

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

**ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

---

**AUTOREFERÁT DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Ing. Nikola Holubová**

**České Budějovice  
2021**

## **Autoreferát disertační práce**

**Doktorand:** Ing. Nikola Holubová  
**Studijní program:** Zootechnika  
**Studijní obor:** Zoohygiena a prevence chorob hospodářských zvířat  
**Název práce:** Kryptosporidie a kryptosporidióza ptáků  
**Školitel:** prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.  
**Oponenti:** prof. MVDr. Daniela Lukešová, CSc.  
doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.  
MVDr. Lada Hofmannová, Ph.D.

Obhajoba disertační práce se koná dne 3. 2. 2022 v 11.30 v pavilonu M v místnosti vědecké rady ZF JU.

S disertační prací se lze seznámit na studijním oddělení Zemědělské fakulty JU v Českých Budějovicích.

## SEZNAM IMPAKTOVANÝCH PUBLIKACÍ

### Disertační práce vychází z těchto publikací:

- 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.
- **Holubová N.**, Sak B., Horčíčková M., Hlásková L., Květoňová D., Menchaca S., McEvoy J., Kváč M. 2016: *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. Parasitology Research 115: 2243–2251.
- Laathamna A.E., **Holubová N.**, Sak B., Kváč M. 2017: *Cryptosporidium meleagridis* and *C. baileyi* (Apicomplexa) in domestic and wild birds in Algeria. Folia Parasitologica (Praha) 64: 018.
- **Holubová N.**, Sak B., Hlásková L., Květoňová D., Hanzal V., Rajský D., Rost M., McEvoy J., Kváč M. 2018: Host specificity and age-dependent resistance to *Cryptosporidium avium* infection in chickens, ducks and pheasants. Experimental Parasitology 191: 62–65.
- **Holubová N.**, Zikmundová V., Limpouchová Z., Sak B., Konečný R., Hlásková L., Rajský D., Kopacz Z., McEvoy J., Kváč M. 2019: *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. European Journal of Protistology 69: 70–87.
- **Holubová N.**, Tůmová L., Sak B., Hejzlarová A., Konečný R., McEvoy J., Kváč M. 2020: Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. Parasites & Vectors 13: 340.
- **Holubová N.**, Sak B., Schulzová T., Konečný R., Rost M., Tůmová L., McEvoy J., Kváč M. 2020: A chicken embryo model for the maintenance and amplification of *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium baileyi* oocysts. European Journal of Protistology 75: 125718.

## PRÁCE VZNIKLA ZA PODPORY NÁSLEDUJÍCÍCH GRANTŮ

- **GAČR 15-01090S** – Rozkrývání rozmanitosti kryptosporidií: propojení studia genetické variability a biologie parazitů (2015–2017; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).
- **GAČR 18-12364S** – Kryptosporidie ptáků: doplnění chybějících znalostí u neoprávněně opomíjené skupiny hostitelů (2018–2020; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).
- **MSMT LTAUSA17165** – Diverzita a koevoluce kryptosporidií hlodavců: propojení studia genetické variability a biologie parazitů (2017–2020; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).
- **GAJU 082/2017/Z** – Prevalence, diverzita a biologie kryptosporidií parazitujících u vrubozobých (2017; řešitelka: Ing. Nikola Holubová).
- **GAJU 017/2018/Z** – Kryptosporidie volně žijících ptáků: diverzita, biologie a možnost přenosu na hospodářská zvířata (2018; řešitelka: Ing. Nikola Holubová).
- **GAJU 040/2019/Z** – Ptačí vejce jako inkubátor pro pomnožení parazitů rodu *Cryptosporidium*: možnost překonání hostitelské a mezidruhové specifity (2019; řešitelka: Ing. Nikola Holubová).
- **GAJU 007/2021/Z** – Zdivočelí holubi jako zdroj zoonotických parazitů rodu *Cryptosporidium*, *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon* (2021; řešitelka: Ing. Nikola Holubová).
- **GAJU 028/2019/Z** – Genetika, zdraví zvířat a biologicky a sensoricky aktivní látky jako základní předpoklad kvalitních potravin a zemědělských surovin (2019–2021; řešitel: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.).

### **Grantový projekt, jehož byla Ing. Nikola Holubová spoluřešitelkou a nemá vztah k tématu disertační práce**

- **GAJU 016/2020/Z** – Synantropní hlodavci: hostitelé zoonotických a hostitelsky specifických kryptosporidií (2020; řešitelka: RNDr. Jana Ježková, spoluřešitelka: Ing. Nikola Holubová).

## ANOTACE

*Cryptosporidium* (Apicomplexa) je rod jednobuněčných parazitů infikujících gastrointestinální, respirační a urogenitální trakt většiny obratlovců včetně člověka a způsobujících onemocnění kryptosporidiózu. Podle Světové zdravotnické organizace je kryptosporidióza celosvětově se vyskytujícím průjmovým onemocněním, které postihuje miliony osob; je druhou nejčastější příčinou úmrtí kojenců v rozvojových zemích a je označována za novou příčinu nemocnosti a úmrtnosti na celém světě. Kryptosporidie také způsobují závažné onemocnění u hospodářských zvířat, kde vyvolávají časté průjmy a způsobují značné ekonomické ztráty, zejména u mladých jedinců. Ačkoli jsou kryptosporidie intenzivně zkoumány již více než 25 let, výzkum se do značné míry zaměřuje na kryptosporidie u lidí, hospodářských zvířat a jiných savců, přičemž kryptosporidiím ptáků byla dosud věnována poměrně malá pozornost. V současné době je popsáno 49 platných druhů kryptosporidií parazitujících u širokého spektra hostitelů. Kromě platně popsaných druhů byly popsány desítky genotypů, o kterých není dostatek údajů, aby bylo možné je označit za samostatné druhy. Z těchto druhů a genotypů je šest druhů, z nichž tři byly popsány v rámci této práce, a 20 genotypů specifických pro ptáky. Tato disertační práce výrazně rozšiřuje znalosti o kryptosporidiích specifických pro ptáky, zaměřuje se na jejich výskyt a diverzitu v rámci 25 řádů a 176 čeledí ptáků, morfologii vývojových stádií, hostitelskou a orgánovou specifitu, patogenitu a přenos.

