

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

# **Střevní paraziti ptáků na Svalbardu**

**Bakalářská práce**

Veronika Žánová

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

**Školitel specialista:** Mgr. Anna Mácová

České Budějovice, 2020

**Žánová V.**, 2020: Střevní paraziti ptáků na Svalbardu. [Intestinal parasites of birds on Svalbard. Bc. Thesis, in Czech.] – 72 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:** This study aimed to research the distribution of intestinal parasites in wild birds occurring on the Svalbard archipelago. Collected faecal samples from various bird species were examined using both microscopy and molecular methods. This study focused on the occurrence of coccidian, cryptosporidian and microsporidian parasites.

### **Čestné prohlášení**

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se 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 porovnaným textem mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích.....

.....

Podpis studenta

**Poděkování:**

Tímto bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc za jeho pomoc, ochotu, věcné rady a možnost věnovat se velmi zajímavému tématu bakalářské práce. Mé velké díky patří také Mgr. Anně Mácové, za její rady a trpělivost. Za ochotu a cenné rady děkuji také RNDr. Evě Myškové. Za vstřícnost, ochotu a rady děkuji také zaměstnancům Laboratoře veterinární a medicínské protistologie. Děkuji také všem kolegům z Centra polární ekologie za velmi přátelskou atmosféru, pomoc při sběru vzorků a poskytnuté fotografie ptáků. V neposlední řadě chci také poděkovat rodině a přátelům za trpělivost a podporu.

Chci také poděkovat za podporu z grantů LM2015078 CzechPolar (MŠMT ČR) a CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_013/0001708 ECOPOLARIS, které mi umožnily práci na Špicberkách.

# Obsah

<b>1 Úvod</b> .....	1
1.1 Arktida a parazitismus .....	2
1.2 Ptáci jako hostitelé .....	2
1.2.1 Migrace a parazitismus.....	3
1.2.2 Sledované druhy ptáků.....	3
1.2.2.1 Řád vrubozobí .....	4
1.2.2.2 Řád hrabaví.....	5
1.2.2.3 Řád dlouhokřídlí.....	5
1.2.2.4 Řád pěvci .....	8
1.3 Sledování paraziti .....	8
1.3.1 Kmen apikomplexa .....	8
1.3.1.1 Kokcidie .....	9
1.3.1.1.1 Biologie kokcidií .....	9
1.3.1.1.2 Diagnostika kokcidií.....	11
1.3.1.1.3 Výskyt kokcidií u ptáků.....	11
1.3.1.1.4 Výskyt kokcidií v Arktidě .....	12
1.3.1.2 Kryptosporidie .....	13
1.3.1.2.1 Biologie kryptosporidií.....	13
1.3.1.2.2 Diagnostika kryptosporidií .....	14
1.3.1.2.3 Výskyt kryptosporidií u ptáků .....	15
1.3.1.2.4 Výskyt kryptosporidií v Arktidě.....	15
1.3.2 Kmen mikrosporidie.....	16
1.3.2.1 Biologie mikrosporidií.....	16
1.3.2.2 Diagnostika mikrosporidií .....	18
1.3.2.3 Výskyt mikrosporidií u ptáků .....	18
1.3.2.4 Výskyt mikrosporidií v Arktidě.....	19
<b>2 Cíle práce</b> .....	20
<b>3 Metodika</b> .....	21
3.1 Sběr materiálu .....	21
3.2 Mikroskopické vyšetření.....	23
3.2.1 Flotace dle Sheathera .....	23
3.2.2 Barvení dle Miláčka a Vítovce.....	24
3.3 Molekulární metody.....	24
3.3.1 Příprava před izolací.....	24
3.3.2 Izolace DNA.....	25

3.3.2.1 Izolace komerčním kitem .....	25
3.3.2.2 Fenol-chloroformová izolace.....	25
3.3.3 PCR .....	26
3.3.4 Gelová elektroforéza .....	29
3.3.5 Čištění PCR produktu .....	29
3.4 Fylogenetická analýza.....	30
<b>4 Výsledky .....</b>	<b>31</b>
4.1 Mikroskopické vyšetření.....	31
4.2 Molekulární vyšetření .....	36
4.3 Fylogenetická analýza.....	37
<b>5 Diskuse.....</b>	<b>44</b>
<b>6 Závěry .....</b>	<b>50</b>
<b>7 Použité zdroje.....</b>	<b>51</b>
7.1 Literatura.....	51
7.2 Internetové zdroje .....	65
<b>8 Příloha .....</b>	<b>68</b>

## 1. Úvod

V severních polárních oblastech panují jedny z nejextrémnějších podmínek pro život, zejména chladné klima, omezené potravní zdroje a výrazné sezónní rozdíly. Polární ekosystémy jsou tradičně charakterizovány jako jednoduchá společenstva s nízkou druhovou rozmanitostí, krátkými potravními řetězci a omezenou schopností přizpůsobit se změnám (Hoberg a kol. 2003, Sale 2006). Malé druhové zastoupení odpovídá zákonitosti zvané latitudinální gradient diverzity, při které se s rostoucí zeměpisnou šířkou snižuje druhová diverzita (Callaghan a kol. 2004). I přesto je řada organismů, které jsou schopné žít a prosperovat i v takto nehostinném prostředí a některé druhy se zde dokonce vyskytují ve vysokých počtech (Hoberg a kol. 2003, Blix 2016). U polárních rostlin a živočichů se vyvinuly různorodé adaptace, které jim umožňují tolerovat místní abiotické stresové faktory (Bliss 1962, Blix 2016). Takových přizpůsobení je nespočet, například využití úkrytů, hibernace, tvorba izolačních vrstev či řada fyziologických přizpůsobení (Scholander a kol. 1950, Blix 2016). Další adaptací, která stojí za zmínku, je pravidelná migrace (Jørgensen a kol. 2013).

Svalbard je pojmenování pro norské souostroví ležící v Severním ledovém oceánu. Dřívější název Špicberky, který platil pro celé souostroví do roku 1925, se zúžil pouze na největší ostrov, na kterém se nachází hlavní město Longyearbyen a většina osad. Rozloha souostroví činí 61 022 km<sup>2</sup> a z této plochy je přibližně 60 % pokryto ledovcem. Svalbard se nachází severně od severního polárního kruhu, mezi 74° a 81° severní šířky a 10. a 35. východní délky. Přestože Svalbard geograficky patří do vysoké Arktidy, je místní klima v porovnání s oblastmi ve stejné zeměpisné šířce poměrně mírné, především pak v zimní sezóně. Platí to zejména pro západní pobřeží a severní část souostroví, která je ovlivněna větví teplého Gofského proudu tzv. Západním špicberským proudem. Naopak klima ve východní části souostroví, které je ovlivňováno studeným proudem, spíše koreluje se zbytkem vysoké Arktidy (Gulliksen a Svensen 2004, Stange 2018). Pro Svalbard bohužel stejně jako pro zbytek polárních oblastí platí, že jde o lokalitu nejvíce a nejrychleji zasaženou probíhajícími globálními změnami teplot a problematika jejich dopadu na místní ekosystém je tématem řady studií (Hovinen a kol. 2014, Prop a kol. 2015, Descamps a kol. 2017). Svalbard zároveň patří mezi velice zajímavou a relativně dostupnou turistickou destinaci. Rostoucí turismus a s ním spojená lidská aktivita je další výzvou pro místní život (Madsen a kol. 2009).

Tato bakalářská práce je zaměřena na studium a rozšíření poznatků o výskytu parazitů u ptáků, kteří pravidelně hnízdí na Svalbardu. Vzhledem k přísné ochraně místní avifauny byly pro parazitologické vyšetření zvoleny neinvazivní koprologické metody. Sledovanými parazity byli zástupci z kmene apikomplexa – kokcidie a kryptosporidie, dále pak zástupci kmene mikrosporidie.

### **1.1. Arktida a parazitismus**

Na výzkum polárních oblastí je dnes v důsledku probíhajících změn klimatu směřováno velké množství pozornosti. Poznatky o biodiverzitě parazitů v Arktidě jsou přesto stále velmi omezené. Ukazuje se však, že v kontrastu s nízkou diverzitou, která ve vysokých zeměpisných šířkách převládá, je zdejší parazitofauna poměrně bohatá, a to i za předpokladu, že vnější stádia parazitů musí stejně jako jejich hostitelé čelit náročným podmínkám prostředí (Hoberg a kol. 2013). Jako ukázkový příklad může posloužit výskyt téměř stovky různých druhů parazitických helmintů, jež byli popsáni u rybožravých ptáků jako jsou alky, potáplice a potápky (Storer 2000, 2002, Muzzafar a Jones 2004). Oproti tomu jednobuněční paraziti, kteří se běžně objevují ve světové populaci ptáků, nebyli v těchto oblastech intenzivně zkoumáni (Bennett a kol. 1992).

I přes veškeré snahy o lepší porozumění roli parazitů v Arktidě však stále není dosavadní výzkum dostatečně ucelený. Práce navíc bývají obvykle zaměřeny pouze na krátkodobé sledování na prostorově omezených lokalitách. Pro správné pochopení významu parazitismu v místních ekosystémech je potřeba rozšířit poznatky také dlouhodobými studiemi. Prohloubení těchto znalostí nám může pomoci objasnit historický vývoj polárního společenstva, predikovat možné změny v populacích ovlivněné globálními změnami, popřípadě zlepšit prevenci proti vypuknutí nákazy či zdokonalit zajištění bezpečnosti potravin (Hoberg a kol. 2003, 2013).

### **1.2. Ptáci jako hostitelé**

Ptáci mohou sloužit jako hostitelé pro širokou škálu jednobuněčných i mnohobuněčných, vnějších i vnitřních parazitů. Některé druhy ptačích parazitů lze najít také u savčích hostitelů (např. Fernandes a kol. 2015), jiné druhy jsou specificky ornitofilní (např. Bennett a kol. 1993). Mezi významné mnohobuněčné střevní parazity ptáků patří například různé druhy tasemnic (Cestoda), motolic (Trematoda), hlístů (Nematoda) a vrtejšů (Acanthocephala). Mezi

jednobuněčné parazity napadající trávicí soustavu ptáků, patří například zástupci gastrointestinálních diplomonád, trichomonád a kokcií (Ritchie a kol. 1994).

### **1.2.1. Migrace a parazitismus**

Migraci, jakožto odpověď na střídající se roční období, je možné pozorovat v různých formách u takřka všech živočišných skupin (Dingle a Drake 2007). Tato strategie je běžná zejména mezi zástupci ptačí říše (Veselovský 2001). Letové schopnosti ptákům umožňují překonávat někdy přímo obdivuhodné vzdálenosti. Díky tomu mohou využít velmi výhodné podmínky v podobě množství potravních příležitostí a nízkého predatorního tlaku pro zahánění i v oblastech, které jsou po většinu roku nehostinné (Fryxell a Sinclair 1988, McKinnon a kol. 2010).

Pravidelné migrace dávají ptákům potenciál pro mezikontinentální rozšiřování patogenů. Ptáci, kteří slouží jako tzv. přenašeči, mohou roznášet řadu původců virových, bakteriálních či parazitárních onemocnění (Reed a kol. 2003, Viana a Figuerola 2016). V průběhu přesunu do sezónních areálů se stěhovaví ptáci zároveň vyskytují na různorodých habitatech, kde jsou vystavováni široké škále patogenů včetně parazitů (Viney a kol. 2005).

Většina studií, které se zabývají touto problematikou, cílí na krevní parazity (například Figuerola a Green 2000, Barnard a kol. 2010). Jsou ale také případy sledující střevní parazity. Například Koprivnikar a Leung (2015) ve své práci prokázali, že stěhovaví ptáci mají podstatně vyšší diverzitu střevních parazitů, než je tomu u nemigrujících druhů. Migrující ptáci jsou zřejmě také rezervoárem pro kryptosporidie nebo bičenky (Jourdain a kol. 2007, Lawson a kol. 2011). Sandstrom a kol. (2012) ve své studii také poukázali na to, že by ptáci v polárních oblastech mohli sloužit jako zdroj infekce *Toxoplasma gondii*.

I přestože je vliv migrace hostitelů na distribuci parazitů zřejmý, přesný mechanismus a míra její role jsou stále nejasné. Důvodem je hlavně nedostatek provedených studií pramenících z náročnosti výzkumu konkrétních migračních strategií ptáků (Fuller a kol. 2012, Pulgarín-R a kol. 2018). Objasnění zmíněných souvislostí mezi migrací a parazitismem by však mohlo mít zásadní význam pro lepší pochopení vlivu ptáků na dynamiku parazitů v geograficky oddělených oblastech, kam patří i Arktida (Altizer a kol. 2011).

### **1.2.2. Sledované druhy ptáků**

Na Svalbardu byl zaznamenán výskyt více než 227 různých ptačích druhů a z toho se v 41 případech jedná o pravidelně hnízdící druhy (Norsk Ornitologisk Forening 2019: 1).



Následující část práce je zaměřena pouze na konkrétní druhy, od kterých se podařilo získat a následně vyšetřit vzorek trusu.

#### **1.2.2.1. Řád vrubozobí**

##### ***Branta leucopsis* (Bechstein, 1803) - berneška bělolící**

Bernešky se taxonomicky řadí do čeledi kachnovití (ITIS 2020: 2). Pro tyto středně velké ptáky je charakteristické jejich kontrastní černobílé zbarvení. Bernešky jsou převážně koloniální ptáci, kteří si pro zahnízdění vybírají málo dostupná místa (Svensson 1999, Kovacs a Lydersen 2006, Sale 2006). Na souši zpravidla vyhledávají travnaté plochy, kde spásají nízkou vegetaci, kořínky či mechy (Alsos a kol. 1998). Hnízdní lokality bernešek jsou roztroušeny mezi Svalbardem, Grónskem, severovýchodní částí Ruska a baltskými zeměmi. Na podzim bernešky migrují ze Svalbardu přes ostrov Bjørnøya a norský Helgeland do Solway Firth (Kovacs a Lydersen 2006, Tombre a kol. 2008) (BirdLife International 2019: 3).

##### ***Anser brachyrhynchus* (Baillon, 1834) - husa krátkozobá**

Husy jsou druhým zmíněným rodem z čeledi kachnovitých (ITIS 2020: 2). Spolehlivým morfologickým znakem hus krátkozobých je drobný trojúhelníkovitý zobák a krátký krk. Kolonie hus, případně solitérní páry, si pro stavbu hnízd nejčastěji volí pobřeží nebo vyvýšená místa (Svensson 1999, Kovacs a Lydersen 2006, Sale 2006). Husy na Svalbardu patří spolu s berneškami mezi klíčové spásače a mezi jejich hlavní složky potravy patří zelené části rostlin a kořínky (Fox a kol. 2006). Husy krátkozobé hnízdí ve východní části Grónska, na Islandu a na Svalbardu. Ptáci v průběhu září opouští Svalbard a s několika zastávkami migrují přes Norsko na jih do Belgie, Nizozemska a Dánska (Kovacs a Lydersen 2006, Tombre a kol. 2008) (BirdLife International 2019: 4).

##### ***Somateria mollissima* (Linnaeus, 1758) - kajka mořská**

Kajky patří do čeledi kachnovití (ITIS 2020: 2) a na Svalbardu se vyskytuje poddruh *Somateria mollissima borealis*. Tento potápivý pták je díky prodloužené hlavě a zobáku snadno rozpoznatelný i z velké vzdálenosti. Kajky jsou společenší ptáci hnízdící v koloniích a po vyhnízdění se pohybují v hejnech. Hlavní složkou potravy kajek jsou vodní živočichové, zejména se jedná o různé druhy měkkýšů a korýšů (Svensson 1999, Kovacs a Lydersen 2006, Sale 2006). Kajky mají cirkumpolární výskyt a hlavní areálem pro jejich hnízdění jsou arktické a boreální oblasti severní polokoule. Poddruh *Somateria mollissima borealis* hnízdí mimo Svalbard také v Grónsku, Kanadě, Rusku a na Islandu. Kajky hnízdící na Svalbardu zimují na Islandu a v Norsku (Hanssen a kol. 2016).

#### 1.2.2.2. Řád hrabaví

##### ***Lagopus muta hyperborea* (Sundevall, 1845) - bělokur horský**

Na Svalbardu se vyskytuje jediný zástupce hrabavých (ITIS 2020: 2) – endemický poddruh *Lagopus muta hyperborea*. Charakteristickým společným znakem bělokurů je přítomnost opeřených chodidel a střídání šatu v průběhu sezóny (Sale 2006). Potrava bělokurů se liší v závislosti na dané sezóně a na ontogenezi ptáka. Dospělci vyhledávají rostlinné zdroje, oproti tomu mláďata se příležitostně živí také hmyzem. Bělokur je jediným zástupcem z ptačí říše, který se na Svalbardu vyskytuje celoročně (Kovacs a Lydersen 2006, Sale 2006). V průběhu roku je zaznamenán pohyb bělokurů, který je spojovaný s hnízděním či nedostatkem potravy (Kovacs a Lydersen 2006).

#### 1.2.2.3. Řád dlouhokřídli

##### ***Charadrius hiaticula* (Linnaeus, 1758) - kulík písečný**

Kulíci patří mezi bahňáky z čeledi kulíkovití (ITIS 2020: 2). Jde o menší ptáky s vazbou na vodní prostředí. Výskyt kulíků během hnízdění je v blízkosti vody, nejčastěji se jedná o písčné či šterkovité břehy, eventuálně svahy s nízkou vegetací. Potrava je u kulíků stejně jako u většiny bahňáků složena z hmyzu, korýšů a červů (Svensson 1999, Kovacs a Lydersen 2006, Sale 2006). Kulíci píseční mají palearktické rozšíření hnízdního areálu, který také částečně zasahuje do severovýchodní části Kanady. Kulíci na zimu často ve velkých hejnech migrují do teplých krajín. Mezi cílové lokality pro zimování patří pobřeží západní Evropy, tropické oblasti Afriky a Střední východ (Kovacs a Lydersen 2006) (BirdLife International 2019: 5).

##### ***Phalaropus fulicarius* (Linnaeus, 1758) - lyskonoh ploskozobý**

Tento pták z čeledi slukovití (ITIS 2020: 2) je těžko zaměnitelný s ostatními bahňáky díky svému nápadnému rezavému zbarvení. Patříčnou lokalitou pro zahnízdění bývá pobřeží či podmáčená tundra poblíž sladké vody, kde sbírají vodní hmyz, korýše a jiné bezobratlé. Mimo hnízdění dospělci obývají otevřené moře (Kovacs a Lydersen 2006). Hnízdní areál lyskonohů má cirkumpolární rozšíření včetně Svalbardu. Na zimu odlétají do tropických oblastí, které jsou bohaté na vodní plankton. Z Palearktidy směřují hlavně do vod při pobřeží západní části Afriky, ale jako zimoviště mohou využít i jiné lokality jako například pobřeží Francie (Kovacs a Lydersen 2006) (BirdLife International 2019: 6).

### ***Calidris maritima* (Brunnich, 1764) - jespák mořský**

Taxonomicky jsou jespáci zařazeni do čeledi slukovití (ITIS 2020: 2). Jespák je malý podsaditý bahňák s poměrně dlouhým lehce zahnutým zobákem a dlouhým ocasem. Jespáci zpravidla hnízdí poblíž vodního zdroje, kde si obstarávají živočišnou potravu, ojediněle si také mohou přilepšit semeny rostlin (Svensson 1999, Kovacs a Lydersen 2006, Sale 2006). Jespáci se v létě nachází napříč Arktidou, například v Grónsku, na Islandu a na Svalbardu. Jespáci nepatří mezi dálkové migranty a jedinci ze Svalbardu tráví zimu při pobřeží severního Norska, Švédska či Skotska (Hake a kol. 1997, Kovacs a Lydersen 2006, Summers a kol. 2010) (BirdLife International 2019: 7).

### ***Rissa tridactyla* (Linnaeus, 1758) – racek tříprstý**

Rackové náleží k čeledi rackovití (ITIS 2020: 2). Rackové hnízdí v různě velkých koloniích, které mohou čítat až k deseti tisícům jedinců. Kolonie bývají homogenní, nezřídka ale dochází k tvorbě smíšených kolonií s jinými ptačími druhy, například s alkounem tlustozobým. Rackové loví nejčastěji v hejnu, a to konkrétně menší ryby či bezobratlé z vodní hladiny (Kovacs a Lydersen 2006, Sale 2006). Racek tříprstý má cirkumpolární rozšíření a hnízdí nejen v Arktidě, ale také v oblastech boreálního pásma. V průběhu září nastává přesun na otevřené moře v západním Atlantiku či v Severním moři (Kovacs a Lydersen 2006) (BirdLife International 2019: 8).

### ***Larus hyperboreus* (Gunnerus, 1767) – racek šedý**

Tento velký pták na Svalbardu patří mezi hlavní predátory a má proto významnou roli v místním ekosystému. Rackové jsou všežravci a jejich potravu je velmi různorodá. Spadají tam různé druhy mořských ryb, měkkýšů, hmyzu či nalezené mršiny. Nezřídka se stává, že hnízdí poblíž kolonií jiných mořských ptáků, kde predují na vajíčkách nebo mláďatech (Svensson 1999, Kovacs a Lydersen 2006, Sale 2006). Hnízdní distribuce racka šedého je cirkumpolární s převahou míst ve vysoké Arktidě včetně Svalbardu. Na přelomu září a října dochází k jejich rozptýlení na otevřené moře. Zpravidla míří do oblasti Barentsova moře a severního Atlantiku (Gabrielsen 1995, Kovacs a Lydersen 2006) (BirdLife International 2019: 9).

### ***Sterna paradisaea* (Pontoppidan, 1763) – rybák dlouhoocasý**

Rybáci jsou středně velcí ptáci patřící do čeledi rackovití (ITIS 2020: 2). Rybáci dlouhoocasí tvoří početné kolonie, které jsou zpravidla poblíž moře. Tam nejčastěji loví malé ryby, korýše a hmyz z vodní hladiny (Kovacs a Lydersen 2006, Sale 2006). Rybáci mají

cirkumpolární rozšíření. Pozorovat je lze například na ostrovech a při pobřeží v Pacifickém a Atlantském oceánu a ve vysoké Arktidě. Mezi pravidelná hnízdiště patří také Svalbard. Mezi zvířaty z celého světa byla dosud zaznamenána nejdelší migrační trasa právě u rybáka dlouhoocasého, který zimuje v Antarktidě. Trasy této obdivuhodné migrace vedou podél východního a západního pobřeží Atlantiku (Kovacs a Lydersen 2006, Hromádková a kol. 2020) (BirdLife International 2019: 10).

### ***Stercorarius parasiticus* (Linnaeus, 1758) - chaluha příživná**

Chaluha příživná je středně velký pták, který patří do čeledi chaluhovití (ITIS 2020: 2). Chaluchy hnízdí solitérně. U chaluh, které jsou rozšířené při pobřeží, je možné sledovat jev zvaný kleptoparazitismus. Tato potravní strategie spočívá v krádeži kořisti jiných mořských ptáků. Oproti tomu chaluchy ve vnitrozemí častěji predují na vajíčkách, popřípadě mláďatech jiných ptáků (Svensson 1999, Kovacs a Lydersen 2006, Sale 2006). Pro chaluchy příživné platí cirkumpolární rozšíření a mezi významná hnízdiště patří také Svalbard. Do teplých krajín, konkrétně do jihozápadní Afriky, odlétají na přelomu srpna, kde žijí na otevřeném moři nebo se zdržují při pobřeží (Kovacs a Lydersen 2006) (BirdLife International 2019: 11).

### ***Cepphus grylle* (Linnaeus, 1758) - alkoun obecný**

Alkouni, patřící do čeledi Alcidae (ITIS 2020: 2), mají v arktické ptačí fauně největší početní zastoupení. Morfologie a tělesná fyziologie je přizpůsobena k lovu pod vodní hladinou (Svensson 1999, Kovacs a Lydersen 2006, Sale 2006). Kořist alkouna obecného se skládá z širokého spektra bentických ryb a korýšů (Barrett a kol. 1997). Lokality pro hnízdění alkounů obecných se nachází téměř po celém cirkumpolárním pásu a na Svalbardu tvoří nepřilíš početné kolonie, popřípadě hnízdí solitérně. Zimoviště alkounů nejsou dosud zcela probádána. Předpokládá se, že se zdržují na otevřeném moři poblíž Svalbardu a Grónska (Kovacs a Lydersen 2006) (BirdLife International 2019: 12).

