

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

## **Výskyt potenciálních původců parazitárních zoonóz na Svalbardu**

Bakalářská práce

Autor: Lucie Honsová

Vedoucí práce: doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Datum odevzdání: 3.5.2012

**Annotation:**

**The incidence of potential agents of parasitic zoonoses in Svalbard**

In my thesis I have studied the occurrence of selected parasitic zoonoses in terrestrial vertebrates on Svalbard. Parasitic examination was focused on ascertaining of the presence of cryptosporidia, microsporidia and giardia. There were 87 samples of excrements of 12 animal species.

In Svalbard, only 3 species of terrestrial mammals occur. Originally there were only the svalbard reindeer (*Rangifer tarandus platyrhynchus*) and the arctic fox (*Alopex lagopus*). In the first half of the 20<sup>th</sup> century east european vole (*Microtus levis*) has been introduced there probably from Russia – region of Petersburg. In this archipelago there can be found different birds species in summer and the only one who winter there is the rock ptarmigan (*Lagopus muta*).

The samples were analyzed by microscopy of stained smears and by molecular methods. For microscopic examination the staining by Miláček – Vítovec was used to find out the presence of oocysts of cryptosporidia in animal excrements. The molecular diagnostics of cryptosporidia, microsporidia and giardia was done using the polymerase chain reaction (PCR). The positive detection was followed by the sequential analyses which proved the presence of cryptosporidia: *C. parvum* in *Anser brachyrhynchus*, *Cryptosporidium* goose genotype II in *Branta leucopsis* and *C. muris* TS 03 in *Rangifer tarandus platyrhynchus*. Also the presence of *Encephalitozoon. cuniculi* genotype II in three samples of *Rangifer tarandus platyrhynchus*, one sample of *Alopex lagopus* and one sample of *Branta leucopsis* was proved. Another recognized kind of microsporidia was *Enterocytozoon bieneusi* in *Rangifer tarandus platyrhynchus* and *Anser brachyrhynchus*. Both findings present new genotypes of microsporidia.

These findings proved that the extreme conditions of high Arctic on Svalbard enable spreading of intestinal unicellular parasites, cryptosporidia and microsporidia.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 .....

.....

Podpis studenta

**Poděkování:**

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc. Za nasbírání materiálu na Svalbardu a cenné rady při tvorbě této práce. Velké poděkování také patří kolektivu Laboratoře oportunních parazitů PaÚ BC AV ČR v Českých Budějovicích za ochotu a vytvoření příjemných pracovních podmínek při výzkumu. V neposlední řadě děkuji i mému příteli a své rodině za podporu během studia.

## Obsah:

Úvod.....	7
1. Současný stav .....	8
1.1. Kryptosporidie .....	8
1.1.1. Taxonomie .....	8
1.1.2. Vývojový cyklus .....	10
1.1.3. Historie.....	11
1.1.4. Kryptosporidióza .....	12
1.1.5. Cesty přenosu.....	12
1.1.6. Výskyt v arktických oblastech.....	13
1.2. Mikrosporidie .....	14
1.2.1. Taxonomie .....	14
1.2.2. Historie.....	14
1.2.3. Vývojový cyklus .....	15
1.2.4. Mikrosporidióza.....	16
1.2.5. Epidemiologie .....	17
1.2.6. Výskyt v arktických oblastech.....	18
1.3. Giardia .....	18
1.3.1. Taxonomie .....	18
1.3.2. Vývojový cyklus .....	19
1.3.3. Hostitelská specifita.....	19
1.3.4. Giardióza.....	20
1.3.5. Cesty přenosu.....	21
1.3.6. Výskyt v arktických oblastech.....	22
2. Cíl práce a hypotézy .....	23
2.1. Cíl práce.....	23
2.2. Hypotézy.....	23
3. Materiál a metodika .....	24
3.1. Vyšetřovaný materiál.....	24
3.1.1. Lokalita .....	24
3.1.2. Vyšetřovaná zvířata .....	25
3.2. Metody zpracování .....	31
3.2.1. Barvení podle Miláčka a Vítovce (1985).....	31

3.2.2.	Molekulární vyšetření trusu .....	32
4.	Výsledky.....	42
4.1.	Mikroskopické vyšetření trusu .....	42
4.1.1.	Výsledky vyšetření trusu dle Miláčka a Vítovce .....	42
4.2.	Molekulární vyšetření trusu.....	43
4.2.1.	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	43
4.2.2.	Vyhodnocení výsledků sekvenace a fylogenetické analýzy .....	43
5.	Diskuse .....	47
6.	Závěr.....	53
7.	Seznam použitých zdrojů .....	54
8.	Klíčová slova .....	77

## Úvod

O významném vlivu mnohých parazitárních infekcí z tropických oblastí na zdraví člověka toho bylo poměrně hodně publikováno. Avšak lékařsky a veterinárně důležití paraziti se nacházejí i v arktických oblastech, ze kterých je naopak informací o jejich výskytu velice málo. Přitom lov zvěře s nedostatečnou kontrolou masa nebo pití povrchové vody, která může být kontaminována výkaly infikované zvěře, představuje pro člověka riziko.

Touto prací jsem zjišťovala přítomnost jednobuněčných parazitů, kryptosporidií, mikrosporidií a giardií, v trusu divoce žijících zvířat z oblasti vysoké Arktidy.

## **1. Současný stav**

### ***1.1. Kryptosporidie***

#### ***1.1.1. Taxonomie***

Kryptosporidie patří mezi eukaryotické organismy říše prvoků, kmene Apicomplexa a třídy Cryptosporidia. Dříve se rod *Cryptosporidium* řadil ke kokcidiím, ale genová sekvenční analýza svědčí o větší podobnosti k hromadinkám také z kmene Apicomplexa (Carreno et al. 1999). Jde o jednobuněčné parazity, kteří infikují epitel gastrointestinálního a dýchacího traktu různých obratlovců, včetně člověka (O'Donoghue 1995). Infekce způsobené těmito parazity se vyskytují v celém světě. Podle přítomnosti vývojových stádií v hostiteli rozeznáváme kryptosporidie napadající epitel žaludečních žláz a kryptosporidie napadající enterocyty ve střevech. Některé druhy jsou patogenní a mohou vyvolat akutní nebo chronickou infekci, zatímco přítomnost některých druhů nemusí vyvolat žádné onemocnění. V současné době existuje 26 validních druhů rodu *Cryptosporidium* (Tab. 1). Původně se předpokládalo, že izoláty z jednoho druhu obratlovců, nemohou být infekční pro hostitele jiných druhů (Fayer et al. 1990), tedy že mají striktní hostitelskou specifitu. Tuto domněnku vyvrátily studie mezidruhových infekcí (Levine 1984).



Tab. 1: Validní druhy žaludečních a střevních kryptosporidií

ŽALUDEČNÍ KRYPTOSPORIDIE		
DRUH	HOSTITEL	AUTOŘI POPISU
<i>C. andersoni</i>	skot	Lindsay et al. 2000
<i>C. fragile</i>	obojživelníci	Jirků et al. 2008
<i>C. galli</i>	ptáci	Pavlásek 1999
<i>C. molnari</i>	ryby	Alvarez-Pellitero et Sitjá-Bonadilla 2002
<i>C. muris</i>	hlodavci	Tyzzler 1907
<i>C. serpentis</i>	plazi	Levine 1980
STŘEVNÍ KRYPTOSPORIDIE		
DRUH	HOSTITEL	AUTOŘI POPISU
<i>C. baileyi*</i>	drůbež	Current et al. 1986
<i>C. bovis</i>	skot	Fayer et al. 2005
<i>C. canis</i>	psi	Fayer et al. 2001
<i>C. cuniculus</i>	králíci	Inman et Takeuchi 1979
<i>C. ducismarci</i>	želvy	Traversa 2010
<i>C. fayeri</i>	klokani	Ryan et al. 2008
<i>C. felis</i>	kočky	Iseki 1979
<i>C. hominis</i>	člověk	Morgan-Ryan et al. 2002
<i>C. macropodum</i>	klokani	Power-Ryan et al. 2008
<i>C. meleagridis</i>	ptáci	Slavin 1995
<i>C. nasonis</i>	ryby	Hoover et al. 1981
<i>C. parvum</i>	savci	Tyzzler 1912
<i>C. ryanae</i>	skot	Fayer et al. 2008
<i>C. scophthalmi</i>	platýs	Alvarez-Pellitero et al. 2004
<i>C. suis</i>	prasata	Ryan et al. 2004
<i>C. tyzzleri</i>	myši	Ren et al. 2011
<i>C. ubiquitum</i>	skot	Fayer et al. 2010
<i>C. varanii</i>	plazi	Pavlásek et al. 1995
<i>C. wrairi</i>	morčata	Vetterling et al. 1971
<i>C. xiaoi</i>	ovce	Fayer et Santín 2009

\*infikuje gastrointestinální trakt, respirační trakt a kloaku

### 1.1.2. Vývojový cyklus

Primárním místem infekce pro *C. hominis*, *C. parvum* a další střevní kryptosporidie je tenké střevo. Žaludeční druhy jako *C. muris*, *C. andersoni* a *C. serpentis* napadají epitel žaludku. Zvláštním druhem je ptačí *Cryptosporidium baileyi*, jehož životní cyklus může probíhat v gastrointestinálním traktu, respiračním traktu nebo kloace. Kryptosporidie celý svůj životní cyklus, který se skládá z asexuální a sexuální fáze, absolvují v jednom hostiteli.

Endogenní cyklus začíná po pozření nebo dokonce po inhalaci oocyst. V organismu hostitele dojde k excystaci zralých oocyst. Z oocysty se uvolní infekční sporozoiti a adherují nejčastěji k epitelu tenkého střeva, ale mohou adherovat i k epitelu jiných orgánů. Sporozoiti jsou situováni v parazitární vakuole a mění se v trofozoity (= merozoity). Z trofozoitů vznikají po třech jaderných děleních meronti (schizonti). Tento proces se nazývá merogonie (schizogonie). U *C. parvum* rozlišujeme dva typy vzniklých merontů. První typ merontů vytváří 6-8 jader a z každého se vytváří merozoit. Ty dále napadají epiteliální buňky a šíří tím infekci. Tito merozoiti v nově infikovaných buňkách prodělají další merogonii typu I nebo se formují v meronty II. typu, kteří vytvářejí 4 merozoity. Pouze merozoiti II. typu jsou schopni se dále sexuálně rozmnožit gametogonií (gamontogonií), při které vzniknou gamonti (mikrogamonti a makrogamonti). Z mikrogamontů vznikají mikrogametocyty s 16 pohyblivými mikrogametami. Zralá mikrogameta poté oplodní makrogametu a tím vznikne zygota, která dále prodělá sporogonii. Při sporogonii se ve zralé oocystě vytvoří 4 sporozoiti. Mohou vzniknout dva typy oocyst. Většinou (80 %) jde o oocysty silnostěnné, které jsou výkaly uvolňovány ven z těla hostitele a šíří tím infekci mezi ostatní hostitele. Zbýlých 20 % tvoří oocysty tenkostěnné, které excystují v hostiteli a způsobují autoinfekci (Fayer et al. 1997, Fayer et Xiao 2008).

### 1.1.3. Historie

O přítomnosti nákazy *Cryptosporidium* spp. svědčí nálezy v koproliitech lidského původu na středoseverním pobřeží Peru z doby 4 300 let př. Kristem (Ortega et Bonavia 2003). Prvním popsáným druhem, nacházejícím se v žaludečních žlázách laboratorních myší, bylo *Cryptosporidium muris* (Tyzzer 1907). Detailněji parazita popsal až o tři roky později a podle nově zjištěných informací navrhl nový rod *Cryptosporidium* a *C. muris* jeho druhem (Tyzzer 1910). V roce 1912 Tyzzer popsal další nový druh, *Cryptosporidium parvum*, který se nacházel v tenkém střevě laboratorních myší (Tyzzer 1912). Experimentálním infikováním myší demonstroval, že *C. parvum* se vyvíjí pouze v tenkém střevě a že jeho oocysty jsou menší než oocysty *C. muris*. V roce 1929 Tyzzer nejasně popsal vývojové fáze parazita kuřat, o kterém si myslel, že jde o *C. parvum* (Tyzzer 1929). Téměř 50 let od Tyzzerovi první publikace nebyla problematika kryptosporidií dále rozvíjena, protože nebyly kryptosporidie považovány za ekonomicky, medicínsky nebo veterinárně významné. V roce 1955 byl popsán nový druh *Cryptosporidium meleagridis* způsobující onemocnění a úmrtí krůt (Slavin 1955). Zájem o studium tohoto druhu vzbudil roku 1970 případ kryptosporidiózy u telat (Panciera et al. 1971, Meutin et al. 1974).

První dvě zprávy o infekci u člověka pochází z roku 1976 (Meisel et al. 1976, Nime et al. 1976). Infikováno bylo 3 roky staré dítě a 39 let starý muž se sníženou imunitou. Kromě infekcí u lidí se během desetiletí objevily v téměř 40 publikacích případy infekce u skotu, ovcí, prasat, koní, krůt, králíků, opic, hadů a morčat. Celosvětový zájem o studium organismů z rodu *Cryptosporidium* vzbudila zpráva o výskytu těžkých průjmů u několika mužů se syndromem získané imunodeficiency AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS), jejichž příčinou byly kryptosporidie (Goldfarb et al. 1982).

#### **1.1.4. Kryptosporidióza**

Toto onemocnění patří mezi zoonózy a oportunní infekce. Vzniká infikováním hostitele odolnými oocystami kryptosporidií. Nákaza postihuje osoby všech věkových skupin. Projevuje se nekrvavými vodnatými průjmy cholerového charakteru s dalšími gastrointestinálními obtížemi a celkovou vyčerpaností (Petersen 1992). Průběh infekce je závislý především na imunitním stavu hostitele a druhu parazita (Tzipori et Ward 2002). U imunokompetentních jedinců má onemocnění většinou dočasný charakter a ustoupí během několika týdnů. Naopak u jedinců se sníženou imunitou má kryptosporidióza dramatický průběh s život ohrožujícími následky, kterými je dehydratace, rozvrat rovnováhy elektrolytů a hubnutí způsobené neschopností střeva resorbovat živiny. U těchto osob často dochází k diseminaci parazita do epitelu jiných orgánů. Většina infekcí u savců, včetně člověka, byla dříve publikována s *C. parvum* jako původcem (Tzipori 1988, Petersen 1993). V současné době se tento druh rozpadl na řadu jiných druhů a genotypů.

Onemocnění diagnostikujeme mikroskopickým nálezem oocyst ve výkalech. U *C. parvum* také můžeme nalézt vývojová stádia parazita v duodenální biopsii (Bednář et al. 1996).

#### **1.1.5. Cesty přenosu**

Oocysty kryptosporidií jsou přenášeny především fekálně orální cestou. K přenosu nákazy na člověka může dojít i blízkým kontaktem s infikovanou osobou a během pečování o infikovaná zvířata. Na člověka je nejčastěji přenesena z mladých telat, u kterých způsobuje těžké průjmy (Castro-Hermida et al. 2006, Maddox-Hyttel et al. 2006)

Další možnou cestou nákazy je pití infikované vody a rekreační aktivity v kontaminovaných vodních zdrojích. Minimální množství oocyst, které je schopno vyvolat infekci touto cestou přenosu je 10 (DuPont et al. 1995, Okhuysen et al. 1999). Ve vodním prostředí jsou oocysty schopny přežít několik měsíců až let (Ramirez et al. 2004, Fayer 2004). V roce 1993 proběhla masivní infekce způsobená kontaminovanou

pitnou vodou v Milwaukee, Wisconsin, kde bylo odhadem infikováno 403 000 lidí (MacKenzie et al. 1994).

Oocysty se také mohou nacházet v čerstvé zelenině, do které se dostanou při zavlažování (Ortega et al. 1997). Možný je i přenos hnojením lidskou stolicí nebo trusem zvířat infikovaných jedinců.

Preventivní opatření jsou zaměřena na eliminaci oocyst ve vnějším prostředí a v pitné vodě. K dekontaminaci prostředí se doporučuje používat sterilizaci horkou parou nebo plynování čpavkem. V ohrožených oblastech se pro prevenci doporučuje pít pouze převařené vody nebo balených nápojů. V neposlední řadě je důležité dodržovat osobní hygienu (Jíra 2009).

#### ***1.1.6. Výskyt v arktických oblastech***

Před nepříznivými vlivy vnějšího prostředí chrání sporozoity, infekční stádia kryptosporidií, obaly oocysty a tím jim je umožněna dlouhodobá infektivita (Fayer 2004). Životaschopnost oocyst se zkracuje při poklesu teplot pod 5 °C (Fayer et al. 1998, Jenkins et al. 2003, King et al. 2005).

Některé druhy jelenovitých v Norsku mohou být infikovány kryptosporidiiemi a jsou zdrojem kontaminace vodních zdrojů nebo potenciálním zdrojem nákazy pro domácí zvířata (Hamnes et al. 2006a). Infekce byla diagnostikována např. u jelenů (*Cervus elaphus*), srnců (*Capreolus capreolus*) a sobů (*Rangifer tarandus*) (Deng et Cliver 1999, Korsholm et Henriksen 1984, Siefker et al. 2002).

Vzhledem k tomu, že norské lišky velmi často sdílejí stejnou lokalitu jako jelenovité a pokud dojde k jejich úhynu, jsou pro ně i možným zdrojem potravy, může snadno dojít k přenosu a dalšímu šíření infekce. V roce 2007 byly v jedné studii rozpoznány oocysty kryptosporidií v trusu 6 lišek. Morfologie oocyst se shodovala s popsányými druhy *C. parvum* a dalšími *C. parvum* podobnými druhy, včetně *C. canis*. U většiny zvířat byla popsána i další infekce střevními parazity (hlístice a kokcidie). Všechny pozitivní vzorky obsahovaly velmi málo oocyst (Hamnes et al. 2007).