## ANNOTATION

*Cryptosporidium* is a genus of single-cell protist parasites that infect gastrointestinal, respiratory and/or urogenital tract of most vertebrates, including humans, and it causes the disease cryptosporidiosis. According to the World Health Organisation, cryptosporidiosis is a global diarrhoeal disease affecting millions of individuals; it is the second most common cause of infantile death in developing countries and is has been identified as an emerging cause of morbidity and mortality worldwide. The disease is also severe in livestock, causing profuse diarrhoea and considerable economic losses in farmed young animals. Although *Cryptosporidium* has been under intensive investigation for more than 25 years, research has been heavily biased towards *Cryptosporidium* in humans, livestock, and other mammals, with comparatively little attention paid to *Cryptosporidium* in birds. Currently, there are 49 described valid *Cryptosporidium* species infecting a wide spectrum of animals. In addition to the validly described species, dozens of genotypes have been described that lack sufficient data to justify a species designation. Out of these, six species, three were described within this thesis, and 20 genotypes has been reported to be bird specific. The thesis greatly expands the overview of bird-derived *Cryptosporidium*, focusing on its prevalence and diversity across 25 orders and 176 families within the class Aves, morphology of developmental stages, host- and organ specificity, pathogenicity and transmission.

## SOUHRN

Předmětem této disertační práce je studium výskytu a diverzity kryptosporidií infikujících ptáky. Během studia bylo získáno a vyšetřeno pomocí mikroskopických a molekulárních metod 4740 vzorků trusu ptáků z 25 řádů a 176 rodů z 9 zemí, konkrétně 2928 vzorků z České republiky, 301 ze Slovenska, 732 z Chorvatska, 25 z Polska, 90 z Jihoafrické republiky, 238 z Nového Zélandu, 11 ze Spojených arabských emirátů, 345 z Alžírsko a 70 z USA. Specifická DNA kryptosporidií byla detekována na lokusech genů kódujících malou podjednotku rRNA (SSU), aktin, heat shock protein (HSP70), thrombospondin-related adhesive protein (TRAP-C1), *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) a 60 kDa glykoprotein (gp60) v 255 (5,4 %) případech. Fylogenetické analýzy prokázaly přítomnost 11 druhů a 6 genotypů kryptosporidií. Nejčastěji byly detekovány druhy *C. baileyi* (65/4740; 1,4 %), *C. proventriculi* (35/4740; 0,7 %) a *Cryptosporidium* sp. goose genotyp Id (33/4740; 0,7 %). Naopak nejméně často byl detekován *Cryptosporidium* sp. avian genotyp I (2/4740; 0,04 %). Na základě fylogenetických a experimentálních studií byl popsán jeden nový genotyp - *Cryptosporidium* avian genotyp VI z vlhovce červenokřídlého a tři nové druhy - *C. avium* z kakarikiho rudočelého, *C. proventriculi* z papouška koňžského a *C. ornithophilus* z pštrosa dvouprstého. Velikost oocyst všech nově popsaných druhů se od sebe lišila. Oocysty *C. avium* měřily  $6,3 \times 4,9 \mu\text{m}$ , *C. proventriculi*  $7,4 \times 5,7 \mu\text{m}$  a *C. ornithophilus*  $6,1 \times 5,2 \mu\text{m}$ . Studium tkáňové specifity prokázalo vývoj *C. avium* v tenkém a slepém střevě, ale také ledvinách a močovodech. Vývojová stádia *C. proventriculi* byla nalezena v proventrikulu a ventrikulu. Druh *C. ornithophilus* infikoval slepé a tlusté střevo spolu s Fabriciovou burzou. *Cryptosporidium avium* získané z papoušků, byl infekční pro kur domácí z řádu hrabavých, kachnu domácí patřící do řádu vrubozobých, ale překvapivě neinfekční pro bažanta obecného. Druh *C. proventriculi* byl infekční pro korelu chocholatou z řádu papoušků, nikoliv však andulku vlnkovanou, která také patří mezi papoušky. Kur domácí byl v experimentálních podmínkách vnímavý k infekci *C. ornithophilus*. Ani jeden výše jmenovaný druh kryptosporidií nebyl infekční pro laboratorní myši kmene SCID a BALB/c. Výsledky našich studií výrazným způsobem rozšířily naše znalosti o věkové specifitě a průběhu infekce různých druhů a genotypů kryptosporidií parazitujících u ptáků. *Cryptosporidium avium* patří mezi druhy kryptosporidií, u kterých byl prokázán přenos parazita na hostitele u všech věkových kategorií vybraných skupin ptáků. U *Cryptosporidium ornithophilus* jsme na základě námi provedených experimentů zjistili kratší prepatentní periodu u mladších jedinců než u dospělých, kteří mohou být k infekci méně citliví z důvodů již prodělané

kryptosporidiové infekce. Během našich experimentů jsme nezaznamenali žádné klinické příznaky ptáků infikovaných druhy *C. avium*, *C. proventriculi* a *C. ornothophilus*. V neposlední řadě byla tato disertační práce rozšířena o výzkum zaměřený na kultivaci kryptosporidií pomocí kuřecích embryí. Byla úspěšně zpracována a opakovaně ověřena metodika pro úspěšnou infekci embryí druhů *C. baileyi* a *C. parvum*.

## SUMMARY

The subject of this thesis is the study of the occurrence and diversity of cryptosporidia infecting birds. During the study, 4,740 bird faecal samples from 25 orders and 176 genera from 9 countries, namely 2,928 samples from the Czech Republic, 301 from Slovakia, 732 from Croatia, 25 from Poland, 90 from South Africa, 238 from New Zealand, 11 from the United Arab Emirates, 345 from Algeria and 70 from the USA, were obtained and examined using microscopic and molecular methods. Cryptosporidium-specific DNA was detected at loci of genes encoding small subunit rRNA (SSU), actin, heat shock protein (HSP70), thrombospondin-related adhesive protein (TRAP-C1), *Cryptosporidium* oocyst wall protein (COWP) and 60 kDa glycoprotein (gp60) in 255 (5.4 %) cases. Phylogenetic analyses revealed the presence of 11 species and 6 genotypes of *Cryptosporidium*. The most frequently detected species were *C. baileyi* (65/4,740; 1.4 %), *C. proventriculi* (35/4,740; 0.7%) and *Cryptosporidium* sp. goose genotype Id (33/4,740; 0.7%). In contrast, *Cryptosporidium* sp. avian genotype I was the least frequently detected (2/4,740; 0.04%). Based on phylogenetic and experimental studies, one new genotype, *Cryptosporidium* avian genotype VI, was described from the red-winged blackbird, and three new species, *C. avium* from the red-fronted parakeet, *C. proventriculi* from the red-fronted parrot and *C. ornithophilus* from the ostrich. The oocyst size of all newly described species differed from each other. Oocysts of *C. avium* measured  $6.3 \times 4.9 \mu\text{m}$ , *C. proventriculi*  $7.4 \times 5.7 \mu\text{m}$  and *C. ornithophilus*  $6.1 \times 5.2 \mu\text{m}$ . Tissue specificity studies showed the development of *C. avium* in the small intestine and caecum but also in the kidney and ureters. Developmental stages of *C. proventriculi* were found in the proventriculus and ventriculus. *Cryptosporidium ornithophilus* infected the caecum and colon together with bursae of Fabricius. *Cryptosporidium avium*, obtained from parrots, was infectious to the domestic chicken belonging to the order Galliformes, the domestic duck belonging to the order Anseriformes, but surprisingly non-infectious to the common pheasant. The species *C. proventriculi* was infectious to the cockatiel of the order

