



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra zootechnických věd

Bakalářská práce

Diverzita endoparazitů lišek polárních (*Vulpes lagopus*)
na Bylot Island v Kanadě

Autorka práce: Markéta Pavlovičová

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

Konzultant práce: RNDr. Eva Myšková

České Budějovice
2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne.....

.....

Podpis

Abstrakt

Lišky představují rezervoár zoonotických infekcí, proto je důležité mít přehled o výskytu případných onemocnění. Od roku 2003 do roku 2019 byly sbírány vzorky trusu lišky polární (*Vulpes lagopus*) z různých stanovišť na Bylotově ostrově v Kanadě, které byly následně vyšetřeny mikroskopickými a molekulárními metodami na přítomnost mikrosporidií, kryptosporidií a giardií. Byla prokázána přítomnost specifické DNA kryptosporidií ve dvou, specifická DNA mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* ve 34 a specifická DNA mikrosporidií rodu *Enterocytozoon* v pěti vzorcích trusu. Následné analýzy prokázaly přítomnost *Cryptosporidium canis* fox genotyp, *Encephalitozoon cuniculi* genotyp II a III a *Encephalitozoon hellem* genotyp 1A. Žádný z vyšetřovaných vzorků trusu nebyl pozitivní na přítomnost specifické DNA *Giardia intestinalis*. Žádné zvíře nejevilo známky průjmového onemocnění. Výsledky práce ukazují, že lišky polární jsou často parazitovány mikrosporidii rodu *Encephalitozoon*, zatímco výskyt ostatních sledovaných parazitů byl ojedinělý.

Klíčová slova: *Cryptosporidium* spp., mikrosporidie, *Giardia intestinalis*, PCR, koprologie, trus, liška polární, Kanada

Abstract

The foxes represent a reservoir of zoonotic infections therefore it is important to be familiar with an occurrence of possible diseases. Arctic fox (*Vulpes lagopus*) faeces were collected between 2003 and 2011 from various locations on Bylot Island, Canada. These samples were consequently treated with microscopic and molecular methods to prove the presence of microsporidia, cryptosporidia and giardia. The presence of a specific DNA of *Cryptosporidium* was detected in two samples and specific DNA of Microsporidia was detected in 34 samples for genus *Encephalitozoon* and in five samples for genus *Enterocytozoon*. None of the animals showed any symptoms of a diarrhoea. Subsequent analyses showed the presence of the *Cryptosporidium canis* fox genotype, *Encephalitozoon cuniculi* II and III genotypes and *Encephalitozoon hellem* genotype 1A. None of the examined faeces samples were positive for the presence of specific *G. intestinalis* DNA. Results of the thesis show that Arctic foxes are mainly infected by microsporidia of the genus *Encephalitozoon*, while the occurrence of other observed parasites was rare.

Keywords: *Cryptosporidium* spp., microsporidia, *Giardia intestinalis*, PCR, coprology, faeces, arctic fox, Canada

Poděkování

Mé poděkování patří prof. Ing. Martinu Kváčovi za jeho trpělivost, cenné rady a odborné vedení. Dále bych chtěla poděkovat školitelce specialiste, RNDr. Evě Myškové, za pomoc při získání materiálu a práci v laboratoři. Děkuji také všem pracovníkům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie, Parazitologického ústavu BC AV ČR, v.v.i. za ochotu a přátelské jednání. Velké díky patří také mé rodině, která mě po dobu mého studia podporovala.

Obsah

Úvod.....	8
1 Literární přehled	9
1.1 Liška polární (<i>Vulpes lagopus</i>)	9
1.1.1 Výskyt.....	9
1.1.2 Stavba těla.....	9
1.1.3 Barevné varianty	9
1.1.4 Potrava	10
1.1.5 Rozmnožování	10
1.2 Paraziti vyskytující se u lišek polárních.....	10
1.2.1 Protista	11
1.2.2 Hlístice	11
1.2.3 Tasemnice	12
1.2.4 Motolice	13
1.2.5 Vrtejši	14
1.3 Sledování paraziti.....	14
1.3.1 <i>Cryptosporidium</i> spp.	14
1.3.2 Mikrosporidie	15
1.3.3 <i>Giardia intestinalis</i>	17
2 Cíle	19
3 Materiál a metodika.....	20
3.1 Materiál	20
3.2 Flotace dle Sheathera	20
3.3 Izolace DNA z trusu.....	21
3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	22
3.5 Gelová elektroforéza	24

3.6	Izolace z gelu.....	24
3.7	Sekvenace.....	25
3.8	Fylogenetické analýzy.....	25
3.9	Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) mikrosporidií	26
4	Výsledky.....	28
5	Diskuze	32
6	Závěr.....	35
	Seznam použité literatury.....	36
	Seznam tabulek	46
	Seznam obrázků	48

Úvod

Polární lišky mají cirkumpolární rozšíření a jsou vrcholovými predátory v arktických ekosystémech. Na řadě míst slouží jako významní mrchožrouti (Angerbjörn a Tannerfeldt, 2014). Polární liška představuje také významný rezervoár řady patogenů, z nichž někteří mají zoonotický potenciál. Zdravotní stav lišek má významný vliv pro celý ekosystém. Kombinace nehostinných podmínek v arktických oblastech, stresu, nedostatku potravy a parazitárních infekcí může zásadním způsobem ovlivnit jejich plodnost, schopnost přežít a tím může být významně ovlivněno demografické rozšíření lišek (Botková a Unnsteinsdóttirová, 2014).

Polární lišky se dělí na populace vnitrozemských a pobřežních lišek jejichž složení potravy se významným způsobem liší (Botková a Unnsteinsdóttirová, 2014). Zdroj potravy a hustota populace lišek se může významně odrážet ve spektru parazitů, kterými jsou jednotlivé populace lišek nakaženy. U lišek byla v minulosti detekována celá řada původců parazitárních onemocnění, přičemž většina studií se zaměřovala na hlístice, tasemnice nebo motolice, a tedy parazitózy, které je relativně snadné detekovat při rutinním parazitologickém/mikroskopickém vyšetření. Parazitičtí protisti, jejichž infekční stadia jsou velmi malá a nesnadno detekovatelná, stáli v minulosti mimo hlavní pozornost vědců studujících parazitární infekce u lišek polárních, a to i přes skutečnost, že například infekce způsobené mikrosporidii *Encephalitozoon cuniculi* jsou pro lišky často letální (Aguirre et al., 2000; Åkerstedt et al., 2010; Andreassen et al., 2017; Eaton a Secord, 1979; Elmore et al., 2013; Hersteinsson et al. 1993; Henttonen et al. 2001; Kapel a Nansen 1996; Meijer et al. 2011; Myšková et al., 2019; Prestrud et al. 1993; Prestrud et al. 2007; Skirnisson et al. 1993; Stien et al. 2010).

Tato práce se tedy zaměřuje na výskyt několika opomíjených parazitů u volně žijících lišek polárních.

1 Literární přehled

1.1 Liška polární (*Vulpes lagopus*)

1.1.1 Výskyt

Liška polární (*Vulpes lagopus*) dříve řazená do rodu *Alopex* nyní do rodu *Vulpes* je drobná psovitá šelma. Jedná se o stabilní populaci, jejíž početnost se po světě řádově pohybuje kolem několika stovek tisíc jedinců. Liška polární má cirkumpolární rozšíření. Běžně se vyskytuje v oblastech ledovců a tundry v Kanadě, Rusku, na pobřeží Aljašky, severních částech Asie, Evropy, na Islandu, v Grónsku a na dalších přilehlých ostrovech v arktickém regionu (Angerbjörn a Tannerfeldt, 2014). Z důvodů obchodu s kožešinami byla liška polární introdukována na místa, kde se původně nevyskytovala. Takovým příkladem mohou být Aleutské ostrovy na Aljašce, kde lišky způsobovaly značné škody na populacích ohrožených druhů ptáků, a proto byly vyhubeny (Angerbjörn a Tannerfeldt, 2014). V některých státech, např. Norsku, Finsku a Švédsku je liška polární chráněná kvůli snižujícímu se počtu jedinců způsobeným nedostatkem potravy (Botková a Unnsteinsdóttirová, 2014).

1.1.2 Stavba těla

Stavba těla se přizpůsobila klimatickým podmínkám, ve kterých liška polární žije. Tělo je menšího vzrůstu pokryté hustou srstí, která zabraňuje úniku tepla z těla i při vysoce nízkých teplotách dosahujících až -50 °C. Srst pokrývá i polštářky na chodidlech končetin, jako tomu je i u ledního medvěda (Unnsteinsdóttir, 2020). Krátká tlama, krátké končetiny a uši snižují tepelné ztráty. Naopak ocas je dlouhý a huňatý, při stočení slouží jako tepelný kryt. U lišek polárních je výrazný pohlavní dimorfismus. Samci bývají větší než samice až o 10–20 %. Průměrná váha u samce se pohybuje okolo 3–4 kg, zatím co samice váží okolo 2,9 kg (Hornok et al., 2020).

1.1.3 Barevné varianty

Rozlišujeme dvě barevné varianty, bílou a modrou. Jedinci bílé varianty mají v zimě sněhově bílou srst, která slouží jako skvělé maskování před případnými predátory. V létě srst přelíná na hnědou barvu se žlutými oblastmi na spodní straně těla. U jedinců s modrou variantou je přes letní období srst čokoládově hnědá a v zimním období se mění na světlejší hnědou s ocelově modrošedým nádechem.

Modrá varianta lišky polární se vyskytuje především v pobřežních biotopech (Botková a Unnsteinsdóttirová, 2014).

1.1.4 Potrava

Polární liška je oportunistický predátor, všežravec, ale v zimním období při nedostatku potravy i mrchožrout. Mezi hlavní zdroje obživy patří především hlodavci, jako jsou lumíci (*Lemmini*) a hraboši (*Microtus*), mořští ptáci a ryby. Stravu si mohou zpestřit různým hmyzem, obojživelníky, plži a bobulemi (Sale, 2006; Stange, 2012). Přes letní období si lišky tvoří tukové zásoby. Přebytkovou stravu si schovávají do svých nor, kde potravu přikrývají kameny. V zimním období při nedostatku potravy lišky následují lední medvědy a přiživují se na zbytcích z jejich kořisti (Eide et al., 2005).