## **1.2. Mikrosporidie**

### **1.2.1. Taxonomie**

Mikrosporidie jsou malí obligátní jednobuněční paraziti řazeni do samostatného kmene Microspora (Weber et al. 1994). Bylo popsáno téměř 1000 druhů zařazených do více než 100 rodů (Sprague et al. 1992). Ačkoliv mikrosporidiím chybí mitochondrie a peroxizomy (Hirt et al. 1999), jsou přesto řazeni mezi pravá eukaryota, protože mají jádro s jaderným obalem, intracytoplasmatický systém membrán a dělení chromosomů pomocí dělicího vřeténka (Canning et al. 1986).

Původně se mikrosporidie zařazovaly mezi Protozoa. Později bylo zjištěno, že mikrosporidie patří buď přímo mezi houby, nebo organismy houbám příbuzné (Hirt et al. 1999). Mikrosporidie se s houbami shodují i v citlivosti k některým chemoterapeutikům, např. jsou citlivé k fungicidním benzimidazolům (Edlind et al. 1996, Li et al. 1996). Dále bylo zjištěno, že mikrosporidie mají některé strukturní znaky, díky kterým jsou řazeny k houbám (např. přítomnost chitinu ve stěně spor, nepřítomnost bičíku) a některé znaky, které je naopak od hub odlišují (např. způsob infekce hostitelského organismu, nepřítomnost mitochondrií, peroxisomů a velikost ribozomů) (Voigt et Kirk 2011).

### **1.2.2. Historie**

Roku 1857 Nägeli poprvé popsal mikrosporidii u housenky bource morušového a pojmenoval ji *Nosema bombycis* (Nägeli 1857). Zpočátku bylo nejvíce studií prováděno se zaměřením na výskyt mikrosporidií u hmyzu (Franzen 2008), později však byla popsána řada lidských infekcí, zejména u pacientů s AIDS (Canning et Hollister 1992a). Jako původci onemocnění byly nalezeny i u příjemců orgánů, cestovatelů, dětí, osob s kontaktními čočkami a seniorů (Didier 2005). Mikrosporidie mohou způsobit intestinální, oční, svalová a plicní onemocnění (Weber et al. 1994). První mikrosporidióza u lidí byla popsána v roce 1959 (Matsubayashi et al. 1959). Do roku 1985 bylo dobře zdokumentováno a popsáno pouze 10 případů tohoto onemocnění

u lidí. V té době byl ve Francii u HIV – pozitivních osob popsán nový druh *Enterocytozoon bienuesi* (Desportes et al. 1985).

### **1.2.3. Vývojový cyklus**

K infikování hostitele dochází nejčastěji požitím nebo inhalací spór, jejichž velikost se u savčích hostitelů pohybuje mezi 1-3  $\mu\text{m}$ . V hostitelské buňce poté probíhá vývoj mikrosporidií. K infekci hostitelské buňky mikrosporidiím slouží vystřelovací aparát a polaroplast (Larsson 1999). Po vniknutí spóry do nového hostitele je hostitelská buňka injikována sporoplasmou pomocí polární trubice. Vytlačení polární trubice je závislé na rychlém přísunu vody do spory a na předpokládané funkci aquaporinu. Jako aquaporiny jsou označovány proteiny vyskytující se u rostlinných a živočišných buněk, v nichž tvoří selektivně transmembránové vodní kanály, které jsou nepropustné pro ionty a metabolity. Také ovlivňují osmotické procesy. U jednoho z lidských patogenů, *E. cuniculi*, je umožněna předpokládaná identifikace aquaporinu díky sekvenční analýze (Ghosh et al. 2006). Při napadení hostitelské buňky se kromě polární trubice uplatňuje i fagocytóza.

Procesem zvaným merogonie (schizogonie) se zahajuje první fáze - proliferativní fáze, při které se zárodek v hostitelské buňce mění v meront. Uvnitř buňky dochází k velkému namnožení merontů, nejčastěji intranukleární mitózou. Stádium merontů je obklopeno plazmatickou membránou a má tvar okrouhlé, nepravidelné nebo protáhlé buňky.

Vývoj dále pokračuje sporogonií, kdy se meronti změní ve sporonty. Ty mají elektrodenzní povrchový povlak, ze kterého vzniká vnější vrstva zralé spóry. Ze sporontů vzniknou sporoblasty, které se přímo diferencují v plně vyvinuté spóry. Vzniklé spory představují jedinou životní formu mikrosporidií, která se vyskytuje mimo hostitelskou buňku. Spory mohou mít vejčitý, elipsovitý nebo hruškovitý tvar. Stěna spory je tvořena, jak je již výše uvedeno, z vnější elektrodenzní bílkovinné exospory a z vnitřní silnější endospory, která obsahuje chitin. Spóry jsou uvolňovány z hostitele a mohou být zdrojem infekce (Volf et Horák 2007).

#### **1.2.4. Mikrosporidióza**

Mikrosporidie způsobují onemocnění nazývané mikrosporidióza. Toto onemocnění jsou schopny vyvolat u většiny bezobratlých a všech tříd obratlovců (Canning et al. 1986, Sprague et Vávra 1976). Veliký ekonomický význam mají v tropickém sladkovodním rybníkářství, komerčním chovu ryb, včelařství a hedvábnictví (Wittner 1999). Tato infekce může způsobovat cerebrální, okulární, nasální, pulmonální, gastrointestinální, renální, muskulární nebo multiorgánové onemocnění. Závažná onemocnění způsobují u imunosuprimovaných osob – např.: osoby infikované virem HIV (Orenstein et al. 1997). Vyskytuje se jako importovaná nákaza u cizinců přijíždějících z tropických oblastí. U imunokompetentních osob probíhá jako krátkodobé průjemové onemocnění (Lopez- Velez et al. 1999). Druhy mikrosporidií vyskytujících se u lidí jsou uvedeny v Tabulce 2. Mikrosporidie jsou do prostředí uvolňovány stolicí, močí nebo sekrety z dýchacích cest. Možným zdrojem mikrosporidiové infekce jsou osoby i zvířata (Mathis et al. 2005). Tomu nasvědčuje i pozitivní nález u dítěte, které bylo v kontaktu se štěňaty infikovanými *E. cuniculi* (MacInnes et Stewart 1991). Zdrojem lidské nákazy může dále být hmyz nebo kontaminované potraviny. Vzhledem k tomu, že je výskyt mikrosporidií u některých živočichů ubikvitní, je expozice nákaze skoro nevyhnutelná.

Určité riziko nákazy představují vodní zdroje. Je to především díky tomu, že mikrosporidie opouštějí infikovaného hostitele především výkaly a močí a tím mohou kontaminovat vodu. Spory jsou ve vodě schopny přežít i několik měsíců a kvůli jejich malé velikosti je obtížné zachytit je filtrací (Franzen et Müller 1999). Existuje zpráva o epidemii z kontaminované vody (Cotte et al. 1999).

Klinické příznaky se odlišují v závislosti na druhu mikrosporidie a na stavu imunitního systému hostitele. Střevní mikrosporidie, především *E. bienersi*, způsobují histologické změny v duodenu, tenkém i tlustém střevě a rektu (Rabeneck et al. 1995). Nastává atrofie a fúze klků, prodloužení krypt a vyprázdnění pohárkových buněk. Parazit se nachází v apikální oblasti enterocytů a způsobují především průjem.

V očích se mikrosporidie vyskytují ve spojivce a rohovce (Schwartz et al. 1993). Klinickými projevy jsou bolestivost a zarudnutí s následujícím zhoršením příznaků i



vidění po použití steroidní léčby. Postiženy mohou být osoby s poruchou imunity i imunokompetentní jedinci (Chan et al. 2003).

Tab. 2: **Druhy mikrosporidií vyskytujících se u lidí**

<i>Brachiola algerae</i>	<i>Microsporidium ceylonensis</i>
<i>Brachiola vesicularum</i>	<i>Nosema ocularum</i>
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	<i>Pleistophora ronneafiei</i>
<i>Encephalitozoon hellem</i>	<i>Trachipleistophora hominis</i>
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	<i>Trachipleistophora antropophtera</i>
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	<i>Vittaforma corneae</i>
<i>Microsporidium africanum</i>	

### 1.2.5. Epidemiologie

Mikrosporidie, jako oportunní paraziti, mají geopolitní rozšíření a případy lidské mikrosporidie byly hlášeny z celého světa, většinou u HIV- infikovaných pacientů (Bryan et al. 1991, Canning et Hollister 1992b). Nejvyšší výskyt onemocnění u osob se sníženou imunitou je hlášen z Austrálie, severní Ameriky a západní Evropy (Weber et al. 1994). V arktických oblastech nebyl dosud výskyt mikrosporidií intenzivně studován.

Výskyt infekce u imunokompetentních osob je spojovaný s pobytem v tropických a subtropických oblastech (Sandfort et al. 1994). V Africe byla hlášena infekce u 8 dětí, které žily v oblasti s nízkým výskytem HIV, ale stav imunity u těchto dětí byl neznámý (Bretagne et al. 1993). Mikrosporidie byly také nalezeny ve stolici osob, opět s neznámým stavem imunity, žijících v Mexiku (Enriques et al. 1998).

### **1.2.6. Výskyt v arktických oblastech**

V Norsku byla provedena studie, která se zabývala výskytem *E. cuniculi* u arktických lišek (*Alopex lagopus*). Onemocnění encephylitozoonóza, které u nich vyvolává, se rozvíjí 1 – 3 měsíce po narození a způsobuje v jejich chovech velké ztráty (Åkerstedt 2002).

## **1.3. Giardia**

### **1.3.1. Taxonomie**

Podle dřívějšího rozdělení- na základě morfologie, se giardie řadily do kmene Sarcocystophora, podkmene Mastigophora, třídy Zoomastigophorea a čeledě Hexamitidae (Morrison et al. 2007). Nové systematické zařazení, které je založeno na genetických, strukturálních a biochemických poznacích, řadí giardie do kmene Metamonada, podkmene Trichozoa, třídy Trepomonadea a rodu *Giardia* (Cavalier-Smith 2003). První giardie byla detailněji popsána roku 1859. Od té doby, bylo popsáno přes 50 odlišných druhů, především na základě jejich hostitelské specifity.

Giardie se řadí mezi jednobuněčné eukaryotické organismy, i když jim chybí kompartmenty typické pro eukaryota, jako jsou mitochondrie, peroxizomy a mikroskopicky prokazatelný Golgiho komplex. Na základě světelné a elektronové mikroskopie bylo rozlišeno 6 druhů giardií (Adam 2001). Pět druhů představující izoláty z obojživelníků (*G. agilis*), ptáků (*G. ardeae*, *G. psittaci*), myši (*G. muris*) a ondater (*G. microti*) (Cacciò et al. 2005, McRoberts et al. 1996, Adam 2001). Jako šestý druh je uvedena skupina kmenů izolovaných z velkého množství jiných savčích hostitelů seskupených podle Filice (1952) do jednoho druhu *G. duodenalis*, protože mají stejné morfologické znaky. Později byly všechny druhy definovány pomocí rRNA. U posledního zmíněného druhu- *G. duodenalis* se můžeme setkat s mnoha synonymy, jako např.: *G. intestinalis*, *G. enterica*, *G. lamblia*, *Lamblia intestinalis*. Podle zásad mezinárodního kódu zoologické nomenklatury se používá pojmenování *G. intestinalis*.

### **1.3.2. Vývojový cyklus**

Z cyst, které se dostanou do hostitele, se uvolňuje trofozoit hruškovitého tvaru, který se pomocí přísavného (adhezního) disku přichycuje k enterocytům horní části tenkého střeva (duodenum, jejunum). Tento disk je tvořen ojedinělou buněčnou strukturou a byl popsán pouze u rodu *Giardia*. Jeho buněčnou stavbou se zabývají některé studie, např.: Elmendorf et al. 2003. Dále mají giardie 4 páry bičíků (anteriorní, posteriorní, kaudální, ventrální) a 2 jádra, která jsou k bičíkům ukotvena. Spojení bylo také pozorováno mezi jádry a diskem (Benchimol 2005).

Trofozoit přijímá na dorzálním povrchu a ve střední oblasti adhezního disku jako potravu hlenovitý střevní sekret procesem, který se nazývá endocytóza (pinocytóza). Jako ochranu si parazit tvoří proteiny, které se uvolňují do prostředí a chrání ho před střevními protézami a žlučovými solemi hostitele.

K jeho rozmnožování dochází podvojným dělením. Proces dělení je popisován několika způsoby. Jeden způsob popisuje Ghosh et al. (2001) a to tak, že dělení probíhá se zrcadlovou symetrií v rovině disku, kdy levé jádro mateřské buňky se stává pravým jádrem dceřiné buňky. V další studii je popisováno neobvyklé mitotické chování, kdy se dělení jádra zúčastňuje adhezní disk (Benchimol 2004). V poslední fázi se vytváří v tlustém střevě cysta, která obsahuje 4 jádra a představuje klidovou formu. Vytvoření cysty (encystaci) podporuje mírně alkalické prostředí, žlučové soli a mastné kyseliny. Celý proces formování cyst, během kterého se ztrácí pohyblivost a schopnost adheze, trvá 12 – 14 hodin. Cysta je odolná vůči vlivům vnějšího prostředí. Hostitel se infikuje polknutím cysty, která ve střevě excystuje (Jíra 2009).

### **1.3.3. Hostitelská specifita**

Izoláty giardií z člověka a jiných savců se dělí na 2 hlavní genetické skupiny (assemblages)- A a B a každá z nich zahrnuje několik genetických podskupin. Největší riziko zoonotického přenosu představují genotypy ze skupiny A. Menším rizikem jsou genotypy ze skupiny B (Thompson 2000). Lidé, hospodářská zvířata, psi, kočky a některé druhy volně žijících zvířat (např.: lišky, daněk, sob a opice) jsou přirozenými

hostiteli *G. intestinalis* skupiny A (Geurden et al. 2008, Leonhard et al. 2007, Robertson et al. 2007, Souza et al. 2007). Lidé, psi, morčata, králíci, hospodářská zvířata a některé druhy volně žijících zvířat (např.: bobr, makak, šimpanz, kojot a norská červená liška) jsou přirozenými hostiteli *G. intestinalis* skupiny B (Castro-Hermida et al. 2007, Coklin et al. 2007, Itagaki et al. 2005, Minvielle et al. 2008). Cysty giardií skupiny A i B byly nalezeny v trusu divoce žijících ptáků (Kuhn et al. 2002, Plutzer et Tomor 2009).

#### **1.3.4. Giardióza**

Giardie, stejně jako výše uvedené kryptosporidie, jsou běžnými střevními parazity člověka a domácích zvířat. Stále více nálezů je i u volně žijících zvířat, protože se na ně současné studie začínají více zaměřovat (Fayer 2004, Thompson 2004, Thompson et Monis 2004, Appelbee et al. 2005). Toto onemocnění se projevuje průjmem, bolestí břicha, pocitem slabosti a dalšími doprovázejícími příznaky. Stolice může obsahovat hlen, ale neobsahuje krev ani buněčné elementy. K onemocnění jsou zvláště citlivé děti, u kterých může vyvolat malabsorpční syndrom (Bednář et al. 1996). Přítomnost giardií je klinicky významná především u lidí, psů a koček. U zvířat tato infekce často probíhá asymptomaticky (Thompson et Monis 2004). I když byly provedeny studie, které ukazují, že giardie mohou být příčinou průjmů u telat (Xiao et al. 1993, O'Handley et al. 2000). Divoce žijící zvířata mohou být rezervoárem infekce pro člověka i domácí zvířata a mohou mýt možným zdrojem kontaminace zásob vody (Hamnes et al. 2006b).

K nákaze dochází perorálně, pozřením infekčních cyst a 3 dny po infikování mohou být cysty nalezeny ve stolici nově infikovaného hostitele. Maximum vylučovaných cyst může být až  $10^6$  cyst na gram trusu u mladých zvířat, vzhledem k pomalému rozvoji imunity u hostitele (Yanke et al., 1998, O'Handley et al. 2003). Mladá zvířata proto mohou být považována za hlavní zdroj infekce pro vnímavého hostitele. Rozvoj imunity vede ke snížení počtu vylučovaných cyst (Xiao et al. 1994, Nydam et al. 2001). Dospělé hostitele však nemůžeme jako zdroj infekce vyloučit, protože i menší počet cyst (1-10/ gram trusu), které vylučují, postačí k vyvolání infekce (Schaefer et al. 1991; Cacciò et al. 2005). Původcem giardiózy u člověka je pouze *G. intestinalis*.

### ***1.3.5. Cesty přenosu***

Cysty giardií jsou přenášeny fekálně-orální cestou, a to buď přímo, nebo nepřímo. Potenciální mechanismy přenosu jsou: z člověka na člověka, ze zvířete na zvíře, zoonotický přenos (ze zvířete na člověka, z člověka na zvíře) nebo pitím, rekreací a používáním kontaminované vody (Karanis et al. 2007, Porter et al. 1990, Shields et al. 2008, Takizawa et al. 2009).

Do roku 2004 bylo po celém světě hlášeno více než 100 případů giardiózy způsobené vodními zdroji (Karanis et al. 2007). Během let 2008 – 2010 souvisí vypuknutí giardiózy s pitím vody na Floridě a v New Hampshire (USA) (Daly et al. 2010, Eisenstein et al. 2008). Jedním z největších případů giardiózy související s pitím kontaminované vody byl případ v roce 2004 v Norsku, kdy se nakazilo kolem 1500 lidí. Genotypování cyst giardií, které kontaminovaly vodu, nebylo možné (Robertson et al. 2006).

