

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Tažní psi v Arktidě jako potenciální zdroj
parazitárních infekcí lidí a volně žijících zvířat

Diplomová práce

Bc. Marek Brož

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

České Budějovice 2018

Brož M., 2018: Tažní psi v Arktidě jako potenciální zdroj parazitárních infekcí lidí a volně žijících zvířat. [Sledge dogs in Arctic as a potential source of parasitic infections of people and free-living animals. Mgr. Thesis, in Czech] – 32 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

The aim of this thesis is to evaluate dogs introduced into the Arctic as a source of intestinal parasites infection both for wildlife and humans. To that aim coprological examination of faeces sampled in Svalbard and Greenland was performed. Microscopical and molecular detection of cryptosporidia, giardia, microsporidia, roundworms and tapeworms in faeces was carried out. One sample from Svalbard was positive for *Toxocara canis* eggs and four samples from Svalbard were positive for unusual genotype of *Enterocytozoon bieneusi*.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. V platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 12. 12. 2018

.....

Bc. Marek Brož

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat zejména svému vedoucímu práce doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc., za jeho trpělivost, odborné vedení, ochotu a cenné rady. Stejně tak bych rád poděkoval školitelce RNDr. Evě Myškové za trpělivost, odborné vedení a pomoc při zvládnutí metodiky k této práci.

Velký dík patří všem zaměstnancům Centra polární ekologie a Mgr. Tereze Hromádkové za ochotu a pomoc při sběru vzorků a pohodou atmosféru při práci na Svalbardu. Velký dík patří také Mgr. Petře Vinšové za sběr vzorků v Grónsku. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině za podporu při studiu a při psaní této práce.

Především bych ale chtěl poděkovat za podporu z grantů LM2015078 CzechPolar2 (MŠMT ČR) a CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_013/0001708 ECOPOLARIS (MŠMT), která mi umožnila práci na Svalbardu.

Obsah

1.	Úvod	6
1.1.	Tažní psi a jejich paraziti	7
2.	Cíle práce	10
3.	Materiál a metody	10
3.1.	Lokality sběru vzorků	10
3.2.	Vyšetřovaný materiál	13
3.3.	Metody vyšetření vzorků	13
3.3.1.	Barvení dle Miláčka – Vítovce	13
3.3.2.	Barvení spór mikrosporidií optickým bělidlem	14
3.3.3.	Sedimentace AMS III	14
3.3.4.	Flotace dle Sheathera	15
3.3.5.	Molekulární diagnostika	15
3.3.5.1.	Izolace DNA z trusu	16
3.3.5.2.	Polymerázová řetězová reakce	16
3.3.5.3.	Gelová elektroforéza	17
3.3.5.4.	Sekvence a fylogenetická analýza	17
4.	Výsledky	18
4.1.	Přítomnost dospělých helmintů ve výkalech	18
4.2.	Výsledky mikroskopie	18
4.2.1.	Mikroskopie barvených preparátů dle Miláčka-Vítovce	18
4.2.2.	Mikroskopie spór mikrosporidií barvených dle Vávry-Chalupského	18
4.2.3.	Koncentrační metody	18
4.2.3.1.	Flotace dle Sheathera a sedimentace AMSIII	18
4.3.	Molekulární metody	19
5.	Diskuse	21
6.	Závěry	27
7.	Seznam použité literatury	28

PŘÍLOHA I – Primery použité v této práci

PŘÍLOHA II – Přehled nukleotidových neshod v sekvencích *Enterocytozoon bieneusi*

1. Úvod

Arktida je polární oblast nacházející se v nejsevernější části naší planety. Hranice Arktidy lze stanovit různými způsoby. Nejčastěji se definuje buď jako oblast na sever od severního polárního kruhu, tj. od 66°32' severní šířky (v tom případě zabírá oblast o rozloze 21,18 mil. km²), nebo jako oblast na severní polokouli, v níž průměrná teplota ani v létě nepřesahuje 10 °C. Její hranice se přibližně kryje s hranicí lesa. V současné době má takto vymezená Arktida rozlohu více než 26 mil. km². Z politického hlediska je Arktida definována jako oblast ležící na území osmi arktických států – Norska, Finska, Ruska, USA, Kanady, Islandu a Grónska (Dánska). Trvale zmrzlá půda (tzv. permafrost) je v arktických oblastech pokryta sezónně se měnícími sněhovými a ledovými pokrivy. Arktická moře pokrývá v mnoha oblastech sezónní mořský led. V posledních letech však došlo k poklesu množství ledu v oblasti Severního ledového oceánu způsobené globálním oteplováním (Serreze et al. 2007).

Arktida se dá podle vegetačních podmínek dělit na tři pásma: nízkou, střední a vysokou Arktidu. Data zkoumaná v této práci pocházejí z oblasti takzvané vysoké Arktidy. Vysoká Arktida zahrnuje nejsevernější polohy, kam až euroasijský a severoamerický kontinent sahá. Nadzemní biomasa je zde velmi nízká a stává se sporadickou. Velmi nízké procentuální zastoupení kvetoucích rostlin (asi 5 %) je způsobeno průměrnou červencovou teplotou pouhých 5 °C. Obnažený terén, často s horninou rozpraskanou mrazem, tvoří polární poušť (Svoboda 2017).

Arktická oblast je jedinečnou oblastí mezi ekosystémy Země. Nejen živočichové, ale i arktické domorodé národy se přizpůsobily těmto chladným a extrémním podmínkám. Život v Arktidě zahrnuje organismy žijící v ledu, dále zooplankton a fytoplankton, ryby a mořské savce, ptáky, suchozemská zvířata, rostliny a lidi (Krembs et Deming 2006).

Parazitofauna severských polárních oblastí jistě není tak rozmanitá jako například v oblasti tropů, avšak zvířata zde jsou stejně náchylná k infekci jak jednobuněčnými, tak i mnohobuněčnými parazity. S klesající diverzitou hostitelů v závislosti na zvyšující se zeměpisné šířce lze předpokládat, že parazitofauna živočichů v těchto oblastech bude druhově chudší (Bye et Halvorsen 1983).

Tato práce se zabývá parazitologickým vyšetřením tažných psů (*Canis lupus familiaris*) ve vysoké Arktidě, kteří zde nejsou původní, tudíž s sebou mohli zavléci nové druhy parazitů. Psi by mohli sdílet některé druhy jednobuněčných i mnohobuněčných parazitů zejména s polárními liškami (*Vulpes lagopus*), které se v oblastech vysoké Arktidy hojně vyskytují, ale

také například s vlkem arktickým (*Canis lupus arctos*), který žije na severu kanadské Arktidy (Mech et Cluff 2011). Riziko zavlečení nových, v Arktidě dříve nepopsaných druhů parazitů není malé. Zpřístupňování Arktidy turistům a masovější využívání tažných psů ke komerčním účelům by mohlo vést k šíření parazitárních infekcí. Psi mají v Arktidě význam i pro původní obyvatele. Tito lidé jsou v permanentním kontaktu se psy a jsou tedy vystaveni infekcím pocházejícím právě od psů. Některé druhy parazitů mohou infikovat jak psa, tak člověka, například hlístice *Toxocara canis*, *Trichinella spiralis* či tasemnice rodu *Echinococcus* (Unruh et al. 1973, Rausch et Williamson 1959).

