

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zemědělství
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Katedra: Zootechnických věd
Vedoucí katedry: prof. Ing. Václav Matoušek, CSc.

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

VÝSKYT A GENOTYPIZACE KRYPTOSPORIDIÍ U
PŠTROSŮ VE FARMOVÝCH CHOVECH

Autor bakalářské práce: Adéla Hejzlarová
Vedoucí bakalářské práce: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.
Konzultanti bakalářské práce: Ing. Nikola Holubová

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 30. června 2020

.....

Adéla Hejzlarová

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D., za věnovaný čas, trpělivost a odborné rady při tvorbě této práce. Dále také děkuji všem pracovníkům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za jejich pomoc při práci v laboratoři a přátelské prostředí. Nesmím také opomenout mou rodinu, která mne podporovala po celou dobu studia.

Tato práce byla finančně podpořena z projektu Grantové agentury České republiky GAČR 18S-12364S (řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, PhD.) a Grantové agentury Jihočeské univerzity GAJU 040/2019/Z (řešitelka: Ing. Nikola Holubová).

ANOTACE

Ptačí kryptosporidióza je běžné parazitární onemocnění způsobené jednobuněčnými parazity rodu *Cryptosporidium* spp. Tito paraziti byli popsáni jako příčina respiračních a gastrointestinálních nemocí jak u lidí, tak u hospodářských i volně žijících zvířat. Na čtyřech pštrosích farmách v České republice bylo odebráno celkem 204 vzorků trusu pštrosů dvouprstých (*Struthio camelus*). Vzorky byly molekulárně i mikroskopicky pozitivní na přítomnost kryptosporidií. Celkově bylo 2,5 % (5/204) mikroskopicky a 5,9 % (12/204) molekulárně pozitivních na *Cryptosporidium* spp. Fylogenetická analýza genových sekvencí malých podjednotek rRNA (SSU), aktinu a gp60 ukázala přítomnost *Cryptosporidium* avian genotyp II (7x) a *C. ubiquitum* IXa (5x). Pouze v trusu pštrosů infikovaných *Cryptosporidium* avian genotyp II proběhla detekce oocyst pomocí mikroskopických metod. Oocysty byly purifikovány ze společného vzorku čtyř ptáků, ty byly morfometricky charakterizovány a použity pro experimentální infekci. Oocysty byly infekční pro housata (*Anser anser* f. *domestica*), kuřata (*Gallus gallus* f. *domestica*) a korely (*Nymphicus hollandicus*) s prepatentním obdobím 4, 7 a 8 dní po infekci. Avšak oocysty nebyly infekční pro myši (*Mus musculus*) a potkany (*Rattus norvegicus*). Oocysty *Cryptosporidium* avian genotyp II měří $6,13 \times 5,15 \mu\text{m}$, takže jsou okem nerozeznatelné od *C. baileyi* a *C. avium*. Intenzita infekce se pohybovala v rozmezí od 1 000 do 16 000 oocyst na gram trusu. Žádný z přirozeně nebo experimentálně infikovaných ptáků v této studii nevykazoval klinické příznaky.

Klíčová slova: *Cryptosporidium* spp., kryptosporidióza, pštros, oocysty, experimentální infekce, prevalence

ANOTATION

Avian cryptosporidiosis is a common parasitic disease caused by unicellular parasites belonging to the genus *Cryptosporidium* spp. These parasites have been described as a cause of various respiratory and gastrointestinal diseases of humans, farm and wild animals. Total of 204 faecal samples of common ostriches (*Struthio camelus*) were collected on four ostrich farms in the Czech Republic. Samples were screened for *Cryptosporidium* presence by microscopy and PCR/sequencing. Overall, 2.5 % (5/204) and 5.9 % (12/204) of animals were positive for *Cryptosporidium* by microscopy and PCR, respectively. Phylogenetic analysis of small subunit rRNA, actin and gp60 gene sequences showed the presence of *Cryptosporidium* avian genotype II (n=7) and *C. ubiquitum* IXa (n=5). Only ostriches infected with *Cryptosporidium* avian genotype II shed oocysts that were detectable by microscopy. Oocysts were purified from a pooled sample of four birds, characterised morphometrically and used in experimental infections to determine biological characteristics. Oocysts of *Cryptosporidium* avian genotype II measure $6.13 \times 5.15 \mu\text{m}$, which is indistinguishable from *C. baileyi* and *C. avium*. *Cryptosporidium* avian genotype II was experimentally infectious for geese (*Anser anser* f. *domestica*), chickens (*Gallus gallus* f. *domestica*) and cockatiels (*Nymphicus hollandicus*), with a prepatent period of four, seven and eight days post infection, respectively and not infectious for mice (*Mus musculus*) and rats (*Rattus norvegicus*). The infection intensity ranged from 1,000 to 16,000 oocysts per gram. None of the naturally or experimentally infected birds developed clinical signs in the present study.

Key words: *Cryptosporidium* spp., cryptosporidiosis, ostrich, oocyst, experimental infection, prevalence

OBSAH

1. ÚVOD	8
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	9
2.1 ROD <i>CRYPTOSPORIDIUM</i>	9
2.1.1 TAXONOMIE	9
2.1.2 HISTORIE	10
2.1.3 VÝVOJOVÝ CYKLUS	11
2.1.4 HOSTITELSKÉ SPEKTRUM	13
2.1.5 LOKALIZACE INFEKCE	14
2.1.6 ODOLNOST OOCYST KRYPTOSPORIDIÍ	15
2.2 KRYPTOSPORIDIÓZA	15
2.2.1 ŽALUDEČNÍ KRYPTOSPORIDIOZA	16
2.2.2 STŘEVNÍ KRYPTOSPORIDIÓZA	16
2.2.3 PRŮBĚH INFEKCE	16
2.2.4 PROJEVY/PŘÍZNAKY	17
2.2.5 PŘENOS	18
2.2.6 LÉČBA	19
2.3 PTAČÍ KRYPTOSPORIDIE A KRYPTOSPORIDIÓZA PTÁKŮ	19
2.3.1 KRYPTOSPORIDIE A KRYPTOSPORIDIÓZA PŠTROSŮ	20
2.3.1.1 <i>CRYPTOSPORIDIUM BAILEYI</i>	21
2.3.1.2 <i>CRYPTOSPORIDIUM AVIAN GENOTYP II</i>	22
2.3.1.3 <i>CRYPTOSPORIDIUM MURIS</i>	22
2.3.1.4 <i>CRYPTOSPORIDIUM UBIQUITUM</i>	23
3. CÍL PRÁCE	25
4. MATERIÁL A METODIKA ZPRACOVÁNÍ	26
4.1 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	26
4.2 BARVENÍ OOCYST KRYPTOSPORIDIÍ POMOCÍ METODY MILÁČEK ET VÍTOVEC (1985)	26
4.3 MOLEKULÁRNÍ METODY VYŠETŘENÍ TRUSU	27
4.3.1 IZOLACE DNA	27
4.3.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZCOVÁ REAKCE (PCR)	28
4.3.3 GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	29
4.3.4 IZOLACE Z GELU	30

4.3.5	SEKVENACE A GENOTYPIZACE	31
4.4	PURIFIKACE OOCYST	32
4.4.1	SACHARÓZOVÝ GRADIENT (ARROWOOD ET STEARLING 1987)	32
4.4.2	CESIUM CHLORIDOVÝ GRADIENT (ARROWOOD ET DONALDSON 1996)	33
4.4.3	KONCENTRACE OOCYST	33
4.5	EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE	33
4.5.1	CHOV EXPERIMENTÁLNÍCH ZVÍŘAT	34
5.	VÝSLEDKY	35
5.1	VÝSKYT A PREVALENCE KRYPTOSPORIDIÍ	35
5.2	GENOTYPIZACE KRYPTOSPORIDIÍ	35
5.3	HOSTITELSKÁ SPECIFITA <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> AVIAN GENOTYPU II	39
5.4	MORFOMETRIE OOCYST <i>CRYPTOSPORIDIUM</i> AVIAN GENOTYPU II	41
6.	DISKUZE	43
7.	ZÁVĚR	47
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48

1. ÚVOD

Zástupci rodu *Cryptosporidium* jsou kosmopolitně rozšíření jednobuněční paraziti infikující převážně buňky gastrointestinálního a dýchacího traktu celé řady hostitelů patřících do všech tříd obratlovců (Current et Garcia 1991; O'Donoghue 1995). Do současné doby bylo uznáno 44 druhů kryptosporidií a je známo přes 200 genotypů (Čondlová et al. 2018; Horčíčková et al. 2018; Holubová et al. 2016; Kváč et al. 2013a; Xiao et al. 2004). Jednotlivé druhy kryptosporidií se od sebe liší morfologií oocyst, místem infekce v hostiteli a zejména hostitelským spektrem. U většiny genotypů nejsou známé téměř žádné biologické vlastnosti a většina byla odlišena od platných druhů a ostatních genotypů na základě odlišné sekvence genu kódujícího malou podjednotku rRNA, případně dalších genů (Stenger et al. 2015; Sulaiman et al. 1999).

V rámci rodu *Cryptosporidium* existují druhy, které primárně infikují střevní buňky, jiné však osidlují žaludeční epitel, případně další tkáně jako například plíce, ledviny nebo oko. U imunodeficitních jedinců mohou být infikovány i další tkáně (Wang et al. 2014). Některé druhy nezpůsobují klinické onemocnění, jiné jsou patogenní a vyvolávají akutní či chronickou kryptosporidiózu, která je často doprovázena průjmy, zvracením a výraznou ztrátou hmotnosti a dehydratací ohrožující život hostitele (Adamu et al. 2014; Chalmers et Davies 2010; Chen et LaRusso 2002; Current et al. 1983; Fayer et al. 2000; Navin et Juránek 1984; O'Connor et al. 2011; Ramirez et al. 2004). Průběh infekce souvisí s věkem a imunitním systémem hostitele (Janda et al. 1987).

Poprvé byly kryptosporidie u pštrosů nalezeny v roce 1993 (Gajadhar 1993). Od té doby bylo zaznamenáno několik případů kryptosporidiózy u pštrosů, avšak ve většině z nich nebyly izoláty genotypizovány (např. Allwright et al. 1993; Bezuidenhout 1993; Gajadhar 1994; Gordo et al. 2002; Jardine et Verwoerd 1997; Penrith et Burger 1993; Penrith et al. 1994; Sotiraki et al. 2001). Pomocí molekulárních metod byl u pštrosů prokázán výskyt *C. baileyi*, *C. muris* a *Cryptosporidium* avian genotyp II v Brazílii, Kanadě, Číně, Řecku a Vietnamu (Laatamna et al. 2017; Mammeri et Adjou 2019; Nakamura et al. 2009; Nguyen 2013; Qi et al. 2014; Wang et al. 2011). Druh *C. baileyi* je velmi dobře prostudován, avšak o biologických vlastnostech *Cryptosporidium* avian genotyp II existuje pouze omezené množství informací (Robertson et al. 2014). Také nejsou známy žádné informace o výskytu kryptosporidií na území České republiky. Tato bakalářská práce je zaměřena na výskyt a diverzitu kryptosporidií u pštrosů ve farmových chovech na území České republiky.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 ROD *CRYPTOSPORIDIUM*

Rod *Cryptosporidium* je jedním z více než 300 rodů, které patří do kmene Apicomplexa zahrnujícího téměř 4 800 pojmenovaných druhů, přičemž toto číslo není považováno za konečné (Fayer et Xiao 2007). Jsou to eukaryotické organismy, jejichž DNA uložená v jádře je obklopena dvojitou membránou. Kryptosporidie parazitují u mnoha obratlovců, více než 200 druhů savců včetně člověka (Fayer et Xiao 2008; Morgan et al. 1999).

Většina infekcí u savců byla až do počátku 90 let 20. století přisuzována druhu *C. parvum*, následné molekulární analýzy prokázaly vysokou diverzitu v rámci rodu a byla popsána řada druhů a genotypů (Petersen 1993; Tzipori 1988). Nejvíce lidských infekcí je způsobeno druhy *C. hominis* a *C. parvum* (Checklay et al. 2015). Další druhy, které se vyskytují u lidí, jsou *C. andersoni*, *C. canis*, *C. cuniculus*, *C. ditrichi*, *C. felis*, *C. meleagridis*, *C. muris*, *C. scrofarum*, *C. suis*, *C. tyzzeri*, *C. ubiquitum*, *C. wrairi*, horse genotyp, a chipmunk genotyp I, monkey genotyp a skunk genotyp (Kváč et al. 2009).

Zařazení příslušné kryptosporidie do druhu nebo do genotypu umožňují pouze molekulární metody. Díky vysoké senzitivitě a specifitě a dokáží detekovat velmi malé množství kryptosporidií v odebraném vzorku (Thompson et Ash 2016; Smith et al. 2006). Nejpoužívanějším genem pro detekci a genotypizaci kryptosporidií je malá podjednotka rRNA (SSU). Dále jsou používány geny kódující aktin nebo gen kódující 60 kDA glykoprotein (Alves et al. 2003; Morgan-Ryan et al. 2001; Xiao 2010).

2.1.1 TAXONOMIE

Rod *Cryptosporidium* se řadí mezi eukaryotické mikroorganismy patřící do říše prvoků, nadkmene Alveolata, kmene Apicomplexa, třídy Coccidea, řádu Eucoccidiorida, čeledi Cryptosporidiidae a rodu *Cryptosporidium* (Fayer et Xiao 2008). Dříve byly kryptosporidie řazeny do třídy Coccidea díky podobnosti jejich vývojového cyklu, což jim chybně přikládalo striktní hostitelské spektrum (Levine 1988). Až později bylo molekulárními analýzami poukázáno na blízkou příbuznost s hromadinkami patřícími do třídy Gregarinae (Carreno et al. 1999; Fayer et al. 1997). Přesto však nelze určit, zda se kryptosporidie vyvinuly z gregarinů či jsou jejich sesterskou skupinou (Leander et al. 2003).

Kryptosporidie se přichycují k hostitelské buňce jedinečným způsobem pomocí apikálního komplexu, což je soubor několika organel. Přichycují se na povrch epitelu, proto jsou intracelulární a extracytoplasmatické (Thompson et al. 2005). Endogenní stádia kryptosporidií jsou uzavřena v parazitoformní vakuole, což je odlišuje od ostatních zástupců kmene Apicomplexa. Dále se liší absencí apikoplastu, zbytkem plastidu získaného od endosymbionta, a silně redukovaným zbytkem mitochondrie (Fayer et al. 1997).

2.1.2 HISTORIE

Kryptosporidie byly poprvé popsány v žaludečních žlázách laboratorní myši Edwardem Ernestem Tyzzerem, který tohoto parazita v roce 1907 pojmenoval jako *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). O další tři roky detailně popsal morfologii vývojových stádií, v roce 1910 byly kryptosporidie uznány jako samostatný rod (Tyzzer 1910). Roku 1912 Tyzzer našel další druh v tenkém střevě u myši, který pojmenoval *Cryptosporidium parvum* a popsal rozdíly v umístění a morfologii mezi oběma nalezenými druhy (Tyzzer 1912).

Kryptosporidie byly v první polovině 20. století považovány za medicínsky, ekonomicky a veterinárně bezvýznamné. Proto následujících padesát let problematika kryptosporidií nebyla dále rozvíjena. Moc velký zájem v roce 1955 nevzbudil ani nález nového druhu *Cryptosporidium meleagridis*, který způsobil onemocnění a úmrtí krůt (Slavin 1955). Zájem o problematiku zvýšil až v roce 1970 výskyt kryptosporidiózy u dvou telat (Meutin et al. 1974; Panciera et al. 1971). Roku 1976 dvě nezávislé studie potvrdily u člověka výskyt kryptosporidií, které byly diagnostikovány pomocí biopsie. Nakažen byl 39 let starý muž a malé dítě, kteří bydleli na farmě a chovali dobytek (Meisel et al. 1976, Nime et al. 1976). Během následujícího desetiletí se objevily v téměř 40 publikacích případy infekce u skotu, prasat, koní, ovcí, opic, hadů, krůt, králíků a morčat (Anderson et al. 1982; Angus 1990; Blagburn et al. 1990; Current et al. 1986; Janda et al. 1987; Pavlásek 1981).

V Československu byly první kryptosporidie popsány u jehňat a telat v roce 1979 (Pavlásek 1981, 1999). Toho samého roku byla kryptosporidióza zařazena mezi zoonózy, jelikož byl prvně zaznamenán přenos druhu *C. parvum* z telete na studenta veterinární medicíny (Anderson et al. 1982). Celosvětový zájem o problematiku kryptosporidií vyvolala až roku 1982 zpráva Světové zdravotnické organizace (WHO).

Ta popisovala výskyt těžkého průjmového onemocnění u 21 mužů trpících nemocí AIDS, jehož příčinou byla kryptosporidióza (Goldfarb et al. 1982). V České republice byla poprvé zaznamenána kryptosporidióza u člověka roku 1985 (Janda et al. 1987). V roce 1993 propukla v USA nejrozsáhlejší infekce kryptosporidiiem vyvolaná kontaminací pitné vody v Milwaukee ve Wisconsinu. Odhadem bylo nakaženo 400 000 lidí, z nichž minimálně 4 000 bylo hospitalizováno. Infikované osoby trpěly průjmy, zvracením, horečkou a úbytkem váhy (MacKenzie et al. 1994). Zemřelo tehdy nejméně 100 osob, nejčastěji to byli starší a imunodeficitní pacienti (Corso et al. 2003; Peng et al. 1997).

První druh ptačí kryptosporidie byl zaznamenán ve slepém střevě u kuřat roku 1929, našel ho již zmiňovaný Tyzzer (Tyzzer 1929). Později byl tento druh pojmenován jako *C. tyzzeri*, ale z důvodu částečného popisu je druh považován za neplatný. Roku 1955 byl popsán první platný ptačí druh – *C. meleagridis* parazitující u krocanů (Slavin 1955). Roku 1986 byl izolován a zaznamenán druh *C. baileyi* u slepic (Current et al. 1986; Ditrich et al. 1991). Roku 1999 byl nalezen v žaludku slepic druh *C. galli*, jenž je specifický pro ptáky, a to zejména pro hrabavou drůbež (Fayer et Xiao 2007; Pavlásek 1999; Ryan et al. 2003a). Dalším platným druhem nalezeným u papoušků je *C. avium*, který byl dříve pojmenován jako *Cryptosporidium* avian genotyp V (Holubová et al. 2016). Posledním platným druhem je *C. proventriculi*, dříve známý jako *Cryptosporidium* avian genotyp III (Holubová et al. 2019).