1.1.5 Rozmnožování

V době rozmnožování žijí lišky polární v páru. K páření dochází na jaře a někdy se mohou rozmnožovat i dvakrát za rok. Samice je březí 52–53 dní. Své teritorium si vymezují pachovými stopami a hlasem. Samec neopouští samici s mláďaty, ale zůstává s nimi a podílí se na péči o liščata. Velikost teritoria závisí na množství potravy v dané lokalitě. Ve vrhu bývá kolem 5–10 mláďat, ta začínají přijímat pevnou stravu okolo 4. týdne stáří. Potravu obstarává samec. Liščata ve věku 21–28 dní poprvé opouštějí doupě a prozkoumávají okolí. Své rodiče opouštějí na podzim a pohlavní zralosti dosahují už ve stáří 10 měsíců (Unnsteinsdóttir, 2020). Liška se může dožít až 16 let (v zajetí až 20 let), průměrně však žije pouhé 3–4 roky (Botková a Unnsteinsdóttirová, 2014).

1.2 Paraziti vyskytující se u lišek polárních

V porovnání s jinými psovitými šelmami je počet studií, které se zabývaly výskytem střevních parazitů u lišek polárních, omezený. Studie byly dosud provedeny ve Finsku, Kanadě, na Islandu a Grónsku a na Svalbardu (Aguirre et al.; 2000; Åkerstedt et al., 2010; Andreassen et al., 2017; Eaton a Secord, 1979; Elmore et al., 2013; Hersteinsson et al. 1993; Henttonen et al. 2001; Kapel a Nansen 1996; Meijer et al. 2011; Myšková et al., 2019; Prestrud et al. 1993; Prestrud et al. 2007; Skirnisson et al. 1993; Stien et al. 2010). Z dosud publikovaných výsledků vyplývá,

že lišky polární mohou být hostitelé a mezihostitelé celé řady střevních parazitů patřících mezi protista, hlístice, tasemnice, motolice nebo vrtejše.

1.2.1 Protista

V rámci protist byl u lišek polárních zaznamenán výskyt nálevníků patřících do rodu *Balantidium*, kokcií rodu *Eimeria*, *Isospora*, *Cystoisospora*, *Sarcocystis* a *Toxoplasma* (Skirnisson et al. 1993). Dále byl detekován výskyt kryptosporidií, giardií a mikrosporidií rodu *Encephalitozoon*, konkrétně *E. cuniculi* (Tabulka 1). V rámci rodu *Sarcocystis* byl popsán výskyt *S. grueneri*, *S. rangi* a *S. tarandivulpes* (Dahlgren et al. 2007).

Tabulka 1. Výskyt parazitických protist u lišek polárních ve světě (Aguirre et al., 2000; Åkerstedt et al., 2010; Eaton a Secord, 1978; Elmore et al., 2013; Hersteinsson et al., 1993; Henttonen et al., 2001; Kapel a Nansen, 1996; Meijer et al., 2011; Prestrud et al., 1993; Prestrud et al., 2007; Skirnisson et al., 1993; Stien et al., 2010).

Druh	Lokalita					
	Grónsko	Island	Kanada	Norsko	Svalbard	Švédsko
<i>Balantidium</i> sp.						•
<i>Cryptosporidium</i> sp.			•			
<i>Cystoisospora</i> spp.						•
<i>Eimeria</i> sp.		•	•			•
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>		•				
<i>Giardia</i> sp.			•			
<i>Isospora</i> sp.		•	•			•
<i>Sarcocystis</i> spp.			•	•		•
<i>Toxoplasma gondii</i>				•	•	

• zaznamenaný výskyt

1.2.2 Hlístice

Lišky polární jsou často parazitovány celou řadou hlístic. Výsledky studií ukázaly přítomnost kapilárií (*Eucoleus aerophilus* a *Capilaria* sp.), plicnivky liščí (*Crenosoma vulpis*), *Stegophorus stercoralis*, háďat rodu *Strongyloides*, škrkavek

(*Toxocara* a *Toxascaris*), tenkohlavců (*Trichuris*), měchovců (*Uncinaria*) a svalovců (*Trichinella nativa*) (Prestrud, 1993; Tabulka 2).

Tabulka 2. Výskyt parazitických hlístic u lišek polárních ve světě (Aguirre et al., 2000; Åkerstedt et al., 2010; Eaton a Secord, 1978; Elmore et al., 2013; Hersteinsson et al., 1993; Henttonen et al., 2001; Kapel a Nansen, 1996; Meijer et al., 2011; Prestrud et al., 1993; Prestrud et al., 2007; Skirnisson et al., 1993; Stien et al., 2010).

Druh	Lokalita					
	Grónsko	Island	Kanada	Norsko	Svalbard	Švédsko
<i>Capillaria</i> spp.		•	•		•	•
<i>Crenosoma vulpis</i>						•
<i>Spiruroidae-like</i>						•
<i>Stegophorus stercorarii</i>		•			•	
<i>Strongyloides stercoralis</i>	•					
<i>Toxocara canis</i>		•	•		•	•
<i>Toxascaris leonina</i>	•	•	•		•	•
<i>Trichinella nativa</i>	•					
<i>Trichuris</i> sp.					•	•
<i>Uncinaria stenocephala</i>	•	•				•

• zaznamenaný výskyt

1.2.3 Tasemnice

V rámci tasemnic byl u lišek polárních detekován výskyt měchožilů (*Echinococcus granulosus*), škulovců (*Diphyllbothrium dendriticum*), tasemnice norčí (*Mesocestoides lineatus*) a několika druhů tasemnic rodu *Taenia* a *Schistocephalus solidus* (Tabulka 3).

Tabulka 3. Výskyt parazitických tasemnic lišek polárních ve světě (Aguirre et al., 2000; Åkerstedt et al., 2010; Eaton a Secord, 1978; Elmore et al., 2013; Hersteinsson et al., 1993; Henttonen et al., 2001; Kapel a Nansen, 1996; Meijer et al., 2011; Prestrud et al., 1993; Prestrud et al., 2007; Skirnisson et al., 1993; Stien et al., 2010).

Druh	Lokalita					
	Grónsko	Island	Kanada	Norsko	Svalbard	Švédsko
<i>Echinococcus multilocularis</i>	•		•		•	
<i>Diphyllbothrium dendriticum</i>	•	•				
<i>Mesocestoides</i> spp.	•	•				•
<i>Schistocephalus solidus</i>		•				
<i>Taenia</i> spp.	•		•		•	•

• zaznamenaný výskyt

1.2.4 Motolice

Z pěti různých rodů motolic detekovaných u lišek polárních byly všechny nalezeny u lišek na Islandu (Tabulka 4). Motolice *Cryptocle lingua* a *Plagiorchis elegans* byly navíc nalezeny i u lišek v Grónsku (Kapel a Nansen, 1996).

Tabulka 4. Výskyt parazitických motolic lišek polárních ve světě (Aguirre et al., 2000; Åkerstedt et al., 2010; Eaton a Secord, 1978; Elmore et al., 2013; Hersteinsson et al., 1993; Henttonen et al., 2001; Kapel a Nansen, 1996; Meijer et al., 2011; Prestrud et al., 1993; Prestrud et al., 2007; Skirnisson et al., 1993; Stien et al., 2010).

Druh	Stát/lokalita					
	Grónsko	Island	Kanada	Norsko	Svalbard	Švédsko
<i>Brachylaemus</i> sp.		•				
<i>Cryptocotyle lingua</i>	•	•				
<i>Plagiorchis elegans</i>	•	•				
<i>Spelotrema</i> sp.		•				
<i>Tristriata</i> sp.		•				

• zaznamenaný výskyt

1.2.5 Vrtejší

V rámci této skupiny parazitů byla u lišek polárních na Islandu nalezena *Corynosoma hadweni* a *Polymorphus mayeri* (Hersteinsson et al., 1993, Skirnisson et al., 1993). V Grónsku byl nalezen *Polymorphus* sp. (Kapel a Nansen, 1996).

1.3 Sledování paraziti

S ohledem na zaměření této práce se tato kapitola bude podrobněji zabývat pouze parazity, kteří byli předmětem studia. Všichni níže popisovaní paraziti, respektive jejich infekční vývojová stadia jsou z hostitelů vylučována převážně trusem (Bouzid, 2013). Z toho vyplývá, že kryptosporidie, giardie i mikrosporidie jsou primárně přenášeny fekálně-orální cestou, přičemž přenos může probíhat kontaktem mezi zvířetem a zvířetem, nebo člověkem a zvířetem. Další častou cestou přenosu je pozření kontaminované vody nebo potravy (Fayer et al., 2000).

1.3.1 *Cryptosporidium* spp.

Kryptosporidie jsou celosvětově rozšíření jednobuněční intracelulární paraziti infikující epitelální buňky trávicího aparátu velkého množství hostitelů patřících do všech tříd obratlovců (O'Donoghue, 1995). Kromě lokalizace vývojového cyklu v zažívacím traktu hostitele mohou některé druhy a genotypy kryptosporidií infikovat plíce, ledviny a vzácně i další vnitřní orgány (Current et al., 1986, Holubová et al., 2016). Většina dosud popsáných druhů kryptosporidií je hostitelsky specifická; infikují jen omezenou skupinu, často fylogeneticky příbuzných hostitelů, nebo je znám pouze jeden jediný hostitel (Xiao, 2010). Malé procento druhů, mezi které patří *C. parvum*, *C. ubiquitum* nebo *C. baileyi*, má širokou hostitelskou specifitu (Fayer a Xiao, 2007).

Průběh infekce závisí na imunitním stavu hostitele, jeho věku a druhu kryptosporidie. U volně žijících druhů zvířat, které jsou parazitována hostitelsky adaptovanými druhy a genotypy je průběh infekce často asymptomatický. U mláďat hospodářských zvířat, stejně jako u člověka je infekce často doprovázena silnými vodnatými průjmy, křečemi, zvracením a bolestmi břicha. Průběh infekce může být pro oslabené a imunosuprimované jedince smrtelný (Lindsay a Blagburn, 1990).