Jako testovací vzorek nám posloužily výkaly psů ze Svalbardu a Grónska. Tato práce přímo navazuje na moji bakalářskou práci, kdy jsem odebral a vyšetřil mimo jiné vzorky také 36 vzorků psích výkalů. Přítomnost DNA mikrosporidie *Enterocytozoon bieneusi* v sedmi vzorcích a přítomnost DNA kryptosporidie *Cryptosporidium canis* v jednom vzorku potvrdila naši hypotézu o výskytu těchto parazitů v Arktidě a vedl k pokračování výzkumu (Brož 2016).

1.1. Tažní psi a jejich paraziti

V Arktidě jsou psi chováni převážně ke společenským a pracovním účelům. Tažní psi jsou využíváni po celý rok, tahají buď sáně či upravené vozíky s kolečky, podle množství sněhu a roční doby. Největší zastoupení mají odolná severská plemena, speciálně šlechtěná pro tahání sání – tedy husky, grónský pes, malamut, samojed a také jejich kříženci, kteří jsou podle chovatelů ještě odolnější. Najdeme je většinou v psích stanicích (areál s boudami, u kterých jsou psi uvázáni), ale také u soukromých majitelů, kteří vlastní menší skupinku psů.

Již v 19. a 20. století norští a ruští lovci kožešin používali na Svalbardu tažné psy. Bez psů byl pohyb po souostroví značně limitován. V současné době jsou psi používáni převážně k turistickým účelům (Umbreit 2005, Stange 2012). Na Svalbardu se v roce 2015 nacházelo zhruba 770 evidovaných psů, z nichž asi 350 vlastní společnosti poskytující služby turistům. Počet psů na Svalbardu však nadále roste (Meyer 2016). Dovážet psy a jiná zvířata na Svalbard je oficiálně zakázané, výjimky uděluje The Norwegian Food Safety Authority. Ihned po importu psa je nutné nechat ho zkontrolovat veterinářem. Pokud pes na Svalbardu uhynie, změní majitele, nebo je odvezen na pevninu, je nutné informovat úřad guvernéra souostroví tzv. Sysselmanna (Anonymous 2016). Všichni psi na Svalbardu musí být pravidelně očkováni proti vzteklině a jsou jim dvakrát až čtyřikrát ročně podávána antiparazitika (Vikaune 2018), zejména kvůli strachu z možné infekce tasemnicí *Echinococcus multilocularis*, vyskytující se na Svalbardu díky přítomnosti lišek polárních (*V. lagopus*) a hrabošů východoevropských

(*Microtus mystacinus*), jejichž náhodná introdukce s ruskými loděmi v druhé polovině 20. století umožnila dokončení vývojového cyklu této tasemnice. Žádná infekce psů tímto parazitem však dosud nebyla zaznamenána (Henttonen et al. 2001).

Na Svalbardu se parazity psů kromě mé bakalářské práce nikdo nezabýval. Byla zde však nalezena DNA mikrosporidií, které by mohly infikovat i psy což dokazují právě výsledky mé bakalářské práce (Brož 2016), konkrétně *Enterocytozoon bieneusi* v trusu lišek polárních (*V. lagopus*), soba polárního (*Rangifer tarandus platyrhynchus*), husy krátkozobé (*Anser brachyrhynchus*). Několik vzorků trusu volně žijících zvířat bylo pozitivní na DNA *Encephalitozoon cuniculi*, zejména sobi, lišky a husy. DNA mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* byla také nalezena ve třech vzorcích trusu psů odebraných v okolí Longyearbyenu a Ny-Ålesundu. Taktéž pro psy potenciálně nebezpečné kryptosporidie (k úmrtí po nákaze může dojít zejména u štěňat) byly nalezeny v centrální části Svalbardu u soba, husy krátkozobé a bernešky bělolící (*Branta leucopsis*), infekce *C. canis* byla potvrzena i v mé bakalářské práci u jednoho psa (Honsová 2012, Myšková zatím nepublikovaná data, Brož 2016).

V Grónsku je nejrozšířenějším plemenem grónský pes. Toto plemeno odpradávná pomáhalo Inuitům v pohybu po ledu a zasněžené krajině. Grónský pes je ve smečce schopný ulovit ledního medvěda či tuleně. Počet tažných psů v Grónsku se velmi rychle snižuje, za posledních dvacet let téměř o polovinu a v současné době se zde nachází přibližně 15000 psů (Drivsholm 2017). Snižování počtu grónských psů je způsobeno nejen nahrazováním psích spřežení sněžnými skútry, kdy není motivace udržovat vysoké počty psů v chovech, ale bohužel také epidemiemi psinky a parvovirových infekcí. V Grónsku psi nejsou považováni za mazlíčky, jde čistě o pracovní zvíře. Nejsou pro ně nařízeny žádné veterinární kontroly ani očkování, vše se děje svépomocí majitelů těchto psů (Sonne et al. 2018). Co se týče studií o parazitech psů v Grónsku, neexistují dosud žádné publikované údaje.

Parazitofauna tažných psů se podstatně neliší od parazitofauny psů s jiným využitím, paraziti psů jsou většinou hostitelsky specifictí. Velmi komplexní studii provedl v roce 1973 Unruh s jeho týmem, kdy vyšetřili 959 vzorků výkalů psů z 12 inuitských kolonií v severokanadských teritoriích. Vzorky vyšetřili flotačními metodami a našli široké spektrum parazitů: hlístice *Toxocara canis*, *Toxascaris leonina*, *Ancylostoma* sp., tasemnice rodů *Taenia*, *Echinococcus*, *Diphyllobothrium* a tasemnici *Dipylidium caninum*. Z motolic pak *Metorchis conjunctus*, zaznamenanou, stejně jako tasemnice rodu *Diphyllobothrium*, v oblastech, kde je primárním zdrojem obživy rybolov a psi jsou krmeni syrovými rybami či jejich zbytky. Zaznamenány byly také parazitární infekce, které byly považovány za méně

zoonoticky významné – *Trichuris* sp., *Alaria* sp. a infekce rodu *Isoospora*. Dnes už ale víme, že nákazy parazity rodu *Trichuris* a *Alaria* mohou být pro člověka potenciálně nebezpečné (Kramer et al. 1996, MacLean et al. 1996, Markell et al. 1999). Parazitárními infekcemi tažných psů v Kanadě se zabýval také Villeneuve v roce 2015, kdy bylo vyšetřeno celkem 1086 vzorků a parazitofauna byla velmi podobná jako v případě staršího výzkumu Unruha (1973). Oproti jeho výsledkům Villeneuve potvrdil v trusu i přítomnost cyst giardií, kryptosporidií, *Sarcocystis* a také vajíčka hlístice *Capillaria* sp.

Několik studií se také zabývalo parazity vlků v Arktidě, zejména v Severní Americe. V kanadském Yukonu a Severozápadním teritoriu bylo vyšetřeno 171 arktických vlků (*C. lupus arctos*) a prokázán byl nález motolic *Alaria americana*, *A. arisaemoides*, tasemnic *Diphyllobothrium* spp., *Mesocestoides kirbyi*, *Taenia hydatigena*, *T. krabbei*, *T. pisiformis*, *T. serialis*, *Echinococcus granulosus* a hlístic *Toxascaris leonina*, *Uncinaria stenocephala*, *Spirocerca arctica* a *S. lupi* (Choquette et al. 1973). Podobnou studii provedli Rausch a Williamson v roce 1959 na Aljašce, kdy bylo vyšetřeno 200 mrtvých vlků pomocí pitvy. Bylo nalezeno opět mnoho parazitů kopytníků, stejně jako v předešlém případě. Paraziti kopytníků však pro psy zřejmě nejsou ohrožením, protože psi neloví soby ani losy. Problémem by mohly být mršiny kopytníků, ke kterým by se psi náhodně dostali, či krmení psů syrovými sobími či losími vnitřnostmi. V aljašské studii však bylo nalezeno i několik pro psa i člověka nebezpečných parazitů, například *Echinococcus granulosus*. Dalo by se tedy předpokládat, že podobné spektrum parazitů, jako ve výše uvedených publikacích, bude u tažných psů napříč Arktidou. Bohužel neexistuje dostatek literárních zdrojů. V této studii jsme se snažili rozšířit znalosti o parazitech tažných psů v arktických oblastech a zaměřili jsme se zejména na Svalbard.

