

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Biologie

Zoologie



Bc. Sylvie Dlugošová

Hematologická variabilita a její souvislost s gastroinstestinální mikrobiotou u papoušků
(Psittaciformes)

Variability in selected haematological traits related to gastrointestinal microbiota in parrots
(Psittaciformes)

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Michal Vinkler, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2. ledna 2020

Podpis:

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala především RNDr. Michalu Vinklerovi, Ph.D. nejen za vedení diplomové práce a poskytnutí cenných odborných rad, ale také za ochotu a trpělivost.

Dále děkuji spolupracujícím veterinárním lékařům, a to zejména MVDr. Veronice Grymové za poskytnutí spolupráce po celou dobu projektu a zprostředkování značného množství pacientských vzorků a MVDr. Zoře Knotkové za předání odborných rad ohledně hematologických metod a poskytnutí výsledků hematologických analýz a diagnostických výsledků získaných od spolupracujících komerčních laboratoří. Za ochotu a spolupráci dále děkuji MVDr. Janu Pokornému a MVDr. Martinu Karešovi. Poděkování patří též chovatelům exotického ptactva, kteří nám poskytnuli své chovance k odběru vzorků.

Za pomoc při zpracování bioinformatické analýzy mikrobiologické části diplomové práce bych ráda poděkovala Mgr. Jakubu Kreisingerovi, Ph.D. a Mgr. Lucii Schmiedové.

Dále děkuji Mgr. Tereze Krajzingrové za pomoc ohledně statistického zpracování hematologických dat.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, jež mi studium na univerzitě umožnila a svému příteli, jenž mi byl neuvěřitelnou podporou.

Tato práce vznikla s podporou grantu PRIMUS/17/SCI/12.

Abstrakt

Tisíce papoušků po celém světě trpí nemocemi a dalšími zdravotními komplikacemi, které mohou mít základ v interakci mezi jejich imunitním systémem a bakteriemi v jejich trávicím traktu. Předkládaná diplomová práce si klade za cíl pochopit souvislosti mezi projevy těchto zdravotních problémů, buněčným složením krve a skladbou gastrointestinální mikrobioty u papoušků. Hematologické vyšetření bylo provedeno u 198 krevních vzorků 53 druhů papoušků. Složení mikrobioty bylo stanovenou kombinací molekulárního přístupu sekvenace bakteriálního genu pro 16S rRNA ze 132 vzorků trusu, 12 vzorků střev, 228 kloakálních výtěrů a 236 výtěrů zobáku odebraných celkem z 61 papouščích druhů a diagnostického přístupu analýzou fekálních nátěrů Gramovou metodou. Byla zjištěna signifikantní závislost hematologických parametrů na individuálních, environmentálních a klinických faktorech a zároveň jejich značná mezidruhová variabilita. Hodnoty absolutního počtu heterofilů a lymfocytů se ukázaly jako užitečnější pro monitorování průběhu infekčních a autoimunitních onemocnění papoušků než hodnoty H/L poměru. Nejkvalitnějším ukazatelem pro sledování projevů poruch chování byly hodnoty relativního počtu bazofilů. Byl odhalen efekt bakteriální čeledi Flavobacteriaceae, jako součásti orální mikrobioty, a bakterií *Escherichia*, či *Shigella*, přítomných v bakteriálních komunitách v kloace, na hodnoty H/L poměru. Analýza hlavních koordinát založená na Bray-Curtisově distancích poukázala k jasné nekonzistenci ve složení mezi mikrobiotou v orálních výtěrech a ostatních mikrobiologických vzorkách. Naopak vzorky z různých částí střeva vykázaly ve složení mikrobioty značnou spojitost. Zjistili jsme též výraznou vnitrodruhovou i mezidruhovou variabilitu v mikrobiálním složení vzorků trusu a kloakálních výtěrech. Závěry této práce jsou nejenom přínosem pro základní výzkum evoluce imunologických adaptací, ale zároveň mohou mít praktický aplikační potenciál ve veterinární a zoohygienické praxi.

Klíčová slova: Psittaciformes, Hematologie, Mikrobiota, 16S rRNA

Abstract

Thousands of parrots all over the world suffer from illnesses and medical complications that can result from interactions between their immune system and bacteria in their digestive tract. The aim of this master's thesis is to understand the link between symptoms of these medical issues, the composition of blood and gastrointestinal microbiota in parrots. Using the hematological methods, 198 blood samples representing 53 parrot species were analyzed. The composition of microbiome was defined by combination of a molecular approach using bacterial 16S rRNA gene sequencing in 132 fecal samples, 12 intestine samples, 228 cloacal swabs and 236 beak swabs representing in total 61 parrot species and a diagnostic approach by psittacine fecal Gram's stain method. Significant association of hematological parameters with individual, environmental and clinical factors was observed, as well as its considerable interspecific variability. Absolute heterophile and lymphocyte counts have been shown more useful for infectious and autoimmune disease monitoring than H/L ratio. Relative numbers of basophiles were the best indicator for behavioral disorders. In relation to hematological parameters, the effect of the bacterial family Flavobacteriaceae, as part of the oral microbiota, and the bacteria *Escherichia* or *Shigella*, presented in the bacterial communities in cloaca, on the H/L ratio was revealed. Principal component analysis based on Bray-Curtis distance metric indicated that the oral swab microbiota differed from all other parrot microbiota samples. In contrast, all intestinal specimens have shown considerable consistency in their taxonomic composition. Among fecal, cloacal and oral microbiota, intra- and interspecific variability in composition has been revealed. In conclusion, these results provide useful information for the basic evolutionary-immunological research as well as having practical potential in veterinary and zoohygienic practice.

Keywords: Psittaciformes, Hematology, Microbiota, 16S rRNA gene

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Hematologie	1
1.2	Mikrobiota	4
1.3	Cíle práce	6
2	Vzorky a datový soubor	8
2.1	Experimentální zvířata	8
2.2	Postup sběru dat a vzorků	8
2.2.1	Odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu	9
2.2.2	Odběr vzorků pro hematologickou analýzu	10
2.3	Charakteristika datasetu.....	12
3	Metodika	17
3.1	Molekulární determinace pohlaví.....	17
3.2	Hematologická analýza	18
3.2.1	Absolutní počet erytrocytů a leukocytů	18
3.2.2	Diferenciální počet leukocytů	20
3.2.3	Hematokrit, koncentrace hemoglobinu a MCHC.....	21
3.2.4	Statistická analýza	23
3.3	Analýza složení gastrointestinální mikrobioty	26
3.3.1	DNA metabarcoding.....	26
3.3.2	Analýza fekálních nátěrů Gramovou metodou	29
4	Výsledky	32
4.1	Hematologická analýza	32
4.1.1	Faktory ovlivňující hematologický stav papoušků	35
4.1.2	Vliv fylogeneze na hematologické parametry	49
4.2	Analýza složení gastrointestinální mikrobioty	59
4.2.1	Konzistence ve složení bakteriálních komunit.....	60
4.2.2	Komparativní analýza.....	68
4.2.3	Závislost bakteriálních OTU na hematologických parametrech	69
5	Diskuze	73
5.1	Hematologická analýza	73

5.2	Analýza složení gastrointestinální mikrobioty	81
6	Závěr.....	84
7	Seznam termínů.....	85
8	Seznam tabulek.....	87
9	Seznam grafů.....	88
10	Seznam obrázků.....	88
11	Seznam literatury	89
12	Přílohy	99

1 Úvod

Papoušci (Psittaciformes) jsou socioekonomicky důležitá skupina domácích, nikoliv však ve většině případů domestikovaných, ptáků, kteří představují reálné riziko pro přenos některých infekčních onemocnění. Ročně je předmětem legálního mezinárodního světového obchodu 400 tisíc papoušků vzácných druhů zařazených do seznamu CITES (dostupný z: <https://trade.cites.org/>), celkový světový objem přepravovaných papoušků tak bude v řádu milionů jedinců ročně. Předkládaná diplomová práce si klade za cíl popsat vnitrodruhové a mezidruhové rozdíly ve vybraných hematologických znacích u papoušků, získat odpovídající data o variabilitě ve složení mikrobioty v zažívacím traktu papoušků a pokusit se najít vztah mezi imunologickou variabilitou zprostředkovovanou složením krevních buněk, kompozicí mikrobioty a zdravím vyšetřovaných jedinců. Aplikován bude komparativní přístup spočívající ve srovnání dat o mezidruhové i vnitrodruhové variabilitě. Zjištěné poznatky budou spojeny do uceleného závěru s ohledem na klinický a evolučně-ekologický kontext. Jelikož o souvislosti krevního složení s gastrointestinální mikrobiotou chovaných papoušků není takřka nic známo, tato diplomová práce má význam pro pochopení role variability pro imunologickou interakci papoušků s mikroorganismy.

1.1 Hematologie

Mezi obecně známé vlastnosti volně žijících papoušků patří jejich schopnost maskovat projevy onemocnění a prezentovat se tak před možným predátorem coby zdravý člen hejna (Briscoe, Rosenthal a Shofer 2010). S ohledem k povaze praktického vyšetření papoušků, které nebyvá zdaleka tolik vypovídající jako v případě jiných živočichů, nepodlehla tato charakteristika domestikaci, a laboratorní testování tak hraje významnou roli v upřesnění diagnózy, sledování zdravotního stavu papouščího pacienta a v ověření účinnosti terapeutického postupu (Sakas a Bauck 2002). Během tohoto testování bývají rutinně aplikovány hematologické metody sloužící k vyšetření hladiny hematokritu a koncentrace hemoglobinu, za účelem poukázání kupříkladu na možnou chudokrevnost, či s dehydratací spojenou erytrocytózu vyšetřovaného zvířete (Datta, Soni a Datta 1990, Velguth, Payton a Hoover 2010, Minias 2015). Pro účely morfologické klasifikace anémie je rovněž vhodné dopočítat erytrocytární index MCHC (Fudge 2000). V rámci hematologické analýzy se dále stanovují počty erytrocytů (červených krvinek) a leukocytů (bílých krvinek). Vzhledem

k morfologické (viz. kap. 3.2.2), vývojové a funkční (Hořejší et al. 2017) rozmanitosti bílých krvinek se kromě jejich absolutních počtů v krvi hodnotí i relativní zastoupení jejich jednotlivých morfologických subtypů, tzv. diferenciální počet leukocytů. Zvýšené, či snížené hodnoty všech či pouze konkrétních subtypů potom mohou indikovat určitý chorobný stav, přičemž za fyziologické jsou v případě ptáků obecně udávány hodnoty leukocytů uvedené v tabulce 1.1-I (Campbell a Ellis 2007, Fudge 2000). Při vztažení těchto parametrů na zástupce papoušků je však nutné vést v patrnost jejich vnitrodruhovou a mezidruhovou hematologickou variabilitu, a tedy i rozlišnost fyziologických hodnot pro jednotlivé krevní znaky (Fudge 2000). Přestože jsou tyto hodnoty zaznamenány pro některé papouščí druhy, nebyly popsány celoplošně napříč papouščí fylogenezí (Briscoe, Rosenthal a Shofer 2010, Drew, Joyner a Lobingier 1993, Polo et al. 1998, Vergneau-Grosset et al. 2016).

Tabulka 1.1-I. Fyziologická rozmezí hodnot krevních parametrů u ptačích taxonů (Campbell a Ellis 2007, Fudge 2000).

Hematologický parametr	Fyziologické rozmezí hodnot
Hematokrit (%)	35–55
Hemoglobin (g/l)	100 –180
Absolutní počet erytrocytů ($10^{12}/l$)	2,00–4,50
Absolutní počet leukocytů ($10^9/l$)	3,50–15,00
Lymfocyty (%)	25–45
Heterofily (%)	45–75
Eosinofily (%)	0–2
Bazofily (%)	0–1
Monocyty (%)	0–3

Lymfocyty lze zařadit mezi agranulocyty lymfoidní linie a jejich pokles pod fyziologickou mez u ptačích taxonů nejčastěji nastává v důsledku akutní virální infekce, kdy dochází k poškození Fabriciovy burzy (Chu et al. 2016, Hakimuddin et al. 2015, Maclachlan a Dubovi 2010), či při kortikosteroidy vyvolané imunosupresi (Isobe a Lillehoj 1992). Lymfocytóza je naopak pozorovatelná při chronických virových infekcích (Hawkey et al. 1982, Rosenberg et al. 1997, Godwin, Jacobson a Gaskin 1982, Fudge 2000), typická je též pro lymfoproliferativní neoplastická onemocnění (Rossi 1998, Coleman a Oliver 1994, Baker 1980). Leukocytóza však primárně nastává při zvýšeném množství heterofilních granulocytů v krvi. Cytochemicky se dají ptačí heterofily od savčích neutrofilů odlišit na základě chybějící peroxidázy a kyselé fosfatázy v granulech, jejich fagocytární aktivita však zůstává podobná (Daimon a Caxton-

Martins 1977). Heterofilie je často pozorovatelná v důsledku fyziologického stresu, jenž může nastat v souvislosti s transportem (McRee et al. 2018, Scope et al. 2002, Parga, Pendl a Forbes 2001, Gross a Siegel 1983), sníženým příjmem potravy (Maxwell, Hocking a Robertson 1992) či vystavením jedince chladu (M. H. Maxwell 1993). Zvýšení počtu heterofilů v ptačí periferní krvi však může sloužit jako indikátor zánětlivého onemocnění (Srinivasan et al. 2013), pozorovatelné je při bakteriální septikémii, akutní chlamydióze, tuberkulóze, či plísňových infekcích (Vaz et al. 2016, Salazar, Teves a Ii 2018, Sioson a Tacuboy 2017, Razmyar et al. 2016, V. Schmidt et al. 2008, Forbes, Simpson a Goudswaard 1992, Fudge 1997, Fudge 2000). Naopak heteropenie je v souvislosti s onemocněním v případě ptačích pacientů méně běžná (Donnelly et al. 2018, Canny et al. 1999), objevit se může v důsledku akutní cirkovirózy (Fudge 2000). Nižší poměr heterofilů k lymfocytům (H/L) je ovšem u některých druhů, například amazoňanů, obvyklý (Fudge 2000).

Monocytóza u ptáků primárně nastává v důsledku celkového zánětu, méně často jako odpověď na stres. Nárust monocytů v periferní krvi indikuje jejich zvýšený tok do tkání a transformaci na makrofágy (Campbell a Ellis 2007). Proto bývá nejčastěji monocytóza zpozorována jako průvodní jev chronických infekcí, tedy například u chlamydiózy, tuberkulózy, aspergilózy či mykobakteriózy (Salazar, Teves a Ii 2018, Razmyar et al. 2016, V. Schmidt et al. 2008, Forbes, Simpson a Goudswaard 1992) a v důsledku chronických granulomatozních zánětů (Ferrer et al. 1997, Hannon, Bemis a Garner 2012). Dalším ptačím leukocytárním subtypem jsou eosinofily, které mnohdy vnáší jistou formu zmatku nejen do procesu samotného hematologického vyhodnocování, ale i do následné klinické interpretace. Nejen, že existuje variabilita v morfologii eosinofilů v rámci jednotlivých druhů ptáků (Fudge 2000, Lucas a Jamroz 1961), což může způsobovat nesrovnanosti a chybovost v rámci laboratorních analýz, ale panují i nekonzistentní názory ohledně asociace nárustu počtu eosinofilů s parazitární nákazou (Drew, Joyner a Lobingier 1993). Přestože se vyskytují případy ptáků postižených parazitární infekcí se současnou eosinofilií, je pravděpodobné, že tento krevní stav nastal až sekundárně (Deem et al. 2005, Fudge 2000). Eosinofilie se také nekonzistentně objevuje jako důsledek poškození tkání, ovšem v případě kožní hypersenzitivity spojené s vytrháváním peří pozorovaná nebyla (Fudge 2000). Jiným typem granulocytů v periferní krvi ptáků jsou bazofily, jež jsou ve srovnání se složením savčí krve přítomné ve větších počtech, tyto počty se však liší i mezi druhy v rámci ptačích taxonů.

Jako efektorové buňky jsou bazofily schopné fagocytózy a degranulace, proto je nárůst jejich hodnot spojován s celkovým zánětem. Bylo popsáno, že bezofily reagují na chemotaktické lymfokiny a ve směru jejich gradientu migrují do místa zánětu (M. Maxwell a Robertson 1995). Silný stres v důsledku hladovění či přehřátí při transportu může také vést k nárůstu bazofilů (M. Maxwell 1993, M. Maxwell a Robertson 1995). Přestože jsou vyšší počty v rámci některých papoušků, například u rodu aratinga, běžné, obecně lze považovat výskyt bazofilů v periferní krvi papoušků za nezvyklý (Fudge 2000). Bazofilie se může objevit ve spojitosti s poškozením tkáně, u papoušků je však znatelná zejména v důsledku aktivního onemocnění chlamydiázou (Fudge 1997).

Hodnoty hematologických znaků, zejména pak H/L poměr, mají kromě diagnostického využití i význam pro ekologické výzkumy jako srovnávací nástroj k posouzení míry stresu (Hoi-Leitner et al. 2001), rozdílů mezi věkově odlišnými skupinami jedinců (Salvioli et al. 2006), či rozdílů mezi pohlavími (Ots, Murumägi a Hôrak 1998). Hladiny hematokritu byly potom vztaženy do souvislosti s výživovým stavem (Svensson a Merila 1996), energetickými výdaji (Saino et al. 1997) či pohlavím zkoumaných jedinců (Ots, Murumägi a Hôrak 1998). Analýza krevních parametrů tak našla uplatnění i jako posuzovací nástroj v rámci výzkumu adaptací na habitat (Ots, Murumägi a Hôrak 1998), dostupnosti potravy (Hoi-Leitner et al. 2001), migrace (Svensson a Merila 1996), či ornamentace a pohlavní selekce (Saino et al. 1997).

Hematologie tak kromě doplňkového využití pro posouzení zdravotního (Moreno et al. 1998), kondičního (Ewenson, Zann a Flannery 2001) či reprodukčního stavu (Merino a Barbosa 1997) může posloužit i jako širokospektrální srovnávací prostředek pro ekologicky zaměřené výzkumy.