Obdobně jako u jiných druhů parazitů, také o výskytu kryptosporidií u lišek polárních není mnoho záznamů. Jak již bylo výše zmíněno, kryptosporidie u volně

žijících lišek polárních byly detekovány pouze v jedné studii v Kanadě. Detekce oocyst byla provedena mikroskopicky, tedy není známo, jaký druh kryptosporidie se ve studovaných jedincích nacházel (Elmore et al., 2013). U farmově chovaných lišek polárních v Číně, byla prokázána přítomnost *C. canis* u 48 zvířat z 302 vyšetřených (Zhang et al., 2016) (Tabulka 5).

Co se týká výskytu kryptosporidií u jiných druhů lišek, tak tito paraziti byli detekováni u lišky obecné (*Vulpes vulpes*) a lišky šedé (*Urocyon cinereoargenteus*). U druhé jmenované byl popsán výskyt oocyst kryptosporidií bez bližšího molekulárního určení (Current, 1989, Davidson et al., 1992). Naopak u lišky obecné byly kryptosporidie detekovány relativně často. Ve studii ze Slovenska bylo 24 ze 62 lišek obecných pozitivních na přítomnost specifického koproantigenu kryptosporidií (Ravaszová et al., 2012). Přehled výskytu kryptosporidií u lišek je uveden v tabulce 5.

Tabulka 5. Výskyt kryptosporidií u lišek ve světě.

Hostitel (vědecký název)	Stát	<i>Cryptosporidium</i> spp.	Výskyt	Reference
Liška obecná (<i>Vulpes vulpes</i>)	Slovensko	<i>Cryptosporidium</i> sp.	38,7 %	Ravaszová et al. (2012)
	Irsko	<i>C. parvum</i>	8,1 %	Nagano et al. (2007)
	Anglie	<i>Cryptosporidium</i> sp.	8,7 %	Sturdee et al. (1999) Hamnes et al. (2007)
	Írán	<i>Cryptosporidium</i> spp.	3,2 %	Zhou et al. (2004)
	Španělsko	<i>C. canis</i> , <i>C. parvum</i> , <i>C. felis</i> , <i>C. ubiquitum</i>	8 %	Mateo et al. (2017)
	Španělsko	<i>C. homnis</i>	ND	Barrera et al. (2020)
Liška polární (<i>Vulpes lagopus</i>)	Čína	<i>C. canis</i>	15,9 %	Zhang et al. (2016)
	Kanada	<i>Cryptosporidium</i> sp.	9,5 %	Elmore et al. (2013)
Liška šedá (<i>Urocyon cinereoargenteus</i>)	USA	<i>Cryptosporidium</i> sp.	ND	Current (1989) Davidson et al. (1992)

ND - neuvedeno

1.3.2 Mikrosporidie

Mikrosporidie patří do kmene Microsporidia, třídy Microsporea a řádu Microsporida (Vivarés et al., 2002). V současné době známe kolem 2 000 druhů mikrosporidií, řazených asi do 200 rodů (Vávra, 2017) z nichž většina parazituje u bezobratlých hostitelů. Mikrosporidie rodů *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon* jsou nejčastějšími

původci mikrosporidiových infekcí u savců. Rozšíření mikrosporidií je kosmopolitní a tito paraziti byli nalezeni na všech obydlených kontinentech (Ardila-Garcia a Fast, 2012).

Rod *Enterocytozoon* zahrnuje dva druhy – *E. bienersi* a *E. salmonis*. Druh *E. bienersi* je jednou z nejčastějších mikrosporidií u savců. Poprvé byl tento druh detekován u AIDS pacienta v roce 1985 (Desportes et al., 1985) a následně v celé řadě různých hostitelů (Buckholt et al., 2002; Rinder et al., 2000; Sak et al., 2008; Dengjel et al., 2001; Fayer et al., 2003; Sulaiman et al., 2004; Rinder et al., 2000; Reetz et al., 2002; Dengjel et al., 2001; Lores et al., 2002; del Aguila et al., 1999; Sulaiman et al., 2004; del Aguila et al., 2004; del Aguila et al., 2004; Haro et al., 2005; Sestak et al., 2003; Santín a Fayer, 2011). V současné době jsou známy stovky genotypů tohoto druhu, které jsou od sebe odlišovány na základě sekvence pro ITS (Santín a Fayer, 2009). U většiny genotypů byla popsána nízká hostitelská specifita (Didier et al., 1995). Jen některé genotypy jsou pravděpodobně úzce hostitelsky specifické. Klinické příznaky onemocnění jsou velmi různorodé, dle zasažených orgánů, zahrnující chronický průjem, úbytek hmotnosti, zvýšení tělesné teploty, celkové vysílení organismu až smrti jedince (Kotler a Orenstein, 1998)

Dosavadní studie popsaly výskyt *E. bienersi* jak u divokých, tak i chovaných lišek. U farmově chované lišky obecné a stříbrné, Santín et al. (2017) popsali výskyt *E. bienersi* genotypu WildBoar3 u 8 z 87 lišek obecných ve Španělsku. Výskyt *E. bienersi* byl prokázán u farmově chovaných lišek obecných (*Vulpes vulpes*) v Číně (Zhao et al., 2015; Yang et al., 2015) a u divoké lišky obecné v USA a Španělsku (Galván-Díaz et al., 2014; Sulaiman et al., 2003). U farmově chovaných lišek obecných se pohyboval výskyt *E. bienersi* 9,2 %, u lišky divoké byl výskyt vyšší. V USA byl výskyt 13,4 % (Sulaiman et al., 2003), ve Španělsku 14,3 % (Galván-Díaz et al., 2014). Ve dvou studiích farmově chovaných lišek polárních (*Vulpes lagopus*) v Číně byl výskyt 16,4 % (Zhang et al., 2016; Zhao et al., 2015).

Rod *Encephalitozoon* zahrnuje 4 druhy – *E. cuniculi*, *E. intestinalis*, *E. hellem*, *E. lacertae*. U savců se nejčastěji vyskytuje *E. cuniculi* a *E. intestinalis* (Jeong et al. 2007). *Encephalitozoon hellem* je primárně adaptován na ptáky, ale u savců je ojediněle popisován (Rosell et al., 2016; Hinney et al., 2016).

V rámci druhu *E. cuniculi* jsou odlišovány čtyři genotypy. Genotyp I původně pocházející z králíků, genotyp II z myší, genotyp III ze psů a genotyp IV popsáný u HIV pozitivního pacienta (Shadduck, 1979; Shadduck et al., 1978; Didier et al., 1998). Dle současných znalostí víme, že jednotlivé genotypy se v hostitelích chovají různým způsobem, tedy mají odlišný průběh infekce (Ortega a Bonavia, 2003). Nicméně všechny postrádají hostitelskou specifitu (Arrowood, 2002).

První studie o mikrosporidiióze lišek polárních pochází již z 80 let minulého století, kdy byly provedeny experimentální infekce druhem *E. cuniculi* (Mohn et al., 1982a-d) z důvodu častých úhynů lišcat na mikrosporidiiózu (Akerstedt, 2003; Bjerkås a Nesland, 1987; Mohn et al., 1981; Persín a Dousek, 1986). Jako příčina infekcí byl detekován druh *E. cuniculi*. Vzhledem k značným ekonomickým ztrátám byla výskytu této mikrosporidie v chovech lišek věnována značná pozornost (Akerstedt et al., 2002; Hersteinsson et al., 1993; Mandara et al., 2007; Mathis et al., 1996; Meng et al., 2001; Mohn, 1982). V roce 1993 byla publikována studie popisující výskyt protilátek proti *E. cuniculi* u divokých polárních lišek na Islandu (Hersteinsson et al., 1993). O téměř 15 let později byla uveřejněna publikace popisující seroprevalenci u lišek obecných v Irsku (Murphy et al., 2007). Do současné doby nebyl hlášen žádný výskyt *E. hellem* u lišek. *Encephalitozoon intestinalis*, dříve *Septata intestinalis*, byl detekován u lišek obecných v Irsku (Hinney, 2016).

1.3.3 *Giardia intestinalis*

Giardióza způsobená *Giardia intestinalis* (synonyma *G. duodenalis* a *G. lamblia*) je jednou z nejčastějších protozoárních infekcí člověka a hospodářsky chovaných savců (Thompson a Monis, 2004). Parazit je lokalizován v tenkém střevě, konkrétně v duodenu a průběh infekce může být stejně jako u kryptosporidií a mikrosporidií od asymptomatického až po život ohrožující. Pro giardiové infekce je charakteristický akutní vodnatý průjem, dehydratace, bolesti v břišní oblasti a ztráta hmotnosti (Gardner a Hill 2001).

V rámci druhu *Giardia intestinalis* rozlišujeme osm linií, skrytých druhů tzv. asambláží A–H, které se od sebe odlišují hostitelskou specifiitou. Asambláže A a B jsou infekční pro člověka a ostatní primáty, hospodářská zvířata (skot, ovce, prasata,

kozy, koně), domácí zvířata (psi, kočky) a některé volně žijící zvířata. Asambláže C a D byly primárně detekovány u psů a ostatní psovitých šelem, asambláž F u koček, asambláž G u hlodavců a asambláž H u mořských ploutvonožců (Mateo et al., 2017).

Stejně jako v předešlých případech, také o výskytu giardií u lišek je limitovaný počet studií (Beck et al., 2011; Elmore et al., 2013; Stojewski et al., 2015). Z několika málo studií provedených v Evropě vyplývá, že prevalence lišek obecných se pohybuje od 5 do 19 %. U lišek polárních byly giardie nalezeny ve studii v Kanadě (Tabulka 6).

Tabulka 6. Výskyt *Giardia intestinalis* u lišek ve světě.

Hostitel (vědecký název)	Stát	Výskyt	Reference
Liška obecná (<i>Vulpes vulpes</i>)	Španělsko	8 %	GómezCouso et al. (2006); Méndez-Hermida et al. (2007)
	Chorvatsko	5 %	Beck et al. (2011)
	Norsko	2 %	Hamnes et al. (2007)
	Polsko	19 %	Stojewski et al. (2015)

2 Cíle

Cílem práce je popsat výskyt a diverzitu endoparazitů u volně žijících lišek polárních na Bylot Island v Kanadě. Pomocí standardních parazitologických a molekulárních metod provést detekci vývojových stádií, respektive specifické DNA endoparazitů. Fylogenetickými metodami určit vztahy mezi detekovanými druhy parazitů. Zpracovat datové soubory příslušnými metodami. Porovnat získané výsledky s publikovanými údaji.