2. Cíle práce

Cíli mé diplomové práce bylo:

- Zpracovat literární rešerši o tažných psech v Arktidě a jejich parazitárních infekcích
- Shromáždit koprologický materiál tažných psů a pomocí molekulárních a koncentračních metod jej vyšetřit na přítomnost střevních parazitů
- Na základě výsledků posoudit možnosti přenosu parazitárních infekcí na člověka a volně žijící zvířata a zhodnotit epidemiologický význam tažných psů.

3. Materiál a metody

3.1. Lokality sběru vzorků

Většina vzorků pochází z centrální oblasti Svalbardu. Vzorky výkalů svalbardských psů pocházely ze tří psích stanic v okolí města Longyearbyen (Greendog, Basecamp a Svalbard Husky) a ruské psí stanice v Barentsburgu (Obr. 1, 3, 4). Odebrané vzorky z Grónska pochází přímo od soukromých majitelů tažných psů poblíž města Nuuk na jihozápadním pobřeží Grónska (Obr. 2).



Obr.1: Lokality sběru vzorků na Svalbardu (zdroj: toposvalbard.npolar.no, google.com).



Obr. 2: Lokalita sběru vzorků v Grónsku (zdroj: google.com).



Obr. 3: Psinec u města Longyearbyen (vlevo), psinec ve městě Barentsburg (vpravo).



Obr. 4: Odběr vzorků trusu v psinci u města Longyearbyen. Foto: Tereza Hromádková

3.2. Vyšetřovaný materiál

Vyšetřované vzorky výkalů psů byly odebrány v létě 2017. Odebrané vzorky výkalů (124 na Svalbardu a 6 v Grónsku) byly uchovávány v uzavíratelných zkumavkách typu Falcon zalité dichromanem draselným $K_2Cr_2O_7$ a skladovány při teplotě 4 °C.

3.3. Metody vyšetření vzorků

3.3.1. Barvení dle Miláčka – Vítovce

Metoda barvení dle Miláčka – Vítovce (1985) je používána pro mikroskopické vyšetření přítomnosti oocyst kryptosporidií v trusu a výkalech pomocí specifického barvení.

Použité chemikálie:

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

Pracovní postup:

Nejdříve byl vytvořen tenký nátěr výkalů na předem označené sklíčko. Nátěr byl poté fixován methanolem v plameni a 30 minut barven v kyvetě s roztokem methylvioleti. Poté byl nátěr opláchnut pod tekoucí vodou. Dále byl nátěr 2 minuty diferenciován v kyvetě s 2% kyselinou sírovou. Znovu byl opláchnut pod tekoucí vodou. V dalším kroku byl vzorek 5 minut dobarvován tartrazinem. V posledním kroku byl nátěr opět opláchnut pod tekoucí vodou a nechal se uschnout.

Barvené nátěry byly prohlíženy světelným mikroskopem (OLYMPUS BX 51) při zvětšení 1000× s použitím olejové imerze. V případě pozitivních vzorků byly pozorovány oocysty kryptosporidií, což byly přibližně 5µm velké kulovité struktury s fialovým zbarvením.

3.3.2. Barvení spór mikrosporidií optickým bělidlem

Metoda je používána pro mikroskopické vyšetření přítomnosti spór mikrosporidií v tenkém nátěru trusu a výkalů pomocí specifického barvení (Vávra et Chalupský 1982).

Použité chemikálie:

- 1) UVITEX 2B 0,1% v PBS (fosfátový pufr, pH 7,2 – 7,4)
- 2) Evansova modř 0,5%
- 3) Methanol

Pracovní postup:

Vzorky výkalů natřené na podložní sklíčko byly fixovány methanolem a po oschnutí (2 min) následovalo barvení 0,1% UVITEXEM 2b v PBS (10 min). Poté bylo podložní sklíčko opláchnuto PBS a dobarveno 0,5% Evansovou modří ve vodě po dobu 30 sekund. Podložní sklíčko se nechalo zaschnout a takto obarvené vzorky byly prohlíženy fluorescenčním mikroskopem (OLYMPUS BX51) při zvětšení 1000× s použitím olejové imerze při vlnové délce 490 nm. Obarvené spóry mikrosporidií svítí jasně modrobíle.

3.3.3. Sedimentace AMS III

Metoda sedimentace je koncentrační mikroskopickou metodou. Je určena např. k zachycení vajíček helmintů ve výkalech (Hunter et al. 1960). Pro vyšetření vzorků výkalů metodou AMSIII byly použity dva zásobní roztoky v následujícím složení:

1. AMS III roztok

115,2 g Na₂SO₄ bezvodý

540 ml HCl

660 ml H₂O

hustota = 1,080 g/ml

2. roztok Triton

16,5 ml Triton X 100

33,5 ml H₂O

Vzorek výkalů o velikosti lískového ořechu byl rozmíchán ve vodě a poté přefiltrován přes gázu. Vzniklý filtrát byl smíchán se 6ml roztoku AMS a protřepán. Do směsi byly přidány 3 kapky Tritonu a 3 ml diethyléru, poté byl obsah protřepán a centrifugován po dobu 2 min při 600 g. Sediment byl prohlížen světelným mikroskopem při zvětšení 200×.

3.3.4. Flotace dle Sheathera

Tato metoda je opět koncentrační mikroskopickou metodou k zachycení různých vývojových stádií parazitů ve výkalech. Pro vyšetření touto metodou je třeba tzv.

Sheatherův cukerný roztok:

259 ml deionizované vody

405 g cukru (krystal)

7,29 g fenolu

hustota = 1,2 g/ml

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

3.3.5. Molekulární diagnostika

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

3.3.5.1. Izolace DNA z trusu

K vyizolování DNA ze vzorků trusu byl použit komerční izolační kit (GeneAll ExGene Stool DNA mini). Do zkumavky bylo umístěno 200 mg vzorku trusu. Poté byl přidán 1 ml PBS pufru, zkumavka zvortexována a nechána 30 s odstát. Poté byl supernatant přenesen do čisté 2 ml mikrozkušavky. Přenesený obsah byl zcentrifugován po dobu 2 min na nejvyšší g, poté odstraněn supernatant. Do téže zkumavky bylo přidáno 1,3 ml FL pufru a resuspendován pelet. Zkumavka byla 5 min inkubována a poté centrifugována 5 min při 10 000 g. Supernatant byl poté přenesen na kolonu EzPass filter a centrifugován 1 min při 10 000 g. Poté byl postup s EzPass filtrem ještě jednou zopakován. Na EzPass filtr bylo dále přidáno 100 µl EB pufru a 1 min inkubováno. Poté byla kolona opět zcentrifugována po dobu 1 min při 10 000 g. Do filtrátu bylo přidáno 500 µl PB pufru a zkumavka promíchána. Obsah zkumavky byl přenesen na MiniSpin kolonu a při 10 000 g po dobu jedné minuty centrifugován, poté byl odstraněn filtrát. Na stejnou kolonu bylo přidáno 500 µl NW pufru, poté opět centrifugováno 1 min při 10 000 g a odstraněn filtrát. Kolona byla znovu centrifugována 1 min při maximálním g. Poté byla kolona přenesena do čisté 1,5 ml zkumavky. Na membránu MiniSpin kolony bylo přidáno 50 µl EB pufru, inkubováno 1 min a centrifugováno 1 min při 10 000 g. Kolona byla poté sejmuta a filtrát s vyizolovanou DNA v 1,5 ml zkumavce zmražen.