1.2 Mikrobiota

Zažívací trakt živočichů je osídlen milióny fylogeneticky a metabolicky rozličných mikroorganismů, tzv. mikrobiotou (McFall-Ngai et al. 2013), které hrají zásadní roli v trávicích a imunologických procesech nezbytných pro zachování kondice a zdraví (Lee a Hase 2014). Tento stav je výsledkem milióny let probíhajícího procesu zvaného koevoluce,

tedy synchronizované evoluce mikrobioty s hostitelem (Giraud et al. 2001), kdy v souladu s přijímanou potravou a typem střeva (Ley et al. 2008) a v souvislosti s imunitním systémem (Sedaghat a Karimi Torshizi 2017, Slack et al. 2009) vznikají specifická bakteriální společenství. Evoluce dala vzniknout mnoha ptačím skupinám s různými anatomickými, fyziologickými a potravními specializacemi. Tento fakt činí ptáky zajímavými organismy pro studium hostitelsky asociovaných mikroorganismů, protože právě vysoká mezidruhová hostitelská diverzita pomáhá ke vzniku různě preferovaných podmínek pro široké spektrum rozličných mikroorganismů. Přesto je výzkum popisující vztah mikrobioty a zdraví zaměřený na ptáky jen zcela zřídka (Kreisinger et al. 2018) a pokud ano, největší pozornost je věnována domestikovaným kurům (Choi, Lee a Sul 2015), patrně z důvodů využití těchto zvířat jako zdroje potravy.

Tisíce papoušků různých druhů přitom žijí po celém světě v kontaktu s lidmi a jejich majitelé jsou vystavování trusu a dalším sekretům, jež mohou sloužit jako rezervoár patogenních organismů (Collins, Flanagan a Henning 2012, Xenoulis et al. 2010, Brilhante et al. 2010, Gomes et al. 2010, Thomas, Hunter a Atkinson 2007, Smith et al. 2005, Morishita et al. 1996, Spenser 1991, Panigrahy, Clark a Hall 1983, Britt, Howard a Rosskopf 1980, Panigrahy et al. 1979). V důsledku toho má studium jejich mikrobioty kromě evolučního aspektu vztahu hostitele a mikroorganismu význam i pro komunitu veterinární a humánní medicíny.

Při kompletním veterinárním vyšetření papoušků hraje významnou roli analýza fekálních nátěrů Gramovou metodou. Přestože nelze na jejím základě definitivně určit diagnózu, umožňuje okamžitý pohled na procentuální složení bakterií přítomných v gastrointestinálním traktu v době odběru vzorku trusu (Leboffe a Pierce 2011, Sakas a Bauck 2002, Gibbons et al. 2002). Běžná mikrobiota v zažívacím traktu papoušků, pozorována na fekálním nátěru barveném Gramovou metodou jako grampozitivní, tedy modře zabarvená, představuje jak aerobní, tak anaerobní zástupce bakterií (Ritchie et al. 1997, Bangert et al. 1988). Přestože nejběžnější patogenní druhy bakterií izolovány z trusu papoušků jsou gramnegativní, tedy červeně barvené, prezence nízkého množství gramnegativních bakterií ve fekálních vzorcích je považována za standardní. Populace s 10 % gramnegativních bakterií je tedy typicky zhodnocena jako v mezích normy (Sakas a Bauck 2002). Mezi běžnou komponentu střevní mikrobioty nestresovaného papouška

pozorovatelnou na fekálním nátěru však nepatří gramnegativní čeleď *Enterobacteriaceae* zahrnující jak druhy s patogenním potenciálem, kupříkladu *Salmonella* (Sawa et al. 1981, Panigrahy et al. 1979), *Acinetobacter* spp. (Ritchie et al. 1997), *Escherichia coli* (Becker Saidenberg et al. 2012, Graham a Graham 1978), tak druhy oportunistické (Ritchie et al. 1997).

V součtu lze uvést, že běžná kompozice aerobních bakterií v trusu papouščích jedinců je tvořena grampozitivními tyčinkami bakterií *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Corynebacterium* a *Streptomyces* sp. Dále grampozitivními koky bakterií *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecium durans*, *Aerococcus* a *Micrococcus* sp. a gramnegativními tyčinkami *Pseudomonas* sp., *Enterobacter cloacae*, *Alcaligenes faecalis*, *Flavobacterium odoratum*, *Klebsiella oxytoca* (Allegretti et al. 2014, Ritchie et al. 1997, Bangert et al. 1988).

1.3 Cíle práce

Ač jsou výše uvedená klinicko-ekologická odvětví hematologie a mikrobiologie široká a různorodá, rozhodla jsem se pro jejich propojení v ucelený výstup, zohledňující individuální, environmentální a klinické faktory u papoušků.

Mým primáním záměrem bylo prozkoumat vnitrodruhové a mezdruhové rozdíly ve vybraných hematologických znacích u papoušků a rovněž se pokusit zjistit, zda mohou mít tyto výsledky využití při určování veterinární diagnózy. Základem pro toto zjištění byla hematologická analýza zahrnující zejména vyšetření absolutního a relativního počtu různých typů leukocytů a dále určení koncentrace hemoglobinu, hladiny hematokritu a erytrocytárního indexu MCHC v krvi papoušků (v. kap. 3.2).

V souvislosti s aktuálním trendem masivního paralelního sekvenování, v důsledku čehož je dostupné velké množství kompletně osekvenovaných bakteriálních genomů, jsem se rozhodla pro určení taxonomického složení gastrointestinální mikrobioty u papoušků. Pro tento výzkum jsem využila sekvenaci bakteriálního genu pro 16S rRNA genu ze vzorků trusu, dvou různých segmentů střeva, kloakálních výtěrů a výtěrů zobáku papouščích jedinců. Gen pro 16S rRNA je typický střídáním variabilních a konzervativních oblastí a jeho využití je tak při analýzách konkrétních bakteriálních taxonů rozšířené, avšak přesnost analýzy je závislá na výběru primerů (v. kap. 3.3.1) (Klindworth et al. 2013).

Analýzu fekálních nátěrů barvených dle Grama (v. kap. 3.3.2) jsem provedla nejen za účely okamžité diagnostiky, ale také ve snaze o získání materiálu pro porovnání výsledků sekvenace bakteriálního genu pro 16S rRNA a určení, do jaké míry jsou výsledky získané tradičními a moderními metodami konzistentní.

Získané hematologické a mikrobiologické výstupy jsem se rozhodla finální statistickou analýzou propojit v celek a zjistit tak, zda existuje souvislost mezi taxonomickým složením gastroinstestinální mikrobioty a variabilitou hematologických parametrů u papoušků.

2 Vzorky a datový soubor

2.1 Experimentální zvířata

Pro účely této korelativní studie byla sbírána data a vzorky chovaných papoušků všech druhů, kteří prošli vyšetřením u spolupracujících veterinárních lékařů na veterinární klinice Avetum ($49^{\circ}15'28.9''N$ $16^{\circ}35'36.0''E$) a veterinární ordinaci StarVet ($49^{\circ}42'15.8''N$ $13^{\circ}28'02.4''E$) mezi říjnem roku 2017 a zářím roku 2019. Aby však bylo možné provést fylogeneticky relevantní analýzu zkoumaných dat o složení mikrobioty a získání představy o mezidruhové variabilitě v hematologických parametrech, bylo potřeba v rámci řádu papoušků pokrýt vybranými zástupci spektrum existujících fylogenetických linií. Dataset byl tedy během května až září roku 2019 dále obohacen o vzorky jedinců dalších vybraných druhů získaných v rámci spolupráce se zájmovými chovateli papoušků a veterinárním personálem zoologických zahrad v Zoologické a botanické zahradě města Plzně ($49^{\circ}45'27.8''N$ $13^{\circ}21'35.5''E$), v Zoologické zahradě Brno ($49^{\circ}13'48.5''N$ $16^{\circ}32'00.2''E$) a v Zoologické zahradě Liberec ($50^{\circ}46'38.1''N$ $15^{\circ}04'52.6''E$). Papoušci poskytnutí chovateli byli vzorkováni v prostorách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy ($50^{\circ}04'20.2''N$ $14^{\circ}25'27.1''E$).

2.2 Postup sběru dat a vzorků

V rámci procedury byly sbírány vzorky krve, trusu a výtěry kloaky a zobáku, jejichž odběr byl proveden veterinárním lékařem. Vždy byl nejprve majitelem zvířete podepsán souhlas se zpracováním odebraných vzorků a údajů pro výzkumné účely a s následnou archivací v Genetické bance Katedry zoologie PřF UK.

Poté byly od majitele vyžádány informace o druhu, varietě, pohlaví, věku, původu a odchovu, tedy zda byl jedinec odchován s rodiči, či ručně. Poté byl zjišťován typ chovného zařízení, čili zda je vzorkovaný papoušek chován ve vnější voliéře, nebo ve vnitřní kleci a zda jednotlivě, či v páru, nebo v hejnu. Dotazovali jsme se také, jestli je papoušek v době vyšetření hnízdící, či nehnízdící a majitelé nám poskytli informace ohledně typu potravy, předchozích onemocnění a eventuální stávající medikaci. Posuzován byl i výživový stav zvířete. Do záznamových karet byly dále uvedeny údaje o délce běháku (od středu intertarsálního kloubu k distálnímu konci tarsometatarsu) papouška, změřeného pomocí digitálního posuvného měřítka s přesností na 0,01mm (Kinex 6040.2, Kinex Measuring, Česká republika) a po zvážení zvířete pomocí digitální váhy i o jeho hmotnosti. Od vážení a

měření bylo upuštěno v případech, kdy majitel poskytl zprávu, že by takovýto postup mohl být pro daného jedince stresující. Dále byly zapsány projevy infekčních chorob (např. zahlenění horních cest dýchacích, konjunktivitida, periorbitální otoky, kašel, dušnost, kýchání, septikemie), metabolické a zažívací obtíže (např. obezita, zvracení, špatné trávení, anorexie, ztráta hmotnosti, polyurie/polydipsie), změny a poruchy chování (např. škubání per, stereotypní pohyby, apatie, slabost) a symptomy indikující autoimunitní poruchy (např. atopie, ulcerativní dermatitida). Jestliže byl jedinec kroužkován nebo očipován, číslo kroužku nebo kód čipu byly taktéž zaznamenány (obr. 2.2-I).

Pokud to bylo s ohledem na povahu vyšetření žádoucí, byla sbírána data o výsledcích diagnostiky běžných patogenů (např. viry, chlamydie) komerčními laboratořemi, výsledcích cytologického vyšetření choanálních výtěrů, popř. výsledek pitvy, pokud jedinec následně uhynul. Tyto parametry však nebyly pro relativní řídkost záznamů v této práci hodnoceny. Část jedinců vykoupených od zájmových chovatelů byla utracena za účelem odběru vybraných tkáňových vzorků z vnitřních orgánů.

2.2.1 Odběr vzorků pro mikrobiologickou analýzu

Po převzetí byl jedinec umístěn do prostoru s novou vložkou filtračního papíru v kleci pro eventuální odběr trusu. V případě defekace byla bezprostředně odebrána pevná část trusu sterilizovanou pinzetou anebo sterilním výtěrovým tamponem. Sterilizace pinzety probíhala ožehem (nástroj byl vždy ponechán vychladnout, aby nedošlo k degradaci DNA v důsledku zvýšené teploty). Pokud nešlo jinak, byl v několika ojedinělých případech trus odebrán z přepravky, ve které byl pacient donesen do ordinace, či z voliéry, kde bylo zvíře chováno. Tato informace však nebyla dále zohledněna. Vzorek trusu byl vložen do šroubovací kryozkumavky vyplněné sterilním 99,8% ethanolem, zkumavka byla popsána specifickým kódem jedince a typem vzorku a nakonec uložena do mrazicího boxu o teplotě -20 °C. Část trusu byla dále nanesena na mikroskopické podložní sklo a pomocí druhého podložního skla byl z této části trusu vyhotoven fekální nátěr. Nátěr byl popsán, ponechán k uschnutí a uložen do kazety.

Dále byl každému jedinci proveden výtěr kloaky sterilním výtěrovým tamponem (FLOQSwabs, Copan, Itálie), který byl taktéž uložen do šroubovací kryozkumavky s 99,8% ethanolem, označen a dále uchováván při -20 °C. Následně byl zvířeti jemně pootevřen zobák pomocí sterilizované pinzety a s využitím sterilního výtěrového tamponu byl zejména v oblasti choan proveden výtěr. Výtěrový tampon byl dále zpracován a uchován stejným způsobem jako předešlé.

V případě uhynulých či utracených jedinců byly během pitvy sterilizovanými nástroji odebrány vzorky tkáně dvou odlišných částí trávicího traktu. Mezi tyto části se řadil koncový úsek tenkého střeva nacházející se přibližně 1 cm od napojení na tlusté střevo, *ileum*, a samotné tlusté střevo, *colon*. Tyto tkáňové vzorky byly taktéž uchovávány v označené kryozkumavce vyplněné sterilním 99,8% ethanolem při teplotě -20 °C.

2.2.2 Odběr vzorků pro hematologickou analýzu

Pokud byl umožněn odběr krve, byl proveden heparinizovanou (Heparin inj. 1x10 ml, Zentiva Group, Česká republika) stříkačkou s jehlou punkcí jugulární žíly (*v. jugularis*), či *v. basilica* v úrovni mezi proximální a distální třetinou kosti pažní (*humerus*). Pro odběr krve u malých jedinců (pod 300g) byl využit insulinový set (1 ml/100 IU 0,3x12mm, Braun Omnican, Covetrus, USA), u větších jedinců byla použita injekční stříkačka (2 ml, Chirana T Injecta, Covetrus, USA) s jehlou (0,5x16 mm 25G, Medoject, Covetrus, USA). Odebrané množství krve tvořilo maximálně 1 % hmotnosti jedince (0,2–2,0 ml). Místo odběru bylo před zákrokem ošetřeno dezinfekčním tamponem. Následně byla kapka krve nanесена na podložní sklo pro zhotovení dvou kusů krevního nátěru. Skla byla popsána, ponechána k uschnutí a uložena do kazety. Krevní roztěry byly využity pro vyšetření diferenciálního počtu leukocytů. 20–100 µl krve bylo dále odkápnuto do sterilní zkumavky s 96% ethanolem, zkumavka byla označena kódem jedince a uložena do mrazicího boxu o teplotě -20 °C. Tento vzorek dále posloužil jako materiál pro molekulární determinaci pohlaví jedince. Dále bylo do skleněné hematologické baňky s 2985 µl Natt-Herrickova roztoku (Dr. Kulich Pharma, Česká republika) přidáno pipetou s předem heparinizovanou špičkou přes podložní sklo 15 µl krve. Baňka byla označena a krouživým pohybem se zajistilo promíchání krve s roztokem. Takto uchovaná krev dále posloužila pro vyšetření absolutního počtu erytrocytů a leukocytů. Pro vyšetření hematokritu bylo dále 30–50 µl krve uloženo buď do suchých

kryozkumavek, dále uchovávaných v mrazicím boxu při teplotě -80 °C, ze kterých byla následně krev nabrána a vpravena do skleněných kapilár (Heparin Na; 75mm/60ul, Keraglass, Česká republika), nebo rovnou do připravených kapilár ze stříkačky. Naplněné kapiláry byly označeny štítkem. Zbytek krve byl stočen, sediment a supernatant, tj. krevní plasma, byly umístěny do samostatných zkumavek, popsány a také zamrazeny v mrazicím boxu při -80 °C. Vzorky byly dále převezeny do laboratoře na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze a nejpozději do druhého dne vyšetřeny na absolutní počet červených a bílých krvinek.