2.1.3 VÝVOJOVÝ CYKLUS

Vývojový cyklus nejčastěji probíhá v epitelálních buňkách gastrointestinálního traktu (Fayer et Xiao 2008). Kryptosporidie se řadí mezi obligátní epicelulární parazity a jsou monoxenní, dokončují tedy celý vývojový cyklus v jednom hostiteli (Abubakar et al. 2007; Current et Blagburn 1990; Fleta et al. 1995; Xiao et Ryan 2004). Nejčastěji bývá infikován trávicí trakt, například druhy *C. parvum* a *C. hominis* infikují tenké střevo, zatímco druhy *C. muris* a *C. andersoni* žaludeční epitel. Výjimkou jsou ptačí druhy *C. baileyi* a *C. avium*, jejichž vývojový cyklus kromě gastrointestinálním traktu může probíhat v respiračním traktu nebo ledvinách (Bermudez a kol. 1988; Current et al. 1986; Fleta et al. 1995; Plutzer et Karanis 2009).

Vývojový cyklus se skládá ze čtyř hlavních částí a to excystace, merogonie, gametogonie a sporogonie. První fáze, excystace, začíná, jakmile hostitel pozře infekční

oocysty kryptosporidií. Vlivem vyšších teplot, změn pH a faktorů, jako jsou koncentrace oxidu uhličitého, žlučových solí, pankreatických a proteolytických enzymů, praská ve stěně oocysty sutura, čímž je degradována integrita stěny oocysty (Smith et al. 2005). Z oocysty jsou uvolněni čtyři sporozoiti, kteří se aktivně přichycují na sliznici zejména trávicího ústrojí. Sporozoiti se k hostitelské buňce přichycují apikálním komplexem a vytváří speciální tzv. Feeder organelu, které vytváří membránové připojení pro snadné využití energie a živin hostitele pro výživu prvoka (Fayer 2004). Sporozoiti se nezanořují do tkáně, což je chrání před imunitním systémem hostitele a mohou se tak dále vyvíjet (Carey et al. 2004; Hijjawi et al. 2002; Otranto et al. 2015). V blízkosti sporozoita a hostitelské buňky dochází k evaginaci, tedy prodloužení plazmatické membrány, která obrůstá přichyceného sporozoita. Jejím spojením vzniká parazitoforní vakuola (Current et Garcia 1991; Melicherová et al. 2014; Valigurová et al. 2007). Sporozoiti se ve vakuole epicelulárně mění na kulovitá stádia zvaná trofozoiti. Mění tím strukturu mikroklků bez přítomnosti apikálního komplexu, což rod *Cryptosporidium* odlišuje od ostatních Apicomplex (Valigurová et al. 2008).

Jakmile se jádro trofozoita rozdělí, nastává merogonie, stádium nepohlavního rozmnožování. Vznikají meronti dvou typů. Z prvního typu vzniká šest až osm merozoitů, které napadají aktivně ostatní buňky hostitele. Na nich se opět vyvíjejí meronti prvního typu, nebo dávají vzniknout merontům druhého typu, kteří jsou pouze čtyři (Current et al. 1986; Liu et al. 2009; Valigurová et al. 2008).

Druhý typ merontů spouští pohlavní rozmnožování - gametogonii. Z merontů druhého typu vznikají gamonti, samičí se nazývají makrogamonti a samčí mikrogamonti. Z mikrogamontů vznikají mikrogametocyty se čtrnácti až šestnácti bičíkatými mikrogametami. Mikrogamety oplodňují makrogamety, které vznikají ze samičích makrogamontů. Tím vzniká zygota vyvíjející se v oocystu.

Při sporogonii prochází jádro meiotickým dělením, díky kterému vznikají čtyři sporozoiti s redukovaným počtem chromozomů, dále vzniká i reziduální tělíčko. Sporulující oocysta je infekční pro další hostitele ihned po vyloučení z hostitele (Fayer et al. 1997; Liu et al. 2009; Xiao et Fayer 2008).

U druhu *C. parvum* jsou 4/5 všech oocyst silnostěnné, ty slouží k šíření infekce do nových hostitelů a jsou vylučovány z těla do volného prostředí. Jsou světlolomné a mají kulovito-vejčitý tvar. Mají silnou, téměř bezbarvou ochrannou stěnu s charakteristickou

pólovou suturou a zůstávají dlouho infekční v nepříznivých podmínkách (Current et Reese 1986; Fayer et al. 1997; Fayer et Xiao 2008). Zbylou 1/5 oocyst u *C. parvum* tvoří tenkostěnné oocysty, které excystují v těle hostitele a způsobují autoinfekci. Z těla hostitele jsou vylučovány pouze výjimečně. Probíhá degradace křehké vnější vrstvy, sporozoitů jsou uvolněni z oocysty a rychle pronikají k mikroklkům střeva (Current et Snyder 1988). U jiných druhů nebyla existence tenkostěnných oocyst prokázána (Fayer et al. 1997; Fayer et Xiao 2008).

Prepatentní doba je doba potřebná k ukončení celého vývojového cyklu parazita v hostiteli, tedy období od infekce do prvního vyloučení vývojových stádií, v případě kryptosporidií – oocyst. Tato doba je závislá na hostiteli a druhu a genotypu kryptosporidií. Mezní délka je 3 až 24 dní (Hijjawi et al. 2002). Délka prepatentní periody je u většiny střevních kryptosporidií 5–7 dní (Fayer et al. 2005). Například u *C. meleagridis* a *C. baileyi* je prepatentní perioda 3–4 dny, u žaludečních druhů může období trvat dva až tři týdny. U druhu *C. avium* je prepatentní perioda až 12 dní (Bermudez et al. 1988; Current et al. 1986; Enemark et al. 2003; Holubová et al. 2016).

2.1.4 HOSTITELSKÉ SPEKTRUM

Hostitelské spektrum představuje skupinu hostitelů, které dokáže infikovat určitý druh patogena/parazita a ukončit v něm vývojový cyklus. Do prostředí musí být hostitelem vylučovány geneticky shodné oocysty jako ty, které způsobily infekci (Fayer et Xiao 2007). Některé kryptosporidie infikují velké množství hostitelských druhů, zatímco jiné jsou hostitelsky specifické (Fayer et Xiao 2008).

Druhy, které mají široké hostitelské spektrum, jsou schopny infikovat a parazitovat v široké škále hostitelů. Jsou hostitelsky nespecifické a postihují savce i ptáky. Patří mezi ně například *C. baileyi*, *C. meleagridis* a *C. parvum* (Fayer 2010; Lindsay et al. 1988,1989). Další skupinou jsou kryptosporidie, které jsou schopné infikovat úzkou, mnohdy fylogeneticky příbuznou skupinu hostitelů. Řadí se mezi ně třeba *C. muris* a *C. andersoni*, které infikují nejčastěji hlodavce, respektive přežvýkavce (Kváč et al. 2016). Převážná část kryptosporidií má úzké hostitelské spektrum, což znamená, že jsou zaměřené jen na jeden druh hostitele, kterého dokážou nakazit (Kváč et al. 2014b). Například druhy *C. suis* nebo *C. scrofarum* jsou hostitelsky adaptovány na divoká a domácí prasata, *C. rubeyi* na veverky (Fayer et al. 2005; Fayer et Xiao 2008; Kváč et al. 2013a; Li et al. 2015; Ryan et al. 2004; Tyzzer 1910), *C. wrairi* parazitující u morčat

(Feng et al. 2010) nebo *C. hominis*, jehož primárním hostitelem je člověk (Morgan-Ryan et al. 2002).

Hostitelské spektrum je ověřováno tak, že oocysty jednotlivých druhů nebo genotypů jsou experimentálně přenášeny do dalších jedinců. Za zmínku stojí, že použitím molekulárních metod nelze spolehlivě určit, jestli se jedná o pasivní pasáž traktem anebo aktivní infekci. Díky tomu bylo u řady druhů v minulosti chybně popsáno hostitelské spektrum (Grazcyk et al. 1996). Obecně je předpokládáno, že převážná část kryptosporidií má úzké hostitelské spektrum a nedochází k infekci různých hostitelů napříč třídami obratlovců (Fayer et Xiao 2008; Xiao et al. 2004).

2.1.5 LOKALIZACE INFEKCE

Vývojový cyklus je lokalizován především na epitelu trávicího traktu v oblasti mikrokloků a epitelu dýchacích cest (Bermudez et al. 1988; Current et al. 1986; Lindsay et al. 1987). Z pohledu lokalizace rozeznáváme dvě skupiny kryptosporidií, které parazitují primárně v i) žaludečním nebo ii) střevním epitelu. Tyto dvě skupiny kryptosporidií se odlišují tvarem a velikostí oocyst (Xiao et al. 2004). Kryptosporidie osidlující žaludeční epitel, mají větší oocysty oválného tvaru (Kváč et al. 2013b). Jsou uzpůsobeny kyselému prostředí, ve kterém by střevní kryptosporidie byly inaktivovány (Widmer et al. 2007). Infekce způsobené žaludečními druhy probíhají většinou bez příznaků. Řadí se mezi ně například *C. andersoni*, *C. fragile*, *C. galli*, *C. molnari*, *C. muris*, *C. proliferans*, *C. proventriculi* nebo *C. serpentis* (Carey et al. 2004; Current et al. 1986; Fayer a Xiao 2008; Fleta et al. 1995).

Kryptosporidie, které parazitují ve střevech, jsou charakteristické afinitou k enterocytům, menší velikostí a kulatými oocystami. V prostředí žaludku neexcystují a aktivují se účinkem proteolytických enzymů, žluče a trypsinu ve střevě (Widmer et al. 2007). Střevní kryptosporidie u imunodeficitních jedinců způsobují poruchy trávení, vývoje a růstu především u mladších jedinců. Do této kategorie se řadí valná většina kryptosporidií, nejčastějším zástupcem je druh *C. bovis*, *C. canis*, *C. fayeri*, *C. felis*, *C. hominis* nebo *C. parvum*. Zvláštním druhem je *C. baileyi*, které infikuje kloaku, ledviny a bronchiální strom (Carey et al. 2004; Fayer a Xiao 2008; Fleta et al. 1995). Dále stojí za zmínku i druh *C. avium*, který byl nalezen například v kloace, játrech či ledvinách (Curtiss et al. 2015; Holubová et al. 2016).

2.1.6 ODOLNOST OOCYST KRYPTOSPORIDIÍ

Odolnost oocyst kryptosporidií je v nepříznivých podmínkách vnějšího prostředí velmi vysoká. Infekční stádia – sporozoitů jsou chráněna třívrstvou stěnou oocysty. Ochranné vrstvy jsou komplexně složeny z proteino-lipido-sacharidového matrixu (Fayer et Xiao 2008). Tím je tomuto rodu umožněna v infekčním stádiu vysoká odolnost a dlouhodobá infektivita ve vnějším prostředí (Fayer 2004).

Oocysty jsou schopny přežít ve vhodných podmínkách, jako je voda nebo vlhká půda, i několik měsíců. Při teplotě okolo 20 °C jsou kryptosporidie schopny přežít a zůstat infekční až šest měsíců (Fayer 2004; Bednarska et al. 2003; Fayer et al. 1998). Nejdéle zůstávají oocysty infekční v jílových půdách, které mají vyšší schopnost zadržovat vodu (Jenkins et al. 2002).

Spolehlivě lze odolné oocysty zničit buď za pomoci vysokých teplot, například ve vroucí vodě po dobu jedné minuty nebo v 65 °C po dobu 20 minut, či za pomoci velmi nízkých teplot okolo -70 °C na dobu jedné hodiny (Fayer 2004; Fayer et al. 1998, 1996). V pitné vodě lze nejspolehlivěji oocysty inaktivovat pomocí ozonizace a UV záření (Betancourt et Rose 2004). Kryptosporidie jsou rezistentní vůči dezinfekčním prostředkům na bázi chlóru, které jsou běžně užívány pro hygienické zabezpečení pitné vody (Xiao et al. 2000).

2.2 KRYPTOSPORIDIÓZA

Kryptosporidióza je onemocnění vyvolané parazity rodu *Cryptosporidium*, patří mezi zoonózy a oportunní infekce. Kryptosporidie jsou jednou z hlavních příčin průjmových onemocnění zvláště u pacientů s AIDS, osob s oslabeným imunitním systémem, dětí a starších osob (Chen et LaRusso 2002; Fayer et al. 2000). Obzvláště v zemích třetího světa u dětí do pěti let je kryptosporidióza, hned po rotavirech, druhou nejčastější příčinou průjmových onemocnění končících smrtí (Segura et al. 2015). Předpokládá se, že v rozvojových zemích kryptosporidióza souvisí s poruchami růstu a podvýživou u dětí (Checkley et al. 2015). U zvířat žijících ve volné přírodě jsou průjmová onemocnění způsobená kryptosporidii vzácná (Hamnes et al. 2007; Prediger et al. 2017; Ravaszova et al. 2012; Wait et al. 2017). Infekci, a její klinický průběh ovlivňuje oslabení organismu a stupeň imunodeficiency (Adamu et al. 2014; Current et al. 1983; Navin et Juránek 1984).

2.2.1 ŽALUDEČNÍ KRYPTOSPORIDIÓZA

Žaludeční kryptosporidiová infekce probíhá bez průjmového onemocnění, které je charakteristické pro střevní druhy, a jiných klinických příznaků (Segura et al. 2015). Charakteristickými histopatologickými změnami jsou například atrofie, hypertrofie nebo metaplazie žláznatých buněk a dilatace infikovaných žláz (Anderson 1987; Aydin et Özkul 1996; Kváč et Vítovec 2003; Özkul et Aydin 1994). U žaludečních kryptosporidií jsou hostitelé rezistentní vůči reinfekci stejným druhem nebo genotypem po zdolání infekce (Kváč et al. 2008b, McDonald et al. 1992). U žaludečních kryptosporidií mohou být hostitelé infekční celý život (Kváč et al. 2008b; Lindsay et al. 2000).

2.2.2 STŘEVNÍ KRYPTOSPORIDIÓZA

Střevní kryptosporidióza se projevuje gastrointestinálními obtížemi, jako jsou vodnaté nekrvavé průjmy cholerového charakteru a celkovou vyčerpaností (Petersen 1992). Díky infekci dochází v hostitelských buňkách k postupné ztrátě epitelálních buněk, což způsobuje narušení a atrofii klků. To graduje smrtí enterocytů díky níž probíhá zhoršený transport elektrolytů a živin. Vývoj infekce je především podmíněn druhem parazita a imunitním stavem hostitele (Tzipori et Ward 2002).

2.2.3 PRŮBĚH INFEKCE

Po přichycení sporozoitů dochází k postupnému uvolňování cytokinů a aktivaci fagocytů. Nastává zánětlivá reakce organismu, přičemž se zvyšuje sekrece střevních tekutin a snižuje její absorpce. Dochází k hyperplazii krypt, regresivní změně klků a také k deskvamaci epitelu. Epiteliální buňky jsou ničeny dvěma způsoby, buď přímým působením parazita na buňku, anebo vznikající zánětlivou reakcí organismu. To má za následek úbytek kartáčového lemu mikrovilů a zmenšující se povrch a počet epitelálních buněk (Thompson et al. 2005; Tzipori 1983). Střevní stěna je mnohem více citlivá na působení trávicích enzymů a žluči, to vyvolává dráždivost střeva. Střevo není schopné absorbovat potřebné živiny a vodu, což přispívá ke vzniku vodnatých průjmů a celkové dehydrataci (Guerrant 1997).

Poškozené tkáně vyvolávají u hostitelů zpětnou zánětlivou odezvu, která vyvolává a podporuje indukci prostaglandinů. Hostitel je tak schopný vylučovat vhodné protizánětlivé látky (Farthing 2000). Kryptosporidióza, u střevních druhů

lokalizovaných v tlustém střevě, často probíhá bez typických příznaků (Vítovec et al. 2006). V zasažených orgánech jsou patologické změny mnohdy minimální nebo nezjistitelné (Čondlová et al. 2018; Ježková et al. 2016; Kváč et al. 2018).

2.2.4 PROJEVY/PŘÍZNAKY

Onemocnění je mírného až těžkého charakteru a závisí na místě infekce, imunitním i výživovém stavu a věku hostitele (O'Connor et al. 2011; Chalmers et Davies 2010; Ramirez et al. 2004). Mezi doprovodné příznaky střevní kryptosporidiózy patří nevolnost, únava, malátnost, horečka, křečovitě bolesti břicha, nechutenství, hubnutí, anorexie a dýchací obtíže. Kryptosporidie rovněž narušují imunitní systém a zvyšují riziko infekcí. Když hostitel vyčerpá veškeré zásoby živin, jako jsou bílkoviny a minerální látky, nastává rychle smrt (Current et Garcia 1991; Jokipii et Jokipii 1986; Meinhardt et al. 1996).

U zdravých imunokompetentních jedinců je onemocnění pouze dočasné a může ustoupit během pár týdnů. Nemoc trvá v rozmezí 2 až 26 dní, průměrně však 12 dní (Fayer et al. 2005). Infekce se vyvíjí subklinicky a s nízkou mírou patogenity. Mezi parazitem a hostitelem dochází k nastolení tolerantního vztahu, kde kryptosporidie dlouhodobě, až celoživotně parazituje v hostiteli (Enemark et al. 2003; Higgins 1999; Ježková et al. 2016; Kváč et al. 2014a; Kváč et al. 2013a). Může docházet k samovyléčení jedince díky odpovědi imunitního systému (DuPont et al. 1995; Enemark et al. 2003; Tzipori et al. 1983).

U imunodeficitních jedinců se sníženou imunitou má nemoc velmi vážný průběh. Může mít bez hospitalizace až fatální následky díky závažné podvýživě a dehydrataci organismu (Current et Garcia 1991). U pacientů je aplikována rehydratace, symptomatická léčba a doplnění minerálních látek (Ditrich 2005). Onemocnění může trvat několik měsíců až let, a může diseminovat do sousedních orgánů trávicího traktu, jako jsou játra, žlučník, nebo slinivka břišní (Current et Garcia 1991; Fayer et al. 1997). U pacientů podstupujících transplantaci orgánů, kostní dřeně, hemodialýzu nebo chemoterapii, je zaznamenána vysoká prevalence nemoci kryptosporidiózy (Gentile et al. 1991; Sreedharan et al. 1996; Tanyüksel et al. 1995; Turkcapar et al. 2002).

U domácích či hospodářských zvířat se kryptosporidióza projevuje obdobným způsobem jako u lidí. Nejčastějším projevem u zvířat je vodnatý průjem trvající obvykle 6 až 14 dní, avšak u některých jedinců může trvat až 4 měsíce (Isaacs 1985; Jokipii et

Jokipii 1986; Soave et Armstrong 1986; Stehr-Green et al. 1987; Wolfson et al. 1985). Tyto příznaky byly zaregistrovány kupříkladu u skotu, koz, ovcí a jelenů chovaných na farmách (Angus 1990).