3.3.5.2. Polymerázová řetězová reakce

V případě kryptosporidií byl amplifikován gen pro malou ribozomální podjednotku (SSU rRNA), velikost produktu 800 bp (Jiang et al. 2005). U mikrosporidií *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon* spp. byl použit protokol pro amplifikaci Internal Transcribed Spacer (ITS) genu rRNA. Velikost produktů je v případě *E. bieneusi* 390 bp, v případě *Encephalitozoon* sp. pak 300 bp (Didier et al. 1995, Katzwinkel-Wladarsch et al. 1996, Buckholt et al. 2002). U giardií byla amplifikována část genu Triose Phosphate Isomerase (TPI), výsledná velikost produktu 500 bp (Sulaiman 2003a). Reakční směs měla objem 25 µl, kdy 12,5 µl tvořil komerční master mix obsahující Taq polymerázu (TopBio), 9,5 µl PCR voda (TopBio), 2 µl tvořili forward a reverse primery (charakteristika viz příloha I) a 1 µl pak templátová DNA. Součástí každé PCR reakce byla také pozitivní a negativní kontrola. U všech parazitů byl pozitivní kontrolou osekvenovaný vzorek.

K provedení reakce byl použit termocykler BIO-RAD T100. Amplifikační program pro mikrosporidie, kryptosporidie a giardie, pro primární i sekundární PCR (nested PCR), byl

složen z počáteční denaturace při 94 °C po dobu 3 min. Následovalo 35 cyklů, z nichž každý cyklus zahrnoval denaturaci po dobu 45 s při 94 °C, druhově specifické nasedání primerů (annealing) po dobu 45 s (viz příloha I) a syntézu nového řetězce (extenze) při 72 °C po dobu 1 min. Po těchto 35 cyklech následovalo dosyntetizování nového řetězce (finální extenze) při 72 °C po dobu 7 min.

3.3.5.3. Gelová elektroforéza

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

3.3.5.4. Sekvence a fylogenetická analýza

Sekundární PCR produkty pozitivních vzorků (mikrosporidie) byly sekvenovány pomocí ABI BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit na sekvenátoru ABI3130 (SEQme, ČR) za použití sekundárních primerů (*E. bieneusi* – EBITS1 a EBIT2,4; *Encephalitozoon* spp. – MSP-3 a MSP-4A) (specifikace viz Příloha I). Sekvence pak byly zpracovány pomocí programu Geneious (Kearse et al. 2012) a porovnány s databází GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). Pro dosažení stability a spolehlivosti umístění kořene bylo jako outgroup použita sekvence mikrosporidie *Nucleospora salmonis*. Poté byl vytvořen alignment metodou MAFFT (Katoh et Standley 2013) a z upraveného alignmentu (délka alignmentu 360 bp) byl metodou maximum-likelihood modelem K80 v programu PhyML vytvořen fylogenetický strom. Bootstrap výsledného ML stromu byl získán na základě 1000 opakování (Guindon et al. 2010, Kimura 1980). Meziskupinová nukleotidová diverzita byla vypočítána v programu DnaSP 6 (Rozas et al. 2017). Alignment pro DnaSP byl upraven na délku 321 bp. Porovnávána byla skupina „psi“ (vzorky získané pro tuto práci plus genotypy EntCanA a PtEbIX získané ze psů) se skupinou referenčních sekvencí z GenBank, ke které byly přidány sekvence volně žijících zvířat ze Svalbardu.

4. Výsledky

4.1. Přítomnost dospělých helmintů ve výkalech

Během vyšetřování vzorků výkalů nebyla zaznamenána přítomnost dospělců helmintů.

4.2. Výsledky mikroskopie

4.2.1. Mikroskopie barvených preparátů dle Miláčka-Vítovce

Všechny barvené nátěry metodou dle Miláčka-Vítovce byly negativní.

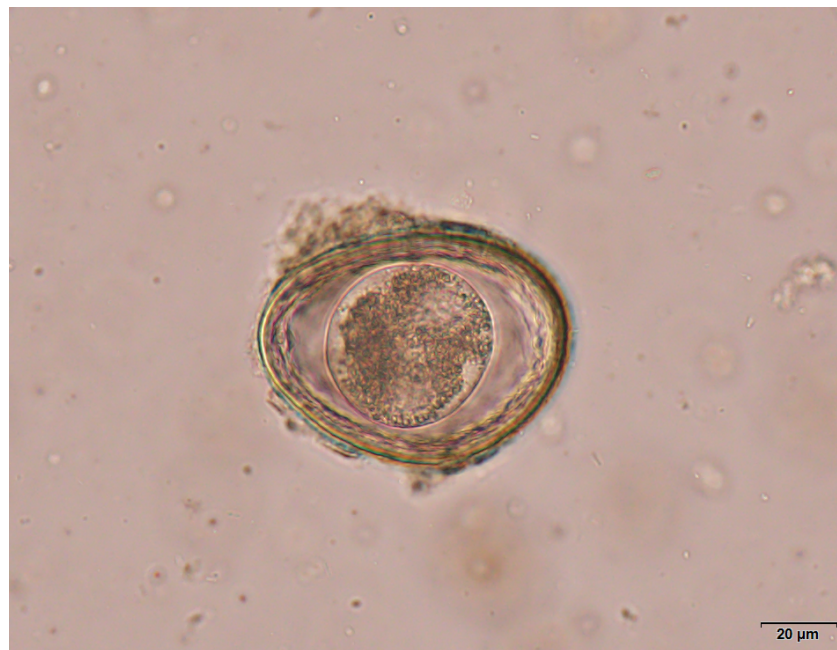
4.2.2. Mikroskopie spór mikrosporidií barvených dle Vávry-Chalupského

Všechny barvené nátěry metodou dle Vávry-Chalupského byly negativní.

4.2.3. Koncentrační metody

4.2.3.1. Flotace dle Sheathera a sedimentace AMSIII

Flotací dle Sheathera a sedimentací AMSIII bylo vyšetřeno všech 130 vzorků výkalů psů, z nichž pozitivní byl pouze jeden (prevalence 0,8 %). V tomto vzorku ze Svalbardu byla nalezena silná infekce *Toxocara canis* (Obr. 5)



Obr. 5: Vajíčko *Toxocara canis*, zvětšení 200×.

4.3. Molekulární metody

Při zjišťování přítomnosti DNA rodu *Cryptosporidium* nebyly pozitivní žádné vzorky. Při zjišťování přítomnosti mikrosporidií byly 4 vzorky pozitivní na přítomnost DNA *E. bienensi* (prevalence 3,1 %). Všechny pocházely ze vzorků odebraných z tažných psů na Svalbardu. U žádného vzorku nebyla zjištěna přítomnost více druhů parazitů najednou. Přítomnost DNA mikrosporidie *E. cuniculi* a giardií nebyla potvrzena ani v jednom ze zkoumaných vzorků.