Psittaciformes, but not to the budgerigar, which also belongs to the order Psittaciformes. The domestic chicken was susceptible to infection by *C. ornithophilus* under experimental conditions. Neither of the above-mentioned *Cryptosporidium* species was infective to laboratory mice of the SCID and BALB/c strains. The results of our studies have greatly increased our knowledge of the age specificity and infection course of different species and genotypes of cryptosporidia parasitizing birds. *Cryptosporidium avium* is one of the cryptosporidial species that have been shown to transmit the parasite to the host at all ages in selected groups of birds. In case of *Cryptosporidium ornithophilus*, based on our experiments, we found a shorter prepatent period in younger individuals than in adults, which may be less susceptible to infection because of previous cryptosporidial infection. During our experiments, we did not observe any clinical signs in birds infected with *C. avium*, *C. proventriculi* and *C. ornithophilus* species. Finally, this thesis has been extended to include research on *Cryptosporidium* cultivation using chicken embryos. A methodology for successful infection of embryos with *C. baileyi* and *C. parvum* species was successfully developed and repeatedly validated.

# ÚVOD

Miliony let trvající vývoj ptáků směřoval zřejmě k jednomu cíli, a to k ovládnutí vzdušného prostoru. Postupem času určité skupiny ptáků z rozličných důvodů schopnost létat ztratily. Někteří ptáci dorostli takových rozměrů, že jejich obrovská těla by svaly křídel nemohly unést (pštros dvouprstý (*Struthio camelus*)), mořští ptáci se specializovali na lov potravy pod hladinou a jejich tělo se zdokonalovalo v plavání, zatímco na souši si vystačili jen s pomalou a kolébatou chůzí a létat vůbec nepotřebovali (tučňáci – Sphenisciformes). Další ptáci se schopnosti létat "dobrovolně" vzdali (kiviové (*Apterygiformes*), papoušek zemní (*Pezoporus wallicus*) a kakapo soví (*Strigops habroptila*)), protože ji v životě nepotřebovali a neuplatňovali. Vývoj některých ptáků probíhal na jednom místě, často na izolovaných ostrovech nebo v nedostupných oblastech, poskytujících dostatek potravy a spolu s nimi se vyvíjeli i jejich paraziti. Naopak jiní ptáci díky své schopnosti migrovat na velké vzdálenosti mohli přenášet různé patogeny z jedné oblasti do druhé a představovat tak potenciální zdroj infekce pro další ptačí druhy, ale i člověka a jím chovaná zvířata (Ryan et al. 2014, Nakamura et Meireles 2015).

Paraziti rodu *Cryptosporidium* jsou nejčastější původci parazitárních onemocnění volně žijících, v zajetí a hospodářsky chovaných ptáků (O'Donoghue 1995, Sréter et Varga 2000). Vzhledem k omezenému množství studií provedených na ptačích hostitelích, zůstává mnoho otázek nezodpovězených. Mezi základní otázky patří **i)** je druhová diverzita ptačích kryptosporidií obdobná té, kterou známe u kryptosporidií savců, **ii)** jsou ptačí kryptosporidie hostitelsky, věkově a tkáňově specifické, **iii)** jaká je patogenita a průběh infekce ptačích kryptosporidií nebo **iv)** mohou být ptáci hostitelé savčích kryptosporidií?

Počet druhů ptáků výrazně převyšuje počet zástupců třídy savců, u nichž byla popsána velká diverzita kryptosporidií, nicméně bylo dosud popsáno pouze 6 platných druhů ptačích kryptosporidií, z nichž 3 (tučně zvýrazněno) byly popsány v rámci této práce: *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin 1955), *Cryptosporidium baileyi* (Current et al. 1986), *Cryptosporidium galli* (Pavlásek 1999, Ryan et al. 2003b), ***Cryptosporidium avium*** (Holubová et al. 2016), ***Cryptosporidium proventriculi*** (Holubová et al. 2019) a ***Cryptosporidium ornithophilus*** (Holubová et al. 2020) a 20 genotypů, o kterých nemáme dostatek údajů, aby bylo možné je označit za samostatné druhy. Tato disertační práce výrazně rozšiřuje přehled o kryptosporidiích specifických pro ptáky, zaměřuje se na jejich výskyt a diverzitu v rámci 25 řádů a 176 čeledí, morfologii vývojových stadií, hostitelskou a orgánovou specifitu, patogenitu a přenos.

## CÍL PRÁCE

Cílem této práce je studovat výskyt, diverzitu a biologii ptačích kryptosporidií u vybraných skupin ptáků.

Následující konkrétní dílčí cíle představují jednotlivé kroky výzkumu nezbytné pro dosažení hlavního cíle:

- Vyhodnotit výskyt a prevalenci kryptosporidiových infekcí u volně žijících ptáků, u ptáků ze zoologických zahrad, v chovech exotického ptactva, na různých ptačích farmách a u pernaté zvěře chované mysliveckými spolky.
- Prokázat hostitelskou specifitu a infektivitu různých druhů a genotypů kryptosporidií pomocí experimentálních infekcí.
- Popsat biologii získaných druhů a genotypů kryptosporidií, zejména průběh infekce, patogenitu a lokalizaci vývojového cyklu včetně popisu vývojových stádií.
- Popsat diverzitu kryptosporidií ptáků pomocí multilokusové genotypizace a fylogenetických analýz.

## SHRNUTÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE

**Všechny dosažené výsledky (obrázky, grafy, tabulky), použitý materiál a metody je možno nalézt v disertační práci a publikacích v ní přiložených.**

Paraziti rodu *Cryptosporidium* jsou nejčastější původci parazitárních onemocnění volně žijících, v zajetí a hospodářsky chovaných ptáků (O'Donoghue 1995, Sréter et Varga 2000).

Počet druhů ptáků výrazně převyšuje počet zástupců třídy savců, u nichž byla popsána velká diverzita kryptosporidií, nicméně bylo dosud popsáno pouze 6 platných druhů ptačích kryptosporidií: *Cryptosporidium meleagridis* (Slavin 1955), *Cryptosporidium baileyi* (Current et al. 1986), *Cryptosporidium galli* (Pavlásek 1999, Ryan et al. 2003b), *Cryptosporidium avium* (Holubová et al. 2016), *Cryptosporidium proventriculi* (Holubová et al. 2019) a *Cryptosporidium ornithophilus* (Holubová et al. 2020) a 20 genotypů, o kterých nemáme dostatek údajů, aby bylo možné je označit za samostatné druhy. Kromě hostitelsky specifických kryptosporidií byly u ptáků nalezeny i druhy, které jsou typické pro savce (*C. andersoni*, *C. canis*, *C. hominis*, *C. muris* a *C. parvum*). Tyto případy můžeme vysvětlit náhodným pozřením oocyst a u ptáků byla zachycena pouze pasáž (Fayer et al. 2001, Xiao et al. 2007).