2.2.5 PŘENOS

K nákaze hostitele dochází nejčastěji prostřednictvím kontaminované vody (Betancourt et Rose 2004; Fayer 2004, 2000; Ramirez et al. 2004). K infekci hostitele dochází po pití kontaminované vody, nebo díky rekreačním aktivitám v kontaminovaných vodních zdrojích (Atwill et al. 2002; Da Silva et al. 2003; Fayer 2004; Kváč et al. 2008a; MacKenzie et al. 1995; Santín et al. 2005). K infekci může dojít při záplavách nebo při poruše technologického procesu úpravy pitné vody (Zítek 1998). Během prvního desetiletí 21. století bylo zaznamenáno více než 200 kontaminací rekreačních vod a pitných zdrojů po celém světě (Baldursson et Karanis 2011; Chalmers 2012; Glaberman et al. 2002; Hlavsa et al. 2011; Karanis et al. 2007; Yoder et al. 2012).

Dále byly zjištěny jako zdroje infekce například jogurty, nepasterizované mléko, nebo jablečné mošty (Smith et al. 2007). Dalším zdrojem kontaminace můžou být mlži, kterým se díky efektivní filtraci zachycují oocysty kryptosporidií na žábrách, přičemž potom bývají často konzumováni syroví (Fayer et al. 1999).

Oocysty jsou přenášeny hlavně fekálně orální cestou (Putignami et Menichella 2010). Z dýchacích cest při respiračním onemocnění odchází oocysty do vnějšího prostředí pomocí nasálních či respiračních sekretů (Current et Snyder 1988; Current 1985). Nebezpečí nákazy stoupá při blízkém kontaktu s infikovaným hostitelem, zejména pak během péče o nemocné jedince. Na člověka jsou kryptosporidie nejčastěji přenášeny z infikovaných telat (Castro-Hermida et al. 2006, Maddox-Hyttel et al. 2006). Minimální počet oocyst, které jsou schopné vyvolat infekci je 10 (Okhuysen et al. 1999; DuPont et al. 1995). Avšak i jediná oocysta stačí na teoretické vyvolání a propuknutí infekce u vnímavého hostitele (Ramirez et al. 2004). Za důležitý zdroj kryptosporidií jsou považována i divoká zvířata sloužící jako rezervoáry, ze kterých se oocysty přenášejí na člověka a domácí zvířata (Kruse et al. 2004). Naopak znečištěné životní prostředí, například výkaly domácích zvířat, zvyšuje riziko infekce u divokých zvířat (Appelbee et al. 2005).

2.2.6 LÉČBA

Do dnešní doby není znám žádný účinný lék, který by byl vhodný pro imunodeficitní jedince k vyléčení kryptosporidiózy (Fayer et al. 2000; Ryan et al. 2003b). Pro zmírnění a zkrácení doby průjmu lze užít kaolin či pektin, díky nimž se také snižuje množství vylučovaných oocyst (Hijjawi et al. 2004; Ryan et al. 2003b; Thompson et al. 2005). U potkanů byla testována probiotika, kdy se při experimentální studii podal lék narozeným mláďatům. Ta se zbavila rychleji infekce (Guitard et al. 2006).

Chemoterapeutika, která jsou účinná u kokcií, se ukázala jako neúčinná proti kryptosporidióze. Testovaná léčiva využívána v potřebných množstvích se ukázala být jak toxická, tak zcela nebo částečně neúčinná. Jediný lék, který byl schválen pro léčbu kryptosporidiózy je Nitazoxanid, ten ale není v Evropě registrován. Ale ani při požívání vysokých dávek není tento lék dlouhodobě účinný (Shirley et al. 2012). Od roku 1999 se v Evropě ve veterinární praxi může užívat halofuginon-laktát pro léčbu a prevenci kryptosporidiózy skotu. Halofuginon-laktát inhibuje reprodukci oocyst a podporuje rozvoj hostitelovy imunity. Halofuginon-laktát a paromomycin jsou zatím nejúčinnějšími preparáty s antikryptosporidiální aktivitou, avšak jejich účinnost nepřesahuje 80 % (Causapé et al. 1999).

2.3 PTAČÍ KRYPTOSPORIDIE A KRYPTOSPORIDIÓZA PTÁKŮ

Kryptosporidióza je u ptáků jedním z nejrozšířenějších parazitárních onemocnění jak u domácích, tak i divokých druhů. U ptáků byly kryptosporidiové infekce zaznamenány u více než 30 druhů na celém světě (Fayer et al. 1997; Morgan et al. 2001; O'Donoghue 1995; Ryan et al. 2010; Sreter et Varga 2000). Do současné doby bylo popsáno 18 genotypů kryptosporidií (*Cryptosporidium* sp. YS-2017 genotyp, avian genotyp I, avian genotyp IV, avian genotyp VI–IX, black duck genotyp, Euroasian woodcock genotyp, duck genotyp, goose genotypy I–IV a goose genotyp Id a finch genotypy I–III) (Abe et Makino 2010; Blagburn et al. 1990; Cano et al. 2016; Chelladurai et al. 2016; Gomes et al. 2012; Jellison et al. 2004; ; Kuhn et al. 2002; Meireles et al. 2006; Morgan et al. 2001; Nakamura et al. 2009; Ng et al. 2006; Plutzer et Tomor 2009; Qi et al. 2011; Rubbenstroth et al. 2014; Ryan 2010; Ryan et al. 2003a; Zhou et al. 2004) a 5 druhů (*Cryptosporidium baileyi*, *C. meleagridis*, *C. galli*, *C. avium* a *C. proventriculi*) (Current et al. 1986; Holubová et al. 2016, 2019; Pavlásek 1999; Slavin 1955).

Nejčastější druhy kryptosporidií parazitující u ptáků jsou *C. baileyi* a *C. meleagridis* (Abe et Iseki 2004; Holubová et al. 2016; Tůmová et al. 2002). Dále se k nim řadí i *C. galli*, které je také schopno infikovat mnoho ptačích druhů. Tyto tři druhy kryptosporidií se ale liší místem vzniku infekce (Xiao et al. 2004). V trávicím traktu byly nalezeny druhy *C. baileyi*, *C. meleagridis*, *C. galli* a *C. avium*. Dále byl druh *C. avium* nalezen ve vylučovací soustavě stejně jako druh *C. baileyi*, který se nacházel i v dýchací soustavě (Current et al. 1986; Holubová et al. 2016; Pavlásek 1999; Slavin 1955). Respirační kryptosporidiózou jsou častěji nakaženi ptáci než savci (Ramirez et al. 2004). Dále byly nalezeny oocysty druhu *C. andersoni* a *C. muris* v trusu koroptve korunkaté (*Rollulus rouloul*) a lelkouna soviho (*Podargus strigoides*) (Ng et al. 2006). Dalším ptačím druhem, nalezeným u dytíka úhorního (*Burhinus oedicnemus*) je *C. parvum* (Gomes et al. 2012; Zylan et al. 2008).

U popsaných genotypů většinou schází informace o hostitelském spektru, průběhu infekce nebo velikosti oocyst, a proto nemohou být uznány jako samostatné druhy (Cano et al. 2016; Jellison et al. 2004; Kuhn et al. 2002; Morgan et al. 2001; Ng et al. 2006; O'Donoghue 1995; Plutzer et Tomor 2009; Ryan 2010; Zhou et al. 2004).

Ptáci díky schopnosti migrovat mohou přenášet aktivně a pasivně různé patogeny včetně kryptosporidií. Mohou kontaminovat vodní zdroje oocystami kryptosporidií a hrají tak významnou roli v propuknutí epidemií kryptosporidióz (Graczyk et Cranfield 1998; Graczyk et al. 1996). Promořenost ptáků kryptosporidiemi se liší v různých studiích, ale pohybuje se v rozmezí od 1,4 % do 7,2 % (Gül et Cicek 2009; Majewska et al. 2009; Nakamura et al. 2009; Ng et al. 2006; Ziegler et al. 2007).

2.3.1 KRYPTOSPORIDIE A KRYPTOSPORIDIÓZA PŠTROSŮ

Pštrosi (*Struthio camelus*) mohou být rezervoárem řady parazitů, z nichž se většina usidluje v gastrointestinálním traktu (Eslami et al. 2007; Sotiraki et al. 2001). Infekce u pštrosů probíhají často subklinicky, ale v některých případech, zejména u kuřat, mohou zvířata vykazovat slabost a trpět anorexií, průjmy či anémií (Black et Glatz 2011; Craig et Diamond 1996; Gajadhar 1993).

Přestože bylo od počátku 90. let zaznamenáno u pštrosů mnoho infekčních případů způsobených rodem *Cryptosporidium*, nebyly jednotlivé izoláty genotypizovány na úrovni druhu/genotypu (Allwright et al 1993; Bezuidenhout 1993; Gajadhar 1994;

Jardine et Verwoerd, 1997; Meireles et al. 2006; Penrith et Burger 1993; Penrith et al. 1994; Ponce Gordo et al. 2002; Santos et al. 2005).

V posledních 10 letech byla provedena řada studií, ve kterých pomocí molekulárních analýz byly charakterizovány jednotlivé druhy a genotypy kryptosporidií, které se u pštrosů vyskytují. Mammeri et Adjou (2019) identifikovali v Alžírsku ve své studii u 27 % (4/15) pštrosů druh *C. baileyi*. Stejně tomu bylo tak o dva roky dříve, kdy Laathamna et al. (2017) genotypizací potvrdili přítomnost *C. baileyi* u 31 % sledovaných pštrosův Alžírsku. Taktéž Wang et al. (2011) detekovali v Číně *C. baileyi* u 11,7 % (53/452) pštrosů. Studie Qi et al. (2014) odhalila pomocí molekulárních metod 10,2 % (31/303) pozitivních jedinců v Číně. Z tohoto počtu bylo 22 jedinců pozitivních na druh *C. muris* a zbývajících 9 na *C. baileyi*. Nguyen et al. (2013) vyšetřili ve středním Vietnamu celkem 464 vzorků a 110 z nich (23,7 %) bylo identifikováno jako pozitivní. Následné molekulární analýzy prokázaly přítomnost *Cryptosporidium* avian genotyp II.

Níže se budu blíže věnovat druhům a genotypům kryptosporidií detekovaných u pštrosů.

2.3.1.1 CRYPTOSPORIDIUM BAILEYI

Druh *C. baileyi* byl poprvé detekován u brojlerových kuřat roku 1986 (Current et al. 1986). Oocysty tohoto druhu jsou velké $6,6 \times 5,5 \mu\text{m}$ a parazit infikuje epitel dýchacích cest, Fabriciovy burzy, v dolní části tenkého a tlustého střeva a kloaku (Lindsay et Blagburn 1990). Tento parazitický prvok je nejčastěji spojován s extraintestinální lokalizací, jelikož infekce často probíhá v dýchacím traktu, kde oocysty následně opouští tělo dýchacími cestami a nasálním sekretem (Blagburn et al. 1990; Current et al. 1986). Tato kryptosporidie byla dosud detekována pouze u ptáků, vyjma jednoho případu u imunodeficitního pacienta (Ditrich et al. 1991). Získaným lidským izolátem se experimentálně nepodařilo nakazit žádnou laboratorní myš, avšak u kuřat nemoc naplno propukla (Ditrich et al. 1991).

Je to nejspíše nejčastější druh detekovaný u ptáků a vykazuje vysokou nakažlivost a úmrtnost u brojlerových kuřat. Infekce má těžký průběh hlavně u mladých jedinců (Current et al. 1988, 1986; Tůmová et al. 2002; Wang et al. 2011).

Kromě brojlerových kuřat byly infekce *C. baileyi* zaznamenány u divokých ptáků, například u racka chechtavého (*Larus ridibundus*), kormorána (*Phalacrocorax* spp.),

jeřába popelavého (*Grus grus*), tukana bělolícího (*Ramphastos vitellinus*), kachny divoké (*Anas platyrhynchos*), křepelky japonské (*Coturnix japonica*), výřečka malého (*Otus scops*) a pštrosa dvouprstého (*Struthio camelus*), či u domácích zvířat jako jsou slepice (*Gallus gallus f. domestica*), krocani domácí (*Meleagris gallopavo f. domestica*), husy domácí (*Anser anser domestica*) nebo korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) (Abe et Iseki 2004; Blagburn et al. 1990; Chvala et al. 2006; Jellison et al. 2004; Kimura et al. 2004; Molina-Lopez et al. 2010; Morgan et al. 2001; Pavlásek 1993; Ryan et al. 2003a; Wang et al. 2011).

2.3.1.2 CRYPTOSPORIDIUM AVIAN GENOTYP II

Tento genotyp se na základě analýzy části genu SSU rRNA velmi podobá kryptosporidii druhu *C. baileyi*. Velikost oocyst se pohybuje v rozmezí 3,9–6,1 × 3,3–5,0 μm. Tento genotyp byl dříve nalezen ve výkalech pštrosů dvouprstých (*Struthio camelus*) importovaných do Kanady (Gajadhar 1994). Oocysty byly nalezeny ve Fabriciově burze a v kloace, jednalo se ale o slabou infekci. Molekulárně bylo vyšetřeno 165 vzorků, přičemž 14 (8,5 %) z nich bylo pozitivních na kryptosporidie. Infekční pštrosí oocysty byly vyizolovány a použity pro experimentální infekci u kuřat, krocanů, křepelek a myši (Santos et al. 2005). Podobnou experimentální infekci provedli Meireles et al. (2006), kteří infikovali oocystami dvě skupiny vylíhlých kuřat a následně je čtyři týdny vyšetřovali. Oba experimenty dopadly stejně, pozitivní infekce nebyla potvrzena.

Dále byl tento genotyp nalezen u papoušků, například u korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*), kakadu inka (*Cacatua leadbeateri*), alexandra velkého (*Psittacula eupatria*), elektuse různobarvého (*Eclectus roratus*), kakadu růžového (*Eolophus roseicapilla*), papouška alexandřina (*Polytelis alexandrae*), aratingy kropenaté, (*Aratinga leucophthalma*) a aratingy sluneční (*Aratinga solstitialis*) (da Paixão Sevá et al. 2011; Meireles et al. 2006; Nakamura et al. 2009; Ng et al. 2006; Nguyen et al. 2013; Santos et al. 2005).

2.3.1.3 CRYPTOSPORIDIUM MURIS

Druh *C. muris* byl jako vůbec první kryptosporidie popsán E. E. Tyzzerem roku 1907. Tato kryptosporidie byla nalezena v epitelu žaludečních žlázek u laboratorních myši a její oocysty mají velikost 7,8 × 5,6 μm (Tyzzer 1907). Ve většině případů probíhá onemocnění asymptomaticky, bez příznaků a bez makroskopických změn

vnitřních orgánů. Ani zánětlivá reakce není ve sliznici patrná (Anderson 1987; Aydin et Özkul 1996; Iseki et al. 1989; Kváč et al. 2008a; Kváč et Vítovec 2003; Özkul et Aydin 1994).

Typickým hostitelem tohoto druhu kryptosporie jsou hlodavci, zejména myši (Anderson 1987; Kváč et al. 2008a). Nicméně *C. muris* bylo detekováno u řady dalších druhů hostitelů patřících do různých řádů, například kočky, kamzíci, velbloudi, žirafy, damani, makakové nebo člověk (Kodádková et al. 2010; Lupo et al. 2008; Morgan et al. 1999; Ryan et al. 2003b; Xiao et al. 2004). U ptáků bylo *C. muris* poprvé identifikováno u lelkouna sovího (*Podargus stridoides*) (Ng et al. 2006). U pštrosů byly oocysty *C. muris* potvrzeny ve studii Qi et al. (2014), jež odhalila pomocí molekulárních metod 7,3 % (22/303) pozitivních jedinců v Číně. Experimentálně byla prokázána vnímavost jehňat a kůzlat (Kváč et al. 2008a). Naopak oocysty získané z divoké myši domácí byly neinfekční pro prasata (Kváč et al. 2012). Často bývají *C. muris* nakaženi taky hlodavci, psi, hadi, varani, kamzíci, velbloudi, damani, makakové či člověk (Lupo et al. 2008; Morgan et al. 1999; Ryan et al. 2003b; Xiao et al. 2004).

2.3.1.4 CRYPTOSPORIDIUM UBIQUITUM

Druh *C. ubiquitum*, dříve známý jako *Cryptosporidium cervine* genotyp, je velmi často detekován ve vodních zdrojích velkého geografického rozsahu a patří mezi kryptosporidie s nízkou hostelskou specifitou (Xiao et al. 2000). Tento druh byl zaznamenán u přežvýkavců (ovce, jelen, muflon), masožravců (norek), hlodavců (veverka, bobr či myšice), primátů (lemur) a člověka (da Silva et al. 2003; Elwin et Chalmers 2008; Fayer et al. 2010; Feltus et al. 2006; Feng et al. 2007; Leoni et al. 2006; Murakoshi et al. 2013; Ong et al. 2002; Ryan et al. 2005; Soba et al. 2006; Trotz-Williams et al. 2006). Oocysty tohoto druhu měří $5,19 \times 4,87 \mu\text{m}$. U infikovaných myši byla vývojová stádia detekována v ileu (Fayer et al. 2010). *Cryptosporidium ubiquitum* bylo nalezeno u ovcí všech věkových skupin a je považováno za hlavní druh parazitující u ovcí v Číně (Wang et al. 2010).

Li et al. (2016) publikovali studii popisující výskyt *C. ubiquitum* v Číně u loskutáka posvátného (*Gracula religiosa*) a ježka (*Erinaceus europaeus*). Je to jediná studie potvrzující přítomnost *C. ubiquitum* u ptáků. Dále byl tento druh detekován například u ovce, jelena, muflona, mývala, lemura a hlodavců, jako jsou veverky, bobři či myšice (da Silva et al. 2003; Elwin et Chalmers 2008; Feltus et al. 2006; Feng et al. 2007;

Leoni et al., 2006; Murakoshi et al. 2013; Ong et al. 2002; Ryan et al. 2005; Soba et al. 2006; Trotz-Williams et al. 2006).

3. CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce je

- 1) Zpracovat literární rešerši o tématu, jež se zabývá kryptosporidiózou u pštrosů.
- 2) Odebrat vzorky na pštrosích farmách a vyšetřit je parazitárními metodami.
- 3) Vyizolovat DNA vzorků a pomocí PCR metody vyšetřit na přítomnost kryptosporidií.
- 4) Purifikovat oocysty kryptosporidií a provést experimentální infekce u kuřat, housat, korel, SCID myší a potkanů.
- 5) Genotypizovat pozitivní získané izoláty a porovnat je s výsledky předchozích studií.