Pozornost je třeba věnovat kontaminaci ovoce, zeleniny a koryšů cystami, protože tyto potraviny jsou často konzumovány bez tepelné úpravy (Blasi et al. 2008, Pozio 2008). Příkladem je studie prováděná na vzorcích ředice, špenátu a rukoly, ve kterých byla nalezena jedna cysta giardií na 50 g vzorku (Cook et al. 2007). Studie zaměřené na členské státy Evropské unie (27 států) zjistily, že původci parazitárního onemocnění jsou přenášeni potravinami s různým výskytem, v závislosti na zemi, podmínkách životního prostředí, lidském chování a sociálně ekonomické úrovni (Pozio 2008).

Studie, které používaly cysty giardií izolované z člověka i zvířat dokazují, že je možný přenos ze zvířete na člověka a naopak (Monis et Thompson 2003). Mnoho autorů řeší problematiku zoonotického přenosu *G. intestinalis* (van Keulen et al. 2002, Traub et al. 2004, Lalle et al. 2005, Savioli et al. 2006), ale tato problematika stále není jasná. Giardie byly hlášeny u užitkových zvířat po celém světě (Geurden et al. 2010). Většina studií je zaměřena na výskyt giardií u dobytka a hus chovaných na farmě (O'Handley et al. 1999, Castro-Hermida et al. 2005).

### **1.3.6. Výskyt v arktických oblastech**

Ve vysoké Arktidě dosud nebyl dosud popsán výskyt giardií, ale v nízké Arktidě byly diagnostikovány v několika případech. Většina údajů o výskytu giardií u volně žijících zvířat pochází z výzkumů suchozemských savců, které posuzovaly možnost přenosu na domácí zvířata nebo na člověka. Jedním z největších zdrojů kontaminace vody jsou bobři, dokonce v Severní Americe je giardióza běžně označována jako „bobří horečka“. Díky přítomnosti cyst giardií (a také oocyst kryptosporidií) v trusu zvířat, který byl nalezen v blízkosti vodních toků používaných k lidské spotřebě, jsou tyto zvířata považována za zdroj kontaminace (Heitman et al. 2002).

Cysty giardií byly popsány v trusu lišky obecné (*Vulpes vulpes*), z východního, středního a severního Norska. Většina pozitivních vzorků obsahovala poměrně málo cyst, ale u jednoho vzorku (dospělý samec) z východního Norska byla diagnostikována silná infekce (Hamnes et al. 2007). Výskyt giardií v Norsku byl studován i u volně žijících druhů jelenovitých (Hamnes et al. 2006b).

## **2. Cíl práce a hypotézy**

### **2.1. Cíl práce**

Cíle mé bakalářské práce byly:

- Zpracovat literární rešerši o tématu.
- Vyšetřit vzorky klasickými parazitárními metodami.
- Izolovat DNA a pomocí PCR vyšetřit trus na přítomnost kryptosporidií, mikrosporidií a giardií.
- V případě pozitivních nálezů získané izoláty genotypizovat a porovnat s již popsánymi nálezy.

### **2.2. Hypotézy**

H1: Arktické klima není vhodné pro šíření původců střevních parazitárních zoonóz. Na Svalbardu se nevyskytují kryptosporidie, mikrosporidie a giardie vůbec. Nebo se vyskytují ve významně nižších prevalencích než v ostatních klimatech.

H2: Arktické klima neovlivňuje významně šíření původců střevních parazitárních zoonóz. Na Svalbardu se kryptosporidie, mikrosporidie a giardie vyskytují podobně jako v mírném pásmu.

### 3. Materiál a metodika

#### 3.1. *Vyšetřovaný materiál*

Při práci parazitologické skupiny na české polární stanici bylo získáno 87 vzorků trusu divoce žijících zvířat. Vzorky pocházely ze souostroví v Severním ledovém oceánu severně od evropské pevniny jménem Svalbard, z jeho severní části, zejména z oblasti zátoky Petunia. Trus pocházel z 12 druhů zvířat a byl získán během 2 výprav. První část (37 vzorků) byla získána v roce 2010. Druhá část (50 vzorků) byla získána v roce 2011. Parazitární vyšetření bylo provedeno v období od března 2011 do února 2012. Byly odebrány pouze vzorky, u kterých bylo jasné, ze kterých zvířat trus pochází.

##### 3.1.1. *Lokalita*

Svalbard (Špicberky, český význam: Studené pobřeží) je společný název souostroví, které se nachází v Severním ledovém oceánu, přibližně 580 km severně od Norska a 1 000 km od severního pólu. Ostrovy jsou roztroušeny mezi 74° a 81° severní šířky a mezi 10° a 34° východní délky a jsou pod administrativní správou Norského království se správním střediskem Longyearbyen. Špicberky je název pouze pro největší ostrov na západě souostroví (Západní Špicberky), ale velmi často se toto označení používá pro celé souostroví a zahrnuje i přilehlé ostrovy Jan Mayne a Medvědí ostrovy (Bjørnøya). Celé souostroví má rozlohu 62 748 km<sup>2</sup> a téměř 80% plochy pokrývají ledovce. Nejvyšší vrchol Newtontoppen (Newtonův štít) na severozápadě dosahuje výšky 1 717 m. Kromě největšího ostrova Západní Špicberky tvoří souostroví ještě další 3 větší ostrovy: Nordaustlandet (Severovýchodní země), Barentsøya (Barentsův ostrov), Edgeøya (Edgeův ostrov) a mnoho dalších menších ostrovů.

Toto souostroví poprvé objevili Vikingové. První historické zprávy pochází z r. 1191 z islandské kroniky. Na tento objev se zapomenulo a souostroví opět objevil r. 1596 Holanďan Williem Barents. V 18. století zde byli ruští lovci kožešinové zvěře. Rusové s lovem skončili v polovině 19. století, ale od roku 1800 na souostroví jezdili za stejným účelem i Norové. Na přelomu 19. a 20. století provedly švédské a norské



expedice výzkum a zaměření ostrovů. Po první světové válce se podle mezinárodní smlouvy z r. 1920 Svalbard dostal pod administrativní správu Norska. Smluvní strany (41 států) mají zajištěna různá práva, jako např. těžbu nerostných surovin a zřizování výzkumných stanic.

Na ostrovech zvláště při pobřeží žije velké množství stěhovavého ptactva. Přezimuje zde bělokur rousný (*Lagopus lagopus*). Ze savců na ostrovech můžeme najít např. polární lišky, tuleně, soby, zavlečené hraboše (*Microtus laevis*) a na pobřeží lední medvědy.

Od druhé poloviny 20. století pronikla na Svalbard organizovaná turistika zejména ze severských a západoevropských zemí. Arktická příroda je velmi zranitelná a málo odolná proti zásahům člověka, a proto r. 1991 norský parlament schválil zvláštní opatření k regulaci turistiky na Svalbardu. Celé souostroví je rozděleno do čtyř kategorií ochrany přírody, v nichž je přístup turistům usměrňován od volného pohybu po úplný zákaz vstupu. Tyto čtyři oblasti jsou následující: přírodní rezervace, národní parky, oblasti volné rekreace a exkurzní oblast (Grégr et al. 1997).

### 3.1.2. *Vyšetřovaná zvířata*

#### *Alopex lagopus* (liška polární)

Liška polární má krátký čenich, krátké zakulacené uši a tělo menší než příbuzná liška červená (ta na Svalbardu nežije). Je okolo 60 cm dlouhá a její ocas měří přibližně 30 cm. Arktické lišky váží 2,5 - 5 kg. V zimě je jejich kožišina silná s hustou vrstvou. Liška polární se objevuje ve 2 barvách srsti, bílá a modrá. Bílý druh tvoří 90-97% populace lišek na Svalbardu.

Liška polární je cirkumpolární druh, který obývá arktickou tundru. Na Svalbardu se lišky polární vyskytují téměř všude. Od nejvyšších horských hřebenů po mořské pobřeží a dokonce i na úlomcích ledu. Hojně se vyskytují tam, kde je přístup k dostatku potravy během období rozmnožování, což je na západním pobřeží Svalbardu, kde je mnoho mořských ptáků a druhů hus. Brzy na jaře se živí především mláďaty tuleňů (*Phoca hispida*) (Lydersen et Gjertz 1986), zatímco v létě jejich stravu tvoří velké množství mořských ptáků, kteří hojně přilétají na souostroví. Potravní možnosti jsou

během podzimu a zimy omezeny, protože mnoho ptáků Svalbard opouští v říjnu (Mehlum 1990). Přes zimu se živí mrtvými těly sobů (*Rangifer tarandus platyrhynchus*) a tuleňů (*Phocidae*). Dále je jejich potravou skalní bělokur žijící na Svalbardu (*Lagopus muta hyperborea*) a potrava získaná během jara a léta (Prestrud 1992, Frafjord 1993). Je jediným suchozemským masožravcem na Svalbardu.

Liška polární na Svalbardu nemá přirozeného nepřítele. Stejně jako u soba polárního je pravděpodobně nejčastější příčinou úmrtí hladovění během zimy (Frafjord 1992).

#### *Microtus levis* (hraboš východoevropský)

Hraboš východoevropský má šedivohnědou srst po těle, krátké uši a krátký ocas (ten tvoří 1/3 délky těla). Je 10-16 cm dlouhý a váží přibližně 30 g. Samci jsou o něco těžší než samice. Tento živočich byl náhodně zavlečen na Svalbard a je jediným malým druhem savce na souostroví.

Tento druh se vyskytuje na loukách a zemědělských oblastech v Euroasii. Nejsevernější oblast výskytu je Finsko. Hraboš na Svalbardu pravděpodobně pochází z okolí Petrohradu v Rusku a velmi pravděpodobně byl na Svalbard zavlečen lodní přepravou v seně (krmivo pro hospodářská zvířata (Kovacs et al. 2006).

#### *Rangifer tarandus platyrhynchus* (sob polární špicberský)

*Rangifer tarandus* (sob polární) se vyskytuje od vysokých arktických ostrovů po oblasti tundry a taigy (Leader-Williams 1988). Na souostroví Svalbard žije sob polární špicberský (*Rangifer tarandus platyrhynchus*), který je malým poddruhem *Rangifer tarandus* (soba polárního). Samci jsou podstatně větší než samice a také mají větší parohy. Samci váží přibližně 65 kg na jaře a 90 kg na podzim, zatímco samice váží přibližně 53 kg na jaře a 70 kg na podzim. Délka samců je 160 cm a samice jsou dlouhé okolo 150 cm. Svalbardští sobi jsou krátkonozí, mají menší tělo a delší srst v zimním období v porovnání s ostatními poddruhy *R. tarandus* (Degerbøl 1957, Banfield 1961). Srst je na zádech hnědá a na břiše světlá. Během zimy je srst světlejší než během léta.

Samcům se tvoří mohutné těžké parohy během dubna až července a ztrácejí je časně v zimě. Samicím začínají parohy růst v červnu a obvykle je mají po celý rok.

Sob se nachází prakticky ve všech nezaledněných částech souostroví Svalbard. Nej hustěji žijí na Nordenskiöld, Edgeøya a Barentsøya.

Svalbardský sob má variabilní stravu a požívá téměř všechny typy vegetace s malou výjimkou (jako je arktický bílý vřes). Během zimy se sob nachází na vyvýšeninách, horských svazích, náhorních plošinách a ostatních místech, kde je málo sněhu. Během léta se nachází v oblastech kde je bujná vegetace, často v údolích a nížinách. Živiny (tuk) využívá během zimy, kdy je vegetace nedostupná nebo není příliš kvalitní. Usedlým chováním mohou snížit svou spotřebu energie. Jako dobrá izolace proti studené zimě jim slouží srst. Nejběžnější příčinou úmrtí je vyhladovění (Kovacs et al. 2006).

#### *Anas crecca* (čírka obecná)

Čírka obecná je nejmenší plovací kachna se zavalitým tělem a krátkým krkem. Měří 34-38 cm. Samci mají kaštanově hnědou a zelenou hlavu, tmavě šedé tělo a krémově žluté zbarvení pod ocasem. Samice jsou hnědé s tmavými skvrnami.

Vyskytují se v mnoha oblastech severní polokoule s výjimkou Grónska a přes zimu migrují na jih (Pott 2004).

#### *Anas platyrhynchos* (kachna divoká)

Kachna divoká patří k nejznámějším evropským ptákům. Dorůstá do délky 51-62 cm. Samci mají zelenou hlavu, se žlutým zobákem a bílým kroužkem okolo krku. Hrud' je červenohnědá, zadní hřbet je černobílý a ostatní peří světle šedé. V prostém šatě se podobají samicím a jejich tělo je celé hnědé se skvrnami. Samci jsou světle hnědé (Pott 2004).

Tato kachna je rozšířena v celé Evropě a Asii a téměř v celé Severní Americe.

### *Anser brachyrhynchus* (husa krátkozobá)

Husa krátkozobá je ze 3 druhů hus, které hnízdí na Svalbardu, největší. Dosahuje délky 60-75 cm a váží 2200-2800g. Obě pohlaví vypadají stejně, ale samci jsou o něco větší než samice. Nohy mají růžové. Hlava a horní část krku jsou tmavě hnědošedé v kontrastu se spodní částí krku a těla, které jsou světle hnědošedé. Husa krátkozobá má relativně krátký trojúhelníkový zobák. Zobák je skoro černý s růžovým pruhem přes vnější část. Hlava je zaoblená a krk je krátký.

Husa krátkozobá je býložravec. Na Svalbardu se jejich potrava skládá z bylin, které rostou podél pobřeží a na skálách kolem moře. Vyskytují se především v Euroasii a východním Grónsku (Madsen 1999).

### *Branta bernicla* (berneška tmavá)

Berneška tmavá je relativně malá husa s mírně delším krkem, malou hlavou a užšími křídly. Existuje několik poddruhů a každý z nich má trochu odlišnější opeření. Populace na Svalbardu patří do poddruhu *Branta bernicla hrota*. Dospělí ptáci jsou 56-61 cm velcí a váží 1100-1600 g. Obě pohlaví si jsou podobná, ale samci jsou mírně větší než samice. Berneška tmavá má černou hlavu, krk a prsa s bílými skvrnami po stranách krku. Horní část těla a křídla jsou tmavá šedivohnědá. Spodní část je světlá šedivohnědá. Zobák a nohy jsou černé.

Berneška tmavá hnízdí od května na Svalbardu a jiných severských oblastech (Kanada) a v první polovině září migrují do Dánska a Anglie. Na Svalbardu se jejich hnízda vyskytují v blízkosti rybníků a jezer a na ostrovech, často s bohatou vegetací. Během období rozmnožování bernešky tmavé na Svalbardu jsou hlavním zdrojem potravy suchozemské rostliny a mechy. Během zimy jsou jejich hlavní potravou mořské chaluhy a řasy (Kovacs et al. 2006).

### *Branta leucopsis* (berneška bělolící)

Berneška bělolící je středně velká, šedivočernobílá husa s krátkým krkem a kulatou hlavou. Zobák je malý a černý, nohy jsou také černé. Dosahuje délky 58-70 cm a váží 1500-2000 g. Pohlaví jsou vzhledově stejná, ale samci jsou mírně větší než

samice. Hlava je bělavá s černou korunkou. Krk je černý, zatímco spodní části jsou stříbrno bílé, šedivé a černé (Kovacs et al. 2006).

#### *Fratercula arctica* (papuchalk bělobradý plochozobý)

Papuchalk je středně velký pták, který je lehce rozpoznatelný podle velkého a barevného zobáku. Dospělí jedinci dosahují délky 26-29 cm a váhy 300-600 g. Samci a samice mají podobný vzhled. Kromě charakteristického zobáku mají šedivobílou kruhovou část na hlavě okolo očí, která je oddělena od bílého hrudníku černým pruhem. Horní část těla je černá, zatímco břicho a boční strany jsou bílé. Nohy jsou celé oranžovočervené. Mohutný zobák je příčně zploštělý a má červené, žluté a modré drážky. V zimě jsou boční strany hlavy tmavě šedivé a zobák je menší. Mláďata se podobají dospělým v zimním opeření, ale mají menší a tmavší zobák.

Vyskytuje se od severovýchodní části Severní Ameriky a Britských ostrovů na jižní straně po Grónsko, Svalbard a severní část Ruska. V Evropě je naprostá většina podél Atlantického oceánu (Kovacs et al. 2006).

#### *Lagopus muta hyperborea* (bělokur horský)

Svalbardský bělokur horský je poddruh horského bělokura *Lagopus muta*. Je 35-40 cm dlouhý a váží mezi 490-1200 g. Obě pohlaví mají bílé zimní opeření s výjimkou černého peří na vnější straně ocasu. Samci mají černou linku od očí k zobáku a v období rozmnožování také mají velký červený hřeben nad očima. Samice mají také červený hřeben, ale mají ho méně viditelný. Samice mění opeření na letní v dubnu až květnu. Peří je více hnědé. Samci si ponechávají bílé opeření do června a kompletní hnědé letní peří získávají až od poloviny srpna. Na konci září mají obě pohlaví zpět zimní opeření. Mladí ptáci jsou více šedivohnědí než jejich rodiče a mají hnědý ocas.

Bělokur horský je jediným ptákem, který přezimuje na Svalbardu. Na podzim zvýší příjem potravy a jeho tělo je ze 4/5 tvořeno tukem, ze kterého získává energii celou zimu (Nudds et al. 2011).