### ***Fratercula arctica* (Linnaeus, 1758) - papuchalk severní**

Papuchalkové náleží do podřádu alky a čeledi alkovití (ITIS 2020: 2). Stavba těla je přizpůsobena životu na moři. Papuchalkové hnízdí v koloniích obvykle poblíž moře, tedy v blízkosti zdroje potravy. Ta se skládá převážně z malých druhů ryb, ale také z korýšů a pelagických plžů (Kovacs a Lydersen 2006, Sale 2006). Areálem hnízdění papuchalků je pobřeží severního Atlantiku a pouze necelé jedno procento světové populace si pro zahnízdění volí právě vysokou Arktidu. Kam papuchalkové odlétají na zimu není dosud dostatečně prostudováno, pravděpodobně míří do Barentsova moře a na severovýchod

Atlantiku (Kovacs a Lydersen 2006, Provencher a Gaston 2012) (BirdLife International 2019: 13).

#### **1.2.2.4. Řád pěvci**

##### ***Plectrophenax nivalis* (Linnaeus, 1758) - sněhule severní**

Sněhule severní, patřící do čeledi Calcariidae (ITIS 2020: 2), je jediným pravidelně hnízdícím zástupcem pěvců na Svalbardu. Tento drobný pěvec se živí převážně semeny rostlin, vyjma období hnízdění, kdy loví také bezobratlé, jež slouží jako potrava pro mláďata. Sněhule se převážně zdržují na otevřených plochách s bohatou vegetací (Kovacs a Lydersen 2006, Espmark 2016). Letní distribuce sněhulí severních odpovídá cirkumpolárnímu rozšíření, naopak zimní výskyt je spojován s oblastmi mírného pásu. Několik kroužkovaných ptáků ze Svalbardu bylo spatřeno u Bílého moře, na ruském poloostrově Kanin či ve stepích západosibiřské roviny (Kovacs a Lydersen 2006, Snell a kol. 2018) (BirdLife International 2019: 14).

### **1.3. Sledování paraziti**

#### **1.3.1. Kmen apikomplexa**

Apikomplexa neboli výtrusovci jsou početným monofyletickým kmenem, který je součástí skupiny protist zvané Alveolata (Fast a kol. 2002). Kmen apikomplexa se dělí do čtyř skupin – kokcidie (Coccidea), hemosporidie (Hematozoa), gregariny (Gregarinea) a kryptosporidie (Cryptosporidea) a zahrnuje velké množství původců medicínsky i veterinárně významných onemocnění (Levine 1973, Kreier 1993).

Apikomplexa patří mezi různorodou skupinu organismů. Charakteristickým společným znakem této skupiny je adaptace na život uvnitř nebo méně často na povrchu buňky hostitele (Levine 1970). Převládající životní cyklus je poměrně složitý a dochází při něm ke střídání tří rozmnožovacích fází, tj. merogonie, gamogonie a sporogonie (Samuel a kol. 2008). Cyklus může kompletně proběhnout v jednom nebo ve více hostitelích (Fayer 1980). Sledované skupiny parazitů – tedy kokcidie a kryptosporidie, mají velmi podobný průběh vývoje. Lze ho shrnout následovně. Přenos na nového hostitele je zprostředkován odolnými oocystami, které dokáží odolat podmínkám vnějšího prostředí (Siński a Behnke 2004). Ty jsou poté nejčastěji požitky spolu s kontaminovanou vodou nebo potravou a v trávicí soustavě dojde k uvolnění pohyblivého sporozoita. Sporozoit invaduje hostitelskou buňku, kde přetrvává v útvaru zvaném parazitoformní vakuola (Fantham 1910, Volf a kol. 2007). V buňce dále roste a přechází v další stádium tzv. meronta. Pro fázi merogonie je charakteristické asexuální

množení za vzniku jednojaderných merozoitů, kteří mohou napadnout novou buňku. Stádium merogonie se může opakovat, a poté parazit přechází do další fáze, zvané gamogonie. Jedná se o sexuální dělení, při kterém vznikají nezralé samčí a samičí gametocyty. Ty poté už jako zralé mikro a makrogamety dají vzniknout diploidní zygotě, která je podrobena poslednímu nepohlavnímu dělení, zvanému sporogonie. V oocystě probíhající sporogonie může probíhat uvnitř hostitele, popřípadě až ve vnějším prostředí a výsledkem dělení jsou sporozoiti (Pellérdy 1974, Volf a kol. 2007).

Vyjma složitý životní cyklus je pro výtrusovce dále charakteristická přítomnost organely zvané apikální komplex, která se vyskytuje u vývojových stádií invadujících hostitelskou buňku, tzv. zoitů (Levine 1988). Apikální komplex umožňuje penetraci parazita do hostitelské buňky a skládá se ze sekrečních organel, tj. rhoptrií, mikroném a denzních granul, a dále ze skeletárních struktur: konoidu a polárního prstence (Levine 1970, Volf a kol. 2007). Další organela přítomná u většiny zástupců je apikoplast. Apikoplast je plastid s vlastním genomem, který pravděpodobně vznikl sekundární endosymbiózou. Produkty genů obsažených v apikoplastu se pravděpodobně účastní řady metabolických drah důležitých pro správný vývoj parazita (Köhler a kol. 1997, Cavalier-Smith 1999, Lim a McFadden 2010).

### **1.3.1.1. Kokcidie**

#### **1.3.1.1.1. Biologie kokcií**

Kokcidie jsou skupinou intracelulárních parazitů, pro kterou je charakteristická vysoká míra diverzity (Barta a kol. 1997). To platí především pro nejpočetnější čeleď Eimeriidae, která se dále dělí do rodů *Eimeria*, *Isospora* a *Cyclospora* (Samuel a kol. 2008).

Prvním popsáným druhem je *E. tenella*, která byla objevena ve slepém střevě kuřat (Tyzzer, 1929). Kokcidiím se dále věnoval také Fantham (1910), kterému se jako prvnímu podařilo detailně popsat životní cyklus. Další klíčovou postavou pro výzkum kokcií je bezpochyby Tyzzer, který se zasloužil o popsání několika nových druhů, jejich životních cyklů a vlivu na hostitele (Tyzzer 1929, Tyzzer a kol. 1932). Mezi zástupci čeledi Eimeriidae převládá vysoká míra specializace nejen na úrovni hostitele, ale také na úrovni tkáňové lokalizace (Long and Reid 1982, Barta a kol. 1997). Hostitelé mohou být jak z řad bezobratlých živočichů, tak i obratlovců (Pellérdy 1974, Kopečná a kol. 2006). Taxonomie je stále problematičtější především díky nezvyklým fenotypickým a fylogenetickým znakům a velkému množství druhů (Cox 1991, Tenter a Johnson 1997).

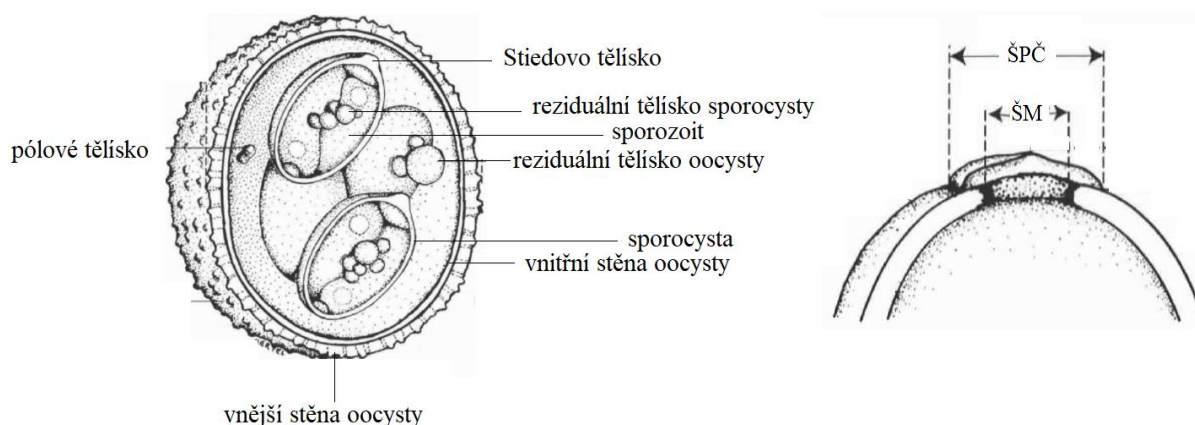
Životní cyklus odpovídá vývoji výtrusovců a u většiny střevních kokcií z řádu Eimeriidae probíhá v jediném hostiteli. Vývoj končí tvorbou odolných oocyst, jejichž

sporulace probíhá při vhodných podmínkách ve vnějším prostředí (Levine 1970). Pravděpodobně z důvodu rizika vyschnutí jsou oocysty uvolňovány s určitou pravidelností, která souvisí s denní dobou, jak tomu napovídá řada provedených experimentů, například u rodu *Isospora* (Martinaud a kol. 2009, Dolnik a kol. 2011). Vysporulované oocysty, které se liší počtem sporocyst a sporozoitů, mohou sloužit k rozlišení jednotlivých rodů kokcií (Tab. 1). Mezi další odlišovací znaky patří například přítomnost či absence mikropyle, struktura a šířka stěny nebo velikost oocysty (Duszynski a Wilber 1997) (Obr. 1).

**Tab. 1:** Morfologické znaky vysporulovaných oocyst (podle Samour 2015).

Rod	Počet sporocyst	Počet sporozoitů*
<i>Caryospora</i> sp.	1	8
<i>Eimeria</i> sp.	4	2
<i>Isospora</i> sp.	2	4

Vysvětlivky: „\*“ = odpovídá jedné sporocystě.



**Obr. 1:** Vlevo – schéma vysporulované oocysty *Eimeria* sp., vpravo – vršek oocysty s mikropyle, šířka mikropyle (ŠM) a šířka pólóvé čepičky (ŠPČ) (upraveno podle Duszynski a Wilber 1997).

Vzhledem k rozmanitosti skupiny je obtížné zobecnit charakteristiku průběhu onemocnění zvané kokcidióza. Projev kokcidiózy je navíc ovlivněn několika faktory, které souvisí s celkovým zdravotním stavem a stářím hostitele. Kokcie u volně žijících druhů zpravidla nezpůsobují vážné onemocnění (Ritchie a kol. 1994). Naopak zvířata, která jsou ve stresu, v nevhodných podmínkách či ve velkém počtu na malém prostoru, často prochází závažnějším vývojem infekce. Tento stav může nastat nejen u populace chovných zvířat, ale také ve volné přírodě, narušením či změnou habitatu (Schoener a kol. 2013, Chapman 2014, Samour 2015). Projev onemocnění se liší nejen v závislosti na druhu parazita, ale také na specializované

hostitelské tkáni, kde často dochází k poškození buněk a tvorbě zánětů. Z obvykle sledovaných klinických příznaků infekce lze uvést například celkovou skleslost a sníženou aktivitu, ztrátu hmotnosti, průjmová onemocnění spojené s dehydratací až smrt jedince (Samour 2015).

#### **1.3.1.1.2. Diagnostika kokcií**

V prvotních pracích byla většina nově objevených druhů kokcií klasifikovaná na základě morfologických znaků, dále pak na hostitelské specifitě a lokalizaci uvnitř těla hostitele (Long a Reid 1982). I přestože vyšetření trusu a následná identifikace oocyst na základě morfologie patří mezi velmi často zvolené metody diagnostiky, nejedná se o příliš přesnou metodu. Dokonce i rozlišení oocyst u velmi vzdálených druhů může být velice náročné až nemožné (Long a Joyner 1984). S rostoucím významem molekulárních metod se proto postupně začalo přecházet na popis na základě molekulární charakteristiky (Shirley 1975, Nakamura a kol. 1986). Na úrovni druhů se používá množství metod, které sledují odchylky v genech a zároveň umožňují sledovat fylogenetické vztahy druhů uvnitř skupiny. Pro objasnění vztahů mezi druhy je standardní metodou porovnání malé ribozomální podjednotky (SSU), která je hojně zastoupena v dostupných databázích a jedná se tedy o vhodnou volbu pro fylogenetickou analýzu (Barta 1997, Modrý a kol. 2000). Mezi další vhodné markery patří také mitochondriální geny pro protein cytochrom c oxidázové podjednotky či gen pro protein cytochrom b (Besansky a kol. 2003, Ogedengbe a kol. 2011).

#### **1.3.1.1.3. Výskyt kokcií u ptáků**

Kokcidie patří mezi významné ptačí patogeny (Levine 1988). Poznatky o jejich distribuci a diverzitě mezi volně žijícími ptáky jsou však stále značně omezené. Obecně lze předpokládat, že výskyt a množství kokcií bude převažovat u býložravých druhů, kde je vyšší šance na přenos mezi hostiteli (Dolnik a kol. 2010). Výskyt kokcií u volně žijících ptáků byl popsán v několika vědeckých pracích (Tab. 2). Pěvci nejčastěji hostí parazity z rodu *Isospora* (Svobodová 1994). Rod *Caryospora* je zase významným patogenem dravých ptáků (Klaphake a Claney 2005). U ptactva chovaného v zajetí, převážně pak u hospodářsky významných druhů, je popsáno podstatně větší množství kokcií než u volně žijících ptáků. Například v chovech kuřat mohou vznikat ohniska nákazy až sedmi různých druhů *Eimeria*, které mohou mít na svědomí značné ekonomické ztráty (Long a Joyner 1984).



**Tab. 2:** Příklad výskytu kokciidií u volně žijících ptáků.

<b>Druh</b>	<b>Hostitel</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Reference</b>
<i>Caryospora</i> sp.	pěvci	Evropa	Svobodová 1994, Brown a kol. 2010
<i>Eimeria curvata</i>	měkkozobí	Jižní Amerika	Adriano a kol., 2000
<i>Eimeria fraterculae</i>	dlouhokřídlí	Severní Amerika	Leighton a Gajadhar, 1986
<i>Eimeria fulva</i>	vrubozobí	Severní Amerika	Greiner a kol. 1981
<i>Eimeria hermani</i>	vrubozobí	Severní Amerika	Greiner a kol. 1981
<i>Eimeria magnalia</i>	vrubozobí	Severní Amerika	Greiner a kol. 1981
<i>Eimeria pygosceli</i>	tučňáci	Antarktida	Golemanski, 2003
<i>Eimeria rissae</i>	dlouhokřídlí	Evropa	Soulsby a Jennings, 1957
<i>Eimeria sicki</i>	pěvci	Jižní Amerika	Berto a kol., 2009
<i>Eimeria somateriae</i>	vrubozobí	Evropa	Skirnisson 1998
<i>Eimeria pileata</i>	pěvci	Severní Amerika	Soriano-Vargas a kol., 2015
<i>Eimeria</i> sp.	hrabaví, krátkokřídlí, měkkozobí	Evropa	Brown a kol. 2010
<i>Eimeria</i> sp.	pěvci	Evropa	Svobodová a kol. 1994
<i>Eimeria</i> sp.	pěvci	Oceánie	Fowler 1981
<i>Eimeria stercorariae</i>	dlouhokřídlí	neznámo	Galli-Valerio, 1940
<i>Eimeria truncata</i>	vrubozobí	Severní Amerika	Greiner a kol. 1981
<i>Isoospora ferox</i>	pěvci	Jižní Amerika	Berto a kol., 2009
<i>Isoospora lesouefi</i>	pěvci	Austrálie	Morin-Adeline a kol., 2011
<i>Isoospora thibetana</i>	pěvci	Asie	Perrucci a kol., 1998
<i>Isoospora</i> sp.	sokoli, krátkokřídlí, pěvci	Evropa	Misof 2004, Brown a kol. 2010
<i>Tyzzeria parvula</i>	vrubozobí	Severní Amerika	Greiner a kol. 1981

#### 1.3.1.1.4. Výskyt kokciidií v Arktidě

Poznatků o výskytu kokcidiózy v Arktidě je několik. Americkým autorů, kteří studovali bernešky hnízající v Severní Americe, se podařilo prokázat přítomnost různých druhů kokciidií (Greiner a kol. 1981). Další ukázkou je studie, zabývající se endoparazity u polárních lišek v Kanadě, která prokázala infekci množstvím parazitů včetně *Eimeria* sp. a *Cystoisospora* sp. (Elmore a kol. 2013). Rozšíření kokcidiózy u volně žijících druhů bylo studováno také

na Svalbardu. Prestrud a kol. (2007) sledovali výskyt *Toxoplasma gondii* u polárních lišek a přišli s hypotézou, že migrující bernešky mohou sloužit jako rezervoáry nákazy. Polární lišky zde také prokazatelně slouží jako hostitelé pro řadu zástupců rodu *Eimeria* (Myšková a kol. 2019). Ptačí kokcidióza byla na Svalbardu prokázána také u sněhule severní, u které byl popsán druh *Isospora plectrophenaxia* (Dolnik a Loonen, 2007).

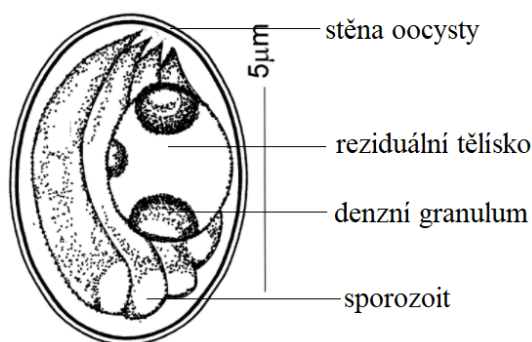
### **1.3.1.2. Kryptosporidie**

#### **1.3.1.2.1. Biologie kryptosporidií**

Rod *Cryptosporidium* patří do kmene výtrusovců (Fayer 2010). První objev kryptosporidií se datuje k roku 1907, kdy Tyzzer popsal nejprve oocysty v trusu a poté také kryptosporidie v žaludečních žlázách u laboratorních myší (Tyzzer, 1907). Jako první bylo popsáno *C. muris* (Tyzzer, 1910) a o dva roky později menší druh *C. parvum* v tenkém střevě myší a králíků (Tyzzer, 1912).

Kryptosporidie byly dříve nesprávně řazeny mezi kokcidie pravděpodobně díky podobnostem ve vývojovém cyklu (Levine 1988, Fayer 1997). Pozdější molekulární analýzy však ukázaly, že rod *Cryptosporidium* patří do třídy Gregarina (Carreno a kol. 1999). Kryptosporidie se navíc od zástupců kokcidií liší extracytoplazmatickou lokalizací uvnitř hostitelské buňky (Fayer 1997), absencí plastidu (Zhu a kol. 2000) nebo sporulací oocyst již uvnitř původního hostitele (Fayer 1997). Rod *Cryptosporidium* lze na základě morfologie a lokalizace uvnitř hostitele rozdělit do žaludeční a střevní linie (Xiao a kol. 2004). Kryptosporidie mohou napadat také plíce či lymfatický orgán, jako je tomu u ptačího druhu *C. baileyi* (Current a kol., 1986). Dnes je akceptováno 13 různých druhů *Cryptosporidium*, přičemž většina zástupců je specializovaná na hostitele z podkmene obratlovci (Levine 1973, Xiao a kol. 2004). Nejvíce prostudovaným druhem je *C. parvum*, které má navíc značné množství odlišných genotypů (Ryan a kol. 2003a).

Složité vývojové cykly, který je pro výtrusovce charakteristický, probíhá v jediném hostiteli a skládá se ze sexuální a asexuální fáze (viz kapitola 1.3.1.). Zdrojem infekce je nejčastěji voda či potrava kontaminovaná oocystami kryptosporidií (Tzipori a Ward 2002). Oocysty se orální cestou dostanou do gastrointestinálního traktu (Reduker 1985) či méně často do plicní tkáně vhodného hostitele (Clavel a kol. 1996). Tam dochází k jejich excystaci a uvolnění sporozoitů, kteří infikují buňky epitelu. Životní cyklus vrcholí vznikem oocysty, která obsahuje 4 banánkovité sporozoity (Obr. 2). U *C. parvum* byl popsán vznik tenkostěnných a silnostěnných oocyst (Reduker 1985).



**Obr. 2:** Schéma vysporulované oocysty *C. galli* (upraveno podle Ryan a kol. 2003b).

Rod *Cryptosporidium* môže u hostiteľa spôsobiť ochorenie zvané kryptosporidióza (Dillingham a kol. 2002). Príznaky nákazy sa líšia v závislosti na typu napadenej tkaniny a imunitnej kompetencii hostiteľa (Xiao a kol. 2004). Infekcia môže prebiehať bezpríznakové, zejména v prípade línii žalúdočných kryptosporidií. U niektorých jedincov sa však môže vyskytnúť rada symptomov ako napríklad vodnatý prújem, nechutenstvá, kŕče v oblasti brucha či horečka (Fayer a Xiao 2007). Kryptosporidióza spôsobená *C. bailey* je častejšie spojovaná s ochorením dýchacích sústav. Oproti tomu *C. parvum* a *C. galli* napadajú spíše epitel trávicích sústav, kde môžu spôsobiť nekrózu či hyperpláziu buniek (Dubey a kol. 1990, Pavlásek 1999, 2001). Výzkum, ktorý je zameraný na toto ochorenie, sa z veľkej časti zaoberá nákazou u hospodárskych zvierat alebo u imunitne oslabených pacientov (Tzipori a kol. 1980, Current a kol. 1983).

#### 1.3.1.2.2. Diagnostika kryptosporidií

Diagnostika kryptosporidií je zpravidla založená na analýze vzorku trusu za účelom preukázania prítomnosti oocyst. Taktiež je možné odhaliť nákazu s pomocou histologického vyšetrenia tkaniny alebo imunologickým preukázaním protilátok u hostiteľa. K detekcii oocyst z trusu je možné využiť rôzne metódy, ktoré sa od seba líšia citlivosťou a tiež časovou a finančnou náročnosťou (Khurana a Chaudhary 2018). Medzi tradičnými a dosiaľ bežne používanými diagnostickými metódami patrí mikroskopické vyšetrenie nativného, popri tom barveného vzorku (O'Donoghue 1995, Pacheco a kol. 2013). Tuto techniku je vhodné zkombinovať s koncentračnými metódami (napr. Sheatherova flotácia viz kapitola 3.2.1.). Spoľahlivejšia a citlivejšia voľba je použitie molekulárných metód, ktoré navyše umožňujú druhovú identifikáciu parazita. Díky svojej rýchlosti, presnosti a relatívnej cenovej dostupnosti sa dnes volí predovšetkým polymerázová reťazová reakcia (PCR) (Checkley a kol. 2015). Medzi najčastejšie ciele genové oblasti patrí zejména SSU rRNA či Hsp 70 (Xiao a kol. 1999, Sulaiman a kol. 2000).

### 1.3.1.2.3. Výskyt kryptosporidií u ptáků

Do dnešní doby bylo popsáno 6 ptačích druhů rodu *Cryptosporidium* (Tab. 3) a více než 18 různých genotypů (Tab. 4) (Holubová a kol. 2020). Prvním popsáným druhem u ptačího hostitele bylo *C. meleagridis* (Slavin, 1955). U komerčně chovaných kuřat byl později objeven a popsán další druh *C. baileyi* (Current a kol., 1986). Častým ptačím druhem je také *C. galli* (Pavlásek, 1999), které napadá široké spektrum hostitelských druhů (Ryan a kol. 2003a). U ptáků byly také objeveny další dva druhy *C. anserinum* a *C. tyzzeri*, jejich popis však není dostatečný, proto aby získaly právoplatné druhové zařazení (Levine 1961, Proctor a Kemp 1974, Dubey a kol. 1990). Holubová a kol. 2016 popsali další primárně ptačí druh *C. avium* (dříve *Cryptosporidium* avian genotype V). Nejnovějšími popsánými druhy *Cryptosporidium* je *C. proventriculi* (Holubová a kol., 2019), které bylo popsáno u papoušků, a *C. ornithophilus* (Holubová a kol., 2020) původem z pštrosího hostitele.