V případě vzorků krve získaných MVDr. Grymovou bylo provedeno vyšetření na Veterinární a farmaceutické fakultě v Brně (MVDr. Knotková). Postup byl obdobný jako výše popsaný, pouze s odchylkou při ředění krve Natt-Herrickovým roztokem spočívající v přidání 25 µl krve do 4975 µl roztočku.



dr. Michal Vinkler
Katedra zoologie, PřF UK

PAPOUŠCI 2017 – odběr genetických a mikrobiologických vzorků veterinárními lékaři

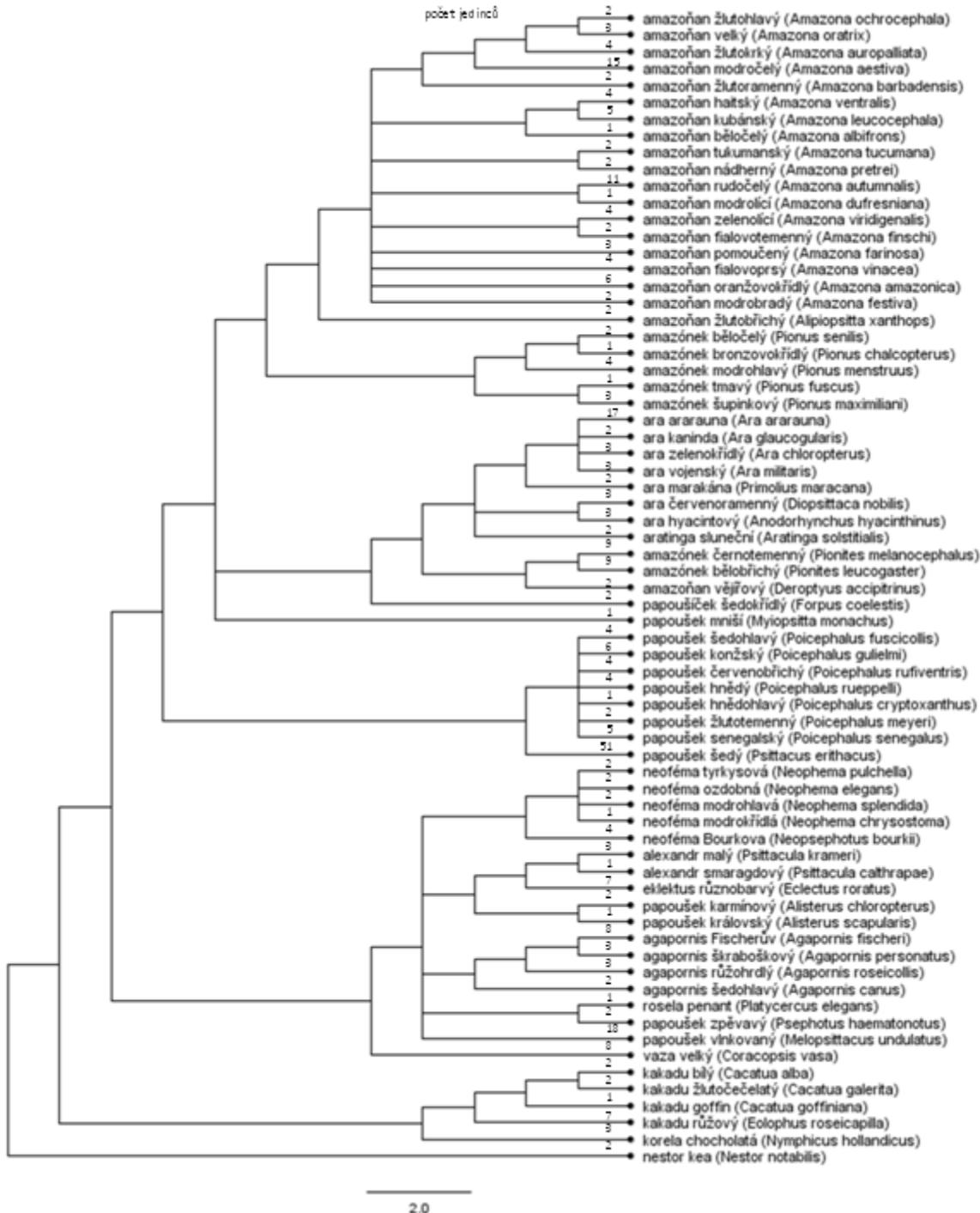
Experimental Protocol: EP-EEI-MV201702 v1

INFORMAČNÍ ÚDAJE		ODBĚR VZORKŮ	
Kód jedince (IN-YYYY-nnn)	Datum	Vzorky na mikrobiom	
Majitel		<input type="checkbox"/> výtěr kloaky	<input type="checkbox"/> fekální nátěr
Druh		<input type="checkbox"/> vzorek trusu	<input type="checkbox"/> výtěr zobáku
Varieta		Varianta A - odběr krve je možný Varianta B - odběr krve není možný	
Původ	Odchov <input type="checkbox"/> s rodiči <input type="checkbox"/> uměle	<input type="checkbox"/> odběr krve	<input type="checkbox"/> rostoucí pera (v toulci)
Typ chovného zařízení <input type="checkbox"/> v hejnu pozn. <input type="checkbox"/> vnější <input type="checkbox"/> voliéra <input type="checkbox"/> v páru <input type="checkbox"/> vnitřní <input type="checkbox"/> klec <input type="checkbox"/> jednotlivě		<input type="checkbox"/> krevní nátěr (2ks)	
Potrava		<input type="checkbox"/> vzorek do 96% ethanolu (na DNA) <input type="checkbox"/> zbytek zaslat dr. Knotkové na VFU	
Číslo kroužku	Číslo čipu	Délka běháku	Váha
Předchozí onemocnění	Stávající medikace	Výživový stav	
Poznámky		DIAGNOSTIKA	
		Symptomy infekčních chorob	Metabolické a zažívací obtíže
		<input type="checkbox"/> zahlenění horních cest dýchacích <input type="checkbox"/> konjunktivitida <input type="checkbox"/> periorbitální otoky <input type="checkbox"/> kašel <input type="checkbox"/> dušnost <input type="checkbox"/> kýchání <input type="checkbox"/> septikemie <input type="checkbox"/> jiné:	<input type="checkbox"/> obesita <input type="checkbox"/> zvracení <input type="checkbox"/> špatně trávení <input type="checkbox"/> anorexie <input type="checkbox"/> ztráta hmotnosti <input type="checkbox"/> polyurie/polydipsie <input type="checkbox"/> jiné:
		Symptomy indikující autoimunitní poruchy	Změny a poruchy chování
		<input type="checkbox"/> atopie <input type="checkbox"/> ulcerativní dermatitida <input type="checkbox"/> jiné:	<input type="checkbox"/> škubání per <input type="checkbox"/> stereotypní pohyby <input type="checkbox"/> apatie <input type="checkbox"/> slabost <input type="checkbox"/> jiné:

Obrázek 2.2-I. Záznamová karta vyplňovaná během vzorkování pro každého jedince. Autor: RNDr. Michal Vinkler, Ph.D., Mgr. Zuzana Świderská, Sylvie Dlugošová.

2.3 Charakteristika datasetu

Během procesu odběrů bylo ve spolupráci s veterinárními lékaři získáno celkem 294 krevních vzorků, 151 vzorků trusu, 252 výtěrů kloaky a 247 výtěrů zobáků pocházejících z celkového počtu 308 jedinců 69 různých druhů (obr. 2.3-I) z 28 rodů (tab. 2.3 I) papoušků chovaných mezi lety 2017 a 2019. V několika případech nebylo možné během vzorkování jedince odebrat každý typ vzorku. Dále bylo získáno 12 vzorků tkání z dvou různých segmentů střeva, konkrétně 6 vzorků *ilea* a 6 vzorků *colonu* pocházející z 6 druhů papoušků, papouška zpěvavého (*Psephotus haematonotus*), agapornise růžohrdlého (*Agapornis roseicollis*), neofémy ozdobné (*Neophema elegans*), papouška vlnkovaného (*Melopsittacus undulatus*), korely chocholaté (*Nymphicus hollandicus*) a papoušíčka šedokřídlého (*Forpus coelestis*). Krevní vzorky byly obstarávány za účelem hematologického vyšetření (v. kap. 3.2) a molekulárně genetického stanovení pohlaví (v. kap. 3.1), ostatní jako biologický materiál k extrakci bakteriální DNA pro analýzu složení gastrointestinální mikrobioty papouščích jedinců (v. kap. 3.3).



Obrázek 2.3-I. Konsensuální fylogenetický strom znázorňující příbuzenské vztahy mezi 69 druhů ovozorkovaných papoušků z řádu Psittaciformes, včetně uvedených počtů jedinců. Jednotlivé stromy byly zkonstruovány pomocí nástroje BirdTree (dostupné z: <https://birdtree.org/subsets/>), konsensus byl vytvořen v programu R (R Development Core Team 2017) a upraven v programu FigTree (dostupný z: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Tabulka 2.3-I. Rodы папошкъ из отряда Psittaciformes, представляющие dataset 308 единиц, овзоркованных в рамках этой дипломовой работы между 2017–2019 гг., с их частотами в этом наборе данных. Для каждого рода приведены общее и подродовое название, а также один пример вида, с чешским названием. *Биогеографическая распределение определена по Sargatala и Haffera (1997).

Rod	Čeleď'	Podčeleď	Zahrnutý druh	Autor	Distribuce *	Frekvence	%
<i>Amazona</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Amazoňan běločelý	Sparrman, 1788	Neotropická	73	23,7
<i>Psittacus</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Psittacinae</i>	Papoušek šedý	Linnaeus, 1758	Afroasijská	51	16,56
<i>Poicephalus</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Psittacinae</i>	Papoušek konžský	Jardine, 1849	Afroasijská	26	8,44
<i>Ara</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Ara zelenokřídly	G. R. Gray, 1859	Neotropická	25	8,12
<i>Melopsittacus</i>	<i>Psittaculidae</i>	<i>Loriinae</i>	Papoušek vlnkovany	Shaw, 1805	Australasijská	18	5,84
<i>Pionites</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Amazónek bělobřichý	Kuhl, 1820	Neotropická	18	5,84
<i>Agapornis</i>	<i>Psittaculidae</i>	<i>Agapornithinae</i>	Agapornis Fischerův	Reichenow, 1887	Afroasijská	16	5,19
<i>Pionus</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Amazónek bronzovokřídly	Fraser, 1841	Neotropická	11	3,57
<i>Coracopsis</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Vaza velký	Shaw, 1812	Afroasijská	8	2,6
<i>Eolophus</i>	<i>Cacatuidae</i>	<i>Cacatuinae</i>	Kakadu růžový	Vieillot, 1817	Australasijská	7	2,27
<i>Eclectus</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Eklektus různobarvý	Müller, 1776	Australasijská	7	2,27
<i>Neophema</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Neoféma modrohlavá	Gould, 1841	Australasijská	7	2,27
<i>Cacatua</i>	<i>Cacatuidae</i>	<i>Cacatuinae</i>	Kakadu žlutočečelatý	Latham, 1790	Australasijská	5	1,62
<i>Psittacula</i>	<i>Psittaculidae</i>	<i>Psittaculinae</i>	Alexandr malý	Scopoli, 1769	Afroasijská	4	1,3
<i>Neopsephotus</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Neoféma Bourkova	Gould, 1841	Australasijská	4	1,3
<i>Nymphicus</i>	<i>Cacatuidae</i>	<i>Nymphicinae</i>	Korela chocholatá	Kerr, 1792	Australasijská	3	0,97
<i>Diopsittaca</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Ara červenoramenný	Linnaeus, 1758	Neotropická	3	0,97
<i>Alisterus</i>	<i>Psittaculidae</i>	<i>Psittaculinae</i>	Papoušek karmínový	E. P. Ramsay, 1879	Australasijská	3	0,97
<i>Anodorhynchus</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Ara hyacintový	Latham, 1790	Neotropická	3	0,97
<i>Aratinga</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Aratinga sluneční	Linnaeus, 1758	Neotropická	2	0,65
<i>Primolius</i>	<i>Psittaculidae</i>	<i>Psittaculinae</i>	Ara marakána	Vieillot, 1816	Neotropická	2	0,65
<i>Deroptyus</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Amazoňan vějířový	Linnaeus, 1758	Neotropická	2	0,65
<i>Alipiopsitta</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Amazoňan žlutobřichý	Spix, 1824	Neotropická	2	0,65
<i>Psephotus</i>	<i>Psittaculidae</i>	<i>Psittaculinae</i>	Papoušek zpěvavý	Gould, 1838	Australasijská	2	0,65
<i>Forpus</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Papoušek šedokřídly	Lesson, 1847	Neotropická	2	0,65
<i>Nestor</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Nestor kea	Gould, 1856	Australasijská	2	0,65
<i>Platycercus</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Rosela penant	J. F. Gmelin, 1789	Australasijská	1	0,32
<i>Myiopsitta</i>	<i>Psittacidae</i>	<i>Arinae</i>	Papoušek mniší	Boddaert, 1783	Neotropická	1	0,32

V tabulce 2.3-II jsou uvedeny údaje o faktoriálních proměnných, čili pohlaví, věkové kategorie, umístění, chovném zařízení, sociálním typu chovu, potravě a výživovém stavu týkající se 308 ovzorkovaných jedinců. V následujících tabulkách jsou k dispozici základní statistické údaje ohledně kontinuálních proměnných, tedy věku (tab. 2.3-III), váhy (tab. 2.3-IV) a délky běháku (tab. 2.3-V) pro ty jedince, u kterých byly tyto hodnoty získány. Všichni ovzorkovaní jedinci zahrnují i 111 případů papoušků vykazujících dle majitele klinické projevy, přičemž nejčastěji pozorované byly metabolické či zažívací poruchy (tab. 2.3-VI), v rámci nichž byla za nejčastější symptom, vyskytující se u 38 postižených jedinců, uvedena ztráta váhy. Dále byly pozorovány symptomy infekčních chorob, nejčastěji dušnost, následovány změnami a poruchami chování s častým projevem vyškubávání peří a nakonec ulcerativní dermatitida jako příznak autoimunitní poruchy.

Tabulka 2.3-II. Základní charakteristika datového souboru 308 ovzorkovaných papoušků. *Výživový stav posouzen na základě procentuální odchylky optimální hmotnosti daného druhu papouška. Pokud nebyla váhová hodnota jedince dispozici, byl stav posouzen vizuálně.

Znak		Počet jedinců	%
Pohlaví	samec	150	48,701
	samice	135	43,831
	neurčeno	23	7,468
Věk	mládě	58	18,831
	dospělec	192	62,338
	neurčeno	58	18,831
Umístění	vnitř	128	41,558
	vně	121	39,286
	neurčeno	59	19,156
Chovné zařízení	klec	102	33,117
	voliéra	160	51,948
	neurčeno	46	14,935
Chov	samostatně	79	25,649
	pár	120	38,961
	hejno	50	16,234
	neurčeno	59	19,156
Složka stravy	zrniny	218	70,779
	granule	83	26,948
	ovoce a zelenina	209	67,857
	neurčeno	32	10,39
Výživový stav *	kachexie	6	1,948
	špatný	12	3,896
	zhoršený	49	15,909
	dobrý	134	43,506
	obezita	4	1,299
	neurčeno	103	33,442

2.3-III. Základní popisná statistika pro věk, n = 178.

Parametr	rozsah (rok)	průměr	směrodatná odchylka	medián
Věk	0,17–25,00	4,94	4,98	3,00

2.3-IV. Základní popisná statistika pro váhu, n = 70.

Parametr	rozsah (g)	průměr	směrodatná odchylka	medián
Váha	24,85–1400,00	200,79	251,94	57,82

2.3-V. Základní popisná statistika pro délku běháku, n = 197.

Parametr	rozsah (mm)	průměr	směrodatná odchylka	medián
Délka běháku	12,30–56,52	27,93	9,33	28,26

Tabulka 2.3-VI. Klinické projevy uvedené majiteli u 111 chovaných papoušků mezi lety 2017–2019. *Někteří jedinci vykazovali více než 1 klinický projev.

Klinické projevy poskytnuté majitelem	Počet jedinců *	%
Metabolické a zažívací obtíže (např. ztráta váhy)	68	61,261
Symptomy infekčních chorob (např. dušnost)	27	24,324
Změny a poruchy chování (např. škubání per)	33	29,730
Symptomy indikující autoimunitní poruchy (např. ulcerativní dermatitida)	3	2,703

3 Metodika

3.1 Molekulární determinace pohlaví

V případě 15 jedinců, u kterých nebylo na základě zbarvení či morfologie určení pohlaví možné a u kterých byl k dispozici krevní vzorek, bylo pohlaví determinováno geneticky s využitím testu založenému na dvou CHD (z anglického chromo-helicase-DNA-binding) genech, lokalizovaných na ptačích pohlavních chromozomech. U ptáků jsou heterogametické samice v systému ZW, a proto je gen CHD-W, lokalizovaný na W chromozomu, unikátní právě pro samice. Naproti tomu druhý gen CHD-Z, vyskytující se na Z chromozomu, se objevuje u obou pohlaví. Za využití polymerázové řetězové reakce (PCR, z anglického polymerase chain reaction) s jedním setem primerů byly potom amplifikovány homologní sekvence na těchto dvou CHD genech a včleněny introny lišící se délkami (Griffiths et al. 1998).

Genomická DNA byla extrahována ze vzorků krve uchovávané ve zkumavkách s 96% ethanolem s využitím izolačního kitu DNeasy 96 Blood & Tissue Kit (Qiagen, Německo). Před samotnou extrakcí bylo nejprve za účelem evaporace ethanolu přeneseno 10–25 mg vzorku krve do čisté zkumavky a ponecháno v inkubátoru při teplotě 42 °C po dobu 2 h, popř. po delší dobu, dokud nedošlo k úplnému vysušení vzorku. Dále byl postup práce dodržen dle protokolu doporučeného výrobcem.

Během testování byly pro PCR amplifikaci využity modifikované primery P2 a P8 (Griffiths et al. 1998, Steiner et al. 2011) se sekvencemi 5'-GAAACTGTGCAAAACAGG-3' pro F (z anglického forward, přední) primer a 5'-TCTGCATCACTAAATCCTTT-3' pro R (z anglického reverse, zadní) primer. Samotná amplifikace byla provedena v celkovém objemu 10 µl. Pro jednu PCR reakci bylo užito 5 µl Multiplex PCR Master Mixu (Qiagen, Německo), 0,4 µM směsy předního a zadního primeru, 0,6 µl Nuclease-free vody (Qiagen, Německo) a 4 µl templátové DNA. PCR proběhla pro každý vzorek v duplikátu v prostředí cykléru (LightCycler 480 Real-TimePCR, Roche, Česká republika) dle následujícího programu: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 3 min následována 40 cykly vždy při 95 °C (30 s), 55 °C (45 s), 72 °C (1 min). Reakce byla zakončena finální extenzí produktu při 68 °C po dobu 5 min.

Výsledný PCR produkt byl separován elektroforézou po dobu 130 min při napětí 80 V na 2% agarázovém gelu barveném ethidium bromidem. Po prosvícení gelu UV lampou byl při zpozorování dvou bandů výsledek vyhodnocen jako samice, při spatření jednoho jako samec.

Kontrola spolehlivosti determinace pohlaví na základě těchto genů byla provedena s využitím krevních vzorků dvou samců a dvou samic eklekta různobarvého (*Eclectus roratus*), u kterých lze pohlaví zřetelně určit na základě zbarvení peří (Heinsohn, Legg a Endler 2005). Získaný výsledek byl shodný s očekáváním.

3.2 Hematologická analýza

V rámci hematologického vyšetření krevních vzorků papouščích jedinců byl zhodnocen absolutní a relativní rozpočet červených (erytrocytů) a bílých krvinek (leukocytů) a byla stanovena hodnota hematokritu a koncentrace hemoglobinu. Tato vyšetření jsou závislá na množství získaných krevních vzorků a v případě několika jedinců nebylo možné kompletní hematologickou analýzu provést.

3.2.1 Absolutní počet erytrocytů a leukocytů

Pro analýzu absolutního počtu erytrocytů a leukocytů byla využita 200x naředěná krev v baničce s Natt-Herrickovým roztokem. Přibližně 10 µL takto naředěné krve bylo z baničky pipetou přeneseno do počítacího prostoru Bürkerovy komůrky (Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Německo), kde byly buňky vyhodnoceny pod zvětšením 200x pod světelným mikroskopem (Olympus CX-31, Olympus Corporation, Japonsko).