3 Materiál a metodika

3.1 Materiál

Vzorky trusu lišky polární (*Vulpes lagopus*) byly sbírány v průběhu let 2003 až 2011. Každý vzorek byl uchováván v zip-lock sáčku a následně zamražen při -80 °C. U každého vzorku bylo zaznamenáno datum nálezu a místo sběru. Vzorky byly poskytnuty z Kanady z Bylotova ostrova.

3.2 Flotace dle Sheathera

- Sheatherův cukerný roztok
- 259 ml deionizované vody
- 405 g cukru (krystal)
- 7,29 g fenolu
- hustota = 1,2 g/ml

Pracovní postup:

- Ve třecí misce s vodou rozmíchat vzorek trusu o velikosti lískového ořechu.
- Zhomogenizovanou směs a přelít přes sítko do označené zkumavky.
- Centrifugovat při 1000 g po dobu 5 minut.
- Odstranit supernatant, přidat malé množství Sheatherova cukerného roztoku.
- Rozmíchat sediment s Sheatherovým cukerným roztokem a dolít zkumavku Sheatherovým cukerným roztokem.
- Centrifugovat při 1000 g po dobu 5 minut.
- Na podložní sklíčko nanést pomocí mikrobiologické kličky povrchovou blanku, přikrýt krycím sklíčkem.
- Prohlížet světelným mikroskopem při zvětšení 200–400×.

3.3 Izolace DNA z trusu

Izolace byla provedena pomocí komerčního kitu Exgene Stool DNA mini (GeneAll Biotechnology, Korea).

Součásti kitu:

- FL pufr
- PB pufr
- pufr
- EzPass kolona
- Kolona typ G
- 1,5 ml mikrocentrifugační zkumavka

Pracovní postup

- Vzorek trusu (200 mg) dát do Safe-Lock-Tube, přidat skleněné a zirkonové kuličky o průměru 0,5 mm.
- Přidat 1 ml FL pufru, zhomogenizovat a rozbít 1 minutu při rychlosti 5,5 m/s (FastPrep 24 Instrument, MP Bio, CA, USA).
- Inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě, poté centrifugovat 5 minut při 16000 g.
- Veškerý supernatant přenést na EzPass kolonku (bílá kolonka).
- Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Na kolonku napipetovat 100 µl EB pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a znovu centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Vyhodit bílou kolonku a do sběrné zkumavky připipetovat 500 µl PB pufru, pipetováním promíchat.
- Veškerý obsah sběrné zkumavky přenést na MiniSpin kolonku (zelená kolonka).
- Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g, vylít odpad sběrné zkumavky.
- Napipetovat 500 µl NW pufru na střed kolony.
- Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
- Centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Odstranit filtrát a přenést kolonu na čistou eppendorfku.

- Na kolonu napipetovat 200 µl EB pufru, inkubovat 1 minutu při laboratorní teplotě a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
- Odstranit kolonu a purifikovanou DNA skladovat v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

3.4 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Byl použit nested PCR protokol pro amplifikaci částečné oblasti genu kódujícího malou podjednotku rRNA (SSU; Xiao et al., 1999) kryptosporidií, Internal transcribed spacer mikrosporidií (ITS, Buckholt a kol., 2002) a TPI giardií (Irshad et al., 2003). Nukleotidové sekvence primerů jsou uvedeny níže.

Sety primerů pro molekulární analýzy *Cryptosporidium* spp.

Primární PCR – nasedací teplota 50 °C

F1 5' - TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG -3'

R1 5' - CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA -3'

Sekundární PCR – nasedací teplota 55 °C

F2 5'- GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG -3'

R2 5' - AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A -3'

Sety primerů pro molekulární analýzy *Giardie intestinalis*

Primární PCR – nasedací teplota 50 °C

F1 5' - AAA TIA TGC CTG CTC GTC G -3'

R1 5' - CAA ACC TTI TCC GCA AAC C -3'

Sekundární PCR – nasedací teplota 55 °C

F2 5'- CCC TCT ATC GGI GGT AAC TT -3'

R2 5' - GTG GCC ACC ACI CCC GTG CC -3'

Sety primerů pro molekulární analýzy *Encephalitozoon* spp.

Primární PCR – nasedací teplota 55 °C

INT580F 5' - TGC AGT TAA AAT GTC CGT AGT -3'

INT580R 5' - TTT CAC TCG CCG CTA CTC AG -3'

Sekundární PCR – nasedací teplota 55 °C

MSP-3 5'- GGA ATT CAC ACC GCC CGT C(A,G) (C,T)TAT -3'

MSP-4A 5'- CCA AGC TTA TGC TTA AGT (C,T)(A,C)A A(A,G)G GGT -3'

Sety primerů pro molekulární analýzy *Enterocytozoon bieneusi*

Primární PCR – nasedací teplota 55 °C

EBITS3 5' - GGT CAT AGG GAT GAA GAG -3'

EBITS4 5' - TTC GAG TTC TTT CGC GCT C -3'

Sekundární PCR – nasedací teplota 55 °C

EBITS1 5' - GCT CTG AAT ATC TAT GGC T -3'

EBITS2,4 5' - ATC GCC GAC GGA TCC AAG TG -3'

Požadované úseky byly amplifikovány v termocycleru. Amplifikační program pro termocycler zahrnoval počáteční denaturaci při 94 °C po dobu 3 minut, 35 cyklů skládajících se z denaturace při 94 °C po dobu 45 s, specifické nasedací teploty primerů (viz výše) po dobu 45 s; extenze při 60 °C po dobu 60 s a závěrečného dosyntetizování řetězců při 72 °C po dobu 10 minut. Objem a složení reakčních směsí pro primární i sekundární reakce jsou uvedeny v tabulce 7. Jako negativní kontrola byla použita PCR voda a jako pozitivní kontrola DNA *Cryptosporidium proliferans*, *Giardia microti*, *Encephalitozoon cuniculi* genotyp I a *Enterocytozoon bieneusi* genotyp A.

Tabulka 7. Složení reakčních směsí pro amplifikaci malé podjednotky rRNA kryptosporidií, ITS mikrosporidií a TPI *Giardia intestinalis*.

Chemikálie	Koncentrace	Objem v primární reakci (μl)	Objem v sekundární reakci (μl)
deionizovaná H ₂ O	-	19,5	23,85
MgCl ₂	25 mM	4,8	1,2
pufr	10×	1,5	1,5
dNTP's	10 mM	0,6	0,6
Forward primer	10 μM	0,3	0,3
Reverse primer	10 μM	0,3	0,3
BSA	10 mg/ml	1,2	0
Taq polymeráza	5 U/ml	0,25	0,25
DNA/PCR produkt	2	2	2
Celkem		30	30

3.5 Gelová elektroforéza

Chemikálie:

- TAE pufr agaróza
- Ethidium-bromid (EtBr) – 10 mg/ml
- 100 bp DNA Ladder

Pracovní postup:

- V erlenmayerově baňce smíchat naváženou agarózu s TAE pufrem tak, aby vznikl 1,5 % gel, zahřívat v mikrovlnné troubě do vzniku homogenní směsi.
- Zchladit pod tekoucí vodou, přidat 1 µl EtBr, promíchat.
- Obsah baňky vlít do připraveného nosiče s hřebenem, nechat ztuhnout (15–20 minut).
- Po zatuhnutí vyjmout hřeben a vložit gel do elektroforetické vany s TAE pufrem.
- Do první jamky nanést 10 µl ladderu, do ostatních jamek nanést 20 µl sekundárních PCR reakce.
- Nechat gel vyvíjet při 90 V, aby došlo k separaci fragmentů DNA (cca 40 minut).
- Výsledek vizualizovat pomocí UV transiluminátoru.

3.6 Izolace z gelu

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

Pracovní postup:

- Skalpelem vyříznout z gelu fragmenty DNA a vložit je do 1,5 ml mikrokumavky.
- Připipetovat 500 µl Gel Solubilization Solution (na 100 mg gelu přidat 300 µl).
- Inkubovat 10 minut při 50 °C, promíchat každé 2–3 minuty a kontrolovat rozpouštění (vznikne žlutého zabarvení).
- Sestavit Binding Column G, napipetovat 500 µl Column Preparation Solution a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.

-
- Inkubovat PCR vodu na eluci při 65 °C.
 - Připipetovat ke vzorku 150 µl isopropanolu a promíchat.
 - Přepipetovat veškerý objem vzorku na kolonku (Binding Column G) a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g, vylít odpad ze sběrné zkumavky.
 - Připipetovat 700 µl Wash Solution G a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
 - Vylít odpad ze sběrné zkumavky a centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
 - Zkumavku v centrifuze otočit o 180° a centrifugovat znovu 3 minuty při 16 000 g.
 - Vložit kolonu do nové 1,5 ml zkumavky a provést eluci přidáním 30 µl PCR vody na střed kolony.
 - Inkubovat 1 minutu, centrifugovat 1 minutu při 16 000 g.
 - V získaném eluátu změřit koncentraci DNA na spektrofotometru NanoDrop dle návodu výrobce.
 - Připravit DNA k sekvenování dle požadavků komerčních firem.

3.7 Sekvenace

Sekundární PCR produkty byly sekvenovány z obou stran za použití sekundárních primerů v komerční společnosti (SeqMe, Dobříš, Česká republika).

3.8 Fylogenetické analýzy

Sekvence získané v této studii byly upraveny pomocí ChromasPro (Technelysium, verze 2.1.8) a porovnány se sekvencemi uloženými v GenBank. Dataset zarovnaných sekvencí byl ručně překontrolován v programu BioEdit a výsledný alignment byl vytvořen pomocí online serveru MAFFT verze 7 (www.mafft.cbrc.jp/alignment/server). Nejvhodnější fylogenetický model pro analýzu byl vybrán pomocí softwaru MEGA X. Metodou Maximum likelihood (ML) a Neighbour Joining (NJ) byly zkonstruovány fylogenetické stromy. Nejvhodnější model byl vybrán pomocí Bayesiánského informačního kritéria v programu MEGA X. Bootstrapový konsenzus výsledných stromu byl získán na základě 1 000× opakování. Fylogenetické stromy byly do finální podoby ručně upravena pomocí programu CorelDraw X7 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada).