### 1.3.1.2.4. Výskyt kryptosporidií v Arktidě

Výskyt kryptosporidií v Arktidě popisuje řada studií. Nálezy jsou zajímavé především z toho důvodu, že kryptosporidie nepatří mezi termorezistentní organismy a životaschopnost jejich oocyst klesá se snižující se teplotou (Sherwood a kol. 1982). U savčích hostitelů bylo *Cryptosporidium* pozorováno například u soba polárního či u tuleně kroužkovaného (Siefker s kol. 2002, Dixon a kol. 2008). Dalším příkladem je propuknutí nákazy kryptosporidiózy u obyvatel v oblasti Nunavik (Thivierge a kol. 2016). Na Svalbardu byl prokázán výskyt kryptosporidií u řady hostitelů, například u soba polárního nebo hraboše východoevropského (Honsová 2012, Myšková a kol. 2019). Honsová ve své práci také prokázala přítomnost kryptosporidií u ptačích hostitelů, a to u husy krátkozobé a bernešky bělolící (Honsová 2012).

**Tab. 3:** Uznávané druhy *Cryptosporidium* u ptačích hostitelů.

<b>Druh</b>	<b>Autor popisu</b>
<i>C. avium</i>	Holubová a kol., 2016
<i>C. baileyi</i>	Current a kol., 1986
<i>C. galli</i>	Pavlásek a kol., 1999
<i>C. meleagridis</i>	Slavin, 1995
<i>C. ornithophilus</i>	Holubová a kol., 2020
<i>C. proventriculi</i>	Holubová a kol., 2019

**Tab. 4:** Známé genotypy *Cryptosporidium* u ptáků a potvrzení hostitelé.

<b>Genotypy</b>	<b>Hostitel</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Reference</b>
avian genotyp I	pěvci	Austrálie	Ng. a kol. 2006
avian genotyp II	papoušci, pštrosi	Evropa, Austrálie	Meireles a kol. 2006, Ng. a kol. 2006
avian genotyp III	papoušci, pštrosi	Austrálie	Ng. a kol. 2006
avian genotyp IV	pěvci	Austrálie	Ng. a kol. 2006
avian genotyp VI	pěvci	Severní Amerika	Chelladurai a kol. 2016
avian genotyp VII	hrabaví	Evropa	Helmy a kol. 2017
avian genotyp VIII	hrabaví	Evropa	Helmy a kol. 2017
avian genotyp IX	hrabaví	Evropa	Helmy a kol. 2017
duck genotyp	vrubozobí	Austrálie	Morgan a kol. 2001
finch genotyp I	pěvci	Austrálie	Morgan a kol. 2001
finch genotyp II	pěvci	Austrálie	Morgan a kol. 2001
finch genotyp III	pěvci	Austrálie	Morgan a kol. 2001
goose genotyp I	vrubozobí	Severní Amerika	Xiao a kol. 2002
goose genotyp II	vrubozobí	Severní Amerika	Jellison a kol. 2004, Zhou a kol, 2004
goose genotyp III	vrubozobí	Severní Amerika	Jellison a kol. 2004
goose genotyp IV	vrubozobí	Severní Amerika	Jellison a kol. 2004
Euroasian wood-cock genotyp	dlohokřídlí	Evropa	Ryan a kol. 2003b
LC310796	sovy	Japonsko	Makino a kol. 2018

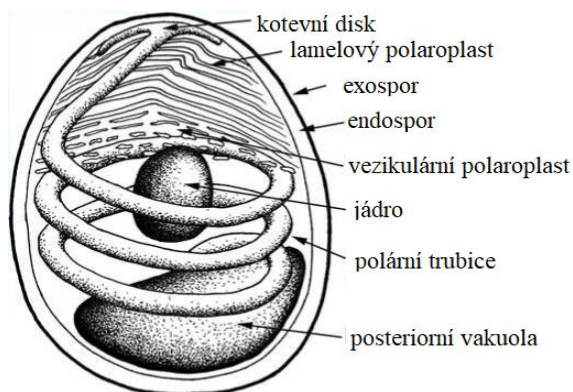
### 1.3.2. Kmen mikrosporidie

#### 1.3.2.1. Biologie mikrosporidií

Mikrosporidie patří mezi jednobuněčné intracelulární parazity s unikátní strukturou, biologií a dosud plně neobjasněnou taxonomií (Didier a kol. 2004, Vávra a Lukeš 2013). Původně byla tato monofyletická skupina řazena k parazitickým prvokům (Vossbrinck a kol. 1987). Za podpory molekulárně-fylogenetických studií dnes však převažuje názor, že mikrosporidie patří do skupiny Opisthosporidia, která je součástí Opisthokonta (Adl a kol. 2019). Mikrosporidie byly objeveny před více než 150 lety, kdy byl u bource morušového popsán první druh *Nosema bombycis* (Nägeli, 1857). Výskyt mikrosporidií je zaznamenán takřka u všech živočišných řádů a dnes je známo více než 187 rodů a 1500 druhů. Tento počet je ale pravděpodobně pouze zlomkem celkové diverzity a většina druhů stále čeká na své objevení. Mikrosporidie patří pod tzv. pravé eukaryotické organismy, avšak v porovnání

s ostatními zástupci mnohobuněčných mají velmi zjednodušenou buněčnou stavbu umožňující jim život uvnitř hostitelské buňky (Keeling a kol. 2002, Volf a kol. 2007, Vávra a Lukeš 2013). Další unikátní vlastností mikrosporidií je menší typ ribozomů, konkrétně 70S a také jeden z nejmenších známých genomů v říši eukaryot (Biddere a kol. 1994, Garcia 2002).

Životní cykly jednotlivých druhů mohou být značně různorodé. Obecně platí, že se skládají z proliferační fáze (merogonie), sporogonické fáze (sporogonie) a dále infekčního stádia. Při merogonii dochází k nepohlavnímu dělení nepohyblivých stádií tzv. merontů, kteří se nachází v hostitelské buňce. Merogonie může být několikrát zopakovaná a nedochází při ní k výraznému poškození hostitelské buňky (Fantham a Porter 1912, Vávra a Lukeš 2013). Po merogonii následuje fáze sporogonie za vzniku sporontu a následného dělení ve sporoblast, který dále prochází morfogenezí za vzniku spóry. Toto odolné stádium umožňuje přenos do nového hostitele, popřípadě autoinfekci již stávajícího (Weiss a Becnel 2014). Exospóra obvykle dosahuje velikosti v rozmezí 1-12  $\mu\text{m}$  a je chráněna stěnou obsahující chitin (Franzen a Müller 1999). Na první pohled je nejvýraznější strukturou uvnitř spóry vystřelovací aparát, který se skládá ze 3 částí – pólového vlákna, polaroplastu a zadní vakuoly, a jedná se o klíčovou adaptaci mikrosporidií k invaginaci hostitelské buňky. Vnitřek spóry dále obsahuje cytoplazmu s jádrem neboli sporoplasmu (Obr. 3), která je za vhodných podmínek vytlačena do cytoplazmy hostitelské buňky (Lom a Vávra 1963, Volf a kol. 2007, Vávra a Lukeš 2013).



**Obr. 3:** Schéma exospóry mikrosporidie (upraveno podle Keeling a Fast 2002).

Mikrosporidie mohou u hostitele vyvolat nemoc zvanou mikrosporidíóza, jejíž průběh se může lišit v závislosti na celkovém zdravotním stavu hostitele a také na lokalizaci infekce. Mikrosporidie jsou velmi často původci tzv. oportunistického onemocnění, při kterém hraje zásadní roli imunokompetence hostitele. U zdravých jedinců má infekce často mírný průběh

nebo je dokonce bezpříznaková (Didier a kol. 2004, Didier a Weiss 2006). Na druhou stranu u jedinců s oslabenou imunitou může dojít k rozvoji různorodých symptomů (Weiss a Wittner 1999, Didier a kol. 2000). Negativní vliv mikrosporidií na ptačí hostitele je obvykle pozorovatelný u stresovaných či jinak oslabených jedinců. Mikrosporidíóza se proto často projevuje u zvířat chovaných v nevhodných podmínkách či u nedospělých jedinců. Hlavní lokalizací infekce pak obvykle bývá trávicí soustava, dále pak tkáň ledvin či jater. Projevy onemocnění bývají nespecifické a zpravidla se odvíjí od druhu napadené tkáně (Black a kol. 1997, Snowden 2004, Bart a kol. 2008).

### **1.3.2.2. Diagnostika mikrosporidií**

Ultrastruktura druhově specifických exospór a typ buněčné organizace tradičně sloužily k rozlišení jednotlivých druhů mikrosporidií, a to za využití světelné či elektronové mikroskopie. Pro diagnostiku exospór je dále možné zvolit z několika barvicích metod, jako je např. barvení modifikovaným trichromem či řadou fluorescenčních barviv (Weber a kol. 1992, Garcia 2002, Ghosh a Weiss 2009). Metody založené na mikroskopování jsou však časově i finančně náročné a ani ultrastrukturní znaky nejsou dostatečné pro správné zařazení do druhu. Z toho důvodu se dnes volí spíše molekulární metody, které jsou přesnější, citlivější a snazší na interpretaci (Procop 2007). Často používanou metodou je PCR, při které se amplifikuje cílová oblast DNA parazita, konkrétně rRNA geny malé a velké (LSU) ribozomální podjednotky, popřípadě oblast intergenického spaceru (ITS) (Franzen a Müller 1999).

### **1.3.2.3. Výskyt mikrosporidií u ptáků**

První potvrzená nákaza mikrosporidiemi u ptačího hostitele byla popsána u papouška škraboškového (Kemp a Kluge 1975). Výskyt mikrosporidií byl později potvrzen nejen u avifauny žijící v zajetí, ale také u široké škály volně žijících ptáků (např. Lobo a kol. 2006). U ptačích hostitelů byly doposud popsány 4 druhy mikrosporidií – *Enterocytozoon bieneusi* (Reetz a kol., 2002), *Encephalitozoon hellem* (Black a kol., 1997), *Encephalitozoon cuniculi* (Reetz, 1993) a *Encephalitozoon intestinalis* (Haro a kol. 2005) (Tab. 5). U ptáků je nejčastěji pozorováno *E. hellem* (např. Barton a kol. 2003, Slodkiewicz-Kowalska a kol. 2006). Pozorovaná prevalence zbylých druhů mikrosporidií je ve světové avifauně znatelně nižší a ptáci zde pravděpodobně slouží jako rezervoáry mikrosporidií, nikoliv jako primární hostitelé (Kašičková a kol. 2007, 2009, Zhao a kol. 2016).

**Tab. 5:** Příklady ptačích hostitelů mikrosporidií.

<b>Druh</b>	<b>Hostitel</b>	<b>Lokalita</b>	<b>Reference</b>
<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	hrabaví	Evropa	Reetz a kol., 1993
	měkkozobí	Evropa, Blízký východ	Bart a kol., 2008, Pirestani a kol. 2013
	papoušci	Evropa	Kašičková a kol. 2007
<i>Encephalitozoon hellem</i>	dlohokřídli	S. Amerika	Tocidlowski a kol. 1997
	měkkozobí	Evropa	Bart a kol. 2008, Haro a kol. 2005
	papoušci	S. Amerika, J. Amerika	Black a kol., 1997, Barton a kol. 2003, Lallo a kol. 2012
	pštrosi	S. Amerika	Snowden a Logan 1999
	svišťouni	S. Amerika	Snowden a kol. 2001
	vrubozobí	Evropa	Slodkiewicz-Kowalska a kol. 2006
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	měkkozobí	Evropa, J. Amerika	Bart a kol. 2008, Haro a kol. 2005, Lallo a kol. 2012
	vrubozobí	Evropa	Slodkiewicz-Kowalska a kol. 2006
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	hrabaví	Čína	Li a kol. 2014
	měkkozobí	Evropa, S. Amerika, J. Amerika,	Graczyk a kol. 2007, Haro a kol. 2005, Lallo a kol. 2012
	papoušci	Evropa, J. Amerika	Kašičková a kol. 2009, Lallo a kol. 2012, Lobo a kol. 2006
	pěvci	Evropa	Lobo a kol. 2006
	sokolovití	Blízký východ	Müller a kol. 2008

#### 1.3.2.4. Výskyt mikrosporidií v Arktidě

Ač mikrosporidie patří mezi široce rozšířené parazity, poznatky o jejich výskytu v Arktidě jsou stále značně omezené. Příkladem je rozšíření *E. cuniculi* v kožešinových chovech polárních lišek ve Skandinávii (Nordstoga 1972, Mathis a kol. 1996). *Encephalitozoon cuniculi* byl také prvně objeven na Svalbardu u ledního medvěda (Myšková a kol. 2019). Honsová (2012) ve své práci diagnostikovala *E. cuniculi* genotyp II u soba polárního, lišky polární a bernešky bělolící s výskytem na Svalbardu (Honsová 2012). Další rod *Enterocytozoon bieneusi* byl prokázán u polární lišky, psa domácího a soba polárního, z ptačích hostitelů se pak jednalo o husu krátkozobou a racka tříprstého (Honsová 2012, Brož 2016, Myšková 2014).



## **2. Cíle práce**

1. Zpracovat literární rešerši o tématu.
2. Koprologicky vyšetřit reprezentativní vzorek trusu vybraných druhů ptáků hnízdících na Svalbardu, zaměřit se zejména na kokcidie, kryptosporidie a mikrosporidie.
3. U vybraných parazitů provést fylogenetickou analýzu a pokusit se nalézt souvislosti s hostitelskou specifitou, případně s geografickou polohou zimovišť.

### 3. Metodika

#### 3.1. Sběr materiálu

##### Lokalita

Vzorky byly sbírány na území Svalbardu v průběhu letní sezóny v roce 2018. Vzorky z roku 2015 a 2016 jsou darovaným materiálem již vyizolované DNA z ptačího trusu. Ptačí trus, pocházející z letní sezóny 2019, byl nasbíráán a dovezen kolegy. Původně měly být v práci zahrnuty také vzorky z letní sezóny v roce 2020 včetně reprezentativního vzorku trusu sněhulí severních od norských spolupracovníků. Vzhledem k probíhajícím epidemiologickým opatřením však tento sběr nebyl proveden. Přehled nasbíraného materiálu je znázorněn v tabulce (Tab. 6). Převážná část vzorků pochází z okolí města Longyearbyen, které se nachází v centrální části ostrova Špicberky. Několik vzorků pochází ze zátoky Petuniabukta a jeden vzorek je původem z lokality Sørbreen. Na obrázku níže je zobrazeno rozmístění lokalit na mapě souostroví (Obr. 4).



**Obr. 4:** Přehled lokalit sběru vzorků (1. Longyerbyen, 2. Petuniabukta, 3. Sørbreen). Průměr koleček odráží množství získaných vzorků (upraveno podle Norsk polarinstitut 2020: 15).

## Určení hostitele

Vzorek ptačího trusu byl sbírán pouze pokud byl známý jeho původce. Ptáci byli na základě morfologických znaků určováni do druhu přímo v terénu s použitím ornitologického klíče (Svensson 1999). Při identifikaci je potřeba sledovat nejen fenotypové znaky, ale také pozorovat ekologické a etologické aspekty a dále využít znalosti o výskytu konkrétního druhu na dané lokalitě. Pro stanovení druhů byly také využity rady zkušených kolegů ornitologů.

**Tab. 6:** Přehled nasbíraných vzorků ptačího trusu.

Druh hostitele	Počet vzorků		
	r. 2015-2016	r. 2018	r. 2019
<i>Anser brachyrhynchus</i>	–	7	–
<i>Branta leucopsis</i>	–	21	2
<i>Calidris maritima</i>	–	17	–
<i>Cephus grylle</i>	–	–	1
<i>Fratercula arctica</i>	–	1	–
<i>Charadrius hiaticula</i>	–	3	–
<i>Lagopus muta hyperborea</i>	–	1	–
<i>Larus hyperboreus</i>	–	4	–
<i>Phalaropus fulicarius</i>	–	2	–
<i>Plectrophenax nivalis</i>	2*	8	–
<i>Rissa tridactyla</i>	–	9	–
<i>Somateria mollissima</i>	–	12	1
<i>Stercorarius parasiticus</i>	–	1	–
<i>Sterna paradisaea</i>	–	46	6

Vysvětlivky: „\*“ = vzorky již vyizolované DNA.

## Odběr a skladování vzorků

Nalezený vzorek trusu byl přenesen pomocí očištěné pinzety nebo vatové tyčinky do zip-lock sáčku nebo do mikrozkuhavky. Takto uskladněný vzorek byl vždy označen datem, lokalitou nálezů a ptačím druhem. Vzorek byl skladován buď v nativním stavu nebo v 4% roztoku dichromanu draselného ( $K_2Cr_2O_7$ ). Hlavní role dichromanu draselného, jako konzervačního činidla, spočívá v jeho schopnosti vytvořit vhodné prostředí pro případnou sporulaci oocyst kokcií. Materiál byl poté skladován v lednici při teplotě 4 °C do dalšího vyšetření.

### 3.2. Mikroskopické vyšetření

V případě, že se podařilo odebrat větší množství trusu, byla část vzorků vyšetřena mikroskopicky. Vzorky, kterých bylo malé množství, byly vyšetřeny pouze molekulárně.

#### 3.2.1. Flotace dle Sheathera

Flotace dle Sheathera je tradičně užívaná koncentrační metoda v parazitologické diagnostice střevních parazitů. Metoda umožňuje detekovat parazity na základě přítomnosti vajíček helmintů a cyst prvoků ve vzorku trusu s pomocí roztoku o dané koncentraci (Dryden 2005, Mergani 2014).

#### Použité chemikálie:

#### **Sheatherův cukerný roztok** (hustota = 1,3 g/ml)

259 ml ... deionizovaná voda

329 g ... cukr

7,29 g ... fenol

#### Postup:

Vzorek trusu byl rozmíchán a řádně zhomogenizován ve vodě. Takto vzniklá směs byla přelita přes sítko a centrifugována po dobu 15 min při 2500 rpm. Vzniklý supernatant byl slit a zbylý sediment byl rozmíchán v Sheatherovu cukerném roztoku. Směs byla opět centrifugována za stejných podmínek. Pomocí mikrobiologické kličky byla šetrně odebrána vzniklá povrchová blanka. Vzorek byl přenesen na podložní sklo, přikryt krycím sklíčkem a sledován při zvětšení 10× až 100× světelným mikroskopem (Olympus BX 51). V případě hledání oocyst kryptosporidií byl použit fázový kontrast. U pozitivních vzorků byla stanovena míra infekce pomocí tzv. semikvantitativní metody, tj. na základě počtu oocyst v zorném poli při zvětšení 20x (Thienpont a kol. 1979) (Tab. 7).

**Tab. 7.** Semikvantitativní metoda pro stanovení infekce (dle Thienpont a kol. 1979).

1-5 oocyst	+	Slabá infekce
6-10 oocyst	++	Středně silná infekce
11-50 oocyst	+++	Silná infekce
více než 50 oocyst	++++	Velmi silná infekce

### **3.2.2. Barvení dle Miláčka a Vítovce**

Metoda je vhodná pro mikroskopickou diagnostiku oocyst kryptosporidií specifickým obarvením nátěru trusu (Miláček a Vítovec 1985).

#### Použité chemikálie:

#### **Roztok metylviolet'**

- 0,6 g ... metylviolet'
- 1 ml ... anilin
- 1 g ... fenol
- 30 ml ... ethanol (EtOH)
- 70 ml ... deionizovaná voda

#### **2% vodný roztok kyseliny sírové**

**Roztok tartrazin:** 1% tartrazin v 1% kyselině octové

#### Postup:

Na podložní sklo byl nanesen tenký nátěr zkoumaného vzorku trusu. Nátěr byl zafixován pomocí ethanolu v plameni. Po fixaci byl nátěr vložen do kyvety s roztokem metylvioleti a takto byl po dobu 30 min barven. Po uplynutí potřebné doby byl obarvený vzorek opláchnut pod tekoucí vodou. Po opláchnutí bylo sklíčko přeneseno do nové kyvety obsahující 2% kyselinu sírovou, zde bylo ponecháno 2 min, a poté opět opláchnuto vodou. Následně byl použit tartrazin na dobarvení nátěru opět po dobu 2 min. Ve finálním kroku bylo sklíčko s nátěrem naposledy opláchnuto vodou. Po oschnutí preparátu bylo možné sklíčka sledovat světelným mikroskopem (Olympus BX 51) při zvětšení od 40× až po 100× za použití imerzního oleje.

### **3.3. Molekulární metody**

#### **3.3.1. Příprava před izolací**

Vzorek byl nejprve zhomogenizován a vzniklá směs byla přefiltrována do čisté nádoby. Část vzniklého sedimentu byla přenesena do čisté mikrokumavky a zde byla poté několikrát pročištěna vodou s pomocí centrifugy (Eppendorf MiniSpin®). Čištění probíhalo do té doby, než byl vzniklý supernatant bezbarvý. Pečlivé pročištění bylo klíčové především u vzorků, které byly skladovány v dichromanu draselném, který působí jako inhibitor PCR.

### **3.3.2. Izolace DNA**

#### **3.3.2.1. Izolace komerčním kitem**

K izolaci genomové DNA byl použit komerčně dodávaný izolační kit Exgene™ Stool DNA mini (GeneAll, Seoul, Korea). V případě izolace kokcií byl také použit QIAamp DNA Stool Mini Kit z důvodu lepšího zachytu (Qiagen, Hilden, Německo).

Do zkumavky se vzorkem byly nejprve přidány skleněné kuličky o velikosti 0,5 mm (BioSpec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA), zirkonové kuličky (Invitek) a 1 ml bufferu PBS. Připravený obsah zkumavky byl poté rozbíjen pomocí bead-beateru (Precellys 24, Bertin technologies) po dobu 2 min. Další postup se shodoval s návodem od výrobce daného izolačního kitu. Takto získaná DNA byla poté skladována při teplotě -20 °C do dalšího použití.

#### **3.3.2.2. Fenol-chloroformová izolace**

##### Použité chemikálie:

400 µl ... TNES pufr

44 µl ... Proteináza K

400 µl ... Fenol

92% ethanol, 70% ethanol

##### Postup:

Nejprve bylo třeba vzorek trusu zhomogenizovat s pomocí skleněných a zirkonových kuliček v bead-beateru. Do vzorku bylo poté přidáno 400 µl TNES buffer a 44 µl Proteinázy K (GeneAll, Seoul, Korea). Takto připravený vzorek byl ponechán přes noc při teplotě 45°C.

Po inkubaci bylo do zkumavky se vzorkem přidáno 400 µl fenolu a vzorek byl po dobu pěti min promícháván. Po promíchání byl vzorek deset min centrifugován za teploty 21 °C při 8969 rpm. Vytvořená horní vrstva obsahu zkumavky byla přenesena do nové zkumavky a k ní bylo přidáno stejné množství chloroformu. Vzorek byl opět 5 min míchán a centrifugován za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Horní vrstva byla opět přenesena do nové zkumavky a k obsahu bylo přidáno 3 x větší množství 92% ethanolu. Takto vzniklý vzorek byl centrifugován v předem vychlazené centrifuze (4 °C, 4 min, 11 180 rpm). Vzniklý supernatant byl po stočení vylit a k sedimentu bylo přidáno stejné množství 70% ethanolu jako v předchozím kroku. Vzorek byl centrifugován jako za předchozích podmínek (4 °C, 4 min, 11180 rpm). Supernatant byl opět odstraněn a vyizolovaná DNA obsažená v sedimentu byla po usušení zalita 30-40 µl deionizované vody. Takto byla dále uchována při teplotě -20 °C.

### 3.3.3. PCR

#### Postup:

Amplifikovaný gen se lišil podle toho, jaký konkrétní druh parazita byl v daném vzorku vyšetřován. V případě kokcií bylo PCR provedeno k detekci genu pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA) (Morrison a kol. 2004) a genu pro mitochondriální cytochrom oxidázu I (COI) (Ogedengbe a kol. 2011) a III (COX3) (Ogedengbe a kol. 2014). U kryptosporidií byl taktéž použit gen pro SSU rRNA (Xiao a kol. 1999). V případě mikrosporidií byl sledován výskyt dvou druhů – *Enterocytozoon bieneusi* (Buckholt a kol. 2002) a *Encephalitozoon* sp. (Didier a kol. 1995). Pro oba druhy mikrosporidií byl použit protokol pro amplifikaci ITS.