### *Somateria mollissima* (kajka mořská)

Kajka mořská patří mezi velké potápivé kachny. Má poměrně velkou hlavu, krátký krk a dlouhý klínovitý zobák, který je ze stran opeřený. Dospělí jedinci měří 50-71 cm a váží mezi 1200-2800 g. Samci a samice mají velmi odlišné opeření. Samci mají bílou hlavu s černou korunkou a světle zelené skvrny na týlu. Hrudník a horní části těla jsou bílé, zatímco spodní část těla kajky je černá. Samice jsou převážně hnědé. Mláďata se podobají samcům, ale jsou o trochu tmavší.

Hnízdí podél evropského pobřeží od severu Francie, přes Nizozemsko, Velkou Británii k Islandu a arktickému pobřeží Ruska. Dále jejich hnízda můžeme najít v arktických oblastech jako je Svalbard, severovýchod Sibíře, Severní Amerika a Grónsko. Bylo popsáno několik poddruhů, populace vyskytující se na Svalbardu patří do poddruhu *S. m. bodalis*. Tento poddruh také hnízdí na severovýchodě Kanady, Grónsku, Islandu a ostrovech France Josefa (Rusko). Tento poddruh se na Svalbardu vyskytuje v koloniích na malých ostrůvcích nebo rozptýlený podél pobřeží. Přes zimu se ze svých hnízd stěhují pouze v nejsevernějších oblastech. Kajky mořské ze Svalbardu nejspíš nezimovávají severního podél pobřeží Norska a na Islandu. Někteří jedinci mohou zimu přečkat na ledových krách na západním pobřeží Svalbardu (Kovacs et al. 2006).

### *Sterna paradisaea* (rybák dlouhoocasý)

Polární rybák je relativně malý pták se světle šedivým peřím, černou skvrnou na hlavě, červeným zobákem a červenými nohama. Je to jediný druh rybáka, který se vyskytuje na Svalbardu. Dospělí ptáci dosahují délky 33-35 cm a váhy 100-125 g. Obě pohlaví vypadají podobně. Černá skvrna na hlavě dosahuje až dolů na zadní straně krku. Zobák je krvavě červený a občas má černou špičku. Nohy jsou červené a velmi krátké. Tělo je převážně šedivé, ale krk, hrud' a zadní části jsou bílé (Kovacs et al. 2006).

### 3.2. *Metody zpracování*

#### 3.2.1. *Barvení podle Miláčka a Vítovce (1985)*

Tato metoda se používá ke zjištění přítomnosti oocyst kryptosporidií v trusu. Barvení je specifické pro oocysty kryptosporidií.

Použité roztoky:

- roztok metylvioleti: Methylviolet' ..... 0,6 g  
Anilin ..... 1 ml  
Fenol ..... 1 g  
Ethanol (EtOH)..... 30 ml  
Deionizovaná voda ..... 70 ml
- kyselina sírová: 2% vodný roztok
- roztok tartrazinu: 1% tartrazin v 1% kyselině octové

Pracovní postup:

Nejdříve byl vytvořen tenký nátěr trusu na předem označené sklíčko. Poté byl nátěr fixován methanolem v plameni a 30 minut barven v kyvetě s roztokem metylvioleti. Poté bylo sklíčko opláchnuto pod tekoucí vodou. Dále byl nátěr 2 minuty diferencován v kyvetě s 2 % kyselinou sírovou. Opět bylo sklíčko opláchnuto pod tekoucí vodou. V dalším kroku byl vzorek 2 minuty dobarvován tartrazinem. V posledním kroku bylo sklíčko opět opláchnuto pod tekoucí vodou a bylo necháno uschnout.

Sklíčka byla prohlížena světelným mikroskopem (OLYMPUS BX 51) při zvětšení 1000× za použití olejové imerze. V případě pozitivních vzorků byly pozorovány oocysty kryptosporidií, což byly přibližně 5µm velké kulovité struktury s fialovým zbarvením.

### **3.2.2. Molekulární vyšetření trusu**

DNA byla z trusu vyizolována komerčním kitem a analyzována polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Vyhodnocení proběhlo pomocí gelové elektroforézy v 1% agarózovém gelu s vizualizací UV transiluminátorem při vlnové délce 302 nm. V případě pozitivního nálezu byl fragment obsahující DNA vyříznut, extrahován z gelu a sekvenován. Vyšetřování probíhalo v následujícím pořadí.

#### **Izolace DNA z trusu**

Izolace byla provedena komerčním kitem QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) podle následujícího pracovního postupu.

Součástí kitu:

lyzační pufr ASL, inhibiční tablety, proteinase K, pufr AL , 96% ethanol, promývací pufr AW1 a AW2, eluční pufr AE , QIAamp kolony se sběrnými zkumavkami

Pracovní postup:

Do 2 ml mikrozkušavky bylo dáno 180 – 200 mg zkoumaného vzorku (trus) a byly přidány skleněné kuličky o průměru 0,5 mm (BioSpec Products, Inc., USA). Dále byl připipetován 1 ml lyzačního pufru ASL a směs byla vortexována 1 minutu. Následně došlo k rozbíjení oocyst po dobu 60 s v beadbeateru (FastPrep®- 24 Instrument, M.P. Biomedicals, USA) rychlostí 5,5 m/s. Vzorek byl 5 minut inkubována při 70 °C v inkubačním bloku. Opět byl 15 s vortexován a centrifugován (Eppendorf, MiniSpin) 1 minutu při rychlosti 16 000 g. Maximum supernatantu bylo přeneseno do čisté mikrozkušavky a pelet vyhozen. Do zkumavky byla přidána inhibiční EX tableta, směs byla vortexována 1 minutu (dokud nedošlo k úplnému rozpuštění tablety) a inkubována 1 minutu při laboratorní teplotě. Následovala centrifugace 3 minuty při výše uvedené rychlosti. Veškerý supernatant byl přepipetován do nové mikrozkušavky a opět 3 minuty centrifugován. Do čisté mikrozkušavky bylo přidáno 15 µl proteinase K lyzující bílkoviny, 200 µl supernatantu, 200 µl pufru AL a vortexováno 15 s. Směs



byla inkubována 10 minut při 70 °C v inkubačním bloku. Dále bylo přidáno 200 µl 96% ethanolu a vortexováno. Vzniklý lyzát byl přepipetován na QIAamp kolonu opatřenou sběrnou zkumavkou a centrifugován 1 minutu (poté byla vyprázdněna sběrná zkumavka). Na kolonu bylo přidáno 500 µl promývacího pufru AW1, centrifugováno 1 minutu a sběrná zkumavka byla vyprázdněna. Opět na kolonu bylo napipetováno 500 µl promývacího pufru AW2 a centrifugováno 3 minuty. Dále byla kolona přenesena na čistou zkumavku. Přímo na membránu bylo napipetováno 200 µl elučního pufru AE, ponecháno 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifugováno 1 minutu při 16 000 g. Získaná DNA byla uchována při -20 °C.

### **Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Amplifikace neboli pomnožení izolované DNA kryptosporidií byla provedena metodou PCR na dvou různých lokusech- genu malé ribozomální podjednotky (SSU rDNA) a glykoproteinu 60 (GP 60). U všech vzorků byl nejdříve proveden test na přítomnost rodově specifické kryptosporidiové DNA pomocí primerů amplifikujících částečnou sekvenci SSU (Tab.3). Pozitivní vzorky byly podrobeny další amplifikaci, tentokrát na lokusu GP 60 (Tab.4). Používaný protokol je uveden v Tabulce 5. Amplifikace proběhla v termocycleru (Little Genius, BIOER). Program použitý pro SSU je uveden v Tabulce 6 a pro GP 60 je uveden v Tabulce 7. Ke každé reakci byla přidána pozitivní a negativní kontrola. Reakce byly prováděny v celkovém objemu 20 µl. Pro sekundární amplifikaci byly použity 3 µl primárního produktu. Všechny vzorky byly prováděny v duplikátu z důvodu reprodukovatelného záchytu. Jako pozitivní kontrola pro SSU byla použita DNA vyizolovaná ze suspenze oocyst *C. andersoni* získaných z tura domácího a pro GP 60 byla použita DNA z oocyst *C. hominis* získaných z pozitivního lidského vzorku.

Použité chemikálie:

- deionizovaná PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, ČR)
- MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Top-Bio, ČR)
- 10× koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu (Top-Bio, ČR)
- Deoxiribonukleosid trifosfáty (dNTP's, 10 mM roztok - 2,5 mM každé báze, Top-Bio, ČR)
- primery forward a reverse (10 µm, Generi Biotech, ČR)
- bovinní sérový albumin (BSA, 10 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA)
- Taq purple DNA polymeráza (1 U/µl, Top-Bio, ČR)

Tab. 3: **Použité primery pro SSU rDNA** (Jiang et al. 2005)

Primární PCR	Sekvence
F1	5'- TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG -3'
R1	5'- CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA -3'
Sekundární PCR	Sekvence
F2	5'- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG -3'
R2	5'- CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT A -3'

Tab. 4: **Použité primery pro GP 60** (Feng et al. 2007)

Primární PCR	Sekvence
F1	5'- ATA GTC TCC GCT GTA TTC -3'
R1	5'- GGA AGG AAC GAT GTA TCT -3'
Sekundární PCR	Sekvence
F2	5'- TCC GCT GTA TTC TCA GCC -3'
R2	5'- GCA GAG GAA CCA GCA TC -3'

Tab. 5: **Reagencie pro jeden vzorek** (v  $\mu$ l)

reagencie	koncentrace	primární PCR	sekundární PCR
H <sub>2</sub> O		11,30	12,10
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,2	1,2
10× buffer		2	2
dNTP	10 mM	0,40	0,40
forward	10 $\mu$ M	0,40	0,40
reverse	10 $\mu$ M	0,40	0,40
BSA	10 mg/ml	0,80	-
Taq	1 U/1 $\mu$ l	0,50	0,50
DNA		3	3
Celkem		20	20

Tab. 6: **Amplifikační program PCR pro SSU rDNA**

94 °C.....3 min. (počáteční denaturace DNA)
35 cyklů:
94°C.....45 s. (denaturace DNA)
55°C.....45 s. (nasedací teplota primerů)
72°C.....60 s. (syntéza nového řetězce DNA)
72°C.....10 min. (dosyntetizování nového řetězce DNA)

Tab. 7: **Amplifikační program PCR pro GP 60**

94 °C.....3 min. (počáteční denaturace DNA)
35 cyklů:
94°C.....45 s. (denaturace DNA)
50°C.....45 s. (nasedací teplota primerů)
72°C.....60 s. (syntéza nového řetězce DNA)
72°C.....10 min. (dosyntetizování nového řetězce DNA)

K detekci mikrosporidií ve vyšetřovaných vzorcích byla použita již vyizolovaná DNA (viz. Izolace DNA z trusu). Molekulární charakterizace izolátů mikrosporidií byla provedena metodou PCR. Všechny vzorky byly testovány na přítomnost specifické mikrosporidiové DNA. K amplifikaci pro *Encephalitozoon* sp. byly použity primery uvedené v Tabulce 8. Primery použité k amplifikaci pro *Enterocytozoon* sp. jsou

uvedeny v Tabulce 9. Reakce byly prováděny v celkovém objemu 25  $\mu$ l (Tab. 10). Amplifikace proběhla v termocycleru (Little Genius, BIOER). Použitý program je uveden v Tabulce 11. Ke každé reakci byla přidána pozitivní a negativní kontrola. Pro sekundární amplifikaci byl použit produkt primární PCR. Všechny vzorky byly prováděny v duplikátu z důvodu reprodukovatelného záchytu. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA vyizolovaná z tkáňové kultury *E. intestinalis*.

Použité chemikálie:

- deionizovaná PCR H<sub>2</sub>O (Top-Bio, ČR)
- MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Top-Bio, ČR)
- 10× koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu (Top-Bio, ČR)
- Deoxiribonukleosid trifosfáty (dNTP's, 10 mM roztok - 2,5 mM každé báze, Top-Bio, ČR)
- primery forward a reverse (10  $\mu$ m, Generi Biotech, ČR)
- bovinní sérový albumin (BSA, 10 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA)
- Taq purple DNA polymeráza (1 U/ $\mu$ l, Top-Bio, ČR)

Tab. 8: **Použité primery pro ITS u *Encephalitozoon* sp.** (Didier et al. 1995, Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996)

Primární PCR	Sekvence
int580f	5'- TGC AGT TAA AAT GTC CGT AGT -3'
int580r	5'- TTT CAC TCG CCG CTA CTC AG -3'
Sekundární PCR	Sekvence
MSP 3	5'- GGA ATT CAC ACC GCC CGT CVY TAT -3'
MSP 4A	5'- CCA AGC TTA TGC TTA AGT YMA ARG GGT -3'

Tab. 9: **Použité primery pro ITS u *Enterocytozoon bieneusi*** (Buckhold et al. 2002)

Primární PCR	Sekvence
EBITS3	5'- GGT CAT AGG GAT GAA GAG -3'
EBITS4	5'- TTC GAG TTC TTT CGC GCT C -3'
Sekundární PCR	Sekvence
EBITS1	5'- GCT CTG AAT ATC TAT GGC T -3'
EBITS2.4	5'- ATC GCC GAC GGA TCC AAG TG -3'

Tab. 10: **Reagencie pro jeden vzorek** (v  $\mu\text{l}$ )

reagencie	koncentrace	primární PCR	sekundární PCR
H <sub>2</sub> O		12,87	16,87
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,50	1,50
10× buffer		2,50	2,50
dNTP	10 mM	0,50	0,50
forward	10 $\mu\text{M}$	0,50	0,50
reverse	10 $\mu\text{M}$	0,50	0,50
BSA	10 mg/ml	1	-
Taq	1 U/1 $\mu\text{l}$	0,63	0,63
DNA		5	2
Celkem:		25 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$

Tab. 11: **Amplifikační program PCR**

94 °C.....3 min. (počáteční denaturace DNA)
35 cyklů:
94°C.....45 s. (denaturace DNA)
55°C.....45 s. (nasedací teplota primerů)
72°C.....60 s. (syntéza nového řetězce DNA)
72°C.....10 min. (dosyntetizování nového řetězce DNA)

K detekci giardií ve vyšetřovaných vzorcích byla použita již vyizolovaná DNA (viz. Izolace DNA z trusu). Molekulární charakterizace izolátů giardií byla provedena metodou PCR. Všechny vzorky byly testovány na přítomnost specifické DNA. K amplifikaci byly použity primery uvedené v Tabulce 12. Reakce byly prováděny v celkovém objemu 25  $\mu\text{l}$  (Tab. 13). Amplifikace proběhla v termocycleru (Little Genius, BIOER). Použitý program je uveden v Tabulce 14. Ke každé reakci byla přidána pozitivní a negativní kontrola. Pro sekundární amplifikaci byl použit produkt primární PCR. Všechny vzorky byly prováděny v duplikátu z důvodu reprodukovatelného záchytu. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA vyizolovaná z cyst giardií z pozitivního pacienta.

Použité chemikálie:

- deionizovaná H<sub>2</sub>O (Top-Bio, ČR)
- MgCl<sub>2</sub> (25 mM, Top-Bio, ČR)
- 10× koncentrovaný pufr pro Taq purple DNA polymerázu (Top-Bio, ČR)
- Deoxiribonukleosid trifosfáty (dNTP's, 10 mM roztok - 2,5 mM každé báze, Top-Bio, ČR)
- primery forward a reverse (10 μm, Generi Biotech, ČR)- Tabulka 12
- bovinní sérový albumin (BSA, 10 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA)
- Taq purple DNA polymeráza (1 U/μl, Top-Bio, ČR)

Tab. 12: **Použité primery pro SSU giardií** (Sulaiman et al. 2003b)

Primární PCR	Sekvence
GIAF1	5' - AAA TIA TGC CTG CTG GTC G -3'
GIAR1	5' - CAA ACC TTI TCC GCA AAC C -3'
Sekundární PCR	Sekvence
GIAF2	5' - CCC TTC ATC GGI GGT AAC TT -3'
GIAR2	5' - GTG GCC ACC ACI CCC GTG CC -3'

Tab. 13: **Reagencie pro jeden vzorek** (v μl)

reagencie	koncentrace	primární PCR	sekundární PCR
H <sub>2</sub> O		14,70	18,70
10× buffer		2,50	2,50
dNTP	10 mM	0,50	0,50
forward	10 μM	0,50	0,50
reverse	10 μM	0,50	0,50
BSA	10 mg/ml	1	-
Taq	1 U/1μl	0,30	0,30
DNA		5	2
Celkem		25 μl	25 μl

Tabulka 14: **Amplifikační program PCR**

94 °C.....	3 min. (počáteční denaturace DNA)
35 cyklů:	
94°C.....	45 s. (denaturace DNA)
50°C.....	45 s. (nasedací teplota primerů)
72°C.....	60 s. (syntéza nového řetězce DNA)
72°C.....	10 min. (dosyntetizování nového řetězce DNA)

### **Gelová elektroforéza**

V tomto kroku došlo k rozdělení DNA fragmentů v 1 % agarózovém gelu podle molekulových hmotností působením elektrického pole.