3.9 Kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) mikrosporidií

Kvantitativní PCR byla provedena pro stanovení koncentrace spor *Encephalitozoon* spp. a *E. bienusi* v testovaných vzorcích trusu za použití specifických primerů amplifikujících část genu kódujícího malou podjednotku rRNA *Encephalitozoon* spp. a specifické TaqMan próby (268 bp; Wolk et al. 2002) za použití přístroje Light cycler 480 (Roche, Basel, Švýcarsko). Složení reakční směsi je uvedeno níže (Tabulka 8). Nukleotidové sekvence primerů a prób jsou uvedeny níže.

Sety primerů a prób pro qRT-PCR *Encephalitozoon* spp.

Malá podjednotka rRNA *Encephalitozoon* spp. (Wolk et al., 2002)

- forward primer: 5' - GTC CGT TAT GCC CTG AGA - 3'
- reverse primer: 5' - ACA GCA GCC ATG TTA CGA CT - 3'
- próba: 5'- red 640 - TGG ACG AAG ATT GGA AGG TCT GAG TC-phosphate-3'

Sety primerů a prób pro qRT-PCR *Encephalitozoon* spp.

β-aktin (Dai et al., 2009)

- forward primer: 5'- AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC - 3'
- reverse primer: 5'- CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT - 3'
- próba: 5'- FAM - CAC TGC CGC ATC CTC TTC CTC CC BHQ1-3'

Tabulka 8. Složení reakčních směsí (20 µl + 5 µl DNA):

Chemikálie	Objem (µl)
FastStart Universal Probe Master (Roche)	12,5
Deionizovaná H ₂ O	5,0
Forward primer (10 µM)	1,0
Reverse primer (10 µM)	1,0
Próba (10 µM)	0,5
DNA	5,0
Celkem	25,0

Amplifikační program v termocycleru byl nastaven následovně:

- Počáteční denaturace 95 °C po dobu 3 minut, 45 cyklů zahrnující denaturaci 95 °C po dobu 45 sekund.
- Hybridizace 60 °C po dobu 10 sekund.
- Syntéza 72 °C po dobu 16 sekund.
- Závěrečná extenze 55–85 °C po dobu 16 sekund rychlostí 0,2 °C za 1 sekundu.
- Chlazení při 40 °C po dobu 30 sekund (Wolk et al. 2002).

Ke každé qRT PCR reakci byly přiřazeny dvě negativní kontroly a vzorky o známých koncentracích *Encephalitozoon* spp. (10^5) a β -aktinu ($2,94 \times 10^5$) použité jako standardy. Všechny vzorky byly testovány v duplikátech.

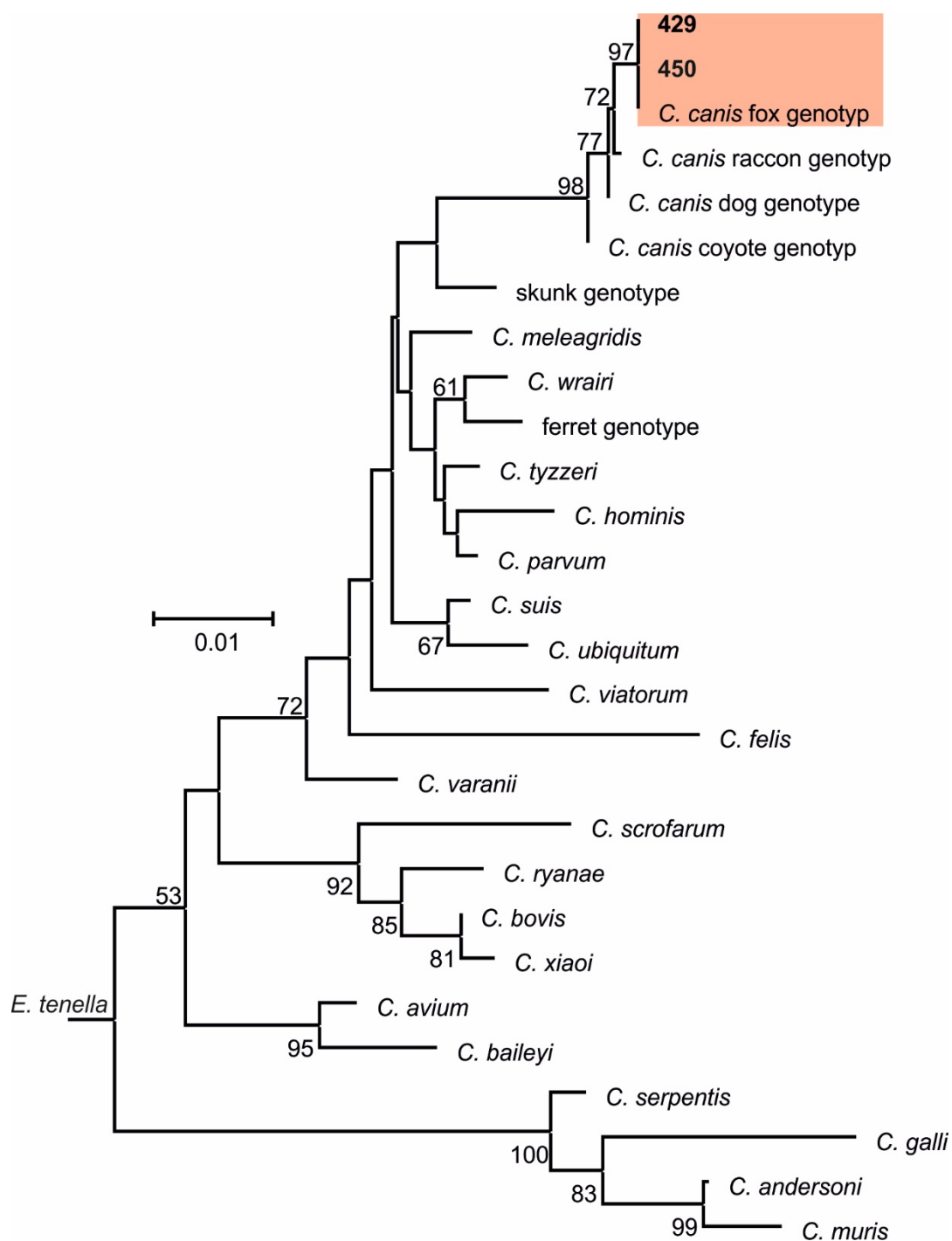
4 Výsledky

Celkem bylo zpracováno 260 individuálních vzorků trusu lišek polárních z Kanady. Mikroskopické vyšetření trusu neprokázalo přítomnost sledovaných parazitů, *Cryptosporidium* spp., *G. intestinalis* a mikrosporidií rodů *Encephalitozoon* nebo *Enterocytozoon*, v žádném z vyšetřovaných vzorků. Pomocí molekulárních metod za použití specifických primerů a sond byla prokázána přítomnost specifické DNA kryptosporidií ve dvou, specifická DNA mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* ve 34, specifická DNA mikrosporidií rodu *Enterocytozoon* v pěti vzorcích trusu. Žádný z vyšetřovaných vzorků trusu nebyl pozitivní na přítomnost specifické DNA *G. intestinalis*. Z celkové počtu 41 PCR pozitivních vzorů se podařilo osekvenovat všechny izoláty pozitivní na kryptosporidie a 11 izolátů pozitivních na mikrosporidie rodu *Encephalitozoon*. Zbývajících 28 vzorků nemělo nedostatečnou kvalitu a koncentraci DNA nezbytnou pro úspěšné osekvenování.

Fylogenetické analýzy získaných sekvencí prokázaly přítomnost *C. canis* fox genotyp ve vzorcích č. 429 a 450 (Obrázek 1). Získané sekvence byly vzájemně identické a 100% shodné s izolátem KU215430 dříve získaným z lišky polární v Číně.

Intenzita infekce mikrosporidií v trusu polárních lišek byly stanoveny pomocí metody qRT-PCR. Výsledky kvantitativní PCR ukázaly, že množství spor mikrosporidií *Encephalitozoon* spp. ve vyšetřovaných vzorcích se pohybovalo od 1 do 9550 spor na gram trusu (Tabulka 9). Následné sekvenační analýzy prokázaly přítomnost *E. cuniculi* genotyp II u devíti vzorků a *E. cuniculi* genotyp III a *E. hellem* 1A po jednom vzorku (Tabulka 9). Množství detekovaných spor *E. bienersi* ve vzorcích trusu vyšetřovaných lišek se pohyboval v rozmezí od 575 do 6650 (Tabulka 10). Pouze u jednoho zvířete, č. 306, byla detekována smíšená infekce *Encephalitozoon* sp. a *E. bienersi*.

I přes způsob uchování vzorků zmražením bylo možné vyhodnotit konzistenci získaného trusu. Žádný ze vzorků nevykazoval známky průjmu. Vzorky trusu svou barvou a konzistencí odpovídaly druhu zvířat.



Obrázek 1. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryptosporidií získaných z lišek polárních (*Vulpes lagopus*) v této studii s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genů kódujících malou ribozomální podjednotku, vytvořený metodou ML v programu MEGA X. Znáznorněny jsou hodnoty podpory větví více než 50 %.

Tabulka 9. Koncentrace spor, druh a genotyp *Encephalitozoon* spp. v trusu polárních lišek detekovaná na základě qRT-PCR a sekvenování ITS sekvence za použití rodově specifických primerů.

