmental dissemination of human pathogenic *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Hungary. *International Journal for Parasitology* 58: 227–231.
- Quah J.X., Ambu S., Lim Y.A., Mahdy M.A., Mak J.W. 2011:** Molecular identification of *Cryptosporidium parvum* from avian hosts. *Parasitology* 138: 573–577.
- R Core Team 2019:** R. A language and environment for statistical computing.; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Reboredo-Fernandez A., Ares-Mazas E., Caccio S.M., Gomez-Couso H. 2015:** Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest Spain). *Parasitology* 142: 917–925.
- Ren X., Zhao J., Zhang L., Ning C., Jian F., Wang R., Lv C., Wang Q., Arrowood M.J., Xiao L. 2012:** *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp.(Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Experimental Parasitology* 130: 274–281.
- Rizzo M.L., Szekely G.J. 2010:** Disco Analysis: A Nonparametric Extension of Analysis of Variance. *The Annals of Applied Statistics* 4: 1034–1055.
- Rossle N.F., Latif B. 2013:** Cryptosporidiosis as threatening health problem: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3: 916–924.
- Ryan U.M., Xiao L. 2008:** Birds, in: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, pp. 395–418.
- 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. *Veterinary Parasitology* 122: 103–117.
- Slavin D. 1955:** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology* 65: 262–266.
- Scott T.R. 2004:** Our current understanding of humoral immunity of poultry. *Poultry Science* 83: 574–579.
- Sréter T., Varga I., Békési L. 1995:** Age-dependent resistance to *Cryptosporidium baileyi* in chickens. *Journal of Parasitology* 81: 827–829.
- Sréter T., Széll Z., Varga I. 1999:** Attempted chemoprophylaxis of Cryptosporidiosis in chickens, using diclazuril, toltrazuril, or garlic extract. *Journal of Parasitology* 85: 989–991.
- Sréter T., Varga I. 2000:** Cryptosporidiosis in birds-a review. *Veterinary Parasitology* 87: 261–79.
- Sulzyc-Bielicka V., Kołodziejczyk L., Jaczewska S., Bielicki D., Safranow K., Bielicki P., et al. 2018:** Colorectal cancer and *Cryptosporidium* spp. infection. *PLoS One* 13: e0195834.
- Surl C.G., Kim S.M., Kim H.C. 2003:** Viability of preserved *Cryptosporidium baileyi* oocysts. *The Korean Journal of Parasitology* 41: 197–201.



- Taylor M.A., Catchpole J., Norton C.C., Green J.A. 1994:** Variations in oocyst output associated with *Cryptosporidium baileyi* infections in chickens. *Veterinary Parasitology* 53: 7–14.
- Taylor M.A., Marshall R.N., Green J.A., Catchpole J. 1999:** The pathogenesis of experimental infections of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in outbred nude mice. *Veterinary Parasitology* 86: 41–48.
- Thompson R.C., Olson M.E., Zhu G., Enomoto S., Abrahamsen M.S., Hijjawi N.S. 2005:** *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology* 59: 77–158.
- Thurston-Enriquez J.A., Watt P., Dowd S.E., Enriquez R., Pepper I.L., Gerba C.P. 2002:** Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *Journal of Food Protection* 65: 378–382.
- Totková A., Klobušický M., Valent M. 2008:** *Lekárska parazitológia: učebnica pre lekárske a nelekárske študijné programy*. Osveta, ISBN 80–8063–263–2, pp. 400.
- Tyzzer E.E. 1907:** A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 5: 12.
- Tyzzer E.E. 1910:** An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glands of the common mouse. *Journal of Medical Research* 23: 487–509.
- Tyzzer, E.E., 1912:** *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde* 26: 394–412.
- Tyzzer E.E. 1929:** Coccidiosis in gallinaceous bird. *American journal of hygiene* 10: 269–271.
- Tzipori S., Angus K.W., Gray E.W., Campbell I., Allan F. 1981:** Diarrhea in lambs experimentally infected with *Cryptosporidium* isolated from calves. *American Journal of Veterinary Research* 42: 1400–1404.
- Tzipori S., Smith M., Halpin C., Angus K.W., Sherwood D., Campbell I. 1983:** Experimental Cryptosporidiosis in Calves - Clinical Manifestations and Pathological Findings. *Veterinary Record* 112: 116–120.
- Tzipori S., Ward H. 2002:** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection* 4: 1047–1058.

- Vetterling J.M., Takeuchi A., Madden P.A. 1971:** Ultrastructure of *Cryptosporidium wrairi* from the guinea pig. *The Journal of Protozoology* 18: 248–60.
- Vítovec J., Koudela B. 1992:** Pathogenesis of intestinal Cryptosporidiosis in conventional and gnotobiotic piglets. *Veterinary Parasitology* 43: 25–36.
- Vítovec J., Hamadejová K., Landová L., Kváč M., Květoňová D., Sak B. 2006:** Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *Journal of Veterinary Medicine B* 53: 239–243.
- Wang R.J., Li J.Q., Chen Y.C., Zhang L.X., Xiao L.H. 2018:** Widespread occurrence of *Cryptosporidium* infections in patients with HIV/AIDS: Epidemiology, clinical feature, diagnosis, and therapy. *Acta Tropica* 187: 257–263.
- Woodmansee D.B., Pohlenz J.F.L. 1983:** Development of *Cryptosporidium* sp. in a human rectal tumor cell line, in Proc. 4th Int. Symp. on Neonatal Diarrhea, Veterinary Infectious Disease Organization, University of Saskatchewan, Canada, pp. 306–319.
- Wunderlin E., Wild P., Eckert J. 1997:** Comparative reproduction of *Cryptosporidium baileyi* in embryonated eggs and in chickens. *Parasitology Research* 83: 712–715.
- Xiao L., Escalante L., Yang C., Sulaiman I., Escalante A.A., Montali R.J., Fayer R., Lal A.A. 1999:** Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1578–1583.
- Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S.J. 2004:** *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 72–97.
- Xiao L., Fayer R. 2008:** Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International Journal for Parasitology* 38: 1239–1255.
- Xiao L., Ryan U.M., Feng Y. 2015:** *Biology of foodborne parasites*. CRC Press, Boca Raton, ISBN 978-1-4665-6883-9, pp. 520.
- Yousof H.S., Khater M.M., El-Sayed S.H., El-Badry A.A. 2017:** Diagnostic biomarkers in murine Cryptosporidiosis: dose- and age-related infection. *Journal of Parasitic Diseases* 41: 831–836.

- Yuan L., Yan W., Wang T., Qian W., Ding K., Zhang L., Han L., Shao X. 2014:** Effects of different inoculation routes on the parasit sites of *Cryptosporidium baileyi* infection in chickens. *Experimental Parasitology* 145: 152–156.
- Zambriski J.A., Nydam D.V., Bowman D.D., Bellosa M.L., Burton A.J., Linden T.C., Liotta J.L., Ollivett T.L., Tondello-Martins L., Mohammed H.O. 2013:** Description of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in experimentally challenged dairy calves. *Parasitology Research* 112: 1247–1254.
- 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.
- Zylan K., Bailey T., Smith H.V., Silvanose C., Kinne J., Schuster R.K., Hyland K. 2008:** An outbreak of Cryptosporidiosis in a collection of Stone curlews (*Burhinus oedicephalus*) in Dubai. *Avian Pathology* 37: 521–526.