Použité chemikálie:

- 50× koncentrovaný TAE pufr: 242 g TRIS base, 57,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA (pH=8)
- agaróza (Serva Electrophoresis, Germany)
- ethidium-bromid (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, USA)
- 100 bp DNA Ladder (Fermentas International Inc., Canada)

Pracovní postup:

Byl připraven 1% agarózový gel smícháním agarózy s 1× TAE puforem a rozpuštěním v mikrovlnné troubě (přibližně 2 minuty). Následně byla směs ochlazena pod tekoucí vodou přibližně na 40 °C a byl přidán ethidium bromid tak, aby jeho celková koncentrace v gelu byla 0,5 ng/μl. Roztok byl důkladně promíchán a nalit do připraveného nosiče s hřebeny, kde se nechal zcela ztuhnout. Po ztuhnutí byly hřebeny vyndány, nosič s gelem byl vložen do elektroforetického tanku a zalit 1× TAE puforem. Do vzniklých jamek bylo nanášeno 19 μl sekundárního produktu PCR. Poté proběhla elektroforéza při napětí 80 V, dokud nedošlo k separaci sledovaných fragmentů (cca 45 min.). Výsledné fragmenty byly detekovány UV transiluminátorem (Electronic UV transilluminator, Ultra-Lum, Inc.) při vlnové délce 302 nm. Jako DNA marker byl použit 100 bp DNA ladder (Fermentas).

### **Extrakce z gelu- SPIN PROTOKOL QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit Protokol, Qiagen)**

V případě pozitivního nálezu u některého z vyšetřovaných vzorků byla vyříznuta oblast, kde se vyskytovala DNA pozitivního vzorku. Tato DNA se musela z gelu uvolnit.

Použité chemikálie:

QG pufr

PE pufr

EB pufr

Pracovní postup:

Na UV transilluminátoru byl čistým skalpelem z agarózového gelu vyříznut fragment obsahující DNA. Fragment byl dán do připravené mikrozkušavky a bylo k němu připipetováno 400  $\mu$ l QG pufru. Následovala inkubace 10 minut při 50 °C (rozpuštění gelu bylo opakovaně kontrolováno, každé 2 – 3 minuty byl obsah zkumavky promíchán). Po rozpuštění byl ve zkumavce žlutý roztok, který byl napipetován na kolonu a centrifugován 1 minutu při rychlosti 16 000 g. Odpad ze sběrné zkumavky byl slit a na kolonu bylo napipetováno 500  $\mu$ l QG pufru. Následovala centrifugace 1 minutu při 16 000 g, odpad ze sběrné zkumavky byl opět slit a kolona byla promyta připipetováním 750  $\mu$ l PE pufru. Následovala inkubace 2 – 5 minut při laboratorní teplotě a poté opět centrifugace 1 minutu při 16 000 g. Odpad ze sběrné zkumavky byl slit a zkumavka byla opět centrifugována 1 minutu při 16 000 g. Následně byla kolona přenesena na čistou 1,5 ml mikrozkušavku a byla provedena eluce napipetováním 40  $\mu$ l EB pufru přímo na střed kolony. Obsah zkumavky byl inkubován 1 minutu při laboratorní teplotě a poté centrifugován 1 minutu při 16 000 g. Získaná DNA byla vysušena ve vakuovém evaporizátoru (DyNAVap, Labnet) a poté do doby sekvenace uskladněna při teplotě 4 °C



## **Sekvenace**

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány zakázkově komerční službou (Macrogen, Inc., Seoul, Korea). Sekvenace byly upraveny v programu ChromasPro a porovnány se sekvencemi uloženými v databázi GenBank pomocí programu ClustalX.

## 4. Výsledky

### 4.1. Mikroskopické vyšetření trusu

#### 4.1.1. Výsledky vyšetření trusu dle Miláčka a Vítovce

Výsledky tohoto barvení, které je specifické pro oocysty kryptosporidií, jsou uvedeny v tabulce č. 15 a 16. Znamky positivity vykazoval pouze jeden vzorek ze soba polárního. Tento nález však nebyl potvrzen metodou PCR.

Tab. 15: Výsledky detekce kryptosporidií u savců barvením dle Miláčka a Vítovce

Vyšetřovaní savci	Počet vzorků	Počet pozitivních nálezů
<i>Alopex lagopus</i>	7	0
<i>Microtus levis</i>	2	0
<i>Rangifer tarandus platyrhynchus</i>	40	1

Tab. 16: Výsledky detekce kryptosporidií u ptáků barvením dle Miláčka a Vítovce

Vyšetřovaní ptáci	Počet vzorků	Počet pozitivních nálezů
<i>Anas crecca</i>	1	0
<i>Anas platyrhynchos</i>	2	0
<i>Anser brachyrhynchus</i>	9	0
<i>Branta bernicla</i>	12	0
<i>Branta leucopsis</i>	2	0
<i>Fratercula arctica</i>	1	0
<i>Lagopus muta hyperborea</i>	3	0
<i>Somateria mollissima</i>	6	0
<i>Sterna paradisaea</i>	2	0

## 4.2. Molekulární vyšetření trusu

### 4.2.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Při zjišťování přítomnosti rodu *Cryptosporidium* byly pozitivní 3 vzorky a každý z nich pocházel z jiného zvířete. Jednalo se o husu krátkozobou, bernešku bělolící a soba polárního. Při zjišťování přítomnosti mikrosporidií bylo 5 vzorků pozitivních na *E. cuniculi* genotyp II, z toho 3 pocházely- ze soba polárního, jeden z lišky polární a jeden z bernešky bělolící. Dále byl jeden vzorek ze soba polárního a husy krátkozobé pozitivní na *E. bieneusi*. V obou případech to byl neznámý genotyp.. Všechny pozitivní fragmenty DNA byly zaslány na sekvenaci a následně byly fylogeneticky analyzovány. Ani u jednoho vzorku nebyla zjištěna přítomnost obou parazitů. Přítomnost giardií nebyla potvrzena ani v jednom ze zkoumaných vzorků.

### 4.2.2. Vyhodnocení výsledků sekvenace a fylogenetické analýzy

Sekvenace a fylogenetická analýza ve vyšetřovaných vzorcích potvrdila přítomnost kryptosporidií a mikrosporidií. Pozitivní nálezy kryptosporidií jsou uvedeny v tabulce 17 a 18 a pozitivní nálezy mikrosporidií jsou uvedeny v tabulce 19, 20, 21 a 22.

Tab. 17: Výsledky molekulárního vyšetření přítomnosti kryptosporidií u savců

Vyšetřovaní savci	Počet vzorků	Počet pozitivních nálezů	Nalezený genotyp
<i>Alopex lagopus</i>	7	0	
<i>Microtus levis</i>	2	0	
<i>Rangifer tarandus platyrhynchus</i>	40	1	<i>C. muris</i> TS 03

Tab. 18: Výsledky molekulárního vyšetření přítomnosti kryptosporidií u ptáků

Vyšetřování ptáci	Počet vzorků	Počet pozitivních nálezů	Nalezený genotyp
<i>Anas crecca</i>	1	0	
<i>Anas platyrhynchos</i>	2	1	
<i>Anser brachyrhynchus</i>	9	0	<i>C. parvum</i> IIa
<i>Branta bernicla</i>	12	0	
<i>Branta leucopsis</i>	2	1	<i>Cryptosporidium</i> . goose genotype II
<i>Fratercula arctica</i>	1	0	
<i>Lagopus muta hyperborea</i>	3	0	
<i>Somateria mollissima</i>	6	0	
<i>Sterna paradisaea</i>	2	0	

*Cryptosporidium parvum* 100 % shodný se sekvencí z GenBank AF-10-88-64

*Cryptosporidium* goose genotype II 100 % shodný se sekvencí z GenBank AY-50-45-12

*Cryptosporidium muris* TS 03 100 % shodný se sekvencí z GenBank EU-24-50-43

Tab. 19: Výsledky molekulárního vyšetření přítomnosti druhu *Encephalitozoon* u savců

Vyšetřování savci	Počet vzorků	Počet pozitivních nálezů	Nalezený genotyp <i>Encephalitozoon</i>
<i>Alopex lagopus</i>	7	1	<i>E. cuniculi</i> genotyp II
<i>Microtus levis</i>	2	0	
<i>Rangifer tarandus platyrhynchus</i>	40	3	<i>E. cuniculi</i> genotyp II

Tab. 20: Výsledky molekulárního vyšetření přítomnosti druhu *Encephalitozoon* u ptáků

Vyšetřovaní ptáci	Počet vzorků	Počet pozitivních nálezů	Nalezený genotyp <i>Encephalitozoon</i>
<i>Anas crecca</i>	1	0	
<i>Anas platyrhynchos</i>	2	0	
<i>Anser brachyrhynchus</i>	9	0	
<i>Branta bernicla</i>	12	0	
<i>Branta leucopsis</i>	2	1	<i>E. cuniculi</i> genotyp II
<i>Fratercula arctica</i>	1	0	
<i>Lagopus muta hyperborea</i>	3	0	
<i>Somateria mollissima</i>	6	0	
<i>Sterna paradisaea</i>	2	0	

Tab. 21: Výsledky molekulárního vyšetření přítomnosti druhu *Enterocytozoon* u savců

Vyšetřovaní savci	Počet vzorků	Počet pozitivních nálezů	Nalezený genotyp <i>Enterocytozoon</i>
<i>Alopex lagopus</i>	7	0	
<i>Microtus levis</i>	2	0	
<i>Rangifer tarandus platyrhynchus</i>	40	1	<i>E. bieneusi</i> (nový g.)

*Enterocytozoon bieneusi* z 99,1 % podobný se sekvencí z GenBank JQ-80-49-71

Tab. č. 22: Výsledky molekulárního vyšetření přítomnosti druhu *Enterocytozoon* u ptáků

Vyšetřovaní ptáci	Počet vzorků	Počet pozitivních nálezů	Nalezený genotyp <i>Enterocytozoon</i>
<i>Anas crecca</i>	1	0	
<i>Anas platyrhynchos</i>	2	1	
<i>Anser brachyrhynchus</i>	9	0	<i>E. bieneusi</i> (nový g.)
<i>Branta bernicla</i>	12	0	
<i>Branta leucopsis</i>	2	0	
<i>Fratercula arctica</i>	1	0	
<i>Lagopus muta hyperborea</i>	3	0	
<i>Somateria mollissima</i>	6	0	
<i>Sterna paradisaea</i>	2	0	

*Enterocytozoon bieneusi* z 98,7% podobný se sekvencí z GenBank HM-99-25-16

## 5. Diskuse

V arktických oblastech dosud nebyl výskyt střevních parazitárních infekcí intenzivně studován. Provedené studie se zaměřovaly spíše na oblast nízké Arktidy. Tato práce rozšiřuje informace o výskytu jednobuněčných parazitů u volně žijících zvířat na Svalbardu, patřícího do vysoké Arktidy. Vyšetřovanou skupinou bylo několik druhů ptáků a zástupci jediných tří druhů suchozemských savců žijící na souostroví, kterými jsou liška polární, sob polární a zavlečený hraboš východoevropský. K detekci střevních parazitů u zvířat byl použit jejich trus.

Pro kryptosporidie specifickým barvením methylvioletí dle Miláčka-Vítovce byly rozpoznány oocysty u jednoho vzorku ze soba polárního. Následným provedením detekce pomocí metody PCR s daleko vyšší specifitou, však nález nebyl potvrzen, proto se tento vzorek musí považovat za negativní. Pravděpodobně se jednalo o záměnu oocyst s útvary jim podobným. Již zmíněná metoda PCR, však diagnostikovala přítomnost kryptosporidií u vzorků, jež byly metodou barvení negativní. Šlo vždy o jeden vzorek ze soba polárního, bernešky bělolící a husy krátkozobé.

Izolát z trusu soba polárního byl rozpoznán jako *Cryptosporidium muris* TS 03. Podle dostupné literatury jde o první nález tohoto genotypu u soba a tím výsledky této práce pravděpodobně rozšiřují spektrum hostitelů. Infekce vyvolaná *C. muris* již byla diagnostikována u lidí, zvláště infikovaných virem HIV (Tiangtip et Jongwutiwes 2002) a několika druhů zvířat. Ve Velké Británii a Španělsku byl popsán výskyt tohoto parazita u malých hlodavců (Chalmers et al. 1997, Torres et al. 2000). Dále byl tento parazit popsán ve dvou případech u kočky domácí (*Felis catus*) (Santín et al. 2006, Pavlásek et Ryan 2007). Mimo řadu savců byly oocysty tohoto parazita rozpoznány u hadů krmených myšmi s infekcí *C. muris* (Xiao et al. 2004). Podobného původu mohly být i oocysty popsané u ptačího hostitele lelkouna soviho (*Podargus stridooides*) (Ng et al. 2006).

Siefker a jeho spolupracovníci se zabývali výskytem kryptosporidií u arktických sobů- caribu (*Rangifer tarandus*) a losů (*Alces alces*) z oblasti severní Aljašky. Vyšetřovaný trus byl sbírán u stáda sobů z oblasi Teshekpuk Lake Herd (TLH) a

Western Arctic Herd (WAH). Vzorky sobů z oblasti TLH a z losů byly odebrány per rektum, zatímco z oblasti WAH byly sbírány ze země. Oocysty kryptosporidií byly rozpoznány ve 3 ze 49 vzorků trusu a všechny byly odebrány z území WAH. Na základě analýzy části genu pro malou ribozomální podjednotku a pro heat shock protein byla popsána příbuznost tohoto genotypu k *C. andersoni*, *C. muris* a *C. serpentis*, což byl první nález u divokých caribů. Ve vzorcích z losů a sobů z oblasti TLH oocysty kryptosporidií rozpoznány nebyly (Siefker et al. 2002). Populace sobů z těchto dvou studií jsou dlouhou dobu odděleny, a proto je zajímavé, že u obou skupin byla infekce způsobena žaludečními kryptosporidii.

Další studie se zabývala výskytem kryptosporidií u kojotů (*Canis latrans*) v USA a diagnostikovala pouze dva mikroskopicky pozitivní vzorky z celkového počtu sedmdesáti vzorků, které byly následně molekulárně analyzovány. Tím se potvrdil blízký fylogenetický vztah mezi izoláty z kojotů a *C. canis*. Tato kryptosporidie již byla u kojotů v USA diagnostikována (Trout et al. 2006, Thompson et al. 2009).

Kryptosporidíóza patří i mezi časté parazitární infekce ptactva, která byla popsána u více než 30 druhů ptáků (O'Donoghue 1995, Sreter et Varga, 2000) ve více než 30 zemích. Tento fakt se potvrdil i v mé práci, protože u bernešky bělolící (*Branta leucopsis*) jsem rozpoznala *Cryptosporidium* goose genotyp II a u husy krátkozobé (*Anser brachyrhynchus*) *Cryptosporidium parvum* IIa. Pro člověka jsou infekční *C. meleagridis* (Sreter et Varga 2000, Snyder et al. 1988), *C. baileyi* (Rhee et al. 1997, Abe et al. 2004), *C. galli* (Ryan et al. 2003), *C. parvum* (Zhou et al. 2004), *C. muris* a *C. andersoni* (Ng et al. 2006). Husa krátkozobá pro člověka může být zdrojem infekce (Zhou et al. 2004).

Výskytu kryptosporidií v trusu bernešky velké (*Branta canadensis*) v Kanadě se zabýval Zhou se spolupracovníky a popsali u ní 3 genotypy druhu *Cryptosporidium*: *C. goose* genotyp I, II, *duck* genotyp a 2 *Cryptosporidium* spp. *C. parvum* a *C. hominis*. *C. goose* genotyp I byl již dříve popsán (Xiao et al. 2002), ale *C. goose* genotyp II do té doby u hus velkých rozpoznán nebyl. Hlavními hostiteli *C. parvum* jsou přežvýkavci a *C. hominis* lidé, proto by bernešky velké mohly být potenciálním zdrojem pro tyto vnímavé jedince, ale vzhledem k poměrně malému výskytu představují pro člověka



minimální zdroj infekce. Tato studie tedy ukázala, že se u kanadské husy vyskytují kryptosporidie, jež vyvolávají infekci u kachen, hus, lidí a přežvýkavců (Zhou et al. 2004).

Dalšími hledanými parazity byly mikrosporidie, u kterých výsledky této práce pravděpodobně také rozšiřují hostitelské spektrum. Ve své vyšetřované skupině jsem u třech vzorků ze soba polárního (*Rangifer tarandus platyrhynchus*) a jednom z bernešky bělolící (*Branta leucopsis*) diagnostikovala parazita *E. cuniculi* genotyp II. U těchto dvou druhů zvířat se podle dostupné literatury jedná o první nález a tím tato práce pravděpodobně rozšiřuje spektrum hostitelů pro *E. cuniculi* genotyp II. Díky nízké hostitelské specifitě může *E. cuniculi* infikovat řadu hostitelů (Didier et al. 1998, Weber et al. 1994). Hojně je rozšířen mezi savci, především u králíků (Canning et al. 1986). Dalším vnímavým hostitelem ze savců jsou lišky (Åkerstedt 2002). Tato infekce byla diagnostikována u imunodeficitních i imunokompetentních osob (Mathis et al. 2005, Sak et al. 2011). Kašičková a její kolegové popsali tohoto parazita u australského papouška a u exotických druhů ptáků (Kašičková et al. 2007, 2009). V poslední době byl patogenní *Encephalitozoon* sp. rozpoznán u nového hostitele z ptačí říše. Malčková s kolektivem vyšetřili 30 vzorků trusu rarocha (*Falco rusticolus*) a zjišťovala přítomnost mikrosporidií. Mikroskopická analýza ukázala v 5 vzorcích přítomnost jasně fluoreskujících oválných útvarů o velikosti 1,5 x 3 µm, charakteristických pro kmen *Microsporidia*. Molekulární metoda PCR však prokázala přítomnost spór pouze ve 2 vzorcích, ve kterých byl rozpoznán *E. cuniculi* genotyp II a tím byl u tohoto parazita popsán nový hostitel (Malčková et al. 2010).

U lišek polárních byl v roce 2002 popsán *Encephalitozoon cuniculi*, který u nich může vyvolat závažnou infekci. Jednalo se o chovaná zvířata v Norsku a infekce vedla k velkým ztrátám mláďat (Åkerstedt 2002). Vzhledem k tomu, že *E. cuniculi* byl popsán u několika hlodavců, mohou být pro lišky rezervoárem infekce (Hersteinsson et al. 1993).