Číslo vzorku	Koncentrace spor na 1 g trusu	Genotypizace
300	575,0	<i>E. cuniculi</i> genotyp II
303	17,7	neosekvenováno
305	58,5	neosekvenováno
306	57,0	neosekvenováno
308	443,0	<i>E. cuniculi</i> genotyp III
310	1970,0	<i>E. cuniculi</i> genotyp II
312	78,5	neosekvenováno
317	29,0	neosekvenováno
324	10,5	neosekvenováno
330	79,0	neosekvenováno
336	326,0	<i>E. cuniculi</i> genotyp II
341	60,0	neosekvenováno
346	3260,0	<i>E. cuniculi</i> genotyp II
353	104,0	neosekvenováno
373	199,0	neosekvenováno
376	263,0	<i>E. cuniculi</i> genotyp II
385	150,0	<i>E. cuniculi</i> genotyp II
387	119,0	neosekvenováno
396	71,0	<i>E. hellem</i> genotyp 1A
405	33,8	neosekvenováno
410	20,3	neosekvenováno
413	5,90	neosekvenováno
415	9550,0	<i>E. cuniculi</i> genotyp II
423	1,8	neosekvenováno
425	9,3	neosekvenováno
435	227,0	<i>E. cuniculi</i> genotyp II
446	14,8	neosekvenováno
457	5,6	neosekvenováno
469	40,5	<i>E. cuniculi</i> genotyp II
480	11,4	neosekvenováno
488	22,2	neosekvenováno
494	29,7	neosekvenováno
497	62,5	neosekvenováno
527	5,7	neosekvenováno

Tabulka 10. Koncentrace spor, druh a genotyp *Enterocytozoon bieneusi* v trusu polárních lišek detekovaná na základě qRT-PCR a sekvenování ITS sekvence za použití rodově specifických primerů.

Číslo vzorku	Koncentrace spor na 1 g trusu	Genotypizace
306	840,0	neosekvenováno
369	575,0	neosekvenováno
381	1660,0	neosekvenováno
397	5900,0	neosekvenováno
398	6950,0	neosekvenováno

5 Diskuze

Tato práce je dosud nejkomplexnější studií zabývající se výskytem parazitických protist rodů *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon* u lišek polárních. Výsledky této práce ukázaly, že lišky polární na Bylotově ostrově v Kanadě nebyly parazitovány giardiemi. O výskytu tohoto parazita u lišek je omezený počet záznamů. Také ve studii v Kanadské Arktidě bylo nalezeno jen velmi nízké procento pozitivních lišek polárních (Elmore et al., 2013). Naopak u lišek obecných se promořenost napříč různými studiemi pohybovala od 5 do 19 % (Hamnes et al., 2007; Beck et al., 2011; Hodžić a kol., 2014; Onac a kol. 2015; Stojacki a kol., 2015). Cysty *G. intestinalis* jsou z hostitele vylučovány intermitentně a pro spolehlivou detekci je doporučováno vyšetření tří nezávislých vzorků trusu. Vyšetření jednoho vzorku ze zvířete tak, jak tomu je ve většině publikací, včetně této práce, by mohlo ovlivnit výslednou prevalenci (Mendonça et al., 2017). Na druhou stranu velké počty vyšetřených vzorků, z různých zvířat v různých obdobích mohou částečně nahradit absenci opakovaného vyšetření trusu od jednoho jedince.

Kryptosporidie jsou jednou z nejčastějších parazitárních infekcí u většiny obratlovců (Ziegler et al. 2007, Ježková et al. 2016). Z velkého množství studií dnes víme, že prevalence kryptosporidií v populacích volně žijících zvířat může být ve velmi širokém rozmezí od jednotek až pod desítky procent (Kváč et al., 2014). Procento pozitivních jedinců v populaci je ovlivněno celou řadou faktorů. Mimo jiné, je výskyt a šíření kryptosporidií ovlivněno prostředním a přírodními podmínkami ve kterém hostitel žije a hustotou populace (Petersen et al., 2015; Gatti et al., 2017). Studie, které se zabývaly výskytem kryptosporidií u lišek obecných ukázaly, že promořenost se pohybovala od 1 do 12 % (Ravaszová et al., 2012; Nagano et al., 2007; Sturdee et al., 1999; Hamnes et al., 2007; Razmjoo et al., 2014; Barrera et al., 2020; Zhou et al., 2004). Těmto údajům odpovídá i promořenost (9,4 %) arktických lišek z Kanady ve studii Elmore et al. (2013). V rozporu s těmito výsledky, naše studie ukázala výrazně nižší promořenost studovaných lišek (0,8 %). Rozdíly mezi naší a jinými studiemi nemůžeme přičítat různým metodickým přístupům sběru materiálu, a to z důvodu, že v naší práci jsme použili molekulární metody, které jsou z pohledu senzitivity mnohem citlivější než běžná parazitologická vyšetření použitá v některých dříve publikovaných pracích (Tomanová, 2017). Naopak, ve studiích,

kde nebyly použity molekulární analýzy lze předpokládat vyšší procento pozitivních vzorků, než bylo uvedeno. Rozdíly v promořenosti námi studované populace lišek může být dáno její izolací na ostrově a přírodními podmínkami ovlivňující přežití cyst giardií a oocyst kryptosporidií (níže).

Molekulární analýzy pozitivních vzorků prokázaly přítomnost *C. canis* fox genotyp, který byl dosud detekován výhradně u lišek a je považován za hostitelsky specifický (Zhou et al., 2004). Absence jiných druhů a genotypů kryptosporidií v této studii může být zapříčiněna izolací populace vyšetřovaných lišek. V předchozích studiích zaměřených na lišky obecné žijící na pevnině byly detekovány druhy *C. hominis*, *C. parvum*, *C. ubiquitum*, *C. suis*, *C. galli* a muskrat genotyp I (Kváč et al., 2021). Všechny zmíněné kryptosporidie jsou adaptovány na jiné hostitele a lišky představují minoritního (*C. parvum* a *C. ubiquitum*) nebo náhodného hostitele (ostatní druhy a genotypy). V řadě případů by se mohlo jednat i o pouhou pasáž oocyst nebo jejich DNA zaživacím traktem lišky, přičemž oocysty mohou pocházet z kořisti, mršin nebo kontaminovaného prostředí (Xiao et al. 2004). Při použití senzitivních molekulárních metod není neobvyklá detekce pasážované DNA trusu zvířat, která byla krmena kontaminovanou potravou nebo zvířaty s kryptosporidiovými infekcemi (Graczyk et al., 1998).

Absence giardií a nízká promořenost kryptosporidii může souviset s teplotními podmínkami. Po většinu roku se teploty na Bylotově ostrově pohybují pod bodem mrazu a pouze v letních měsících dochází o oteplení na 0–10 °C. Jak cysty giardií, tak oocysty kryptosporidií jsou primárně přenášeny na nové hostitele fekálně orální cestou a ve vnějším prostředí při nízkých teplotách zůstávají životaschopné jen po velmi krátkou dobu. Oocysty kryptosporidií a cysty giardií jsou schopné zůstat životaschopné po dobu několika dnů až týdnů při teplotě okolo 5–15 °C (Alum et al., 2014; Fayer a Nerad, 1996; Peng et al., 2008). Při snížení teploty na a pod bod mrazu dochází k postupné inaktivaci. Při teplotách -15 a -20 °C dochází k inaktivaci oocyst kryptosporidií po 168, respektive po 24 hodinách (Fayer a Nerad, 1996). Studie provedená v Norsku prokázala, že cysty giardií a oocysty kryptosporidií nepřežívají teplotní podmínky zimního období v Norsku (Robertson a Gjerge, 2004).

Souladu s výskytem kryptosporidií a giardií, také procento lišek polárních pozitivních na *E. bienersi* bylo relativně nízké (1,9 %), v porovnání s dříve publikovanými výsledky u volně žijících lišek obecných, u nichž byla zjištěna

prevalence v rozmezí 9–14 % (Santín, 2017; Galván-Díaz et al., 2014; Sulaiman et al., 2003). Stejně jako předchozí parazitická protista, také druh *E. bieneusi* je přenášen primárně fekálně orální cestou (Matos et al., 2012). O odolnosti spor *E. bieneusi* se toho mnoho neví, ale lze předpokládat, že bude podobná jako u mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* jehož spóry přežívají zmražení na -70 °C po dobu až 8 hodin a při vystaví teplotě -24 °C po dobu 8 až 24 hodin (Koudela et al., 1999).

Na rozdíl do výše zmíněných parazitických protist jsme v naší práci detekovali vysokou prevalenci mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* (13 %). Pokud bychom vzali do úvahy pouze infekční stadia přežívající ve vnějším prostředí, dospěli bychom k závěru, že výskyt mikrosporidií rodu *Encephalitozoon* by měl být podobný s *E. bieneusi*. Rozdíl ve zjištěné prevalenci lze vysvětlit tím, že druhy rodu *Encephalitozoon* sice primárně infikují střevo a jsou do prostředí vylučovány trusem, ale v chronické fázi infekce dochází k postupné diseminaci infekce do všech orgánů těla (Kotková et al., 2017). Vzhledem k tomu, že byl prokázán přenos infekce prostřednictvím potravy, respektive tkání kořisti, která byla infikována (Hinney et al., 2016), je pravděpodobné, že se mikrosporidie rodu *Encephalitozoon* šíří v arktických oblastech častěji predací cestou. *Encephalitozoon cuniculi*, který byl v této práci nejčastěji detekován, je častým parazitem hlodavců a drobných savců, kteří jsou častou kořistí lišek (Hinney et al., 2016). Nižší prevalence *E. hellem*, v této práci odpovídá dříve popsáním údajům. Tento druh, který je specifický pro ptáky, se u savců vyskytuje jen ojediněle (Rosell et al., 2016). Zdrojem infekce *E. hellem* pro lišky mohou být různí ptáci, kteří se stali jejich kořistí (Hinney et al., 2016).

Zjištěná nízká intenzita infekce mikrosporidií rodů *Encephalitozoon* a *Enterocytozoon* může znamenat že lišky, ze kterých pocházely vyšetřované vzorky se pravděpodobně nacházely v chronické fázi infekce. Obdobně vysoké intenzity infekcí byly zjištěny v chronické fázi infekce u experimentálně infikovaných myší (Sak et al., 2017).

6 Závěr

Výsledky této práce ukázaly, že lišky polární žijící na Bylotově ostrově v Kanadě jsou velmi málo nebo vůbec parazitovány kryptosporidiemi, respektive giardiemi. Naopak infekce způsobené mikrosporidiemi rodu *Encephalitozoon* jsou relativně časté.