### Výskyt a diverzita ptačích kryptosporidií

V rámci doktorského studia bylo získáno a vyšetřeno 4740 vzorků trusu ptáků z 25 řádů a 176 rodů z 9 zemí. Z toho 2928 vzorků pocházelo z České republiky, 301 ze Slovenska, 732 z Chorvatska, 25 z Polska, 90 z Jihoafrické republiky, 238 z Nového Zélandu, 11 ze Spojených arabských emirátů, 345 z Alžírsko a 70 z USA. Celkový počet pozitivních vzorků ptáků na kryptosporidie byl 255 (5,4 %). Tento výsledek odpovídá průměrné promořenosti volně žijících ptáků 3,96 % (1945/49129, 95 % CI: 3,79–4,13; Wang et al. 2021).

Procento infikovaných ptáků se napříč různými studiemi a věkovými kategoriemi pohybuje od 0 do 100 % (Curtis et al. 2015, Iijima et al. 2018, Wang et al. 2021). Velký rozptyl jak v publikovaných, tak našich výsledcích může být ovlivněn řadou faktorů. Častou příčinou může být způsob výpočtu prevalence z různě velkých skupin vyšetřovaných jedinců. Poměrně často jsou publikovány výsledky, které jsou získány pouze z malého vzorku jedinců, někdy pouze z jednoho jedince (Nakagun et al. 2017, Oliveira et al. 2017b, Seixas et al. 2019). Také výpočet prevalence z již předem vybrané skupiny, například ptáků trpících klinickým onemocněním,

výrazným způsobem zkresluje výsledky (Curtis et al. 2015, Makino et al. 2018). Této chybě jsme se v naší práci snažili vyhnout, i když z některých zástupců se nám nepodařilo získat reprezentativní počet vzorků.

Druhým, velmi důležitým faktorem je hostitelská specifita jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií. V rámci námi provedených studií jsme nejčastěji detekovali *C. baileyi* (65/4740; 1,4 %), *C. proventriculi* (35/4740; 0,7 %) a *Cryptosporidium* sp. goose genotyp Id (33/4740; 0,7 %). Naopak nejméně často byl detekován *Cryptosporidium* sp. avian genotyp I (2/4740; 0,04 %). Přehled všech nalezených druhů a genotypů je přehledně popsán v Tabulce 5, která je součástí disertační práce (kapitola 4.1). Zatímco druh *C. baileyi*, který byl v rámci našich studií detekován u 15 druhů ptáků patřících do 13 rodů v rámci 9 čeledí ze 7 řádů (hrabavých, měkkozobých, papoušků, pěvců, pštrosů, vrubozobých a sokolů) a celosvětově dále také u dravců a sov (např. Nakamura et al. 2009, Ng et al. 2006, Wang et al. 2021), *Cryptosporidium* sp. avian genotyp I se zdá být hostitelsky adaptován pouze na kanára divokého (*Serinus canaria*), což se shoduje jak s našimi výsledky práce, tak se studii ve světě (např. Camargo et al. 2018, Ng et al. 2006). Obdobně tomu je u *Cryptosporidium* avian genotypu VI, který byl nalezen v rámci této práce pouze u vlhvců červenokřídlých (*Agelaius phoeniceus*) (Chelladurai et al. 2016). U kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) jsme popsali izolát, který nebyl doposud popsán a v brzké době bude opublikován jako nový ptačí genotyp.

## **Biologická a molekulární charakterizace nových druhů a genotypů kryptosporidií.**

### **Morfologie a morfometrie oocyst ptačích kryptosporidií**

Ačkoli morfologie a morfometrie oocyst je jednou ze základních podmínek pro popis nového druhu, nejsou tyto údaje spolehlivým diagnostickým znakem a pro identifikaci druhu, případně genotypu kryptosporidií je nezbytná molekulární charakterizace. Mikroskopicky je od sebe možné odlišit druhy parazitující v žaludku, které mají obecně větší, oválné oocysty, od druhů s vývojem ve střevě, které mají menší okrouhlé oocysty. Také v rámci jednotlivých fylogenetických linií existují významné rozdíly. Oocysty *C. galli* (žaludeční druh) jsou mnohem větší než oocysty střevního druhu *C. ornithophilus*, ale v rámci střevních kryptosporidií nelze od sebe odlišit oocysty *C. ornithophilus*, *C. avium* a *C. baileyi* (Holubová et al. 2021). *Cryptosporidium meleagridis* má morfometricky identické oocysty s druhem *C. parvum*, za který bylo často v minulosti zaměňováno a který byl v několika případech u ptáků detekován (např. Graczyk et al. 1998, Nakamura et al. 2009, Oliveira et al. 2017).

Přestože je velikost oocyst *C. meleagridis* výrazně menší než u ostatních ptačích kryptosporidií parazitujících ve střevě, skutečné využití rozdílů mezi druhy při jejich diferenciaci je velmi omezené. Obdobně je tomu i u v rámci linie žaludečních kryptosporidií. Oocysty *C. galli* mohou být zaměněny s oocystami *Cryptosporidium* avian genotyp IV a *Cryptosporidium* Eurasian woodcock genotyp. Přestože všechny zmíněné kryptosporidie mají oocysty větší než *C. proventriculi*, rozdíl ve velikosti není prakticky využitelný pro rozlišení pomocí světelné mikroskopie.

### ***Cryptosporidium avium***

Oocysty *C. avium* pocházející z přirozeně infikovaných papoušků (kakariki rudočelý) byly morfometricky shodné s oocystami, které byly získány z experimentálně infikovaných slepic a které měřily 5,30–6,90  $\mu\text{m}$  (průměr = 6,26  $\mu\text{m}$ )  $\times$  4,30–5,50  $\mu\text{m}$  (průměr = 4,86  $\mu\text{m}$ ) a indexu tvaru 1,29 (1,14–1,47). Oocysty *C. avium* nelze morfometricky odlišit od oocyst dalších ptačích druhů a genotypů kryptosporidií jako například *C. baileyi* a *C. ornithophilus* (Holubová et al. 2016, Meireles et al. 2006, Ng et al. 2006, Qi et al. 2011).