Při detekci mikrosporidií jsem v jednom vzorku z lišky polární diagnostikovala *E. cuniculi* genotyp II, což je podle dostupné literatury první izolát tohoto parazita z volně žijících lišek.

Sørensen se spolupracovníky se zabývali úmrtím jedné dospělé samice a dvou mláďat divokých arktických lišek na Svalbardu. U všech byla diagnostikována akutní toxoplazmóza a v jednom případě byla popsána i koinfekce se *Salmonella enteritidis* a *Yersinia pseudotuberculosis*, což mohlo přispět k závažnosti infekce toxoplasmou (Sørensen et al. 2005). *Toxoplasma gondii* je rozšířena po celém světě a jejím jediným známým definitivním hostitelem je kočka domácí a jiné kočkovité šelmy (Frenkel et al. 1970). Kočky jsou považovány za nezbytnou součásti vývojového cyklu, a proto se tato infekce u zvířat na ostrovech, kde nejsou kočkovité šelmy, téměř nevyskytuje (Wallace, 1973, Munday 1972, Dubey et al. 1997). Protilátky proti *Toxoplasma gondii* byly na Svalbardu popsány i u některých druhů ptáků (Prestrud et al. 2007).

Tato práce se zabývala i druhem *Enterocytozoon bieneusi*. Parazit byl rozpoznán u jednoho vzorku ze soba polárního a husy krátkozobé. Tyto dva vzorky byly pozitivní na nové genotypy *E. bieneusi*. Izolát ze soba polárního je velmi příbuzný k *E. bieneusi* Horse genotyp 3, který byl popsán v ČR u koní. Izolát z husy krátkozobé je příbuzný k *E. bieneusi* CHN7 z prasete, který byl popsán v Číně. Tento parazit má široké hostitelské spektrum. Mezi jeho dosud popsané hostitele patří řada domácích savců, včetně člověka (Mansfield et al. 1997, Deplazes et al. 1996, Lores et al. 2002, Lobo et al. 2006). Dále *E. bieneusi* popsán i u řady ptáků, kteří tím mohou pro člověka představovat rezervoár infekce (Kašičková et al. 2009).

Práce Sulaimana a jeho kolegů studovala výskyt *E. bieneusi* ve východním Marylandu. Vyšetřovanou skupinu tvořilo 465 volně žijících savců, mezi kterými byli bobří, lišky, ondatry, vydry a mývalové. Z celkového množství bylo pozitivních 59 vzorků (9 izolátů z lišek, 13 z bobrů, 20 z ondatr, 15 z mývalů a 2 z vydry). Věk infikovaných zvířat se pohyboval mezi 6-42 měsíci. V této studii bylo zjištěno celkem 17 různých genotypů *E. bieneusi*. Výsledky ukazují první případ výskytu *E. bieneusi* u volně žijících zvířat (Sulaiman et al. 2003a).

Výše zmíněná práce od Siefkera a jeho kolegů studovala nejen výskyt kryptosporidií, ale i giardií u arktických sobů- caribu (*Rangifer tarandus*) a losů (*Alces alces*) z oblasti severní Aljašky. Vyšetřovaný materiál byl stejný jako v případě detekce

kryptosporidií, avšak výsledky se lišily. Giardie nebyly diagnostikovány ani v jednom ze vzorků trusu losů a sobů (Siefker et al. 2002).

Výskytem giardií u jelenovitých v Norsku se zabýval Hamnes s kolegy. V jejich práci popisují výskyt giardií u srnců (*Capreolus capreolus*), losů (*Alces alces*) a sobů (*Rangifer tarandus*). Na rozdíl od mých výsledků, kde jsem prokázala přítomnost kryptosporidií a nediaagnostikovala jsem giardie, jeho studie popisuje častější infekci giardiemi než kryptosporidiemi (Hamnes et al. 2006a). Toto zjištění by zřejmě mohlo být způsobeno delším trváním giardiózy, při níž se cysty mohou vylučovat více než 30 týdnů, zatímco při kryptosporidióze dochází k vylučování oocyst 1-2 týdny (Olson et al. 2004). Dalším důvodem vyšší prevalence giardií mohl být věk vyšetřované zvěře (starší než 3 měsíce). Z domácích druhů, jako je dobytek, je známo, že kryptosporidie jsou rozšířenější mezi mladými zvířaty, zatímco giardie jsou častěji diagnostikovány u starších zvířat (Olson et al. 2004).

V Norsku byla zjišťována přítomnost cyst giardií ve 269 vzorcích trusu lišek polárních. Molekulární metody diagnostikovaly 7 pozitivních vzorků (3 dospělé samice, 2 samce, 1 samčí a 1 samičí mládě) (Hamnes et al. 2007).

V této práci byly posledními hledanými parazity giardie, které nebyly nalezeny ani v jednom z vyšetřovaných vzorků. Možným důvodem je malá vyšetřovaná skupina nebo dlouhodobé zamrzání vod, které giardie nejsou schopny přežít. Vzhledem k malému množství vyšetřovaných vzorků nelze jednoznačně potvrdit hypotézu, že se giardie na Svalbardu nevyskytují. Pravděpodobně tam přítomny jsou, už jen díky turistice a migrujícím ptákům.

Dalším zdravotním problémem na Svalbardu je zavlečení parazita *Echinococcus multilocularis*, který je původcem alveolární echinokokózy, jedné z nejvíce zdraví ohrožujících zoonóz v severských oblastech. Byl popsán v Evropě, některých částech Severní Ameriky a Asii (Vuitton et al. 2003). K dosažení svého životního cyklu potřebuje masožravého hostitele, kterým je liška obecná (*Vulpes vulpes*) nebo liška polární (*Alopex lagopus*) v severských zeměpisných šířkách a hlodavce (Rausch 1995, Vuitton et al. 2003). Životní cyklus byl umožněn díky zavlečení mezihostitele- hraboše východoevropského (*Microtus levis*), nejspíše z okolí Petrohradu v Rusku.

Pravděpodobně k tomu došlo v první polovině 20. století těžbou dřeva a námořní činností (Henttonen et al. 2001). Dále mohlo dojít k introdukci parazita díky přesunu lišek na ledových krách po moři mezi Svalbardem a oblastí Sibiře, kde je vyšší výskyt *E. multilocularis* (Henttonen et al. 2001). K zavlečení také mohlo dojít díky turistice z kontinentální Evropy a vědeckému zkoumání ve 20. století (Knapp et al. 2012). Vzhledem ke zjištěnému výskytu echinokokózy, i když je poměrně malý, se nedoporučuje pití povrchové vody. V trusu lišek, který jsem měla k dispozici, se nepodařilo echinokoka zachytit, protože pocházely z míst, kde se nevyskytují hraboši, a tudíž nemohlo dojít k dosažení jejich životního cyklu.

Vývojová stádia parazitů nacházejících se v hostiteli, žijí ve stálé teplotě. Avšak nízká teplota, kdy klidová stádia (oocysty, spory a cysty) přežívají mimo tělo hostitele, může ovlivnit jejich přenos. Výsledky mé bakalářské práce prokázaly, že v případě kryptosporidií a mikrosporidií jsou tyto stádia odolná a podmínky Vysoké Arktidy nebrání v jejich přenosu na jiné hostitele. Ve své práci dokonce rozšiřují hostitelské spektrum *C. muris* TS 03 a *E. cuniculi* genotyp II. Dále byly nalezeny nové genotypy *E. bieneusi*. Riziko infekce střevními parazity je v arktických oblastech vyšší, kvůli pití povrchové vody a permafrostu, než v jiných zeměpisných šířkách. Myslím, že by se výskyt parazitárních infekcí v arktických oblastech, zvláště v oblasti Vysoké Arktidy měl studovat intenzivněji.

## 6. Závěr

I. Parazitologické vyšetřením vzorků trusu divoce žijících zvířat barvicí metodou byl nalezen jeden pozitivní vzorek. Tento nález však nebyl v korelaci s metodou molekulární.

II. Molekulární metodou PCR byla prokázána přítomnost kryptosporidií u husy krátkozobé (*Anser brachyrhynchus*), bernešky bělolící (*Branta leucopsis*) a soba polárního (*Rangifer tarandus platyrhynchus*). Tyto nálezy byly identifikovány jako *C. parvum* IIa u husy krátkozobé, *C. goose* genotyp II u bernešky bělolící a *C. muris* TS 03 u soba polárního. Prevalence u suchozemských savců jsou 2 % a u ptáků 5 %.

III. Mikrosporidie *E. cuniculi* genotyp II byla diagnostikována ve třech vzorcích ze soba polárního (*Rangifer tarandus platyrhynchus*), po jednom vzorku z lišky polární (*Alopex lagopus*) a bernešky bělolící (*Branta leucopsis*). Druh *E. bieneusi* byl diagnostikován u soba polárního (*Rangifer tarandus platyrhynchus*) a husy krátkozobé (*Anser brachyrhynchus*). V obou případech to byl nový genotyp. Celková prevalence mikrosporidií u suchozemských savců je 10 % a u ptáků 5 %.

IV. V případě detekce kryptosporidií a mikrosporidií se potvrdila H2: původci střevních parazitárních infekcí jsou přítomni i ve vysoké Arktidě na Svalbardu. Přítomnost giardií nebyla prokázána v žádném vzorku. Nepotvrdila se H1 ani H2 vzhledem k poměrně malému počtu vyšetřovaného materiálu.

## 7. Seznam použitých zdrojů

- ÅKERSTEDT, J. (2002): An Indirect ELISA for Detection of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Farmed Blue Foxes (*Alopex lagopus*). Acta. Vet. Scand. 43: 211–220.
- ABE, N. et ISEKI, M. (2004): Identification of *Cryptosporidium* isolates from cockatiels by direct sequencing of the PCR-amplified small subunit ribosomal RNA gene. Parasitol. Res. 92: 523–526.
- ADAM, R.D. (2001): Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14: 447–475.
- ALVAREZ-PELLITERO, P., QUIROGA, M.I., SITJA-BOBADILLA, A., REDONDO, M.J., PALENZUELA, O., PADROS, F., VAZQUEZ, F., NIETO, J.M. (2004): *Cryptosporidium scophthalmi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Light and electron microscope description and histopathological study. Dis. Aquat. Organ. 62: 133–145.
- ALVAREZ-PELLITERO, P. et SITJA-BOBADILLA, A. (2002): *Cryptosporidium molnari* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting two marine fish species, *Sparus aurata* L. and *Dicentrarchus labrax* L. Int. J. Parasitol. 32: 1007–1021.
- APPELBEE, A.J., THOMPSON, R.C.A., OLSON, M.E. (2005): *Giardia* and *Cryptosporidium* in wildlife-current status and future needs. Trends Parasitol. 21: 370–376.
- BANFIELD, A.W. F. (1961): A revision of the reindeer and caribou, genus *Rangifer*. National Museum of Canada. 177: 1–137.
- BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. (1996): Lékařská mikrobiologie, Praha: Marvil, 558S.
- BENCHIMOL, M. (2004): Participation of the adhesive disc during karyokinesis in *Giardia lamblia*. Biol. Cell. 96: 291–301.

- BENCHIMOL, M. (2005): The nuclei of *Giardia lamblia* – new ultrastructural observations. Arch. Microbiol. 183: 160–168.
- BLASI, M.F., CARERE, M., POMPA, M.G., RIZZUTO, E., FUNARI, E. (2008): Water-related diseases outbreaks reported in Italy. J. Wat. Health. 6: 423–432.
- BRETAGNE, S., FOULET, F., ALKASSOUM, W., FEITH, J.F., DEVELOUX, M. (1993): Prévalence des spores d'*Enterocytozoon bieneusi* dans les selles de patients sidéens et d'enfants Africains non infectés par le VIH. Bull. Soc. Pathol. Exot. 86: 351–357.
- BRYAN, R.T., CALI, A., OWEN, R.L., SPENCER, H.C. (1991): Microsporidia: opportunistic pathogens in patients with AIDS. Prog. Clin. Parasitol. 2: 1–26.
- BUCKHOLT, M.A., LEE, J.H., TZIPORI, S. (2002) Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2595–2599.
- CACCIÒ, S.M., THOMPSON, A.R.C., MCLAUCHLIN, J., SMITH, H.W. (2005): Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. Trends Parasitol. 21: 431–437.
- CANNING, E.U. et HOLLISTER, W.S. (1992a): Human infections with microsporidia. Rev. Med. Microbiol. 2: 35–42.
- CANNING, E.U. et HOLLISTER, W.S. (1992b): The importance of microsporidia as opportunistic infections in patients with acquired immune deficiency syndrome. Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. 4: 422–427.
- CANNING, E.U., LOM, J., DYKOVÁ, I. (1986): The microsporidia of vertebrates. Academic Press, Inc. New York. 289S
- CARRENO, R. A., MARTIN, D. S., BARTA, J. R. (1999): *Cryptosporidium* is more closely related to gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. Parasit. Res. 85: 899–904.

- CASTRO-HERMIDA, J.A., ALMEIDA, A., GONZALEZ-WARLETA, M., CORREIA DA COSTA, J.M., RUMBO LORENZO, C., MEZO, M. (2007): Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *Giardia duodenalis* in healthy adult domestic ruminants. *Parasitol.Res.* 101: 1443–1448.
- CASTRO-HERMIDA, J.A., CARRO-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). *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Pub. Health* 53: 244–246.
- CASTRO-HERMIDA, J.A., DELAFOSSE, A., PORS, I., ARES-MAZÁS, E., CHARTIER, C. (2005): *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* infections in adult goats and their implications for neonatal kids. *Vet. Record.* 157: 623–627.
- CAVALIER-SMITH, T. (2003): Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European J. Protist.* 39: 338–348.
- COKLIN, T., FARBER, J., PARRINGTON, L., DIXON, B. (2007): Prevalence and molecular characterization of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* sp. in dairy cattle in Ontario, Canada. *Vet. Parasitol.* 150: 297–305.
- COOK, N., NICHOLS, R.A., WILKINSON, N., PATON, C.A., BARKER, K., SMITH, H.V. (2007): Development of a method for detection of *Giardia duodenalis* cysts on lettuce and for simultaneous analysis of salad products for the presence of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 7388–7391.
- COTTE, L., RABODONIRINA, M., CHAPUIS, F., BAILLY, F., BISSUEL, F., RAYNAL, C., GELAS, P., PERSAT, F., PIENS, M.A., TREPO, C. (1999): Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in person with and without human immunodeficiency virus infection. *J. Infect. Dis.* 180: 2003–2008.



- CURRENT, W.L., UPTON, S.J., HAYNES, T.B. (1986): The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplex, Cryptosporidiidae) infecting chickens. J. Protozool. 33: 289–296.
- DALY, E.R., ROY, S.J., BLANEY, D.D., MANNING, J.S., HILL, V.R., XIAO, L., STULL, J.W. (2010): Outbreak of giardiasis associated with a community drinking-water source. Epidemiol. Infect. 138: 491–500.
- DEGERBØL, M. (1957): The extinct reindeer of East Greenland. Acta Arctica 10: 57S.
- DENG, M.Q. et CLIVER, D.O. (1999): Improved immunofluorescence assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* from asymptomatic adult cervine animals. Parasitol. Res. 85: 733–736.
- DEPLAZES, P., MATHIS, A., MÜLLER, C., WEBER, R. (1996): Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples of pigs. J. Eukaryot. Microbiol. 43: 93S.
- DESPORTES, I., LE CHARPENTIER, Y., GALIAN, A. (1985): Occurrence of a new microsporidian, *Enterocytozoon bieneusi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. J. Protozool. 32: 250–254.
- DIDIER, E.S. (2005): Microsporidiosis: An emerging and opportunistic infection in humans and animals. Acta. Trop. 94: 61–76.
- DIDIER, E.S., SNOWDEN, K.F., SHADDUCK, J.A. (1998): Biology of microsporidian species infecting mammals. Adv. Parasitol. 40: 283–320.
- DIDIER, E.S., VOSSBRINCK, C.R., BAKER, M.D., ROGERS, L.B., BERTUCCI, D.C., SHADDUCK, J.A. (1995): Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. Parasitology 111: 411–421.
- DUBEY, J.P., ROLLOR, E.A., SMITH, K., KWOK, O.C.H., THULLIEZ, P. (1997): Low seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in feral pigs from a remote island lacking cats. J. Parasitol. 83: 839–841.

- 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. *N. Engl. J. Med.* 332: 855–859.
- EDLIND, T.D., KATIYAR, S., VISVESVARA, G.S., LI, J. (1996): Evolutionary origins of microsporidia and basis for benzimidazole sensitivity: An update. *J. Eukaryot. Microbiol.* 43: 109S.
- EISENSTEIN, L., BODAGER, D., GINZL, D. (2008): Outbreak of giardiasis and cryptosporidiosis associated with a neighborhood interactive water fountain—Florida, 2006. *J. Environ. Health.* 71: 8–22.
- ELMENDORF, H.G., DAWSON, S.C., MCCAFFERY, J.M. (2003): The cytoskeleton of *Giardia lamblia*. *Int. J. Parasit.* 33: 3–28.
- ENRIQUES, F.J., TAREN, D., CRUZ-LOPEZ, A., MURAMOTO, M., PALTING, J.D., CRUZ, P. (1998): Prevalence of intestinal encephalitozoonosis in Mexico. *Clin. Infect. Dis.* 26: 1227–1229.
- FAYER, R. (2004): *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet. Parasitol.* 126: 37–56.
- FAYER, R. et SANTÍN, M. (2009): *Cryptosporidium xiaoi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in sheep (*Ovis aries*). *Vet. Parasitol.* 164: 192–200.
- FAYER, R., SANTÍN, M., MACARISIN, D. (2010): *Cryptosporidium ubiquitum* n. sp. in animals and humans. *Vet. Parasitol.* 172: 23–32.
- FAYER, R., SANTÍN, M., TROUT, J.M. (2008): *Cryptosporidium ryane* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Vet. Parasitol.* 156: 191–198.
- FAYER, R., SANTIN, M., XIAO, L. (2005): *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *J. Parasitol.* 91: 624–629.

