

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Střevní paraziti savců introdukovaných na Svalbard

Bakalářská práce

Marek Brož

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.
Školitel specialista: RNDr. Eva Myšková

České Budějovice 2016

Brož M., 2016: Střevní paraziti savců introdukovaných na Svalbard. [Intestinal parasites of mammals introduced to Svalbard. Bc. Thesis, in Czech.] – 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

The aim of this thesis was the research of parasites of mammals introduced to Svalbard: sibling voles, horses and dogs. Faeces of this three species were used for examination of intestinal parasites. Samples were collected in central part of Svalbard and examined in Czech Republic by microscopic and molecular methods for detection of protists and helminths.

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

V Českých Budějovicích, 14. 12. 2016

.....

Marek Brož

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat zejména svému vedoucímu práce doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc., za jeho trpělivost, odborné vedení, ochotu a cenné rady. Stejně tak bych rád poděkoval školitelce specialistce RNDr. Evě Myškové za trpělivost, odborné vedení a pomoc při zvládnutí metodiky k této práci. Dále všem pracovníkům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu, BC AV ČR, v.v.i. za jejich cenné rady a ochotu.

Velký dík patří všem zaměstnancům Centra polární ekologie a Mgr. Anně Mácové za ochotu a pomoc při sběru vzorků a pohodovou atmosféru při práci na Svalbardu. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za podporu při studiu a při psaní této práce.

Především bych ale chtěl poděkovat za podporu z grantů LM2010009 CzechPolar (MŠMT ČR) a NF-CZ07-ICP-1-029-2014 (NF), která mi umožnila práci na Svalbardu.

Obsah

1.	Úvod.....	1
1.1.	Autochtonní suchozemští savci.....	2
1.2.	Alochtonní savci.....	2
1.2.1.	Hraboš východoevropský (<i>Microtus levis</i> Miler, 1908).....	3
1.2.2.	Kůň domácí (<i>Equus ferus caballus</i> Linnaeus, 1758).....	5
1.2.3.	Pes domácí (<i>Canis lupus familiaris</i> Linnaeus, 1758).....	6
1.3.	Sledování parazitů.....	7
1.3.1.	<i>Echinococcus multilocularis</i> Leuckart, 1863.....	7
1.3.1.1.	Taxonomie.....	7
1.3.1.2.	Vývojový cyklus.....	8
1.3.1.3.	Echinokokóza.....	8
1.3.1.4.	Výskyt v Arktidě.....	9
1.3.2.	<i>Cryptosporidium</i> Tyzzer, 1907.....	9
1.3.2.1.	Taxonomie.....	9
1.3.2.2.	Vývojový cyklus.....	9
1.3.2.3.	Kryptosporidióza.....	10
1.3.2.4.	Výskyt v Arktidě.....	10
1.3.3.	Mikrosporidie.....	11
1.3.3.1.	Taxonomie.....	11
1.3.3.2.	Vývojový cyklus.....	11
1.3.3.3.	Mikrosporidiózy u lidí.....	12
1.3.3.4.	Výskyt v Arktidě.....	13
1.3.4.	<i>Giardia</i> Künstler, 1882.....	13
1.3.4.1.	Taxonomie.....	13
1.3.4.2.	Vývojový cyklus.....	14
1.3.4.3.	Giardióza.....	14
1.3.4.4.	Výskyt v Arktidě.....	15
2.	Cíle práce.....	16
3.	Materiál a metody.....	17
3.1.	Lokalita sběru vzorků.....	17
3.2.	Vyšetřovaný materiál.....	17
3.2.1.	Metodika odchytu hrabošů <i>Microtus levis</i>	17
3.2.2.	Metodika pitvy hraboše.....	19
3.3.	Metody vyšetření vzorků.....	20
3.3.1.	Barvení dle Miláčka – Vítovce (1985).....	20
3.3.2.	Sedimentace AMS.....	20

3.3.3.	Flotace dle Sheatera	21
3.3.4.	Molekulární diagnostika vzorků.....	21
3.3.4.1.	Izolace DNA z trusu.....	21
3.3.4.2.	Polymerázová řetězová reakce	22
3.3.4.3.	Gelová elektroforéza	23
3.3.4.4.	Sekvence.....	24
3.3.4.5.	Fylogenetická analýza	24
4.	Výsledky	25
4.1.	Přítomnost parazitů zjištěných při pitvě <i>M. levis</i>	25
4.2.	Mikroskopické metody.....	25
4.2.1.	Mikroskopie barvených preparátů dle Miláčka-Vítovce.....	25
4.2.2.	Sedimentační a flotační metody	25
4.2.2.1.	Flotace dle Sheatera	25
4.2.2.2.	Sedimentace AMS.....	25
4.3.	Molekulární metody	26
5.	Diskuse	30
6.	Závěry	34
7.	Literatura	35

1. Úvod

Souostroví Svalbard, také známé pod názvem Špicberky, leží napůl cesty mezi severním okrajem Norska a severním pólem. Rozkládá se mezi 74° a 81° severní šířky a 10° a 35° východní délky. Největší z deseti ostrovů je Západní Špicberk (Spitsbergen), který dal souostroví jméno. Celková rozloha je 62 050 km². Svalbard je nejsevernější výspou Norského království. Správním centrem je městečko Longyearbyen (cca 1700 obyvatel), další obydlené lokality jsou pak Barentsburg (ruská těžební osada, cca 900 obyvatel), těžební osada Sveagruva a výzkumná komunita v Ny-Ålesundu (Henttonen et al. 2001, Stange 2012).

Klima na Svalbardu je mírnější než v jiných zeměpisných šířkách. To je způsobeno nízkým atmosférickým tlakem a teplým prouděním z Atlantického oceánu. Průměrná roční teplota v Longyearbyenu se pohybuje okolo -4 °C. Nejvyšší zaznamenaná teplota na Svalbardu je 21,3 °C a nejnižší je -49,2 °C. V zimě zde vane silný vítr. Na Špicberkách je velmi málo vodních srážek. V Longyearbyenu je méně srážek než v suchých oblastech na norské pevnině. Srážky na Svalbardu pocházejí z východních proudů od Barentsova moře. V Longyearbyenu je polární den od 20. dubna do 23. srpna. Polární noc pak od 26. října do 15. února. Většina polárních organismů se přizpůsobila sezonním podmínkám (Gulliksen a Svensen 2004).

První písemné zmínky o Svalbardu pochází z islandské kroniky z roku 1191. Za objevitele Svalbardu je však považován až holandský mořeplavec Willem Barents, který Svalbard popsal roku 1596. V 19. a 20. století Svalbard osidlovali zejména ruští a norští lovci kožešin, kteří pro usnadnění pohybu po ledu a sněhu používali psí spřežení. Svalbard byl a částečně stále je využíván pro jeho nerostné bohatství. Roku 1906 byl otevřen první důl společností Arctic Coal Company. Těžba přilákala mnoho lidí k práci a bydlení v nově vzniklém městě, Longyearbyen. Horníci k usnadnění práce při převážení vytěženého uhlí používali koně. Roku 1920 byla podepsána tzv. Svalbardská smlouva. Na základě této úmluvy se Svalbard dostal pod administrativní správu Norska. Smluvní strany (41 států) mají zajištěna různá práva, jako např. těžbu nerostných surovin a zřizování výzkumných stanic. V dnešní době je soustroví cílem i mnoha turistických výprav. Turismus je ale regulován pomocí tvorby národních parků a přírodních rezervací (Grégr et al. 1997, Umbreit 2005).

Tato práce je zaměřena na parazitologický výzkum savců, kteří na Svalbardu nejsou původní, tudíž s sebou na Svalbard mohli zavléci nové druhy parazitů. Zaměřil jsem se na parazity na Svalbard zavlečeného hraboše východoevropského (*Microtus levis*), který umožnil dokončení vývojového cyklu tasemnice *Echinococcus multilocularis*, jejímž je

mezihostitelem. Dále jsem parazitologicky vyšetřoval koně a psy, na Svalbard dovezené záměrně.

1.1. Autochtonní suchozemští savci

Na Svalbardu můžeme najít dva původní suchozemské savce. Prvním je sob polární špicberský (*Rangifer tarandus platyrhynchus*), který je menším poddruhem soba polárního. Tento poddruh je charakteristický svými kratšími končetinami a výrazně mohutnějšími kopyty, které usnadňují pohyb v podmáčené tundře a ve sněhu. Sobi polární mění své zbarvení dle ročního období, v létě je jejich srst kratší, šedohnědá, v zimě pak delší, žlutobílá. Oběma pohlavím rostou větvená paroží, která jsou asymetrická. Samci je mají větší. Je to jediný původní herbivorní savec na Svalbardu.

Dalším savcem je liška polární (*Vulpes lagopus*), která má kratší čenich a uši než její příbuzná liška obecná (*Vulpes vulpes*), která se na Svalbardu nevyskytuje. Liška polární má cirkumpolární rozšíření a patří mezi nejlépe adaptované terestriální savce na arktické klima. Její dlouhý ocas po stočení slouží jako ochrana před chladem. Váží zhruba 2,5-5 kg. Existují dvě barevné varianty, bílá a modrá. Bílá je v zimě bílá s černými chlupy na špičce ocasu a šedohnědá v létě. Modrá varianta je pak téměř celý rok modrošedá, v zimě její srst trochu zesvětlí. Na Svalbardu se vyskytuje pouze bílá forma lišky polární. Je rozšířena po celém Svalbardu, teritorium jejího pohybu je kolem 20 km². V některých lokalitách se živí hlavně hlodavci. Ti se na Svalbardu nevyskytují (s výjimkou zavlečeného hraboše *Microtus levis* v oblasti kolem správního centra Longyearbyenu a osady Grumantbyen), proto se zde živí převážně ptáky, jejich vejci, na pobřeží pak rybami a koryši (Kovacs a Lydersen 2006, Sale 2006).

1.2. Alochtonní savci

V současné době se na Svalbardu vyskytují tři druhy savců, kteří jsou nepůvodní a byli zavlečeni člověkem. Všichni jsou suchozemští. Koně a psi byli zavlečeni cíleně jako pracovní a společenská zvířata.

V roce 1929 byli na Svalbard dovezeni pižmoni severní (*Ovibos moschatus*). Bylo přivezeno 17 telat z Grónska. Nejprve se stádo zvětšovalo – do roku 1936 se rozrostlo na 30 jedinců, v 60. letech se po Svalbardu pohybovalo ke stovce kusů. Populace však začla v 70. letech klesat až postupně vyhynula. Poslední živý pižmoň byl spatřen nedaleko Longyearbyenu v roce 1985 (Lent 1999).

Na Svalbardu dříve lidé měli i hospodářská zvířata. Ve správním centru Longyearbyen byla farma a lidé zde v druhé polovině 20. století chovali dojně krávy, vepře a drůbež. Podobné farmy byly i v ruských osadách Pyramiden a Barentsburg (Umbreit 2005, Holm 1999). I přes zákaz vydaný úřadem guvernéra ostrovů je v ruském městě Barentsburg chováno několik koček (*Felis silvestris f. catus*) (Ditrich, osobní sdělení). Z důvodu nelegální introdukce těchto zvířat nebylo možné odebrat materiál pro tuto práci.