Reakční směs pro jeden vzorek byla vytvořena dle Tab. 8. Pro část vzorků kokcií byla také vytvořena odlišná reakční směs dle Tab. 9. Pro každou reakci byla také použita pozitivní a negativní kontrola. Pozitivní kontrolou v případě vyšetření mikrosporidií a kryptosporidií byla DNA původem z kultury a u kokcií byl použit ověřený pozitivní vzorek.

Samotná reakce PCR byla provedena s pomocí termocycleru (BIO-RAD T100). Program pro amplifikaci (Tab. 10) kokcií, kryptosporidií i mikrosporidií byl následující: nejprve byla provedena denaturace při 94 °C po dobu 3 min. Poté následovaly cykly denaturace-annealing-extenze. Denaturace probíhala za teploty 94 °C po dobu 45 sek a byla následovaná druhově specifickým nasedáním primerů (annealing) při teplotách znázorněných v tabulce níže (Tab. 11) po dobu 45 sek, nakonec došlo k syntéze nového řetězce po dobu 1 min při 72 °C. Po proběhnutí 35 cyklů nastala fáze finální extenze, tedy dosyntetizování nového řetězce při 72 °C po 1 min.

V případě kryptosporidií a mikrosporidií byla použita dvoukroková metoda tzv. nested PCR (Carr a kol. 2010) s pomocí sekundárních primerů (Tab. 11).

Z důvodu velmi nízkého výskytu pozitivních nálezů byla část vzorků vyšetřena na přítomnost inhibitorů PCR. Kontrola byla provedena přidáním pozitivní kontroly do vybraných vzorků vyizolované DNA, u kterých byla poté provedena PCR a elektroforéza podle běžného postupu.

**Tab. 8:** Protokol na přípravu reakční směsi na PCR (s použitím komerčního MasterMixu).

Reagencie	Objem do 25 $\mu$ l
Plain PP Master Mix*	12,5 $\mu$ l
5' primer (50 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
3' primer (50 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
templátová DNA	1 $\mu$ l
PCR H <sub>2</sub> O	9,5 $\mu$ l

Vysvětlivky: „\*“ = Plain PP Master Mix/ Combi PP Master Mix.

**Tab. 9:** Protokol na přípravu reakční směsi na PCR.

Reagencie	Objem na 25 $\mu$ l
10x reakční pufr s 15 mM MgCl <sub>2</sub>	2,5 $\mu$ l
dNTP	0,5 $\mu$ l
5' primer (50 $\mu$ M)	0,25 $\mu$ l
3' primer (50 $\mu$ M)	0,25 $\mu$ l
Taq DNA polymeráza*	1,25 $\mu$ l
DNA	0,5 $\mu$ l
PCR H <sub>2</sub> O	19,75 $\mu$ l

Vysvětlivky: „\*“ = Taq Combi/ Taq-purple polymeráza.

**Tab. 10:** Protokol na PCR.

Teplota (°C)	Čas (s)
94	180
94*	45
X*	45
72*	60
72	420
10	$\infty$

Vysvětlivky: „x“ = specifická nasedací teplota z Tab.10; „\*“ = opakování cyklů 35x.



**Tab. 11:** Primery použité při amplifikaci konkrétních genů.

<b>Cílený parazit (gen)</b>	<b>Primer</b>	<b>Sekvence (5'→3')</b>	<b>Nasedací teplota</b>
<i>Cryptosporidium</i> sp. (SSU rRNA)	F1*	TTCTAGAGCTAATACATGCG	55 °C
	R1*	CCCATTTTCCTTCGAAACAGGA	
	F2**	GGAAGGGTTGTATTTATTAGATAAA G	55 °C
	R2**	CTCATAAGGTGCTGAAGGAGTA	
Kokcidie (COI)	COIF	GGTTCAGGTGTTGGTTGGA	52 °C
	COIR	ATCCAATAACCGCACCAAGAG	
Kokcidie (COI3)	COX3F	AGAAAACCTAAAATCATCATGT	48 °C
	COX3 R	AAGTGAGTTCGCATGTTTAC	
Kokcidie (SSU rRNA)	EimF	GAAACTGCGAATGGCTCATT	53 °C
	EimR	CTTGCGCCTACTAGGCATTC	
<i>Encephalitozoon</i> sp. (ITS)	INT580 F*	TTTCACTCGCCGCTACTCAG	55 °C
	INT580 R*	TGCAGTTAAAATGTCCGTAGT	
	MSP3* *	GGAATTCACACCGCCCGTCVYTAT	55 °C
	MSP4A **	CCAAGCTTATGCTTAAGTYMAARGG GT	
<i>Enterocytozoon bieneusi</i> (ITS)	EBITS 3*	GGTCATAGGGATGAAGAG	57 °C
	EBITS 4*	TTCGAGTTCTTTCGCGCTC	
	EBITS 1**	GCTCTGAATATCTATGGCT	55 °C
	EBITS 2,4**	ATCGCCGACGGATCCAAGTG	

Vysvětlivky: „\*“ = primární primery; „\*\*“ = sekundární primery.

### 3.3.4. Gelová elektroforéza

Produkt PCR reakce byl následně vyhodnocen gelovou elektroforézou, která slouží k separaci fragmentů na základě jejich délky (Lee a kol. 2012).

#### Použité chemikálie:

1% agarózový gel

Ethidium bromid/Yellow loading dye

GoodView Nucleic Acid Stain

#### Postup:

Výtěžek z PCR byl ověřen pomocí gelové elektroforézy. Nejprve byl v Erlenmeyerově baňce smíchán 1% roztok agarového gelu a do této směsi byl přidán GoodView Nucleic Acid Stain (SBS GeneTech). Vzniklá směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění gelu. Gel byl po ztuhnutí přenesen do elektroforetické vany. První jamka vytvořená v gelu obsahovala DNA ladder (Solis BioDyne). Do jednotlivých jamek byly dále přepipetovány 4  $\mu$ l naamplifikované DNA smíchané s Yellow loading dye (TopBio) nebo v některých případech s ethidium bromidem (TopBio). Do posledních jamek byla napipetována negativní a pozitivní kontrola. Gelová elektroforéza probíhala při napětí 100 V. Výsledný produkt byl zobrazen pomocí UV transiluminátoru.

### 3.3.5. Čištění PCR produktu

V případě, že byl vzorek vyhodnocen jako pozitivní, bylo pro další účely potřeba nejprve uvolnit DNA z gelu. Pro extrakci DNA byl použit komerčně dostupný kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Německo) a postup odpovídal návodu od výrobce. Výtěžek DNA byl do následné sekvenace ponechán při teplotě 4 °C.

Část vzorků kokcidií byla také připravena na sekvenaci enzymatickým přečištěním PCR produktů. Při přečištění bylo do vzorku PCR produktu přidáno 0,2  $\mu$ l FastAp a 0,2  $\mu$ l Exo1. Enzymatická reakce následně probíhala v termocycleru. Program zahrnoval 15 min při 37 °C a poté 15 min při teplotě 80 °C. Do vzorků přečištěných jak komerčním kitem, tak enzymaticky bylo poté přidáno požadované množství primerů (COIF, COIR, EimF a EimR). Sangerova sekvenace vzorků byla zprostředkována firmou SEQme s.r.o (Dobříš, Česká republika).

### 3.4. Fylogenetická analýza

Získané sekvence byly nejprve porovnány se známými sekvencemi v GenBank (NCBI GenBank 2019: 16) algoritmem BLAST (NCBI BLAST 2019: 17). Úprava sekvencí pro další použití probíhala v programech Sequence Scanner verze 1.0 (Applied Biosystems 2020: 18) a EditSeq verze 5.05 (DNASTAR Inc. 2020: 19). Forward a reverse části byly spojeny v tzv. consensus v programu SeqMan verze 5.05 (DNASTAR Inc. 2020: 20). V BioEdit verze 7.0.5 (Hall 1999) byl vytvořen dataset ze získaných sekvencí a sekvencí původem z GeneBank. Pomocí algoritmu Clustal W (Thompson a kol. 1994) byly sekvence seřazeny v alignment, který byl podle potřeby upraven a ořezán. Z alignmentu byl vypočítán fylogenetický strom. Pro zjištění fylogenetických vztahů byla provedena Maximum likelihood (ML) analýza programem Phym1 verze 2.4.3 (Guindon a Gascuel 2003), dále pak Bayesovská analýza za použití programu MrBayes (Huelsenbeck and Ronquist 2001). Při ML analýze byl zvolen model GTR +  $\Gamma$  + I a pro výpočet bootstrapových hodnot bylo zvoleno 1000 replikací. Model GTR +  $\Gamma$  + I byl použit také při Bayesovské analýze. Výpočet byl proveden pro 10 miliónů generací s frekvencí sběru 1000. Pro geny SSU rRNA a COI byly také provedeny konkatenované analýzy. Dataset byl vytvořen v programu Seaview verze 4.0.1 (Gouy a kol. 2010). Výsledky analýz byly zobrazeny v programu Treeview verze 1.6.6 (Page 2001) a finální úpravy byly provedeny v programu Inkscape verze 3.0 (Free Software Foundation Inc 2007: 21).

## 4. Výsledky

### 4.1. Mikroskopické vyšetření

#### Flotace dle Sheathera

Flotačně bylo vyšetřeno celkem 71 vzorků od 12 různých hostitelů (Tab. 12). Přítomnost kokcií se podařilo prokázat u 23 vzorků pocházejících od 4 ptačích druhů. Prevalence kokcií převedená na procenta činila 61 % (14/23) u bernešek, 86 % (6/7) u hus, 15 % (2/13) u kajek a 12,5 % (1/8) u sněhule. U jednotlivých preparátů byla také určena intenzita infekce stanovená semikvantitativní metodou (viz kapitola 3.2.1.). Infekce byla u všech pozitivních případů vyhodnocena jako slabá. Přítomnost kryptosporidií nebyla prokázána u žádného z vyšetřovaných vzorků.

**Tab. 12:** Prevalence kokcií vyšetřená flotační metodou.

Hostitel	Vyšetřované vzorky		Prevalence
	Pozitivní nález	Negativní nález	
<i>Anser brachyrhynchus</i>	6	1	86 % (6/7)
<i>Branta leucopsis</i>	14	9	61 % (14/23)
<i>Calidris maritima</i>	0	4	0 %
<i>Cephus grylle</i>	0	1	0 %
<i>Fratercula arctica</i>	0	1	0 %
<i>Lagopus muta hyperborea</i>	0	1	0 %
<i>Phalaropus fulicarius</i>	0	1	0 %
<i>Plectrophenax nivalis</i>	1	7	12,5 % (1/8)
<i>Rissa tridactyla</i>	0	4	0 %
<i>Somateria mollissima</i>	2	11	15 % (2/13)
<i>Stercorarius parasiticus</i>	0	1	0 %
<i>Sterna paradisaea</i>	0	7	0 %

Vysvětlivky: **Prevalence** = počet nakažených jedinců/celkový počet.

I přes snahu vytvořit vhodné podmínky pro sporulaci vzorků, byla převážná část detekovaných oocyst v nevysporulovaném stavu. Z tohoto důvodu byla morfologická analýza značně ztížena a zařazení jednotlivých oocyst do konkrétních druhů bylo u většiny vzorků nemožné. I přesto, že sporulace nebyla u převážné většiny oocyst sledována, bylo možné stanovit výskyt různorodých oocyst na základě viditelných znaků, zejména pak vlastností stěny či přítomností struktur jako například mikropyle či pólové tělísko. Dále byla pozorována velikost a tvar oocysty. Popis strukturně odlišných oocyst je znázorněn v tabulce (Tab. 14).

Na základě pozorovaných znaků bylo také možné určit, zda se jednalo o smíšenou infekci. Smíšená nákaza byla sledována ve třech případech u bernešek bělolících.

Vysporulovaná oocysta byla nalezena pouze u tří vzorků (Tab. 13). U sněhule severní (vzorek S1) byla zaznamenána oocysta se dvěma sporocystami (Obr. 5), která pravděpodobně náleží do druhu *Isoospora plectrophenaxia* (Dolnik a Loonen, 2007). S popsaným druhem má sledovaná oocysta společný tvar, výrazné Stiedovo tělísko a velké kruhové pólové tělísko. U vzorku byl dále pozorován náznak kompaktního reziduálního tělíska sporocysty, což je další popsaný znak u *I. plectrophenaxia*. Shoduje se jak hostitelský druh, u kterého byla oocysta nalezena, tak i lokalita výskytu.

U bernešky bělolící (vzorek B19) byla objevena vysporulovaná oocysta obsahující 4 sférické sporocysty bez Stiedova tělíska (Obr. 6a). Viditelné znaky jako silná stěna oocysty, široké mikropyle a pólová čepička, se neshodují s žádným popsaným druhem *Eimeria* a může se proto jednat o nový morfotyp. U jiného vzorku bernešky (vzorek B2) byla dále spatřena oocysta obsahující 2 oválné sporocysty (Obr. 6b). Pravděpodobně se tak jedná o rod *Isoospora*. Shoda s již popsaným druhem nebyla nalezena ani v tomto případě.

**Tab. 13:** Určené morfotypy na základě dostupných znaků (viz. Tab.14).

Vzorek	Hostitel	Morfotyp	Dokumentace
S1	<i>Plectrophenax nivalis</i>	<i>Isoospora plectrophenaxia</i> (Dolnik a Loonen, 2007)	Obr. 5
B2	<i>Branta leucopsis</i>	<i>Isoospora</i> sp.	Obr. 6a
B19	<i>Branta leucopsis</i>	<i>Eimeria</i> sp.	Obr. 6b

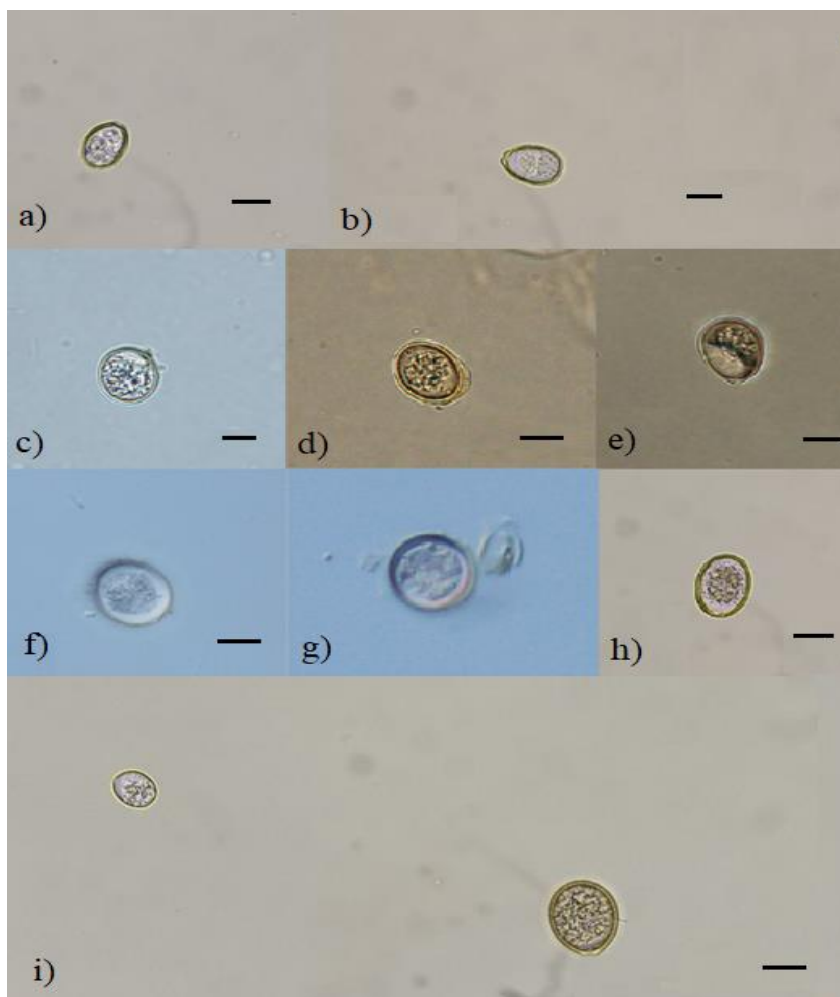
**Tab. 14:** Charakteristika odlišných typů nalezených oocyst kokcií.

Vzorek	Popis			Dokumentace
	Velikost a tvar	Stěna	Sporulace	
H3*	23x20 μm, sférická až oválná	hladká, bezbarvá, bez mikropyle	nevysporulované	Obr. 6c
H7*	22x18 μm, oválná	hladká, silná, žlutá, bez mikropyle	nevysporulované, formující se sférický sporont, patrné pólové tělísko	Obr. 6d
B2**	24x20 μm, oválná	hladká, silná, žlutá, s mikropyle	2 oválné sporocysty, Stiedovo tělísko není zřetelné	Obr. 6b
B6**	29x26 μm, sférická až oválná	bezbarvá, silná, mikropyle s pólovou čepičkou	nevysporulované, formující se sférický sporont	Obr. 6f
	19x13 μm, oválná, zúžený konec při mikropyle	žluto-zelená, mikropyle s čepičkou	nevysporulované, formující se sporont	Obr. 6e
B14**	neměřeno, sférická až oválná	hladká, silná, bez mikropyle	nevysporulované, formující se sférický sporont	Obr. 6g
B19**	24x19 μm, oválná	hladká, silná, žlutá, široké mikropyle s p. čepičkou	4 sférické sporocysty bez Stiedova tělíška	Obr. 6a
B21**	12x11 μm, sférická až oválná	hladká, žlutá, bez mikropyle	nevysporulované	Obr. 6i
	24x17 oválná	hladká, žlutá, prominentní mikropyle bez p. čepičky	nevysporulované	Obr. 6i
S1***	24x23 μm, sférická	hladká, žlutá, bez mikropyle	2 ovoidní sporocysty s reziduáním a výrazným Stiedovo tělískem, přítomnost pólového tělíška	Obr. 5

Vysvětlivky: „\*“ = hostitel - husa krátkozobá; „\*\*“ = hostitel - berneška bělolící; „\*\*\*“ = hostitel - sněhule severní.



**Obr. 5:** Vysporulovaná oocysta z trusu sněhule severní – morfotyp *Isospora plectrophenaxia* (zvětšení 60x; měřítko = 10 $\mu$ m).



**Obr. 6:** Oocysty kokcií nalezené v trusu bernešek bělolících (a, b, e, f, g, h, i) a hus krátkozobých (c, d), detailní popis v Tab. 14 (zvětšení 60-100 $\times$ ; měřítko = 10  $\mu$ m).

U dvou vzorků z bernešek byla dále prokázána přítomnost vajíček helmintů (Tab. 15). Vajíčka byla následně na základě morfologických znaků a známého výskytu u ptačích hostitelů zařazena do řádu Oxyurida z kmene hlístice (Nematoda) (Obr. 7) a (Obr. 8).

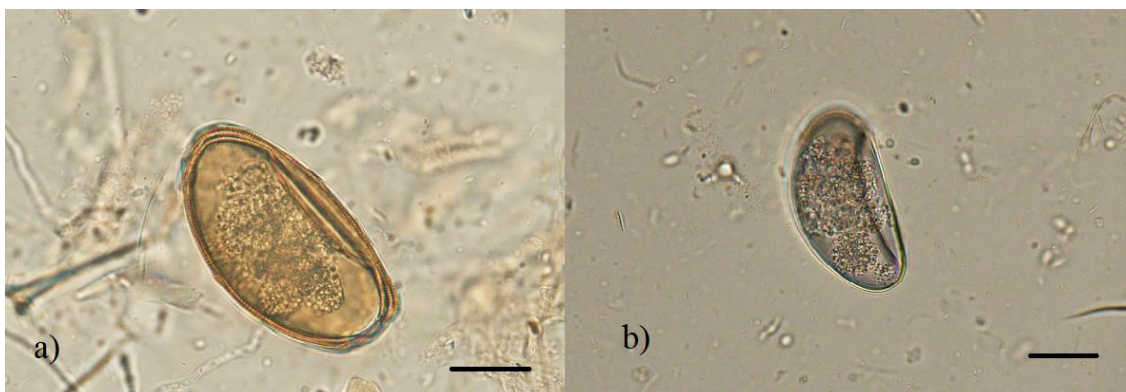
**Tab. 15:** Popis nalezených vajíček hlístů.

Vzorek	Popis			Dokumentace
	Velikost a tvar	Stěna	Rozrýhování	
B8*	92x49 $\mu\text{m}$ , elipsoidní	bezbarvá, tenká, bez pólové zátky	ne	Obr. 7
B16*	89x51 $\mu\text{m}$ , elipsoidní	silná, hnědá, dvouvrstvá, s pruho- váním a širokou pólovou zátkou	ne	Obr. 8a
	83x42 $\mu\text{m}$ , elipsoidní	bezbarvá, tenká, bez pólové zátky	ne	Obr. 8b

Vysvětlivky: „\*“ = hostitel - berneška bělolící.



**Obr. 7:** Mikroskopický nález vajíčka v trusu bernešky bělolící (zvětšení 100 $\times$ ; měřítko = 25  $\mu\text{m}$ ).



**Obr. 8:** Mikroskopický nález vajíčka v trusu bernešky bělolící (zvětšení 100 $\times$ ; měřítko = 25  $\mu\text{m}$ ).



## Barvení dle Miláčka a Vítovce

Pro vyšetření trusu na přítomnost kryptosporidií bylo obarveno celkem 43 vzorků od 3 různých hostitelů (Tab. 16). Po pečlivém mikroskopickém prozkoumání vzorků nebyla prokázána přítomnost oocyst u žádného z nich.

**Tab. 16:** Výsledky z mikroskopického vyšetření na přítomnost oocyst kryptosporidií.

Hostitel	Vyšetřované vzorky	
	Pozitivní nález	Negativní nález
<i>Anser brachyrhynchus</i>	0	7
<i>Branta leucopsis</i>	0	23
<i>Somateria mollissima</i>	0	13

## 4.2. Molekulární vyšetření

Molekulární diagnostiku bylo možné provést celkem u 85 vzorků (Tab. 17). Každý vzorek byl vyšetřen na přítomnost *Cryptosporidium* sp., *Encephalitozoon* sp. a *Enterocytozoon bieneusi*. Ani jeden ze zkoumaných vzorků však nebyl shledán pozitivním (viz Tab. 17). Provedená kontrola inhibitorů PCR u části vzorků byla negativní.

**Tab. 17:** Výsledky molekulárního vyšetření kryptosporidií a mikrosporidií.

Vyšetřování hostitelé	Počet vzorků	Počet pozitivních nálezů
<i>Anser brachyrhynchus</i>	6	0
<i>Branta leucopsis</i>	16	0
<i>Calidris maritima</i>	11	0
<i>Cephus grylle</i>	1	0
<i>Fratercula arctica</i>	1	0
<i>Charadrius hiaticula</i>	2	0
<i>Lagopus muta hyperborea</i>	1	0
<i>Larus hyperboreus</i>	3	0
<i>Phalaropus fulicarius</i>	1	0
<i>Plectrophenax nivalis</i>	5	0
<i>Rissa tridactyla</i>	5	0
<i>Somateria mollissima</i>	9	0
<i>Stercorarius parasiticus</i>	1	0
<i>Sterna paradisaea</i>	23	0

Molekulární analýza na prokázání kokcidií byla zaměřena pouze na vzorky, u kterých byla předem mikroskopicky potvrzená nákaza. Molekulárně bylo analyzováno celkem 16 vzorků, které byly podrobeny opakovanému vyšetření. Zbylé vzorky trusu nebyly vyšetřeny z důvodu kontaminace plísněmi, nebo protože se u nich nepodařilo vyizolovat dostatečně koncentrovaná DNA. Částečné sekvence pro gen kódující SSU se podařilo získat ze 4 vzorků, pocházejících od bernešky bělolící a sněhule severní (Tab.18). V případě genu pro COI byla zajištěna jediná sekvence z trusu sněhule severní.