### ***Cryptosporidium proventriculi***

Oocysty *C. proventriculi* jsou z hostitele vylučovány vysporulované a obsahují 4 sporozoity a reziduální tělísko. Velikost oocyst získaných z přirozeně infikovaných korel [6,70–8,40  $\mu\text{m}$  (průměr  $\pm$  SD = 7,35  $\pm$  0,41  $\mu\text{m}$ )  $\times$  5,10–6,30  $\mu\text{m}$  (průměr  $\pm$  SD = 5,70  $\pm$  0,32  $\mu\text{m}$ ) s poměrem mezi délkou a šířkou 1,08–1,41 (průměr  $\pm$  SD = 1,23  $\pm$  0,11)] se nelišila od oocyst získaných z experimentálně infikovaných korel, u kterých měřily oocysty 6,60–8,40  $\mu\text{m}$  (průměr  $\pm$  SD = 7,37  $\pm$  0,44  $\mu\text{m}$ )  $\times$  5,00–6,40  $\mu\text{m}$  (průměr  $\pm$  SD = 5,80  $\pm$  0,35  $\mu\text{m}$ ) s poměrem mezi délkou a šířkou 1,06–1,43 (průměr  $\pm$  SD = 1,25  $\pm$  0,10). Oocysty *C. proventriculi* jsou větší než oocysty *C. avium* a *C. baileyi* ( $P < 0,001$ ) a nepatrně menší než oocysty *C. galli* (Holubová et al. 2019).

### ***Cryptosporidium ornithophilus***

Oocysty z přirozeně infikovaných pštrosů měřily 5,24–6,77  $\mu\text{m}$  (průměr  $\pm$  SD = 6,13  $\pm$  0,35  $\mu\text{m}$ )  $\times$  4,68–5,5  $\mu\text{m}$  (průměr  $\pm$  SD = 5,15  $\pm$  0,24  $\mu\text{m}$ ) s poměrem délky k šířce 1,06–1,36 (průměr  $\pm$  SD = 1,19  $\pm$  0,08) a shodovaly se s velikostí oocyst získaných z experimentálně infikovaných kuřat, housat a korel. Velikost oocyst *C. ornithophilus* získaných v rámci disertační práce (6,1 $\times$ 5,1  $\mu\text{m}$ , Holubová et al. 2020) byla srovnatelná s výsledky uveřejněnými ve studiích Santos et al. (2005) a Meireles et al. (2006), v rámci nichž autoři zjistili velikost oocyst 6,0 $\times$ 4,8  $\mu\text{m}$ .

### Hostitelská a tkáňová specifita ptáčích kryptosporidií

Studie o průběhu kryptosporidiových infekcí a hostitelské a tkáňové specifitě jsou často chybějící části biologické charakteristiky kryptosporidií, a to nejenom u druhů infikujících ptáky (např. Fayer et Santín 2009, Kváč et al. 2018, Ryan et al. 2008, Zahedi et al. 2021).

Morfologie a morfometrie dalších stadií životního cyklu a variabilita v rámci životního cyklu (např. další vývojová stádia – merogonie), stejně jako určení predilekčního místa infekce může poskytnout cenné informace pro odlišení jednotlivých druhů (Holubová et al. 2020, Ježková et al. 2021). Tento přístup však vyžaduje velké úsilí zahrnující podrobné zkoumání každého hostitele z hlediska infikovaných tkání a následnou časově a finančně náročnou analýzu pomocí různých typů barvení, histologické zpracování tkání a elektronovou mikroskopii. Zmíněný přístup je pro běžnou diagnostiku nepraktický a dalo by se říct i nepoužitelný, ale pro popis nových druhů je tento postup nezbytný (Kváč et al. 2014, Ježková et al. 2021).

Výsledky řady studií provedených nejen na ptácích ukázaly, že jednotlivé druhy, a samozřejmě i genotypy kryptosporidií jsou charakterizovány úzkou tkáňovou specifitou. Vývoj příslušného druhu kryptosporidie je většinou vázán na jedno konkrétní predilekční místo infekce (Holubová et al. 2020, Kváč et al. 2014, 2018, Lindsay et al. 2010, Ryan et al. 1999). Znalost místa infekce spolu s morfologickou charakterizací oocyst může být velmi užitečná při determinaci druhu/genotypu. Nicméně lze najít řadu případů, kdy se morfologie oocyst a lokalizace infekce mezi jednotlivými druhy překrývá. Příkladem může být *C. ornithophilus*, které se vyskytuje ve slepém střevě ptáků stejně jako *C. avium* (Holubová et al. 2016, 2020). V tenkém střevě některých hlodavců, konkrétně v jejunu a ileu, byly lokalizovány druhy *C. ditrichi* a *C. alticolis* (Čondlová et al. 2018, Horčíčková et al. 2019). V tenkém střevě prasat lze nalézt *C. scrofarum* a *C. parvum* (Kváč et al. 2013, Li et al. 2013). V tlustém střevě potkanů se vyskytuje nejen *C. occultus*, ale výjimečně také *C. meleagridis* (Kimura et al. 2007, Kváč et al. 2013, 2018).

Na základě našich experimentů jsme určili tkáňovou specifitu u námi popsaných druhů. *Cryptosporidium ornithophilus* infikuje slepé a tlusté střevo spolu s Fabriciovou burzou, *C. avium* bylo nalezeno v tenkém a slepém střevě, ale také ledvinách a močovodech a *C. proventriculi* bylo nalezeno v proventrikulu a ventrikulu.

Další, neméně významnou biologickou vlastností jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií je jejich hostitelská specifita (Holubová et al. 2018, Li et al. 2016, Sréter et al. 2000, Widmer et al. 2020). Na základě experimentálních infekcí bylo prokázáno, že *C. avium*

získané z kakarikiho rudočelého patřícího do řádu papouškovitých, je infekční pro kur domácí (*Gallus gallus* f. *domestica*) z řádu hrabavých, kachnu domácí (*Anas platyrhynchos* f. *domestica*) patřící do řádu vrubozobých, ale překvapivě neinfekční pro bažanta obecného (*Phasianus colchicus*). Vnímavost kura domácího k infekci *C. avium* byla popsána již v roce 2014 u brojlerových kuřat v Číně (Wang 2014). Oproti druhu *C. meleagridis*, u kterého byla popsána infektivita pro savce včetně myši, potkanů, králíků, skotu a člověka (Cama et al. 2003, Darabus et Olariu 2003, Elwin et al. 2012, Pedraza-Díaz 2001, Xiao et Ryan 2004), nebyla infekce *C. avium* popsána u jiných než ptačích hostitelů. V případě *C. proventriculi* jsme na základě experimentů zjistili, že tento druh je infekční pro korelu chocholatou z řádu papoušků, nikoliv však andulku vlnkovanou, která také patří mezi papoušky. Dále *C. proventriculi*, které bylo detekováno u řady zástupců řádu papoušků, pěvců, šplhavců, a vrubozobých (Cano et al. 2016, Ferrari et al. 2018, Nakamura et al. 2014, Noaves et al. 2018), není infekční pro kuřata a SCID myši. Díky provedeným experimentům jsme dále zjistili, že *C. ornithophilus* není infekční pro savce (laboratorní myši s různým stupněm imunodeficiency), ale naopak je infekční pro husy a korely. Na rozdíl od studií Santos et al. (2005) a Meireles et al. (2006), se nám podařilo experimentálně přenést infekci *C. ornithophilus* na kuřata. Výsledky naší práce a dalších studií ukázaly, že *C. ornithophilus* infikuje celou řadu různých ptačích hostitelů různých řádů ptáků (např. Ng et al. 2006, Nguyen et al. 2013, Sevá et al. 2011). Tato širší hostitelská specifita je obdobná jako byla pozorována u fylogeneticky příbuzného druhu *C. avium*, ale podstatně menší, než je u *C. baileyi*, druhu, který je infekční pro většinu ptáků (např. Bermudez et al. 1988, Curtiss et al. 2015, Holubová et al. 2016).