1.2.1. Hraboš východoevropský (*Microtus levis* Miler, 1908)

Hraboš východoevropský (Obr. 1) má šedohnědou srst, která kryje celé tělo včetně krátkých uší a ocásku. Je 10 – 16 cm velký a váží zhruba 30 g. Živí se travnatým porostem a žije v norách. Tento druh se vyskytuje na loukách a zemědělských oblastech v Euroasii. Nejsevernější oblast výskytu je Finsko. Hraboš východoevropský je náhodně introdukovaným druhem. Na Svalbard se dostal pravděpodobně z oblasti okolo Petrohradu na lodích, přivážejících na Svalbard pícninu pro hornickou osadu Grumantbyen mezi lety 1920 a 1960 (Obr. 2). Z Grumantbyen se rozšířil jak směrem na severozápad k Longyearbyen, tak i jihovýchodně k údolí Colesdalen (Obr. 3). Je jediným drobným savcem na Svalbardu (Kovacs a Lydersen 2006).

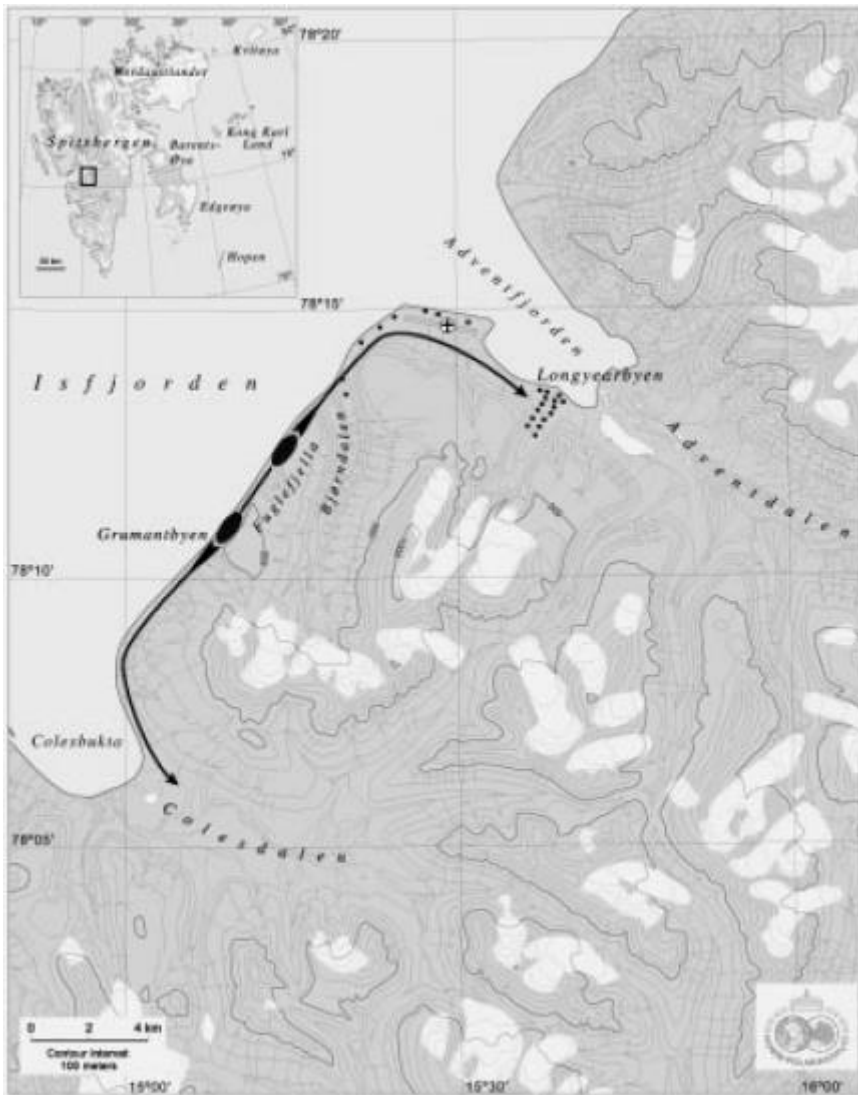
V oblasti kolem Longyearbyenu se vyskytuje především poblíž psích stanic a koňské stáje, kde využívá pro svou obživu krmivo pro koně či psy a to zejména v zimě. V létě se živí travinami, kterých je pro ně v Longyearbyenu dostatek.



Obr. 1: *Microtus levis*.



Obr. 2: Osada Grumantbyen – první místo výskytu *M. levis*. Foto: Tomáš Týmľ



Obr. 3: Mapa rozšíření *M. levis* na Svalbardu Zdroj: Henttonen et al. 2001

1.2.2. Kůň domácí (*Equus ferus caballus* Linnaeus, 1758)

Jediným zástupcem tohoto rodu je na Svalbardu islandský kůň. Islandský kůň je plemeno vyšlechtěné na Islandu, Jeho předchůdce na Island dovezli norští osadníci mezi lety 860 a 935. I přes malý vzrůst ho Islandčané nikdy nepovažovali za poníka (Hartley Edwards 1992). Hůlková výška těchto koní se pohybuje v rozmezí mezi 1,25 – 1,40 m. Většinou jsou zbarvení do hněda, vyskytují se také jako vraníci či ryzáci, bělouši a strakáci. Je to velmi společenské plemeno, vyznačuje se spolehlivostí. Je schopen pro svou vytrvalost překonávat dlouhé vzdálenosti. Vůči tělu má velkou hlavu s malými ušima. V trupu zavalití, s krátkými končetinami. Srst mají drsnou a hustou. Velmi snadno se pohybuje i v náročném terénu. Původně sloužil jako pracovní plemeno v horských oblastech (Hermsen 2002, Pickeral 2004). Na Svalbardu jsou tyto koně využívány jako turistická atrakce (Obr. 4).

Studie Eydala a Gunnarssona (1994) prokázala, že islandští koně přímo na Islandu trpí různými střevními parazity. Nejčastěji nalezenými parazity byly hlístice *Parascaris equorum*, poté roupi *Oxyuris equi* a také byla objevena vajíčka tasemnice *Anoplocephala perfoliata*.



Obr. 4: Islandští koně na Svalbardu.

1.2.3. Pes domácí (*Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758)

Psi jsou na Svalbardu chováni převážně pro společenské a pracovní účely. Tažní psi jsou využíváni v letních i zimních měsících, kdy tahají buď saně a nebo vozíky s lidmi. Nejvíce jsou zastoupena odolná severská plemena jako husky, malamut a také kříženci. Najdeme je většinou v psích stanicích (ohrada s boudami, u kterých jsou psi uvázáni). Všichni psi dovezení na Svalbard musí být zaregistrovaní a veterinárně zkontrolovaní. V roce 2013 se na celém Svalbardu nacházelo zhruba 600 evidovaných psů, z nichž více než polovinu vlastní společnosti poskytující služby turistům (Obr. 5) (Kristiansen 2014). Dovážet psy a jiná zvířata na Svalbard je oficiálně zakázané, výjimky uděluje The Norwegian Food Safety Authority. Po příletu je nutné psy nechat zkontrolovat ihned na letišti. Pokud pes na Svalbardu uhyne, změní majitele, nebo je odvezen na pevninu, je nutné informovat úřad guvernéra soustroví tzv. Sysselmanna (Anonymous 2016).

U tažných psů v Kanadě bylo nalezeno mnoho střevních parazitů, zejména hlístice rodu *Toxocara* a tasemnice *Echinococcus granulosus* (Villeneuve et al. 2015). U společenských psů v Saskatchewanu byly nalezeny oocysty kryptosporidií a cysty giardií (Schurer et al. 2012).



Obr. 5: Psí stanice nedaleko Longyearbyenu.

1.3. Sledování paraziti

Sledování paraziti byli vybráni na základě očekávaných nálezů v trusu zavlečených savců. Všichni sledovaní paraziti způsobují zoonotické infekce přenosné na člověka, vyskytují se v kontinentální Evropě a často také v arktických oblastech, a proto je na ně tento výzkum zaměřen.

1.3.1. *Echinococcus multilocularis* Leuckart, 1863

1.3.1.1. Taxonomie

Echinococcus multilocularis patří do třídy Cestoda, řádu Cyclophyllidea a čeledi Taeniidae. Je to malá tasemnice, tvořená kromě skolexu se čtyřmi přísavkami třemi až čtyřmi články. *E. multilocularis* byl dlouhá léta považován za varietu *Echinococcus granulosus*, ale

nyní je považován za odlišný druh s vlastním životním cyklem (Merkell et al. 1999) Vyskytuje se hlavně v Eurasii a má dva savčí hostitele, lišku polární (*V. lagopus*) a lišku obecnou (*V. vulpes*). Dalšími definitivními hostiteli mohou být i jiné psovitě šelmy (psi domácí, vlci). Mezihostitelem jsou drobní hlodavci, zejména hraboši a lumíci, nakažen ale může být i člověk či pes. Toto onemocnění je velmi závažné a bez léčby je uváděna mortalita přes 90 % (Henttonen et al. 2001, Volf a Horák 2007).

1.3.1.2. Vývojový cyklus

Proces infekce probíhá tak, že liška, která je nakažená dospělými jedinci, kontaminuje trusem potravu hlodavce. V trusu lišky se nacházejí vajíčka ze kterých se poté vylíhne onkosféra. Z onkosfér, které prostoupí krevním řečištěm do těla hraboše a nejčastěji napadnou játra, mozek či plíce, se vytvoří cysty, takzvané alveokoky. Ty obsahují protoskolexy, které se nepohlavně množí. Onemocnění se pak podobá nádorovému bujení, včetně možnosti diseminace do dalších orgánů. Liška, která uloví hlodavce, se nakazí těmito larvami a z nich dorostou dospělí jedinci. (Merkell et al. 1999, Volf a Horák 2007).

1.3.1.3. Echinokokóza

Alveolární echinokokóza je nemoc způsobená *E. multilocularis*. Jde o nejvíce patogenní zoonózu temperátních a arktických oblastí severní polokoule (Vuitton et al. 2003). Larvy echinokoka prorůstají orgány, nejčastěji játry (Volf a Horák 2007). Rozsah poškození cystou závisí na její velikosti a poloze v těle. Důsledek potíží může být tlak cyst na okolní orgány, cysty jako takové škodí zvířatům jen málo. Pokud cysta praskne, může být spuštěna alergická reakce. Vážným problémem jsou pak velké cysty. Dospělý červ nemá dlouhý život, ale cysty mohou být na živu mnoho let. Přítomnost parazita indikuje eosinofilie, tlak na ostatní orgány a poškození krevních cest (Noble 1989). Zaznamenány byly nakažené osoby ve Francii, Belgii, Rakousku, Německu, Polsku, Švýcarsku, Číně a také několik případů na území Česka (Vuitton et al. 2003, Kern et al. 2003, Hozáková a Capulič, 2014). Existuje několik cest léčby echinokokózy. Chirurgické odstranění je radikální a účinnou cestou, ale při rizikové lokalizaci k němu nelze přistoupit. Lékem volby se stávají benzimidazolové léky jednak u neoperovatelných případů a velmi diseminovaných cyst a také jako jediná, či přídatná terapie u méně komplikovaných případů (Horton 1997).