- FAYER, R., SPEER, C. A., DUBEY, J. P. (1990): General biology of *Cryptosporidium*. In *Cryptosporidiosis of Man and Animals*, Dubey, J. P., Speer, C. A. and Fayer, R., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1.
- FAYER, R., SPEER, C.A., DUBEY, J.P. (1997): The general biology of *Cryptosporidium*. Fayer, R (Eds) *Cryptosporidium and cryptosporidiosis* Boca Raton (FL): CRC Press 1–41.
- FAYER, R., TROUT, J.M., JENKINS, M.C. (1998): Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J. Parasitol.* 84: 1165–1169.
- FAYER, R., TROUT, J.M., XIAO, L., MORGAN, U., LAL, A.A., DUBEY, J.P. (2001): *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *J. Parasitol.* 87: 1415–1422.
- FAYER, R. et XIAO, L. (2008): General biology. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium and cryptosporidiosis*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1-42.
- FENG, Y., ORTEGA, Y., HE, G., DAS, P., XU, M., ZHANG, X., FAYER, R., GATEI, W., CAMA, V., XIAO, L. (2007) Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Vet. Parasitol.* 144: 1–9.
- FILICE, F.P. (1952): Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. *Univ. Calif. Publ. Zool.* 57: 53–146.
- FRAFJORD, K. (1992): Behavioural ecology and behavioural energetics in the arctic fox (*Alopex lagopus*). PhD thesis, University of Bergen, Bergen, Norway.
- FRAFJORD, K. (1993): Food habits of arctic foxes (*Alopex lagopus*) on the western coast of Svalbard. *Arctic.* 46: 49–54.
- FRANZEN, C. (2008): *Microsporidia*: A Review of 150 Years of Research. *The Open Par. J.* 2: 1–34.

- FRANZEN, C. et MÜLLER, A. (1999): Cryptosporidia and microsporidia – waterborne diseases in the immunocompromised host. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 34: 245–262.
- FRENKEL, J.K., DUBEY, J.P., MILLER, N.L. (1970): *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. *Science* 167: 893–896.
- GEURDEN, T., GELDHOF, P., LEVECKE, B., MARTENS, C., BERKVEN, D., CASAERT, S., VERCRUYSSSE, J., CLAEREBOUT, E. (2008): Mixed *Giardia duodenalis* assemblage A and E infections in calves. *Int. J. Parasitol.* 38: 259–264.
- GEURDEN, T., VERCRUYSSSE, J., CLAEREBOUT, E. (2010): Is *Giardia* significant pathogen in production animals? *Exp. Parasit.* 124: 98–106.
- GHOSH, K., CAPIELLO, C.D., MCBRIDE, S.M., OCCI, J.L., CALI, A., MCDONALD, T.V., WEISS, L.M., TAKVORIAN, P.M. (2006): Functional characterization of a putative aquaporin from *Encephalitozoon cuniculi*, a microsporidia pathogenic to humans. *Int. J. Parasit.* 36: 57–62.
- GHOSH, S., FRISARDI, M., ROGERS, R., SAMUELSON, J. (2001): How *Giardia* swim and divide. *Infect. Immun.* 69: 7866–7872.
- GOLDFARB, J., TANNOWITZ, H., GROSSNER, R., BONANNO, C., KAUFMAN, D., MA, P., et al. (1982): Cryptosporidiosis: assessment of chemotherapy of males with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 31: 589–591.
- GRÉGR, J., KRÁL, V., RUBÍN, J. (1997): Norsko. 1.vyd. Praha. Nakl. Olympia. 172S.
- HAMNES, I.S., GJERDE, B., FORBERG, T., ROBERTSON, L. (2007): Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Vet. Parasitol.* 143: 347–353.
- HAMNES, I.S., GJERDE, B., ROBERTSON, L. (2006a): Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dairy calves in three areas of Norway. *Vet. Parasitol.* 140: 204–216.

- HAMNES, I.S., GJERDE, B., ROBERTSON, L., VIKØREN, T., HANDELAND, K. (2006b): Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in free-ranging wild cervids in Norway. *Vet. Parasitol.* 141: 30–41.
- HEITMAN, T.L., FREDERICK, L.M., VISTE J.R., GUSELLE N.J., MORGAN U.M., THOMPSON R.C.A., OLSON M.E. (2002): Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. *Can. J. Microbiol.* 48: 530–541.
- HENTTONEN, H., FUGLEI, E., GOWER, C.N., HAUKISALMI, V., IMS, R.A., NIEMIMAA, J., YOCCOZ, N.G. (2001): *Echinococcus multilocularis* on Svalbard: Introduction of an intermediate host has enabled the local life-cycle. *Parasitol.* 123: 547–552.
- HERSTEINSSON, P, GUNNARSSON, E, HJARTARDÓTTIR, S, SKÍRNISSON, K. (1993): Prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in terrestrial mammals in Iceland, 1986 to 1989. *J. Wild. Dis.* 29: 341–344.
- HIRT, R.P., LOGSDON, J.R. JM, HEALY B, DOREY MW, DOOLITTLE WF, EMBLEY TM. (1999): Microsporidia are related to Fungi: evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 580–585.
- HOOVER, D.M., HOERR, F.J., CARLTON, W.W., HINSMAN, E.J., FERGUSON, H.W. (1981): Enteric cryptosporidiosis in a naso tang, *Naso lituratus*, Bloch and Schneider. *Fish Diseases* 4: 425–428.
- CHALMERS, R.M., STURDEE, A.P., BULL, S.A., MILLER, A., WRIGHT, S.E. (1997) The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitol. Res.* 83: 478–482.

- CHAN, C.M.L., THENG, J.T.S., LIM, L., TAN, D.T.H. (2003): Microsporidial keratoconjunctivitis in healthy individuals: A case series. *Ophthalmol.* 110: 1420–1425.
- INMAN, L.R. et TAKEUCHI, A. (1979): Spontaneous cryptosporidiosis in an adult female rabbit. *Vet. Pathol.* 16: 89–95.
- ISEKI, M. (1979): *Cryptosporidium felis* sp. N. (Protozoa, Eimeriorina) from the domestic cat. *JPN J. Parasitol.* 28: 285–307.
- ITAGAKI, T., KINOSHITA, S., AOKI, M., ITOH, N., SAEKI, H., SATO, N., UETSUKI, J., IZUMIYAMA, S., YAGITA, K., ENDO, T. (2005): Genotyping of *Giardia intestinalis* from domestic and wild animals in Japan using glutamate dehydrogenase gene sequencing. *Vet. Parasitol.* 133: 283–287.
- JENKINS, M., TROUT, J.M., HIGGINS, J., DORSCH, M., VEAL, D., FAYER, R. (2003): Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitol. Res.* 89: 1–5.
- JIANG, J, ALDERISIO, K.A., XIAO, L. (2005): Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4446–4454.
- JÍRA, J. (2009): Lékařské protozoologie Protozoální nemoci, 1. vydání. Praha: Galén, 567S. ISBN 978-80-7262-381-5.
- JIRKŮ, M., VALIGUROVÁ, A., KOUDELA, B., KRÍZEK, J., MODRÝ, D., ŠLAPETA, J. (2008): New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morfology, biology and phylogeny. *Folia Parasitol.* 55: 81–98.
- KARANIS, P., KOURENTI, C., SMITH, H. (2007): Water-borne transmission of protozoan parasites: a review of world-wide outbreaks and lessons learnt. *J. Wat. Health* 5: 1–38.

- KAŠIČKOVÁ, D., SAK, B., KVÁČ, M., DITRICH, O. (2007): Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host-cockateel (*Nymphicus hollandicus*) using molecular methods. *Parasitol. Res.* 101: 1685–1688.
- KAŠIČKOVÁ, D., SAK, B., KVÁČ, M., DITRICH, O. (2009): Sources of potentially infectious human microsporidia: molecular characterisation of microsporidia isolates from exotic birds in the Czech Republic, prevalence study and importance of birds in epidemiology of the human microsporidial infections. *Vet. Parasitol.* 165: 125–130.
- KATZWINKEL-WLADARSCH, S., LIEB, M., HEISE, W., LÖSCHER, T., RINDER, H. (1996): Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Trop. Med. Int. Health* 1: 373–378.
- KING B.J., KEEGAN A.R., MONIS P.T., SAINT C.P. (2005): Environmental temperature controls *Cryptosporidium* oocyst metabolic rate and associated retention of infectivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3848–3857.
- KNAPP, J., STAEBLER, S., BART, J.M., STIEN, A., YOCCOZ, N.G, DRÖGEMÜLLER, C, GOTTSTEIN, B., DEPLAZES, P. (2012): Echinococcus multilocularis in Svalbard, Norway: Microsatellite genotyping to investigate the origin of a highly focal contamination. *Infect. Genet. Evol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.008>.
- KORS HOLM, H. et HENRIKSEN, S.A. (1984): Infection with *Cryptosporidium* in roe deer (*Capreolus capreolus*). *Nord. Vet. Med.* 36: 266S.
- KOVACS, K.M., LYDERSEN, CH., ANDERSEN, M., BANGJORD, G., CANADAS, A., DALLMANN, W., DJOSELAND, O., DOWNING, G., FRANTZEN, B., FUGLEI, E., GERLAND, S., GOSSELIN, J.F., HAGEN, O., JACOBSEN, K.O., LESAGE, V., MCCALLUM, G., RUGH, D., STRANN, K.B., STROM, H., WOLKERS, H., YOCCOZ, N., AARS, J. et al. Birds and mammals of Svalbard. Grafisk Nord AS, 2006, 203S. ISBN- 13: 978-82-7666-231-3, 10: 82-7666-231-5.

- KUHN, R.C., ROCK, C.M., OSHIMA, K.H. (2002): Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in wild ducks along the Rio Grande River valley in southern New Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 161–165.
- LALLE, M., POZIO, E., CAPELLI, G., BRUSCHI, F., CROTTI, D., CACCIO, S.M. (2005): Genetic heterogeneity at the beta-giardin locus among human and animal isolates of *Giardia duodenalis* and identification of potentially zoonotic subgenotypes. *Int. Parasitol.* 35: 207–213.
- LARSSON, J.I.R. (1999): Identification of microsporidia. *Acta. Protozool.* 38: 161–197.
- LEADER-WILLIAMS, N. (1988): Reindeer on South Georgia. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- LEONHARD, S., PFISTER, K., BEELITZ, P., WIELINGA, C., THOMPSON, R.C.A. (2007): The molecular characterisation of *Giardia* from dogs in southern Germany. *Vet. Parasitol.* 150: 3–38.
- LEVINE, N.D. (1980): Some corrections of coccidian (Apicomplexa, Protozoa) nomenclature. *J. Parasitol.* 66: 830–834.
- LEVINE, N.D. (1984): Taxonomy and review of the coccidian genus *Cryptosporidium* (protozoa, Apicomplexa). *J. Protozool.* 31: 94–98.
- LI, J., KATIYAR, S., HAMELIN, A. (1996): Tubulin genes from AIDS associated microsporidia and implications for phylogeny and bendimidazole sensitivity. *Molec. Biochem. Parasitol.* 78: 289–295.
- 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*. *J. Eukar. Microbiol.* 47: 91–95.
- LOBO, M.L., XIAO, L., CAMA, V., MAGALHÃES, N., ANTUNES, F., MATOS, O., (2006): Identification of potentially human-pathogenic *Enterocytozoon bienersi* genotypes in various birds. *Appl. Environ. Microbiol.* 11: 7380–7382.



- LOPEZ-VELEZ, R., TURRIENTES, M.C., GARRON, C., MONTILLA, P., NAVAJAS, R., FENOY, S., DEL AGUILA, C. (1999): Microsporidiosis in travelers with diarrhea from the tropics. *J. Travel. Med.* 6: 223–227.
- LORES, B., DEL AGUILA, C., ARIES, C. (2002): *Enterocytozoon bienewisi* (Microsporidia), in faecal samples from domestic animals from Galicia, Spain. *Mam. Inst. Oswaldo Cruz.* 97: 941–945.
- LYDERSEN, C. et GJERTZ, I. (1986): Studies of the ringed seal (*Phoca hispida* Schreber 1775) in its breeding habitat in Kongsfjorden. Svalbard. *Polar Res.* 4: 57–63.
- MACINNES, E.F., STEWART, C.G. (1991): The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 62: 51–54.
- MAC KENZIE, 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. *N. Eng. J. Med.* 331: 161–167.
- MCROBERTS, K.M., MELONI, B.P., MORGAN, U.M., MARANO, R., BINZ, N., ERIANDSEN, S.L., HALSE, S.A., THOMPSON, R.C. (1996): Morphological and molecular characterization of *Giardia* isolated from the straw-necked ibis (*Threskiornis spinicollis*) in Western Australia. *J. Parasitol.* 82: 711–718.
- 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. *Vet. Parasitol.* 141: 48–59.
- MADSEN, J., KUIJKEN, E., MEIRE, P., COTTAAR, F., HAITJEMA, T., NICOLAISEN, P.I., BONES, T., MEHLUM, F. (1999): Pink-footed goose *Anser brachyrhynchus*: Svalbard. In: Madsen, J., Fox, T., Cracknell, J. (Eds.), *Goose Populations of the Western Palearctic. A review of Status and*

Distribution. Wetlands International Publication Wetlands International, Wageningen. National Environ. Research. Instit. 48: 82–93.

- MALČEKOVÁ, B., VALENCAKOVA, A., LUPTAKOVA, L., MOLNAR, L., RAVASZOVA, P., NOVOTNY, F. (2010): First detection and genotyping of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host species, gyrfalcon (*Falco rusticolus*). Parasitol. Res. 108: 1479–1482.
- MANSFIELD, K.J., CARVILLE, A., HEBERT, D., CHALIFOUX, L., SHVETZ, D., LIN, K.C., TZIPORI, S., LACKNER, A. (1997): Identification of an *Enterocytozoon bieneusi*-like microsporidian in simian-immunodeficiency-virus-inoculated macaques with hepato-biliary disease. Am. J. Pathol. 150: 1395–1405.
- MATHIS, A., WEBER, R., DEPLAZES, P. (2005): Zoonotic potential of the microsporidia. Clin. Microbiol. Rev. 18: 423–445.
- MATSUBAYASHI, H., KOIKE, I., MIKATA, I., TAKEI, H., HIGIWARA, S. (1959): A case of *Encephalitozoon*-like infection in man. Arch. Pathol. 67: 181–187.
- MEHLUM, F. (1990): The birds and mammals of Svalbard. In: Polarha°ndbok, 5: 140S.
- MEISEL, J.L., PERERA, D.R., MELIGRO, C., RUBIN, C.E. (1976): Overwhelming watery diarrhea associated with a *Cryptosporidium* in an immunosuppressed patient. Gastroenterology 70: 1156–1160.
- MEUTIN, D.J., VAN KRUININGEN, H.J., KEIN, D.H. (1974): Cryptosporidiosis in a calf. J. Am. Vet. Med. Assoc. 165: 914–917.
- MINVIELLE, M.C., MOLINA, N.B., POLVERINO, D., BASUALDO, J.A. (2008): First genotyping of *Giardia lamblia* from human and animal feces in Argentina, South America. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 103: 98–103.
- MONIS, P.T. et THOMPSON, R.C. (2003): *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? Infect. Genet. Evol. 3: 233–244.

- MORGAN-RYAN, U.M., FALL, A., WARD, L.A., HIJAWI, N., SULAIMAN, I., FAYER, R., THOMPSON, R.C.A., OLSEN, M., LAL, A.A., XIAO, L. (2002): *Cryptosporidium hominis* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from *Homo sapiens*. J. Eukaryot. Microbiol. 49: 433–440.
- MORRISON, H.G., MCARTHUR, A.G., GILLIN, F.D., ALEY, S.B., ADAM, R.D., OLSEN, G.J., BEST, A.A., CANDE, W.Z., CHEN, F., CIPRIANO, M.J., DAVIDS, B.J., DAWSON, S.C., ELMENDORF, H.G., HEHL, A.B., HOLDER, M.E., HUSE, S.M., KIM, U.U., LASEK-NESSLEQUIST, E., MANNING, G., NIGAM, A., NIXON, J.E., PALM, D., PASSAMANECK, N.E., PRABHU, A., REICH, C.I., REINER, D.S., SAMUELSON, J., SVARD, S.G., SOGIN, M.L. (2007): Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. Science 317: 1921–1926.
- MUNDAY, B.L. (1972): Serological evidence of *Toxoplasma* infection in isolated groups of sheep. Res. Vet. Sci. 13: 100–102.
- NÄGELI, K.W. (1857): Ueber die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. Bot. Z. 15: 760–761.
- NG, J.; PAVLASEK, I.; RYAN, U. (2006): Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. Appl. Environ. Microbiol. 7548–7553.
- NIME, F.A., BUREK, J.D., PAGE, D.L., HOLSCHER, M.A., YARDLEY, J.H. (1976): Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium*. Gastroenterology 70: 592–598.
- NUDDS, R.L., FOLKOW, L.P., LEES, J.J., TICKLE, P.G., STOKKAN, K.A., CODD, J.R. (2011): Evidence for energy savings from aerial running in the Svalbard rock ptarmigan (*Lagopus muta hyperborea*). Proc. Biol. Sci. 278: 2654–2661.
- NYDAM, D.V., WADE, S.E., SCHAAF, S.L., MOHAMMED, H.O. (2001): Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp. cysts shed by dairy calves after natural infection. Am. J. of Vet. Research 62: 1612–1615.