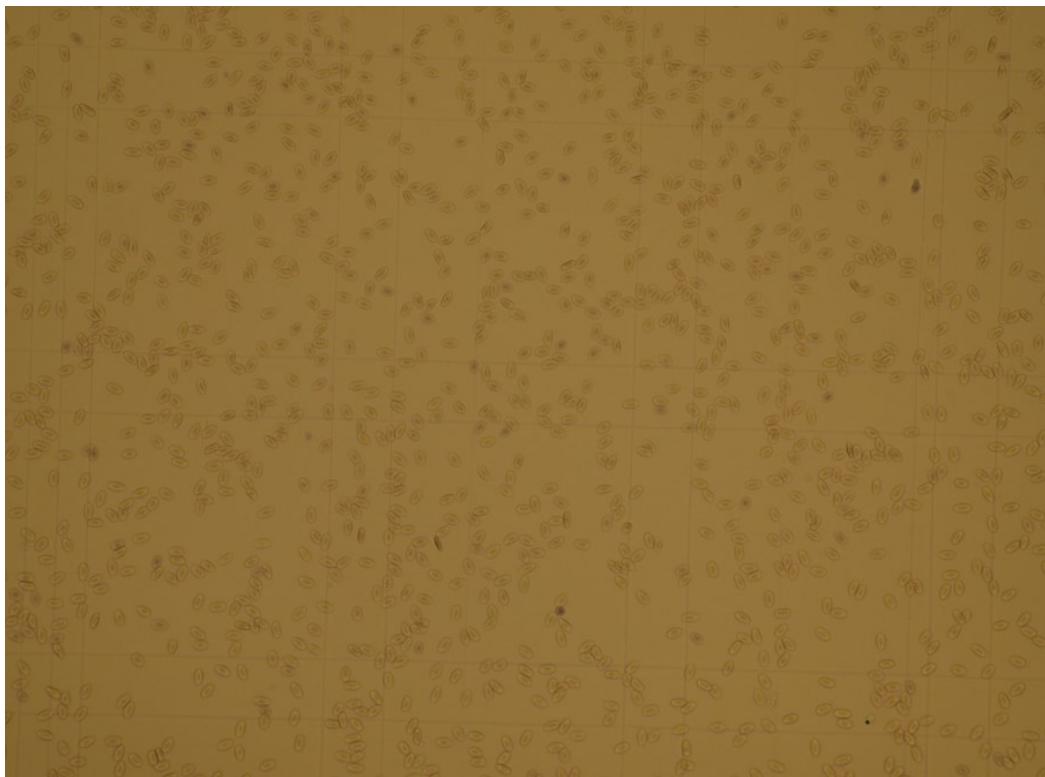
Leukocyty byly počítány ve sto velkých čtvercích ($S = 0,04 \text{ mm}^2$). Počítány byly buňky nacházející se uvnitř čtverce a rovněž ty, které se dotýkaly dvou stran čtverce (Campbell a Ellis 2007). Součet byl následně násoben číslem 0,5, zahrnujícím zředění a objem celkového počítaného prostoru podobně jako uvedený vzorec 3-I, a tím převeden na absolutní počet leukocytů v $1 \text{ mm}^3 (\mu\text{l})$.

Pro získání absolutního počtu erytrocytů byly použity dva různé způsoby. Při aplikaci prvního způsobu byly erytrocyty spočítány ve 20 obdélnících úhlopříčně zleva doprava a opačně, přičemž zahrnutý byly buňky dotýkající se jedné delší a jedné kratší strany a buňky uvnitř obdélníku. Dále byl součet pro vynásoben číslem 0,01, čímž byla získána hodnota

absolutního počtu erytrocytů v 1 mm³ (μl), přepočtena na celkový objem a zředění (podobně jako u vzorce 3-I). Druhá metoda, aplikovaná pro menší časovou náročnost, spočívala v nafocení několika odlišných částí pozorovaného obrazu při zvětšení 200× (obr. 3.2-I) a následném automatickém vyhodnocení počtu buněk s pomocí programu Cell Counter (Štěpka 2013). Pro vyhodnocení jednoho vzorku byl takto spočítán počet erytrocytů nacházející se v obsahu tří polí dvou různých digitálních fotografií vzorku. Po získání hodnot z obsahu těchto polí byl vypočten absolutní počet erytrocytů v 1 mm³ (μl) krve s využitím vzorce 3-I.

$$TRBC = \frac{Nc}{S * d * Ns} * dil$$

Vzorec 3-I. TRBC (Total red blood count) = absolutní počet erytrocytů v 1 mm³, Nc = počet erytrocytů, S = plocha pro výpočet použitého čtverce (S = 0,04 mm²), d = hloubku pro výpočet použitého čtverce (d = 0,1 mm), Ns = celkový počet čtverců (Ns = 6), dil = ředění suspenze (dil=200).



Obrázek 3.2-I. Krevní buňky v Bürkerově komůrce pod světelným mikroskopem, fotografováno při zvětšení objektivu 200x. Fotografie pořízena pro analýzu absolutního počtu erytrocytů. Autor fotografie: Sylvie Dlugošová.

3.2.2 Diferenciální počet leukocytů

Krevní nátěry byly nabarveny barvivem Wright-Giemsa, Modified (Sigma-Aldrich, USA) ponornou metodou ve skleněné barvící nádobě a s pomocí stojánku. Stojánek s nátěry byl do barviva ponořen po dobu jedné minuty, poté byly jednotlivé krevní nátěry opakovaně promývány destilovanou vodou a ponechány volně uschnout.

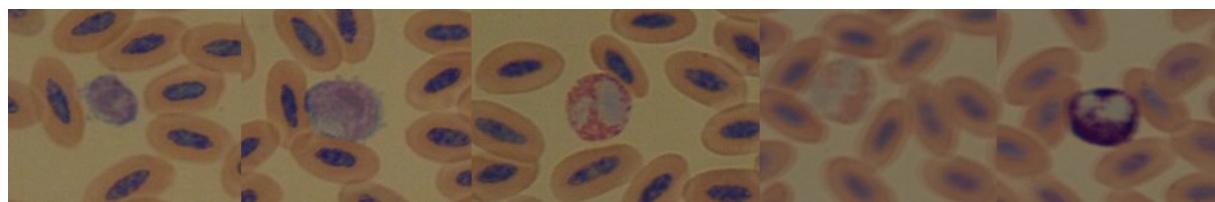
Pro stanovení diferenciálního rozpočtu byla vybrána ta část podložního skla, kde jsou erytrocyty rozloženy rovnoměrně a nepřekrývají se, tedy zpravidla u konce krevního nátěru. Pod světelným mikroskopem (Olympus CX-31, Olympus Corporation, Japonsko) byl nátěr pozorován s použitím imerzního oleje (Olympus IMMOIL-F30CC, Olympus Corporation, Japonsko) meandrovitým pohybem objektivu při celkovém zvětšení 1000x. Pro získání spolehlivého výsledku bylo nutno detekovat a rozlišit sto leukocytů pro každý krevní nátěr.

Jednotlivé subtypy leukocytů v papouščí periferní krvi byly určeny na základě jejich morfologie se zaměřením na tvar a zabarvení jádra, granulí a plazmy do kategorií: lymfocyt, monocyt a heterofilní, bazofilní a eosinofilní granulocyt (obr. 3.2-II) (Campbell a Ellis 2007, Lucas a Jamroz 1961). Po barvení dle Giemsy se basofilní cytoplasma zralého ptačího lymfocytu, stejně jako v případě savčího, jeví fialově-modrá, patrné je nedělené jádro kulatého tvaru umístěné centrálně nebo mírně excentricky a zabírající značnou část buňky. Největšími leukocyty v periferní krvi ptáků jsou monocyty, nabývající rozličných tvarů od kulatého až po améboidní. Jádro monocytu, naproti lymfocytu, může být kulaté, ledvinovité či zaškrcené a propořčně je menší než jádro lymfocytu. Cytoplasma má potom tendenci spíše k šedavému zabarvení, při okraji buňky může být modrá.

Heterofilní granulocyty ptáků bývají okrouhlé s průměrem okolo 8,8 μm . Pro heterofily jsou dále typická polymorfonukleární jádra zaškrcená do více než dvou laloků a dále červená granula vřetenovitého tvaru. Cytoplasma zralého heterofilu je nejčastěji bezbarvá. Naopak v případě ptačího eosinofila, s průměrnou velikostí 7,9 μm , se cytoplasma jeví modře. Patrná jsou také cihlově, nebo světle modře zabarvená, či bezbarvá granula okrouhlého tvaru, jádro bývá opět typicky zaškrceno a disponuje tendencí k tmavšímu barvení než v případě heterofilu. Odlišení heterofilů od eosinofilů pozorovaných v periferní krvi papoušků bývá

často obtížné, kdy jediný zřetelný rozdíl často představuje právě zabarvení a morfologie granulí, dané ultrastrukturálními rozdíly ve složení (Fudge 2000). Pro bazofily jsou dále charakteristická drobná metachromatická granula zakrývající převážnou část cytoplasmy s jedním jádrem, které však může mít tendenci zaškrcovat se do dvou laloků. Mohou být zaměněny za heterofily při toxicke degranulaci (Vaz et al. 2016, Fudge 2000) či za lymfocyty (Robertson a Maxwell 1990).

Zralé erytrocyty byly pozorovány jako buňky oválného tvaru s protáhlým celistvým jádrem a okrově zabarvenou cytoplasmou, pro imaturní (nezralé) erytrocyty je naopak typická šedě zbarvená cytoplasma a polychromatické jádro (Fudge 2000, Lucas a Jamroz 1961). Vzhledem k častému shlukování trombocytů v ptačí krvi nelze tyto buňky vždy spolehlivě odečíst, byly tedy z hodnocení diferenciálního rozpočtu vynechány. Pro získání H/L poměru byl spočítaný relativní počet heterofilů vydělen relativním počtem lymfocytů.



Obrázek 3.2-II. Leukocyty pozorované v periferní krvi amazoňana žlutoramenného a papouška zpěvavého. Zleva lymfocyt, monocyt, heterofil, eosinofil, basofil. Barveno Wright–Giemsou Modified Stain, fotografie pořízena při zvětšení objektivu 1000x. Autor fotografie: Sylvie Dlugošová.

3.2.3 Hematokrit, koncentrace hemoglobinu a MCHC

Pro stanovení hodnoty hematokritu byla do dvou třetin heparinizované mikrohematokritové kapiláry pomocí injekční stříkačky s jehlou vpravena odebraná krev, kapilára byla dále uzavřena ve vodorovné poloze plastickou hmotou o síle 3–5 mm. Centrifugace probíhala pět minut při 10 000 rpm. V kapiláře byly centrifugací odděleny tři vrstvy: 1) plazma, která bývá bezbarvá (avšak u některých ptačích druhů může být vlivem karotenoidních pigmentů žlutá), 2) tzv. buffy coat, skládající se z leukocytů a trombocytů a 3) nejníže uložený sediment erytrocytů (Sakas a Bauck 2002). Pomocí měřícího pultu pro mikrohematokritovou metodu byl změřen sloupec stočené krve a sediment erytrocytů. Následně byla na pultu odečtena hematokritová hodnota, udávající procentuální podíl erytrocytů na celkovém objemu krve.

Celková koncentrace hemoglobinu byla zjišťována použitím standardní hemiglobinkyanidové metody. Do zkumavky obsahující 5 ml Drabkinova roztoku bylo přidáno 20 μ l promíchané krve, poté byl obsah zkumavky znovu promíchán a ponechán k hemolýze po dobu 20 min. Dále byla provedena nízkoobrátková centrifugace při 3 000 rpm po dobu 10 min. Po rozpadu červených krvinek v Drabkinově roztoku oxiduje uvolněný hemoglobin na methemoglobin, jenž se dále mění na cyanmethemoglobin. Analýza cyanmethemoglobinu byla následně provedena na spektrofotometru (Spekol 11, Carl Zeiss Jena, Německo) při vlnové délce 540 nm (Drabkin 1949, Campbell a Ellis 2007). Absorbance byla znásobena 155,1 a vydělena 0,415. Vydelením získané hodnoty koncentrace hemoglobinu hodnotou hematokritu byl získán erytrocytární index MCHC (z anglického mean cell hemoglobin concentration), jenž udává střední hodnotu koncentrace hemoglobinu v jedné červené krvince (Campbell a Ellis 2007).

Koncentrace hemoglobinu byla vyšetřována na Veterinární a farmaceutické fakultě v Brně.

3.2.4 Statistická analýza

3.2.4.1 Opakovatelnost metody diferenciálního rozpočtu leukocytů

Za účelem vyjádření míry přesnosti metody diferenciálního rozpočtu leukocytů za stejných podmínek byla stanovena opakovatelnost (z anglického repeatability). V případě repeatability v rámci hodnotitele byly výsledky analýzy získány stejným hodnotitelem, stejnou metodou, na stejných testovaných objektech a za použití stejného zařízení. Blíže se jednalo o určení diferenciálního rozpočtu leukocytů na 20 různých krevních nátěrech a po uplynutí krátkého časového horizontu stanovení diferenciálu podruhé na totožných nátěrech. Protože byl značný objem hematologických výsledků použity v rámci této diplomové práce vyhodnocen veterinární lékařkou, byla dále opakovatelnost stanovena také na základě nezávislých výsledků hematologické analýzy autorky práce a veterinářky získaných po zhodnocení stejného souboru 20 krevních nátěrů. Získaná data byla podrobena analýze rozptylu (z anglického Analysis of variance, ANOVA) v programu R (R Development Core Team 2017).

3.2.4.2 Korelace hematologických parametrů

Aby bylo možno zhodnotit míru korelace mezi hodnotami pro absolutní počty erytrocytů, hladiny hematokritu, koncentrace hemoglobinu a MCHC (Velguth, Payton a Hoover 2010), byl datový soubor všech jedinců nejprve očištěn od neznámých hodnot a za účelem otestování normality rozložení byla data podrobena Shapiro-Wilkovu testu. Hodnoty absolutních počtů erytrocytů byly logaritmicky znormalizovány. Následně byla míra korelace z důvodu normálního rozložení dat stanovena na základě Pearsonova korelačního testu.

3.2.4.3 Závislost hematologických parametrů na vybraných vysvětlujících proměnných

Testování závislosti hematologických znaků na vysvětlujících proměnných probíhalo v jednotlivých modelech porovnáváním lineárních mixovaných modelů s pomocí balíčku Ime4 (Bates et al. 2015) v programu R (R Development Core Team 2017). Některé faktory, kupříkladu reprodukční stav zvířete, nebyly do konečného testujícího modelu zahrnuty pro nedostatek dat.

Kromě efektu chovatele a roku odběru, jež byly vedeny jako efekty náhodné, byly v rámci základního modelu pro porovnávání jako pevné proměnné použity faktory zahrnující rod,

pohlaví, věk, datum odběru, umístění (uvnitř/vně), chovné zařízení (klec/voliéra), chov (samostatně/pár/hejno), granule, zrniny, ovoce a zeleninu, délku běháku, výživový stav, infekční onemocnění, metabolické obtíže, autoimunitní poruchy a poruchy chování. Tento model byl nadále pro každý vysvětlovaný hematologických parametr zjednodušen na minimální adekvátní model sestupnou eliminací nesignifikantních členů s využitím Aikeho kritéria (AIC) a testováním rozdílů deviancí (ANOVA).

Hodnoty pro absolutní počty erytrocytů a MCHC byly normalizovány druhou mocninou, hodnoty pro absolutní a relativní počty monocytů pomocí Box-Coxovy transformace. Pro transformování vysvětlované proměnné metodou Box-Cox byl využit balíček MASS (Venables a Ripley 2002). Hodnoty absolutních počtů leukocytů, lymfocytů, heterofilů, bazofilů, eosinofilů, H/L poměru a relativních počtů bazofilů a eosinofilů byly normalizovány pomocí logaritmické transformace. Pro všechny testy byla stanovena stejná hodnota pro hladinu významnosti: $\alpha = 0,05$.

Grafická znázornění byla vygenerována s využitím balíčků visreg (Breheny a Burchett 2017), ggplot2 (Wickham 2009) a RColorBrewer (Neuwirth 2014).

3.2.4.4 Detekce fylogenetického signálu v datech

Jednotlivé fylogenetické stromy pro ovzorkované druhy papoušků byly zkonstruovány pomocí nástroje BirdTree (dostupné z: <https://birdtree.org/subsets/>). Byl vytvořen jejich konsensus, který byl dále převeden na distanční matici. Pro zaznamenání vlivu fylogeneze na vysvětlované proměnné byly porovnáváním lineárních mixovaných modelů metodou Markov chain Monte Carlo (MCMC) hematologické parametry testovány po jednotlivých modelech.

Modely byly tvořeny vysvětlujícími faktory, zahrnujícími pohlaví, věk, datum umístění (uvnitř/vně), chovné zařízení (klec/voliéra), chov (samostatně/pár/hejno), granule, zrniny, ovoce a zeleninu, délku běháku, výživový stav, infekční onemocnění, metabolické obtíže, autoimunitní poruchy a poruchy chování, se kterými bylo kalkulováno jako s pevnými. Efekty fylogeneze, chovatele a roku byl vedeny jako faktory náhodné. Počet MCMC iterací byl nastaven na 5 000 000, argument burnin na 1 000 a thinning interval na 500. Pro každý otestovaný model byla zjištěna hodnota lambda, značící přítomnost fylogenetického signálu.

Testování proběhlo v prostředí programu R (R Development Core Team 2017) s využitím balíčku MCMCglmm (Hadfield 2010).

Pro účely grafické vizualizace fylogenetických stromů byly nejprve vytvořeny datové soubory obsahující ovzorkované druhy papoušků spolu s jejich průměrnými hodnotami pro každý hematologický parametr v rámci získaného datasetu. Takový datový soubor byl dále propojen s konsensuálním fylogenetickým stromem, byly odstraněny větve chybějících druhů a vypočítány délky větví zbývajících. Vzniklý fylogenetický strom spolu s barevně značenou průměrnou hodnotou hematologického znaku byl zkonstruován pomocí balíčku phytools (Revell 2012) v programu R.

3.3 Analýza složení gastrointestinální mikrobioty

Složení bakterií v zažívacím traktu papoušků bylo definováno kombinací molekulárního přístupu DNA metabarcodingu a diagnostického přístupu analýzou fekálních nášťerů Gramovou metodou.