Sekvence a fylogenetická analýza potvrdila přítomnost genotypu mikrosporidií *E. bienensi* (Obr. 6). Tento genotyp byl již nalezen ve výkalech psů ze Svalbardu (Brož 2016). Podle dělení *E. bienensi* do skupin dle Thelliera a Bretona podle hostitele spadají tyto sekvence do skupiny tzv. Outliers, do které byly doposud zařazeny pouze dva genotypy PtEbIX a EntCanA, oba izolované z výkalů psů (Mathis et al. 1999, Lobo et al. 2000). Analýza meziskupinové nukleotidové diverzity potvrdila, že v rámci skupiny „psi“ byla zjištěna nulová nukleotidová diverzita. Oproti tomu porovnání skupiny „psi“ se skupinou referenčních sekvencí prokázalo odlišnost. Průměrný nukleotidový rozdíl mezi skupinami je 29,6 % (Tab. 1).

Tab. 1: Porovnání meziskupinové nukleotidové diverzity.

	psi	referenční sekvence
Průměrný počet nukleotidových rozdílů; k	0	16,85
Nukleotidová diverzita; Pi	0	0,07
Průměrný počet nukleotidových rozdílů mezi skupinami	94,97 (29,6 %)	

5. Diskuse

Předložená práce navazuje na výsledky bakalářské práce (Brož 2016). Bylo vyšetřeno větší množství vzorků a zařazeny nové metody průkazu parazitů, zejména molekulární diagnostika a fylogenetika. Podařilo se získat několik vzorků výkalů psů z Grónska a rozšířit sběr vzorků na Svalbardu o další lokality. Kromě mé předchozí studie nebyli psi v těchto oblastech parazitologicky vyšetřováni. Přitom právě oni mohou do těchto oblastí zavléci nové druhy parazitů přenosných nejenom na člověka, ale také na volně žijící zvířata. Od volně žijících zvířat pak mohou některé parazity přijmout.

Parazitofauna tažných psů je podobná parazitofauně ostatních psů používaných k jiným účelům. Většinou jde o hostitelsky specifické parazity, kteří se vyskytují u všech zástupců čeledi Canidae. Již v úvodu zmíněné studie o výskytu parazitů u psů v Kanadě (Unruh 1973, Villeneuve 2015) potvrzují přítomnost těchto parazitů i v arktických oblastech. Kromě již zmíněné Kanady nejsou k dispozici publikované údaje o parazitech tažných psů z jiných částí Arktidy. Ve srovnání s Kanadou jsou námi sledované oblasti geograficky izolovanější, jde o ostrovy vzdálené od pevniny. Také biodiverzita fauny je na Svalbardu i v Grónsku podstatně nižší, proto lze předpokládat, že parazitofauna v těchto oblastech bude chudší než v Kanadě. Zoonotický potenciál nalezených parazitů v Kanadě zdůraznil nutnost věnovat se psovitým šelmám v Arktidě a posuzovat je jako možný zdroj parazitů přenosných na člověka.

Na Svalbardu byl intenzivně studován výskyt tasemnice *Echinococcus multilocularis*. Její mezihostitel, hraboš *M. mystacinus* byl na Svalbard zavlečen pravděpodobně mezi lety 1920 a 1960 na lodích, přivážejících ze Sovětského svazu pícninu pro zvířata do ruských osad. Této problematice se věnoval Henttonen (2001), který v letech 1999 a 2000 na Svalbardu odchytil 224 hrabošů a z toho 59 bylo infikováno *E. multilocularis*. Další tým vyšetřoval v letech 2000 a 2004 přítomnost tasemnice *E. multilocularis* ve vzorcích výkalů lišek. Celkem bylo vyšetřeno 473 vzorků a sérologicky pozitivní na echinokokózu bylo 142 vzorků, zejména z oblastí, kde se vyskytují infikovaní hraboši (Fuglei et al. 2008). Žádná práce se však nezabývala infekcí *E. multilocularis* u psů, i když je toto téma na Svalbardu stále velmi aktuální. Populace hrabošů se na Svalbardu stále vyskytují a riziko, že se výkaly nakažené lišky dostanou ke psům je velmi vysoké.

Detekce dospělců echinokoka ve výkalech psů by byla pozitivní, pokud by pes byl finálním hostitelem. Více pravděpodobným se jeví fakt, že psi by mohli být náhodným mezihostitelem po požití liščích výkalů – pak by infekce napadala vnitřní orgány (játra, mozek). Bohužel, zjistit infekci lze pouze pitvou, která se u psů na Svalbardu neprovádí. Není

tedy potvrzeno, zda k infekci psů jako náhodných mezihostitelů dochází. Mohlo by být zajímavé, kolik psů bylo takto nakaženo a vlivem této infekce uhynulo.

Tato práce potvrdila u tažných psů v Arktidě velmi nízkou prevalenci parazitů. Nutno podotknout, že z vyšetřených 6 vzorků z Grónska nelze vyvozovat závěry, neboť jde o velmi malý vzorek. Bohužel se nepodařilo získat větší množství vzorků. Na Svalbardu bylo odebráno a vyšetřeno 124 vzorků. Předpokládaným nálezem byly mikrosporidie a kryptosporidie, které byly u psů na Svalbardu zjištěny již v mé bakalářské práci. Kryptosporidie však tentokrát nalezeny nebyly vůbec a mikrosporidie pouze u 4 psů (prevalence 3,1 %, ve vzorcích použitých v bakalářské práci bylo 7 pozitivních vzorků z 36 vyšetřovaných, tedy prevalence 19,4 %) (Brož 2016). Mikroskopicky se spóry mikrosporidií nepodařilo prokázat, což je situace u mikrosporidiových infekcí zdravých hostitelů častá. DNA mikrosporidií *E. bieneusi* byla prokázána ve vzorcích ze dvou různých psích stanic. Vzhledem k možnostem přenosu mikrosporidií se psi pravděpodobně infikují navzájem. Další cestou přenosu je možnost kontaminace vody či granulí výkaly. Infekce mezi psy ze dvou různých psích stanic je také možná, protože trasy jejich cest jsou téměř stejné pro všechny společnosti zabývajícími se turistikou s využitím psích spřežení na Svalbardu. Genotyp, který byl nalezen v této studii, je podobný genotypu nalezenému ve Švýcarsku, kde 3 z 36 psů chovaných na farmě byli pozitivní. Tento nález byl popsán jako nový genotyp (Mathis et al. 1999). Stejný genotyp byl nalezen i u jednoho psa v Portugalsku (Lobo et al. 2006) a mých 7 pozitivních vzorků z bakalářské práce je taktéž identických. Podle dělení genotypů *E. bieneusi* do skupin podle hostitele jde o tzv. skupinu „Outliers“, které fylogeneticky leží na odlišné větvi, než zbytek genotypů (Thellier a Breton 2008). Přikláním se k názoru, že samostatné genotypy by neměly být popisovány, pokud se jejich sekvence liší pouze v několika nukleotidech. Tato situace je ale u *E. bieneusi* v případě genu ITS běžná. Zjištěný genotyp se taktéž liší od genotypů nalezených u zvířat žijících ve volné přírodě (sobi, husy, arktická liška a racek) a také od genotypu nalezeného ve zbytcích trusu v místě bývalé drůbežárny a vepřína v opuštěném hornickém městečku Pyramiden, Svalbard (Myšková 2014, Honsová 2012). Odlišnost sekvencí *E. bieneusi* izolovaných z výkalů psů od ostatních sekvencí zobrazuje Příloha II. Tato odlišnost byla prokázána i statisticky, viz Tab. 1.