Přestože nebyly u lišek detekovány průjmové infekce, nelze zvýšený výskyt *E. cuniculi* infekcí podceňovat. Systémové rozšíření tohoto parazita, které nebylo předmětem studia této práce, by mohlo výrazně ovlivnit zdravotní stav lišek polárních, zejména mláďat, pro které může být infekce touto mikrosporidií letální.

Lišky polární, v porovnání s jinými druhy volně žijících zvířat, nepředstavují výrazné riziko přenosu zoonotických protist na člověka.

Seznam použité literatury

- Aguirre, A. A. et al. (2000).** Health evaluation of arctic fox (*Alopex lagopus*) cubs in Sweden. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 31:36-40.
- Akerstedt, J. et al. (2002).** Fox encephalitozoonosis: isolation of the agent from an outbreak in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*) in Finland and some hitherto unreported pathologic lesions. *Journal of veterinary medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 49:400-405.
- Åkerstedt, J. et al. (2010).** Serosurvey for canine distemper virus, canine adenovirus, *Leptospira interrogans*, and *Toxoplasma gondii* in free-ranging canids in Scandinavia and Svalbard. *Journal of Wildlife Diseases*, 46:474-480.
- Alum, A. et al. (2014).** Impact of environmental conditions on the survival of *cryptosporidium* and *giardia* on environmental surfaces. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014:210385.
- Andreassen, P. N. S. et al. (2017).** Gastrointestinal parasites of two populations of Arctic foxes (*Vulpes lagopus*) from north-east Greenland. *Polar research*, vol 36,13.
- Angerbjörn, A. a Tannerfeldt, M. (2014).** *Vulpes lagopus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014:e.T899A57549321
- Ardila-Garcia, A. M. a Fast, N. M. (2012).** Microsporidian infection in a free-living marine Nematode. *American Society for Mikrobiology*, 11:1544-1551.
- Arrowood, M. J. (2002).** In-vitro cultivation of *Cryptosporidium* species. *Clinical Microbiology Reviews*, 15:390-400.
- Barrera, J. P. et al. (2020).** The red fox (*Vulpes vulpes*) as a potential natural reservoir of human cryptosporidiosis by *Cryptosporidium hominis* in Northwest Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, p. 2172-2182.
- Beck, R. et al. (2011).** A large survey of Croatian wild mammals for *Giardia duodenalis* reveals a low prevalence and limited zoonotic potential. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 11:1049-1055.

-
- Botková, K. a Unnsteinsdóttirová E. R. (2015)(5).** Lišky polární na Islandu. *Ochrana přírody* [online], 41-43 [cit. 2021-04-05]. Dostupné z: <https://www.casopis.ochranaprirody.cz/mezinarodni-ochrana-prirody/lisky-polarni-na-islandu/>
- Bouzig, M. et al. (2013).** *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 26:115-134.
- Buckholt, M. A. et al. (2002).** Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at slaughterhouse in Massachusetts. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:2595-2599.
- Current, W. L. (1989).** *Cryptosporidium* spp. In: Genta RM, Walzer PD (Eds.) Parasitic infections in the compromised host. Marcel Dekker, New York, pp. 281-341.
- Current, W. L. a Reese, N. C. (1986).** A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice. *The Journal of Protozoology*, 33:98-108.
- Dahlgren, S. S. a Gjerde, B. (2007).** Genetic characterisation of six *Sarcocystis* species from reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Norway based on the small subunit rRNA gene. *Veterinary Parasitology*, 146:204-213.
- Davidson, W. R. (1992).** Diseases diagnosed in grey foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) from the southeastern United States. *Journal of Wildlife Diseases*, 28:28-35.
- del Aguila, C. et al. (1999).** *Enterocytozoon bieneusi* in animals: rabbits and dogs as new hosts. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46:8-9.
- del Aguila, C. et al. (2004).** Zoonotic potential of microsporidiosis in Spain. In: Emergent pathogens in the 21st century: firsts united workshop on microsporidia from invertebrate and vertebrate hosts, České Budějovice, 12-15.
- Dengjel, B. et al. (2001).** Zoonotic potential of *Enterocytozoon bieneusi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 12:4495-4499.

-
- Desportes, I. et al. (1985).** Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bieneusi* n. g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *Journal of Protozoology*, 32:250-254.
- Didier, E. S. et al. (1998).** Biology of microsporidian species infecting mammals. *Advances in Parasitology*, 40:283-320.
- Eaton, R. D. P. a Secord, D. C. (1979).** Some intestinal parasites of arctic fox, Banks Island, N. W. T. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 43:229-230.
- Eide, N. E. et al. 2005.** Dietary responses of arctic foxes *Alopex lagopus* to changing prey availability across an Arctic landscape. *Wildlife Biology*, 11(2):109-121.
- Elmore, S. A. et al. (2013).** Endoparasites in the feces of arctic foxes in a terrestrial ecosystem in Canada. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2:90-96.
- Fayer, R. a Nerad, T. (1996).** Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:1431-1433.
- Fayer, R. a Xiao, L. (2007).** *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. CRC Press. 576 pp.
- Fayer, R. et al. (2000).** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *Journal for Parasitology*, 30:1305-1322.
- Fayer, R. et al. (2003).** Detection of *Encephalitozoon hellem* in feces of experimentally infected chickens. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50: 574-575.
- Gardner, T. B. a Hill, D. R. (2001).** Treatment of giardiasis. *Clinical Microbiological Reviews*, 14:114-128.
- Graczyk, T. K. et al. (1998).** Experimental transmission of *Cryptosporidium* oocyst isolates from mammals, birds and reptiles to captive snakes. *Veterinary Research*, 29:187-195.
- Hamnes, I. S. et al. (2007).** Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology*, 143:347-353.

-
- Hamnes, I. S. et al. (2007).** Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology*, 143:347-353.
- Haro, M. et al. (2005).** First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. *Applied and Environmental Microbiology*, 71:3153-3157.
- Henttonen, H. E. et al. (2001).** *Echinococcus multilocularis* on Svalbard: introduction of an intermediate host has enabled the local life-cycle. *Parasitology*, 123:547-552.
- Hersteinsson, P. (1993).** Prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in terrestrial mammals in Iceland, 1986 to 1989. *Journal of Wildlife Diseases*, 29:341-344.
- Hinney, B. et al. (2016).** More than a rabbit's tale – *Encephalitozoon* spp. in wild mammals and birds. *International Journal for Parasitology Parasites and Wildlife*, 76-87.
- Hodžić, A. et al. (2014).** Occurrence of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Bosnia and Herzegovina. Macedonian. *Veterinary Review*, 37:189-192.
- Holubová, N. et al. (2016).** *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. *Parasitology Research*, 115:2243-2251.
- Hornok, S. et al. 2020.** Broad Range Screening of Vector-Borne Pathogens in Arctic Foxes (*Vulpes lagopus*) in Iceland. *Animals*, 10(11):2031.
- Irshad, M. S. et al. (2003).** Triosephosphate Isomerase Gene Characterization and Potential Zoonotic Transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 9.
- Jeong, D.K. et al. (2007).** Occurrence and genotypic characteristics of *Enterocytozoon bieneusi* in pigs with diarrhea. *Parasitology Research*, 102:123-128.
- Ježková, J. et al. (2016).** *Cryptosporidium testudinis* sp. n., *Cryptosporidium ducismarci* Traversa, 2010 and *Cryptosporidium tortoise* genotype III (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in tortoises. *Folia Parasitologica*, 63:035.
-

-
- Kapel, C. M. O. a Nansen, P. (1996).** Gastrointestinal helminths of arctic foxes (*Alopex lagopus*) from different bioclimatological regions in Greenland. *Journal of Parasitology*, 82:17-24.
- Kotková, M. et al. (2017).** The course of infection caused by *Encephalitozoon cuniculi* genotype III in immunocompetent and immunodeficient mice. *Experimental Parasitology*, 182:16-21.
- Kotler, D. P. a Orenstein, J. M. (1998).** Clinical syndromes associated with microsporidiosis. *Advance Parasitology*, 40:321-349.
- Koudela, B. et al. (1999).** Effect of low and high temperatures on infectivity of *Encephalitozoon cuniculi* spores suspended in water. *Folia Parasitologica*, 46:171-174.
- Kváč, M. et al. (2014).** Cryptosporidiosis in other vertebrates. In: Cacciò S.M., Widmer G. (Eds.), *Cryptosporidium: Parasite and Disease*, 1st ed. Springer, Wien, pp. 237-326.
- Lindsay, D. S. a Blagburn, B. L. (1990).** *Cryptosporidiosis* in birds. In: Dubey J.P., Speer C.A., Fayer R. (Eds.), *Cryptosporidiosis in man and animals*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 370.
- Lores, B. et al. (2002).** Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus– negative patients from Vigo. Spain. *Clinical Infectious Diseases*, 34:918-921.
- Mandara, M.T. et al. (2007).** Internal hydrocephalus and associated periventricular encephalitis in a young fox. *Veterinary Pathology*, 44:714-716.
- Mateo, M. et al. (2017).** Occurrence and molecular genotyping of *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in wild mesocarnivores in Spain. *Veterinary Parasitology*, 235:86-93.
- Mathis, A. (1996).** Isolates of *Encephalitozoon cuniculi* from farmed blue foxes (*Alopex lagopus*) from Norway differ from isolates from Swiss domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Parasitology Research*, 82:727-730.
- Matos, O. et al. (2012).** Epidemiology of *Enterocytozoon bieneusi* Infection in Humans. *Journal of Parasitology Research*, 2012: 981424.
-

-
- Meijer, T. et al. (2011).** Endoparasites in the endangered Fennoscandian population of arctic foxes (*Vulpes lagopus*). *European Journal of Wildlife Research*, 57:923-927.
- Mendonça, F. F. U. et al. (2017).** The influence of serial fecal sampling on the diagnosis of giardiasis in humans, dogs, and cats. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 59:e61.
- Meng, X. et al. (2014).** First characterization in China of *Encephalitozoon cuniculi* in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 61:580-585.
- Mohn, S. et al. (1982d).** Experimental encephalitozoonosis in the blue fox. Clinical, serological and pathological examinations of vixens after oral and intrauterine inoculation. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 23:490-502.
- Mohn, S. F. (1982).** Encephalitozoonosis in the blue fox. Comparison between the india-ink immuno-reaction and the indirect fluorescent antibody test in detecting *Encephalitozoon cuniculi* antibodies. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 23:99-106.
- Mohn, S. F. (1982c).** Experimental encephalitozoonosis in the blue fox. Clinical and serological examinations of affected pups. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 23:503-514.
- Mohn, S. F. et al. (1982b).** Experimental encephalitozoonosis in the blue fox. Transplacental transmission of the parasite. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 23:211-220.
- Mohn, S. F. a Nordstoga, K. (1982a).** Experimental encephalitozoonosis in the blue fox. Neonatal exposure to the parasite. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 23:344-360.
- Murphy, T. et al. (2007).** Study on the prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Noespora caninum* and molecular evidence of *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infections in red foxes (*Vulpes vulpes*) in rural Ireland. *Veterinary Parasitology*, 146:227-234.