3.3.1 DNA metabarcoding

Zhodnocení složení gastrointestinální mikrobioty molekulárním přístupem proběhlo v závislosti na sekvenaci bakteriálního genu pro 16S rRNA ze vzorků trusu, střev, kloakálních výtěrů a výtěrů zobáku na platformě MiSeq (Illumina, USA).

3.3.1.1 Laboratorní analýza

Bakteriální DNA byla extrahována ze vzorků trusu, nekroptického materiálu tlustého střeva (*colon*) a koncového segmentu tenkého střeva (*ileum*) a z výtěrových tamponů, kterými byl proveden stěr z kloaky a zobáku. Extraktce byla provedena v čistém prostředí laminárního flow boxu za využití izolačního kitu DNeasy PowerSoil (Qiagen, Německo), kdy byl postup procesu proveden dle výrobcem doporučeného protokolu s jedinou odchylkou při eluci DNA, která proběhla do objemu 70 µl roztoku. Během extrakcí byly průběžně prováděny negativní kontroly.

Následně byla provedena dvoukroková polymerázová řetězová reakce. Během prvního kroku byly využity primery se sekvenačním adaptorem a vnitřním bar kódem, lokalizovaným na F primeru a dlouhým 4–5 bp. Tyto primery dále disponují genově specifickou oblastí komplementární k V3 – V4 variabilní částí bakteriální 16S rRNA, tedy S-D-Bact-0341-b-S-17 [5'-CCTACGGGNNGCWGCAG-3'] a S-D-Bact-0785-a-A-21 [5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'] (Klindworth et al. 2013). Pro provedení prvního kroku PCR bylo použito 5 µl KAPA HiFi Hot Start Ready Mixu (Kapa Biosystems, USA), 0,4 µM F a R primeru a 4,6 µl templátové DNA. Všechny produkty byly před pipetováním důkladně rozmrazeny, promíchány a stočeny. Centrifugace PCR produktu proběhla rovněž znova před vložením do PCR cykléru. PCR byla uskutečněna dle následujících podmínek. Počáteční denaturace proběhla při 95 °C na 3 min následována 30 cykly pro DNA izolovanou ze vzorků trusu a výtěrů zobáku, 33 cykly pro výtěry kloaky či 35 cykly pro střevní tkáně *colonu* a *ilea* vždy při 95 °C (30 s), 55 °C (30 s) a 72 °C (30 s). Reakce byla zakončena finální extenzí produktu při 72 °C po dobu 5 min.

Ke vzniklému PCR produktu byly dále během druhého kroku PCR připojeny sekvenační adaptory Nextera (Illumina, USA) s indexem, tedy vnějším bar kódem a P5/ P7 koncem. Pro průběh druhého kroku PCR bylo pro vzorky trusu a výtěry zobáku a kloaky smíseno 10 µl KAPA HIFI Hot Start Ready Mixu, 4 µM adaptorů a 6 µl produktu prvního kroku PCR. Pro vzorky střevní tkáně bylo připraveno 10 µl KAPA HIFI Hot Start Ready Mixu, 5 µl Microbial DNA-Free vody (Qiagen, Německo), 4 µM primerů a 1 µl produktu prvního kroku PCR. V tomto kole PCR probíhala počáteční denaturace při 95 °C na 3 min následována 12 cykly vždy při 95 °C (30 s), 55 °C (30 s) a 72 °C (30 s). Finální extenze se uskutečnila při 72 °C během 5 min.

Koncentrace produktu druhého kroku PCR byla zjištěna pomocí vizualizace na 1,5% agarázovém gelu barveném za využití barviva Goldview při napětí 100 V na 40 min a vyhodnocena na základě intenzity proužku softwarem GenoSoft (VWR International, Belgie). Na základě ekvimolární koncentrace byly produkty smíseny do jedné zkumavky, tzv. zpoolovány. Finální knihovna byla dále pročistěna s využitím paramagnetických kuliček SPRIselect (Beckman Coulter Life Sciences, USA). Produkty požadované délky (520–750 bp) byly extrahovány za pomocí PipinPrep (Sage Science Inc., USA) a sekvenovány na platformě MiSeq (MiSeq Reagent Kit v3 600 cycles, Illumina, USA) na Středočeském technologickém institutu (CEITEC) Masarykovy Univerzity v Brně. Všechny vzorky byly osekvenovány v technických PCR duplikátech.

3.3.1.2 Bioinformatická analýza

Pro demultiplexování, tedy přiřazení získaných sekvenčních readů k příslušnému vzorku na základě bar kódů, a k detekci a odstranění (trimování) genově specifických primerů byl využit algoritmus Skewer (Jiang et al. 2014). V dalším kroku byly eliminovány ready s nízkou kvalitou (očekávaná míra chybovosti pro paired-end read > 1). Pro následné odstranění šumu, tzv. denoising, takto profiltrovaných sekvencí a kvantifikaci 16S rRNA v každém vzorku byl využit software DADA2 (Callahan et al. 2016). Tímto krokem byla zajištěna eliminace sekvenčních chyb ze získaných readů a identifikace správné biologické sekvence mezi ready. Dále byl použit program UCHIME (Edgar et al. 2011) za účelem detekce chimérických OTU (z anglického operational taxonomic unit, operační taxonomická jednotka). Pro samostatné odfiltrování těchto chimér z datasetu posloužila referenční databáze gold.fna (dostupná na: <https://drive5.com/uchime/gold.fa>). Pro zbývající OTU byla

přiřazena taxonomie pomocí klasifikátoru RDP Classifier (Wang et al. 2007). Pro anotaci bakteriálních OTU byla využita databáze GreenGenes, verze gg_13_8 (DeSantis et al. 2006). Dále byly sekvence bakteriálních OTU uspořádány pomocí nástroje PyNAST (Caporaso et al. 2010) a s pomocí FastTree (Price, Dehal a Arkin 2009) pro ně byl zkonstruován fylogenetický strom. Nakonec byly do jedné databáze sloučeny tabulky OTU, resp. počty OTU readů pro jednotlivé vzorky, sekvence OTU, jejich taxonomické anotace a fylogeneze spolu s metadaty k vzorkům pomocí programu R (R Development Core Team 2017) a s využitím balíčku phyloseq (McMurdie a Holmes 2013).

Protože byly získané sekvence produktem dvou sekvenčních běhů, bylo nutné tyto oddělené výstupy spojit v ucelená data. Obě databáze phyloseq byly tedy propojeny do jedné podle referenčních sekvencí. Vzhledem k rozdílům mezi oběma sekvenačními běhy bylo nutné následně data klastrovat na základě 0,97 podobnosti s pomocí nástroje VSEARCH (Rognes et al. 2016). Pro nově vzniklé OTU byla vytvořena taxonomie a fylogenetický strom stejným způsobem, jako je uvedeno výše. Následovalo odstranění OTU vyskytujících se pouze v jediném vzorku. Nakonec byly eliminovány takové OTU, které byly v rámci jednoho vzorku zastoupeny méně než 1 %. Po propojení výsledků podle sekvencí byla data zpracována v infrastruktuře MetaCentrum pomocí skriptu Taxonomy_2.sh. Dále bylo provedeno klastrování a poté byla data spuštěna podle skriptu Taxonomy_3.sh v MetaCentru.

Bioinformatická analýza byla provedena Mgr. Jakubem Kreisingerem, Ph.D. a Mgr. Lucií Schmiedovou, já jsem se procedury účastnila při zpracování částečného souboru dat.

3.3.1.3 Statistická analýza

3.3.1.3.1 Konzistence ve složení bakteriálních komunit

Pro zhodnocení konzistence ve složení bakteriálních společenství ve vzorkách střeva, trusu, výtěrů kloaky a zobáku byla nejprve využita analýza hlavních koordinát (z anglického Principal Coordinates Analysis, PCoA) odvozená od Bray-Curtisových vzdáleností, vhodných pro porovnávání dat zahrnujících abundance druhů (Magurran 2004). PCoA byla provedena pomocí balíčku phylosq (McMurdie a Holmes 2013). Aplikováno bylo i nemetrické mnohorozměrné škálování (NMDS) pro dvě dimenze.

Za účelem matematického vyjádření odlišností ve složení mikrobioty mezi uvedenými typy mikrobiologických vzorků byla aplikována Prokrustova analýza. V rámci této analýzy byly

využity PCoA ordinace jako dva vícerozměrné ordinační prostory pro porovnávání. Použitím rotace byla nalezena korelace mezi ordinacemi pro dvě datové matice obsahující stejné objekty a byly sečteny druhé mocniny vzdáleností mezi odpovídajícími si body ze dvou asociačních matic. Analýza byla provedena formou „protest“ pomocí balíčku vegan (Oksanen et al. 2019) v programu R (R Development Core Team 2017).

3.3.1.3.2 Závislost bakteriálních OTU na hematologických parametrech

Pro každý mikrobiologický vzorek byl následně vytvořen datový vzorek, v rámci něhož byla porovnáváním lineárních mixovaných modelů metodou MCMC, zahrnutou v balíčku MCMCglmm (Hadfield 2010), testována závislost bakteriálních OTU na jednotlivých hematologických parametrech. Hodnoty abundance bakteriálních OTU a hodnoty hematologických znaků byly logaritmicky znormalizovány. Pro zahrnutí fylogeneze byl použit konsensuální fylogenetický strom (v. kap. 3.2.4.4). Testování probíhalo v jednotlivých modelech, kdy byly bakteriální operační taxonomické jednotky a hematologické parametry vedeny jako pevné faktory a efekty chovatele, fylogeneze a roku jako faktory náhodné. MCMC iterace proběhly v počtu 501 000, hodnota burnin byla nastavena na 1 000 a thinning interval na 200.

Za účelem ověření důvěryhodnosti byly hodnoty statistické významnosti upraveny Benjaminiho-Hochbergovou metodou (Benjamini a Hochberg 1995). Grafická znázornění byla vytvořena s využitím balíčků phyloseq (McMurdie a Holmes 2013) a ggplot2 (Wickham 2009). Veškerá testování se uskutečnila pomocí programu R (R Development Core Team 2017).

Statistická analýza byla provedena Mgr. Jakubem Kreisingerem, Ph.D. a Mgr. Lucií Schmiedovou, já jsem se procedury účastnila při zpracování částečného souboru dat.

3.3.2 Analýza fekálních nátěrů Gramovou metodou

Analýza fekálních nátěrů barvených dle Grama byla provedena za účelem okamžitého zhodnocení procentuálního složení bakterií přítomných v trávicím traktu a dále za účelem získání datového materiálu pro porovnání výsledku získaného DNA metabarcodingem.

3.3.2.1 Laboratorní analýza

Na vzduchu zaschlé fekální nátěry bylyobarveny Gramovou metodou barvení pomocí barvící soupravy (Gram-color, Sigma-Aldrich, USA) běžně užívané k analýze materiálu

bakteriologických vzorků pro diagnostické účely (Horobin a Kiernan 2002). Tato sada obsahuje roztok krystalové violeti, Lugolův roztok, odbarvovací roztok a roztok safraninu.

Gramovo barvení bylo aplikováno za účelem umožnění rychlého rozlišení pozorovaných bakterií na grampozitivní a gramnegativní, kdy základ pro afinitu barvy představuje mureinová struktura bakteriální buněčné stěny. Principiálně jsou bakterie v prvním kroku barveny pomocí anilinového barviva, krystalové violeti, a dále zality Lugolovým roztokem, tedy roztokem jódu, což umožní vytvořit komplex barvy a jódu. Při odbarvovacím procesu tento komplex zůstane v několikavrstvé mureinové struktuře grampozitivní bakterie, proto se tyto bakterie dále jeví jako modrofialové. Gramnegativní bakterie naopak disponují jednovrstvou mureinovou strukturou buněčné stěny, barvivo je proto z jejich stěny uvolněno. Tyto bakterie jsou dále dobarveny roztokem safraninu, díky čemuž se jeví jako růžové a červené (Hewitt 2012, Horobin a Kiernan 2002).

Barvení probíhalo v barvící komůrce za použití imerzní metody. Gramův roztok krystalové violeti byl naředěn destilovanou vodou v poměru 1 : 3. Sklíčky bylo po ponoření do roztoku pohybováno, aby se zajistilo dostatečné výsledné obarvení a po jednotlivých krocích barvení byla sklíčka ponechána k okapání. Během barvení byly dodrženy časy uvedené v tabulce 3.3-I.

Tabulka 3.3-I. Postup barvení Gramovou metodou. Převzato z protokolu přiloženého k barvící soupravě Gram-Color (Sigma-Aldrich, USA).

Sklíčko s fixovaným nátěrem	
Činidlo 1, (roztok krystalové violeti)	1:30 min
Tekoucí vodovodní voda	30 sekundy
Činidlo 2 (stabilizovaný Lugolův roztok)*	3 min
Tekoucí vodovodní voda	20 sekundy
Činidlo 3 nebo 4 (odbarvovací roztok)**	5–10 sekundy
Tekoucí vodovodní voda	30 sekundy
Činidlo 5 (roztok safraninu)	1 min
Tekoucí vodovodní voda	1 min
Ponechejte volně uschnout (např. přes noc nebo v sušárně při 50 °C)	

Nabarvené a přes noc zaschlé fekální nátěry byly za účelem archivace zality bezvodným montovacím médiem (Neo-Mount, Sigma-Aldrich, USA) a překryty krycím sklíčkem.

3.3.2.2 Digitální analýza

Fotografie zpracovaných fekálních nátěrů byly pořízeny pod zvětšením 600x za použití imerzního oleje (MXA22168 Nikon Immersion Oil (Type F), Nikon, Japonsko) na invertovaném mikroskopu (Eclipse Ti2, Nikon, Japonsko). Na základě výsledného zabarvení bakteriální buněčné stěny a morfologie jsou bakterie roztríďeny do čtyř kategorií: 1) grampozitivní koky, 2) grampozitivní tyčinky, 3) gramnegativní koky a 4) gramnegativní tyčinky (Leboffe a Pierce 2011). Interpretace nátěru barveného Gramovou metodou probíhá vyhodnocením relativního zastoupení (%) těchto kategorií na jednom poli nátěru. Toto vyhodnocení je v diagnostické praxi většinou prováděno přímo pod světelným mikroskopem při zvětšení 1000x odhadem zkušeného veterinárního lékaře (Leboffe a Pierce 2011), pro tuto diplomovou práci byl však využit program ImageJ (Rueden et al. 2017), kdy byl s pomocí pluginu CellCounter (Kurt de Vos 2010, <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>) na každém snímku kvantifikován počet bakteriálních objektů a každý tento objekt zařazen do příslušné kategorie. Počítání bylo vždy provedeno ve stejně velké oblasti zájmu, tedy v poli o velikosti 3700 x 2220 px a na takovém místě fotografie, kde bylo rozložení bakterií uniformní.

3.3.2.3 Statistická analýza

Výsledky analýzy fekálních nátěrů byly přiřazeny do souhrnné databáze phyloseq (v. kap. 3.3.1.2). K sekvencím bakteriálních OTU získaných ze vzorků trusu spolu s jejich taxonomickou anotací byly dále na základě odborné literatury (Leboffe a Pierce 2011) přičleněny jejich morfologické kategorie a pro každý fekální vzorek určeny abundance kategorií ve vzorku obsažených. Hodnoty abundance bakteriální morfologické kategorie ve vzorku trusu jedince a hodnoty relativního (%) zastoupení dané kategorie ve fekálním nátěru téhož jedince byly podrobeny Pearsonově korelačnímu testu v programu R (R Development Core Team 2017). Grafická znázornění byla vytvořena s využitím balíčků phyloseq (McMurdie a Holmes 2013) a ggplot2 (Wickham 2009).

4 Výsledky

4.1 Hematologická analýza

V rámci hematologického vyšetření byly pro účely této diplomové práce zjištěny hodnoty relativního zastoupení leukocytů u 273 jedinců papoušků a hodnoty pro absolutní počty leukocytů u 177 jedinců. Hodnoty absolutních počtů erytrocytů byly vyšetřeny u 179 jedinců, hematokritu u 177 jedinců a hemoglobinu u 170 jedinců. Erytrocytární index MCHC bylo možno dopočítat pouze u jedinců se známou hodnotou hematokritu i hemoglobinu. Takoví jedinci se v mé datovém souboru vyskytli v počtu 130. Dva jedinci byli ze získaného datasetu odstraněni z důvodu duplikovaného výskytu (vyhodnocen byl pouze první vzorek). Pohlaví bylo molekulárně determinováno u 15 jedinců. Protože u některých jedinců nebyly dostupné všechny potřebné údaje (v. kap. 2.3, tab. 2.3-II), pro statistické zpracování výsledků hematologického vyšetření byly použity zjištěné hodnoty relativního zastoupení leukocytů pouze 198 jedinců 53 druhů papoušků a absolutního počtu leukocytů 124 jedinců 40 druhů. Dále byly použity vyšetřené hodnoty absolutních počtů erytrocytů 139 jedinců z 45 druhů, hodnoty hematokritu 124 jedinců 39 druhů, hemoglobinu 107 jedinců 29 druhů a MCHC jedinců papoušků v počtu 104 z 31 druhů (tab. 4.1-a).

Tabulka 4.1-a. Pro každý druh je uveden počet jedinců, u kterých byly vyšetřeny hodnoty krevních parametrů užity v rámci statistického testování korelací a závislostí hematologických parametrů. RPL (relativní počet leukocytů), APL (absolutní počet leukocytů), APE (absolutní počet erytrocytů), Ht (hematokrit), Hb (hemoglobin), MCHC (erytrocytární index MCHC).