Častými parazity psů bývají helminti: tasemnice a hlístice. Nízký počet těchto parazitů u tažných psů je důsledkem častého používání preventivní dehelmintizace a nízkým počtem či dokonce absencí potenciálních mezihostitelů a paratenických hostitelů. Jediný pes, v jehož vzorcích výkalů byla nalezena vajíčka *T. canis* (prevalence 0,8 %) pochází z vrhu na Svalbardu, takže infekce musí pocházet odsud. Dospělé psy škrkavka *T. canis* téměř

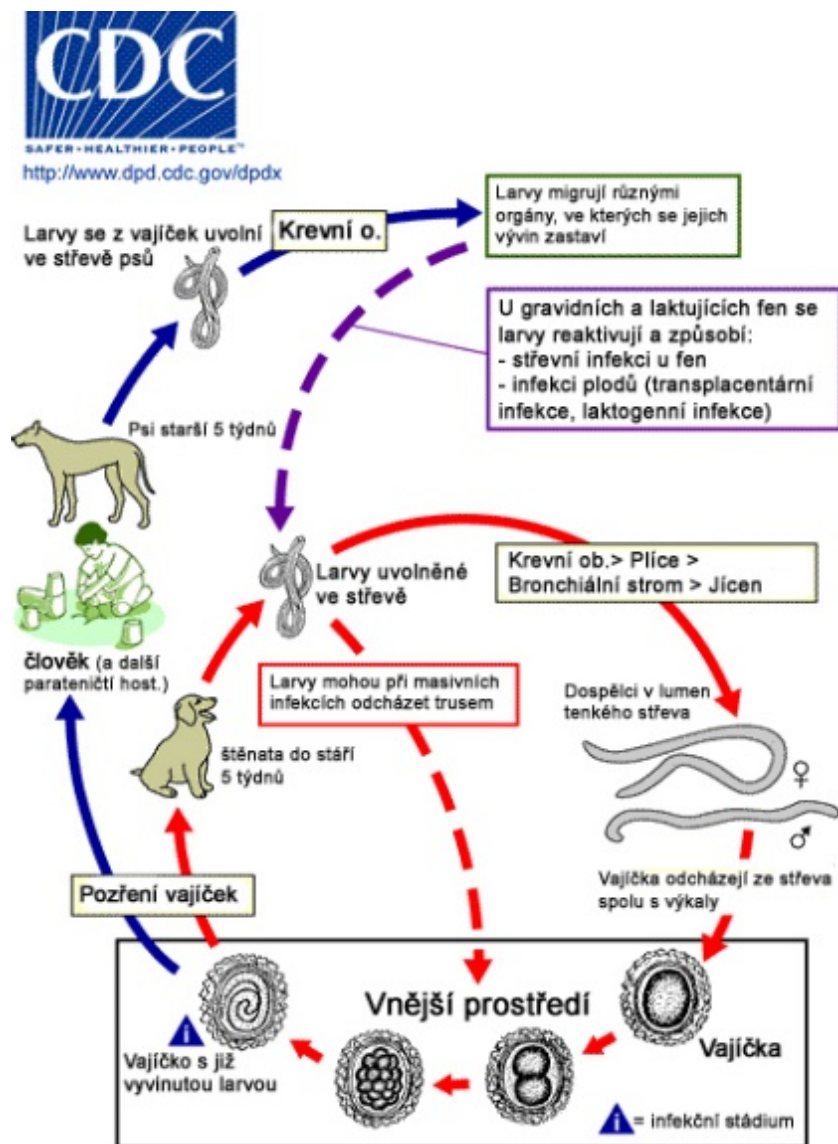
neohrožuje, většina infekcí probíhá bez příznaků. Problém však může nastat v případě štěňat, která se v chovech psů na Svalbardu vyskytují v hojném počtu. Nejnebezpečnější jsou pro štěňata transplacentární a laktogenní infekce, které mohou vést k jejich úhynu během prvních dnů života. Od 2. až 3. týdne stáří štěňat se škrkavky nacházejí ve střevě. Migrující larvy škrkavek v plicích vyvolávají zánět plic, který se projevuje kašlem a výtokem z nosu. Přítomnost dospělých škrkavek ve střevě štěňat může způsobit totální neprůchodnost střev a vést až k ruptuře střeva. Štěňata v takovémto případě mají zvětšené, bolestivé tzv. škrkavkové břicho. Dochází k častému zvracení a průjmu. z dalších příznaků lze pozorovat vyhublost, nechutenství, apatii, matnou srst, křeče až epileptické záchvaty. Slabé infekce probíhají většinou bez výraznějších klinických příznaků (Svobodová et Svoboda 1995).

Člověk jakožto paratenický hostitel se může nakazit pozřením vajíček *T. canis* s infekčními larvami z prostředí nebo přímo larvami od jiného paratenického hostitele (například při konzumaci tepelně neupraveného masa a orgánů zvířat nebo mazlením se se psy). Podobně jako u ostatních paratenických hostitelů, škrkavky v lidském těle migrují různými tkáněmi, ale nikdy nedospějí. Onemocnění vyvolávané migrujícími larvami se nazývá larvální toxokaróza. V odborné literatuře se pro označení migrujících larev v organismu užívá pojem *larva migrans*. Larvy *T. canis* jsou krevním oběhem roznášeny do různých orgánů, kde vyvolávají zánětlivou reakci a vznik granulomů. Larvy u člověka mohou být lokalizovány v játrech, plicích nebo v mozku. V tomto případě se užívá pojem *larva migrans visceralis*. Larvy *Toxocara* spp. mají rovněž vysokou afinitu k oku (*larva migrans ocularis*). Přítomnost larev v oku může narušit sítnici a vést až ke ztrátě zraku. Na základě epidemiologických dat je patrné, že larvální toxokaróza u lidí je vždy ve formě orgánové, oční anebo bezpříznakové. Zatímco u dětí do pěti let je typická orgánová forma, u starších dětí (nad pět let) a dospělých převažuje forma oční (Despommier 2003).

Pro psy jsou zdrojem vajíček výkaly jiných psů, zejména pak štěňat. Vajíčka se s nimi dostávají do půdy, kde se kumulují. V půdě vydrží životaschopná až 3 roky (Svobodová et Svoboda 1995). V prostředí mohou být vajíčka škrkavek rozptýlena vodou, činností kroužkoců a mechanickým přenosem na zobáčích a nohou ptáků (Despommier 2003).

Teplota a vlhkost jsou hlavními faktory, které ovlivňují životaschopnost larev a vajíček škrkavek ve vnějším prostředí. V půdě, kde se drží konstantní vlhkost, vajíčka vydrží déle životaschopná než na písčovitých a jiných suchých exponovaných místech, kde vajíčka při slunečných dnech rychle vysychají, a stávají se neinfekčními. Vajíčka jsou citlivá na teploty pod bodem mrazu, ale oproti tomu vydrží i relativně vysoké teploty (kolem 40 °C). Při teplotách -5 °C vajíčka ztrácejí životaschopnost a larvy hynou. Experimentálně bylo

prokázáno, že viabilita vajíček se snižuje při dlouhodobé teplotě pod $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ (O'Lorcain 1995). Přesto však v kanadském Montrealu, kde teploty v zimě klesají na $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$, je 32,5 % vzorků půdy pozitivních na přítomnost vajíček *T. canis* (Gillespie 1988).