**Tab. 18:** Získané sekvence kokcidií.

Hostitel	Gen	Získané sekvence	Název vzorků
<i>Branta leucopsis</i>	SSU	2	B6, B14*
<i>Plectrophenax nivalis</i>	COI	1	SD2**
	SSU	2	SD1, SD2**

Vysvětlivky: „\*“ = označení odpovídá vzorkům, u kterých byla mikroskopicky potvrzená nákaza kokcidiemi, „\*\*“ = darované vzorky s vyizolovanou DNA bez mikroskopického vyšetření.

### 4.3. Fylogenetická analýza

Srovnání získaných sekvencí algoritmem BLAST ukázalo, že DNA z trusu bernešek odpovídá rodu *Eimeria*, oproti tomu DNA z trusu sněhulí měla nejvyšší shodu se sekvencemi z rodu *Isospora*.

Pro gen SSU rRNA byl vytvořen dataset o 26 sekvencích o celkové délce 738 bp. Zastoupenými rody byla *Eimeria*, *Isospora* a *Caryospora neofalconis* jako outgroup. Hodnota Log-likelihood ML analýzy činila -3074.30040. Konečná hodnota průměrné směrodatné odchylky frekvencí dělení (ASDSF) byla na konci Bayesovské analýzy 0.002693. Sekvence byly dále rozděleny do klastrů za podpory bootstrapových hodnot (Obr. 9). Schéma fylogramu odpovídá výsledkům ML analýzy, která měla sice nižší hodnoty pravděpodobnosti, ale zato neobsahovala polytomické větvení jako výsledek Bayesovské inference. Sekvence původem z této práce byly rozděleny do rozdílných klastrů. Kokcidie ze 2 rozdílných vzorků sněhule severní jsou řazeny do monofyletické skupiny obsahující různé druhy *Isospora* původem z pěvců. Nalezené sekvence se dále dělí do dvou rozdílných linií. Kokcidie nalezené u bernešek bělolících tvoří samostatnou linii nepodobnou známým ptačím druhům a za velmi vysoké podpory náleží k sobě.

Dataset pro gen COI obsahoval 24 sekvencí a jeho délka byla 489 bp. Pro zakořenění stromu byla zvolena *Caryospora* sp. Výsledný Log-likelihood analýzy činil -3120.72932 a ASDSF byla 0.002907. Fylogram znázorňující rozdělení sekvencí je zobrazen níže (Obr. 10). Schéma bylo opět vytvořeno na základě výsledků z ML analýzy. Ze vzorku sněhule severní se dále podařilo získat sekvenci pro gen COI. Nalezený genotyp je za vysoké podpory klastrován s druhem *Isospora* sp., který byl dříve pozorován u sněhule severní hnízdící na Svalbardu (Trefancová a kol. 2019).

Pro konkatenované analýzy bylo použito 41 sekvencí genu SSU rRNA a COI a délka datasetu činila 1227 bp. Pro zakořenění stromu byla vybrána *Caryospora* sp. Konečná hodnota pro Log-likelihood činila -5490.57216 a pro ASDSF byla 0.004510. Vzhledem k tomu, že dostupných sekvencí pro oba geny bylo pouze sedm, podpory větvení jsou velmi slabé a z výsledků proto není příliš vhodné vyvozovat nepodložené hypotézy (Obr. 11).

**Tab. 19:** Seznam referenčních sekvencí genu SSU rRNA z databáze GenBank pro fylogenetické analýzy.

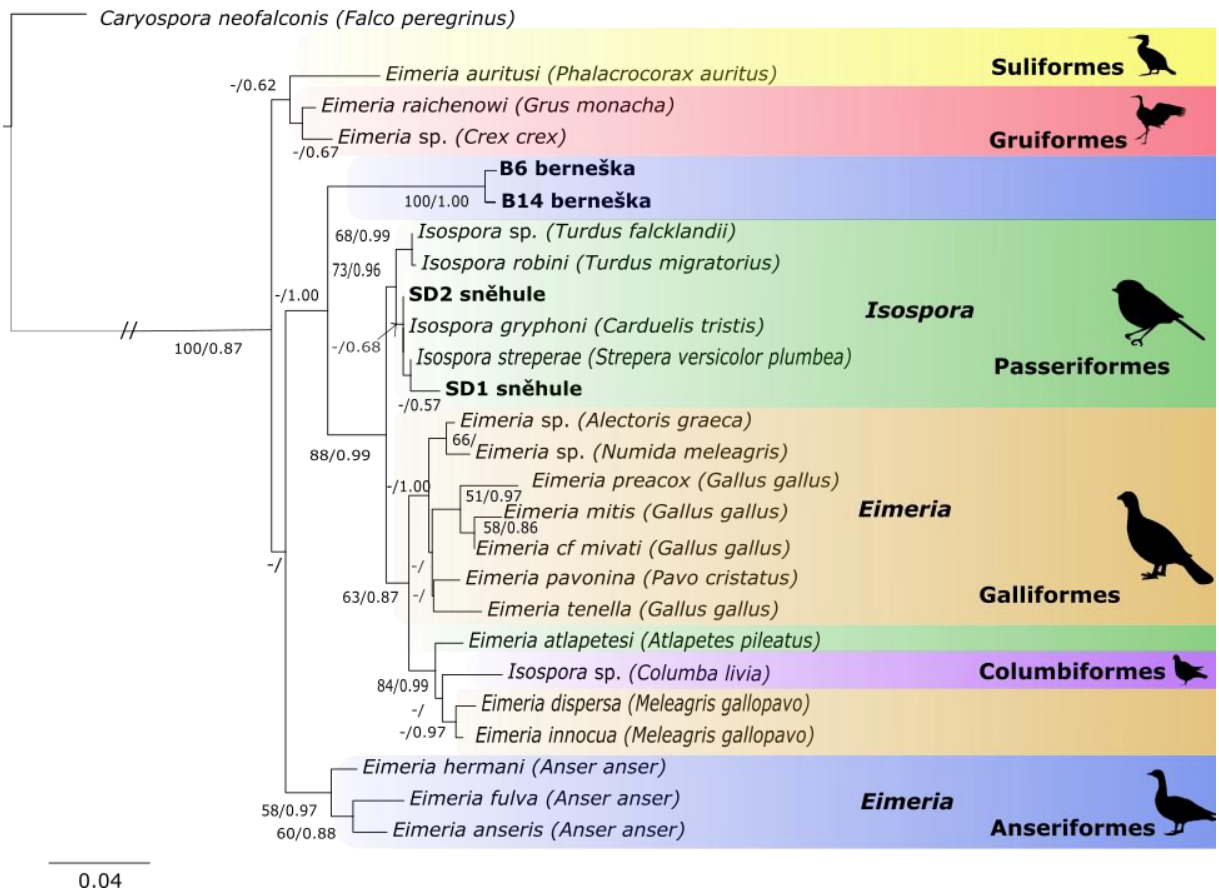
<b>Kokcidie</b>	<b>Hostitel</b>	<b>Přístupový kód sekvence v databázi GenBank</b>
<i>Eimeria</i> sp.	<i>Alectoris graeca</i> (orebice horská)	HM070378
<i>Eimeria auritusi</i>	<i>Phalacrocorax auritus</i> (kormorán ušatý)	DQ398107
<i>Eimeria raichenowi</i>	<i>Grus monacha</i> (jeřáb kápový)	AB205179
<i>Eimeria</i> sp.	<i>Crex crex</i> (chřástal polní)	HE653906
<i>Eimeria anseris</i>	<i>Anser anser</i> (husa velká)	KJ000077
<i>Eimeria cf mivati</i>	<i>Gallus gallus</i> (kur bankivský)	FJ236378
<i>Eimeria dispersa</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocán divoký)	HG793041
<i>Eimeria fulva</i>	<i>Anser anser</i> (husa velká)	KP789172
<i>Eimeria hermani</i>	<i>Anser anser</i> (husa velká)	KJ000078
<i>Eimeria innocua</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocán divoký)	HG793045
<i>Eimeria mitis</i>	<i>Gallus gallus</i> (kur bankivský)	FJ236379
<i>Eimeria</i> sp.	<i>Numida meleagris</i> (perlička kropenatá)	KJ547707
<i>Eimeria pavonina</i>	<i>Pavo cristatus</i> (páv korunkatý)	JN596589
<i>Eimeria praecox</i>	<i>Gallus gallus</i> (kur bankivský)	FJ236362
<i>Eimeria tenella</i>	<i>Gallus gallus</i> (kur bankivský)	JX093898
<i>Isoospora streperae</i>	<i>Strepera versicolor plumbea</i> (flétňák bělořítý)	KJ634021
<i>Isoospora</i> sp.	<i>Columba livia domestica</i> (holub domácí)	AB757864
<i>Isoospora</i> sp.	<i>Turdus falcklandii</i> (drozd falklandský)	JX984669
<i>Isoospora gryphoni</i>	<i>Carduelis tristis</i> (čížek žlutý)	AF080613
<i>Isoospora robini</i>	<i>Turdus migratorius</i> (drozd stěhovavý)	AF080612
<i>Eimeria atlapetesi</i>	<i>Atlapetes pileatus</i> (strnádek čepičatý)	KY195976
<i>Caryospora neofalconis</i> *	<i>Sokol stěhovavý</i> (sokol stěhovavý)	KT037081

Vysvětlivky: „\*“ = outgroup.

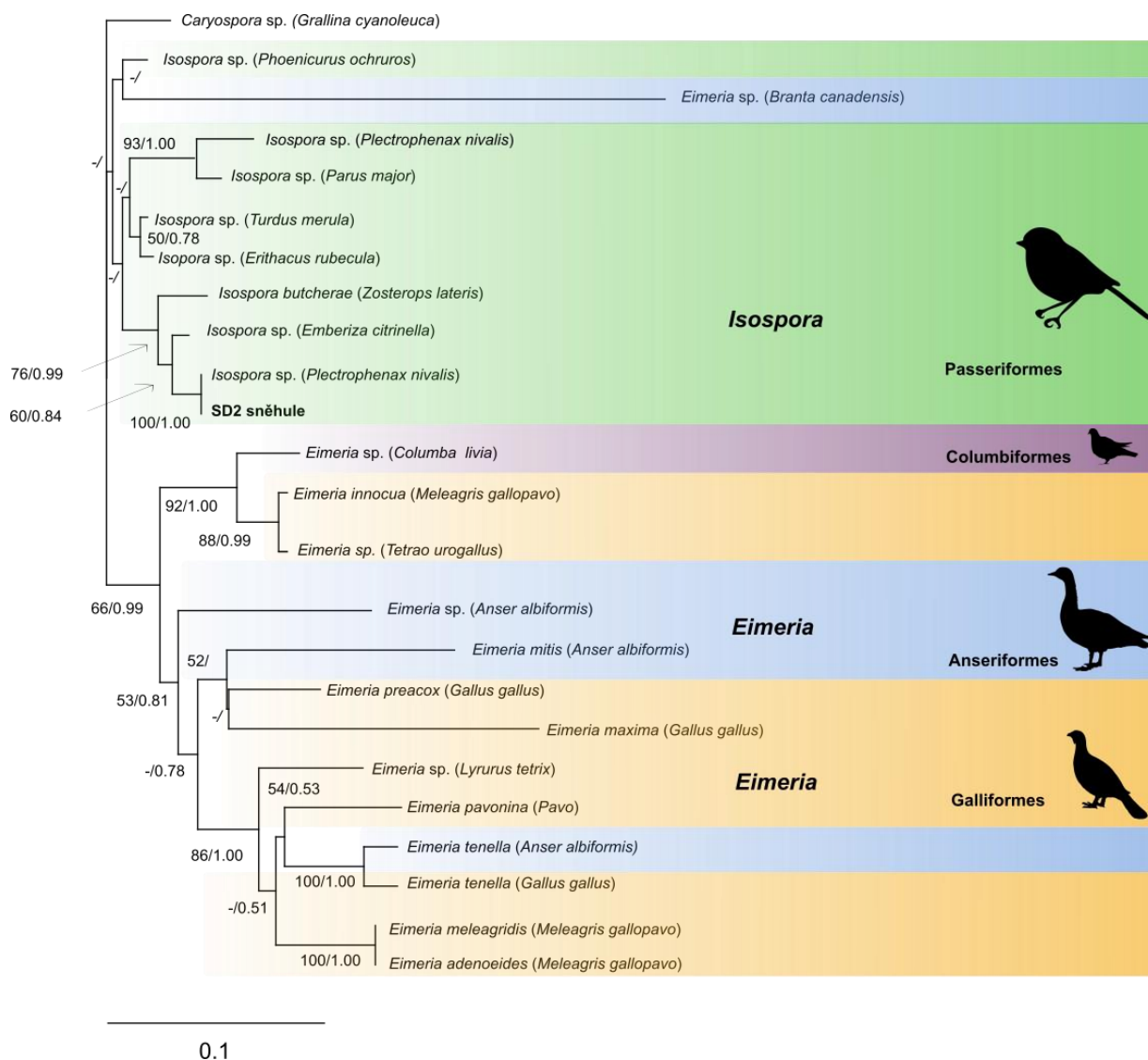
**Tab. 20:** Seznam referenčních sekvencí genu COI z databáze GenBank pro fylogenetické analýzy.

<b>Kokcidie</b>	<b>Hostitel</b>	<b>Přístupový kód sekvence v databázi GenBank</b>
<i>Eimeria</i> sp.	<i>Anser albifrons</i> (husa běločelá)	MN586865
<i>Eimeria</i> sp.	<i>Branta canadensis</i> (berneška velká)	KT184380
<i>Eimeria</i> sp.	<i>Columba livia domestica</i> (holub domácí)	KT305929
<i>Eimeria</i> sp.	<i>Tetrao urogallus</i> (tetřev hlušec)	MG595963
<i>Eimeria</i> sp.	<i>Lyrurus tetrix</i> (tetřívka obecná)	MG595959
<i>Eimeria adenoides</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocan divoký)	KC346360
<i>Eimeria innocua</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocan divoký)	HG793049
<i>Eimeria maxima</i>	<i>Gallus gallus</i> (kur bankivský)	FJ236459
<i>Eimeria meleagridis</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (krocan divoký)	HG793047
<i>Eimeria mitis</i>	<i>Anser albifrons</i> (husa běločelá)	MN586864
<i>Eimeria pavonina</i>	<i>Pavo</i> (páv)	JN596590
<i>Eimeria precox</i>	<i>Gallus gallus</i> (kur bankivský)	KT184378
<i>Eimeria tenella</i>	<i>Anser albifrons</i> (husa běločelá)	MN586863
<i>Isospora</i> sp.	<i>Turdus merula</i> (kos černý)	MK573843
<i>Isospora</i> sp.	<i>Phoenicurus ochruros</i> (rehek domácí)	MK573842
<i>Isospora</i> sp.	<i>Erithacus rubecula</i> (červenka obecná)	MK573838
<i>Isospora</i> sp.	<i>Emberiza citrinella</i> (strnad obecný)	MK573834
<i>Isospora</i> sp.	<i>Parus major</i> (sýkora koňadra)	MK573833
<i>Isospora</i> sp.	<i>Plectrophenax nivalis</i> (sněhule severní)	MH69855
<i>Isospora</i> sp.	<i>Plectrophenax nivalis</i> (sněhule severní)	MH698551
<i>Isospora butcheriae</i>	<i>Zosterops lateralis</i> (kruhoočko stříbrné)	KY801687
<i>Caryospora</i> sp.*	<i>Grallina cyanoleuca</i> (popeláček drozdí)	MN167470

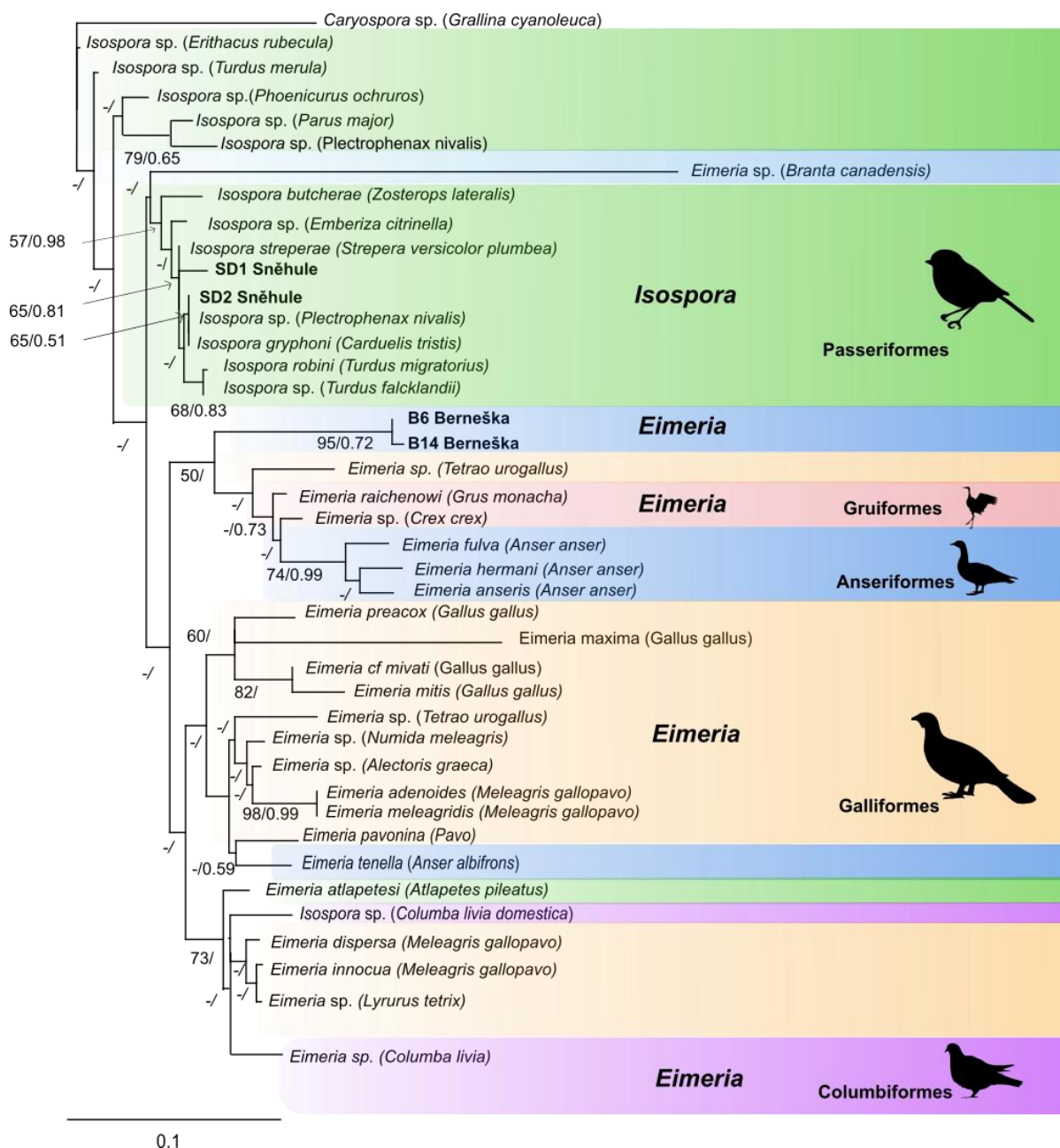
Vysvětlivky: „\*“ = outgroup.



**Obr. 9:** Fylogram získaný fylogenetickými analýzami pro sekvence genu SSU rRNA. Parametry použité pro jednotlivé analýzy jsou uvedeny v kapitole 3.4. Číselné hodnoty u uzlů odpovídají hodnotám bootstrapu (hodnota z ML analýzy/hodnota z Bayesovské analýzy). Hodnoty nižší než 50 % jsou znázorněny pomlčkou a v případě odlišného klastrování mezerou. Název v závorce odpovídá hostiteli nalezené kokcidie. Pro zakořnení stromu slouží *Caryospora neofalconis*. Sekvence původem z této práce jsou zvýrazněny tučně. Odlišné podbarvení odpovídá řádům hostitelů kokciidií. Ptačí siluety pocházejí z <http://phylopic.org> (PhyloPic: 22).



**Obr. 10:** Fylogram získaný fylogenetickými analýzami pro sekvence genu COI. Parametry použité pro jednotlivé analýzy jsou uvedeny v kapitole 3.4. Číselné hodnoty u uzlů odpovídají hodnotám bootstrapu (hodnota z ML analýzy/hodnota z Bayesovské analýzy). Hodnoty nižší než 50 % jsou znázorněny pomlčkou a v případě odlišného klastrování mezerou. Název v závorce odpovídá hostiteli nalezené kokcidie. Pro zakořenení stromu slouží *Caryospora* sp. Sekvence původem z této práce jsou zvýrazněny tučně. Odlišné podbarvení odpovídá řádům hostitelů kokciidií. Ptačí siluety pocházejí z <http://phylopic.org> (PhyloPic: 22).



**Obr. 11:** Fylogram získaný fylogenetickými konkaténovanými analýzami pro sekvence genu SSU a COI. Parametry použité pro jednotlivé analýzy jsou uvedeny v kapitole 3.4. Číselné hodnoty u uzlů odpovídají hodnotám bootstrapu (hodnota z ML analýzy/hodnota z Bayesovské analýzy). Hodnoty nižší než 50 % jsou znázorněny pomlčkou a v případě odlišného klastrování mezerou. Název v závorce odpovídá hostiteli nalezené kokcidie. Pro zakořenění stromu slouží *Caryospora* sp. Sekvence původem z této práce jsou zvýrazněny tučně. Odlišné podbarvení odpovídá řádům hostitelů kokcií. Ptačí siluety pocházejí z <http://phylopic.org> (PhyloPic: 22).



## 5. Diskuse

Vyšetření přítomnosti parazitů v trusu ptáků hnízdících na Svalbardu bylo provedeno mikroskopickými i molekulárními metodami. Metodika byla vybrána na základě sledovaných druhů parazitů, tedy kokcií, kryptosporidií a mikrosporidií.

První sledovanou skupinou byly kokcie. Oocysty byly detekovány flotační metodou s použitím Sheatherova cukerného roztoku. Flotace byla provedena celkem u 71 vzorků trusu původem z 12 odlišných ptačích druhů. Důvodem pro mikroskopické vyšetření bylo poměrně velké množství materiálu ke zpracování a také potenciál výskytu kokcií u těchto hostitelů, vzhledem k jejich ekologii a potravním návykům. Výskyt oocyst kokcií byl prokázán u 23 vzorků pocházejících od 4 různých ptačích druhů. Konkrétně šlo o husu krátkozobou, bernešku bělolící, kajku mořskou a sněhuli severní. Ze srovnání prevalence u jednotlivých ptačích druhů vyplývá, že nejvyšší výskyt byl zaznamenán mezi husami ( $p=86\%$ ) a berneškami ( $p=61\%$ ). Důvodem takto vysoké prevalence může být například to, že husy a bernešky patří mezi herbivorní spásáče, kteří se vyskytují v koloniích, a jsou proto více exponovány oocystám uvolněným do prostředí (viz kapitola 1.2.2.1.). Vlivu preferované potravy a shlukování ptáků na míru výskytu parazitů se ve své práci věnovala například Dolnik a kol. (2010). Jejich práce byla ale zaměřena na ptačí hostitele z řádu pěvců, pro které je charakteristické střídání potravních lokalit, při čemž čerstvě uvolněné oocysty nemají čas na vysporulování a pravděpodobnost infekce nového hostitele je proto snížena. Husy a bernešky naopak opakovaně vyhledávají potravu na totožném místě (Alsos a kol. 1989, Fox a kol. 2006). Možnost nákazy může být proto vyšší než u pěvců. Dolnik a kol. (2010) také formulovali hypotézu, že druhy vyskytující se v koloniích mohou mít jiné patogeny snižující celkovou imunitu jedince, čímž může být usnadněná infekce kokciemi.