1.3.1.4. Výskyt v Arktidě

V Arktidě je výskyt *E. multilocularis* závislý na polární lišce (*V. lagopus*) nebo psu domácím (*C. lupus familiaris*) jakožto konečným hostitelům této tasemnice. Lidské infekce jsou způsobeny požitím infekčních vajíček distribuovaných s výkaly z těchto hostitelů (Fuglei et al. 2008). V letech 1999 a 2000 byla u 59 z 224 hrabošů odchycených na Svalbardu potvrzena přítomnost cyst *E. multilocularis* (Henttonen et al. 2001).

1.3.2. *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907

1.3.2.1. Taxonomie

Kryptosporidie řadíme mezi eukaryotické organismy skupiny Apicomplexa a podskupiny Conoidasida (Adl et al. 2012). V minulosti byl rod *Cryptosporidium* řazen mezi kokcidie, molekulární metody prokázaly větší příbuznost s hromadinkami, taktéž z kmene Apicomplexa (Carreno et al. 1999). Kryptosporidie jsou jednobuněční paraziti, kteří rostou a množí se v epitelálních buňkách gastrointestinálního a dýchacího traktu obratlovců. Dříve existovaly domněnky, že jsou kryptosporidie vzácné a hostitelsky specifické, nyní je však známo, že řada z nich není hostitelsky specifická. Dle výskytu vývojových stádií v hostiteli rozeznáváme kryptosporidie napadající epitel žaludečních žláz a kryptosporidie napadající enterocyty ve střevech. V současné době existuje nejméně 19 rozdílných druhů (Fayer a Ungar 1986, Fayer 2010, Xiao a Fayer 2008).

1.3.2.2. Vývojový cyklus

Kryptosporidie svůj životní cyklus, tvořený sexuální a asexuální fází, uskuteční pouze v jednom hostiteli. Primární lokalizací infekce pro *C. hominis*, *C. parvum* a další střevní kryptosporidie je tenké střevo. Žaludeční kryptosporidie (*C. muris*, *C. andersoni* a *C. serpentis*) napadají epitel žaludku. Endogenní cyklus je odstartován pozřením oocyst. V hostitelském organismu dojde k excystaci zralých oocyst. Z oocysty se uvolní infekční sporozoiti a přilnou nejčastěji k epitelu tenkého střeva, ale mohou přilnout i k epitelu jiných orgánů. Hostitelská buňka sporozoita uzavře do vakuoly mimo cytoplasmu (tzv. epiplasmatická lokalizace). Sporozoit se poté mění v trofozoit. Z trofozoitů vznikají nepohlavním rozmnožováním meronti. Tento proces se nazývá merogonie (schizogonie). U

druhu *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. 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, při které vzniknou gamonti (mikrogamonti a makrogamonti). Z mikrogamontů se tvoří mikrogametocyty s 16 pohyblivými mikrogametami. Zralá mikrogameta poté oplodní makrogametu a tím vznikne zygota, která dále projde sporogonií. Při sporogonii se ve zralé oocystě vytvoří 4 sporozoiti. Mohou vzniknout dva typy oocyst. Většinou jde o oocysty silnostěnné, které jsou výkaly uvolňovány ven z těla hostitele a šíří tím infekci mezi ostatní hostitele. Zbytek tvoří oocysty tenkostěnné, které excystují v hostiteli a způsobují autoinfekci (Fayer et Xiao 2008).

1.3.2.3. Kryptosporidióza

Kryptosporidióza je oportunní zoonóza. Infekce vzniká po pozření odolných oocyst hostitelem. Projevem infekce jsou nekrvavé průjmy s dalšími gastrointestinálními potížemi a celkovou vyčerpaností organismu (Petersen 1992). V současné době neexistuje účinná kauzální léčba lidské či zvířecí kryptosporidiózy. Ačkoli mnoho infekcí u imunokompetentních hostitelů může být zcela bez příznaků či s mírnými klinickými obtížemi, které vymizí během 1-2 týdnů, některé případy mohou být natolik závažné, že musí dojít k lékařskému nebo veterinárnímu zásahu. Zejména u imunodeficitních pacientů dochází k rozsáhlým diseminovaným infekcím, které většinou končí smrtí. Podpůrnou léčbou u imunokompetentních je doplňování tekutin orální či nitrožilní cestou pro snížení dehydratace doprovázející akutní průjem, zatímco se čeká na spontánní zotavení (O'Donoghue 1995). Onemocnění se diagnostikuje mikroskopickým nálezem oocyst ve stolici či molekulárními metodami (Fischer et al. 1998). Vývojová stádia tohoto parazita lze najít také v duodenální biopsii (Bednář et al. 1996).

1.3.2.4. Výskyt v Arktidě

Infekční stádia kryptosporidií, sporozoity, jsou chráněny před vnějšími vlivy pomocí obalů, tzv. oocyst, 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). V Norsku byl výskyt kryptosporidií zaznamenán u jelenovitých, konkrétně u jelenů

(*Cervus elaphus*) a u sobů (*R. tarandus*) (Deng a Cliver 1999, Sefker et al. 2002). Stejnou lokalitu jako jelenovití v Norsku obývají také lišky, a právě na ně může dojít k přenosu infekce. V roce 2007 byly rozpoznány oocysty v trusu 6 lišek, všechny pozitivní vzorky ale obsahovaly velmi málo oocyst. (Hannes et al. 2007). U člověka byl výskyt kryptosporidií zaznamenán v Kanadě v oblasti Nunavik, kde žije převážně inuitské obyvatelstvo. V roce 2013 zde byla mikroskopicky vyšetřena stolice 283 lidí a 51 vzorků bylo pozitivních. Molekulární analýzou pak bylo potvrzeno, že jde o *C. hominis*. Nejpravděpodobněji byla nákaza introdukována a později rozšířena přenosem z člověka na člověka (Thivierge et al. 2016). V kanadském teritoriu Nunavut byla zaznamenána infekce *C. parvum* u lidí. Dalším zaznamenaným výskytem kryptosporidiózy v Arktidě byl nález kryptosporidií u sobů na Aljašce (Jenkins et al. 2013).

1.3.3. Mikrosporidie

1.3.3.1. Taxonomie

Mikrosporidie jsou obligátně intracelulární paraziti. Patří do skupiny Opisthosporidia, které jsou sesterskou skupinou hub v rámci nadřazené skupiny Holomycota (Karpov et al. 2015). Mikrosporidií bylo popsáno skoro 1000 druhů zařazených do více než 100 rodů (Sprague et al. 1992). Mikrosporidie napadají příslušníky téměř všech živočišných kmenů, nejčastěji však koryše a hmyz. Mohou také infikovat ryby, ptáky a savce včetně člověka (Anane, 2010). Poprvé byl výskyt mikrosporidiové nákazy u lidí zaznamenán v roce 1959 mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* (Matsubayashi et al. 1959). Od té doby až do roku 1985 bylo dobře popsáno jen 10 případů tohoto onemocnění u lidí. U HIV pozitivních pacientů ve Francii byl v té době popsán nový druh *Enterocytozoon bienuesi* (Desportes et al. 1985).

1.3.3.2. Vývojový cyklus

K infekci hostitele nejčastěji dochází vdechnutím či pozřením spór. Velikost spór druhů parazitujících u savčích hostitelů se pohybuje mezi 1-3 μm . Tvar spór je často kulový, vejcovitý, tyčovitý nebo tvaru půlměsíce. Obal spóry se skládá ze tří vrstev – z jednoduché plazmatické membrány a dvou extracelulárních membrán. Povrch stěny tvoří tzv. exospóra, složená z elektron-denzní proteinové vrstvy. Vnitřní část stěny je tvořena chitinem a je nazývaná endospórou. Funkcí obalu je ochrana sporoplazmy (infekční materiál mikrosporidie), která je tvořena jádrem, ribozomy, zadní vakuolou a vystřelovacím aparátem.

Vystřelovací aparát zahrnuje polaroplast a pólovou trubici. Polaroplast je organela tvořená k sobě těsně přiloženými vrstvami membránových lamel a vezikul. Pólová trubice leží stočená uvnitř spóry (Keeling a Fast 2002, Weber et al. 1994). K infekci hostitelské buňky mikrosporidiím slouží vystřelovací aparát a polaroplast. Vývoj mikrosporidií poté probíhá v hostitelské buňce ve dvou fázích (Larsson 1999, Weber et al. 1994, Volf a Horák 2007). V první fázi (tzv. merogonie, vegetativní fáze) dochází k růstu sporoplasmy v plasmodium. Plasmodium se dál dělí binárním dělením na dceřinné buňky, tzv. meronty. Meronti jsou několik μm velké buňky mikrosporidií a mají jednoduchou strukturu. Obsahují pozůstatky mitochondrií a velmi primitivní Golgiho aparát. K dělení plasmodia na meronty dochází tak dlouho, až je buňka zcela zaplněna meronty. Poté se na povrchu mikrosporidií začne vytvářet elektrodenzní stěna. Pak začíná druhá fáze vývoje, generativní, tzv. sporogonie. Jednotlivé buňky (meronti) se stávají autonomními a mění se ve sporoblasty. Z každé buňky parazita pak v posledním stádiu sporulace vzniká spóra. V tomto okamžiku je již hostitelská buňka poškozována (Volf a Horák 2007). Spóry mohou být také produkovány ve dvou generacích. První generace spór šíří infekci v hostiteli, naopak druhá generace pak šíří infekci do vnějšího prostředí. Tento efekt je umožněn tloušťkou buněčné stěny spóry mikrosporidie. První generace spór mikrosporidií má buněčnou stěnu tenčí, druhá generace naopak silnější (Vávra a Larsson 1999).