- O'DONOGHUE, P.J. (1995): *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *Int. J. Parasitol.* 25: 139–195.
- O'HANDLEY, R.M., CERI, H., ANETTE, C., OLSON, M.E. (2003): Passive immunity and serological immune response in dairy calves associated with natural *Giardia duodenalis* infections. *Vet. Parasitol.* 113: 89–98.
- O'HANDLEY, R.M., COCKWILL, C., MCALLISTER, T.A., JELINSKI, M., MORCK, D.W., OLSON, M.E. (1999): Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. *J. of the Amer. Vet. Med. Associat.* 214: 391–396.
- O'HANDLEY, R.M., OLSON, M.E., FRASER, D., ADAMS, P., THOMPSON, R.C.A. (2000): Prevalence and genotypic characterisation of *Giardia* in dairy calves from Western Australia and Western Canada. *Vet. Parasitol.* 90: 193–200.
- 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. *J. Infect. Dis.* 180: 1275–1281.
- OLSON, M.E., O'HANDLEY, R.M., RALSTON, B.J., MCALLISTER, T.A., THOMPSON, R.C.A. (2004): Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends Parasitol.* 20: 185–191.
- ORENSTEIN, J.M., GAETZ, H.P., YACHNIS, A.T., FRANKEL, S.S., MERTENS, R.B., DIDIER, E.S. (1997): Disseminated microsporidiosis in AIDS: are any organs spared. *AIDS* 11: 385–386.
- ORTEGA, Y.R. et BONAVIA, D. (2003): *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Cyclospora* in ancient Peruvians. *J. Parasit.* 89: 635–636.
- ORTEGA, Y.R., ROXAS, C.R., GILMAN, R.H., MILLER, N.J., CABRERA, L., TAQUIRI, C., STERLING, C.R. (1997): Isolation of *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayentanensis* from vegetables collected in markets of an endemic region in Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57: 683–686.

- PANCIERA, R.J., THOMASSEN, R.W., GARNER, F.M. (1971): Cryptosporidial infection in a calf. *Vet. Pathol.* 8: 479–484.
- PAVLASEK, I. (1999): Cryptosporidia: biology, diagnosis, host spectrum, specificity and the environment. *Remedia Clin. Microbiol.* 3: 290–302.
- PAVLASEK, I., LAVICKOVA, M., HORAK, P., KRAL, J., KRAL, B. (1995): *Cryptosporidium varanii* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in Emerald monitor (*Varanus prasinus*) Schegel 1893 in captivity at Prague zoo. *Gazella* 22: 99–108.
- PAVLÁSEK, I. et RYAN, U. (2007): The first finding of a natural infection of *Cryptosporidium muris* in a cat. *Vet. Parasitol.* 144: 349–352.
- PETERSEN, C. (1992): Cryptosporidiosis in patients infected with Human Immunodeficiency Virus. *Clin. Infect. Dis.* 15: 903–909.
- PETERSEN, C. (1993): Cellular biology of *Cryptosporidium parvum*. *Parasitol. Tod.* 9: 87–91.
- PLUTZER, J. et TOMOR, B. (2009): The role of aquatic birds in the dissemination of human pathogenic *Giardia duodenalis* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in Hungary. *Parasitol. Int.* 58: 227–231.
- PORTER, J.D., GAFFNEY, C., HEYMANN, D., PARKIN, W. (1990): Food-borne outbreak of *Giardia lamblia*. *Am. J. Public Health* 80: 1259–1260.
- POTT, E. (2004): *Průvodce přírodou: Ptáci*. Praha: Beta- Pavel Dobrovský. 221S. ISBN 80-7306-134-1.
- POWER M.L. et RYAN U.M. (2008): A new species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) from eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*). *J. Parasitol.* 94: 1114–1117.
- POZIO, E. (2008): Epidemiology and control prospects of foodborne parasitic zoonoses in the European Union. *Parassitologia* 50: 17–24.

- PRESTRUD, P. (1992): Food habits and observations of the hunting behaviour of arctic foxes, (*Alopex lagopus*), in Svalbard. *Can. Field-Nat.* 106: 225–236.
- PRESTRUD, K.W., ÅSBAKK, K., FUGLEI, E., MØRK, T., STIEN, A., ROPSTAD, E., TRYLAND, M., GABRIELSEN, G.W., LYDERSEN, C., KOVACS, K.M., LOONEN, M.J.J.E., SAGERUP, K., OKSANEN, A. (2007): Serosurvey for *Toxoplasma gondii* in arctic foxes and possible source species of infection in the high Arctic of Svalbard. *Vet. Parasitol.* 150: 6–12.
- RABENECK, L., GENTA, R.M., GYORKEY, F., CLARRIDGE, J.E., GYORKEY, P., FOOTE, L.W. (1995): Observations on the pathological spectrum and clinical course of microsporidiosis in men infected with the human immunodeficiency virus: follow-up study. *Clin. Infect. Dis.* 20: 1229–1235.
- RAMIREZ N. E., WARD L. A., SREEVATSAN S. (2004): A review of the biology and epidemiology of cryptosporidiosis in humans and animals. *Microb. Infect.* 6: 773–785.
- RAUSCH, R.L. (1995): Life cycle patterns and geographic distribution of *Echinococcus* species. In: Thompson, R.C.A., Lymbery, A.J. et al. *Echinococcus and hydatid disease*. Oxon, CAB Internation. 89–134.
- REN X., ZHAO J., ZHANG L., NING C., JIAN F., WANG R., LY C., WANG Q., ARROWOOD M.J., XIAO L. (2011): *Cryptosporidium tyzzeri* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) in domestic mice (*Mus musculus*). *Exp. Parasitol.* 130: 274–281.
- RHEE, J.K., KIM, H.C., PARK, B.K. (1997): Effects of *Cryptosporidium baileyi* infection on the bursa of Fabricius in chickens. *Korean J. Parasitol.* 35: 181–187.
- ROBERTSON, L.J., FORBERG, T., HERMANSEN, L., HAMNES, I.S., GJERDE, B. (2007): *Giardia duodenalis* cysts isolated from wild moose and reindeer in Norway: genetic characterization by PCR-RFLP and sequence analysis at two genes. *J. Wild. Dis.* 43: 576–585.

- ROBERTSON, L.J., HERMANSEN, L., GJERDE, B.K., STRAND, E., ALVSVAG, J.O., LANGE LAND, N. (2006): Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway, during autumn and winter 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2212–2217.
- 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*). *J. Parasitol.* 90: 769–773.
- RYAN U.M., POWER M., XIAO L. (2008): *Cryptosporidium fayeri* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from the Red Kangaroo (*Macropus rufus*). *J. Eukaryot. Microbiol.* 55: 22–26.
- RYAN, U. M., L. XIAO, C. READ, I. M. SULAIMAN, P. MONIS, A. A. LAL, R. FAYER, I. PAVLÁSEK. (2003): A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlásek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) from birds. *J. Parasitol.* 89: 809–813.
- SAK, B., BRADY, D., PELIKÁNOVÁ, M., KVĚTOŇOVÁ, D., ROST, M., KOSTKA, M., TOLAROVÁ, V., HŮZOVÁ, Z., KVÁČ, M. (2011): Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *J. Clin. Microbiol.* 49: 1064–1070.
- SANDFORT, J., HANNEMANN, A., GELDERBLUM, H., STARK, K., OWEN, R.L., RUF, B. (1994): *Enterocytozoon bienersi* infection in an immunocompetent patient who had acute diarrhoea and who was not infected with the human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 19: 514–516.
- SANTÍN, M., TROUT, J.M., VECINO, J.A., DUBEY, J.P., FAYER, R. (2006): *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bienersi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. *Vet. Parasitol.* 141: 334–339.
- SAVIOLI, L., SMITH, H., THOMPSON, R.C.A. (2006): *Giardia* and *Cryptosporidium* join the ‘Neglected Diseases Initiative’. *Trends Parasitol.* 22: 203–208.

- SHIELDS, J.M., GLEIM, E.R., BEACH, M.J. (2008): Prevalence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia intestinalis* in swimming pools, Atlanta, Georgia. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 948–950.
- SCHAEFER 3rd, F.W., JOHNSON, C.H., HSU, C.H., RICE, E.W. (1991): Determination of *Giardia lamblia* cyst infective dose for the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2408–2409.
- SCHWARTZ, D.A., VISVESVARA, G.S., DIESENHOUSE, M.C., WEBER, R., FONT, R.L., WILSON, L.A., CORRENT, G., SERDAREVIC, O.N., ROSBERGER, D.F., KEENEN, P.C. (1993): Pathologic features and immunofluorescent antibody demonstration of ocular microsporidiosis (*Encephalitozoon hellem*) in seven patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Amer. J. Ophthal.* 115: 285–292.
- SIEFKER, C., RICKARD, L.G., PHARR, G.T., SIMMONS, J.S., O’HARA, T.M. (2002): Molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. isolated from northern Alaskan caribou (*Rangifer tarandus*). *J. Parasitol.* 88: 213–216.
- SLAVIN, D. (1955): *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *J. Comp. Pathol.* 65: 262–270.
- SNYDER, D.B., CURRENT, W.L., RUSSEK-COHEN, E., GORHAM, S.L., MALLINSON, E.T., MARQUARDT, W.W., SAVAGE, P.K. (1988): Serologic incidence of *Cryptosporidium* in Delmarva broiler flocks. *Poult. Sci.* 67: 730–735.
- SOUZA, S.L., GENNARI, S.M., RICHTZENHAIN, L.J., PENA, H.F., FUNADA, M.R., CORTEZ, A., GREGORI, F., SOARES, R.M. (2007): Molecular identification of *Giardia duodenalis* isolates from humans, dogs, cats and cattle from the state of Sao Paulo, Brazil, by sequence analysis of fragments of glutamate dehydrogenase (GDH) coding gene. *Vet. Parasitol.* 149: 258–264.
- SØRENSEN, K.K., MØRK, T., SIGURÐARDÓTTIR, Ó.G., ÅSBAKK, K., ÅKERSTEDT, J., BERGSJØ, B., FUGLEI, E. (2005): Acute toxoplasmosis in



- three wild arctic foxes (*Alopex lagopus*) from Svalbard; one with co-infections of *Salmonella* Enteritidis PT1 and *Yersinia pseudotuberculosis* serotype 2b. *Research in Vet. Science* 78: 161–167.
- SPRAGUE, V., BECNEL, J.J., HAZARD, E.I. (1992): Taxonomy of phylum Microspora. *Crit. Rev. Microbiol.* 18: 285–395.
- SPRAGUE, V. et VÁVRA, J. (1976): Biology of the microsporidia. In Bulla Jr. L.A. et Cheng, T.C. et al. *Comparative pathobiology*. vol. 1. Plenum Press, New York, 1–370.
- SRETER, T. et, VARGA, I. (2000): Cryptosporidiosis in birds—a review. *Vet. Parasitol.* 87: 261–279.
- SULAIMAN, I.M., FAYER, R., BERN, C., GILMAN, R.H., TROUT, J.M., SCHANTZ, P.M., DAS, P., LAL, A.A., XIAO, L. (2003b) Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emer. Infect. Dis.* 9: 1444–1452.
- SULAIMAN, I.M., FAYER, R., LAL, A.A., TROUT, J.M., SCHAEFER III, F.W., XIAO, L. (2003a): Molecular Characterization of Microsporidia Indicates that Wild Mammals Harbor Host-Adapted *Enterocytozoon* spp. as well as Human-Pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 :4495–4501.
- TAKIZAWA, M.G., FALAVIGNA, D.L., GOMES, M.L. (2009): Enteroparasitosis and their ethnographic relationship to food handlers in a tourist and economic center in Parana, Southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.* 51: 31–35.
- THOMPSON, R.C.A. (2000): Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. *Int. J. Parasitol.* 30: 1259–1267.
- THOMPSON, R.C.A. (2004): The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet. Parasitol.* 126: 15–35.
- THOMPSON, R.C.A., COLWELL, D.D., SHURY, T., APPELBEE, A.J., READ, C., NJIRU, Z., OLSON, M.E. (2009): The molecular epidemiology of

- Cryptosporidium* and *Giardia* infections in coyotes from Alberta, Canada, and observations on some cohabiting parasites. *Vet. Parasitol.* 159 :167–170.
- THOMPSON, R.C.A. et MONIS, P.T. (2004): Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv. Parasitol.* 58: 69–137.
- TIANGTIP, R. et JONGWUTIWES, S. (2002): Molecular analysis of *Cryptosporidium* species isolated from HIV-infected patients in Thailand. *Trop. Med. Int. Health* 7: 357–364.
- TORRES, J., GRACENEA, M., GÓMEZ, M.S., ARRIZABALAGA, A., GONZÁLEZ-MORENO, O. (2000): The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C. muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Vet. Parasitol.* 92: 253–260.
- TRAUB, R.J., MONIS, P.T., ROBERTSON, I., IRWIN, P., MENCKE, N., THOMPSON, R.C. (2004): Epidemiological and molecular evidence supports the zoonotic transmission of *Giardia* among humans and dogs living in the same community. *Parasitol.* 128: 253–262.
- TRAVERSA, D. (2010): Evidence for a new species of *Cryptosporidium* infecting tortoises: *Cryptosporidium ducismarci*. *Parasit. Vectors* 25: 3–21.
- TROUT, J.M., SANTIN, M., FAYER, R. (2006): *Giardia* and *Cryptosporidium* species and genotypes in coyotes (*Canis latrans*). *J. Zoo Wild Med.* 37: 141–144.
- TYZZER, E.E. (1907): A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proc. Soc. EXP Biol. Med.* 5: 12–13.
- TYZZER, E.E. (1910): An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.) of the gastric glanc of the common mouse. *J. Med. Res.* 23: 487–511.
- TYZZER, E.E. (1912): *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Arch. Protistenkd.* 26: 394–412.
- TYZZER, E.E. (1929): Coccidiosis in gallinaceous birds. *Am. J. Hyg.* 10: 269–383.
- TZIPORI, S. (1988): Cryptosporidiosis in perspective. *Adv. Paraito.l* 27: 63–129.

- TZIPORI S. et WARD H. (2002): Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microb. Infec.* 4: 1047–1058.
- van KEULEN, H., MACECHKO, P.T., WADE, S., SCHAAF, S., WALLIS, P.M., ERLANDSEN, S.L. (2002): Presence of human *Giardia* in domestic, farm and wild animals, and environmental samples suggests a zoonotic potential for giardiasis. *Vet. Parasitol.* 108: 97–107.
- VETTERLING, J.M., JERVIS, H.R., MERRILL, T.G., SPRINZ, H. (1971): *Cryptosporidium wrairi* sp. n. from the guinea pig *Cavia porcellus* with an emendation of the genus. *J. Protozool.* 18: 243–247.
- VOIGT, K. et KIRK, P.M. (2011): Recent developments in the taxonomic affiliation and phylogenetic positioning of fungi: impact in applied microbiology and environmental biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90: 41–57.
- VOLF, P. et HORÁK, P. (2007): Paraziti a jejich biologie, 1.vydání. Praha: Triton, 318s, ISBN 978-80-7387-008-9.
- VUITTON, D., ZHOU, H., BRESSON-HADNI, S., WANG, Q., PIARROUX, M., RAOUL, F., GIRAUDOUX, P. (2003): Epidemiology of alveolar echinococcosis with particular reference to China and Europe. *Parasitol.* 127: 87–107.
- WALLACE, G.D. (1973): The role of the cat in the natural history of *Toxoplasma gondii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 22: 313–322.
- WEBER, R., BRYAN, R.T., SCHWARTZ, D.A., OWEN, R.L. (1994): Human microsporidial infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 426–461.
- WITTNER, M. (1999): Historic perspective on the microsporidia: expanding horizons. In: Wittner M. et Weiss L.M. (et al.) *The microsporidia and Microsporidiosis.* Am. Soc. Microbiol. Washington DC 1–6.
- XIAO, L., HERD, R.P., MCCLURE, K.E. (1994): Periparturient rise in the excretion of *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts as a source of infection for lambs. *J. of Parasitol.* 80: 55–59.

- XIAO, L., HERD, R.P., RINGS, D.M. (1993): Concurrent infections of *Giardia* and *Cryptosporidium* on two Ohio farms with calf diarrhea. *Vet. Parasitol.* 51: 41–48.
- XIAO, L., RYAN, U.M., GRACZYK, T.K., LIMOR, J., LI, L., KOMBERT, M., JUNGE, R., SULAIMAN, I.M., ZHOU, L., ARROWOOD, M.J., KOUDELA, B., MODRÝ, D., LAL, A.A. (2004): Genetic diversity of *Cryptosporidium* sp. in captive reptiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 891–899.
- XIAO, L., SULAIMAN, M., RYAN, U.M., ZHOU, L., ATWILL, R., TISCHLER, L., ZHANG, X. RAYER, R., LAL, A.A. (2002): Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *Int. J. Parasitol.* 32: 1773–1785.
- YANKE, S.J., CERI, H., MCALLISTER, T.A., MORCK, D.W., OLSON, M.E. (1998): Serum imine response to *Giardia duodenalis* in experimentally infected lambs. *Vet. Parasitol.* 75: 9–19.
- ZHOU, L., KASSA, H., TISCHLER M.L., XIAO, L. (2004): Host-Adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada Geese (*Branta canadensis*). *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4211–4215.

## **8. Klíčová slova**

giardie

kryptosporidie

mikrosporidie

Svalbard