Druh	RPL	APL	APE	Ht	Hb	MCHC	Druh	RPL	APL	APE	Ht	Hb	MCHC
<i>Cacatua roseicapilla</i>	5	5	5	5	5	5	<i>Psephotus haematonotus</i>	2	2	1	2	0	0
<i>Ara glaucogularis</i>	1	1	1	1	1	1	<i>Agapornis roseicollis</i>	2	2	2	2	0	0
<i>Melopsittacus undulatus</i>	15	1	9	0	0	0	<i>Neophema elegans</i>	2	2	1	1	0	0
<i>Poicephalus senegalus</i>	4	3	3	3	3	3	<i>Neophema pulchella</i>	2	1	0	1	0	0
<i>Pionites melanocephalus</i>	4	3	3	3	3	3	<i>Diopsittaca nobilis</i>	1	1	1	1	1	1
<i>Ara ararauna</i>	17	13	13	13	13	13	<i>Amazona dufresniana</i>	1	1	1	1	1	1
<i>Psittacus erithacus</i>	41	36	36	36	37	35	<i>Psittacula krameri</i>	1	1	1	1	1	1
<i>Agapornis personatus</i>	1	1	1	1	1	1	<i>Cacatua alba</i>	2	1	1	1	1	1
<i>Amazona ochrocephala</i>	1	1	1	1	1	1	<i>Coracopsis vasa</i>	4	4	4	4	4	4
<i>Poicephalus robustus</i>	3	1	1	1	1	1	<i>Amazona viridigenalis</i>	4	2	2	2	0	0
<i>Amazona amazonica</i>	5	3	3	3	3	3	<i>Nestor notabilis</i>	2	2	2	2	0	0
<i>Amazona aestiva</i>	11	8	9	8	7	7	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	2	2	2	2	0	0
<i>Cacatua goffiniana</i>	1	1	1	1	1	1	<i>Nymphicus hollandicus</i>	3	1	3	1	1	1
<i>Amazona vinacea</i>	3	1	1	1	1	1	<i>Amazona oratrix</i>	2	0	0	0	0	0
<i>Ectacus roratus</i>	7	6	6	6	6	5	<i>Amazona autumnalis</i>	5	0	1	1	1	1
<i>Amazona leucocephala</i>	4	2	2	2	2	2	<i>Amazona pretrei</i>	2	0	0	0	0	0
<i>Poicephalus gulielmi</i>	2	1	1	1	1	1	<i>Poicephalus meyeri</i>	1	0	0	0	0	0
<i>Deroptodus accipitrinus</i>	2	1	1	1	1	1	<i>Amazona tucumana</i>	2	0	0	0	0	0
<i>Amazona albifrons</i>	1	1	1	1	0	0	<i>Amazona finschi</i>	2	0	0	0	0	0
<i>Alisterus chloropterus</i>	2	2	2	2	2	2	<i>Pionus maximiliani</i>	3	0	0	0	0	0
<i>Cacatua galerita</i>	1	1	1	1	1	1	<i>Pionus senilis</i>	2	0	0	0	0	0
<i>Aratinga solstitialis</i>	1	1	1	1	0	0	<i>Neophema splendida</i>	1	0	1	0	0	0
<i>Ara chloropterus</i>	2	2	2	2	1	1	<i>Neophema chrysostoma</i>	1	0	1	0	0	0
<i>Psittacula calthropae</i>	1	1	1	1	1	1	<i>Neopsephotus bourkii</i>	1	0	1	0	0	0
<i>Ara militaris</i>	3	3	3	3	2	2	<i>Forpus coelestis</i>	2	0	2	0	0	0
<i>Pionus menstruus</i>	3	1	1	1	0	0	<i>Alisterus scapularis</i>	1	0	1	1	1	1
<i>Pionites leucogaster</i>	4	2	2	2	2	2							
Celkem								53		198	124	139	124
										107	107	104	

Opakovatelnost stanovení relativního počtu leukocytů je uvedena tabulce 4.1-I.

Tabulka 4.1-I. Stanovená míra repeatability metody diferenciálního rozpočtu leukocytů na základě zhodnocení setu 20 vzorků autorkou práce a veterinářkou a zhodnocení setu 20 vzorků autorkou dvakrát za sebou.

Buněčný typ	Repeatabilita v rámci hodnotitele	Repeatabilita mezi hodnotiteli
relativní počet lymfocytů	0,95	0,98
relativní počet heterofilů	0,95	0,97
relativní počet bazofilů	0,46	0,44
relativní počet eosinofilů	0,77	0,50
relativní počet monocytů	0,85	0,68

Na základě Pearsonova testu byla zjištěna očekávaná pozitivní korelace mezi hodnotami pro absolutní počet erytrocytů, hematokrit a hemoglobin (tab. 4.1-II). Vzhledem k těmto korelacím byl z těchto tří hematologických znaků jako vysvětlovaná proměnná pro navazující statistickou analýzu vybrán pouze absolutní počet erytrocytů a dále erytrocytární index MCHC, který je na absolutním počtu erytrocytů nezávislý.

Tabulka 4.1-II. Korelace hematologických parametrů; p (p hodnota), r (Pearsonův korelační koeficient).

Korelované hematologické parametry	p	r
Absolutní počet erytrocytů vs hemoglobin	< 0,0001	0,64
Absolutní počet erytrocytů vs hematokrit	< 0,0001	0,81
Absolutní počet erytrocytů vs MCHC	0,6156	-0,04
Hemoglobin vs hematokrit	< 0,0001	0,80
Hemoglobin vs MCHC	< 0,0001	0,53
Hematokrit vs MCHC	0,5541	-0,05

Základní popisné údaje pro hodnoty hematologických parametrů v rámci datového podsouboru použitého pro navazující statistickou analýzu jsou uvedeny v tabulkách 4.1-III—VIII, přičemž v tabulce 4.1-III jsou popsány hodnoty relativních počtů jednotlivých podtypů leukocytů a v tabulce 4.1-IV pak hodnoty absolutních počtů leukocytů včetně jejich podtypů. Dále je uveden základní statistický popis absolutních počtů erytrocytů (tab. 4.1-V), hodnot hematokritu (tab. 4.1-VI), koncentrací hemoglobinu (tab. 4.1-VII) a hodnot erytrocytárního indexu MCHC (tab. 4.1-VIII).

Tabulka 4.1-III. Základní statistický popis relativního zastoupení (%) jednotlivých podtypů leukocytů, n = 198.

Buněčný typ	rozsah (%)	průměr	směrodatná odchylka	medián
relativní počet lymfocytů	1,00–96,00	35,88	21,76	32,50
relativní počet heterofilů	0,00–94,00	61,50	21,80	58,55
relativní počet eosinofilů	0,00–10,00	0,48	1,23	0,00
relativní počet bazofilů	0,00–8,00	1,12	1,46	0,86
relativní počet monocytů	0,00–16,00	3,92	3,11	3,32

Tabulka 4.1-IV. Základní popisná statistika pro absolutní počty leukocytů včetně jejich podtypů, n = 124.

Buněčný typ	rozsah ($10^9/l$)	průměr	směrodatná odchylka	medián
absolutní počet leukocytů	1,50–58,50	11,67	8,37	10,00
absolutní počet lymfocytů	0,16–15,41	3,10	2,49	2,31
absolutní počet heterofilů	0,00–49,14	7,98	7,29	5,85

absolutní počet eosinofilů	0,00–0,96	0,06	0,14	0,00
absolutní počet bazofilů	0,00–0,71	0,10	0,15	0,02
absolutní počet monocytů	0,00–4,10	0,50	0,65	0,29

Tabulka 4.1-V. Základní statistický popis absolutních počtů erytrocytů, n = 139.

Buněčný typ	rozsah ($10^{12}/l$)	průměr	směrodatná odchylka	medián
absolutní počet erytrocytů	0,67–4,38	2,98	0,81	3,14

Tabulka 4.1-VI. Základní statistický popis hodnot hematokritu, n = 124.

Parametr	rozsah (l/l)	průměr	směrodatná odchylka	medián
hematokrit	0,11–0,63	0,46	0,09	0,48

Tabulka 4.1-VII. Základní statistický popis pro hodnoty koncentrací hemoglobinu, n = 107.

Parametr	rozsah (g/l)	průměr	směrodatná odchylka	medián
hemoglobin	20,93–244,80	137,58	33,18	142,02

Tabulka 4.1-VIII. Základní popisná statistika pro hodnoty erytrocytárního indexu MCHC, n = 104.

Parametr	rozsah (g/l)	průměr	směrodatná odchylka	medián
MCHC	126,36–470,77	308,80	48,60	318,30

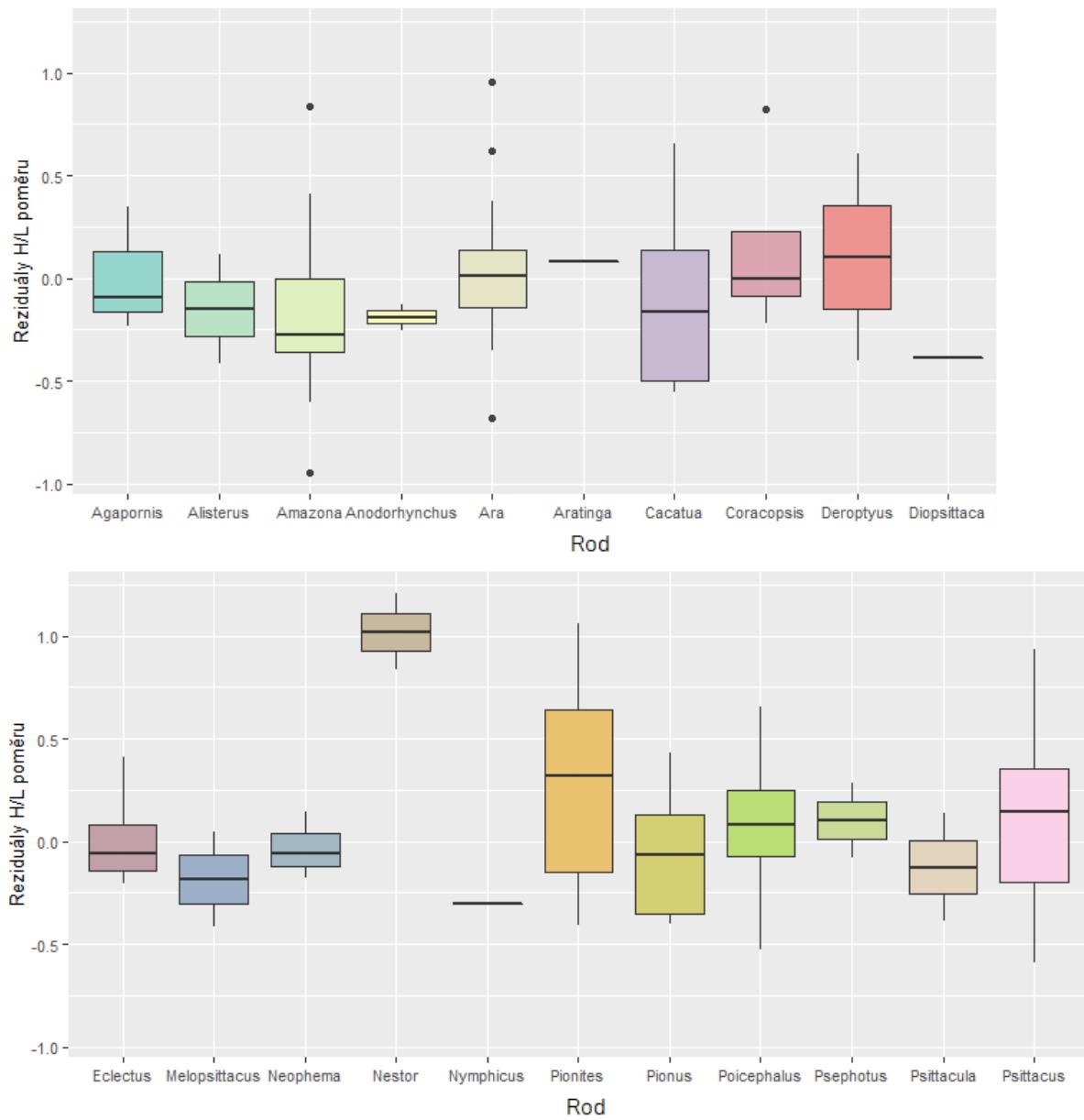
4.1.1 Faktory ovlivňující hematologický stav papoušků

Výsledky hematologických vyšetření byly statisticky zanalyzovány porovnáváním lineárních mixovaných modelů, zohledňujících informační údaje o papouškově, včetně výživových, environmentální a klinických faktorů. Přehledné výsledky popisované v textu práce jsou uvedeny v tabulkách 4.1-IX–XX, hodnoty sklonu \pm SE pro faktoriální proměnné jsou pak dispozici v přílohách 12-I–XII.

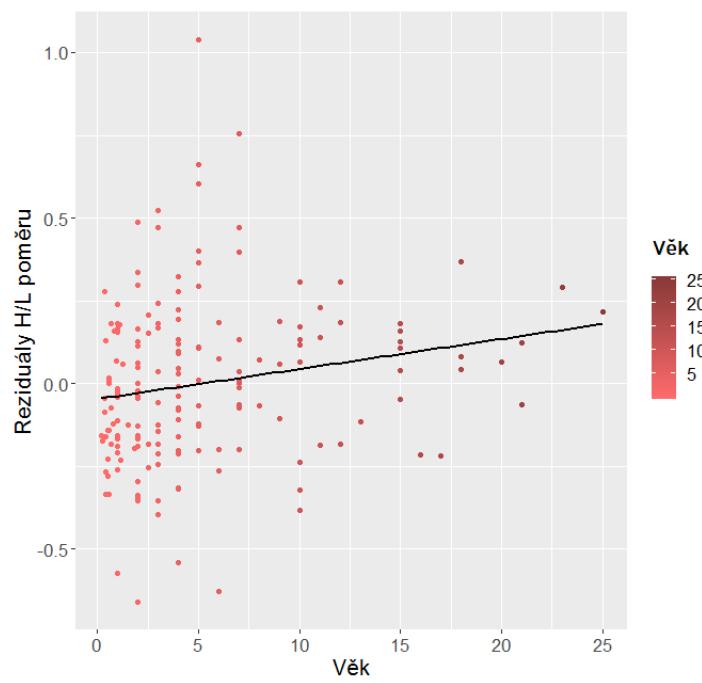
V rámci modelu testujícího závislost hodnot H/L poměru na vysvětlujících proměnných (tab. 4.1-IX, příloha 12-I) byl zjištěn signifikantní efekt rodu papouška ($p < 0,001$, graf 4.1-I) a signifikantně pozitivní efekt věku papouška ($p < 0,001$, graf 4.1-II). Dále byl pozorován negativní vztah H/L poměru s projevy poruch chování ($p = 0,002$, graf 4.1-III) a výživovým stavem ($p = 0,024$).

Tabulka 4.1-IX. Závislost hodnot H/L poměru na rodu; MAM: rod + věk + výživový stav + poruchy chování, n = 198, Chisq = 76,905, p < 0,001.

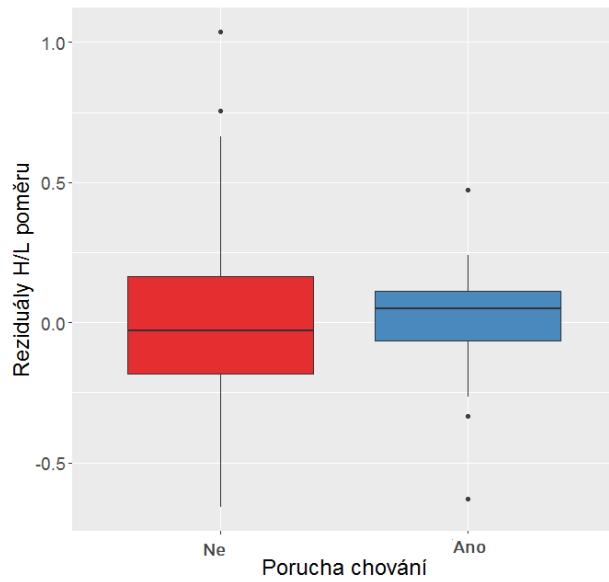
Proměnná	Sklon ± SE	Chisq	p
H/L poměr (%)			
výživový stav	-0,203 ± 0,094	5,072	0,024
poruchy chování		9,933	0,002
věk	0,044 ± 0,012	15,786	< 0,001
rod		58,488	< 0,001



Graf 4.1-I. Vliv rodu papouška na H/L poměr. Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-IX bez efektu rodu, který je vynesen na ose X.



Graf 4.1-II. Vliv věku na H/L poměr. Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-IX bez efektu věku, který je vynesen na ose X.

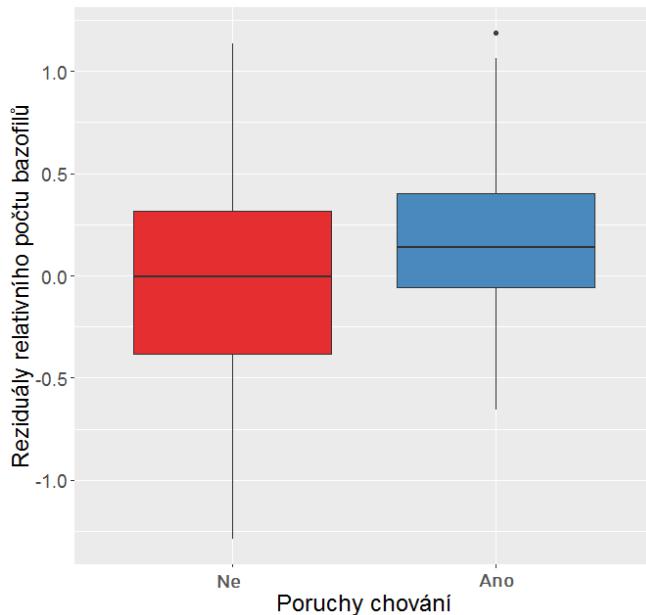


Graf 4.1-III. Vliv poruch chování na H/L poměr. Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-IX bez efektu poruch chování, který je vynesen na ose X.

V modelu testujícím relativní počty bazofilů (tab. 4.1-X, příloha 12-II.) se též projevil vliv rodu papouška ($p < 0,001$). Pozitivní asociace byla zaznamenána se symptomy poruch chování ($p = 0,043$, graf 4.1-IV) a délkou běháku ($p = 0,049$).

Tabulka 4.1-X. Závislost hodnot relativních počtů bazofilů na rodu; MAM: rod + délka běháku + poruchy chování, n = 198, Chisq = 69,791, p < 0,001.