1.3.3.3. Mikrosporidiózy u lidí

Mikrosporidie infikují imunokompetentní i imunodeficitní jedince. U oslabených imunodeficitních působí vážná onemocnění. Většina imunokompetentních zůstane po infekci bez příznaků, ale za určitých podmínek mohou onemocnět taky. Běžně se vyskytují i u zdravé populace bez jakýchkoliv příznaků. Průběh infekcí způsobených mikrosporidii závisí na imunitním stavu hostitele. Zavedením molekulárních metod do diagnostiky bylo zjištěno, že mikrosporidióza se může kromě osob s infekcí HIV vyskytovat i u dětí, pacientů po transplantaci orgánů i u starších osob (Didier 2006). U lidí tato infekce může způsobovat mozková, oční, nosní, plicní, žaludeční, střevní, ledvinová, svalová nebo multiorgánová onemocnění (Orenstein et al. 1997). Nejčastější původci onemocnění u lidí jsou *Encephalitozoon intestinalis* a *E. bienersi*. Při léčbě mikrosporidiózy jsou nejčastěji využívána léčiva albendazolsulfoxid a fumagilin. Albendazolsulfoxid patří do skupiny benzimidazolů a má antimykotické účinky. Je účinný proti mikrosporidiím rodu *Encephalitozoon* (Kotler a Orenstein 1999). Fumagilin je antibiotikum, které se používá zevně při léčbě zánětu rohovky,

který je způsoben mikrosporidii rodu *Encephalitozoon* či *Vairimorpha*. Nežádoucími účinky však byly neutropenie a trombocytopenie u některých pacientů. Na snížení výskytu mikrosporidiových infekcí má také významný podíl vysoce aktivní retrovirální terapie (HAART), která se využívá k léčbě pacientů nakažených AIDS, kteří často trpí právě mikrosporidiovými infekcemi (Conteas et al. 2000).

1.3.3.4. Výskyt v Arktidě

O výskytu mikrosporidií v Arktidě není v literatuře mnoho řečeno. Jedinou zmínkou je studie provedená v Norsku, zabývající se výskytem *E. cuniculi* v chovech lišek polárních (*V. lagopus*). Encephalitozoonóza se u lišek rozvíjí 1–3 měsíce po narození a způsobuje v jejich chovech velké ztráty (Åkerstedt 2002).

1.3.4. *Giardia* Künstler, 1882

1.3.4.1. Taxonomie

Giardie se řadí mezi jednobuněčné eukaryotické organismy, i když jim chybí kompartmenty typické pro eukaryota, jako jsou mitochondrie, peroxizomy a mikroskopicky prokazatelný Golgiho komplex (Adam 2001). Systematické zařazení, založené na genetických, strukturálních a biochemických poznacích, řadí giardie mezi Excavata do kmene Metamonada, podkmene Trichozoa, třídy Trepomonadea a rodu *Giardia* (Cavalier-Smith 2003). První giardie byla detailněji popsána roku 1859 (Lambl 1859). Pomocí detailní elektronové a světelné mikroskopie bylo rozlišeno 6 druhů giardií (Adam 2001). Pět druhů představují izoláty z obojživelníků (*G. agilis*), ptáků (*G. ardeae*, *G. psittaci*), myší (*G. muris*) a ondatery (*G. microti*) (McRoberts et al. 1996, Adam 2001). Šestým druhem je skupina kmenů izolovaných z různých savčích hostitelů. Byly seskupeny do jednoho druhu *G. duodenalis* z důvodu stejných morfologických znaků (Filice 1952). Podle zásad mezinárodního kódu zoologické nomenklatury se používá pojmenování *G. intestinalis* (Alexeieff 1914).

1.3.4.2. Vývojový cyklus

Hostitel pozře cystu, z níž se uvolňují 2 trofozoiti hruškovitého tvaru, kteří se následně znovu rozdělí. Ti se pomocí adhezivního disku přichycují k buňkám tenkého střeva. Disk je ojedinělá buněčná struktura a je specifický pro rod *Giardia*. Giardie mají 8 bičíků ve 4 párech (anteriorní, posteriorní, kaudální a ventrální) ukotvené ke dvěma jádrům (Benchimol 2005). Trofozoit se živí hlenovitým střevním sekretem, který přijímá pinocytózou na dorzálním povrchu a ve střední oblasti adhezivního disku. Parazit si tvoří proteiny, které uvolňuje do prostředí a chrání se tak před střevními enzymy a žlučovými solemi hostitele. K jeho rozmnožování dochází binárním dělením. Proces dělení je popisován několika způsoby. Jeden říká, že dělení probíhá se zrcadlovou symetrií v rovině disku, kdy levé jádro mateřské buňky se stává pravým jádrem dceřiné buňky (Ghosh et al. 2001). Další studie pak popisuje neobvyklé mitotické chování, při kterém se dělení jádra zúčastňuje adhezivní disk (Benchimol 2004). V konečné fázi se vytváří v tlustém střevě cysta, která obsahuje 4 jádra a je klidovou formou parazita. Cysta je velmi odolná vůči vlivům vnějšího prostředí. Hostitel se infikuje polknutím cysty, která ve střevě excystuje (Volf et Horák 2007). K přenosu obvykle dochází fekálně-orální cestou. Přenáší se buď z člověka na člověka nebo ze zvířete na člověka či obráceně, ze zvířete na zvíře. Dále také pozřením či vypitím kontaminované potravy (Karanis et al. 2007, Porter et al. 1990).

1.3.4.3. Giardióza

Infekce giardiemi se projevuje průjmy, bolestmi břicha a pocitem slabosti. Stolice může obsahovat hlen, ale neobsahuje krev. K onemocnění jsou zvláště citlivé děti, u kterých může vyvolat malabsorpční syndrom (Bednář et al. 1996). Nákaza giardiemi je klinicky významná především u lidí, psů a koček. Původcem infekce u člověka je *G. intestinalis*. U zvířat i lidí tato infekce často probíhá asymptomaticky (Thompson a Monis 2004). Volně žijící zvířata mohou být rezervoárem infekce pro člověka i domácí zvířata a mohou být zdrojem kontaminace vodních zdrojů (Hamnes et al. 2006). Přenos infekce probíhá zejména od mladých zvířat, protože jejich méně rozvinutá imunita umožňuje produkovat velké množství cyst (až 10^6 cyst na gram trusu). Dospělí jedinci sice produkují méně cyst, ale i menší množství stačí k vyvolání nákazy (Yanke et al. 1998, O'Handley et al. 2003, Schaeffer et al. 1991). K léčbě giardiózy se používá metronidazol.

1.3.4.4. Výskyt v Arktidě

Výskyt giardií byl v Arktidě zaznamenán na několika místech, vždy šlo ale pouze o oblasti nízké Arktidy. Přítomnost giardií u tuleňů kroužkovaných v Kanadě prokázal Olson (1997). Nakaženo bylo 3 z 15 testovaných zvířat. Také byla zaznamenána přítomnost *G. duodenalis* u pižmoňů (Kutz et al. 2008). V Severní Americe se nákaze giardiózou říká „bobří horečka“, právě proto, že bobři jsou zde giardiemi nakaženi a jsou považováni za nejčastější zdroj kontaminace pitné vody cystami giardií (Heitman et al. 2002). Nákaza giardiemi byla popsána u lišky obecné (*V. 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).

2. Cíle práce

Cíli mé bakalářské práce bylo:

- Zpracovat literární rešerši o tématu
- Pomocí koncentračních, mikroskopických a molekulárních metod vyšetřit vzorky trusu savců introdukovaných na Svalbard (hraboši (*Microtus levis*), psi, koně)
- Na základě výsledků posoudit rizika zavlečení alochtonních parazitárních infekcí na Svalbard

3. Materiál a metody

3.1. Lokalita sběru vzorků

Všechny vzorky pochází z centrální oblasti Svalbardu, z okolí města Longyearbyen. Zkoumané alochtonní druhy se nevyskytují téměř nikde jinde. Vzorky trusu psů pocházely ze dvou psích stanic v okolí města (Greendog a Basecamp). Vzorky trusu koní byly sbírány v koňské stáji na okraji města u letiště. Odchyt hrabošů probíhal ve vybraných lokalitách potenciálního výskytu hrabošů.

3.2. Vyšetřovaný materiál

Vyšetřované vzorky trusu koní a psů byly sebrány v srpnu 2015. Vzorky trusu od 4 islandských koní byly uskladněny v zip-lock sáčcích při teplotě 4°C. Část vzorků trusu byla uskladněna v 1,5 ml uzavíratelných zkumavkách a zafixována 4% dvojchromanem draselným (K₂Cr₂O₇). Vzorky trusu psů (celkem 36) byly uchovávány v uzavíratelných zkumavkách typu Falcon a skladovány taktéž při teplotě 4°C. Vzorky hrabošů pocházely z let 2013 – 2015. V roce 2013 bylo odchyceno 12 hrabošů, v roce 2014 23 hrabošů a v roce 2015 28 hrabošů. Celkem tedy 63 hrabošů.

3.2.1. Metodika odchyty hrabošů *Microtus levis*

Odchyt probíhal v oblasti správního centra Svalbardu, ve městě Longyearbyen, v srpnu 2015. Po získání potřebných povolení bylo rozmístěno celkem 120 pastí na 4 lokalitách. Jako návnady byly nejdříve použity knoty, osmažené na sádle s rozpuštěným zeleninovým bujonem. Tato návnada, v našich podmínkách běžná, bohužel nebyla vhodným lákadlem. Na místě byly testovány různé druhy návnad. Byl testován naklíčený hrách, fazole, kousky sušeného ananasu a také mandle, které se nakonec ukázaly jako nejvhodnější volbou. Kontrola pastí probíhala dvakrát denně, vždy ráno a večer. Pasti na lokalitách byly umístěny týden, s výjimkou stáje islandských koní, kde byly pasti ponechány déle, vzhledem k počtu odchycených vzorků.

První lokalitou byl Hundeklubb Longyearbyen, kde byly nalezeny nory hraboše *M. levis*. Položeno bylo 35 pastí. Na druhé lokalitě, psí stanici „Basecamp“, bylo po dohodě s majitelkou rozmístěno 25 pastí zejména na místech, kde byli hraboši podle majitelky

spatření. Důkaz o pobytu hrabošů na této lokalitě nebyl prokázán, protože nebyly nalezeny ani nory, ani trus.

Další lokalitou byla soukromá stáj islandských koní na okraji Longyearbyenu. Zde bylo patrných několik nor a cestiček mezi nimi. Položeno bylo 35 pastí kolem jihozápadního rohu budovy stáje, kolem hnojiště (Obr. 6, Obr. 7).

Poslední lokalitou byl opuštěný psinec nad Longyearbyenem, ve vesničce Nybyen, kde bylo položeno 25 pastí.

Po odchycení byl usmrcený hraboš uavřen do zip-lock sáčku a až do pitvy uchován v chladu při teplotě 4 °C.



Obr. 6: Jihozápadní roh budovy koňské stáje.



Obr. 7: Past nalíčená knotem u budovy stáje.

3.2.2. Metodika pitvy hraboše

Po odchycení hraboše z něj bylo třeba vypitvat předem určené orgány, v tomto případě především obsah tenkého a tlustého střeva.

Před samotnou pitvou byla zkontrolována jeho srst a také zip-lock sáček, ve kterém byl po odchytu umístěn. Tím byla ověřena přítomnost ektoparazitů. Poté byla zkontrolována játra a ostatní vnitřní orgány na přítomnost boubelí *E. multilocularis*, případně změn působených dalšími tkáňovými parazity. Následovala kontrola střev, zda v nich nejsou helminti a poté odběr obsahu střev pro další vyšetření. V případě podezřelého nálezu následovala kontrola binolupou či mikroskopem, případně roztlak mozku pro zjištění pseudocyst toxoplazmy.