4.3 MOLEKULÁRNÍ METODY VYŠETŘENÍ TRUSU

4.3.1 IZOLACE DNA

Použitý materiál:

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

Do mikrozkušavek byly vloženy skleněné a zirkonové kuličky o průměru 0,5 a 1,5 mm. Poté byl do přichystaných mikrozkušavek přidán biologický materiál. Do směsi byl dále připipetován 1 ml FL pufru. Vzorky byly zhomogenizovány vortexováním a následně byly vloženy do přístroje FastPrep®24 Instrument a rozbíjeny 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s. Mikrozkušavky byly 5 minut inkubovány při laboratorní teplotě a dále centrifugovány po dobu 5 minut při 16 000 g. Izolace proběhla pomocí komerčně dostupné soupravy v souladu s pokyny výrobce Exgene™ Stool DNA mini. Následně byl veškerý supernatant přepipetován na EzPass kolonky se sběrnými zkumavkami a pelet byl vyhozen do odpadu. Kolonky byly centrifugovány 1 minutu při 16 000 g, po stočení byl odpad vylit ze sběrných zkumavek. V dalším kroku bylo do mikrozkušavek napipetováno 100 µl EB pufru, načež byly kolonky 1 minutu inkubovány při laboratorní teplotě a poté centrifugovány 1 minutu při 16 000 g. Po stočení byly z mikrozkušavek EzPass odstraněny bílé kolonky a do sběrných zkumavek bylo napipetováno 500 µl PB pufru. Po promíchání špičkou byl všechn obsah sběrných zkumavek přenesen na mini spin column kolonky. Ty byly poté centrifugovány 1 minutu při 16 000 g, sběrné zkumavky byly vylity. Na střed kolonek bylo napipetováno 500 µl NW pufru a kolonky byly centrifugovány 1 minutu při 16 000 g. Poté byly znovu centrifugovány, aby došlo k úplnému odstranění zbytků NW pufru. V dalším kroku byly kolonky přeneseny na čisté mikrozkušavky. Nakonec bylo na kolonky napipetováno 200 µl EB pufru a byly inkubovány 1 minutu a naposledy centrifugovány 1 minutu při 16 000 g.

4.3.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Molekulární charakterizace kryptosporidií byla provedena pomocí nested PCR amplifikující část genu SSU (cca 830 bp; Jiang et al. 2005; Xiao et al. 1999), aktinu (cca 1066 bp; Sulaiman et al. 2002) a gp60 (cca 820 bp; Alves et al. 2003; Peng et al. 2001). Požadované úseky byly amplifikovány v termocycleru. Pro sekundární amplifikaci byl použit produkt primární PCR. Ke vzorkům byla vždy přidána negativní i pozitivní kontrola. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA vyizolovaná ze suspenze oocyst *C. parvum* a pro účely negativní kontroly byla použita PCR voda. Nukleotidové sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 1, 3, 4. V tabulce 2 je pro představu uvedena reakční směs SSU pro jeden zvorek. Byl použit materiál od firem Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA a New England Biolabs, Ipswich, MA, USA.

Použitý materiál:

- PCR mikrokumavky
- primery (forward, reverse)
- DNA
- MgCl₂
- deoxiribonukleosid trifosfáty (dNTP's) – 2,5 mM každé báze
- pufr pro Taq DNA polymerázu
- Taq DNA polymeráza, Dream Taq Green DNA Polymerase
- Bovinní sérový albumin (BSA), New England Biolabs
- deionizovaná PCR H₂O

Tabulka 1: Primery použité pro SSU rDNA (Jiang et al. 2005).

primární PCR	Sekvence, nasedací teplota 50 °C
F1	5' TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG 3'
R1	5' CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA 3'
sekundární PCR	Sekvence, nasedací teplota 55 °C
F2	5' GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG 3'
R2	5' AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A 3'

Tabulka 2: Složení reakčních směsí SSU, kde množství odpovídá jednomu vzorku

Reagencie	primární PCR	sekundární PCR
H ₂ O	12,30	13,10
MgCl ₂ (25 mM)	1,20	1,20
10× buffer	2,00	2,00
dNTP (10 mM)	0,40	0,40
F primer (10 μM)	0,40	0,40
R primer (10 μM)	0,40	0,40
BSA (10 mg / 1ml)	0,80	-
Taq (5U/ 1 μl)	0,50	0,50
DNA	2,00	2,00
Celkem	20,00 μl	20,00 μl

Tabulka 3: Primery použité pro aktin (Sulaiman et al. 2002).

primární PCR	Sekvence, nasedací teplota 50 °C
F1	5' ATC RGW GAA GAA GWA RYW CAA GC 3'
R1	5' AGA RCA YTT TCT GTG KAC AAT 3'
sekundární PCR	Sekvence, nasedací teplota 45 °C
F2	5' CAA GCW TTR GTT GTT GAY AA 3'
R2	5' TTT CTG TGK ACA ATW SWT GG 3'.

Tabulka 4: Primery použité pro gp60 (Peng et al. 2001).

primární PCR	Sekvence, nasedací teplota 50 °C
F1	5' TTT ACC CAC ACA TCT GTA GCG TCG 3'
R1	5' ACGGACGGAATGATGTATCTGA 3'
sekundární PCR	Sekvence, nasedací teplota 50 °C
F2	5' ATA GGT GAT AAT TAG TCA GTC TTT AAT 3'
R2	5' CCA AAA GCG GCT GAG TCA GCA TC 3'

Vybraný amplifikační program termocycleru pro SSU zahrnoval nejprve počáteční denaturaci při 95 °C, která trvala 3 minuty, následovalo 35 cyklů zahrnujících denaturaci při 95 °C po dobu 45 sekund, specifickou nasedací teplotu primerů trvající 45 sekund a nakonec extenzi při 72 °C 1 minutu. Následovala finální extenze po dobu 10 minut, při které dochází k syntéze, a dosyntetizování nového řetězce v celkovém objemu 20 μl. Pro sekundární amplifikaci byly použity 2 μl primárního produktu.

4.3.3 GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

V průběhu elektroforézy dochází k rozdělení jednotlivých fragmentů DNA v agarózovém gelu. Dochází k tomu díky odlišným molekulovým hmotnostem a působením elektrického proudu při napětí 90 V po dobu asi 50 minut. Byl použit 1 %

agarózový gel obsahující 0,2 µg/ml ethidium-bromidu. Nakonec proběhla vizualizace pomocí transiluminátoru při vlnové délce 320 nm.

Použité chemikálie:

- 1× TAE pufr
- agaróza
- ethidium bromid
- 100 bp DNA Ladder
- DNA zkoumaných vzorků

Nejprve byla navážena agaróza a smíchána s 1× TAE pufrém za vzniku 1 % agarózového gelu. Směs byla zahřáta v mikrovlnné troubě a pravidelně promíchávána. Po rozpuštění, které trvalo přibližně minutu, byla baňka ochlazena pod tekoucí studenou vodou na teplotu asi 40 °C. Po ochlazení bylo do baňky přidáno 2 µl ethidium bromidu. Směs byla krouživými pohyby důkladně promíchána a nalita do připraveného nosiče s vloženými hřebeny, poté byl gel ponechán, aby mohl ztuhnout. Po ztuhnutí byly hřebeny vyndány a nosič s tuhým gelem byl ponořen do elektroforetického tanku, ve kterém byl 1× TAE pufr. Do první jamky bylo napipetováno 10 µl ladderu, do dalších jamek 20 µl sekundárního PCR produktu. Po napipetování všech vzorků, i s kontrolami, bylo nastaveno napětí na 90 V. Zastaveno bylo po cca 45 minutách, kdy viditelně došlo k separaci fragmentů. DNA fragmenty byly detekovány pomocí transiluminátoru, ve kterém byl pořízen snímek výsledného gelu.

4.3.4 IZOLACE Z GELU

Jestliže došlo k amplifikaci DNA, byl vyříznut produkt odpovídající velikosti. Izolace byla provedena pomocí komerčně dodávaného kitu Gen Elute (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Použitý materiál:

- mikrozkušavky
- zkumavky Binding Column G
- Wash Solution Concentrate G

- Column Preparation solution
- Gel Solubilization Solution
- Elution Solution
- PCR voda

Fragment DNA byl z agarózového gelu vyříznut čistým skalpelem na UV transiluminátoru a vložen do připravené mikrozkušavky. Poté bylo do mikrozkušavky s fragmentem připipetováno 500 μ l Gel Solubilization Solution a ta byla inkubována 10 minut při 50 °C. PCR voda na elucii byla inkubována při 65 °C. Rozpuštění v mikrozkušavce bylo kontrolováno a obsah byl promícháván každé 2–3 minuty. Poté byla sestavena Binding Column G kolona, na kterou bylo napipetováno 500 μ l Column Preparation Solution. Kolonka byla vložena do centrifugy na 1 minutu při 16 000 g. Dále bylo ke vzorku připipetováno 150 μ l isopropanolu a promícháno. Veškerý objem vzorku byl napipetován na kolonku a centrifugován 1 minutu při 16 000 g. Poté byl odpad ze sběrné zkumavky slit a zkumavka byla opět použita s kolonou. Na kolonu bylo napipetováno 700 μ l Wash Solution G a ta byla opět centrifugována 1 minutu při 16 000 g. Opět byl vylit odpad ze sběrné zkumavky, a ta byla znovu použita s kolonou. Bez dalších roztoků byla zkumavka opět centrifugována 1 minutu při 16 000 g. Zkumavka byla v centrifuze otočena o 180 ° a znovu centrifugována 3 minuty při 16 000 g. Nakonec byla kolona vložena do nové 1,5 ml mikrozkušavky, v níž byla provedena eluce připipetováním 30 μ l PCR vody, předehřáté na 65 °C, přímo na střed kolony. Poté byly mikrozkušavky inkubovány 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifugovány 1 minutu při 16 000 g.

4.3.5 SEKVENACE A GENOTYPIZACE

Získané sekundární produkty byly sekvenovány v obou směrech pomocí genetického analyzátoru ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Byly použity sekundární PCR primery a BigDye1 Terminator V3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Nukleotidové sekvence, všech získaných genů v této studii, byly editovány za použití softwaru ChromasPro 2.4.1 software (Technelysium, Pty, Ltd., South Brisbane, Australia) a porovnány s referenčními sekvencemi z GenBank pomocí online serveru MAFFT verze 7 (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>). Byly provedeny

fylogenetické analýzy a nejlepší model pro analýzu byl vybrán pomocí softwaru MEGAX (Guindon et al. 2003; Tamura et al. 2011).

Fylogenetické stromy byly vypočteny metodou maximální pravděpodobnosti (ML), přičemž model, jenž nejlépe odpovídal uspořádání, byl vybrán pomocí Bayesovského informačního kritéria. Pro uspořádání zpracování sekvencí SSU a gp60 byl vybrán Tamura 3-parametrový model (Tamura 1992), pro aktin byl použit general time reversible model (Tavaré et al. 1986). Podpora větví byla založena na 1000 replikacích. Fylogramy byly vypočteny pomocí softwaru MEGAX a ručně upraveny pomocí CorelDrawX7. Sekvence SSU [MN969954–MN969968], aktinu [MN973944–MN973958] a gp60 [MN973959–MN973963] získané v této studii byly uloženy do GenBank.

4.4 PURIFIKACE OOCYST

Tato metoda funguje na principu použití flotačních roztoků, jež mají vyšší hmotnost než oocysty kryptosporidií, a tak se ve zpracovaném vzorku oocysty koncentrují na povrchu. Vzorek trusu, který se ukázal být pozitivní na kryptosporidie byl homogenizován ve třecí misce a přečištěn pomocí sacharóзовého gradientu (Arrowood et Stearling 1987). Nakonec bylo provedeno dočištění pomocí cesium chloridového gradientu.

4.4.1 SACHARIDÓZOVÝ GRADIENT (ARROWOOD ET STEARLING 1987)

Použitý materiál:

- zásobní Sheaterův roztok (405 g cukru, 259 ml deionizované vody)
- 1% roztok PBS Tween
- pracovní roztok 1+2 (1 díl zásobní Sh. roztoku + 2 díly PBS Tween)
- pracovní roztok 1+4 (1 díl zásobní Sh. roztoku + 4 díly PBS Tween)

Nejprve byl vzorek zbaven veškerých příměsí, poté byl naředěn deionizovanou vodou a přecezen přes sítko. Dále byl do skleněné centrifugační zkumavky o objemu 100 ml navrstven následující gradient za pomoci Pasteurovy pipety.

Nejdříve bylo dáno do zkumavky 30 ml Sheaterova roztoku 1+2, na tuto vrstvu se dále navrstvilo 30 ml Sheaterova roztoku 1+4. Nakonec se pipetou přidalo do zkumavky

15 ml vzorku na sacharózový gradient. Poté byly zkumavky centrifugovány při 4 °C 20 minut při 1 000 g. Po centrifugaci byla vrchní zabarvená vrstva odsáta zbytek supernatantu byl přenesen do čisté centrifugační kyvety. Ta byla doplněna deionizovanou vodou a centrifugována při 4 °C 20 minut při 1 500 g. Následně byla svrchní polovina objemu odsáta a vzorky byly opět doplněny deionizovanou vodou. Dále byly vzorky znovu centrifugovány při 4 °C 20 minut při 1 500 g. Nakonec byly zbylé sedimenty přeneseny do nové čisté zkumavky a uchovány při 4 °C v PBS.

4.4.2 CESIUM CHLORIDOVÝ GRADIENT (ARROWOOD ET DONALDSON 1996)

Použitý materiál:

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

Sediment obsahující oocysty byl resuspendován v PBS. Poté byl 1 ml CsCl napipetován do čisté mikrozukavky. Dále bylo na CsCl navrstveno 0,5 ml roztoku oocyst v PBS. Pak byl vzorek centrifugován při 20 °C po dobu 3 minut při 16 000 g. Supernatant byl přepipetován do 50 ml centrifugační zkumavky a sediment byl vyhozen. Zkumavku bylo potřeba doplnit deionizovanou vodou a poté byla při 4 °C centrifugována 20 minut při 16 000 g. Supernatant o objemu 5 ml byl odsán. Zkumavka byla opět doplněna deionizovanou vodou a obsah byl zvortexován. Vzorek byl centrifugován 20 minut při teplotě 4 °C a 16 000 g. Aby se úplně vymyl roztok CsCl, byl tento krok opakován 3–4×. Následně byly oocysty uchovávány při 4 °C v deionizované vodě.

4.4.3 KONCENTRACE OOCYST

Množství vyčištěných oocyst bylo zjišťováno v Bürkerově komůrce, kdy byla čistá suspence oocyst napipetována do komůrky a následně byl počet oocyst spočten při zvětšení 400×.

4.5 EXPERIMENTÁLNÍ INFEKCE

Přečištěný vzorek oocyst *Cryptosporidium* avian genotyp II, jenž obsahoval 2×10^4 purifikovaných oocyst v 10 μ l deionizované vody, byl perorálně podán pomocí Pasteurovy pipety jako infekční dávka pokusným zvířatům, Hostitelská specifita

Cryptosporidium avian genotyp II byla testována na 5 kuřatech (*Gallus gallus* f. *domestica*), 5 housatech (*Anser anser* f. *domestica*), 5 korelách (*Nymphicus hollandicus*), 3 SCID myších (*Mus musculus*) a 3 potkanech (*Rattus norvegicus*). Intenzita infekce byla vypočtena jako počet oocyst na gram (OPG) trusu (Kváč et al. 2007). Kromě toho byla denně sledována konzistence trusu a zdravotní stav jedinců.

Každé zvíře bylo individuálně sledováno a vyšetřováno na přítomnost kryptosporidií po dobu 30 dní (DPI), pokud nedošlo k předčasnému usmrcení pozitivního jedince za účelem pitvy. Odebrané části orgánů, převážně trávicího traktu, a exkrementy byly testovány pomocí molekulárních metod na přítomnost specifické DNA kryptosporidií. Z každého vzorku byl proveden nátěr na podložní sklíčko, které bylo poté barveno a mikroskopicky vyšetřováno na přítomnost oocyst. Vzorky byly odebírány do 2 ml zkumavek, které byly řádně označeny a uskladněny při 4 °C.

4.5.1 CHOV EXPERIMENTÁLNÍCH ZVÍŘAT

Vylíhlo se pět kuřat kura domácího (*Gallus gallus* f. *domestica*) a pět housat hus domácích (*Anser anser* f. *domestica*) za sledovaných podmínek v laboratoři Parazitologického ústavu BC AVČR, v.v.i. V prvních pěti dnech byl oběma druhům poskytnut vnější zdroj tepla. Zvířata byla chována v plastových chovných nádobách se savou podložkou po dobu 14 dní, poté byla přemístěna do pokusných stájí Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích kvůli zachování dobrých životních podmínek.

Osmítýdenní SCID myši (*Mus musculus*) a potkani (*Rattus norvegicus*) byli chováni v přiměřeně velkých plastových nádobách (Tecniplast, Buguggiate, Italy) s pilinami pro hlodavce. Korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) byly chovány jednotlivě ve voliérách s papírovou podložkou velikostně odpovídajících jejich potřebám. Zvířata byla umístěna ve zvěřinci Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i.

Všechna zvířata měla k dispozici komerční krmení a vodu *ad libitum*. Každý den byla podestýlka měněna a chovné nádoby byly čištěny.

5. VÝSLEDKY

5.1 VÝSKYT A PREVALENCE KRYPTOSPORIDIÍ

Celkem 164 dospívajících a 40 dospělých pštrosů (*Struthio camelus*) bylo vyšetřeno na přítomnost infekčních parazitů rodu *Cryptosporidium*. Kryptosporidie byly detekovány na třech ze čtyř pštrosích farmách na území České republiky. Z 204 vzorků trusu bylo pět (2,5 %) mikroskopicky pozitivních na přítomnost oocyst kryptosporidií a 12 (5,9 %) vzorků obsahovalo specifickou DNA *Cryptosporidium* spp. (tabulka 5). Všechny PCR pozitivní vzorky byly následně sekvenovány. Intenzita infekce se pohybovala v rozmezí od 6 000 do 18 000 OPG (tabulka 4). Všichni přirozeně infikovaní pštrosi byli v dobré kondici a konzistence trusu odpovídala věku ptáků a krmení.