Proměnná	Sklon ± SE	Chisq	p
<u>relativní počet bazofilů (%)</u>			
délka běháku	0,021 ± 0,012	3,883	0,049
rod		67,946	< 0,001
poruchy chování		4,084	0,043



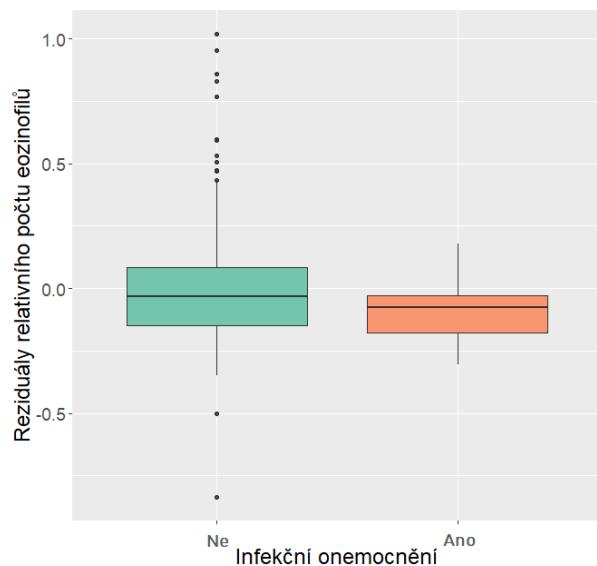
Graf 4.1-IV. Vliv poruch chování na relativní počty bazofilů (%). Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-X bez efektu poruch chování, který je vynesen na ose X.

Pokles relativních počtů eosinofilů v krvi byl zaznamenán jako doprovodný efekt projevů infekčních onemocnění ($p = 0,013$, graf 4.1-V) a poruch chování ($p = 0,044$, tab. 4.1-XI, příloha 12-III, graf 4.1-VI). Je však závislý i na rodu papouška ($p < 0,001$).

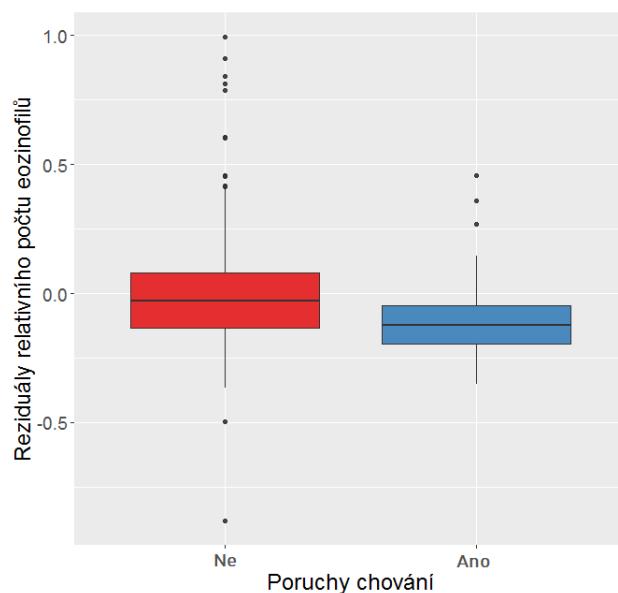
Tabulka 4.1-XI. Závislost hodnot relativních počtů eosinofilů na rodu; MAM: rod + infekční onemocnění + poruchy chování, n = 198, Chisq = 94,879, p < 0,001.

Proměnná	Chisq	p
<u>relativní počet eosinofilů (%)</u>		
poruchy chování	4,070	0,044

rod	91,608	< 0,001
infekční onemocnění	6,111	0,013



Graf 4.1-V. Vliv infekčních chorob na relativní počty eosinofilů (%). Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-XI bez poruch chování onemocnění, který je vynesen na ose X.

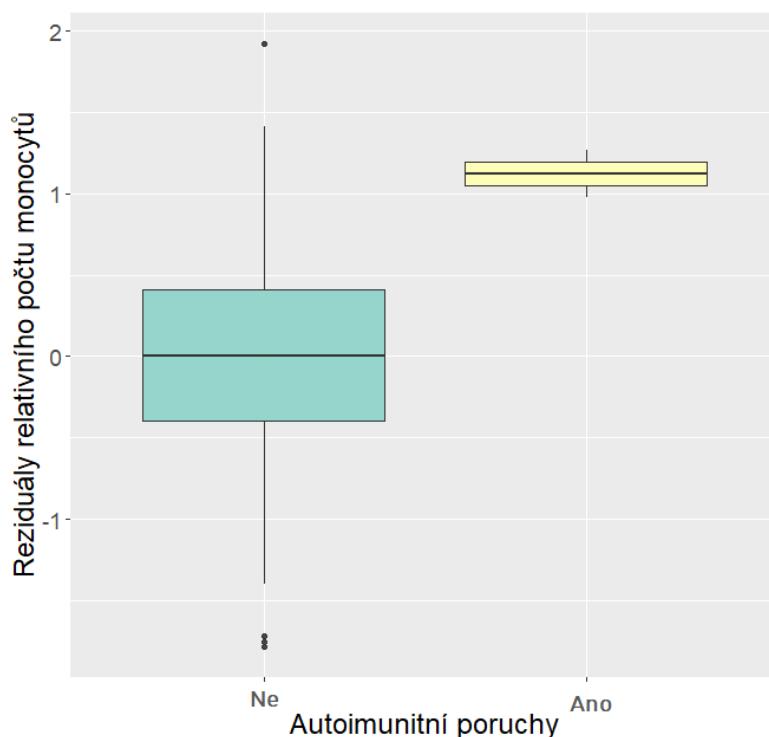


Graf 4.1-VI. Vliv poruch chování na relativní počty eosinofilů (%). Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-XI bez efektu poruch chování, který je vynesen na ose X.

Hodnoty relativních počtů monocytů byly také ovlivněny rodem papouška ($p < 0,001$, tab. 4.1-XII, příloha 12-IV), přičemž jejich nárůst byl zaznamenán v důsledku autoimunitních poruch ($p = 0,002$, graf 4.1-VII) a pokles jako následek přítomnosti granulí ve stravě ($p = 0,016$) a samostatném chovu ($p = 0,031$). U papoušků chovaných v páru byl naopak pozorován nárůst hodnot relativních počtů monocytů ($p = 0,031$).

Tabulka 4.1-XII. Závislost hodnot relativních počtů monocytů na rodu; MAM: rod + chov (samostatně/pár/hejno) + granule jako složka stravy + autoimunitní poruchy, $n = 198$, Chisq = 71,344, $p < 0,001$.

Proměnná	Chisq	p
relativní počet monocytů (%)		
chov (samostatně/pár/hejno)	6,938	0,031
rod	63,359	< 0,001
granule jako složka stravy	5,819	0,016
autoimunitní poruchy	9,764	0,002

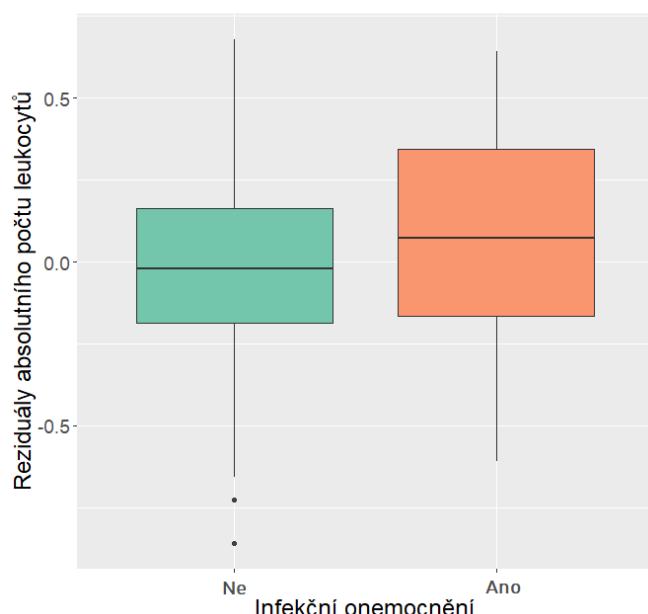


Graf 4.1-VII. Vliv autoimunitních poruch na relativní počty monocytů (%). Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-XII bez efektu autoimunitních onemocnění, který je vynesen na ose X.

Hodnoty absolutních počtů leukocytů byly negativně asociovány s délkou běháku ($p = 0,035$, tab. 4.1-XIII, příloha 12-V) a pozitivně ovlivněny projevy infekčních onemocnění ($p = 0,046$, graf 4.1-VIII) a přítomností ovoce a zeleniny ve stravě ($p = 0,052$). Prokazatelný je opět vliv rodu papouška ($< 0,001$).

Tabulka 4.1-XIII. Závislost hodnot absolutních počtů leukocytů na rodu; MAM: rod + ovoce a zelenina jako složka stravy + délka běháku + infekční onemocnění; $n = 124$, Chisq = 59,125, $p < 0,001$.

Proměnná	Sklon ± SE	Chisq	p
absolutní počet leukocytů ($10^9/l$)			
ovoce a zelenina jako složka stravy		3,788	0,052
rod		46,480	< 0,001
délka běháku	-0,027 ± 0,014	4,441	0,035
infekční onemocnění		3,966	0,046

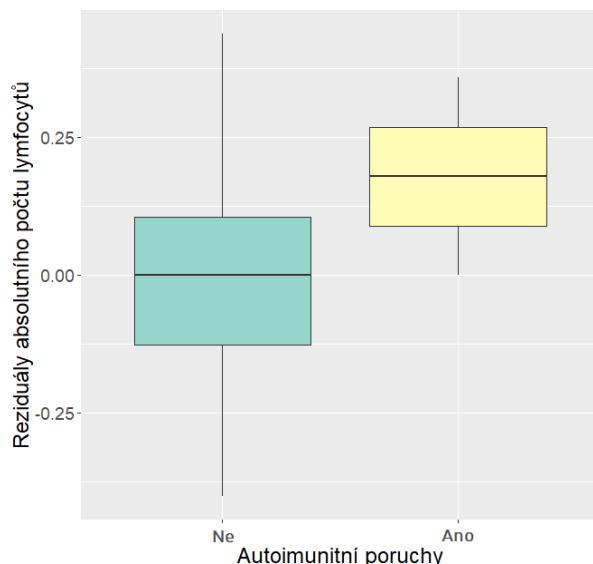


Graf 4.1-VIII. Vliv infekčních onemocnění na absolutní počty leukocytů ($10^9/l$). Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-XIII bez efektu infekčních onemocnění, který je vynesen na ose X.

Nárůst hodnot absolutních počtů lymfocytů byl pozorován v souvislosti s venkovním chovem ($p = 0,011$, tab. 4.1-XIV, příloha 12-VI), v kleci ($p = 0,008$), ovocem a zeleninou jako složkou stravy ($p = 0,031$) a projevy autoimunitních chorob ($p = 0,022$ graf 4.1-IX). Na jejich poklesu byl zaznamenán vliv vnitřního chovu ($p = 0,011$). Signifikantně se na těchto hodnotách projevuje také rod papouška ($p < 0,001$).

Tabulka 4.1-XIV. Závislost hodnot absolutních počtů lymfocytů na rodu; MAM: rod + umístění (uvnitř/vně) + chovné zařízení (voliéra/klec) + ovoce a zelenina jako složka stravy + autoimunitní porucha; $n = 124$, Chisq = 4,6377, $p = 0,031$.

Proměnná	Chisq	p
absolutní počet lymfocytů ($10^9/l$)		
ovoce a zelenina jako složka stravy	4,638	0,031
autoimunitní porucha	5,251	0,022
chovné zařízení (voliéra/klec)	7,058	0,008
rod	68,275	< 0,001
umístění (uvnitř/vně)	8,944	0,011

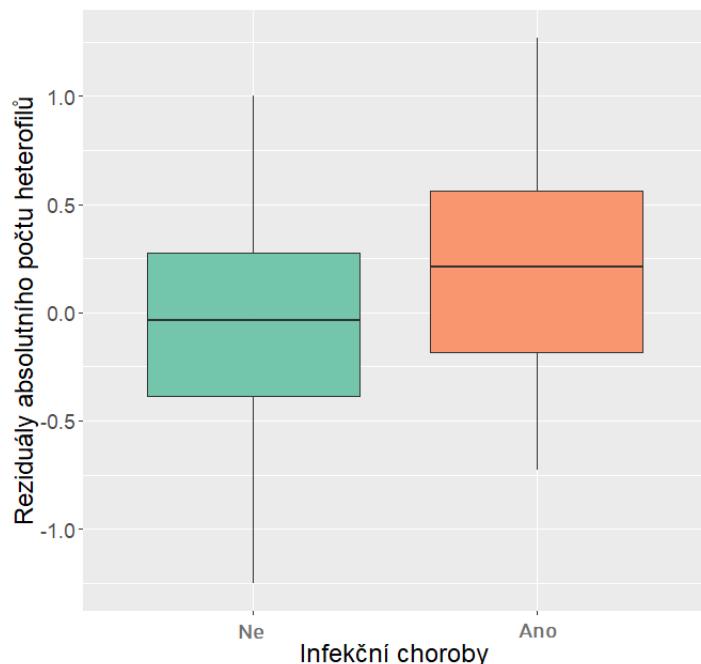


Graf 4.1-IX. Vliv autoimunitních poruch na absolutní počty lymfocytů ($10^9/l$). Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-XIV bez efektu autoimunitních onemocnění, který je vynesen na ose X.

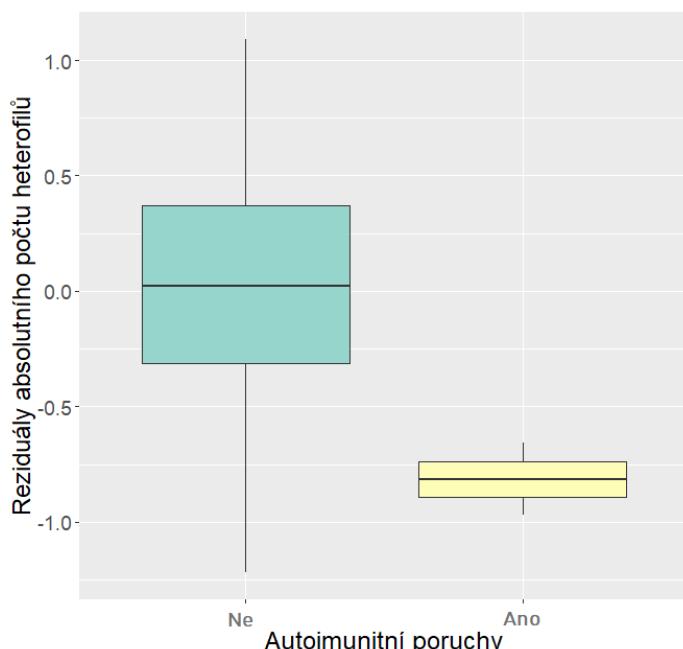
Hodnoty absolutních počtů heterofilů byly pozitivně asociovány s projevy infekčních onemocnění ($p = 0,026$, tab. 4.1-XV, příloha 12-VII, graf 4.1-X) a naopak negativně asociovány s projevy autoimunitních poruch ($p = 0,025$, graf 4.1-XI).

Tabulka 4.1-XV. Závislost hodnot absolutních počtů heterofilů na autoimunitních poruchách; MAM: infekční onemocnění + autoimunitní poruchy; n = 124, Chisq = 10,393, p = 0,005.

Proměnná	Chisq	p
absolutní počet heterofilů ($10^9/l$)		
infekční onemocnění	4,938	0,026
autoimunitní poruchy	5,057	0,025



Graf 4.1-X. Vliv infekčních chorob na absolutní počty heterofilů ($10^9/l$). Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-XV bez efektu infekčních onemocnění, který je vynesen na ose X.



Graf 4.1-XI. Vliv autoimunitních poruch na absolutní počty heterofilů ($10^9/l$). Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-XV bez efektu autoimunitních onemocnění, který je vynesen na ose X.

Na absolutní počty bazofilů byl kromě efektu rodu papouška ($p < 0,001$, tab. 4.1-XVI, příloha 12-VIII) zaznamenán i pozitivní vliv chovu v páru či samostatného chovu ($p = 0,105$).

Tabulka 4.1-XVI. Závislost hodnot absolutních počtů bazofilů na rodu; MAM: rod + chov (samostatně/pár/hejno); n = 124, Chisq = 49,959, p < 0,001.

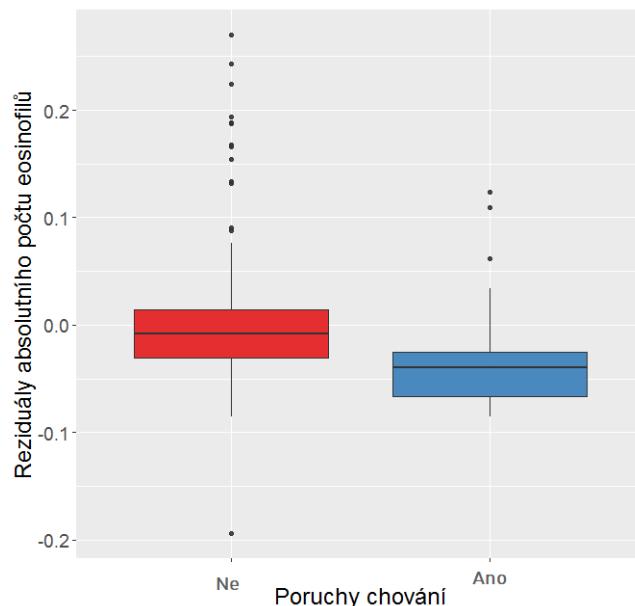
Proměnná	Chisq	p
absolutní počet bazofilů ($10^9/l$)		
rod	49,959	< 0,001
chov (samostatně/pár/hejno)	4,507	0,105

Hodnoty absolutních počtů eosinofilů byly ovlivněny rodem papouška ($p < 0,001$, tab. 4.1-XVII, příloha 12-IX) a dále negativně asociovány s prokazatelnými poruchami chování ($p = 0,009$, graf 4.1-XII) a infekčními onemocněními ($p = 0,030$, graf 4.1-XIII). Ovoce a zelenina ve stravě prokázaly na tento krevní znak pozitivní vliv ($p = 0,056$).