3.3. Metody vyšetření vzorků

3.3.1. Barvení dle Miláčka – Vítovce (1985)

Tato metoda je používána pro mikroskopické vyšetření přítomnosti oocyst kryptosporidií v trusu pomocí specifického barvení.

Použité chemikálie:

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

Pracovní postup:

Nejdříve byl vytvořen tenký nátěr trusu na předem označené sklíčko. Nátěr byl poté 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 usušeno.

Sklíčka byla prohlížena světelným mikroskopem (OLYMPUS BX 51) při zvětšení 1000× s použitím olejové imerze.

3.3.2. Sedimentace AMS

Sedimentace je koncentrační metoda. Je určena např. k zachycení vajíček helmintů v trusu.

Pro vyšetření vzorků trusu metodou AMS byly použity dva zásobní roztoky v následujícím složení:

1. AMS III roztok

115,2 g Na₂SO₄ bezvodý

540 ml HCl

660 ml H₂O

hustota = 1,080 g/ml

2. roztok Triton

16,5 ml Triton X 100

33,5 ml H₂O

Ve zkumavce s 6 ml roztoku AMS byl rozmíchán trus (vzorek o velikosti hrachu) a vzniklá směs se přelila přes gázu. Do směsi byly přidány 3 kapky Tritonu a 3 ml diethyléru, poté byl obsah protřepán a centrifugován po dobu 2 min při 600 g. Sediment byl prohlížen světelným mikroskopem při zvětšení 200×.

3.3.3. Flotace dle Sheatera

Tato metoda je opět koncentrační metodou k zachycení vajíček parazitů v trusu.

Sheatherův cukerný roztok:

259 ml deionizované vody

405 g cukru (krystal)

7,29 g fenolu

hustota = 1,2 g/ml

Vzorek trusu (o velikosti hrachu) byl rozmíchán ve vodě a zhomogenizován ve třecí misce. Vzniklá směs byla slita přes gázu a centrifugována po dobu 5 min při 1000 g. Supernatant byl poté odstraněn a sediment rozmíchán v malém objemu Sheatherova cukerného roztoku. Poté byl zbytek zkumavky doplněn Sheatherovým roztokem a centrifugován po dobu 5 min při 1000 g. Pomocí mikrobiologické kličky byla opatrně odebrána povrchová blanka na podložní sklo, přikryta krycím sklem a prohlížena světelným mikroskopem při zvětšení 200×.

3.3.4. Molekulární diagnostika vzorků

Všechny vzorky byly postupně vyšetřovány pomocí molekulárních metod na přítomnost DNA kryptosporidií, giardií a mikrosporidií.

3.3.4.1. Izolace DNA z trusu

K vyizolování DNA ze vzorků trusu byl použit komerční izolační kit (GeneAll ExGene Stool DNA mini). Do zkumavky bylo umístěno 200 mg vzorku trusu. Poté byl přidán 1 ml PBS pufru, zkumavka promíchána a její obsah 30 s inkubován. Poté byl supernatant přenesen

do čisté 2 ml mikrozkušavky. Přenesený obsah byl zcentrifugován po dobu 2 minut na nejvyšší g, poté odstraněn supernatant. Do téže zkumavky bylo přidáno 1,3 ml FL pufru a resuspendován pelet. Obsah zkumavky byl 5 minut inkubován a poté se centrifugovala 5 min při 10 000 g. Supernatant byl poté přenesen na kolonu EzPass filter a centrifugován 1 minutu při 10 000 g. Poté se postup s EzPass filtrem ještě jednou zopakoval. Na EzPass filtr bylo dále přidáno 100 µl EB pufru a 1 minutu inkubováno. Poté byla kolona opět zcentrifugována po dobu 1 minuty při 10 000 g. Do filtrátu bylo přidáno 500 µl PB pufru a zkumavka promíchána. Obsah zkumavky byl přenesen na MiniSpin kolonu a při 10 000 g po dobu jedné minuty centrifugován, poté byl odstraněn filtrát. Na kolonu bylo přidáno 500 µl NW pufru, poté opět centrifugováno 1 minutu při 10 000 g a odstraněn filtrát. Kolona byla znovu centrifugována 1 minutu při maximálním g. Poté byla kolona přenesena do čisté 1,5 ml zkumavky. Na membránu MiniSpin kolony bylo přidáno 50 µl EB pufru, inkubováno 1 minutu a centrifugováno 1 minutu při 10 000 g. Kolona byla poté sejmuta a filtrát s vyizolovanou DNA v 1,5 ml zkumavce se dal zmrazit.

3.3.4.2. Polymerázová řetězová reakce

V případě kryptosporidií byl amplifikován gen pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) (Jiang et al. 2005). U mikrosporidií *Enterocytozoon bieneusi* (Buckholt et al. 2002) a *Encephalitozoon* spp. (Didier et al. 1995, Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996) byl použit protokol pro amplifikaci Internal Transcribed Spacer (ITS) genu rRNA. U giardií byla amplifikována část genu Triose Phosphate Isomerase (TPI) (Sulaiman 2003). Reakční směs měla objem 25 µl, kdy 12,5 µl tvořil komerční master mix (TopBio), 9,5 µl PCR voda (TopBio), 2 µl tvořili forward a reverse primery (charakteristika viz Tab. 1) a 1 µl pak templátová DNA. Součástí každé PCR reakce byla také pozitivní a negativní kontrola. U všech parazitů byl pozitivní kontrolou osekvenovaný vzorek.

Tab. 1: Charakteristika primerů použitých pro amplifikaci vybraných genů.

Primer	Sekvence primeru (5'→3')	Nasedací t
<i>Cryptosporidium</i> spp. (SSU rRNA)		
F1	TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG	55 °C
R1	CCC ATT TCC TTC GAA ACA GGA	
F2	GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG	55 °C
R2	CTC ATA AGG TGC TGA AGG AGT A	
<i>Giardia</i> (TPI)		
GIAF1	AAA TIA TGC CTG CTG GTC G	50 °C
GIAR1	CAA ACC TTI TCC GCA AAC C	
GIAF2	CCC TTC ATC GGI GGT AAC TT	50 °C
GIAR2	GTG GCC ACC ACI CCC GTG CC	
<i>Enterocytozoon bieneusi</i> (ITS)		
EBITS3	GGT CAT AGG GAT GAA GAG	57 °C
EBITS4	TTC GAG TTC TTT CGC GCT C	
EBITS1	GCT CTG AAT ATC TAT GGC T	55 °C
EBITS2,4	ATC GCC GAC GGA TCC AAG TG	
<i>Encephalitozoon</i> spp. (ITS)		
INT580F	TTT CAC TCG CCG CTA CTC AG	55 °C
INT580R	TGC AGT TAA AAT GTC CGT AGT	
MSP-3	GGA ATT CAC ACC GCC CGT CVY TAT	55 °C
MSP-4A	CCA AGC TTA TGC TTA AGT YMA ARG GGT	

K provedení reakce byl použit termocykler (BIO-RAD T100). Amplifikační program pro mikrosporidie, kryptosporidie a giardie, pro primární i sekundární PCR (Nested PCR), byl složen z počáteční denaturace při 94 °C po dobu 3 min. Následovalo 35 cyklů, z nichž každý cyklus zahrnoval denaturaci po dobu 45 s při 94 °C, druhově specifické nasedání primerů (annealing) po dobu 45 s (Tab. 1) a syntézu nového řetězce (extenze) při 72 °C po dobu 1 min. Po těchto 35 cyklech následovalo dosyntetizování nového řetězce (finální extenze) při 72 °C po dobu 7 min.

3.3.4.3. Gelová elektroforéza

Výsledky PCR reakce a velikost získaných DNA fragmentů byly ověřovány gelovou elektroforézou v 1 % agarózovém gelu s přidavkem GoodView Nucleic Acid Stain (SBS Genetech) při napětí zdroje 90 V (BIO-RAD PowerPac Basic) po dobu 50 minut. K nanesení do jamek gelu byl použit Yellow loading dye (TopBio). Produkty elektroforézy byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru (Electronic UV transilluminator, Ultra-Lum, Inc.) při vlnové délce 312 nm. DNA Markerem byl 100 bp DNA ladder (Fermentas). Pozitivní PCR

produkty byly vyříznuty z gelu a izolovány/přečištěny kitem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) dle návodu výrobce.

3.3.4.4. Sekvenace

Produkty sekundární PCR u pozitivních vzorků byly sekvenovány pomocí ABI BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit na sekvenátoru ABI3130 (SEQme, ČR) za použití sekundárních primerů (*E. bienensei* – EBITS1 a EBIT2,4; *Cryptosporidium* sp. – F1 a F2) (Tab. 1). Získané sekvence byly analyzovány pomocí programu Geneious 9.5.1 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al. 2012). Sekvence byly identifikovány algoritmem BLAST srovnáním s databází GenBank.

3.3.4.5. Fylogenetická analýza

Pro zjištění fylogenetických vztahů získaných sekvencí kryptosporidií a mikrosporidií byly použity jedno-genové matice. Tyto matice byly vytvořeny použitím získaných sekvencí a sekvencí vybraných z databáze GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Pro dosažení stability a spolehlivosti umístění kořene bylo jako outgroup použito několik taxonů. Matice pro kryptosporidie a mikrosporidie byly alignovány na úrovni nukleotidů v programu MAFFT v.7.222 (Kato et al. 2002) a ručně upraveny pomocí programu Geneious 9.5.1 (<http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012).

Fylogenetické vztahy mezi kryptosporidii a mikrosporidii byly rekonstruovány metodou Maximum-likelihood model Kimura (Kimura 1980) v programu PhyML (Guindon a Gascuel 2003). Pro určení statistické podpory větví byl použit aLRT test. Kladogram kryptosporidií a mikrosporidií byl zobrazen programem Geneious 9.1.5. (<http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012) a graficky upraven v programu Adobe Illustrator CS5 (Adobe Systems Inc.).

4. Výsledky

4.1. Přítomnost parazitů zjištěných při pitvě *M. levis*

Při pitvě hrabošů *M. levis* bylo potřeba ověřit přítomnost tasemnic ve střevě či cyst *E. multilocularis* na játrech. Všichni pitvaní jedinci byli negativní na přítomnost tasemnic ve střevech či cyst echinokoka na játrech.

4.2. Mikroskopické metody

4.2.1. Mikroskopie barvených preparátů dle Miláčka-Vítovce

Výsledky mikroskopie preparátů s tímto barvením, které je specifické pro oocysty kryptosporidií, jsou uvedeny v tabulce č. 2. Silně pozitivní byl nátěr jediného vzorku *M. levis* a tento nález byl potvrzen i molekulární metodou.