5.2 GENOTYPIZACE KRYPTOSPORIDIÍ

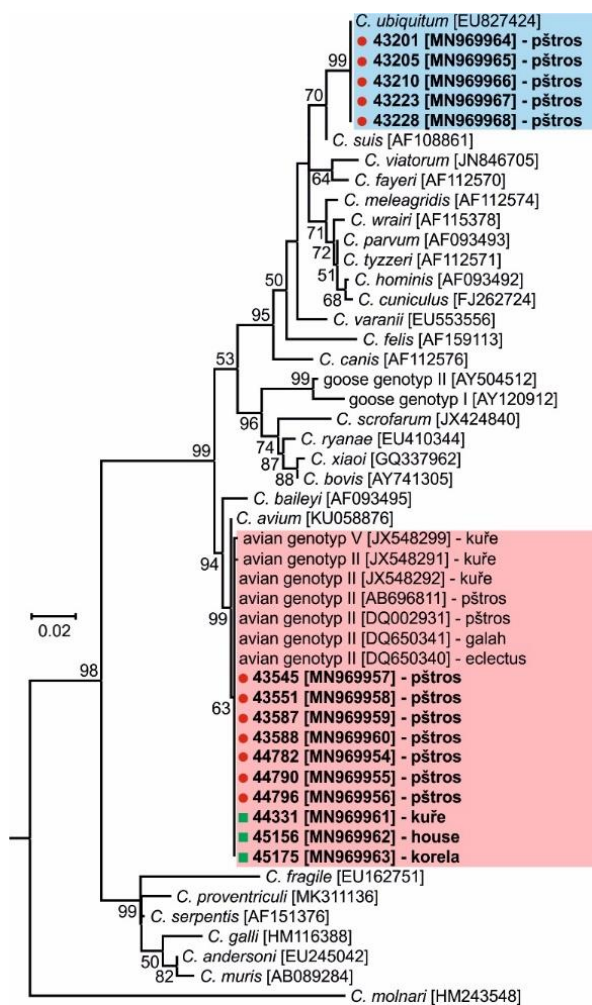
Kryptosporidiiemi byli infikováni pouze juvenilní pštrosi (n=12). Všechny vzorky obsahující specifickou DNA kryptosporidií byly úspěšně genotypizovány na genech kódujících SSU, aktin a GP60 (tabulka 5).

Fylogenetické stromy konstruované na základě sekvencí genů kódujících SSU a aktin v této studii prokázaly přítomnost *Cryptosporidium* avian genotyp II (n=7) a *Cryptosporidium ubiquitum* (n=5) (tabulka 5, obrázky 1–2). Analýza částečných sekvencí genů kódujícího gp60 prokázala přítomnost *C. ubiquitum* subtypu XIIa (obrázek 3).

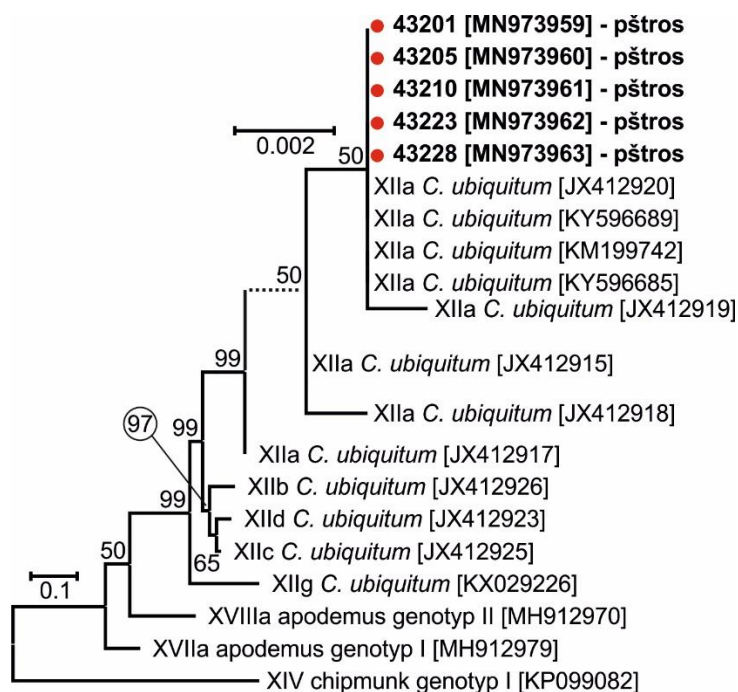
Tabulka 5: Druhy a genotypy kryptosporidií, jenž byly genotypizovány na základě částečných sekvencí malé podjednotky rRNA (SSU), aktinu a 60 kDa glykoproteinu (gp60) u mladých pštrosů (*Struthio camelus*) chovaných na komerčních farmách v České republice. Intenzita infekce kryptosporidií je vyjádřena jako počet oocyst na gram trusu (OPG).

Číslo farmy	Počet odebraných/ pozitivních	Identifikační		Genotypizace		
		číslo pozitivního zvířete	Mikroskopická pozitivita (OPG)	SSU	Actin	gp60
1	40/5	43201	Ne	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	XIIa
		43205	Ne	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	XIIa
		43210	Ne	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	XIIa
		43223	Ne	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	XIIa
		43228	Ne	<i>C. ubiquitum</i>	<i>C. ubiquitum</i>	XIIa
2	64/0	-	-	-	-	-
3	50/3	44782	Ano (8 000)	avian genotyp II	avian genotyp II	-
		44790	Ne	avian genotyp II	avian genotyp II	-
		44796	Ano (12 000)	avian genotyp II	avian genotyp II	-
4	50/4	43545	Ano (12 000)	avian genotyp II	avian genotyp II	-
		43551	Ne	avian genotyp II	avian genotyp II	-
		43587	Ano (6 000)	avian genotyp II	avian genotyp II	-
		43588	Ano (18 000)	avian genotyp II	avian genotyp II	-

Obrázek 1: Maximum likelihood fylogenetický strom zkonstruovaný na základě částečných sekvencí genu kódujícího malou podjednotku rRNA získaných v této práci (tučně) a sekvencí uložených v genové bance (GenBank). Číslo izolátu je identické s číslem v tabulce 5. V hranatých závorkách jsou uvedeny identifikační čísla sekvencí v GenBank. Červený bod u sekvence značí přirozenou infekci, zelený čtverec značí experimentální infekci.



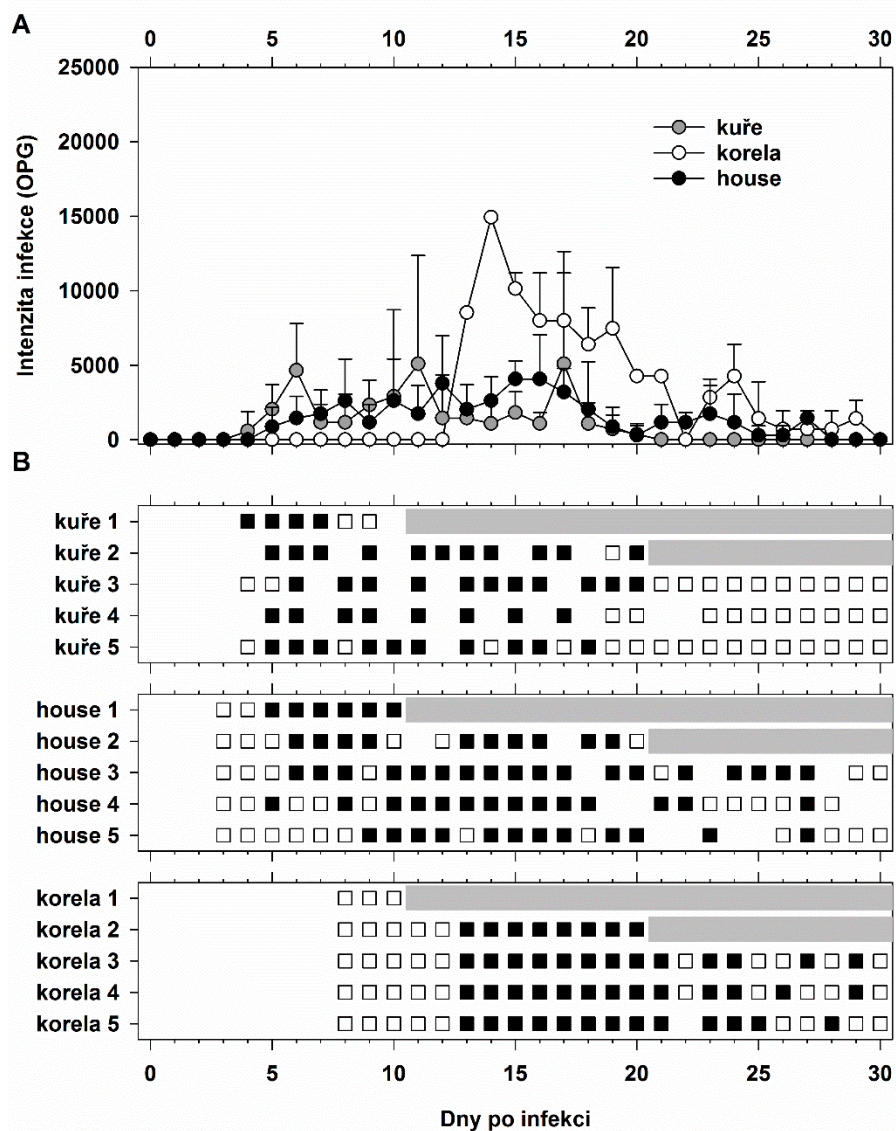
Obrázek 3: Maximum likelihood fylogenetický strom zkonstruovaný na základě částečných sekvencí genu kódujícího 60 kDa glykoprotein získaných v této práci (tučně) a sekvencí uložených v genové bance (GenBank). Číslo izolátu je identické s číslem v tabulce 4. V hranatých závorkách jsou uvedeny identifikační čísla sekvencí v GenBank. Červený bod u sekvence značí přirozenou infekci, zelený čtverec značí experimentální infekci.



5.3 HOSTITESLKÁ SPECIFITA *CRYPTOSPORIDIUM* AVIAN GENOTYP II

Oocysty *Cryptosporidium* avian genotyp II byly infekční pro kuřata (*Gallus gallus* f. *domestica*), husy (*Anser anser* f. *domestica*) a korely (*Nymphicus hollandicus*), nebyly ale infekční pro myši (*Mus musculus*) a potkany (*Rattus norvegicus*). Oocysty, nebo specifická DNA, byly poprvé detekovány u housat 4 DPI, u kuřat 7 DPI a u korel 8 DPI. Intenzita infekce se pohybovala od 2 000 do 16 000 OPG u kuřat a korel a u housat v rozmezí od 1 000 do 8 000 OPG u housat (obrázek 4).

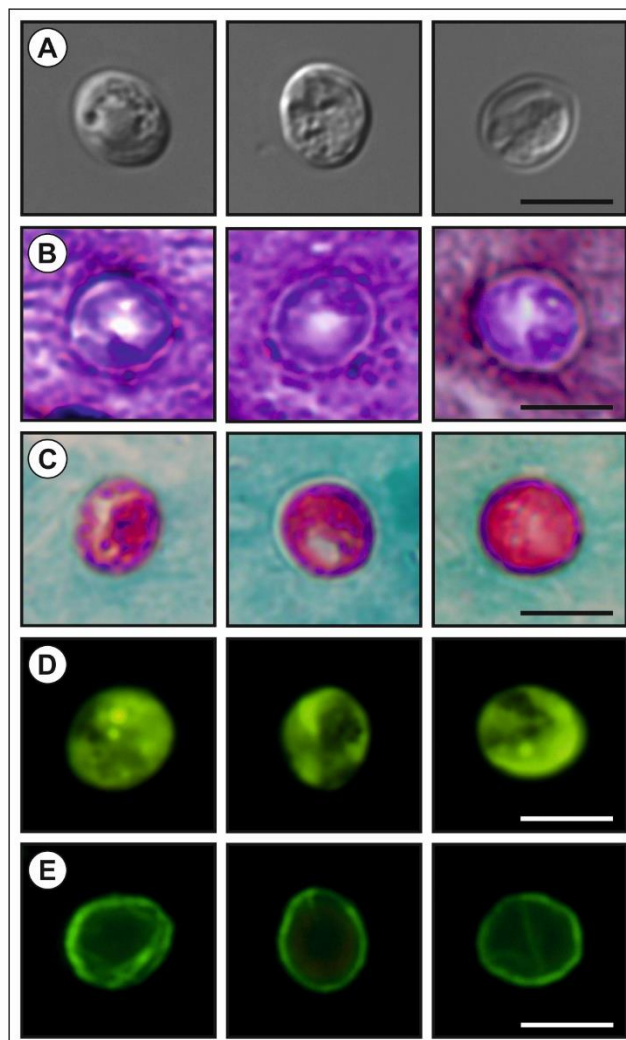
Obrázek 4: Průběh 30 denní experimentální infekce u kuřat (*Gallus gallus* f. *domestica*), housat (*Anser anser* f. *domestica*) a korel (*Nymphicus hollandicus*). Intenzita infekce kryptosporidií je vyjádřena jako počet oocyst na gram trusu (OPG). V sekci B, bílý čtvereček znamená detekci specifické DNA *Cryptosporidium* avian genotyp II pomocí molekulárních metod. Tmavý čtvereček znázorňuje mikroskopickou detekci oocyst. Šedý sloupec znázorňuje absenci zvířete z důvodu jeho usmrcení pro histologické vyšetření (není součástí práce).



5.4 MORFOMETRIE OOCYST *CRYPTOSPORIDIUM AVIAN* GENOTYP II

Oocysty z přirozeně infikovaných pštrosů (z farmy číslo 4, obrázek 5) měřily 5,24–6,77 μm (průměr \pm SD = 6,13 \pm 0,35 μm) \times 4,68–5,5 μm (průměr \pm SD = 5,15 \pm 0,24 μm). Poměr délky k šířce byl 1,06–1,36 (průměr \pm SD = 1,19 \pm 0,08) a byl identický s poměry získanými z experimentálně infikovaných kuřat, housat a korel (tabulka 6).

Obrázek 5: Oocysty *Cryptosporidium avian* genotyp II vizualizovány různými metodami: (A) pomocí diferenciální interferenční kontrastní mikroskopie, (B) barvené anilin-karbol-methyl-violetí, (C) barvené modifikovanou metodou dle Ziehl-Nielsen, (D) barvené phenol-auraminem, (E) značené specifickou anti-*Cryptosporidium* FITC-konjugovanou protilátkou proti stěně oocysty. Měřítka 5 μm .



Tabulka 6: Velikost oocyst *Cryptosporidium* avian genotyp II získaných z přirozeně¹ infikovaných pštrosů (*Struthio camelus*) a experimentálně² infikovaných kuřat (*Gallus gallus* f. *domestica*), housat (*Anser anser* f. *domestica*) a korel (*Nymphicus hollandicus*). U padesáti vyizolovaných oocyst byla měřena délka a šířka při zvětšení 1 000×. Z těchto údajů byl vypočítán poměr mezi délkou a šířkou každé oocysty.

Hostitel	Délka ± SD	Šířka ± SD	Poměr délka/šířka ± SD
	(min. – max.)		
Pštros¹	6,13 ± 0,35 μm (5,24 – 6,77 μm)	5,15 ± 0,24 μm (4,68 – 5,47 μm)	1,19 ± 0,08 (1,06 – 1,36)
Kuře²	6,13 ± 0,34 μm (5,24 – 6,74 μm)	5,21 ± 0,23 μm (4,71 – 5,48 μm)	1,20 ± 0,09 (1,08 – 1,32)
House²	6,22 ± 0,31 μm (5,28 – 6,67 μm)	5,19 ± 0,24 μm (4,69 – 5,52 μm)	1,18 ± 0,10 (1,11 – 1,29)
Korela²	6,17 ± 0,29 μm (5,31 – 6,58 μm)	5,19 ± 0,24 μm (4,92 – 5,48 μm)	1,21 ± 0,12 (1,09 – 1,28)

6. DISKUZE

V této bakalářské práci byla charakterizována prevalence a genetická diverzita kryptosporidií u pštrosů chovaných na území České republiky. Kryptosporidiové infekce u pštrosů byly v minulosti hlášeny v několika studiích (Allwright et al. 1993; Gajadhar 1994; Oliveira et al. 2008; Nguyen et al. 2013; Santos et al. 2005; Sotiraki et al. 2001; Wang et al. 2011), nicméně nebyl určen druh a genotyp kryptosporidie. Následné studie založené na molekulární genotypizaci ukázaly, že pštrosi jsou často infikováni *Cryptosporidium baileyi* a *Cryptosporidium avian* genotyp II (Mammeri 2019; Nakamura et al. 2009; Nguyen et al. 2013; Qi et al. 2014; Ryan et al. 2003; Wang et al. 2011), avšak v této studii jsme u pštrosů detekovali pouze *Cryptosporidium avian* genotyp II a *C. ubiquitum*.

Infekce *Cryptosporidium avian* genotyp II byly v této studii molekulárně potvrzeny na 2 farmách ze 4 s celkovou prevalencí 4,3 %. Námi zjištěné promoření se schoduje s údaji publikovanými Nguyen et al. (2013) a Santos et al. (2005), kteří detekovali tento genotyp u 5,8 %, respektive 8,5 % pštrosů chovaných ve Vietnamu, respektive v Brazílii. V dalších studiích bylo detekováno podobné promoření pštrosů na farmách, ale byly nalezeny jiné druhy kryptosporidií. O něco vyšší prevalence kryptosporidií u pštrosů byla detekována ve studii Qi et al. (2014). Míra prevalence infekce *Cryptosporidium* spp. byla 10,2 % (31/303), z toho bylo 22 jedinců pozitivních na druh *C. muris* a zbývajících 9 na druh *C. baileyi*. Podobný výsledek byl hlášen v Číně, kde byl u 11,7 % (53/452) pštrosů detekován druh *C. baileyi*. Nejvíce nakažených pštrosů bylo ve věku 1–2 měsíce (Wang et al. 2011). Naopak nízká prevalence kryptosporidiových infekcí u pštrosů byla zaznamenána ve studii provedené v Řecku, kdy bylo infikováno pouze 0,6 % jedinců na 20 pštrosích farmách. Zajímavé je, že mikroskopická analýza oocyst prokázala přítomnost dvou odlišných morfotypů, $3,8 \times 3,8 \mu\text{m}$ a $5,7 \times 4,8 \mu\text{m}$ (Sotiraki et al. 2001). Mohlo se tedy jednat o dva rozdílné druhy/genotypy kryptosporidií; molekulární analýzy nebyly provedeny. Velmi vysoká prevalence kryptosporidií byla zjištěna v Brazílii, 44,4 % (34/77), kdy Oliveira et al. (2008) mikroskopicky detekoval oocysty barvené pomocí Ziehl-Neelsenovy metody. Molekulární vyšetření z trusu nebylo provedeno, ale na základě velkých rozdílů v morfometrii oocyst nejspíše u ptáků parazitovalo více druhů kryptosporidií. Také ve studii z Vietnamu byla popsána vysoká prevalence 23,7 % (110/464) *Cryptosporidium avian* genotyp II u pštrosů (Nguyen et al. 2013).