Ptačí kokcidióza byla u volně žijících druhů popsána již kanadskými autory (Hanson a kol. 1957), kteří se ve své práci zaměřili na výskyt kokcií u volně žijících hus a bernešek v Kanadě a USA. Další výzkum na území Severní Ameriky sledoval kokcidiózu u bernešky velké (*Branta canadensis*) a celková přepočtená prevalence činila 20 % (Skene a kol. 1981). Dostupná literatura, která se zaměřuje na ptáky, kteří hnízdí na Svalbardu, je stále velmi omezená. Dolnik a Loonen (2007) zaznamenali výskyt oocyst *Tyzzeria parvula* u bernešek bělolících. Procentuální zastoupení infikovaných ptáků se odvíjelo od věku jedince a pohybovalo se mezi 41 % až 57 %. V potaz je také třeba vzít lokality zimovišť sledovaných ptáků. Například na území britských ostrovů provedl Brown a kol. (2010) výzkum výskytu kokcií u vodních ptáků. U bernešek bělolících, které migrují z Británie a Skotska

na Svalbard, byl zaznamenán výskyt kokcií u 13 % z vyšetřovaných vzorků (Brown a kol. 2010). Mnou zjištěná prevalence kokcií se odvíjí od pozorovaného ptačího druhu. U hus krátkozobých ( $p = 86\%$ ) a u bernešek bělolících ( $p = 61\%$ ) byla v porovnání s dřívějšími studii pozorována vyšší prevalence. Kokcie byly dále pozorovány v trusu z kajky mořské. Výsledná prevalence přepočtená na procenta činila 15 %. Řada vědeckých prací popsala u kajek mořských výskyt mnohobuněčných parazitů, zejména zástupců helmintů (např. Thieltges a kol. 2006, Garbus a kol. 2018, Vestbo a kol. 2019). Naopak poznatky o jednobuněčných střevních parazitech stále chybí. Nižší prevalence ve srovnání s husami a berneškami může být odůvodněna rozdílným složením potravy kajek (viz kapitola 1.2.2.1.). Oocysty kokcií byly také nalezeny u jednoho vzorku sněhule severní. Prevalence přepočtená na procenta činila 12,5 %. Vysporulovaná oocysta byla na základě počtu sporocyst zařazena do rodu *Isoospora*. Druhy tohoto rodu parazitují u hostitelů z řádu pěvců (např. Svobodová 1994). Prevalence *Isoospora* sp. u volně žijících pěvců se v dostupné literatuře pohybuje v rozmezí od 21 % až po 67 % (McQuiston 2000, Dolnik a kol. 2010). Sněhule v průběhu hnízdění sbírají jak rostlinou, tak živočišnou potravu a jsou tedy vystaveny možnému kontaktu s trusem jiných ptáků obsahujícím oocysty kokcií (Dolnik a kol. 2010). Podle morfologických znaků a geografického rozšíření byla tato oocysta zařazena do druhu *Isoospora plecrophenaxia* (Dolnik a Loonen 2007). Nezvykle vysoký výskyt kokcií u volně žijících druhů, který byl sledován v této práci, může být projevem malého počtu nasbíraného materiálu a také faktu, že vzorky trusu od hus pochází z jednoho jediného sběru. Vypočtená prevalence je pravděpodobně artefaktem, ze kterého nelze vyvozovat silné hypotézy.

U vzorků s mikroskopicky prokázanou nákazou a u darovaných vzorků vyizolované DNA, byla vyvinuta snaha o získání sekvencí DNA kokcií pro následné fylogenetické analýzy. Pro ty se podařilo získat celkem 5 sekvencí kokcií pro 2 různé geny (jaderný SSU rRNA a mitochondriální COI). Ze dvou rozdílných vzorků sněhule severní (vzorek SD1 a SD2) byly získány sekvence pro *Isoospora* sp., které byly přiřazeny do skupiny kokcií náležící k hostitelům z řádu pěvců. Sekvence se dále rozdělily do dvou linií, což napovídá tomu, že se může jednat o dva rozdílné druhy. Z darované DNA z trusu sněhule severní se také podařilo získat jednu sekvenci pro gen COI. Ta byla opět klastrována do skupiny *Isoospora* u pěvců a za vysoké podpory odpovídá *Isoospora* sp., která byla použita v práci Trefančové a kol. (2019) u sněhule severní původem ze Svalbardu. Sekvence ze sněhulí jsou také v této práci rozděleny do dvou různých linií (Trefančová a kol. 2019), což podporuje moji hypotézu

o různých druzích. Zmínky o výskytu kokcií u sněhule severní jsou dosud velmi limitované. U sněhule severní byl popsán druh *Isospora plectrophenaxia* (Dolnik a Loonen, 2007), tento popis byl však založen pouze na morfologii nalezené oocysty a molekulární data pro srovnání chybí. V mé práci byl také sledován tento morfotyp, získaná sekvence však nepochází z totožného vzorku trusu a z toho důvodu nelze prokázat jejich náležitost. Sekvence kokcií se také podařilo získat z trusu bernešek bělolících (vzorek B6 a B14). Ty za velmi vysoké podpory vytvořily společnou linii, která se vyčleňuje od klastrů dříve popsaných kokcií u vrubozobých. Obdobné vyčlenění *Eimeria* sp. původem z bernešky od ostatních vrubozobých ptáků lze také pozorovat ve fylogramu vytvořeném na základě variability COI genu (Obr. 10). Tato sekvence (Ogedengbe a kol. 2016) však pochází z *Branta canadensis* (bernešky velké), která se vyskytovala v Severní Americe, a je tedy geograficky izolovaná od *Branta leucopsis* (bernešky bělolící). Pro oba geny byl dále sestrojen fylogram na základě dat z konkatenovaných úseků (Obr. 23). Obě sekvence pro stejný druh byly nalezeny pouze u 7 ze 42 případů, a proto je výsledné větvení podpořeno velmi nízkými hodnotami. Konkatenované analýzy přiřadily bernešky do skupiny s ostatními vrubozobými hostiteli, v důsledku velmi malé podpory však nelze vyvozovat hypotézy o jejich fylogenetických vztazích. Kokcidie ze sněhulí byly opět klastrovány do skupiny *Isospora* původem z pěvců, a ačkoliv je zde nižší podpora než pro samotný gen COI, opět jsou zde sekvence rozděleny do různých linií.

Další sledovanou skupinou parazitů v této práci byly kryptosporidie. Část vzorků, kterých bylo dostatečné množství, bylo navíc vyšetřeno také mikroskopicky. Zvolenou metodou bylo barvení vzorku trusu methylvioletí (viz kapitola 3.2.2.) a následné prohlížení preparátu za účelem odhalení oocyst kryptosporidií. Takto bylo vyšetřeno celkem 43 různých vzorků od 3 odlišných hostitelů – husy krátkozobé, bernešky bělolící a kajky mořské. Přítomnost kryptosporidií nebyla prokázána u žádného ze zkoumaných vzorků. *Cryptosporidium* lze také odhalit flotační metodou (Fujino a kol. 2006) a z toho důvodu byly oocysty hledány také u preparátů vyšetřovaných tímto způsobem (celkem 71 vzorků). Ani takto prozkoumané vzorky nebyly shledány pozitivními na přítomnost kryptosporidií. Molekulární vyšetření bylo provedeno u celkového počtu 85 vzorků. Úsek genu SSU rRNA byl amplifikován pomocí modifikované nested PCR s použitím dvou sad primerů, která zvyšuje senzitivitu a specificitu amplifikace (Carr a kol. 2010). Přítomnost kryptosporidií nebyla prokázána ani u jednoho vzorku z vyšetřovaného souboru.

Vědeckých prací, které se věnují ptačím kryptosporidiím je poměrně velké množství. Většina těchto studií cílí na zvířata chovaná v zajetí (např. Qi a kol. 2011, Badparva a kol. 2015). Ptačí kryptosporidíóza byla ale také zaznamenána u volně žijících druhů (např. Graczyk a kol. 2008, Sevá a kol. 2011, Reboredo-Fernández a kol. 2015). Poznatků o rozšíření kryptosporidií v arktických oblastech je však stále nedostatek, což znesnadňuje srovnání velmi nízkého výskytu kryptosporidií, který byl pozorovaný v této práci. Jedním z důvodů nízké prevalence kryptosporidií mohou být extrémní podmínky, které na území Arktidy panují. Ačkoliv jsou oocysty kryptosporidií velmi odolné a ve vnějším prostředí mohou přežívat po dlouhou dobu, je několik faktorů, které snižují jejich životaschopnost (King a Monis 2007). Jedním z nich, který může hrát významnou roli v severních polárních oblastech, je teplota. Termorezistencí oocyst kryptosporidií se zabývala celá řada studií. Nízké teploty zřejmě snižují viabilitu oocyst, zejména a prokazatelně to platí v případě náhlého snížení teploty pod bod mrazu (Robertson a kol. 1992, Fayer a Nerad 1996, Jenkins 1997). Teplota v průběhu letní sezóny, kdy se zde vyskytuje většina ptačích druhů, se však zpravidla pohybuje nad 0 °C a z tohoto důvodu zde mají oocysty možnost pro přežití (Climate-Data.org: 23). Dalším potencionálním stresorem pro vnější stádia kryptosporidií může být dlouhotrvající vystavení ultrafialovému záření, které také působí nepříznivě na funkčnost oocyst (Campbell a kol. 1995). Provedené výzkumy v Arktidě i přesto odhalily přítomnost kryptosporidií (Roach a kol. 1993, Honsová 2012, Brož 2016, Thivierge a kol. 2016). Výskyt kryptosporidií byl také objeven ve volných vodních plochách na území Norska (Robertson a Gjerde 2001), což vypovídá o tom, že ptáci se také mohou nakazit na místě jejich zimovišť či v průběhu migrace.

Poslední sledovanou skupinou byly mikrosporidie. Ačkoliv je několik způsobů detekce mikrosporidií mikroskopickými metodami, v této práci byly použity pouze molekulární. Hlavním důvodem byla vyšší senzitivita, specifita a také menší časová náročnost (Procop 2007). Vyšetřeno bylo 85 různých vzorků, a to jak na přítomnost *Encephalitozoon* sp. a *Enterocytozoon bieneusi*. Zkoumaným úsekem DNA byl u obou případů ITS. Pro amplifikaci genu byla stejně jako v případě detekce kryptosporidií zvolena nested PCR. Pozitivní nález nebyl detekován u žádného vyšetřovaného vzorku.

Vzhledem k tomu že mikrosporidie patří mezi všudypřítomné organismy, jejichž výskyt byl popsán v řadě studií (např. Kašíčková a kol. 2009, Haro a kol. 2005, Bart a kol. 2008), je překvapením, že jejich výskyt v této práci nebyl prokázán. Co se sledované prevalence u volně žijících ptáků týče, v několika studiích byla vyhodnocena jako relativně nízká.

Výskyt mikrosporidií u volně žijících ptáků popisuje například Graczyk a kol. (2008), kteří ve své práci zaznamenali přítomnost různých druhů mikrosporidií u 1-10 % sledovaných vzorků. Obdobně nízká prevalence byla pozorována i u dalších studií (např. Slodkowiec-Kowalska a kol. 2006, Bart a kol. 2008). Rozšíření mikrosporidií na území Arktidy není stále příliš probádané. V několika případech byly nalezeny u řady savčích hostitelů (Nordstoga 1972, Mathis a kol. 1996, Myšková a kol. 2019). Pokud jde o výzkum ptačí mikrosporidiózy, ten byl prozatím proveden pouze v rámci bakalářských a magisterských prací (Honsová 2012, Myšková 2014). Autorkám těchto prací se podařilo prokázat výskyt mikrosporidií u různých hostitelů včetně ptáků hnízdících na Svalbardu, a to u bernešky bělolící, husy krátkozobé a racka tříprstého. Výsledná prevalence mikrosporidií byla v obou pracích vyhodnocena jako velmi nízká.

Ačkoliv je tato práce zaměřena na jednobuněčné parazity, byl také zaznamenán výskyt vajíček helmintů. Pozitivní nález byl odhalen flotační metodou u dvou různých vzorků trusu od bernešek bělolících. Vzhledem k nezralosti nalezených stádií nebylo možné přesné zařazení do druhu. Na základě dostupných znaků byly parazité zařazeny do řádu Oxyurida, který patří do třídy Secernentea, kmen Nematoda (hlístice). Helmintofaunou se na Svalbardu zabývala řada studií. Ačkoliv je převážná část zaměřená na savčí hostitele (např. Irvine a kol. 2000), nálezy byly také u ptáků. Například Vadim a kol. (2004) popsali výskyt hlístic u různých ptačích druhů včetně kajky mořské. Zmínky o výskytu helmintů mezi berneškami na Svalbardu nebyly nalezeny.

Při srovnání výsledků této a již dříve provedených prací Honsové (2012), Myškové (2014) a Brože (2016) je očividné, že prevalence ptačích kryptosporidií a mikrosporidií je na Svalbardu velmi malá. Pro polární ekosystémy je charakteristická nízká hostitelská diverzita, což může mít vliv také na nižší celkovou různorodost místní parazitofauny (Payer a kol. 2013). Extrémní podmínky severního prostředí mohou zároveň snižovat počet životaschopných vnějších stádií parazitů, což může mít vliv na počet infikovaných hostitelů. Je také potřeba zohlednit omezení plynoucí z použití koprologických metod, při kterých je infekce stanovena pouze na základě výskytu vnějších stádií (v tomto případě oocyst a exospór). U různých druhů parazitů byla pozorována cirkadiální variabilita v uvolňování oocyst či vajíček do prostředí, což snižuje možnost zachytu infekce při vyšetření (např. Williams 1995, Villanua a kol. 2006). Dále v porovnání s histologickým vyšetřením nelze koprologicky detekovat infikovaného hostitele, u kterého právě neprobíhá patence, tj. uvolňování infekčních stádií do prostředí, což bylo pozorováno například u kokciidií

(Duszynski a Couch 2013). Dá se očekávat, že obdobné limitace budou také v případě detekce kryptosporidií a mikrosporidií, jejichž prevalence může být takto podhodnocena. Vzorek trusu může být molekulárně vyhodnocen jako falešně negativní také v důsledku působení přítomných inhibičních látek. Ty mají vliv na vyhodnocení nákazy molekulárními metodami. Příkladem můžou být produkty metabolismu či polysacharidy z nestrávené potravy, které brání správnému průběhu PCR reakce (Monteiro a kol. 1997, Chaturvedi a kol. 2008). Z tohoto důvodu byla u náhodně zvolených vzorků původem z rozdílných hostitelů provedena kontrola na přítomnost inhibitorů. Po provedení několika pokusů však nebyl vliv inhibice prokázán. Komplikace mohou nastat již při extrakci DNA z trusu, kdy mohou zejména rostlinné zbytky potravy snižovat její efektivitu, a to i za použití vhodného kitu (Zhang a kol. 2007). Následkem toho může dojít k relativně nízké koncentraci vyizolované DNA, což bylo při vypracování této práce pozorováno u části vyšetřovaných vzorků. Zároveň jak kryptosporidie, tak mikrosporidie mají velmi silnou stěnu vnějších stádií a pro uvolnění DNA je potřeba důkladné mechanické poškození oocyst či spor (Ghosh a Weiss 2009). Velmi nízký výskyt parazitů tedy může být ovlivněn také výše zmíněnými faktory.

Z důvodu omezeného množství vzorků a také v důsledku komplikací, které nastaly při molekulárním vyšetření (hlavně při izolaci DNA), by bylo vhodné věnovat se tomuto tématu i v budoucnu, což by umožnilo lépe objasnit zastoupení parazitů v tak zajímavé lokalitě jako je Svalbard. Doporučila bych nejen navýšit počet nasbíraného materiálu, ale také zkusit upravit postup izolování DNA z komplikovaného materiálu trusu. Možnostmi optimalizace izolace DNA z trusu se věnoval například Hawash (2014). V případě kryptosporidií a mikrosporidií by mohl pomoci výběr vhodnějších, optimálně vlastnoručně navržených primerů.

## 6. Závěry

1. Mikroskopicky byla prokázána přítomnost kokcií u čtyř různých ptačích druhů s prevalencí v rozmezí od 12,5 % do 86 %.
2. Převážná část nalezených oocyst byla v nevysporulovaném stavu. Vysporulované oocysty byly určeny jako *Isoospora plectrophenaxia*, *Eimeria* sp. a *Isoospora* sp.
3. Výskyt kryptosporidií nebyl mikroskopicky ani molekulárně pozorován ani u jednoho vyšetřovaného vzorku.
4. Z ptačího trusu se podařilo získat pět sekvencí kokcií pro gen SSU rRNA a COI.
5. Sekvence kokcií z trusu sněhule severní (*Plectrophenax nivalis*) byly zařazeny do rodu *Isoospora*, patřící do dvou fylogenetických linií. Pravděpodobně jde o dva samostatné druhy.
6. DNA oocyst kokcií z trusu bernešek bělolících (*Branta leucopsis*) odpovídá rodu *Eimeria* a získané sekvence vytvořily vlastní skupinu nepříbuznou s dříve popsány druhy u vrubozobých.
7. Prevalence střevních parazitů u ptáků na Svalbardu je velmi nízká (zejména kryptosporidií a mikrosporidií).

## 7. Použité zdroje

### 7.1. Literatura

- Adl S.M., Bass D., Lane C.E., Lukeš J., Schoch C.L., Smirnov A., Agatha S., Berney C., Brown M.W., Burki F., Cárdenas P., Čepička I., Chistyakova L., Del Campo J., Dunthorn M., Edvardsen B., Eglit Y., Guillou L., Hampl V., Heiss A.A., Hoppenrath M., James T.Y., Karnkowska A., Karpov S., Kim E., Kolisko M., Kudryavtsev A., Lahr D.J.G., Lara E., Le Gall L., Lynn D.H., Mann D.G., Massana R., Mitchell E.A.D., Morrow C., Park J.S., Pawlowski J.W., Powell M.J., Richter D.J., Rueckert S., Shadwick L., Shimano S., Spiegel F.W., Torruella G., Youssef N., Zlatogursky V., Zhang Q. 2019: Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 66: 4-119.
- Adriano E.A., Thyssen P.J., Cordeiro N.S. 2000: *Eimeria curvata* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) in *Columbina talpacoti* and *Scardafella squammata* (Aves: Columbidae) from Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95: 53-55.
- Alsos I.G., Elvebakk A., Gabrielsen G.W. 1998: Vegetation exploitation by barnacle geese *Branta leucopsis* during incubation on Svalbard. *Polar Research* 17: 1-14.
- Altizer S., Bartel R., Han B.A. 2011: Animal migration and infectious disease risk. *Science* 331: 296-302.
- Badparva E., Ezatpour B., Azami M., Badparva M. 2015: First report of birds infection by intestinal parasites in Khorramabad, west Iran. *Journal of Parasitic Diseases* 39: 720-724.
- Barnard W.H., Mettke-Hofmann C., Matsuoka S.M. 2010: Prevalence of hematozoa infections among breeding and wintering Rusty Blackbirds. *The Condor* 112: 849-853.
- Barrett R., Anker-Nilssen T. 1997: Egg-laying, chick growth and food of Black Guillemots *Cephus grylle* in North Norway. *Fauna Norvegica* 20: 69-79.
- Barta J.R. 1997: Investigating phylogenetic relationships within the Apicomplexa using sequence data. *The Search for Homology Methods* 13: 81-88.
- Barta J.R., Martin D.S., Liberator P.A., Dashkevicz M., Anderson J.W., Feighner S.D., Elbrecht A., Perkins-Barrow A., Jenkins M.C., Danforth H.D., Ruff M.D., Profous-Juchelka H. 1997: Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *The Journal of Parasitology* 83: 262-71.
- Bart A., Wentink-Bonnema E.M., Heddema E.R., Buijs J., van Gool T. 2008: Frequent occurrence of human-associated microsporidia in fecal droppings of urban pigeons in Amsterdam, the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 7056-7058.
- Barton C.S., Phalen D.N., Snowden K.F. 2003: Prevalence of microsporidian spores shed by asymptomatic lovebirds: evidence for a potential emerging zoonosis. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 17: 197-202.
- Bennett G., Montgomerie R., Seutin G. 1992: Scarcity of haematozoa in birds breeding on the arctic tundra of North America. *The Condor* 94: 289-292.
- Bennett G.F., Peirce, M.A., Ashford R.W. 1993: Avian haematozoa: mortality and pathogenicity. *Journal of Natural History* 27: 993-1001.
- Besansky N.J., Severson D.W., Ferdig M.T. 2003: DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. *Trends in Parasitology* 19: 545-546.



- Berto B.P., Ribeiro L.H., Flausino W., Ferreira, I., Lopes C.W.G.** 2009: New species of *Eimeria* Schneider, 1875 and *Isospora* Schneider, 1881 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the short-crested flycatcher *Myiarchus ferox* (Gmelin) (Passeriformes: Tyrannidae) in South America. *Systematic Parasitology* 74: 75-80.
- Biddere C., Pages M., Méténier G., David D., Bata J., Prensier G., Vivarés C.P.** 1994: On small genomes in eukaryotic organisms: molecular karyotypes of two microsporidian species (Protozoa) parasites of vertebrates. *C. R. Academy of Sciences* 317: 399-404.
- Black S., Steinhart L.A., Bertucci D., Rogers L., Didier E.** 1997: *Encephalitozoon hellem* in Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Veterinary Pathology* 34: 189-98.
- Bliss L.C.** 1962: Adaptations of arctic and alpine plants to environmental conditions. *Arctic* 15: 117-144.
- Blix A.** 2016: Adaptations to polar life in mammals and birds. *Journal of Experimental Biology* 219: 1093-1105.
- Brož M.** 2016: Střevní paraziti savců introdukovaných na Svalbard. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 41 pp.
- Brown M.A., Ball S.J., Snow K.R.** 2010: Coccidian parasites of British wild birds. *Journal of Natural History* 44: 2669-2691.
- Buckholt M.A., Lee J.H., Tzipori S.** 2002: Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2595-2599.
- Callaghan T.V., Björn L.O., Chernov Y., Chapin T., Christensen T.R., Huntley B., Ims R.A., Johansson M., Jolly D., Jonasson S., Matveyeva N., Panikov N., Oechel W., Shaver G., Elster J., Henttonen H., Laine K., Taulavuori K., Taulavuori E., Zöckler C.** 2004: Biodiversity, distributions and adaptations of arctic species in the context of environmental change. *AMBIO A Journal of the Human Environment* 33: 404-417.
- Campbell A.T., Robertson L.J., Snowball M.R., Smith H.V.** 1995: Inactivation of oocysts of *Cryptosporidium parvum* by ultraviolet irradiation. *Water Research* 29: 2583-2586.
- Carr J., Williams D., Hayden R.** 2010: Molecular Detection of Multiple Respiratory Viruses. *Molecular Diagnostics* 289-300.
- Carreno R.A., Matrin D.S., Barta J.R.** 1999: *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research* 85: 899-904.
- Cavalier-Smith T.** 1999: Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46: 347-366.
- Clavel A., Arnal A.C., Sánchez E.C., Cuesta J., Letona S., Amiguet J.A., Castillo F.J., Varea M., Gómez-Lus R.** 1996: Respiratory cryptosporidiosis: case series and review of the literature. *Infection* 24: 341-6.
- Cox F.E.G.** 1991: Systematics of parasitic protozoa. *Parasitic Protozoa* 1: 55-80.
- Current W.L., Reese N.C., Ernst J.V., Bailey W.S., Heyman M.B., Weinstein W.M.** 1983: Human Cryptosporidiosis in Immunocompetent and Immunodeficient Persons. *New England Journal of Medicine* 308: 1252-1257.