Obr. 8: Životní cyklus hlístice *T. canis*. Zdroj: CDC, upraveno

Vajíčka *T. canis* byla také nalezena ve vzorcích výkalů polárních lišek právě ze Svalbardu (Myšková 2014). Na Svalbardu můžeme nalézt u volně žijících zvířat i jiné helminty. Při vyšetření vzorků výkalů lišek byla nalezena vajíčka helmintů *Eucoleus aerophilus*, *Toxascaris leonina* a *Uncinaria stenocephala*. Ve vzorcích výkalů sobů byla prokázána vajíčka hlístic čeledi Trichostrongyloidae, *Capillaria* sp. a *Moniezia* sp. Ve výkalech medvěda ledního byla nalezena vajíčka hlístice *Baylisascaris transfuga* (Myšková 2014). Nalezení parazitů lišek

a medvědů jsou přenosní na psy i na člověka. Studie Unruha a Villeneuve, kdy bylo množství nalezených vajíček helmintů podstatě vyšší, potvrzuje schopnost přežívání helmintů i v arktických oblastech.

Psi se na Svalbardu musejí veterinárně kontrolovat jak v případě dovozu, tak i v případě štěňat narozených přímo tam (Anonymous 2016). Rutinní parazitologické vyšetření psů nezahrnuje jednobuněčné parazity (Protista). Vzhledem k tomu, že při standardní kontrole nelze detekovat mikrosporidie, lze předpokládat, že minimálně jeden ze psů přivezl infekci z kontinentální Evropy. Parazitologické vyšetření psů by se nemělo vyžadovat pouze kvůli tasemnicím a hlísticím, ale také proto, že výskyt *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon cuniculi* a *Cryptosporidium canis* může být rizikem pro polární lišky (*V. lagopus*), které jsou na Svalbardu běžné a riziko setkání infekčního psa s liškou je velmi vysoké. Liška je schopna urazit velké vzdálenosti, a proto hrozí riziko šíření mikrosporidiových infekcí i do jiných oblastí Arktidy. Zjištěný genotyp *E. bieneusi* byl sice zatím nalezen pouze u psů, ale přenos na jiné druhy zvířat není vyloučen. U lišek v USA byl nalezen jiný genotyp této mikrosporidie, spadající spíše do skupiny genotypů, které byly nalezeny u volně žijících zvířat na Svalbardu (Sulaiman et al. 2003b). V této práci, ani v pracích předchozích nebyl potvrzen výskyt *E. cuniculi* u psů na Svalbardu. Tento parazit způsobil velké ztráty štěňat na liščích farmách v Norsku. Encephalitozoonóza se rozvíjí u lišek 1-3 měsíce po narození (Åkerstedt 2002). Pokud by se tímto parazitem nakazily volně žijící lišky, lze očekávat podobný problém s úhynem mláďat. Lišky jsou také velmi zranitelné v případě nákazy *Cryptosporidium canis*, která byla potvrzena u psů v chovech na Svalbardu v mé bakalářské práci. Lišky, stejně jako psi a lidé, trpí při této infekci velmi silnými průjmy (Zhang et al. 2016). Mikrosporidie *E. bieneusi*, jako příčina oportunních infekcí, může být také rizikem pro lidi, zejména pro imunodeficientní jedince. Vzhledem k rozmáhajícímu se turismu je možné, že by se člověk s imunodeficiencí na Svalbardu mohl vyskytovat a pokud by přišel do kontaktu s infekčními psy, riziko nákazy zde existuje. Na druhou stranu, extrémní podmínky, které na Svalbardu zejména v zimě panují, zapříčinily, že zde trvale nežijí lidé s nádorovým onemocněním, pacienti léčení imunosupresivou po transplantaci orgánů či pacienti s AIDS. Riziko nákazy imunodeficientního jedince je v případě místních obyvatel nízké. Byly však zaznamenány případy, kdy i imunokompetentní pacienti měli klinické příznaky infekce mikrosporidii (Weber et Bryan 1994, Ditrich et al. 2011).

Zajímavé je, že se v této práci nepodařilo zachytit infekci *C. canis*, která byla prokázána u jednoho psa v předchozí práci. Pochopitelně může jít o náhodu, ale vzhledem k faktu, že kryptosporidie jsou velmi limitovány nízkou teplotou, mohlo dojít k „vymrznutí“ infekce.

Životaschopnost kryptosporidií se velmi snižuje již při teplotách pod 5 °C, a chladné zimy na Svalbardu tak oocysty ve výkalech eliminují.

Ani jeden ze 6 vyšetřených vzorků výkalů psů z Grónska nepotvrdil přítomnost parazitů u těchto psů. Výsledek analýz na těchto vzorcích nelze brát v potaz, vzhledem k nízkému počtu vyšetřených vzorků. Je však velmi pravděpodobné, že hlístice *T. canis* i mikrosporidie prokázané v této práci jsou schopné přežít i v Grónsku, vzhledem k podobné geografické poloze.

Ačkoliv je tedy prevalence střevních parazitů u tažných psů v Arktidě nízká, potenciální riziko přenosu na volně žijící faunu či lidi existuje. Podobné spektrum parazitů jako na Svalbardu by se mohlo vyskytovat i v Grónsku a na dalších málo obydlených ostrovech vysoké Arktidy. Problémem by mohly být zejména infekce *T. canis*, jejíž vajíčka a larvy dokáží přežít ve volném prostředí i relativně drsné podmínky a vzhledem k oteplování Arktidy bude přežívání larev a vajíček během letní sezóny mnohem snazší. Opatrnost je na místě i v případě infekcí mikrosporidii, které byly konkrétně na Svalbardu prokázány opakovaně.

6. Závěry

- 1) Ve vzorcích výkalů psů z Grónska nebyly prokázány žádné parazitární infekce.
- 2) V jednom vzorku výkalů psa ze Svalbardu byla zachycena silná infekce *Toxocara canis*, potenciálně přenosná na člověka či volně žijící zvířata.
- 3) Genotypizace mikrosporidie *Enterocytozoon bieneusi* nalezené i v předešlé práci odhalila neobvyklý genotyp, vzácně se vyskytující u psů na evropském kontinentu.
- 4) Opakované nálezy tohoto genotypu v této studii svědčí o dlouhodobém přetrvávání mikrosporidiové infekce psů na Svalbardu.
- 5) Parazitofauna vyšetřených psů je mimořádně nízká.
- 6) I když jsou nalezení paraziti potenciálně přenosní na autochtonní faunu, dosavadní výsledky analýz tyto přenosy nepotvrzují.

7. Seznam použité literatury

Åkerstedt, J. (2002). An indirect ELISA for detection of *Encephalitozoon cuniculi* infection in farmed blue foxes (*Alopex lagopus*). *Acta Veterinaria Scandinavica* 43: 211.

Brož, M. (2016). Střevní paraziti savců introdukovaných na Svalbard. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 41pp.

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.

Despommier, D. (2003). Toxocariasis: clinical aspects, epidemiology, medical ecology, and molecular aspects. *Clinical microbiology reviews* 16: 265-272.

Didier, E. S., Vossbrinck, C. R., Baker, M. D., Rogers, L. B., Bertucci, D. C., Shaddock, J. A. (1995). Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* 111: 411-421.