-
- Myšková, E. et al. (2019).** Gastrointestinal parasites of arctic foxes (*Vulpes lagopus*) and sibling voles (*Microtus levis*) in Spitsbergen, Svalbard. *Parasitology Research*, 118:3409-3418.
- Nagano, Y. et al. (2007).** Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and bacterial pathogens in faecal material in the red fox (*Vulpes vulpes*) population. *Veterinary Research Communications*, 31:559-564.
- O'Donoghue, P. J. (1995).** Cryptosporidium and Cryptosporidiosis in Man and Animals. *International Journal of Parasitology*, 25, 139-195.
- Onac, D. et al. (2015).** Occurrence of *Giardia duodenalis* zoonotic assemblages in red foxes from Romania. *Sci Parasitology*, 16:177-180.
- Ortega, Y. R. a Bonavia, D. (2003).** *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in ancient Peruvians. *Journal of Parasitology*, 89:635-636.
- Pend, X. et al. (2008).** Evaluation of the effect of temperature on the die-off rate for *Cryptosporidium parvum* oocysts in water, soils, and feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:7101-7107.
- Prestrud, K. et al. (2007).** Serosurvey for *Toxoplasma gondii* in arctic foxes and possible sources of infection in the high Arctic of Svalbard. *Veterinary Parasitology*, 150:6-12.
- Prestrud, P., G. S. a Holt, G. (1993).** The prevalence of *Trichinella* sp. in Arctic foxes (*Alopex lagopus*) in Svalbard. *Journal of Wildlife Diseases*, 29:337-340.
- Ravaszová, P. et al. (2012).** Occurrence of *Cryptosporidium* spp. in red foxes and brown bear in the Slovak Republic. *Parasitology Research*, 110:469-471.
- Reetz, J. et al. (2002).** First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). *International Journal of Parasitology*, 32:785-787.
- Rinder, H. et al. (2000).** Close genotypic relationship between *Enterocytozoon bieneusi* from humans and pigs and first detection in cattle. *Journal of Parasitology*, 86:185-188.

-
- Robertson, L. J. a Gjerde, B. K. (2004).** Effects of the Norwegian Winter Environment on *Giardia* Cysts and *Cryptosporidium* Oocysts. *Microbial Ecology*, 359-365.
- Rosell, J. et al. (2016).** *Encephalitozoon hellem* infection in aviary passerine and psittacine birds in Spain. *Veterinary Parasitology*, 219:57-60.
- Rosell, J. et al. (2016).** *Encephalitozoon hellem* infection in aviary passerine and psittacine birds in Spain. *Veterinary Parasitology*, 219:57-60.
- Sak, B. et al. (2008).** First report of *Enterocytozoon bieneusi* infection on a pig farm in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 153:220-224.
- Sak, B. et al. (2017).** Effects of selected Indonesian plant extracts on *E. cuniculi* infection in vivo. *Experimental Parasitology*, 181: 94-10.
- Sale, R. (2006).** A complete guide to Arctic wildlife. Buffalo. *Firefly Books*, 464 pp.
- Santín, M. a Fayer, R. (2009).** *Enterocytozoon bieneusi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence – a consensus. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(1):34-38.
- Santín, M. a Fayer, R. (2011).** Microsporidiosis: *Enterocytozoon bieneusi* in domesticated and wild animals. *Research in Veterinary Science*, 90:363-371.
- Sestak, K. et al. (2003).** Quantitative evaluation of *Enterocytozoon bieneusi* infection in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *Journal of Medical Primatology*, 32:74-81.
- Shadduck, J. A. a Geroulo, M. J. (1979).** A simple method for the detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Laboratory Animal Science*, 29:330-334.
- Shadduck, J. A. a Polley, M. B. (1978).** Some factors influencing the in vitro infectivity and replication of *Encephalitozoon cuniculi*. *Journal of Protozoology*, 25:491-496.
- Skirnisson, K. at al. (1993).** Parasites of the arctic fox (*Alopex lagopus*) in Iceland. *Journal of Wildlife Diseases*, 29:440-446.

-
- Stange, R. 2012.** Spitsbergen – Svalbard. A complete guide around the Arctic archipelago. *Stange*. 512 pp.
- Stien, A. et al. (2010).** Intestinal parasites of the Arctic fox in relation to the abundance and distribution of intermediate hosts. *Parasitology*, 137:149-157.
- Stojecki, K. et al. 2015.** Prevalence and molecular typing of *Giardia duodenalis* in wildlife from eastern Poland. *Folia Parasitology*, 62:2015.042.
- Sturdee, A. P. et al. (1999).** Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain. *Veterinary Parasitology*, 80:273-280.
- Sulaiman, I. M. et al. (2004).** Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle indicates that only some isolates have zoonotic potential. *Parasitology Research*, 4:328-334.
- Thompson, R. C. A. a Monis, P. T. (2004).** Variation in *Giardia*: Implications for taxonomy and epidemiology. *Advances in Parasitology*, 58:69-137.
- Tomanová, V. (2017).** Přítomnost specifické DNA a koproantigenu kryptosporidií jako indikátor probíhající infekce. [Diplomová práce] 53 s. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra zootechnických věd.
- Unnsteinsdóttir, E. R. (2020).** What do you know about the arctic fox? *The arctic fox centre*, pp. 5-18.
- Vávra, J. (2017).** Mikrosporidie: houby, co nevypadají jako houby, aneb Sestry říše Fungi? *Živa*. 257-261.
- Vivarés, C. P. (2002).** Functional and evolutionary analysis of eukaryotic genome. *Current Opinion Microbiology*, 5:499-505.
- Xiao, L. (2010).** Molecular epidemiology of cryptosporidiosis: an update. *Experimental Parasitology*, 124:80-89.
- Xiao, L. et al. (2004).** Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:891-899.
- Zhang, X. (2016).** First report of *Cryptosporidium canis* in farmed Arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in China. *Parasites & Vector*, 9:126.
-

-
- Zhou, L. et al. (2004).** Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting fur-bearing mammals differ from those of species infecting humans. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:7574-7577.
- Ziegler, P. E. et al. (2007).** Prevalence of *Cryptosporidium* species in wildlife populations within a watershed landscape in Southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, 147:176-184.

Seznam tabulek

Tabulka 1. Výskyt parazitických protist u lišek polárních ve světě (Aguirre et al., 2000; Åkerstedt et al., 2010; Eaton a Secord, 1978; Elmore et al., 2013; Hersteinsson et al., 1993; Henttonen et al., 2001; Kapel a Nansen, 1996; Meijer et al., 2011; Prestrud et al., 1993; Prestrud et al., 2007; Skirnisson et al., 1993; Stien et al., 2010).....	11
Tabulka 2. Výskyt parazitických hlístic u lišek polárních ve světě (Aguirre et al., 2000; Åkerstedt et al., 2010; Eaton a Secord, 1978; Elmore et al., 2013; Hersteinsson et al., 1993; Henttonen et al., 2001; Kapel a Nansen, 1996; Meijer et al., 2011; Prestrud et al., 1993; Prestrud et al., 2007; Skirnisson et al., 1993; Stien et al., 2010).....	12
Tabulka 3. Výskyt parazitických tasemnic lišek polárních ve světě (Aguirre et al., 2000; Åkerstedt et al., 2010; Eaton a Secord, 1978; Elmore et al., 2013; Hersteinsson et al., 1993; Henttonen et al., 2001; Kapel a Nansen, 1996; Meijer et al., 2011; Prestrud et al., 1993; Prestrud et al., 2007; Skirnisson et al., 1993; Stien et al., 2010).....	13
Tabulka 4. Výskyt parazitických motolic lišek polárních ve světě (Aguirre et al., 2000; Åkerstedt et al., 2010; Eaton a Secord, 1978; Elmore et al., 2013; Hersteinsson et al., 1993; Henttonen et al., 2001; Kapel a Nansen, 1996; Meijer et al., 2011; Prestrud et al., 1993; Prestrud et al., 2007; Skirnisson et al., 1993; Stien et al., 2010).....	13
Tabulka 5. Výskyt kryptosporidií u lišek ve světě.	15
Tabulka 6. Výskyt <i>Giardia intestinalis</i> u lišek ve světě.....	18
Tabulka 7. Složení reakčních směsí pro amplifikaci malé podjednotky rRNA kryptosporidií, ITS mikrosporidií a TPI <i>Giardia intestinalis</i>	23
Tabulka 8. Složení reakčních směsí (20 µl + 5 µl DNA):	26
Tabulka 9. Koncentrace spor, druh a genotyp <i>Encephalitozoon</i> spp. v trusu polárních lišek detekovaná na základě qRT-PCR a sekvenování ITS sekvence za použití rodově specifických primerů.....	30

Tabulka 10. Koncentrace spor, druh a genotyp <i>Enterocytozoon bieneusi</i> v trusu polárních lišek detekovaná na základě qRT-PCR a sekvenování ITS sekvence za použití rodově specifických primerů.....	31
---	----

Seznam obrázků

- Obrázek 1.** Kladogram fylogenetických vztahů izolátů kryposporidií získaných z lišek polárních (*Vulpes lagopus*) v této studii s ostatními druhy a genotypy kryptosporidií na základě částečné nukleotidové sekvence genů kódujících malou ribozomální podjednotku, vytvořený metodou ML v programu MEGA X. Znázorněny jsou hodnoty podpory větví více než 50 %. 29