- Current W.L., Upton S.J., Haynes T.B.** 1986: The life cycle of *Cryptosporidium baileyi* n. sp. (Apicomplexa, Cryptosporidiidae) infecting chickens. *Journal of Protozoology* 33: 289–296.
- Descamps S., Aars J., Fuglei E., Kovacs K.M., Lydersen C., Pavlova O., Pedersen Å.Ø., Ravolainen V., Strøm H.** 2017: Climate change impacts on wildlife in a High Arctic archipelago – Svalbard, Norway. *Global Change Biology* 23: 490-502.
- Didier E.S., Vossbrinck C., Baker M., Rogers L., Bertucci, D., Shadduck J.A.** 1995: Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* 111: 411-421.
- Didier E.S., Didier P.J., Snowden K.F., Shadduck J.A.** 2000: Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection* 2: 709-720.
- Didier E.S., Stovall M.E., Green L.C., Brindley P.J., Sestak M., Didier P.J.** 2004: Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology* 126: 145-166.
- Didier E.S., Weiss L.M.** 2006: Microsporidiosis: current status. *Current Opinion in Infectious Diseases* 19: 485-92.
- Dillingham R.A., Lima A.A., Guerrant R.L.** 2002: Cryptosporidiosis: epidemiology and impact. *Microbes and Infection* 4: 1059-1066.
- Dingle H., Drake V.A.** 2007: What is migration? *Bioscience* 57: 113-121.
- Dixon B.R., Parrington L.J., Parenteau M., Leclair D., Santín M., Fayer R.** 2008: *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium* spp. in the Intestinal Contents of Ringed Seals (*Phoca hispida*) and Bearded Seals (*Erignathus barbatus*) in Nunavik, Quebec, Canada. *Journal of Parasitology* 94: 1161-1163.
- Dolnik O.V., Loonen M.J.J.E.** 2007: *Isospora plectrophenaxia* n. sp (Apicomplexa: Eimeriidae), a new coccidian parasite found in Snow Bunting (*Plectrophenax nivalis*) nestlings on Spitsbergen. *Parasitology research* 101: 1617-1619.
- Dolnik O.V., Dolnik V.R., Bairlein F.** 2010: The effect of host foraging ecology on the prevalence and intensity of coccidian infection in wild passerine birds. *Ardea* 98: 97-103.
- Dolnik O.V., Metzger B. J., Loonen M.J.J.E.** 2011: Keeping the clock set under the midnight sun: diurnal periodicity and synchrony of avian *Isospora* parasites cycle in the High Arctic. *Parasitology* 138: 1077-1081.
- Dryden M.W., Payne P.A., Ridley R., Smith V.** 2005: Comparison of common fecal flotation techniques for the recovery of parasite eggs and oocysts. *Veterinary Therapeutics* 6: 15-28.
- Dubey J.P., Speer C.A., Fayer R.** 1990: *Cryptosporidiosis of man and animals*. CRC Press, Florida, 208 pp.
- Duszynski D.W., Couch L.** 2013: *The Biology and Identification of the Coccidia (Apicomplexa) of Rabbits of the World*. Elsevier, Londýn, 352 pp.
- Duszynski D.W., Wilber P.G.** 1997: A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeridae. *Journal of Parasitology* 83: 333-336.
- Elmore S.A., Lalonde L.F., Samelius G., Alisauskas R.T., Gajadhar A.A., Jenkins E.J.** 2013: Endoparasites in the feces of arctic foxes in a terrestrial ecosystem in Canada. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2: 90-96.

- Espmark Y.** 2016: Breeding biology of snow buntings (*Plectrophenax nivalis*) in Svalbard. Det Kongelige Norske Videnskabers Selskabs Skrifter 2016: 1-36.
- Fantham H.B.** 1910: The morphology and life-history of *Eimeria (Coccidium)bavium*: a Sporozoö causing a fatal disease among young Grouse. Proceedings of the Zoological Society of London 80: 672–691.
- Fantham H.B., Porter A.** 1912: The morphology and life history of *Nosema apis* and the significance of its various stages in the so-called ‘Isle of Wight’ disease in bees (Microsporidiosis). Annals of Tropical Medicine & Parasitology 6: 163-195.
- Fast N.M., Xue L., Bingham S., Keeling P.J.** 2002: Re-examining alveolate evolution using multiple protein molecular phylogenies. Journal of Eukaryotic Microbiology 49: 30-7.
- Fayer R.** 1980: Epidemiology of protozoan infections: The Coccidia. Veterinary Parasitology 6: 75-103.
- Fayer R.** 1997: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Florida, 272 pp.
- Fayer R.** 2010: Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. Experimental Parasitology 120: 90-97.
- Fayer R., Nerad T.** 1996: Effects of low temperatures on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. Applied and Environmental Microbiology 62: 1431-1433.
- Fayer R., Xiao L.** 2007: *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press, Florida, 576 pp.
- Fernandes B., Justo M., Cardenas M., Cohen S.** 2015: South American trematodes parasites of birds and mammals. Oficina do Livro, Alfragide, 550 pp.
- Figuerola J., Green A.J.** 2000: Haematozoan parasites and migratory behaviour in waterfowl. Evolutionary Ecology 14: 143-153.
- Fox A., Francis I.S., Bergersen E.** 2006: Diet and habitat use of Svalbard Pink-footed Geese *Anser brachyrhynchus* during arrival and pre-breeding periods in Adventdalen. Ardea 94: 691-699.
- Fowler M.E.** 1981: Wildlife disease of the pacific basin and other countries, Proceedings of the 4th international conference of the Wildlife Disease Association, Wildlife Disease Association, Austrálie, 262 pp.
- Franzen C., Müller A.** 1999: Molecular techniques for detection, species differentiation, and phylogenetic analysis of microsporidia. Clinical Microbiology Reviews 12: 243-285.
- Fryxell J.M., Sinclair A.R.** 1988: Causes and consequences of migration by large herbivores. Trends in Ecology & Evolution 3: 237-241.
- Fujino T., Matsuo T., Okada M., Matsui T.** 2006: Detection of a small number of *Cryptosporidium parvum* oocysts by sugar flotation and sugar centrifugation methods. The Journal of Veterinary Medical Science 68: 1191-1193.
- Fuller T., Bensch S., Müller I., Novembre J., Pérez-Tris J., Ricklefs R., Smith T., Waldenström J.** 2012: The ecology of emerging infectious diseases in migratory birds: An assessment of the role of climate change and priorities for future research. EcoHealth 9: 80-88.
- Gabrielsen G.W., Skaare J.U., Polder A., Bakken V.** 1995: Chlorinated hydrocarbons in glaucous gulls (*Larus hyperboreus*) in the southern part of Svalbard. Science of The Total Environment 160-161: 337-346.

- Galli-Valerio B.** 1940: Notes de Parasitologie et de technique parasitologique. Schweizer Archiv fur Tierheilkunde 82: 352-358.
- Garcia L.S.** 2002: Laboratory identification of the microsporidia. Journal of Clinical Microbiology 40: 1892-1901.
- Garbus S., Lyngs P., Christensen J., Buchmann K., Eulaers I., Mosbech A., Dietz R., Gilchrist H., Sonne, Ch.** 2018: Common eider (*Somateria mollissima*) body condition and parasitic load during a mortality event in the baltic proper. Avian Biology Research 11: 167-172.
- Ghosh K., Weiss L.** 2009: Molecular diagnostic tests for Microsporidia. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases 2009: 926521.
- Golemanski V.** 2003: *Eimeria pygosceli* n. sp. (Coccidia: Eimeriidae) from the penguins (Pygoscelidae) on the Livingston Island (the Antarctic). Acta Zoologica Bulgarica 55: 3–8.
- Gouy M., Guindon S., Gascuel O.** 2010: SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. Molecular Biology and Evolution 27: 221-224.
- Graczyk T.K., Sunderland D., Rule A.M., da Silva A.J., Moura I.N., Tamang L., Girouard A.S., Schwab K.J., Breyse P.N.** 2007: Urban feral pigeons (*Columba livia*) as a source for air – and waterborne contamination with *Enterocytozoon bieneusi* spores. Applied and Environmental Microbiology 73: 4357-4358.
- Graczyk T.K., Majewska A.C., Schwab K.J.** 2008: The role of birds in dissemination of human waterborne enteropathogens. Trends in Parasitology 24: 55-59.
- Greiner E.C., Forrester D. J., Carpenter J. W., Yparraguirre D. R.** 1981: Coccidia of Aleutian Canada geese. Journal of Wildlife Diseases 17: 365-370.
- Gulliksen B., Svensen E.** 2004: Svalbard and Life in Polar Ocean. KOM Forlag, Kristiansund, 160 pp.
- Guindon S., Gascuel O.** 2003. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Systematic Biology 52: 696-704.
- Hake M., Blomqvist D., Pierce E.P., Järås T., Johansson O.C.** 1997: Population size, migration routes and breeding origin of Purple Sandpipers *Calidris maritima* wintering in Sweden. Ornis Svecica 7: 121-132.
- Hall T.A.** 1999: BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- Hanssen S.A., Gabrielsen G., Bustnes J., Bråthen V., Skottene E., Fenstad A., Strøm H., Bakken V., Phillips R., Moe B.** 2016: Migration strategies of common eiders from Svalbard: implications for bilateral conservation management. Polar Biology 39: 2179-2188.
- Hanson H.C., Levine N.D., Ivens V.** 1957: Coccidia (Protozoa: Eimeriidae) of North American wild geese and swans. Canadian Journal of Zoology 35: 715-733.
- Haro M., Izquierdo F., Henriques-Gil N., Andres I., Alonso F., Fenoy S., del Aguila C.** 2005: First detection and genotyping of human-associated microsporidia in pigeons from urban parks. Applied and Environmental Microbiology 71: 3153-3157.
- Hawash Y.** 2014: DNA Extraction from protozoan oocysts/cysts in feces for diagnostic PCR. The Korean Journal of Parasitology 52: 263-271.
- Helmy Y.A., Krucken J., Abdelwhab E.M., von Samson-Himmelstjerna G., Hafez H.M.** 2017: Molecular diagnosis and characterization of *Cryptosporidium* spp. in turkeys and

chickens in Germany reveals evidence for previously undetected parasite species. PLOS One 12: e0177150.

**Hoberg E.P., Kutz S., Galbreath K., Cook J.** 2003: Arctic biodiversity: From discovery to faunal baselines - Revealing the history of a dynamic ecosystem. Journal of Parasitology 89: 84-95.

**Hoberg E., Kutz S., Cook J., Galaktionov K., Haukisalme V., Henttonen H., Laaksonen S., Makarikov A., Marcogliese D.** 2013: Chapter 15. Parasites. In: Arctic Biodiversity Assessment: Status and trends in Arctic biodiversity (The Conservation of Arctic Flora and Fauna (CAFF), Arctic Council) 1: 420-449.

**Holubová N., Sak B., Horčíčková M., Hlásková L., Květoňová D., Menchaca S., McEvoy J., Kváč M.** 2016: *Cryptosporidium avium* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. Parasitology Research 115: 2243-2251.

**Holubová N., Tůmová L., Sak B., Hejzlarová A., Konečný R., McEvoy J., Kváč M.** 2020: Description of *Cryptosporidium ornithophilus* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in farmed ostriches. Parasites & Vectors 13: 340-357.

**Holubová N., Zikmundová V., Limpouchová Z., Sak B., Konečný R., Hlásková L., Rajský D., Kopacz Z., McEvoy J., Kváč M.** 2019: *Cryptosporidium proventriculi* sp. n. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in Psittaciformes birds. European Journal of Protistology 69: 70-87.

**Honsová L.** 2012: Výskyt potenciálních původců parazitárních zoonóz na Svalbardu. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 77 pp.

**Hovinen J., Welcker J., Descamps S., Strøm H., Jerstad K., Berge J., Steen H.** 2014: Climate warming decreases the survival of the little auk (*Alle alle*), a high Arctic avian predator. Ecology and Evolution 4: 3127-3138.

**Hromádková T., Pavel V., Flousek J., Briedis M.** 2020: Seasonally specific responses to wind patterns and ocean productivity facilitate the longest animal migration on Earth. Marine Ecology Progress Series 638: 1-12.

**Huelsenbeck J. P., Ronquist F.** 2001: MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. Bioinformatics 17: 754-755.

**Chapman H.D.** 2014: Milestones in avian coccidiosis research: A review. Poultry Science 93: 501-511.

**Chaturvedi U., Tiwari A.K., Ratta B., Ravindra P.V., Rajawat Y.S., Palia S.K., Rai A.** 2008: Detection of canine adenoviral infections in urine and faeces by the polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods 149: 260-263.

**Checkley W., White A.C., Jaganath D., Arrowood M.J., Chalmers R.M., Chen X.-M., Fayer R., Griffiths J.K., Guerrant R.L., Hedstrom L., Huston C.D., Kotloff K.L., Kang G., Mead J.R., Miller M., Petri W., Priest J.W., Roos D.S., Striepen B., Thompson R.C.A., Ward H.D., Voorhis W.A.V., Xiao L., Zhu G., Houpt, E.R.** 2015: A review of the global burden, novel diagnostics, therapeutics, and vaccine targets for *cryptosporidium*. The Lancet Infectious Diseases 15: 85-94.

**Chelladurai J.J., Clark M.E., Kváč M., Holubová N., Khan E., Stenger B.L., Giddings C.W., McEvoy J.** 2016: *Cryptosporidium galli* and novel *Cryptosporidium avian* genotype VI in North American red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). Parasitology Research 115: 1901-1906.

- Irvine R., Stien A., Halvorsen O., Langvatn R., Albon S.** 2000: Life-history strategies and population dynamics of abomasal nematodes in Svalbard reindeer (*Rangifer tarandus platyrhynchus*). *Parasitology* 120: 297-311.
- Jellison K.L., Distel D.L., Hemond H.F., Schauer D.B.** 2004: Phylogenetic analysis of the hypervariable region of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* oocysts in feces of Canada geese (*Branta canadensis*): evidence for five novel genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 452-458.
- Jenkins M.B., Anguish L.J., Bowman D.D., Walker M.J., Ghiorse W.C.** 1997: Assessment of a dye permeability assay for determination of inactivation rates of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 3844-3850.
- Jourdain E., Gauthier-Clerc M., Bicout D., Sabatier P.** 2007: Bird migration routes and risk for pathogen dispersion into western mediterranean wetlands. *Emerging Infectious Diseases* 13: 365-372.
- Jørgensen E., Johnsen H.** 2013: Rhythmic life of the Arctic charr: Adaptations to life at the edge. *Marine Genomics* 14: 71-81.
- Kašičková D., Sak B., Kváč M., Ditrich O.** 2007: Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host-cockateel (*Nymphicus hollandicus*) using molecular methods. *Parasitology Research* 101: 1685-1688.
- Kašičková D., Sak B., Kváč M., Ditrich O.** 2009: Sources of potentially infectious human microsporidia: molecular characterisation of microsporidia isolates from exotic birds in the Czech Republic, prevalence study and importance of birds in epidemiology of the human microsporidial infections. *Veterinary Parasitology* 165: 125-130.
- Keeling P.J., Fast N.M.** 2002: Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review Microbiology* 56: 93-116.
- Kemp R.L., Kluge J.P.** 1975: *Encephalitozoon* sp. in the blue-masked lovebird, *Agapornis personata* (Reichenow): First confirmed report of microsporidan infection in birds. *The Journal of Protozoology* 22: 489-491.
- King B.J., Monis P.T.** 2007: Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitology* 134: 309-323.
- Klaphake E., Claney J.** 2005: Raptor gastroenterology. *Journal of Exotic Pet Medicine* 19: 140-150.
- Köhler S., Delwiche C.F., Denny P.W., Tilney L.G., Webster P., Wilson R.J., Palmer J.D., Roos D.S.** 1997: A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* 275: 1485-1489.
- Kopečná J., Jirků M., Oborník M., Tokarev Y. S., Lukeš J., Modrý D.** 2006: Phylogenetic analysis of coccidian parasites from invertebrates: Search for missing links. *Protist* 157: 173-183.
- Koprivnikar J., Leung T.L.F.** 2015: Flying with diverse passengers: greater richness of parasitic nematodes in migratory birds. *Oikos* 124: 399-405.
- Kovacs K.M. a Lydersen Chr.** 2006: Birds and mammals of Svalbard. Grafisk Nord AS, Tromsø, 203 pp.
- Khurana S, Chaudhary P.** 2018: Laboratory diagnosis of cryptosporidiosis. *Tropical parasitology* 8: 2-7.
- Kreier J.** 1993: Parasitic protozoa 2nd Edition. Academic press Inc, Massachusetts, 323 pp.

- Lallo M.A., Calábria P., Milanelo L.** 2012: *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon* (Microsporidia) spores in stool from pigeons and exotic birds: microsporidia spores in birds. *Veterinary Pathology* 190: 418-442.
- Lawson B., Robinson R.A., Neimanis A., Handeland K., Isomursu M., Agren E.O., Hammes I.S., Tyler K.M., Chantrey J., Hughes L.A.** 2011: Evidence of spread of the emerging infectious disease, finch trichomonosis, by migrating birds. *Ecology & Health* 8:143-153.
- Lee P.Y., Costumbrado J., Hsu C.Y., Kim Y.H.** 2012: Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Journal of Visualized Experiments* 20: 3923.
- Leighton, F.A., Gajadhar, A.A.** 1986: *Eimeria fraterculae* sp. n. in the kidneys of Atlantic puffins (*Fratercula arctica*) from Newfoundland, Canada: Species description and lesions. *Journal of Wildlife Diseases* 22: 520-526.
- Levine N.D.** 1961: Protozoan parasites of domestic animals and of man. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 412 pp.
- Levine N.D.** 1970: Taxonomy of the Sporozoa, *Journal of Parasitology* 56: 208-209.
- Levine N.D.** 1973: Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man, 2nd edition. Burgess Publishing, Minneapolis, 229 pp.
- Levine N.D.** 1988: The Protozoan Phylum Apicomplexa Vol. I. CRC Press, Florida, 203 pp.
- Li W., Tao W., Jiang Y., Diao R., Yang J., Xiao L.** 2014: Genotypic distribution and phylogenetic characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in diarrheic chickens and pigs in multiple cities. *PLOS One* 9: e108279.
- Lim L., McFadden G.I.** 2010: The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 365: 749-763.
- Lobo M.L., Xiao L., Cama V., Magalhaes N., Antunes F., Matos O.** 2006: Identification of potentially human pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in various birds. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7380-7382.
- Lom J., Vávra J.** 1963: The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores. *Acta Protozoologica* 1: 81-92.
- Long P.L., Joyner L.P.** 1984: Problems in the Identification of Species of *Eimeria*. *The Journal of Protozoology* 31: 535-541.
- Long P.L., Reid W.M.** 1982: A guide for the diagnosis of coccidiosis in chickens. University of Georgia Research Report 404: 17.
- Mathis A., Akerstedt J., Tharaldsen J., Odegaard O., Deplazes P.** 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.
- Madsen J., Tombre I., Eide N.E.** 2009: Effects of disturbance on geese in Svalbard: implications for regulating increasing tourism, *Polar Research* 28: 376-389.
- Makino I., Inumaru M., Abe N., Sato Y.** 2018: A new avian *Cryptosporidium* genotype in a 1-month-old caged brown wood owl (*Strix leptogrammica*) with severe dehydration and diarrhea. *Parasitology Research* 117: 3003-3008.
- Martinaud G., Billaudelle M., Moreau J.** 2009: Circadian variation in shedding of the oocysts of *Isospora turdi* (Apicomplexa) in blackbirds (*Turdus merula*): An adaptive trait

against desiccation and ultraviolet radiation. *International Journal for Parasitology* 39: 735-739.

**McKinnon L., Smith P., Nol E., Martin J.L., Doyle F., Abraham K., Gilchrist H., Morrison R., Bêty J.** 2010: Lower predation risk for migratory birds at high latitudes. *Science* 327: 326-327.

**Mcquistion T.E.** 2000: The prevalence of coccidian parasites in passerine birds from South America. *Transactions of the Illinois State Academy of Science* 93: 221-227.

**Meireles M.V., Soares R.M., dos Santos M.M., Gennari S.M.** 2006: Biological studies and molecular characterization of a *Cryptosporidium* isolate from ostriches (*Struthio camelus*). *Journal of Parasitology* 92: 623-626.

**Mergani H., Al-Shebani M., Nawed K., Meraj B., Hafeez K.A.** 2014: Detection of intestinal protozoa by using different methods. *Dentistry and Medical Research* 2: 28-32.

**Miláček P., Vítovec J.** 1985: Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitologica* 32: 50.

**Misof K.** 2004: Diurnal cycle of *Isospora* spp. oocyst shedding in Eurasian blackbirds (*Turdus merula*). *Canadian Journal of Zoology* 82: 764-768.

**Modrý D., Šlapeta J.R., Koudela B.** 2000: Six new species of coccidia (Apicomplexa: Eimeriidae) from East African chameleons (Sauria: Chamaeleonidae). *Journal of Parasitology* 86: 373-379.

**Monteiro L., Bonnemaïson D., Vekris A., Petry K., Bonnet J., Correia da Silva R., Cabrita J., Megraud F.** 1997: Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 995-998.

**Morgan U.M., Monis P.T., Xiao L., Limor J., Sulaiman I., Raidal S., O'Donoghue P., Gasser R., Murray A., Fayer R., Blagburn B.L., Lal A.A., Thompson R.C.** 2001: Molecular and phylogenetic characterisation of *Cryptosporidium* from birds. *International Journal for Parasitology* 31: 289-296.

**Morin-Adeline V., Vogelnest L., Dhand N. K., Shiels M., Angus W., Šlapeta J.** 2011: Afternoon shedding of a new species of *Isospora* (Apicomplexa) in the endangered Regent Honeyeater (*Xanthomyza phrygia*). *Parasitology* 138: 713-724.

**Morrison D.A., Bornstein S., Thebo P., Wernery U., Kinne J., Mattsson J.G.** 2004: The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidia (Sporozoa). *International Journal for Parasitology* 34: 501-514.

**Müller M.G., Kinne J., Schuster R.K., Walochnik J.** 2008: Outbreak of microsporidiosis caused by *Enterocytozoon bienersi* in falcons. *Veterinary Parasitology* 152: 67-78.

**Muzzafar S.B., Jones I.L.** 2004: Parasites and diseases of the auks (Alcidae) of the world and their ecology – A review. *Marine Ornithology* 32: 121-146.

**Myšková E.** 2014: Střevní paraziti suchozemských obratlovců na Svalbardu. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 66 pp.

**Myšková E., Brož M., Fuglei E., Kvičerová J., Mácová A., Sak B., Kváč M., Ditrich O.** 2019: Gastrointestinal parasites of arctic foxes (*Vulpes lagopus*) and sibling voles (*Microtus levis*) in Spitsbergen, Svalbard. *Parasitology Research* 118: 3409-3418.

**Nägeli K.W.** 1857: Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Botanische Zeitung* 15: 760-761.



- Nakamura T., Konishi T., Kawaguchi H.** 1986: Isozymes of chicken coccidia in Japan. *Japanese Journal of Veterinary Science* 48: 587-590.
- Ng J., Pavlásek I., Ryan U.** 2006: Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from avian hosts. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 7548-7553.
- Nordstoga K.** 1972: Nosematosis in blue foxes. *Nordisk Veterinærmedicin* 24: 21-24.
- O'Donoghue P.J.** 1995: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology* 25: 139-195.
- Ogedengbe J.D., Hanner R. H., Barta J.R.** 2011: DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *International Journal for Parasitology* 41: 843-850.
- Ogedengbe M.E., El-Sherry S., Whale J., Barta J.R.** 2014: Complete mitochondrial genome sequences from five *Eimeria* species (Apicomplexa; Coccidia; Eimeriidae) infecting domestic turkeys. *Parasite Vectors* 7: 335.
- Ogedengbe M.E., Ogedengbe J.D., Whale J., Elliot K., Juárez-Estrada M.A., Barta J.** 2016: Molecular phylogenetic analyses of tissue coccidia (sarcocystidae; apicomplexa) based on nuclear 18S rDNA and mitochondrial COI sequences confirms the paraphyly of the genus *Hammondia*. *Parasitology Open* 2: 1-16.
- Page R.D.M.** 1996: TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- Pacheco F.T., Silva R.K., Martins A.S., Oliveira R.R., Alcântara-Neves N.M., Silva M.P., Soares N.M., Teixeira M.C.** 2013: Differences in the detection of *Cryptosporidium* and *Isospora* (*Cystoisospora*) oocysts according to the fecal concentration or staining method used in a clinical laboratory. *Journal of Parasitology* 99: 1002-1008.
- Pavlásek I.** 1999: Cryptosporidia: Biology, diagnosis, host spectrum, specificity, and the environment. *Remedia—Klinická Mikrobiologie* 3: 290-301.
- Pavlásek I.** 2001: Findings of cryptosporidia in the stomach of chickens and of exotic and wild birds. *Veterinarstvi* 51: 103–108.
- Payer D.C., Alf B. Josefson A.B., Fjeldså J.** 2013: Chapter 2, Species diversity in the Arctic. In: *Arctic Biodiversity Assessment: Status and trends in Arctic biodiversity (The Conservation of Arctic Flora and Fauna (CAFF), Arctic Council)* 1: 420-449.
- Pellérdy L.P.** 1974: *Coccidia and coccidiosis*. Akadémiai Kiadó, Budapest, 959 pp.
- Perrucci S., Rossi G., Macchioni, G.** 1998: *Isospora thibetana* n. sp. (Apicomplexa, Eimeriidae), a parasite of the Tibetan siskin (*Serinus thibetanus*=*Carduelis thibetanus*) (Passeriformes, Fringillidae). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45: 198-201.
- Pirestani M., Sadraei J., Forouzandeh M.** 2013: Molecular characterization and genotyping of human related microsporidia in free-ranging and captive pigeons of Tehran, Iran. *Infection, Genetics and Evolution* 20: 495-499.
- Prestrud K.W., Asbakk K., Fuglei E., Mørk T., Stien A., Ropstad E., Tryland M., Gabrielsen G.W., Lydersen C., Kovacs K.M., Loonen M.J., Sagerup K., Oksanen A.** 2007: Serosurvey for *Toxoplasma gondii* in arctic foxes and possible sources of infection in the high Arctic of Svalbard. *Veterinary Parasitology* 150: 6-12.
- Procop G.W.** 2007: Molecular diagnostics for the detection and characterization of microbial pathogens. *Clinical Infectious Diseases* 45: 99-111.