Ditrich, O., Chrdle, A., Sak, B., Chmelík, V., Kubále, J., Dyková, I., Kváč, M. (2011). *Encephalitozoon cuniculi* genotype i as a causative agent of brain abscess in an immunocompetent patient. *Journal of clinical mikrobiology* 7: 2769-2771.

Drivsholm, L. S. (2017). Greenland's sled dog population is decreasing rapidly. Science Nordic. Dostupné online z: <http://sciencenordic.com/greenlands-sled-dog-population-decreasing-rapidly> (staženo 11.9.2018)

Fuglei, E., Stien, A., Yoccoz, N. G., Ims, R. A., Eide, N. E., Prestrud, P., Oksanen, A. (2008). Spatial distribution of *Echinococcus multilocularis*, Svalbard, Norway. *Emerging Infectious Diseases* 14: 73.

Gillespie, S. H. (1988). The epidemiology of *Toxocara canis*. *Parasitology Today* 4: 180-182.

Guindon, S., Dufayard, J. F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology* 59: 307-321.

Henttonen, H., Fuglei, E., Gower, C.N., Haukisalmi, V., Ims, R.A., Niemimaa, J., Yoccoz, N.G. (2001). *Echinococcus multilocularis* on Svalbard: Introduction of an intermediate host has enabled the local life-cycle. *Parasitology* 123: 547-552.

Honsová, L. (2012). Výskyt potenciálních původců parazitárních zoonóz na Svalbardu. České Budějovice. Bakalářská práce. Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích. 77pp.

Hunter, G. W., Frye, W. W., Swartzwelder, J. (1960). A Manual of Tropical Medicine. *A Manual of Tropical Medicine* 3: 222.

Choquette, L. P. E., Gibson, G. G., Kuyt, E., Pearson, A. M. (1973). Helminths of wolves, *Canis lupus* L., in the Yukon and Northwest Territories. *Canadian Journal of Zoology* 51: 1087-1091.

- Krembs, Ch. (2006). Organisms that thrive in Arctic sea ice. National Oceanic and Atmospheric Administration. Dostupné online z www.arctic.noaa.gov (Staženo 1. 11. 2018)
- Jiang, J., Alderisio, K. A., Xiao, L. (2005). Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4446-4454.
- Katoh, K., Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular biology and evolution* 30: 772-780.
- Katzwinkel-Wladarsch, S., Lieb, M., Helse, W., Löscher, T., Rinder, H. (1996). Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine and International Health* 1: 373-378.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28: 1647-1649.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution* 16: 111-120.
- Kramer, M. H., Eberhard, M. L., Blankenberg, T. A. (1996). Respiratory symptoms and subcutaneous granuloma caused by mesocercariae: a case report. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 55: 447-448.
- Lobo, M. L., Xiao, L., Cama, V., Stevens, T., Antunes, F., Matos, O. (2006). Genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in mammals in Portugal. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53: 61-64.
- MacLean, J. D., Ward, B. J., Kokoskin, E., Arthur, J. R., Gyorkos, T. W., Curtis, M. A. (1996). Common-source outbreak of acute infection due to the North American liver fluke *Metorchis conjunctus*. *The Lancet* 347: 154-158.
- Markell, E. K., John, D. T., Krotoski W. A. (1999). Markell and Voge's medical parasitology. 8th ed. Philadelphia: Saunders, 501 pp.
- Mathis, A., Breitenmoser, A. C., Deplazes, P. (1999). Detection of new *Enterocytozoon genotypes* in faecal samples of farm dogs and a cat. *Parasite* 6: 189-193.
- Mech, L. D., Cluff, H. D. (2011). Movements of wolves at the northern extreme of the species' range, including during four months of darkness. *Public library of Science one* 6: 253.
- Meyer, Ch. (2016). This is Svalbard 2016: What the figures say. Oslo: Statistic Norway. 28pp.
- Miláček, P., Vítovec, J. (1985). Differential staining of *Cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia parasitologica*. 30-52.
- O'Lorcain, P. (1995). The effects of freezing on the viability of *Toxocara canis* and *T. catiembryonated* eggs. *Journal of helminthology* 69: 169-171.

- Rausch, R., Williamson, F. S. (1959). Studies on the helminth fauna of Alaska. XXXIV. The parasites of wolves, *Canis lupus* L. *The Journal of parasitology*: 395-403.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E., Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 34: 3299-3302.
- Serreze, M., Holland, M., Stroeve, J. (2007). Perspectives on the Arctic's shrinking sea-ice cover. *Science* 315: 1533–36.
- Sheather, A. L. (1923). The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *Journal of Comparative Pathology* 36: 266-75.
- Sonne, C., Langebæk, R., Dietz, R., Andersen-Ranberg, E., Houser, G., Hansen, A. J., Meldgaard, M. (2018). Greenland sled dogs at risk of extinction. *Science* 360: 1080-1080.
- Stange, R. (2012). Spitsbergen – Svalbard. a complete guide around the arctic archipelago. Stange. 512 pp.
- Sulaiman, I. M., Fayer, R., Bern, C., Gilman, R. H., Trout, J. M., Schantz, P. M., Das, P., Lal, A. A., Xiao, L. (2003a). Triphosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerging Infectious Diseases* 9: 1444-1452.
- Sulaiman, I. M., Fayer, R., Lal, A. A., Trout, J. M., Schaefer, F. W., Xiao, L. (2003b). Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals harbor host-adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. *Applied and environmental microbiology* 69: 4495-4501.
- Svoboda, J. (2017). Arktida mladá a živá. *Vesmír* 96. Dostupné online na www.vesmir.cz (staženo 5.11.2018)
- Svobodová, V.; Svoboda, M. (1995). Klinická parazitologie psa a kočky. Brno: ČAVLMZ, 238pp.
- Thellier, M., Breton, J. (2008). *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 15: 349-58
- Umbreit, A. 2005. Spitsbergen: Svalbard, Franz Josef Land, Jan Mayen. 3. edition. Chalfont St. Peter, Bucks. Bradt Publications. 288pp.
- Unruh, D. H. A., King, J. E., Allen, J. R., Eaton, R. D. P. (1973). Parasites of dogs from Indian settlements in northwestern Canada: a survey with public health implications. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 37: 25.
- Vávra J., Chalupský J., (1982). Fluorescence staining of “Calcofluor White M2R”. *Journal of Protozoology* 29: 503.
- Vikaune, A. (2018): Osobní sdělení, červenec 2018.
- Villeneuve, A., Polley, L., Jenkins, E. J., Schurer, J. M., Gilleard, J., Kutz, S., Conboy, G., Benoit, D., Seewald, W., Gagné, F. (2015). Parasite prevalence in fecal samples from shelter dogs and cats across the Canadian provinces. *Parasites & Vectors* 8: 28-32.

Weber, R., Bryan, R. T. (1994). Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patients. *Clinical Infectious Diseases* 19: 517-521.

Zhang, X. X., Cong, W., Ma, J. G., Lou, Z. L., Zheng, W. B., Zhao, Q., Zhu, X. Q. (2016). First report of *Cryptosporidium canis* in farmed Arctic foxes (*Vulpes lagopus*) in China. *Parasites & vectors* 9: 126.

PŘÍLOHA I Primery použité v této práci

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

PŘÍLOHA II Přehled nukleotidových neshod v sekvencích *Enterocytozoon bieneusi*