Sledování hostitelské a s tím spojené tkáňové specifity je zatíženo několika potenciálními problémy. Na základě doporučení uvedených v literatuře, ale zejména na základě vlastních zkušeností je třeba přihlížet na stáří, podmínkám skladování a metodám zpracování oocyst, které mohou ovlivňovat jejich infekce schopnost a na imunitní stav a věk hostitele, které mohou významně ovlivnit výsledek experimentu (Fayer et Xiao 2007, Holubová et al. 2016, 2018, Kváč et al. 2013, 2016). Ideální je používat čerstvé, nanejvýš však dva měsíce staré oocysty, které jsou skladovány při teplotě 4–8 °C (Horčíčková et al. 2018, Ježková et al. 2021, Kváč et al. 2018). Imunosuprimovaní a imunodeficitní jedinci, jsou více vnímaví k infekci kryptosporidií, ale prepatentní perioda může být výrazně prodloužena (Kváč et al. 2011). Tento fenomén je třeba brát v úvahu, aby nedošlo k předčasnému ukončení experimentu (Kváč et al. 2008). Také jedinci, kteří se již v minulosti setkali s kryptosporidiovou infekcí mohou být k následné infekci rezistentní nebo méně vnímaví, což

se může projevit nižší intenzitou infekce a délkou prepatentní a patentní periody (Jalovecká et al. 2010). Toto je třeba brát do úvahy, zejména v případech, kdy jsou pro experimentální infekce používána zvířata z konvenčních chovů nebo odchycená ve volné přírodě.

### **Variabilita věkové specifity ptačích kryptosporidií**

Existuje jen málo studií, které se přímo zabývaly věkovou specifitou kryptosporidií ptáků, a proto jsme se na toto téma zaměřili. Mnoho hostitelů vykazuje v průběhu ontogeneze změny v citlivosti vůči infekčním agens. U zástupců rodu *Cryptosporidium* byly popsány tři typy vztahů mezi hostitelem a parazitem v závislosti na věku (Kváč et al. 2014c).

#### **1. Vnímavost parazita není závislá na věku hostitele. Příkladem jsou:**

- *Cryptosporidium andersoni* – jsou vnímavé všechny věkové kategorie skotu (Kváč et al. 2014c).
- *Cryptosporidium baileyi* – byla úspěšně infikována kuřata v různém věku (Sréter et al. 1995, Sréter et Varga 2000).

#### **2. K infekci jsou vnímaví pouze mladí jedinci.**

- Laboratorní myši BALB/c a telata se nakazí *C. parvum* pouze v juvenilním věku (Santín et al. 2004, Fayer et al. 2006, 2007), dospělí jedinci těchto hostitelů jsou k infekci vnímaví výjimečně.
- *Cryptosporidium galli* je infekční pro 9denní, ale ne pro 40denní kuřata (Pavlásek 2001).

#### **3. K infekci dojde až od určitého věku hostitele.**

- *Cryptosporidium scrofarum* je infekční pro prasata starší 5 týdnů (Kváč et al. 2014c)

Průběh infekce, včetně prepatentní a patentní periody, byl do současné doby znám pouze u čtyř platných ptačích druhů (Current et al. 1986, Holubová et al. 2016, Ryan et al. 2003b, Slavin 1955). Výsledky našich studií výrazným způsobem rozšířily znalosti o věkové specifitě a průběhu infekce u několika dalších druhů a genotypů kryptosporidií parazitujících u ptáků.

*Cryptosporidium avium* patří mezi druhy kryptosporidií, u kterých je prokázán přenos parazita na hostitele u všech věkových kategorií vybraných skupin ptáků (přílohy II. a IV. disertační práce). Prepatentní perioda *C. avium* u kachen domácích (4–6 dní) je podobná prepatentní periodě *C. baileyi* a *C. meleagridis* (4–8 dní; Hornok et al. 1998, Lindsay et al. 1988, Tůmová et al. 2002). Sréter et al. (1995, 2000) popsali vliv věku kuřat na průběh infekce *C. baileyi*. Výsledky jejich studií ukázaly, že prepatentní perioda *C. baileyi* je značně kratší u 9denních než u 1denních kuřat. Současně pozorovali delší patentní periodu u

mladších kuřat. Protože druh *C. avium* je fylogeneticky blízce příbuzný právě *C. baileyi*, mohli bychom očekávat obdobný průběh infekce. Tato hypotéza nebyla v naší studii potvrzena. Experimentálně jsme neprokázali vliv věku na délku prepatentní a patentní periody u infekcí způsobených druhem *C. avium*. Přestože ptáci během experimentu vylučovali jen malé množství oocyst, délka infekce trvala po celou dobu experimentu nezávisle na věku zvířat. Lze předpokládat, že námi vyvolané infekce by pokračovaly v chronické formě několik měsíců. Toto tvrzení opíráme o fakt, že kakariki rudočelý, z kterého byl získán izolát pro naši studii vylučoval oocysty *C. avium* více než 5 měsíců (Holubová et al. 2016). Taktéž byla zjištěna infekce vyvolaná *C. avium* u 7letého kakadu inka (*Lophochroa leadbeateri*) (Curtiss et al. 2015), což podporuje tvrzení, že i starší jedinec se může tímto parazitem nakazit.

U *C. ornithophilus* jsme na základě námi provedených experimentů zjistili kratší prepatentní periodu u mladších jedinců (juvenilní jedinci měli prepatentní periodu od 4 do 8 DPI) než u dospělých (specifickou DNA začali vylučovat až od 8 DPI), kteří mohou být k infekci méně citliví z důvodů již prodělané kryptosporidiové infekce. *Cryptosporidium ornithophilus* se vyskytuje převážně u mladších jedinců, což potvrzuje nález tohoto druhu převážně u kuřat (Nguyen et al. 2013, Wang et al. 2011) a můžeme předpokládat, že nepřítomnost oocyst *C. ornithophilus* u starších pštrosů by mohla být vysvětlena rezistencí související s věkem. Obdobný fenomén byl popsán u různých hostitelů infikovaných *C. baileyi*, *C. muris* nebo *C. andersoni* (např. Kváč et al. 2009, Lindsay et Blagburn 1990).