- Proctor S.J., Kemp R.L.** 1974: *Cryptosporidium anserinum* sp. n. (Sporozoa) in a Domestic Goose *Anser anser* L., from Iowa. The Journal of Protozoology 21: 664-666.
- Prop J.A., Bårdsen J., Hanssen B.J., Bech S.A., Bourgeon C., de Fouw S., Gabrielsen J., Lang G., Noreen J., Oudman E., Sittler T., Stempniewicz B., Tombre L., Wolters I., Moe E.B.** 2015: Climate change and the increasing impact of polar bears on bird populations. Frontiers in Ecology and Evolution 3: 1-12.
- Provencher J., Gaston A.** 2012: A specimen of the high Arctic subspecies of atlantic puffin, *Fratercula arctica naumanni*, in Canada. Canadian Field Naturalist 126: 50-54.
- Pulgarín-R P.C., Gómez C., Bayly N.J., Bensch S., Fitzgerald A.M., Starkloff N., Kirchman J.J., González-Prieto A.N., Hobson K.A., Heather J.U.M., Castaño S.M.I., Cadena C.D.** 2018: Migratory birds as vehicles for parasite dispersal? Infection by avian haemosporidians over the year and throughout the range of a long-distance migrant. Journal of Biogeography 46: 83-96.
- Qi M., Wang R., Ning C., Li X., Zhang L., Jian F., Sun Y., Xiao L.** 2011: *Cryptosporidium* spp. in pet birds: genetic diversity and potential public health significance. Experimental Parasitology 128: 336-340.
- Reboredo-Fernández A., Ares-Mazás E., Cacciò S., Gómez-Couso H.** 2015: Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in wild birds in Galicia (Northwest Spain). Parasitology 142: 1-9.
- Reduker D.W., Speer C.A., Blixt J.A.** 1985: Ultrastructure of *Cryptosporidium parvum* oocysts and excysting sporozoites as revealed by high resolution scanning electron microscopy. Journal of Parasitology 32: 708-711.
- Reetz J.** 1993: Naturally-acquired microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) infections in hens. Tierarztl. Tierärztliche Praxis 21: 429-435.
- Reetz J., Rinder H., Thomschke A., Manke H., Schwebs M., Bruderek A.** 2002: First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi* in non-mammalian hosts (chickens). International Journal for Parasitology 32: 785-787.
- Reed K.D., Meece J.K., Henkel J.S., Shukla S.K.** 2003: Birds, migration and emerging Zoonoses: West Nile virus, lyme disease, influenza A and enteropathogens. Clinical Medicine & Research 1: 5-12.
- Ritchie B.W., Harrison G.J., Harrison L.R.** 1994: Avian medicine: principles and application. Wings Publishing Inc., Florida, 1384 pp.
- Roach P.D., Olson M.E., Whitley G., Wallis P.M.** 1993: Waterborne *giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in the Yukon, Canada. Applied and Environmental Microbiology 59: 67-73.
- Robertson, L.J., Campbell, A.T., Smith, H.V.** 1992: Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressure. Applied and Environmental Microbiology 58: 3494-3500.
- Robertson L.J., Gjerde B.** 2001: Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *giardia* cysts in raw waters in Norway. Scandinavian Journal of Public Health 29: 200-207.
- Ryan U., Xiao L., Read C., Sulaiman I. Monis P., Lal A.A., Fayer R., Pavlasek I.** 2003a: A redescription of *Cryptosporidium galli* Pavlasek, 1999 (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in birds. The Journal of Parasitology 89: 809-813.

- Ryan U., Xiao L., Read C., Zhou L., Lal A.A., Pavlasek, I.** 2003b: Identification of novel *Cryptosporidium* genotypes from the Czech Republic. *Applied Environmental Microbiology* 69: 4302-4307.
- Sale R.** 2006: A complete guide to Arctic wildlife. A&C Black Publishers Ltd., Londýn, 464 pp.
- Samour J.** 2015: Avian Medicine 3rd edition. Elsevier, New York, 712 pp.
- Samuel W.M., Pybus M.J., Kocan A.A.** 2008: Parasitic diseases of wild mammals 2nd edition. Wiley-Blackwell, New Jersey, 568 pp.
- Sandstrom C., Buma A., Hoyer B., Prop J., van der Jeugd H., Voslamber B., Madsen J., Loonen M.** 2012: Latitudinal variability in the seroprevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in non-migrant and Arctic migratory geese. *Veterinary parasitology* 194: 9-15.
- Seva A.P., Funada M.R., Richtzenhain L., Guimaraes M.B., Souza Sde O., Allegretti L., Sinhorini J.A., Duarte V.V., Soares R.M.** 2011: Genotyping of *Cryptosporidium* spp. from free-living wild birds from Brazil. *Veterinary Parasitology* 175: 27-32.
- Sherwood D., Angus K.W., Snodgrass D.R., Tzipori S.** 1982: Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. *Infection and Immunity* 38: 471-475.
- Shirley M.W.** 1975: Enzyme variation in *Eimeria* species of the chicken. *Parasitology* 71: 369-376.
- Scholander P.F., Hock R., Walters V., Irving L.** 1950: Adaptation to cold in arctic and tropical mammals and birds in relation to body temperature, insulation, and basal metabolism rate. *Biological Bulletin* 99: 259-271.
- Schoener E.R., Alley M.R., Howe L., Castro I.** 2013: Coccidia species in endemic and native New Zealand passerines. *Parasitology Research* 112: 2027–2036.
- Siefker C., Rickard L.G., Pharr G.T., Simmons J.S., O'Hara T.M.** 2002: Molecular characterization of *Cryptosporidium* sp. isolated from northern Alaskan caribou (*Rangifer tarandus*). *The Journal of Parasitology* 88: 213-216.
- Sinski E., Behnke J.** 2004: Apicomplexan parasites: Environmental contamination and transmission. *Polish Journal of Microbiology* 53: 67-73.
- Skene R.C., Remmler O., Fernando M.A.** 1981: Coccidia of Canada geese (*Branta canadensis*) at Kortright Waterfowl Park, Guelph, Ontario, Canada, with description of *Isoospora anseris* n.sp. *Canadian Journal of Zoology* 59: 493-497.
- Skirnisson K.** 1998: Mortality associated with renal and intestinal coccidiosis in juvenile eiders in Iceland. *Parassitologia*. 39: 325-330.
- Slavin D.** 1955: *Cryptosporidium meleagridis* (sp. nov.). *Comparative Parasitology* 65: 262-266.
- Slodkiewicz-Kowalska A., Graczyk T.K., Tamang L., Jedrzejewski S., Nowosad A., Zduniak P., Solarczyk P., Girouard A.S., Majewska A.C.** 2006: Microsporidian species known to infect humans are present in aquatic birds: implications for transmission via water? *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4540–4544.
- Snell K.R.S., Stokke B.G., Moksnes A., Thorup K., Fossøy F.** 2018: From Svalbard to Siberia: Passerines breeding in the High Arctic also endure the extreme cold of the Western Steppe. *PLOS One* 13: e0202114.

- Snowden K., Logan K.** 1999: Molecular identification of *Encephalitozoon hellem* in an ostrich. *Avian Diseases* 43: 779-782.
- Snowden K., Daft B., Nordhausen R.W.** 2001. Morphological and molecular characterization of *Encephalitozoon hellem* in hummingbirds. *Avian Pathology* 30: 251-255.
- Snowden K.** 2004: Encephalitozoon infection in birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 13: 94-99.
- Soriano-Vargas E., Medina J., Salgado-Miranda C., García-Conejo M., Galindo-Sánchez K., Janczur M., Berto B., Lopes C.** 2015: *Eimeria pileata* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the rufous-capped brush finch *Atlapetes pileatus* Wagler (Passeriformes: Emberizidae) in Mexico. *Systematic Parasitology* 92: 261-265.
- Soulsby E.J.L., Jennings A.R.** 1957: A new species of coccidium (*Eimeria rissae* n.sp. Eimeriidae, Sporozoa) from the kittiwake, *Rissa tridactyla tridactyla* (L.). *Nature* 180: 1057-1058.
- Stange R.** 2018: Guidebook Spitsbergen Svalbard. Druckerei Karl Keuer, Neubukow, 608 pp.
- Storer R.W.** 2000: The metazoan parasite fauna of grebes (Aves: Podicipediformes) and its relationship to the birds' biology. *Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan*, 90 pp.
- Storer R.W.** 2002: The metazoan parasite fauna of loons (Aves: Gaviiformes), its relationship to the birds evolutionary history and biology, and a comparison with the parasite fauna of grebes. *Miscellaneous Publications, Museum of Zoology, University of Michigan, Michigan* 44 pp.
- Sulaiman I.M., Morgan U.M., Thompson R.C., Lal A.A., Xiao L.** 2000: Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2385-2391.
- Summers R.W., Corse C., Etheridge B., Heaton J., Rae R., Swann R.** 2010: Movements to Iceland and Svalbard by Purple Sandpipers wintering in Scotland. *Scottish Birds* 30: 194-200.
- Svensson L.** 1999: Collins bird guide 2nd edition. Harper Collins Publishers Ltd., Londýn, 445 pp.
- Svobodová M.** 1994: *Isospora*, *Caryospora* and *Eimeria* (Apicomplexa: Passeriform Birds) from Czech Republic. *Acta Protozoologica*. 33: 101-108.
- Tenter A.M., Johnson A.M.** 1997: Phylogeny of the Tissue Cyst-forming Coccidia. *Advances in Parasitology* 39: 69-139.
- Thieltges D., Hussel B., Baekgaard H.** 2006: Endoparasites in common eiders *Somateria mollissima* from birds killed by an oil spill in the northern Wadden Sea. *Journal of Sea Research* 55: 301-308.
- Thienpont D., Rochette F., Vanparijs O.F.J.** 1979: Diagnosing helminthiasis through coprological examination. *Janssen Research Foundation, Beerse, Belgie*, 187 pp.
- Thivierge K., Iqbal A., Dixon B., Dion R., Levesque B., Cantin P., Cédilotte L., Ndao M., Proulx J.F., 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: e0004534.

- Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.** 1994: Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Tocidlowski M.E., Cornish T.E., Loomis M.R., Stoskopf, M.K.** 1997: Mortality in captive wild-caught horned puffin chicks (*Fratercula corniculata*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 28: 298-306.
- Tombre I.M., Høgda K.A., Madsen J., Griffin L.R., Kuijken E., Shimmings P., Rees E., Verscheure C.** 2008: The onset of spring and timing of migration in two arctic nesting goose populations: the pink-footed goose *Anser bachyrhynchus* and the barnacle goose *Branta leucopsis*. *Journal of Avian Biology* 39: 691-703.
- Trefancová A., Mácová A., Kvičerová J.** 2019: Isosporan oocysts in the faeces of bank voles (*Myodes glareolus*; Arvicolinae, Rodentia): Real parasites, or pseudoparasites? *Protist* 170: 104-120.
- Tyzzar E.E.** 1907: A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 5: 12-13.
- Tyzzar E.E.** 1910: An extracellular coccidium, *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov.), of the gastric glands of the common mouse. *The Journal of Medical Research* 23: 487-509.
- Tyzzar E.E.** 1912: *Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse. *Archiv für Protistenkunde* 26: 394-412.
- Tyzzar E.E.** 1929: Coccidiosis in gallinaceous birds. *American Journal of Epidemiology* 10: 269-383.
- Tyzzar E.E., Theiler H., Jones E.E.** 1932: Coccidiosis in gallinaceous birds. II. A comparative study of species of *Eimeria* of the chicken. *American Journal of Epidemiology* 15: 319-393.
- Tzipori S., Campbell I., Sherwood D., Snodgrass D.R., Whitelaw A.** 1980: An outbreak of calf diarrhoea attributed to cryptosporidial infection. *The Veterinary Record* 107: 579-580.
- Tzipori S., Ward H.** 2002: Cryptosporidiosis: biology, pathogenesis and disease. *Microbes and Infection* 4: 1047-1058.
- Vadim K., Galkin A., Marasaev S., Marasaeva E.** 2004: The characteristics of the helminthofauna of sea birds of the Svalbard archipelago. *Doklady biological sciences: proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological sciences sections / translated from Russian.* 395: 124-126.
- Vávra J., Lukeš J.** 2013: Microsporidia and 'the art of living together'. *Advances in Parasitology* 82: 253-319.
- Veselovský Z.** 2001: *Obecná ornitologie.* Academia, nakladatelství Akademie věd České republiky, Český Těšín, 357 pp.
- Vestbo S., Hindberg C., Forbes M.R., Mallory M.L., Merkel F., Steenweg R.J., Funch P., Gilchrist H.G., Robertson G.J., Provencher J.F.** 2019: Helminths in common eiders (*Somateria mollissima*): Sex, age, and migration have differential effects on parasite loads. *The International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 9: 184-194.
- Viana D.S., Santamaría L., Figuerola J.** 2016: Migratory birds as global dispersal vectors. *Trends in Ecology & Evolution* 31: 763-775.

- Villanua D., Perez-Rodriguez L., Gortazar C., Hofle U., Vinuela J.** 2006: Avoiding bias in parasite excretion estimates: the effect of sampling time and type of faeces. *Parasitology* 133: 251-259.
- Viney M.E., Riley E.M., Buchanan K.L.** 2005: Optimal immune responses: immunocompetence revisited. *Trends in Ecology & Evolution* 20: 665-669.
- Volf P., Horák P. a kol.** 2007: *Paraziti a jejich biologie*. Triton, Praha, 318 pp.
- Vossbrinck C.R., Maddox J.V., Friedman S., Debrunner-Vossbrinck B.A., Woese C.R.** 1987: Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 326: 411-414.
- Weber R., Bryan R.T., Owen R.L., Wilcox C.M., Gorelkin L., Visvesvara G.S.** 1992: Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. The Enteric Opportunistic Infections Working Group. *New England Journal of Medicine* 326: 161-166.
- Weiss L.M., Becnel J.J.** 2014: *Microsporidia: Pathogens of Opportunity* 1st edition. Wiley, New Jersey, 709 pp.
- Weiss L.M., Wittner M.** 1999: *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press, Washington D.C., 553 pp.
- Williams R.B.** 1995: Epidemiological studies of coccidiosis in the domesticated fowl (*Gallus gallus*). III: The influence of the fowl's defaecation pattern on the excretion patterns of *Eimeria tenella* and *E. acervulina* oocysts. *Applied parasitology* 36: 279-289.
- Xiao L., Escalante L., Yang C., Sulaiman I., Escalante A.A., Montali R.J., Fayer R., Lal A.A.** 1999: Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small-subunit rRNA gene locus. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 1578-1583.
- Xiao L., Fayer R., Ryan U., Upton S.J.** 2004: *Cryptosporidium* taxonomy: recent advances and implications for public health. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 72-97.
- Xiao L., Sulaiman I.M., Ryan U.M., Zhou L., Atwill E.R., Tischler M.L., Zhang X., Fayer R., Lal A.A.** 2002: Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. *International Journal for Parasitology* 32: 1773-1785.
- Zhang B.W., Li M., Ma L.Ch., Wei F.** 2007: A Widely Applicable Protocol for DNA Isolation from Fecal Samples. *Biochemical Genetics* 44: 503-512.
- Zhao W., Yu S., Yang Z., Zhang Y., Zhang L., Wang R., Zhang W., Yang F, Liu A.** 2016: Genotyping of *Enterocytozoon bieneusi* (Microsporidia) isolated from various birds in China. *Infection, Genetics and Evolution* 40: 151-154.
- Zhu G., Marchewka M.J., Keithly J.S.** 2000: *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *Microbiology* 146: 315-321.
- Zhou L., Kassa H., Tischler M.L., Xiao L.** 2004: Host-adapted *Cryptosporidium* spp. in Canada geese (*Branta canadensis*). *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4211-4215.

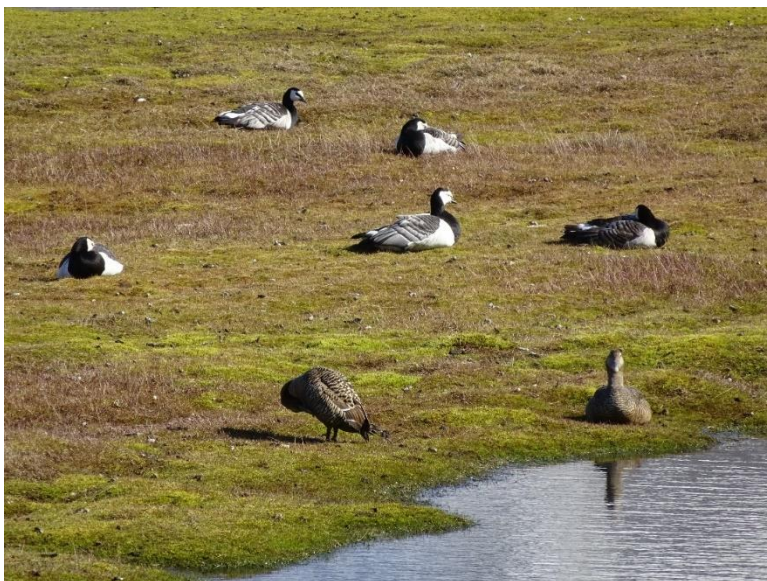
## 7.2. Internetové zdroje

- (1) Norsk Ornitologisk Forening, 2019. *Bird species on Svalbard*. [online]. 29.8. [cit. 19.10.2020].  
Dostupné z: <http://www.svalbardbirds.com/species/>.
- (2) ITIS, 2020. [online]. [cit. 8.12.2020]  
Dostupné z: <https://www.itis.gov/>.
- (3) BirdLife International, 2019. *Branta leucopsis - The IUCN Red List of Threatened Species 2019*. [online]. 9.8. [cit. 15.3.2020].  
Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/species/22679943/131909954/>.
- (4) BirdLife International, 2019. *Anser brachyrhynchus - The IUCN Red List of Threatened Species 2019*. [online]. 1.10. [cit. 15.3.2020].  
Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/species/22679872/85978254/>.
- (5) BirdLife International, 2019. *Charadrius hiaticula - The IUCN Red List of Threatened Species 2019*. [online]. 1.10. [cit. 15.3.2020].  
Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/species/22693759/155487854/>.
- (6) BirdLife International, 2019. *Phalaropus fulicarius - The IUCN Red List of Threatened Species 2019*. [online]. 8.8. [cit. 15.3.2020].  
Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/species/22693494/132531581/>.
- (7) BirdLife International, 2019. *Calidris maritima - The IUCN Red List of Threatened Species 2019*. [online]. 9.8. [cit. 15.3.2020].  
Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/species/22693420/131929424/>.
- (8) BirdLife International, 2019. *Rissa tridactyla. The IUCN Red List of Threatened Species 2019*. [online]. 8.8. [cit. 15.3.2020].  
Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/species/22694497/155617539>
- (9) BirdLife International, 2019. *Larus hyperboreus - The IUCN Red List of Threatened Species 2019*. [online]. 7.8. [cit. 15.3.2020].  
Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/species/22694343/132544122/>.
- (10) BirdLife International, 2019. *Sterna paradisaea. The IUCN Red List of Threatened Species 2019*. [online]. 7.8. [cit. 15.3.2020].  
Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/species/22694629/132065195/>.
- (11) BirdLife International, 2019. *Stercorarius parasiticus. The IUCN Red List of Threatened Species 2019*. [online]. 7.8. [cit. 15.3.2020].  
Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/species/22694245/132535550/>.
- (12) BirdLife International, 2019. *Cephus grylle. The IUCN Red List of Threatened Species 2019*. [online]. 8.8. [cit. 15.3.2020].  
Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/species/22694861/132577878/>.
- (13) BirdLife International, 2019. *Fratercula arctica. The IUCN Red List of Threatened Species 2019*. [online]. 8.8. [cit. 15.3.2020].  
Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/species/22694927/132581443/>.

- (14) BirdLife International, 2019. *Plectrophenax nivalis*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2019*. [online]. 1.10. [cit. 15.3.2020].  
Dostupné z: <https://www.iucnredlist.org/species/22721043/89345729>
- (15) Norsk polarinstitutt, 2020. [online]. [cit. 9.6. 2020].  
Dostupné z: <https://toposvalbard.npolar.no/>.
- (16) NCBI GenBank, 2019. [online]. [cit. 14.10.2020].  
Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
- (17) NCBI BLAST, 2019. [online]. [cit. 14.10.2020].  
Dostupné z: [blast.ncbi.nlm.nih.gov/](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).
- (18) Applied Biosystems 2020. *Sequence Scanner* [online]. [cit. 4.12.2020].  
Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/brands/applied-biosystems/>.
- (19) DNASTAR, Inc., 2020. *EditSeq*. [online]. [cit. 4.12.2020].  
Dostupné z: <https://www.dnastar.com/>.
- (20) DNASTAR, Inc., 2020. *SeqMan*. [online]. [cit. 4.12.2020].  
Dostupné z: <https://www.dnastar.com/>.
- (21) Free Software Foundation, Inc., 2007. *Inkscape*. [online]. [cit. 4.12.2020].  
Dostupné z: <https://inkscape.org/cs/about/license/>.
- (22) PhyloPic. [online]. [cit. 8.11.2020].  
Dostupné z: <http://phylopic.org/>.
- (23) Climate-Data.org, 2020. *Longyearbyen climate (Norway)*. [online]. [cit. 17.11.2020].  
Dostupné z: <https://en.climate-data.org/europe/norway/svalbard/longyearbyen-27870/>.
- (24) Petr Šimon. *Kulík písečný*. [online] [cit. 14.10.2020].  
Dostupné z: <https://www.photosimon.cz/klicova-slova/kulik-pisecny-charadrius-hiaticula-common-ringed-plover-1448/>.



## 8. Příloha



**Obr. 12:** Společný výskyt *Branta leucopsis* (berneška bělolící) a *Somateria mollissima* (kajka mořská). Foto Veronika Žánová.



**Obr. 13:** Společný výskyt *Branta leucopsis* (berneška bělolící) a *Sterna paradisaea* (rybák dlouhoocasý). Foto Veronika Žánová.



**Obr. 14:** *Anser brachyrhynchus* (husa krátkozobá). Foto Vašek Pavel.



**Obr. 15:** *Lagopus muta hyperborea* (bělokur horský). Foto Vašek Pavel.



**Obr. 16:** *Charadrius hiaticula* (kulík písečný) (Petr Šimon: 24).



**Obr. 17:** *Phalaropus fulicarius* (lyskonoh ploskozobý). Foto Veronika Žánová.



**Obr. 18:** *Calidris maritima* (jespák mořský). Foto Veronika Žánová.



**Obr. 19:** *Rissa tridactyla* (racek tříprstý). Foto Veronika Žánová.



**Obr. 20:** *Larus hyperboreus* (racek šedý). Foto Vašek Pavel.



**Obr. 21:** *Sterna paradisaea* (rybák dlouhoocasý). Foto Veronika Žánová.



**Obr. 22:** *Stercorarius parasiticus* (chaluha příživná). Foto Veronika Žánová.



**Obr. 23:** *Cephus grylle* (alkoun obecný). Foto Vašek Pavel.