V jednotlivých studiích se prevalence kryptosporidií velmi liší, což může být způsobeno metodou detekce. Molekulární metody jsou citlivější než mikroskopická vyšetření (Carey et al. 2004; Fleta et al. 1995; Murakoshi et al. 2013). Vzhledem k tomu, že vylučování oocyst u infikovaných zvířat je přerušované (Guselle et al. 2003), může být uváděná prevalence zkreslena. Toto lze pozorovat například v experimentální infekci kuřat, u kterých některé dny nebyla infekce detekována mikroskopicky, ale molekulární metodami ano.

Ve shodě s dřívějšími studiemi Gajadhar (1994), Meireles et al. (2006), Nguyen et al. (2013) a Santos et al. (2005) jsme detekovali *Cryptosporidium* avian genotyp II u pštrosů. Pomocí experimentálních přenosů jsme prokázali, že *Cryptosporidium* avian genotyp II není infekční pro savce, respektive laboratorní myši s různým stupněm imunodeficiency. Dále jsme úspěšně infikovali husy a korely. Na rozdíl od studií Santos et al. (2005) a Meireles et al. (2006), se nám podařilo experimentálně přenést infekci *Cryptosporidium* avian genotyp II na kuřata. Výsledky této a předchozích prací ukázaly, že *Cryptosporidium* avian genotyp II infikuje celou řadu různých ptačích hostitelů patřících do různých řádů podtřídy ptáci (da Paixão Sevá et al. 2011; Meireles et al. 2006; Nakamura et al. 2009; Ng et al. 2006; Nguyen et al. 2013). Tato širší hostitelská specifita je obdobná jako byla pozorována u fylogeneticky příbuzného druhu *C. avium*, ale pravděpodobně menší, než je u *C. baileyi*, druhu, který je infekční pro většinu ptáků (Bermudez et al. 1988; Current et al. 1986; Curtiss et al. 2015; Holubová et al. 2016; Jellison et al. 2004; Kimura et al. 2004; Molina-Lopez et al. 2010).

V souladu s výsledky Ng et al. (2006) a Meireles et al. (2006) jsme u zvířat, která byla experimentálně a přirozeně infikována *Cryptosporidium* avian genotyp II nezaznamenali žádné klinické příznaky kryptosporidiózy. Naopak v několika dalších studiích byly u pštrosích kuřat, která trpěla kryptosporidiózou, pozorovány výhřezy kloaky, enteritidy a pankreatitidy (Penrith et al. 1994; Ponce Gordo et al. 2002; Santos et al. 2005). Nicméně izoláty kryptosporidií nebyly v žádné z těchto prací genotypizovány, a tak je možné, že se jednalo o infekci způsobenou jiným druhem nebo genotypem kryptosporidie. Obdobné klinické příznaky byly hojně popsány u brojlerových kuřat při infekcích druhem *C. baileyi* (Current et al. 1988, 1986; Tůmová et al. 2002; Wang et al. 2011). Prepatentní doba *Cryptosporidium* avian genotyp II se pohybovala od 4 do 8 DPI v závislosti na hostiteli, což je podobné druhům *C. meleagridis* a *C. baileyi* (Lindsay et al. 1988; Tůmová et al. 2002) a odpovídá době

nezbytné pro ukončení vývojového cyklu střevních druhů kryptosporidií (Enemark et al. 2003; Kváč et al. 2018; Tzipori 1983). U korel byla zjištěna molekulární detekcí specifická DNA až 8 DPI. Příčinou by mohlo být stáří ptáků, jelikož se jednalo o dospělé jedince, kteří mohou být k infekci méně citliví z důvodů již prodělané kryptosporidiové infekce. Také absence *C. baileyi* by mohla být vysvětlena věkem sledovaných zvířat, jelikož předchozí studie uváděly *C. baileyi* u pštrosů mladších 3 měsíců. Starší jedinci byli infikováni ojedinele nebo vůbec (Qi et al. 2014; Wang et al. 2011). Nepřítomnost oocyst kryptosporidií *Cryptosporidium* avian genotyp II u starších pštrosů by mohla být vysvětlena rezistencí či imunitou související s věkem, jak již bylo popsáno u *C. baileyi*, *C. muris* či *C. andersoni* u různých hostitelů (Kváč et al. 2009, Lindsay et Blagburn 1990). Přítomnost kryptosporidiové infekce u mladých jedinců v této studii je v souladu s výsledky Nguyen et al. (2013) a Wang et al. (2011), kteří detekovali tyto parazity nejčastěji u kuřat.

Velikost oocyst *Cryptosporidium* avian genotyp II získaných v této studii ($6,1 \times 5,1 \mu\text{m}$) je srovnatelná se studií Santos et al. (2005) a Meireles et al. (2006), kde oocysty *Cryptosporidium* avian genotyp II měřily $6,0 \times 4,8 \mu\text{m}$. Na základě našich a předchozích studií můžeme konstatovat, že oocysty *Cryptosporidium* avian genotyp II jsou morfometricky téměř nerozeznatelné od *C. baileyi* ($6,3 \times 4,6 \mu\text{m}$) (Current et al. 1986), ale menší než oocysty *C. galli* ($8,3 \times 6,3 \mu\text{m}$) (Ryan et al. 2003) a větší než oocysty druhu *C. meleagridis* ($5,0 \times 4,3 \mu\text{m}$) (Slavin 1955). S ohledem na velikost oocyst může být velmi obtížné rozlišit oocysty jednotlivých druhů kryptosporidií a pro spolehlivé určení je nezbytné použití molekulárních metod.

Námi získané částečné sekvence genu kódujícího malou podjednotku rRNA získané v této práci byly identické se sekvencemi, které byly získány ze pštrosů v Brazílii (DQ002931; Meireles et al. 2016), a ve Vietnamu (AB696811; Nguyen et al. 2013). Námi provedené fylogenetické analýzy založené na genových sekvencích SSU a aktinu prokázaly, že *Cryptosporidium* avian genotyp II je geneticky odlišný od všech známých druhů kryptosporidií a je blízkce příbuzný k druhům *C. baileyi* a *C. avium*. Nukleotidová sekvence SSU *Cryptosporidium* avian genotyp II sdílí podobnost s *C. baileyi* v 92,8 % s *C. avium* v 93,5 %. Nukleotidové sekvence genu kódujícího aktin jsou z 88,7 % podobné *C. baileyi* a 98,1 % *C. avium*.

Sekvenční analýza částečných genů SSU, aktinu a *gp60* u pěti pštrosů odhalila přítomnost *C. ubiquitum*, což je nečekaný výsledek, jelikož se tento druh kryptosporidie

u ptáků často nevyskytuje. Limit metody nám neumožnil detekovat oocysty, což naznačuje, že infekce měla pravděpodobně nízkou intenzitu. Avšak mohlo se jednat o pouhou pasáž traktem, nikoli aktivní infekci (Ng et al. 2006; Xiao et al. 2004). Další a jedinou studii popisující výskyt *C. ubiquitum* u ptačího jedinice publikovali Li et al. (2016), kteří detekovali oocysty u loskutáka posvátného (*Gracula religiosa*). Zatímco v naší studii jsme provedli subtypizaci na genu kódujícím *gp60*, Li et al. (2016) tuto analýzu neprovedli. Nelze tak porovnat subtypy *gp60* mezi studii. Naše analýza prokázala přítomnost subtypu XIIa, který je velmi často detekován u člověka a přežvýkavců (Fayer et al. 2010; Kellerová et al. 2017; Li et al. 2016; Murakoshi et al. 2013). Kellerová et al. (2017) detekovali tento subtyp u norků (*Mustela vison*) a činčil (*Chinchilla lanigera*). Vzhledem k tomu, že na vyšetřované farmě nebyla chována žádná další hospodářská zvířata, je možné vyloučit tento zdroj infekce. Přenos z chovatele, který by mohl být zdrojem nákazy, je možný, ale spekulativní. V této studii jsme nevyšetřovali majitele farmy ani pracovníky na ní zaměstnané.

Na základě molekulárních i biologických odlišností od ostatních kryptosporidií by měl být *Cryptosporidium* avian genotyp II popsán jako nový druh.

7. ZÁVĚRY

- 1) Prevalence u pštrosů na 4 farmách v České republice byla 5,9 %.
- 2) U pštrosů byl identifikován *Cryptosporidium* avian genotyp II a druh *Cryptosporidium ubiquitum*.
- 3) Oocysty *Cryptosporidium* avian genotyp II měřily $6,13 \pm 0,35 \mu\text{m} \times 5,15 \pm 0,24 \mu\text{m}$.
- 4) Byla provedena experimentální infekce oocystami *Cryptosporidium* avian genotyp II s pozitivními výsledky u kuřat (*Gallus gallus* f. *domestica*), housat (*Anser anser* f. *domestica*) a korel (*Nymphicus hollandicus*).
- 5) Oocysty nebyly infekční pro SCID myši (*Mus musculus*) a potkany (*Rattus norvegicus*).
- 6) Žádný z přirozeně nebo experimentálně infikovaných ptáků v této studii nevykazoval klinické příznaky kryptosporidiózy.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

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.

ABUBAKAR I., ALIYU S. H., ARUMUGAM C., HUNTER P. R., USMAN N. K. 2007: Prevention and treatment of cryptosporidiosis in immunocompromised patients. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 1: CD004932.

ADAMU H., PETROS B., ZHANG G., KASSA H., AMER S., YE J., FENG Y., XIAO L. 2014: Distribution and Clinical Manifestations of *Cryptosporidium* Species and Subtypes in HIV/AIDS Patients in Ethiopia. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8: e2831.

ALLWRIGHT D.M., BURGER W.P., GEYER A., TERBLANCHE A.W. 1993: Isolation of an influenza A virus from ostriches (*Struthio camelus*). *Avian Pathology* 22: 59–65.

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.

ANDERSON D.C., HARPER K.T., RUSHFORTH S.R. 1982: Recovery of cryptogamic soil crusts from grazing on Utah winter ranges. *Rangeland Ecology & Management. Journal of Range Management Archives* 35: 355–359.

ANGUS K.W. 1990: Cryptosporidiosis in ruminants. In: Dubey J.P, Speer C.A, Fayer R. (Eds.). *Cryptosporidiosis of Man and Animals*. CRC Press, Boca Raton, FL 83–103.

APPELBEE A.J., THOMPSON R.C., OLSON M.E. 2005: *Giardia* and *Cryptosporidium* in mammalian wildlife-current status and future needs. *Trends Parasitology* 21: 370–376.

- 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: 89 S.
- ARROWOOD M.J., STERLING C.R. 1987:** Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic Percoll gradients. *Journal of Parasitology* 73: 314–319.
- ATWILL E.R., HOU L., KARLE B.M., HARTER T., TATE K.W., DAHLGREN, R.A. 2002:** Transport of *Cryptosporidium parvum* Oocysts through Vegetated Buffer Strips and Estimated Filtration Efficiency. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 5517–5527.
- AYDIN Y., ÖZKUL I.A. 1996:** Infectivity of *Cryptosporidium muris* directly isolated from the murine stomach for various laboratory animals. *Veterinary Parasitology* 66: 257–262.
- BALDURSSON S., KARANIS P. 2011:** Waterborne transmission of protozoan parasites: review of worldwide outbreaks - an update 2004-2010. *Water Research* 45: 6603–6614.
- BEDNARSKA M., BEJER A., KULIS K., SIŃSKI E. 2003:** Biological characterisation of *Cryptosporidium parvum* isolates of wildlife rodents in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 10: 163–169.
- 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.
- BETANCOURT W.Q., ROSE J.B. 2004:** Drinking water treatment processes for removal of *Cryptosporidium* and *Giardia*. *Veterinary Parasitology* 126: 219–234.
- BEZUIDENHOUT A.J. 1993:** The spiral fold of the caecum in the ostrich (*Struthio camelus*). *Journal of Anatomy* 183: 587–592.
- BLACK D., GLATZ P.C., 2011:** Ratite health: welfare implications. In: Glatz P.C., Lunam C., Malecki I. (Eds.). *The Welfare of Farmed Ratites*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 175–176.

- BLAGBURN B.L., LINDSAY D.S., HOERR F.J., ATLAS A.L., TOIVIO-KINNUCAN M. 1990:** *Cryptosporidium* sp. infection in the proventriculus of an Australian diamond firetail finch (*Staganoplura bella*: Passeriformes, Estrildidae). Avian Diseases 34: 1027–1030.
- CANO L., DE LUCIO A., BAILO B., GARDONA G.A., MUADICA A.S., LOBO L., CARMENA D. 2016:** Identification and genotyping of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. isolates in aquatic birds in the Salburua wetlands, Álava, Northern Spain. Veterinary Parasitology 221: 144–148.
- CAREY C.M., LEE H., TREVORS J.T. 2004:** Biology, persistence and detection of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* oocyst. Water Research 38: 818–862.
- CASTRO-HERMIDA J.A., C ARRO-CORRAL C., GONZALEZ-WARLETA M., MEZO M. 2006:** Prevalence and intensity of infection of *Cryptosporidium* and *Giardia duodenalis* in dairy cattle in Galicia (NW Spain). Journal of veterinary medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health 53: 244–246.
- 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.
- CAUSAPÉ A.C., SANCHEZ-ACEDO C., QUILEZ J., DEL CACHO E., VIU M. 1999:** Efficacy of halofuginone lactate against natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs. Research and Reviews in Parasitology 59: 41–46.
- CHALMERS R. M. 2012:** Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis Annali dell'Istituto Superiore di Sanità 48: 429–446.
- CHALMERS R. M., DAVIES A. P. 2010:** Minireview: Clinical Cryptosporidiosis. Experimental Parasitology 124: 138–146.
- CHECKLEY W., WHITE A.C., JAGANATH D., ARROWOOD M.J., CHALMERS R.M., CHEN X., FAYER R., GRIFFITHS J.K., GUERRANT R.L., HEDSTROM L., HUSTON CH.D., KOTLOFF K.L., KANG G., MEAD J.R., MILLER M., PETRI W.A., PRIEST J.W., ROOS D.S., STRIEPEN B., THOMPSON R.C.A., WARD H.D., VOORHIS W.A.V., XIAO L., ZHU G.,**

HOUP T E.R. 2015: A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics and vaccine targets for *Cryptosporidium*. *Lancet Infectious Diseases* 15: 85–94.

CHELLADURAI J.J., CLARK M.E., KVÁČ M., HOLUBOVÁ N., KHAN E., STENGER B.L., GIDDINGS C.W., MCEVOY J. 2016: *Cryptosporidium galli* and novel *Cryptosporidium* avian genotype VI in North American red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Parasitology Research* 115: 1901–1906.

CHEN X.M., LARUSSO N.F. 2002: Cryptosporidiosis and the pathogenesis of AIDS-cholangiopathy. *Seminars in Liver Disease* 22: 277–289.

CHVALA S., FRAGNER K., HACKL R., HESS M., WEISSENBOCK H. 2006: *Cryptosporidium* infection in domestic geese (*Anser anser f. domestica*) detected by in-situ hybridization. *Journal of Comparative Pathology* 134: 211–218.

CORSO P.S., KRAMER M.H., BLAIR A.K., ADDISS D.G., DAVIS J.P., HADDIX A.C. 2003: Costs of Illness in the 1993 Waterborne *Cryptosporidium* Outbreak, Milwaukee, Wisconsin. *Emerging Infectious Diseases* 9: 426–431.

CRAIG T.M., DIAMOND P.L. 1996: Parasites of ratites. In: Tully T.N., Shane S.M. (Eds.). *Ratite Management, Medicine and Surgery*. Krieger Publishing Company, Malabar, FL 115–126.

CURRENT W.L. 1985: Cryptosporidiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 187: 1334–1338.

CURRENT W.L., BLAGBURN B. 1990: *Cryptosporidium*: infections in man and domesticated animals. In: Long P. (Eds.). *Coccidiosis of man and domestic animals*. CRC Press, Boca Raton, FL. 235.

CURRENT W.L., GARCIA L.S. 1991: Cryptosporidiosis. *Clinical Microbiology Reviews* 4: 325–358.

CURRENT W.L., REESE N.C. 1986: A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *Journal of Protozoology* 33: 98–108.

CURRENT W.L., REESE N.C., ERNST J.V., BAILEY W.S., MELVIN B., HEYMAN M.D., WEINSTEIN W.M. 1983: Human cryptosporidiosis in

immunocompetent and immunodeficient persons — Studies of an outbreak and experimental transmission. *New England Journal of Medicine* 308: 1252–1257.

CURRENT W. L., SNYDER D. B. 1988: Development of and serologic evaluation of acquired immunity to *Cryptosporidium baileyi* by broiler chickens. *Poultry Science* 67: 720–729.

CURRENT W.L., UPTON S.J., HAYNES T.B. 1986: The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *The Journal of Protozoology* 33: 289–296.

CURTISS J.B., LEONE A.M., WELLEHAN JF, JR., EMERSON J.A., HOWERTH E.W., FARINA L.L. 2015: Renal and Cloacal Cryptosporidiosis (*Cryptosporidium* Avian Genotype V) in a Major Mitchell's Cockatoo (*Lophochroa Leadbeateri*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 46: 934–937.

ČONDLOVÁ Š., HORČIČKOVÁ M., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., HLÁSKOVÁ L., KONEČNÝ R., STANKO M., MCEVOY J., KVÁČ M. 2018: *Cryptosporidium apodemi* sp. n. and *Cryptosporidium ditrichi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in *Apodemus* spp. *European Journal of Protistology* 63: 1–12.

DA SILVA A. J., CACCIÒ S., WILLIAMS C., WON K. Y., NACE E. K., WHITTIER C., EBERHARD M. L. 2003: Molecular and morphologic characterization of a *Cryptosporidium* genotype identified in lemurs. *Veterinary Parasitology* 111: 297–307.

DITRICH O. 2005: Kryptosporidie a mikrosporidie jako původci oportunních parazitárních infekcí. Habilitační práce pp. 41.

DITRICH O., PALKOVIČ L., ŠTĚRBA J., PROKOPIČ J., LOUDOVÁ J., GIBODA M. 1991: The first finding of *Cryptosporidium baileyi* in man. *Parasitology Research* 77: 44–47.