Tab. 2: Výsledky detekce oocyst kryptosporidií barvením dle Miláčka-Vítovce

Vyšetřovaní savci	Počet vzorků	Počet pozitivních nálezů
<i>Equus ferus caballus</i>	4	0
<i>Microtus levis</i>	63	1

4.2.2. Sedimentační a flotační metody

4.2.2.1. Flotace dle Sheatera

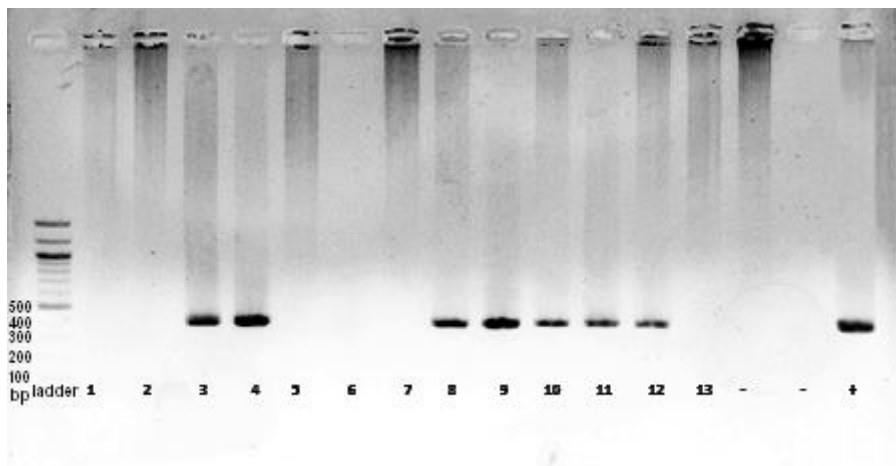
Flotací dle Sheatera byly vyšetřeny vzorky trusu hrabošů (celkem 63) s negativním výsledkem. Negativní byly také čtyři vzorky koní a 36 vzorků psů.

4.2.2.2. Sedimentace AMS

Sedimentační metodou byly vyšetřeny vzorky trusu psů (36 vzorků) a koní (4 vzorky). Všechny vyšetřené vzorky trusu koní byly negativní. Žádná vajíčka helmintů se nepodařilo zachytit ani u psů.

4.3. Molekulární metody

Při zjišťování přítomnosti rodu *Cryptosporidium* byly pozitivní 2 vzorky. Jeden pocházel z hraboše *M. levis* a druhý ze psa. Při zjišťování přítomnosti mikrosporidií bylo 7 vzorků pozitivních na *E. bienensi* (Obr. 8). Všechny pocházely ze vzorků odebraných ze psů. Ani u jednoho vzorku nebyla zjištěna přítomnost více parazitů najednou. Přítomnost mikrosporidie *E. cuniculi* a giardií nebyla potvrzena ani v jednom ze zkoumaných vzorků.



Obr. 8: Výsledek elektroforézy DNA izolované ze psů, pozitivní *E. bienensi*. Jamky 1-13 jsou obsazeny produkty PCR, 14-15 pak negativními kontrolami z primární a sekundární PCR reakce, poslední jamka je pozitivní kontrola.

Sekvenace a fylogenetická analýza ve vyšetřovaných vzorcích potvrdila přítomnost kryptosporidií a mikrosporidií. Pozitivní nálezy kryptosporidií jsou uvedeny v tabulce 3 a pozitivní nálezy mikrosporidie *E. bienensi* jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 3: Výsledky molekulárního vyšetření přítomnosti kryptosporidií.

Vyšetřování savci	Počet vzorků	Počet pozitivních nálezů	Nalezený genotyp
<i>Microtus levis</i>	63	1	Nový genotyp
<i>Equus ferus caballus</i>	4	0	
<i>Canis lupus familiaris</i>	36	1	<i>C. canis</i>

Nový genotyp z hraboše je nejvíce podobný sekvenci s přístupovým kódem GenBank EF641013 izolátu z ondatry. Sekvence *C. canis* je nejpodobnější sekvenci s přístupovým kódem AY120908 izolátu z lišky. Fylogenetické vztahy sekvencí pro gen SSU získaných z nalezených kryptosporidií jsou znázorněny v kladogramu (obr. 9)

Tab. 4: Výsledky molekulárního vyšetření přítomnosti *E. bienensi*.

Vyšetřování savci	Počet vzorků	Počet pozitivních nálezů
<i>Microtus levis</i>	63	0
<i>Equus ferus caballus</i>	4	0
<i>Canis lupus familiaris</i>	36	7

Získaný genotyp ze vzorků izolovaných ze psů je nejvíce podobný genotypu EntCanA s přístupovým kódem GenBank AF059610 izolátu ze psů ve Švýcarsku. Jeden ze vzorků je blíže podobný genotypu PtEbIX s přístupovým kódem GenBank DQ885585 izolátu ze psa v Portugalsku. Fylogenetické vztahy sekvencí pro gen ITS získaných z *E. bienensi* jsou znázorněny v kladogramu (obr. 10).



Obr. 9: Kladogram fylogenetických vztahů kryptosporidií *Cryptosporidium* sp. na základě genu SSU rRNA získaných v této práci a dalších genotypů *Cryptosporidium* sp. z databáze GenBank vytvořený metodou Maximum-likelihood v programu PhyML; statistické podpory větví vypočteny pomocí aLRT (alignováno algoritmem MAFFT). Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny tučně.



Obr. 10: Kladogram fylogenetických vztahů mikrosporidií *Enterocytozoon bieneusi* na základě sekvence genu pro Internal Transcribed Spacer (ITS) rRNA získaných v této práci a dalších genotypů *E. bieneusi* z databáze GenBank vytvořený metodou Maximum-likelihood v programu PhyML; statistické podpory větví vypočteny pomocí aLRT (alignováno algoritmem MAFFT). Sekvence získané v této studii jsou zvýrazněny tučně.

5. Diskuse

Parazitárními infekcemi živočichů na Svalbardu se již zabývalo několik vědeckých článků i studentských diplomových prací (Henttonen et al. 2001, Myšková 2014, Honsová 2012). Dosud žádná práce nebyla zaměřena na parazity alochtonních savců. Přitom právě oni mohou ze svých původních lokalit přinést nové druhy parazitů, které mohou ohrozit nejenom autochtonní druhy na Svalbardu, ale i místní obyvatele.

Doposud byl nejvíce studován výskyt tasemnice *E. multilocularis* u hrabošů. Tomuto tématu se věnoval Henttonen a jeho kolegové (2001), kteří v letech 1999 a 2000 na Svalbardu odchytili 224 hrabošů a z toho v 59 byl nalezen *E. multilocularis*. Ve srovnání s touto prací byl jeho výsledek velmi rozdílný, protože zde ze 63 odchycených hrabošů nebyl ani jeden s pozitivním nálezem. Jedním z důvodů odlišnosti výsledku může být jiná lokalita odchytu. Hraboši byli odchyceni v okolí osady Grumantbyen, tedy v místě, kam byli zavlečeni. Vzorky pro tuto práci pocházely z lokality Longyearbyen, tedy z místa asi 20 km vzdáleného od Grumantbyen. Je možné, že v okolí Longyearbyenu je v porovnání s Grumantbyenem méně lišek, tedy definitivních hostitelů této tasemnice, a proto je i méně infikovaných hrabošů. V roce 2014 byla v Longyearbyenu, poblíž jednoho z míst odchytu hrabošů, nalezena mrtvá liška, která měla ve střevech dospělé echinokoka (Ditrich, osobní sdělení).

Hraboši jako mezihostitelé neintrodukovali *E. multilocularis* na Svalbard. Tasemnice byla zavlečena migrací lišek polárních z jiných částí Arktidy, šlo o genotypy s cirkumpolárním rozšířením, odlišné od genotypů z evropské části Ruska (Knapp et al. 2012). Hraboš jako mezihostitel pouze umožnil uzavření jejich životního cyklu.

Tématikou zavlečených helmintóz se zabývali i v Irsku. Zavlečený norník rudý (*Clethrionomys glareolus*) měl v odebraných vzorcích o poznání méně helmintů než původní myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*) (Loxton 2016). Na Svalbardu ale není žádný jiný druh hlodavce, se kterým by se dal počet helmintóz srovnávat.

Další zkoumanou skupinou parazitů byly kryptosporidie. Jejich přítomnost byla mikroskopicky i molekulárně prokázána u jednoho vzorku z hraboše *M. levis* (prevalence je 1,59 %). Jde o nový genotyp, podle databáze GenBank nejvíce podobný sekvenci s přístupovým kódem EF641013 izolátu z ondatry. U hrabošů byl výskyt kryptosporidií studován: Laakkonen a jeho kolegové (1994) popsali výskyt kryptosporidií u hraboše mokřadního (*Microtus agrestis*) ve Finsku, prevalence ale byla velmi malá, pouze 0,76 % (1 nakažený jedinec ze 131 odchycených). Dalším studovaným hostitelem byl norník rudý (*C. glareolus*). Byli pozitivní 2 jedinci ze 41 odchycených zvířat (prevalence 4,88 %).

Kryptosporidiiemi u norníků (*C. glareolus*) se zabývali v Polsku. Nakažených bylo 20 z 275 (prevalence 7,27 %) (Sinski et al. 1993). V Británii byla prevalence 2,63 % (Chalmers et al. 1997). Ve všech případech šlo o *C. parvum*.

Nízkou prevalenci kryptosporidií hrabošů popsaných v této práci bohužel nelze porovnat s jinými studii, protože studium parazitů *M. levis* na Svalbardu se doposud zaměřovalo pouze na tasemnice *E. multilocularis*, ale výsledek koreluje s vlivy prostředí na životní cyklus kryptosporidií. Je známo, že se životaschopnost oocyst kryptosporidií zkracuje při teplotách pod 5 °C (Fayer et al. 1998), což odpovídá podmínkám na Svalbardu.

DNA kryptosporidií byla prokázána taktéž u jednoho psa. Prevalence je pouhých 2,8 % (vyšetřeno bylo celkem 36 jedinců). Podle výsledků fylogenetické analýzy jde o genotyp *C. canis* nejvíce podobný sekvenci s přístupovým kódem AY120908 izolátu z lišky. V minulosti nebyla přítomnost *C. canis* na Svalbardu potvrzena. Jde o psí varietu *C. parvum* (Fayer et al. 2001). Tato kryptosporidie byla molekulárně prokázána v chovech lišek polárních v Číně, ale také u psů a u lidí (Fayer et al. 2001, Zhang et al. 2016, Xiao et al. 2007).

Na Svalbardu se kryptosporidie vyskytují i u volně žijících zvířat: u sobů, hus a bernešek (Honsová 2012).

Dále byla prokázána přítomnost DNA mikrosporidie *E. bieneusi*, a to u psů. Pozitivních bylo celkem 7 z 36 vzorků odebraných od psů chovaných na dvou psích stanicích (prevalence 19,4 %). Všichni infikovaní psi pocházeli ze stejné psí stanice. Vzhledem k možnostem přenosu mikrosporidií je pravděpodobné, že se psi nakazili od sebe navzájem. Zjištěný genotyp je podobný s nálezem ze Švýcarska kde 3 z 36 psů chovaných na farmě bylo pozitivních (prevalence 8,3 %), šlo o nový genotyp (Mathis et al. 1999). Podobný genotyp byl nalezen u jednoho psa v Portugalsku (Lobo et al. 2006).