Délka prepatentní periody *C. proventriculi* (6 DPI) byla podobná druhům *C. meleagridis* a *C. baileyi*, které infikují střevo (4–8 dnů; Hornok et al. 1999, Lindsay et al. 1988, Rhee et al. 1991, Tůmová et al. 2002), a zároveň kratší než 25 dnů, kterou popsal Pavlásek (2001) u kuřat infikovaných *C. galli*. Na základě mikroskopického, histologického a molekulárního vyšetření gastrointestinálního traktu bylo zjištěno, že SCID myši, andulky vlnkované a kuřata nejsou vnímavá k infekci *C. proventriculi* (Holubová et al. 2019).

### **Patogenita ptačích kryptosporidií**

Patogenita kryptosporidií infikujících ptáky, ale také savce, je velmi variabilní. Na základě provedených experimentů jsme zjistili patogenitu u námi popsaných druhů. Žaludeční kryptosporidie u savců nezpůsobují do takové míry poškození žaludku či úhyn hostitele jako například ptačí kryptosporidie *C. galli*, pro kterou je typický výskyt klinického onemocnění s vysokým procentem úmrtnosti (např. Blagburn et al 1987, Morganetal 2001). Mezi známé

klinické příznaky *C. galli* patří průjem, apatie, ztráta hmotnosti (např. Antunes et al. 2008, Lindsay et al. 1991, Pávlásek 1999, 2001).

V rámci této práce jsme studovali žaludeční druh *C. proventriculi*, který je jediným popisem žaludeční kryptosporidie, která byla detekována jak ve žláznatém, tak i svalnatém žaludku. Během našich experimentů jsme nezaznamenali žádné klinické příznaky u infikovaných ptáků. Makino et al. (2010) popsal chronické zvracení spojené s úbytkem hmotnosti u hrdliček, které byly přirozeně infikované *C. proventriculi*. Histopatologické vyšetření uhynulých hrdliček ukázalo zvětšení proventrikulu a hyperplazii duktálního epitelu proventrikulárních žláz. Rozdíly v naší studii s jinými studiemi si můžeme vysvětlit tím, že zatímco naše pokusy trvaly pouze 30 dní, přirozeně infikovaní ptáci mohli být infikováni i několik měsíců. Podobně byly histopatologické změny a klinické příznaky pozorovány u savců chronicky infikovaných žaludečními druhy *C. proliferans*, *C. andersoni* nebo *C. muris* (např. Anderson 1987, Ozkul a Aydin 1994).

U zvířat infikovaných *C. ornithophilus* jsme nezaznamenali žádné klinické příznaky kryptosporidiózy, což je v souladu s dalšími studiemi (Ng et al. 2006, Merieles et al. 2006). V některých studiích je spojována infekce kryptosporidii pštrosích kuřat s výhřezy kloaky, enteritidy a pankreatitidy (Penrith et al. 1994, Ponce Gordo et al. 2002, Santos et al. 2005). Nicméně v těchto studiích nebyla provedena genotypizace a nelze tedy s jistotou tvrdit, že se jednalo o infekci způsobenou *C. ornithophilus*.

Většina ptáků infikovaných *C. avium*, kteří byli vyšetřeni v rámci této práce, ale i ve světě, včetně experimentálně infikovaných slepic a andulek, nevykazovala žádné klinické příznaky kryptosporidiózy (Ng et al. 2006). Curtis et al. (2015) popsal kryptosporidiózu způsobenou *C. avium* u 7letého kakadu inka (*Lophochroa leadbeateri*), který vykazoval příznaky letargie, anorexii a kloakální prolaps.

### **Molekulární diagnostika kryptosporidií**

Diagnostika kryptosporidií založená na molekulární detekci je ve srovnání s mikroskopickým vyšetřením senzitivnější (Kváč et al. 2014b, Xiao 2010). Udávaná citlivost se nejčastěji pohybuje od 1 až 10 oocyst v analyzovaném vzorku (Kváč 2008, Smith et al. 2006, Thompson et Ash 2016). Hlavní výhodou molekulárních metod je možnost spolehlivě odlišit jednotlivé druhy, genotypy a subtypy kryptosporidií. Další výhodou je možnost izolovat DNA téměř z jakéhokoliv materiálu (např. Enemark et al. 2002, Plutzer et Karanis 2007). Ale i molekulární metody mají svá úskalí. Většina všech dnes známých druhů a

genotypů je charakterizována na základě odlišnosti SSU. Nicméně použití pouze sekvencí SSU k odvození evolučních vztahů kryptosporidií může vést k chybným závěrům (Ježková et al. 2021, Li et al. 2014, Stenger et al. 2015). Proto je nutné při fylogenetických analýzách používat i další lokusy, jako jsou geny kódující aktin, HSP70, TRAP-C1, COWP a gp60 (Morgan-Ryan et al. 2001, Tang et al. 2016). Zjištění vnitrodruhové variability nebo smíšené infekce vyžaduje **i)** opakované sekvenování produktů PCR, **ii)** klonování produktů PCR s následným sekvenováním nebo **iii)** sekvenování nové generace (Grinberg et al. 2013, Papparini et al. 2015, Stenger et al. 2015). Běžně je používáno Sangerovo sekvenování, ale omezením tohoto přístupu je, že smíšené infekce nejsou obvykle detekovány kvůli nízké intenzitě infekce jednoho nebo více druhů a genotypů kryptosporidií oproti vysoké intenzitě infekce dominantního druhu/genotypu ve vzorku (Grinberg et al. 2013).

Z výše uvedených důvodů byly všechny námi provedené studie založené na multilokusové genotypizaci. Vždy byla provedena genotypizace na lokusech kódujících SSU, aktin, HSP70, COWP, TRAP-C1 a gp60. V případě, že nebylo možné amplifikovat vybraný lokus pomocí běžně používaných sad primerů, byly navrženy vlastní primery (Chelladurai et al. 2016). Pro popis nového druhu kryptosporidie byly vždy sekvenovány minimálně tři geny.