DUPONT H.L., CHAPPELL C.L., STERLING C.R., OKHUYSEN P.C., ROSE J.B., JAKUBOWSKI W. 1995: The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *New England Journal of Medicine* 332: 855–859.

- ELWIN K., CHALMERS R.M. 2008:** Contemporary identification of previously reported novel *Cryptosporidium* isolates reveals *Cryptosporidium bovis* and the cervine genotype in sheep (*Ovis aries*). Parasitol Research 102: 1103–1105.
- ENEMARK H.L., AHRENS P., BILLE-HANSEN V., HEEGAARD P.M., VIGRE H., THAMSBORG S.M., LIND P. 2003:** *Cryptosporidium parvum*: infectivity and pathogenicity of the porcine genotype. Parasitology 126: 407–416.
- ESLAMI A., RAHMAT H., MESHGI B., RANJBAR-BAHADORI S. 2007:** Gastrointestinal parasites of ostrich (*Struthio camelus domesticus*) raised in Iran. Iranian Journal of Veterinary Research 8: 80–82.
- FARTHING M.J. 2000:** Clinical aspects of human cryptosporidiosis. Contributions to microbiology 6: 50–74.
- FAYER R. 2004:** *Cryptosporidium*: a waterborne zoonotic parasite. Veterinary Parasitology 126: 37–56.
- FAYER R. 2010:** Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Experimental Parasitology 124: 90–97.
- FAYER R., LEWIS E.J., TROUT M.J., GRACZYK T.K., JENKYNS M.C., HIGGINS J., XIAO L., LALL A.A. 1999:** *Cryptosporidium parvum* in oysters from commercial harvesting sites in the Chesapeake Bay. Emerging Infectious Diseases 5: 706–710.
- FAYER R., SANTÍN M., & MACARISIN D. 2010:** *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. Veterinary Parasitology 172: 23–32.
- FAYER R., SANTÍN M., XIAO L. 2005:** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). Journal of Parasitology 91: 624–629.
- FAYER R., SPEER C., DUBEY J. 1997:** The general biology of *Cryptosporidium* in *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, FL 530 pp.
- FAYER R., TROUT J. M., GRACZYK T. K., LEWIS E. J. 2000:** Prevalence of *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Eimeria* infections in post-weaned and adult cattle on 3 Maryland farms. Veterinary Parasitology 93: 103–112.

- FAYER R., TROUT J. M., JENKINS M. C. 1998:** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology* 84: 1165–1169.
- FAYER R., TROUT J. M., NERAD T. 1996:** Effects of a wide range of temperatures on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43: 64.
- FAYER R., XIAO L. 2007:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, New York 560 pp.
- FAYER R., XIAO L. 2008:** The general biology of *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis CRC Press, Boca Raton, FL. 1–42.
- FELTUS D.C., GIDDINGS C.W., SCHNECK B.L., MONSON T., WARSHAUER D., MCEVOY J.M. 2006:** Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 4303–4308.
- FENG Y., LAL A. A., LI N., XIAO L. 2010:** Subtypes of *Cryptosporidium* spp. in mice and other small mammals. *Experimental Parasitology* 127: 238–242.
- FENG Y., ORTEGA Y., HE G., DAS P., XU M., ZHANG X., XIAO L. 2007:** Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Veterinary Parasitology* 144: 1–9.
- FLETA J., SANCHEZ-ACEDO C., CLAVEL A., QUILEZ J. 1995:** Detection of *Cryptosporidium* oocysts in extraintestinal tissues of sheep and pigs. *Veterinary Parasitology* 59: 201–205.
- GAJADHAR A.A. 1993:** *Cryptosporidium* species in imported ostriches and consideration of possible implications for birds in Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 34: 115.
- GAJADHAR A.A. 1994:** Host specificity studies and oocyst description of a *Cryptosporidium* sp. isolated from ostriches. *Parasitology Research* 80: 316–319.
- GENTILE G., VENDITTI M., MICOZZI A., CAPRIOLI A., DONELLI G., TIRINDELLI C., MELONI G., ARCESE W., MARTINO, P. 1991:**

Cryptosporidiosis in patients with hematologic malignancies. *Reviews of Infectious Diseases* 13: 842–846.

GLABERMAN S., MOORE J. E., LOWERY C. J., CHALMERS R. M., SULAIMAN I., ELWIN K., ROONEY P. J., MILLAR B. C., DOOLEY J. S., LAL A. A., XIAO L. 2002: Three drinking water-associated cryptosporidiosis outbreaks, Northern Ireland. *Emerging Infectious Diseases* 8: 631–633.

GOLDFARB J., TANNOWITZ H., GROSSNER R., BONANNO C., KAUFMAN D., MA P. 1982: Cryptosporidiosis: assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Morbidity and Mortality Weekly Report* 31: 589–591.

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.

GORDO F.P., HERRERA S., CASTRO A.T., DURÁN B.G., DIAZ R.M. 2002: Parasites from farmed ostriches (*Struthio camelus*) and rheas (*Rhea americana*) in Europe. *Veterinary Parasitology* 107: 137–160.

GRACZYK T.K., CRANFIELD M.R. 1998: Experimental transmission of *Cryptosporidium* oocyst isolates from mammals, birds and reptiles to captive snakes. *Journal of Veterinary Research* 29: 187–195.

GRACZYK T. K., CRANFIELD M. R., FAYER R., ANDERSON M. S. 1996: Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts are retained upon intestinal passage through a refractory avian host. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 3234–3237.

GUINDON S., GASCUEL O. 2003: A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696–704.

GUERRANT R.L. 1997: Cryptosporidiosis: an emerging, highly infectious threat. *Emerging Infectious Diseases* 3: 51.

GUITARD J., MENOTTI J., DESVEAUX A., ALIMARDANI P., PORCHER R., DEROUIN F., KAPEL N. 2006: Experimental study of the effects of probiotics on *Cryptosporidium parvum* infection in neonatal rats. *Parasitology Research* 99: 522–527.

GUSELLE N.J., APPELBEE A.J., OLSON M.E. 2003: Biology of *Cryptosporidium parvum* in pigs: from weaning to market. *Veterinary Parasitology* 113: 7–18.

GÜL A., CIÇEK M. 2009: Investigation of the prevalence of gastrointestinal parasites in aviary birds in homes in the Van province. *Turkiye Parazitolojii Dergisi* 33: 215–217.

HAMNES I. S., GJERDE B. K., FORBERG T., ROBERTSON L. J. 2007: Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology* 143: 347–353.

HIGGINS R.J. 1999: Surveillance for cryptosporidiosis. *Pig Journal* 43: 88–91.

HIJJAWI N. S., MELONI B. P., NG'ANZO M., RYAN U. M., OLSON M. E., COX P. T., MONIS P. T., THOMPSON R. C. A. 2004: Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cell-free culture. *Journal of Parasitology* 34: 769–777.

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.

HLAVSA M. C., ROBERTS V. A., ANDERSON A. R., HILL V. R., KAHLER A. M., ORR M., GARRISON L. E., HICKS L. A., NEWTON A., HILBORN E. D., WADE T. J., BEACH M. J., YODER J. S. 2011: Surveillance for waterborne disease outbreaks and other health events associated with recreational water-United States, 2007-2008. *MMWR Surveillance Summaries* 60: 1–32.

HOLUBOVÁ N., SAK B., HORČIČKOVÁ 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., ZIKMUNDOVÁ V., LIMPOUCHOVÁ Z., SAK B., KONEČNÝ R., HLÁSKOVÁ L., KVÁČ, M. 2019: *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. *European Journal of Protistology* 69: 70–87.

HORČIČKOVÁ 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* 17: 1–14.

ISAACS D., HUNT G.H., PHILLIPS A.D., PRICE E.H., RAAFAT F., WALKER-SMITH J.A. 1985: Cryptosporidiosis in immunocompetent children. *Journal of Clinical Pathology* 38: 76–81.

ISEKI M., MAEKAWA T., MORIYA K., UNI S., TAKADA S. 1989: Infectivity of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) in various laboratory animals. *Parasitology Research* 75: 218–222.

JANDA M., FRENCH R., AHLQUIST P. 1987: High efficiency T7 polymerase synthesis of infectious RNA from cloned brome mosaic virus cDNA and effects of 5' extensions on transcript infectivity. *Virology* 158: 259–262.

JARDINE J.E., VERWOERD D.J. 1997: Pancreatic cryptosporidiosis in ostriches. *Avian Pathology* 26: 665–670.

JELLISON K.L., DISTEL D.L., HEMOND H.F., SCHAUER D.B. 2004: Phylogenetic analysis of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada geese (*Branta canadensis*): evidence for five novel genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 452–458.

JENKINS M., TROUT J., HIGGINS J., DORSCH M., VEAL D., FAYER R. 2002: Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitology Research* 89: 1–5.

JEŽKOVÁ J., HORČIČKOVÁ 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: 35.

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.

- JOKIPII L., JOKIPII A.M. 1986:** Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis. *New England Journal of Medicine* 315: 1643–1647.
- KARANIS P., KOURENTI C., SMITH H. 2007:** Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health* 5: 1–38.
- KELLNEROVÁ K., HOLUBOVÁ N., JANDOVÁ A., VEJČÍK A., MCEVOY J., SAK B., KVÁČ M. 2017:** First description of *Cryptosporidium ubiquitum* XIIa subtype family in farmed fur animals. *European Journal of Protistology* 59: 108-113.
- KIMURA A., SUZUKI Y., MATSUI T. 2004:** Identification of the *Cryptosporidium* isolate from chickens in Japan by sequence analyses. *Journal of Veterinary Medical Science* 66: 879–881.
- KODÁDKOVÁ A., KVÁČ M., DITRICH O., SAK B., XIAO L. 2010:** *Cryptosporidium muris* in a reticulated giraffe (*Giraffa camelopardalis reticulata*). *Journal of Parasitology* 96: 211–213.
- KRUSE H., KIRKEMO A.M., HANDELAND K. 2004:** Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerging Infectious Diseases* 10: 2067–2072.
- KUHN R.C., CHANNAH M.R., OSHIMA K.H. 2002:** Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild ducks along the Rio Grande River Valley in Southern New Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 161–165.
- KVÁČ M., HAVRDOVÁ N., HLÁSKOVÁ L., DAŇKOVÁ T., KANDĚRA J., JEŽKOVÁ J., VÍTOVEC J., SAK B., ORTEGA Y., XIAO L., MODRÝ D., CHELLADURAI J.R.J.J., PRANTLOVÁ V., MCEVOY J. 2016:** *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): Molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. *PLoS One* 11: e0147090.
- KVÁČ M., HOFMANNOVÁ L., BERTOLINO S., WAUTERS L., TOSI G., MODRÝ D. 2008a:** Natural infection with two genotypes of *Cryptosporidium* in red squirrels (*Sciurus vulgaris*) in Italy. *Folia Parasitologica* 55: 95–99.

KVÁČ M., HOFMANNOVÁ L., HLÁSKOVÁ L., KVĚTOŇOVÁ D., VÍTOVEC J., McEVOY J., SAK B. 2014a: *Cryptosporidium erinacei* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in hedgehogs. *Veterinary Parasitology* 201: 9–17.

KVÁČ M., KESTŘÁNOVÁ M., KVĚTOŇOVÁ D., KOTKOVÁ M., ORTEGA Y., MCEVOY J., SAK B. 2012: *Cryptosporidium tyzzeri* and *Cryptosporidium muris* originated from wild West-European house mice (*Mus musculus domesticus*) and East-European house mice (*Mus musculus musculus*) are non-infectious for pigs. *Experimental Parasitology* 131: 107–110.

KVÁČ M., KESTŘÁNOVÁ M., PINKOVÁ M., KVĚTOŇOVÁ D., KALINOVÁ J., WAGNEROVÁ P., KOTKOVÁ M., VÍTOVEC J., DITRICH O., MCEVOY J., STENGER B., SAK B. 2013a: *Cryptosporidium scrofarum* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in domestic pigs (*Suis scrofa*). *Veterinary Parasitology* 31: 218–227.

KVÁČ M., MCEVOY J., STENGER B., CLARK M. 2014b: Cryptosporidiosis in other vertebrates. In: Cacciò S.M., Widmer G. (Eds.). *Cryptosporidium: parasite and diseases*. Springer, Wien 1: 237–326.

KVÁČ M., ONDRÁČKOVÁ Z., KVĚTOŇOVÁ D., MCEVOY J., VÍTOVEC J., ROST M. 2013b: The Lesser Egyptian Gerbil (*Gerbillus gerbillus*) is a suitable host for the long-term propagation of *Cryptosporidium andersoni*. *Experimental Parasitology* 134: 438–442.

KVÁČ M., ONDRÁČKOVÁ Z., KVĚTOŇOVÁ D., SAK B., VÍTOVEC J. 2007: Infectivity and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* to a novel host, southern multimammate mouse (*Mastomys coucha*). *Veterinary Parasitology* 143: 229–233.

KVÁČ M., SAK B., HANZLÍKOVÁ D., KOTILOVÁ J., KVĚTOŇOVÁ D. 2009: Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from pigs at slaughterhouses in South Bohemia, Czech Republic. *Parasitology Research* 104: 425–428.

KVÁČ M., SAK B., KVĚTOŇOVÁ D., DITRICH O., HOFMANNOVÁ L., MODRÝ D., VÍTOVEC J., XIAO L. 2008b: Infectivity, pathogenicity, and genetic characteristics of mammalian gastric *Cryptosporidium* spp. in domestic ruminants. *Veterinary Parasitology* 153: 363–367.

KVÁČ M., VÍTOVEC J. 2003: Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium andersoni* in one herd of beef cattle. *Journal of Veterinary Medicine B* 50: 451–457.

KVÁČ M., VLNATÁ G., JEŽKOVÁ J., HORČIČKOVÁ 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.

LAATAMNA A.E., HOLUBOVÁ N., SAK B., KVÁČ, M., 2017: *Cryptosporidium meleagridis* and *C. baileyi* (Apicomplexa) in domestic and wild birds in Algeria. *Folia Parasitologica* 64.

LEANDER B. S., CLOPTON R. E., KEELING P. F. 2003: Phylogeny of gregarines (Apicomplexa) as inferred from SSU rDNA and betatubulin. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 345–354.

LEONI F., AMAR C., NICHOLS G., PEDRAZA-DIAZ S., MCLAUCHLIN J. 2006: Genetic analysis of *Cryptosporidium* from 2414 humans with diarrhoea in England between 1985 and 2000. *Journal of Medical Microbiology* 55:703–707.

LEVINE R. J. 1988: Uncertainty in Clinical Research. *Law Medicine and Health Care* 16: 174–182.

LI J., LIN X., ZHANG L., QI N., LIAO S., LV M., WU C., SUN M. 2015: Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in domestic pigeons (*Columba livia domestica*) in Guangdong Province, Southern China. *Parasitology Research* 114: 2237–2241.

LI Q., LI L., TAO W., JIANG Y., WAN Q., LIN Y., LI W. 2016: Molecular investigation of *Cryptosporidium* in small caged pets in northeast China: host specificity and zoonotic implications. *Parasitology Research* 115: 2905–2911.

LINDSAY D.S., BLAGBURN B.L. 1990: Cryptosporidiosis in birds. In: Dubey J.P., Speer C.A., Fayer R. (Eds.). *Cryptosporidiosis in man and animals*. CRC Press, Boca Raton. FL 370 pp.

LINDSAY D.S., BLAGBURN B.L., HOERR F.J. 1987: Experimentally induced infections in turkeys with *Cryptosporidium baileyi* isolated from chickens. *Journal of Veterinary Research* 48: 104–108.

LINDSAY D.S., BLAGBURN B.L., SUNDERMANN C.A., HOERR F.J. 1989: Experimental infections in domestic ducks with *Cryptosporidium baileyi* isolated from chickens. *Avian Diseases* 33: 69–73.

- LINDSAY D. S., HENDRIX C. M., BLAGBURN B. L. 1988:** Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in opossums (*Didelphis virginiana*). *Journal of Wildlife Diseases* 24: 157–159.
- LINDSAY D.S., UPTON S.J., OWENS D.S., MORGAN U.M., MEAD J.R., BLAGBURN B.L. 2000:** *Cryptosporidium andersoni* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from cattle, *Bos taurus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 47: 91–95.
- LIU CH., WANG L., LANCTO CH. A., ABRAHAMSEN M. S. 2009:** Characterization of a *Cryptosporidium parvum* protein that binds single-stranded G-strand telomeric DNA. *Molecular and Biochemical Parasitology* 165: 132–141.
- LUPO P.J., LANGER-CURRY R.C., ROBINSON M., OKHUYSEN P.C., CHAPPELL C.L. 2008:** *Cryptosporidium muris* in a Texas canine population. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 78: 917–921.
- MACKENZIE W.R., HOXIE N.J., PROCTOR M.E., GRADUS M.S., BLAIR K.A., PETERSON D.E., KAZMIERCZAK J.J., ADDISS D.G., FOX K.R., ROSE J.B., DAVIS J.P. 1994:** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine* 331: 161–167.
- MACKENZIE W.R., KAZMIERCZAK J.J., DAVIS J.P. 1995:** An outbreak of cryptosporidiosis associated with a resort swimming pool. *Epidemiology and Infection* 115: 545–553.
- MADDOX-HYTTEL C., LANGKJÆR R.B., ENEMARK H.L., VIGRE H. 2006:** *Cryptosporidium* and *Giardia* in different age groups of Danish cattle and pigs occurrence and management associated risk factors. *Veterinary Parasitology* 141: 48–59.
- MAJEWSKA A.C., GRACZYK T.K., SŁODKOWICZ-KOWALSKA A., TAMANG L., JĘDRZEJEWSKI S., ZDUNIAK P., SOLARCZYK P., NOWOSAD A., NOWOSAD P. 2009:** The role of free-ranging, captive, and domestic birds of Western Poland in environmental contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts and *Giardia lamblia* cysts. *Parasitology Research* 104: 1093–1099.