Nalezený genotyp je odlišný od genotypů nalezených u volně žijících zvířat (sob polární, husa krátkozobá, liška polární a racek tříprstý) (Myšková 2014, Honsová 2012). Psi jsou na Svalbardu povinně veterinárně kontrolováni jednak při dovozu, tak i při narození na Svalbardu (Anonymous 2016). Vzhledem k tomu, že při standardní prohlídce se nelze mikrosporidie odhalit, lze předpokládat, že některý ze psů přivezl tuto nákazu z pevniny.

Výskyt *C. canis* a *E. bieneusi* by mohl být rizikem pro lišky polární. Nalezený genotyp *E. bieneusi* byl sice zatím prokázán pouze u psů, ale přenos na jiné druhy živočichů není vyloučen. Mohlo by dojít k infekci například lišek, psi se totiž často pohybují se spřeženími ve volném terénu.

Kryptosporidie *C. canis* i mikrosporidie *E. bieneusi*, jakožto původci oportunních infekcí, by mohly být rizikem i pro lidi, zejména pro imunodeficitní jedince. Vzhledem

k tomu, že na Svalbardu panují extrémní podmínky, nežijí zde trvale lidé s nádorovým onemocněním, léčení imunosupresivy po transplantaci orgánů či pacienti s AIDS, je riziko nákazy imunodeficitního jedince nízké. Byly však zaznamenány případy, kdy i imunokompetentní pacienti měli klinické příznaky mikrosporidiové infekce (Weber a Bryan 1994). *Cryptosporidium canis* bylo identifikováno jako původce průjmového onemocnění u dvou dětí (sourozenců) v Peru. Po vyšetření všech domácích zvířat v rodině se prokázalo, že zdrojem infekce je pes (Xiao et al. 2007). Výskyt *C. canis* u psů na Svalbardu by tedy mohl být potenciálně nebezpečný pro lidi.

U psů nebyla mikroskopickými metodami prokázána přítomnost helmintů. Nejpravděpodobnějším důvodem může být jejich pravidelné odčervování. Helminty přesto můžeme na Svalbardu nalézt u volně žijících zvířat. U lišek byla nalezena vajíčka helmintů *Capillaria aerophila*, *Toxascaris leonina* a *Uncinaria stenocephala*. U sobů pak *Trichostrongyloidea*, *Capillaria* sp. a *Moniezia*. V trusu medvěda ledního byla nalezena vajíčka hlístice *Baylisascaris transfuga* (Myšková 2014). Nalezení paraziti lišek a medvědů jsou přenosní na psy i na člověka. Koně by se mohly od sobů nakazit hlísticemi z čeledi *Trichostrongyloidea*.

Nebyl prokázán výskyt parazitů u koní. Při vyšetření vzorků z trusu koní nebyla nalezena vajíčka helmintů a molekulární metody neprokázaly přítomnost DNA ani jednoho ze sledovaných jednobuněčných parazitů. V kontinentální Evropě je rizikovým faktorem kontaminace pastvin, kdy jsou koně paseni neustále na stejném místě. Pokud nejsou kryti anthelmintiky, kontaminují si pastvinu vlastním infekčním trusem. Vajíčka parazitů mohou ve vlhké trávě přežít až několik týdnů. Řešením je střídat pastviny, kosit nevypasenou travu a pravidelně koně odčervovat (Ende et al. 2006, Dušek 2001). Na Svalbardu jsou koně ve společné ohradě jen krátkou část dne, v noci jsou ve stáji a přes den vozí turisty po okolí. Vylučují pokaždé někde jinde, je jen malá šance, že by pozřely potravu infikovanou vlastním trusem. Tím dochází k vyředění parazitů.

Parazitofauna introdukovaných savců na Svalbard není nijak bohatá. Jednak proto, že dva ze tří introdukovaných druhů jsou pod veterinárním dohledem a také proto, že mohlo dojít k bottlenecku (konkrétně u hrabošů), kdy při introdukci zvířat byl přirozeně snížen počet parazitů. V tomto případě je důležitým faktorem absence ostatních druhů drobných savců, kteří by svými parazity nakazili introdukované hraboše a tím by došlo k opětovnému nárůstu parazitofauny u hrabošů. Velký vliv zde také mají extrémní podmínky, které neumožňují životaschopnost některých parazitů. Epidemiologicky přínosným poznatkem pro autochtonní faunu a místní obyvatelstvo je, že se redukuje počet hrabošů nakažených echinokokem,

alespoň v okolí správního centra Longyearbyenu. I přesto mohou v okolí osady Grumantbyen, zátocce Colesbukta či kolem Longyearbyenu existovat populace nakažených hrabošů a lišek.

6. Závěry

- 1) Nebyla prokázána přítomnost tasemnice *Echinococcus multilocularis* ani u jednoho vzorku hraboše *Microtus levis*.
- 2) Ze vzorku trusu hraboše *Microtus levis* byl izolován nový genotyp kryptosporidie.
- 3) Z jednoho vzorku trusu psa byla izolována DNA kryptosporidie *Cryptosporidium canis*.
- 4) Poprvé na Svalbardu byl u psů zjištěn málo obvyklý genotyp mikrosporidie *Enterocytozoon bieneusi*.
- 5) Parazitofauna introdukovaných savců je mimořádně nízká.

7. Literatura

- Adam, R. D. 2001. Biology of *Giardia lamblia*. *Clinical Microbiology Reviews*. 14: 447–475.
- Adl, S. M., A. G. B. Simpson, M. A. Farmer, R. A. Andersen, O. R. Anderson, J. R. Barta, S. S. Bowser, G. Brugerolle, R. A. Fensome, S. Fredericq, T. Y. James, S. Karpov, P. Kugrens, J. Krug, C. E. Lane, L. A. Lewis, J. Lodge, D. H. Lynn, D. G. Mann, R. M. McCourt, L. Mendoza, O. Moestrup, S. E. Mozley-Standridge, T. A. Nerad, C. A. Shearer, A. V. Smirnov, F. W. Spiegel, and M. Taylor. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52: 399–451.
- Åkerstedt, J. 2002. An Indirect ELISA for Detection of *Encephalitozoon cuniculi* Infection in Farmed Blue Foxes (*Alopex lagopus*). *Acta Veterinaria Scandinavica* 43: 211–220.
- Anane, S., Attouchi, H. 2010. Microsporidiosis: epidemiology, clinical data and therapy. *Gastroenterologie clinique et biologique* 34:450-464.
- Anonymous. 2016. SYSSELMANNEN. Import and export of pets to and from Svalbard .[online dostupné z www.syssemmannen.no/en/Shortcuts/Pets/]
- Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J. 1996. Lékařská mikrobiologie, Praha: Marvil, 558pp.
- Benchimol, M. 2004. Participation of the adhesive disc during karyokinesis in *Giardia lamblia*. *Biology of the Cell* 96: 291–301.
- Benchimol, M. 2005. The nuclei of *Giardia lamblia* – new ultrastructural observations. *Archives of Microbiology* 183: 160–168.
- Buckholt, M. A., J. H. Lee, a S. Tzipori. 2002. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2595-2599.
- 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. *Parasitology Research* 85: 899–904.
- Cavalier-Smith, T. 2003. Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European Journal of Protistology* 39: 338–348.
- Conteas, C. N., Berlin, O. G., Ash, L. R., Pruthi, J. S. 2000. Therapy for human gastrointestinal microsporidiosis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 63: 121-127.
- Deng, M. Q., Cliver, D. O. 1999. Improved immunofluorescence assay for detection of *Giardia* and *Cryptosporidium* from asymptomatic adult cervine animals. *Parasitology Research* 85: 733–736.

- Desportes, I., Charpentier, Y. L., Galian, A., Bernard, F., Cochand-Priollet, B., Lavergne, A., Modigliani, R. 1985. Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bienewisi* n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *The Journal of Protozoology* 32: 250-254.
- Didier, E. S., C. R. Vossbrinck, M. D. Baker, L. B. Rogers, D. C. Bertucci, a J. A. Shadduck. 1995. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* 111: 411-421.
- Didier, E. S., Weiss, L. M. 2006. Microsporidiosis: Current status. *Current Opinion in Infectious Diseases* 19: 485-492.
- Ditrich, O. 2. 12. 2016. Ústní sdělení.
- Dušek, J. 2001. Chov koní. 1. vydání. Praha. Brázda. 350pp.
- Ende, H., Isenbügel, E., Wilkens, H. 2006. Péče o zdraví koně. 1. vydání. Praha. Brázda. 279pp.
- Eydal, M., Gunnarsson, E. 1994. Helminth infections in a group of Icelandic horses with little exposure to anthelmintics. *Icelandic agricultural sciences* 8: 85–91.
- Fayer, R. 2004. *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Veterinary Parasitology* 126: 37–56.
- Fayer, R. 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Experimental parasitology* 124: 90-97.
- Fayer, R., Trout, J. M., Jenkins, M. C. 1998. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology* 84: 1165–1169.
- Fayer, R., Trout, J. M., Xiao, L., Morgan, U. M., Lal, A. A., Dubey, J. P. 2001. *Cryptosporidium canis* n. sp. from domestic dogs. *Journal of Parasitology* 87: 1415-1422.
- Fayer, R., Ungar, B. L. 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis. *Microbiological reviews* 50: 458.
- Fayer, R., Xiao, L. 2008. General biology. In: Fayer, R., Xiao, L. (Eds.), *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press, Boca Raton, FL, 1-42.
- Filice, F. P. 1952. Studies on the cytology and life history of a *Giardia* from the laboratory rat. University of California Publications. *Zoology* 57: 53–146
- Fischer, P., Tarashevski, H., Ringelmann, R., Eing, B. 1998. Detection of *Cryptosporidium parvum* in human feces by PCR. *Tokai journal of experimental and clinical medicine* 23: 309-311.
- Fuglei, E., Stien, A., Yoccoz, N. G., Ims, R. A., Eide, N. E., Prestrud, P., Oksanen, A. 2008. Spatial Distribution of *Echinococcus multilocularis*, Svalbard, Norway. *Emerging Infectious Diseases* 14: 73–75.
- Ghosh, S., Frisardi, M., Rogers, R., Samuelson, J. 2001. How *Giardia* swim and divide. *Infection and immunity* 69: 7866-7872.