## **Model kuřecích embryí pro pomnožení oocyst *Cryptosporidium parvum* a *Cryptosporidium baileyi***

V současné době neexistuje postup, jak dokončit vývojový cyklus kryptosporidií v *in vitro* podmínkách a všechny vědecké týmy ve světě jsou odkázány na získávání parazitů z přirozeně nebo experimentálně infikovaných zvířat (Arrowood 2002). Žádná „úspěšná“ *in vitro* kultivace kryptosporidií nebyla totiž doposud úspěšně zopakována a implementována do běžné laboratorní praxe. V současné době lze k vědeckým účelům využít pouze tři druhy kryptosporidií, *C. parvum*, *C. hominis* a *C. muris*, které jsou komerčně dostupné (Vinayak et al. 2015, Wanyiri et Ward 2006a). Vzhledem k tomu, že většina kryptosporidií je úzce hostitelsky specifická, je *in vivo* udržování jednotlivých druhů a genotypů kryptosporidií technicky, ekonomicky a biologicky velmi náročné (Kváč et al. 2014b, Li et al. 2015b). Pokud bychom chtěli pracovat pouze s druhy a genotypy kryptosporidií, které jsou infekční pro člověka (Ortega et Kváč 2013), znamenalo by to získávat oocysty z celé řady různých hostitelů, jako jsou skot, ovce, koně, prasata, králíci, myši, myšice, hraboši, potkani, veverky, ježci nebo drůbež (Ježková et al. 2021, Kváč et al. 2013, 2018, Laamamna et al. 2018), což je finančně a technicky velmi náročné. Navíc u těchto hostitelů jsou infekce často

asymptomatické s velmi nízkou produkcí oocyst (Holubová et al. 2016, Horčíčková et al. 2018, Kváč et al. 2013a,b, Němejce et al. 2013).

V roce 2014 byl zveřejněn článek o úspěšném pomnožení *C. baileyi* (druh hostitelsky specifický pro ptáky) v embryích kura domácího (Huang et al. 2014). Nezodpovězenou a neotestovanou otázkou zůstávalo, zda jsou ptáci, respektive jejich embrya vnímavá k infekci hostitelsky nespecifickými druhy a genotypy kryptosporidií. V řadě epidemiologických studií byly u ptáků v malém procentu případů detekovány savčí druhy a genotypy kryptosporidií (Ferrari et al. 2018, Helmy et al. 2017, Ng et al. 2006, Santín et al. 2004, Zylan et al. 2008). Výsledky Huanga et al. (2014) nás inspirovali k výzkumu zaměřenému na kultivaci kryptosporidií pomocí kuřecích embryí. Naším cílem bylo zjistit, do jaké míry může infekce ve stádiu embrya zvýšit množení oocyst kryptosporidií u kuřat. Imunita ptáků je v podstatě analogická se systémem savců (Chen et al. 2013, Juul-Madsen et al. 2014, Kaiser 2010, Zhang et al. 2004). Embryo může být ve vajíčku chráněno pouze pasivní imunitou, která souvisí s mateřskými protilátkami, které jsou přenášeny na potomstvo vaječným žloutkem z imunních matek (Toman 2009). B-buňky se vyvíjejí mezi 7.–14. dnem inkubace a od 15. dne kolonizují sekundární lymfatické orgány. T-buňky, vyvíjející se v brzlíku a které jsou zásadní pro úspěšné zvládnutí kryptosporidiové infekce, opouštějí brzlík 2–3 dny před vylíhnutím (Jílek 2014, Toman 2009). Právě tento fakt spolu s možností získávat násadová vejce od zdravých nosnic dělá z vajec, respektive embryí v nich, potenciálně ideální inkubátor pro kultivaci kryptosporidií.

Pro výzkum jsme použili dva druhy kryptosporidií, a to *C. baileyi* a *C. parvum*, které byly inokulovány do alantoisu devátý den inkubace kuřecích embryí a perorálně do jednodenních kuřat. Výsledky experimentu ukázaly, že:

- Velikost infekční dávky nemá vliv na průběh infekce ani u embryí, ani u jednodenních kuřat.
- Kuřata infikovaná jako jednodenní vylučovala významně méně oocyst než kuřata infikovaná jako embrya.
- U všech kuřat, která byla infikována jako embrya druhem *C. baileyi* byla specifická DNA této kryptosporidie detekována po vylíhnutí ve všech vyšetřovaných orgánech vyjma mozku. Během šesti dnů po vylíhnutí došlo k vymizení infekce z ledvin, jater, předžaludku a žaludku. Ostatní orgány zůstaly pozitivní až do konce experimentu.
- U kuřat infikovaných *C. baileyi* ve věku jednoho dne po vylíhnutí byla infekce detekována pouze v průdušnici, jícnu, dvanáctníku a jejunoileu.

- U kuřat infikovaných druhem *C. parvum* ve věku jednoho dne po vylíhnutí se infekce rozvinula pouze v tenkém střevě.
- U kuřat infikovaných stejným druhem kryptosporidie ve fázi embrya došlo k rozvoji infekce i v průdušnici, slepém a tlustém střevě a kloace.
- Kuřata infikovaná *C. baileyi* jako embrya uhynula do 16 dnů po vylíhnutí. Všechna ostatní kuřata se z infekce samovyléčila.
- Byla zpracována a opakovaně ověřena metodika pro úspěšnou infekci embryí kryptosporidii, jejichž podrobný popis je součástí disertační práce.

## ZÁVĚRY

### **Detekce kryptosporidií vyskytujících se u ptáků pomocí molekulárních metod.**

- Byly detekovány všechny známé ptačí druhy kryptosporidií, kdy nejčastěji detekovaným druhem bylo *Cryptosporidium baileyi* a *C. proventriculi*. Z více jak 20 známých ptačích genotypů bylo detekováno 6 genotypů, z nichž nejvíce zastoupeným genotypem byl *Cryptosporidium* sp. goose genotyp Id a naopak nejméně často byl detekován *Cryptosporidium* sp. avian genotyp I.
- Kromě hostitelsky specifických kryptosporidií byly u ptáků nalezeny i druhy, které jsou typické pro savce (*C. andersoni*, *C. canis*, *C. hominis*, *C. muris* a *C. parvum*).

### **Biologická a molekulární charakterizace nových druhů a genotypů kryptosporidií**

- Byly popsány tři nové ptačí druhy kryptosporidií: *Cryptosporidium avium* sp. n., *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. a *Cryptosporidium ornithophilus* sp. n., a dva nové genotypy, z nichž *Cryptosporidium* avian genotyp VI byl v rámci této práce již publikován a genotyp nalezený u kachny divoké bude předmětem dalšího bádání.
- V rámci popisu druhu byla popsána morfologie a morfometrie oocyst, hostitelská a tkáňová specifita a patogenita.
- Kryptosporidiové infekce ptáků nejsou většinou provázeny klinickými příznaky onemocnění.

### **Kultivace kryptosporidií pomocí kuřecích embryí**

- Kuřecí embrya jsou vnímavá k infekci střevními kryptosporidii, *C. baileyi* specifickým pro ptáky a *C. parvum*, které je jen omezeně infekční pro ptáky v

postnatální fázi vývoje. Byla zavedena metoda kultivace *C. parvum* a *C. baileyi* v kuřecích embryích s mnohonásobně vyšší výtěžností oocyst než u jiných, dosud používaných metod.