- MAMMERI M., ADJOU K.T. 2019:** Veterinary and public health importance of cryptosporidiosis in Algeria: an update and new insights. *Revue De Medecine Veterinaire* 170: 164–173.
- MCDONALD V., DEER R., UNI S., ISEKI M., BANCROFT G. J. 1992:** Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and SCID) mice. *Infection and Immunity* 60: 3325–3331.
- MEINHARDT P.L., CASEMORE D.P., MILLER K.B. 1996:** Epidemiologic aspects of human cryptosporidiosis and the role of waterborne transmission. *Epidemiologic Reviews* 18: 118–136.
- MEIRELES M.V., SOARES R.M., DOS SANTOS M.M., GENNARI S.M. 2006:** Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). *Journal of Parasitology* 92: 623–626.
- MEISEL J. L., PERERA D. R., MELIGRO C., RUBIN C. E. 1976:** Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. *Gastroenterology* 0: 1156–1160.
- MELICHEROVÁ J., ILGOVÁ J., KVÁČ M., SAK B., KOUDELA B., VALIGUROVÁ A. 2014:** Life cycle of *Cryptosporidium muris* in two rodents with different responses to parasitization. *Parasitology* 141: 287–303.
- MEUTIN D. J., VAN KRUININGEN H. J., KEIN D. H. 1974:** Cryptosporidiosis in a calf. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 165: 914–917.
- MILÁČEK P., VÍTOVEC J. 1985:** Differential staining of cryptosporidia by anilinecarbolic-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitologica* 32: 50.
- MOLINA-LOPEZ R.A., RAMIS A., MARTIN-VAZQUEZ S., GOMEZ-COUSO H., ARES-MAZÁS E., CACCIO S.M., LEIVA M., DARWICH, L. 2010:** *Cryptosporidium baileyi* infection associated with an outbreak of ocular and respiratory disease in otus owls (*Otus scops*) in a rehabilitation centre. *Avian Pathology* 39: 171–176.

- MORGAN U.M., DEPLAZES P., FORBES D.A., SPANO F., HERTZBERG H., SARGENT K.D., ELLIOT A., THOMPSON R.C. 1999:** Sequence and PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacers of the rDNA repeat unit in isolates of *Cryptosporidium* from different hosts. *Parasitology* 118: 49–58.
- MORGAN-RYAN U.M., MONIS P.T., XIAO L., LIMOR J., SULAIMAN I., RAIDAL S., O'DONOGHUE P., GASSER R., MURRAY A., FAYER R., BLAGBURN B.L., LAL A.A., THOMPSON R.C. 2001:** Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. *International Journal for Parasitology* 31: 289–296.
- MORGAN-RYAN U.M., FALL A., WARD L.A., HIJJAWI N., SULAIMAN I., FAYER R., THOMPSON R.C., OLSON M., LAL A., XIAO L. 2002:** *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49: 433–440.
- MORGAN-RYAN U.M., MONIS P., POSSENTI A., CRISANTI A., SPANO F. 2001:** Cloning and phylogenetic analysis of the ribosomal internal transcribed spacer-1 (ITS1) of *Cryptosporidium wrairi* and its relationship to *C. parvum* genotypes. *Parassitologia* 43: 159–163.
- MURAKOSHI F., FUKUDA Y., MATSUBARA R., KATO Y., SATO R., SASAKI T., NAKAI Y. 2013:** Detection and genotyping of *Cryptosporidium* spp. in large Japanese field mice, *Apodemus speciosus*. *Veterinary Parasitology* 196: 184–188.
- NAKAMURA A.A., HOMEM C.G., DA SILVA A.M., MEIRELES M.V. 2014:** Diagnosis of gastric cryptosporidiosis in birds using a duplex real-time PCR assay. *Veterinary Parasitology* 205: 7–13.
- NAVIN T.R., JURÁNEK D.D. 1984:** Cryptosporidiosis: clinical, epidemiologic, and parasitologic review. *Reviews of Infectious Diseases* 6: 313–27.
- 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.

- NIME F. A., BUREK J. D., PAGE D. L., HOLSCHER M. A., YARDLEY J. H. 1976:** Acute enterokolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. *Gastroenterology* 70: 592–598.
- O'CONNOR R.M., SHAFFIE R., KANG G., WARD H.D. 2011:** Cryptosporidiosis in patients with HIV/AIDS. *AIDS* 25: 549–560.
- O'DONOGHUE P.J. 1995:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology* 25: 139–195.
- OKHUYSEN P.C., CHAPPELL C.L., CRABB J.H., STERLING C.R., DUPONT H.L. 1999:** Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *Journal of Infectious Diseases* 180: 1275–1281.
- OLIVEIRA F.C., EDERLI N.B., EDERLI B.B., ALBUQUERQUE M.C., DOS SANTOS M.D., 2008:** Occurrence of *Cryptosporidium* spp. oocysts (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in ostriches, *Struthio camelus* L., 1758 (Aves, Struthionidae) reared in North and Lowered Coastline regions of the state of Rio de Janeiro. Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* 1: 322–325.
- ONG C.S., EISLER D.L., ALIKHAN A., FUNG V.W., TOMBLIN J., BOWIE W.R., ISAAC-RENTON J.L. 2002:** Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype. *Emerging Infectious Diseases* 8: 263–268.
- OTRANTO D., CANTACESSI C., PFEFFER M., DANTAS-TORRES F., BRIANTI E., DEPLAZES P., GENCHI C., GUBERTI V., CAPELLI G. 2015:** The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe: Part I: Protozoa and tick-borne agents. *Veterinary Parasitology* 213: 12–23.
- ÖZKUL I. A., AYDIN Y. 1994:** Natural *Cryptosporidium muris* infection of the stomach in laboratory mice. *Veterinary Parasitology* 55: 129–132.
- PANCIERA R.J., THOMASSEN R.W., GARNER F.M. 1971:** Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology* 8: 47–484.
- PAVLÁSEK I. 1999:** Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum specificity and the environment. *Klinická Mikrobiologie a Infekční Lékařství* 3: 290–301.

- PAVLÁSEK I. 2001:** Findings of cryptosporidia in the stomach of hens and of exotic and wild birds. *Veterinářství* 51: 103–108.
- PAVLÁSEK I. 1981:** First record of *Cryptosporidium* sp. in calves in Czechoslovakia. *Folia parasitologica* 28: 187–189.
- PAVLÁSEK I. 1993:** The black-headed gull (*Larus ridibundus* L.), a new host for *Cryptosporidium baileyi* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae). *Veterinární Medicína* 38: 629–638.
- PENG M.M., MATOS O., GATEI W., DAS P., STANTIC-PAVLINIC M., BERN C., SULAIMAN I.M., GLABERMAN S., LAL A.A., XIAO L. 2001:** A comparison of *Cryptosporidium* subgenotypes from several geographic regions. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 28–31.
- PENG M.M., XIAO L., FREEMAN A.R., ARROWOOD M.J., ESCALANTE A.A., WELTMAN A.C., ONG C.S., MAC KENZIE W.R., LAL A.A., BEARD C.B. 1997:** Genetic polymorphism among *Cryptosporidium parvum* isolates: evidence of two distinct human transmission cycles. *Emerging Infectious Diseases* 3: 567.
- PENRITH M.L., BURGER W.P. 1993:** A *Cryptosporidium* sp. in an ostrich. *The Journal of the South African Veterinary Association* 64: 60–61.
- PENRITH M.L., BEZUIDENHOUT A.J., BURGER W.P., PUTTERILL J.F. 1994:** Evidence for cryptosporidial infection as a cause of prolapse of the phallus and cloaca in ostrich chicks (*Struthio camelus*). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 61: 283–289.
- PETERSEN C. 1993:** Cellular biology of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitology Today* 9: 87–91.
- PETERSEN C. 1992:** Cryptosporidiosis in patients infected with Human Immunodeficiency Virus. *Clinical Infectious Diseases* 15: 903–909.
- PLUTZER J., KARANIS P. 2009:** Genetic polymorphism in *Cryptosporidium* species: An update. *Veterinary Parasitology* 165: 187–199.
- 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.

- PONCE GORDO F., HERRERA S., CASTRO A.T., GARCÍA DURÁN B., MARTÍNEZ DÍAZ R.A. 2002:** Parasites from farmed ostriches (*Struthio camelus*) and rheas (*Rhea americana*) in Europe. *Veterinary Parasitology* 107: 137–160.
- PREDIGER J., HORČIČKOVÁ M., HOFMANNOVÁ L., SAK B., FERRARI N., MAZZAMUTO M.V., ROMEO C., WAUTERS L.A., MCEVOY J., KVÁČ M. 2017:** Native and introduced squirrels in Italy host different *Cryptosporidium* spp. *European Journal of Protistology* 61: 64–75.
- PUTIGNANI L., MECHINELLA D. 2010:** Global distribution, public health and clinical impact of the protozoan pathogen *cryptosporidium*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2010: 1–39.
- 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.
- QI M., HUANG L., WANG R., XIAO L., XU L., LI J., ZHANG, L. 2014:** Natural infection of *Cryptosporidium muris* in ostriches (*Struthio camelus*). *Veterinary Parasitology* 205: 518–522.
- RAMIREZ N.E., WARD L.A., SREEVATSAN S. 2004:** A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microbes and Infection* 6: 773–785.
- RAVASZOVÁ P., HALÁNOVÁ M., GOLDOVÁ M., VALENČAKOVÁ A., MALČEKOVÁ B., HURNÍKOVÁ Z., HALAN M. 2012:** Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in red foxes and brown bear in the Slovak Republic. *Parasitology Research* 110: 469–471.
- ROBERTSON L.J., BJÖRKMAN C., AXÉN C., FAYER R. 2014:** Cryptosporidiosis in farmed Animals. In: Cacciò S.M., Widmer G. (Eds.). *Cryptosporidium: Parasite and Disease*. Springer, Wien 149–236.
- RUBBENSTROTH D., SCHMIDT V., RINDER M., LEGLER M., CORMAN V.M., STAEHELI P. 2014:** Discovery of a new avian bornavirus genotype in estrildid finches (*Estrildidae*) in Germany. *Veterinary Microbiology* 168: 318–323.

RYAN U. 2010: *Cryptosporidium* in birds, fish and amphibians. *Experimental Parasitology* 124: 113–120.

RYAN U.M., BATH C., ROBERTSON I., READ C., ELLIOT A., MCINNES L., TRAUB R., BESIER B. 2005: Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4992–4997.

RYAN U. M., MONIS P., ENEMARK H. L., SULAIMAN I., SAMARASINGHE B., READ C., BUDDLE R., ROBERTSON I., ZHOU L., THOMPSON R. C., XIAO L. 2004: *Cryptosporidium suis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in pigs (*Sus scrofa*). *Journal of Parasitology* 90: 769–773.

RYAN U. M., XIAO L., READ C., SULAIMAN I.M., MONIS P., LAL A.A., FAYER R., PAVLÁSEK I. 2003a: A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlásek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *Journal of Parasitology* 89: 809–813.

RYAN U. M., XIAO L., READ C., ZHOU L., LAL A.A., PAVLÁSEK I. 2003b: Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4302–4307.

SANTÍN M., TROUT J. M., FAYER R. 2005: *Enterocytozoon bienersi* genotypes in dairy cattle in the eastern United States. *Parasitology Research* 97: 535–538.

SANTOS M. M., PIERO J. R., MEIRELES M. V. 2005: *Cryptosporidium* infection in ostriches (*Struthio camelus*) in Brazil: Clinical, morphological and molecular studies. *Brazilian Journal of Poultry Science* 7: 113–117.

SEGURA R., PRIM N., MONTEMAYOR M., VALLS M. E., MUÑOZ C. 2015: Predominant virulent IbA10G2 subtype of *Cryptosporidium hominis* in human isolates in Barcelona: A Five-Year Study. *PLoS One* 10: e0121753.

DA PAIXÃO SEVÁ A., FUNADA M.R., RICHTZENHAIN L., GUIMARÃES M.B., DE OLIVEIRA SOUZA S., ALLEGRETTI L., SINHORINI J.A., DUARTE V.V., SOARES R.M. 2011: Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. *Veterinary Parasitology* 175: 27–32.

- SHIRLEY D.A.T., MOONAH S.N., KOTLOFF, K.L. 2012:** Burden of disease from cryptosporidiosis. *Current opinion in infectious diseases* 25: 555.
- SLAVIN D. 1955:** *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Journal of Comparative Pathology* 65: 262–266.
- SMITH H.V., CACCIO S.M., COOK N., NICHOLS R. A. B., TAIT A. 2007:** *Cryptosporidium* and *Giardia* as foodborne zoonoses. *Veterinary Parasitology* 149: 29–40.
- SMITH H.V., CACCIO S.M., TAIT A., MCLAUCHLIN J., THOMPSON R.C.A. 2006:** Tools for investigating the abiotic transmission of *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in humans. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 5977–5986.
- SMITH H.V., NICHOLS R.A.B., GRIMASON A.M. 2005:** *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology* 21: 133–142.
- SOAVE R., ARMSTRONG D. 1986:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Reviews of Infectious Diseases* 8: 1012–1023.
- SOBA B., PETROVEC M., MIOC V., LOGAR J. 2006:** Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates from humans in Slovenia. *Clinical Microbiology and Infection* 12: 918–921.
- SOTIRAKI S.T., ANTONIADOU-SOTIRIADOU K., HIMONAS C.A., GEORGIADES G. 2001:** Gastrointestinal parasites in ostriches (*Struthio camelus*), pp: 84–86.
- SREEDHARAN A., JAYSHREE R. S., SRIDHAR H. 1996:** Cryptosporidiosis among cancer patients: an observation. *Journal of Diarrhoeal Diseases Research* 211–213.
- SRETER T., VARGA I. 2000:** Cryptosporidiosis in birds-a review. *Veterinary Parasitology* 87: 261–279.
- STEHR-GREEN J.K., MCCAIG L., REMSEN H.M., RAINS C.S., FOX M., JURANEK D.D. 1987:** Shedding of oocysts in immunocompetent individuals infected with *Cryptosporidium*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 36: 338–342.

- STENGER B.L., CLARK M.E., KVÁČ M., KHAN E., GIDDINGS C.W., PREDIGER J., MCEVOY J.M. 2015:** North American tree squirrels and ground squirrels with overlapping ranges host different *Cryptosporidium* species and genotypes. *Infection, Genetics and Evolution* 36: 287–293.
- SULAIMAN I.M., LAL A.A., ARROWOOD M.J., XIAO L. 1999:** Biallelic polymorphism in the intron region of β -tubulin gene of *Cryptosporidium* parasites. *Journal of Parasitology* 85: 154–157.
- 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.
- SYMEONIDOU I., DIAKOU A., PAPADOPOULOS E., GORDO F.P. 2019:** Endoparasitism of Greek ostriches: First report of *Entamoeba struthionis* and *Balantioides coli*. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 18: 100334.
- TAMURA K. 1992:** Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 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. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731–2739.
- TANYÜKSEL M., GÜN H., DOGANCI L. 1995:** Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in patients with neoplasia and diarrhea. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 27: 69–70.
- TAVARÉ S. 1986:** Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* 17: 57–86.
- THOMPSON R.C.A., ASH A. 2016:** Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections. *Infection, Genetics and Evolution* 40: 315–323.
- THOMPSON R.C.A., OLSON M.E., ZHU G., ENOMOTO S., ABRAHAMSEN M.S., HIJAWI N.S. 2005:** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. *Advances in Parasitology* 59: 77–158.

- TROTZ-WILLIAMS L.A., MARTIN D.S., GATEI W., CAMA V., PEREGRINE A.S., MARTIN S.W., XIAO L. 2006:** Genotype and subtype analyses of *Cryptosporidium* isolates from dairy calves and humans in Ontario. *Parasitology Research* 99: 346–352.
- TURKCAPAR N., KUTLAY S., NERGIZOGLU G., ATLI T., DUMAN N. 2002:** Prevalence of *Cryptosporidium* infection in hemodialysis patients. *Nephron* 90: 344–346.
- 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 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. 1929:** Coccidiosis in gallinaceous birds. *American Journal of Hygiene* 10: 269.
- 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.
- TZIPORI S. 1983:** Cryptosporidiosis in animals and humans. *Microbiology Revue* 47: 84–96.
- TZIPORI S. 1988:** Cryptosporidiosis in perspective. *Advances in Parasitology* 27: 63–129.
- TZIPORI S., WARD H. 2002:** Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection* 4: 1047–1058.
- VALIGUROVÁ A., HOFMANNOVÁ L., KOUDELA B., VÁVRA J. 2007:** An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54: 495–510.

- VALIGUROVÁ A., JIRKŮ M., KOUDELA B., GELNAR M., MODRÝ D., ŠLAPETA J. 2008:** Cryptosporidia: epicellular parasites embraced by the host cell membrane. *International Journal for parasitology* 38: 913–922.
- 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* 53: 239–243.
- WAIT L.F., FOX S., PECK S., POWER M.L. 2017:** Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from the Tasmanian devil (*Sarcophilus harrisii*). *PloS One* 12: e0174994.
- WANG R., QI M., JINGING 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 Y., FENG Y., CUI B., JIAN F., NING C., WANG R., ZHANG L., XIAO L. 2010:** Cervine genotype is the major *Cryptosporidium* genotype in sheep in China. *Parasitology Research* 106: 341–347.
- WANG Y., YANG W., CAMA V., WANG L., CABRERA L., ORTEGA Y., BERN C., FENG Y., GILMAN R., XIAO L. 2014:** Population genetics of *Cryptosporidium meleagridis* in humans and birds: evidence for cross-species transmission. *International Journal for Parasitology* 44: 515–521.
- WIDMER G., KLEIN P., BONILLA R. 2007:** Adaptation of *Cryptosporidium* oocysts to different excystation conditions. *Parasitology* 134: 1583–1588.
- WOLFSON J.S., RICHTER J.M., WALDRON M.A., WEBER D.J., MCCARTHY D.M., HOPKINS C.C. 1985:** Cryptosporidiosis in immunocompetent patients. *New England Journal of Medicine* 312: 1278–1282.
- XIAO L. 2010:** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: An update. *Experimental Parasitology* 124: 80–89.
- XIAO L., ALDERISIO K., LIMOR J., ROYER M., LAL A.A. 2000:** Identification of species and sources of *Cryptosporidium* oocysts in storm waters with a small-subunit rRNA-based diagnostic and genotyping tool. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 5492–5498.

XIAO L., BERN C., LIMOR J., SULAIMAN I., ROBERTS J., CHECKLEY W., CABRERA L., GILMAN R. H., LAL A. A. 2001: Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *Journal of Infectious Diseases* 183: 492–497.

XIAO L.H., ESCALANTE L., YANG C.F., 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. 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., FAYER R., RYAN U., UPTON S. 2004: *Cryptosporidium* taxonomy: Recent advances and implications for public health. *Journal of Clinical Microbiology* 17: 72–97.

XIAO L., RYAN U.M. 2004: Cryptosporidiosis: an update in molecular epidemiology. *Current Opinion in Infectious Diseases* 17: 483–490.

YODER J.S., WALLACE R.M., COLLIER S.A., BEACH M.J., HLAVSA M.C. 2012: Cryptosporidiosis surveillance: United States, 2009-2010. *Morbidity and Mortality Weekly Report: Surveillance Summaries* 61: 1–12.

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.

ZÍTEK K. 1998: Prevence kongenitální toxoplasmózy. *Česká Gynekologie* 63: 58–64.

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.