- Grégr, J., Král, V., Rubín, J. 1997. Norsko. 1.vyd. Praha. Olympia. 172pp.
- Guindon, S., Gascuel, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic biology* 52: 696-704.
- Gulliksen, B., E. Svensen. 2004. Svalbard and Life in Polar Ocean. Kristiansund. Komforlag a/s, 160pp.
- Hannes, I. S., Gjerde, B., Forberg, T., Robertson, L. 2007. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology* 143: 347–353.
- Hannes, I. S., Gjerde, B., Robertson, L. 2006. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in dairy calves in three areas of Norway. *Veterinary Parasitology* 140: 204–216.
- Hartley Edwards, E. 1992. Velká kniha o koních. 1. vyd. Bratislava. Gemini. 240pp.
- Heitman, T. L., Frederick, L. M., Viste, J. R., Guselle, N. J., Morgan, U. M., Thompson, R. C., 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. *Canadian Journal of Microbiology* 48: 530-541.
- Henttonen, H., Fuglei, E., Gower, C.N., Haukisalme, 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. *Parasitology* 123: 547–552.
- Hermesen, J. 2002. Encyklopedie koní. Dotisk 3. vyd. Čestlice. Rebo Productions. 312pp.
- Holm, K. 1999. Longyearbyen, Svalbard: historisk veivisere. Norway. 86pp.
- Honsová, L. 2012. Výskyt potenciálních původců parazitárních zoonóz na Svalbardu. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích. 77pp.
- Horton, R. J. 1997. Albendazole in treatment of human cystic echinococcosis: 12 years of experience. *Acta tropica* 64: 79-93.
- Hozáková, L., Capulič, I. 2014. Zkušenosti s alveolární a cystickou echinokokózou. Sborník semináře Echinokokové infekce. 10-13.
- 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. *Parasitology Research* 83: 478–482.
- Jiang, J., K. A. Alderisio, a L. Xiao. 2005. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4446-4454.
- Jenkins, E. J., Castrodale, L. J., de Rosemond, S. J., Dixon, B. R., Elmore, S. A., Gesy, K. M., Thompson, R. C. A. 2013. Tradition and transition: parasitic zoonoses of people and animals in Alaska, northern Canada, and Greenland. *Advances in Parasitology* 82.

- Jenkins, M., Trout, J. M., Higgins, J., Dorsch, M., Veal, D., Fayer, R. 2003. Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitology Research* 89: 1–5.
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K. I., Miyata, T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research* 30: 3059-3066.
- Katzwinkel-Wladarsch, S., M. Lieb, W. Helse, T. Löscher, a H. Rinder. 1996. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine and International Health* 1: 373-378.
- Karanis, P., Kourenti, C., Smith, H. 2007. Water-borne transmission of protozoan parasites: a review of world-wide outbreaks and lessons learnt. *Journal of Water and Health* 5: 1–38.
- Karpov, S. A., Mamkaeva, M. A., Aleoshin, V. V., Nassonova, E., Lilje, O., Gleason, F. H. 2015. Morphology, phylogeny, and ecology of the aphelids (Aphelidea, Opisthoconta) and proposal for the new superphylum Opisthosporidia. *Roles and mechanisms of parasitism in aquatic microbial communities* 64.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Thierer, T. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.
- Keeling, P. J., Fast, N. M. 2002. Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology* 56: 93-116
- Kern, P., Bardonnnet, K., Renner, E., Auer, H., Pawlowski, Z., Ammann, R. W., Vuitton, D. 2003. European echinococcosis registry: human alveolar echinococcosis, Europe, 1982-2000. *Emerging Infectious Diseases* 9: 343-9.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* 16: 111-120.
- Knapp, J., Staebler, S., Bart, J. M., Stien, A., Yoccoz, N. G., Drögemüller, C., Deplazes, P. 2012. *Echinococcus multilocularis* in Svalbard, Norway: microsatellite genotyping to investigate the origin of a highly focal contamination. *Infection, Genetics and Evolution* 12: 1270-1274.
- Kotler D.P., Orenstein, J.M. 1999. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. In: *The Microsporidia and Microsporidiosis*. Wittner M, Weiss LM (Eds), American Society for Microbiology, WA, USA, 258–292
- Kovacs, K. M. a C. Lydersen. 2006. *Birds and mammals of Svalbard*. Tromsø. Norwegian Polar Institut: 203 pp.
- Kristiansen, J. E. 2014. *This is Svalbard 2014: What the figures say*. Oslo: Statistic Norway. 24pp.

- Kutz, S. J., Thompson, R. A., Polley, L., Kandola, K., Nagy, J., Wielinga, C. M., Elkin, B. T. 2008. *Giardia* assemblage A: human genotype in muskoxen in the Canadian Arctic. *Parasites & vectors* 1: 38.
- Laakkonen, J., Soveri, T., & Henttonen, H. 1994. Prevalence of *Cryptosporidium* sp. in peak density *Microtus agrestis*, *Microtus oeconomus* and *Clethrionomys glareolus* populations. *Journal of Wildlife Diseases* 30: 110-111.
- Lambl, W. 1859. Mikroskopische Untersuchungen der Darm-Excrete: Beitrag zur Pathologie des Darms und zur Diagnostik am Krankenbette. 57pp.
- Larsson, J. I. R. 1999. Identification of microsporidia. *Acta Protozoologica* 38: 161–197.
- Lent, P.C. 1999. Muskoxen and their hunters: a history. 1. Norman: University of Oklahoma Press, 324 pp.
- Lobo, M. L., Xiao, L., Cama, V., Stevens, T., Antunes, F., Matos, O. 2006. Genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in mammals in Portugal. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53: 61-64.
- Loxton, K. C., Lawton, C., Stafford, P., Holland, C. V. 2016. Reduced helminth parasitism in the introduced bank vole (*Myodes glareolus*): More parasites lost than gained. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 5: 175-183
- Markell, E. K., John, D. T., Krotoski W. A. 1999. Markell and Voge's medical parasitology. 8th ed. Philadelphia: Saunders, 501 pp.
- Mathis, A., Breitenmoser, A. C., & Deplazes, P. 1999. Detection of new *Enterocytozoon* genotypes in faecal samples of farm dogs and a cat. *Parasite* 6: 189-193.
- Matsubayashi, H., Koike, T., Mikata, I., Takei, H., Hagiwara, S. 1959. A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *Archives of pathology & laboratory medicine* 67: 181-187.
- McRoberts, K. M., Meloni, B. P., Morgan, U. M., Marano, R., Binz, N., Erlandsen, S. L., Halse, S. A., Thompson, R. C. A. 1996. Morphological and molecular characterization of *Giardia* isolated from the straw-necked ibis (*Threskiornis spinicollis*) in Western Australia. *The Journal of parasitology* 82: 711-718.
- Myšková, E. 2014. Střevní paraziti obratlovců na Svalbardu. České Budějovice. Diplomová práce. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích. 81pp.
- Noble, E. R. 1989. Parasitology: the biology of animal parasites. 6th ed. /. Philadelphia: Lea. 584pp.
- O'Donoghue, P.J. 1995. *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology* 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. *Veterinary Parasitology* 113: 89–98.

- Olson, M. E., Roach, P. D., Stabler, M., Chan, W. 1997. Giardiasis in ringed seals from the western arctic. *Journal of Wildlife Diseases* 33: 646-648.
- Orenstein, J. M., Fox, C., Wahl, S. M. 1997. Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections. *Science* 273: 1857-1861.
- Petersen, C. 1992. Cryptosporidiosis in patients infected with Human Immunodeficiency Virus. *Clinical Infectious Diseases* 15: 903–909.
- Pickeral, T. 2004. *Encyklopedie koní a poníků*. Praha. Slovart. 384pp.
- Porter, J. D., Gaffney, C., Heymann, D., Parkin, W. 1990. Food-borne outbreak of *Giardia lamblia*. *American Journal of Public Health* 80: 1259–1260.
- Sale, R. 2006. *A complete guide to Arctic wildlife*. Buffalo. Firefly Books. 464pp.
- Sefker, 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*). *Journal of Parasitology* 88: 213–216.
- Schaeffer 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*). *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2408–2409.
- Schurer, J. M., Hill, J. E., Fernando, Ch., Jenkins, E. J. 2012. Sentinel Surveillance for Zoonotic Parasites in Companion Animals in Indigenous Communities of Saskatchewan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 87: 495–498.
- Sinski E., Hlebowicz, E., Bednarska, M. 1993. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* infection in wild small mammals in District of Mazury Lake (Poland). *Acta Parasitologica* 38: 59–61.
- Sprague, V., Becnel, J. J., Hazard, E. I. 1992. Taxonomy of phylum Microspora. *Critical Reviews in Microbiology* 18: 285–395.
- Stange, R. 2012. *Spitsbergen – Svalbard. A complete guide around the arctic archipelago*. Stange. 512 pp.
- Sulaiman, I. M., R. Fayer, C. Bern, R. H. Gilman, J. M. Trout, P. M. Schantz, P. Das, A. A. Lal, a L. Xiao. 2003. Triphosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging Infectious Diseases* 9:1444-1452.
- Thivierge, K., Iqbal, A., Dixon, B., Dion, R., Levesque, B., Cantin, P., Yansouni, C. P. 2016. *Cryptosporidium hominis* Is a Newly Recognized Pathogen in the Arctic Region of Nunavik, Canada: Molecular Characterization of an Outbreak. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10.
- Thompson, R. C. A., Monis, P. T. 2004. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Advances in Parasitology* 58: 69–137.
- Umbreit, A. 2005. *Spitsbergen: Svalbard, Franz Josef Land, Jan Mayen*. 3. edition. Chalfont St. Peter, Bucks. Bradt Publications. 288pp.

- Vavra, J., Larsson, J. I. R., Wittner, M., Weiss, L. M. 1999. The microsporidia and microsporidiosis. *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society for Microbiology, Washington D. C.: 7-84.
- Villeneuve, A., Polley, L., Jenkins, E. J., Schurer, J. M., Gilleard, J., Kutz, S., Conboy, G., Benoit, D., Seewald, W., Gagné, F. 2015. Parasite prevalence in fecal samples from shelter dogs and cats across the Canadian provinces. *Parasites & Vectors* 8: 1-10.
- Volf, P., Horák, P. 2007. Paraziti a jejich biologie, 1. vydání. Praha. Triton. 318pp.
- 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. *Parasitology* 127: 87–107.
- Weber, R., Bryan, R. T., Schwartz, D. A., Owen, R. L. 1994. Human microsporidial infections. *Clinical Microbiology Reviews* 7: 426-461.
- Weber, R., Bryan, R. T. 1994. Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patients. *Clinical Infectious Diseases* 19: 517-521.
- Xiao, L., Cama, V. A., Cabrera, L., Ortega, Y., Pearson, J., Gilman, R. H. 2007. Possible transmission of *Cryptosporidium canis* among children and a dog in a household. *Journal of clinical microbiology* 45: 2014-2016.
- Xiao, L., Fayer, R. 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *International journal for parasitology* 38: 1239-1255.
- Yanke, S. J., Ceri, H., McAllister, T. A., Morck, D. W., Olson, M. E. 1998. Serum immune response to *Giardia duodenalis* in experimentally infected lambs. *Veterinary parasitology* 75: 9-19.
- Zhang, X. X., Cong, W., Ma, J. G., Lou, Z. L., Zheng, W. B., Zhao, Q., & Zhu, X. Q. 2016. First report of *Cryptosporidium canis* in farmed Arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in China. *Parasites & vectors* 9: 1.

Fotografie bez popisu zdroje patří autorovi práce.