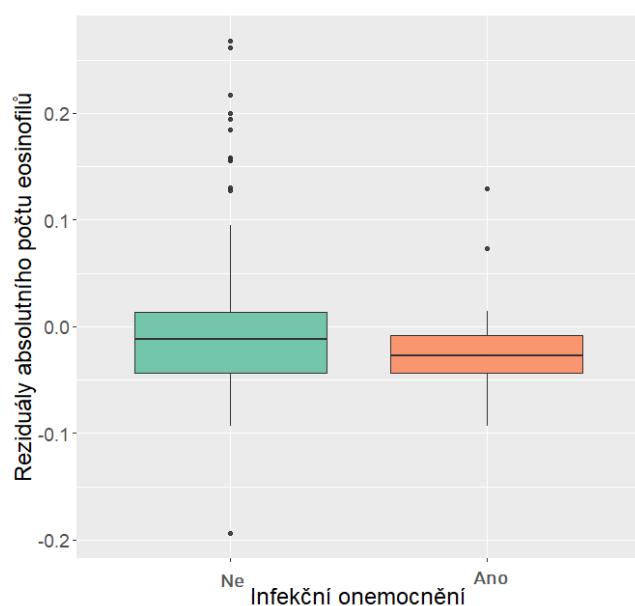
Tabulka 4.1-XVII. Závislost hodnot absolutních počtů eosinofilů na rodu; MAM: rod + ovoce a zelenina jako složka stravy + poruchy chování + infekční onemocnění; n = 124, Chisq = 103,29, p < 0,001.

Proměnná	Chisq	p
absolutní počet eosinofilů ($10^9/l$)		

ovoce a zelenina jako složka stravy	3,645	0,056
rod	99,766	< 0,001
poruchy chování	6,737	0,009
infekční onemocnění	4,727	0,030



Graf 4.1-XII. Vliv poruch chování na absolutní počty eosinofilů ($10^9/l$). Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-XVII bez efektu poruch chování, který je vynesen na ose X.

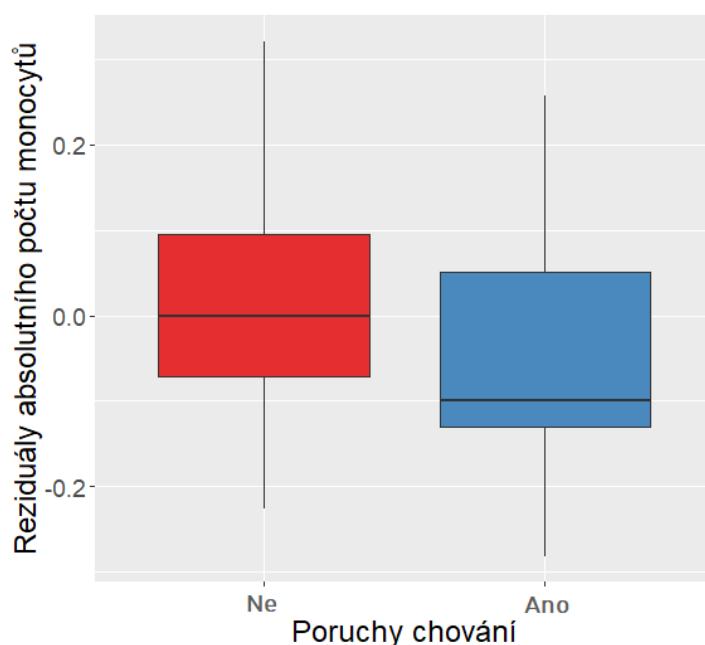


Graf 4.1-XIII. Vliv infekčních onemocnění na absolutní počty eosinofilů ($10^9/l$). Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-XVII bez efektu infekčních onemocnění, který je vynesen na ose X.

Absolutní počty monocytů byly taktéž signifikantně asociovány s rodem papouška ($p < 0,001$, tab. 4.1-XVIII, příloha 12-X). Vzrůst jejich hodnot byl pozorován v souvislosti s věkem, na jejich poklesu se naopak podílí vliv projevů poruch chování ($p = 0,017$, graf 4.1-XIV), či sociální typ chovu, kdy byl jedinec chovaný buď samostatně či v páru.

Tabulka 4.1-XVIII. Závislost hodnot absolutních počtů monocytů na rodu; MAM: rod + věk + poruchy chování + chov (samostatně/pár/hejno); n = 124, Chisq = 55,715, p < 0,001.

Proměnná	Sklon ± SE	Chisq	p
absolutní počet monocytů ($10^9/l$)			
věk	$0,085 \pm 0,040$	4,234	0,040
rod		46,613	< 0,001
chov (samostatně/pár/hejno)		10,016	0,007
poruchy chování		5,676	0,017



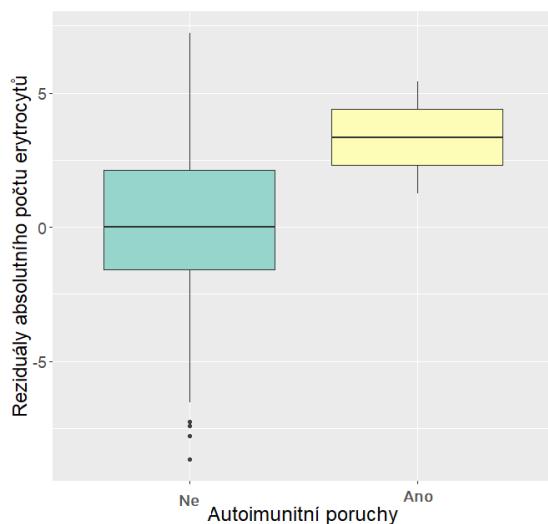
Graf 4.1-XIV. Vliv poruch chování na absolutní počty monocytů ($10^9/l$). Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-XVIII bez efektu poruch chování, který je vynesen na ose X.

Hodnoty absolutních počtů erytrocytů byly asociovány s rodem ($p < 0,001$, tab. 4.1-XIX, příloha 12-XI). Jejich nárůst byl dále ovlivněn venkovním umístěním chovného zařízení ($p < 0,001$), výživovým stavem papouška ($p = 0,002$) a chovem v páru či samostatně ($p = 0,046$). Pozitivní vliv byl rovněž zpozorován i v souvislosti s autoimunitními poruchami ($p = 0,048$, graf 4.1-XV) a datem odběru vzorku ($p = 0,048$, graf 4.1-XVII). Marginálně nesignifikantně

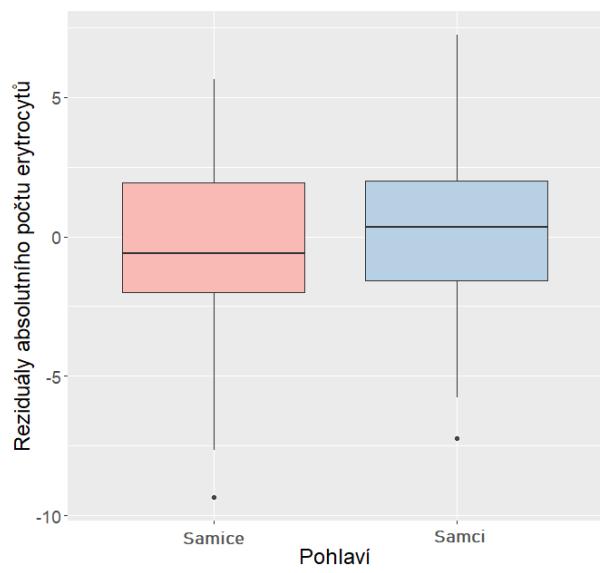
vyšší hodnoty absolutních počtů erytrocytů byly též zjištěny u samců ($p = 0,092$, graf 4.1-XVI).

Tabulka 4.1-XIX. Závislost hodnot absolutních počtů erytrocytů na rodu; MAM: rod + pohlaví + datum odběru + umístění (uvnitř/vně) + chov (samostatně/pár/hejno) + výživový stav + autoimunitní poruchy; n = 139, Chisq = 90,685, p < 0,001.
 *Datum odběru bylo vedeno v podobě pořadového čísla.

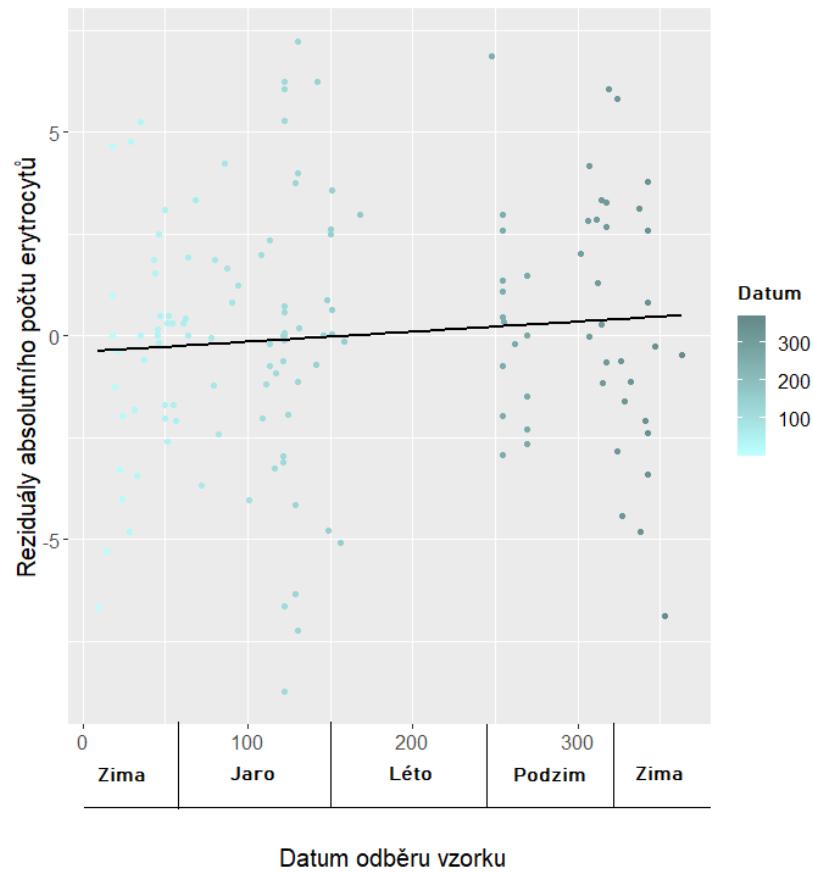
Proměnná	Sklon ± SE	Chisq	p
absolutní počet erytrocytů ($10^{12}/l$)			
rod		72,326	< 0,001
autoimunitní poruchy		3,912	0,048
výživový stav	1,463 ± 0,527	9,506	0,002
chov (samostatně/pár/hejno)		6,171	0,046
datum odběru *	0,005 ± 0,003	3,917	0,048
pohlaví		2,842	0,092
umístění (uvnitř/vně)		16,498	< 0,001



Graf 4.1-XV. Vliv autoimunitních poruch na absolutní počty erytrocytů ($10^{12}/l$). Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-XIX bez efektu autoimunitních poruch, který je vynesen na ose X.



Graf 4.1-XVI. Vliv pohlaví na absolutní počty erytrocytů ($10^{12}/l$). Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-XIX bez efektu pohlaví, který je vynesen na ose X.



Graf 4.1-XVII. Vliv data odběru vzorku na absolutní počty erytrocytů ($10^{12}/l$). Na ose Y jsou zobrazeny reziduály z modelu v tab. 4.1-XIX bez efektu data odběru, který je vynesen na ose X. Datum odběru vzorku bylo vedeno jako pořadové číslo, kdy je datum 1. 1. 2019 zaznamenáno číslem 1 a 31. 12. 2019 číslem 365.

V modelu testujícím souvislost s hodnotami MCHC byl prokázán jejich pokles v důsledku venkovního umístění chovného zařízení ($p = 0,049$, tab. 4.1-XX, příloha 12-XII) a ovoce a zeleniny ($p = 0,054$) jako složky stravy na tyto hodnoty.

Tabulka 4.1-XX. Závislost hodnot MCHC na umístění; MAM: umístění (uvnitř/vně) + ovoce a zelenina jako složka stravy; n = 104, Chisq = 9,364, p = 0,025.

Proměnná	Chisq	p
MCHC (g/l)		
umístění (uvnitř/vně)	6,047	0,049
ovoce a zelenina jako složka stravy	3,703	0,054

Pro efektivní zhodnocení závislosti testovaných hematologických parametrů na fylogenezi byla provedena samostatná analýza, jejíž výsledky jsou k dispozici v kapitole 4.1.2.

4.1.2 Vliv fylogeneze na hematologické parametry

Jelikož byl pro většinu testovaných hematologických parametrů významnou měrou určující rod vyšetřovaného papouška, bylo žádoucí otestovat fylogenetické efekty pro jednotlivé krevní parametry. Výsledky uvedené v tab. 4.1-XXI poukazují k závislosti variability hematologických parametrů na fylogenezi, přičemž nejsilnější fylogenetický signál byl zjištěn v hodnotách pro absolutní počty eosinofilů ($\lambda = 0,873$) a pro H/L poměr ($\lambda = 0,711$). Na základě vizuálního zpracování fylogenetických stromů (obr. 4.1-I—4.1-XII) lze dále posoudit distribuci průměrné hodnoty hematologických znaků napříč papouščí fylogenezí.

Tabulka 4.1-XXI. Vliv fylogeneze na jednotlivé hematologické parametry. λ (lambda, přítomnost fylogenetického signálu); $\lambda = 0$, absence fylogenetického signálu; $\lambda = 1$, model Brownova pohybu.

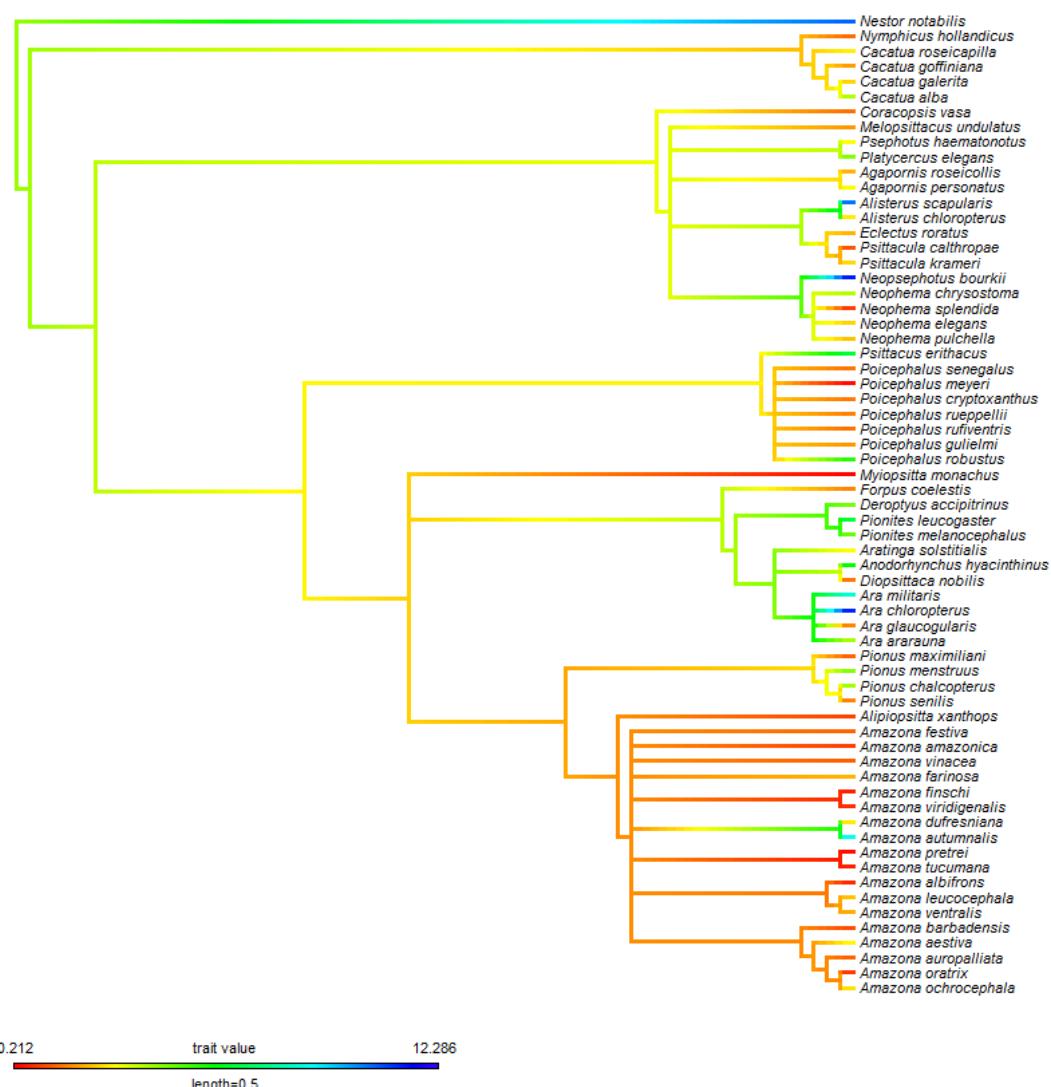
Hematologický parametr	λ	95% konfidenční interval λ	n
H/L poměr	0,711	0,491–0,897	198
relativní počet bazofilů (%)	0,231	0,030–0,463	198
relativní počet eosinofilů (%)	0,152	0,002–0,566	198
relativní počet monocytů (%)	0,314	0,070–0,587	198
absolutní počet leukocytů ($10^9/l$)	0,183	$2,10^{-5}$ –0,802	124
absolutní počet lymfocytů ($10^9/l$)	0,441	0,079–0,811	124
absolutní počet heterofilů ($10^9/l$)	0,131	$2,10^{-5}$ –0,713	124
absolutní počet bazofilů ($10^9/l$)	0,131	$2,10^{-5}$ –0,713	124
absolutní počet eosinofilů ($10^9/l$)	0,873	0,686–0,978	124
absolutní počet monocytů ($10^9/l$)	0,446	0,049–0,860	124
absolutní počet erytrocytů ($10^{12}/l$)	0,107	0,001–0,377	139

MCHC (g/l)

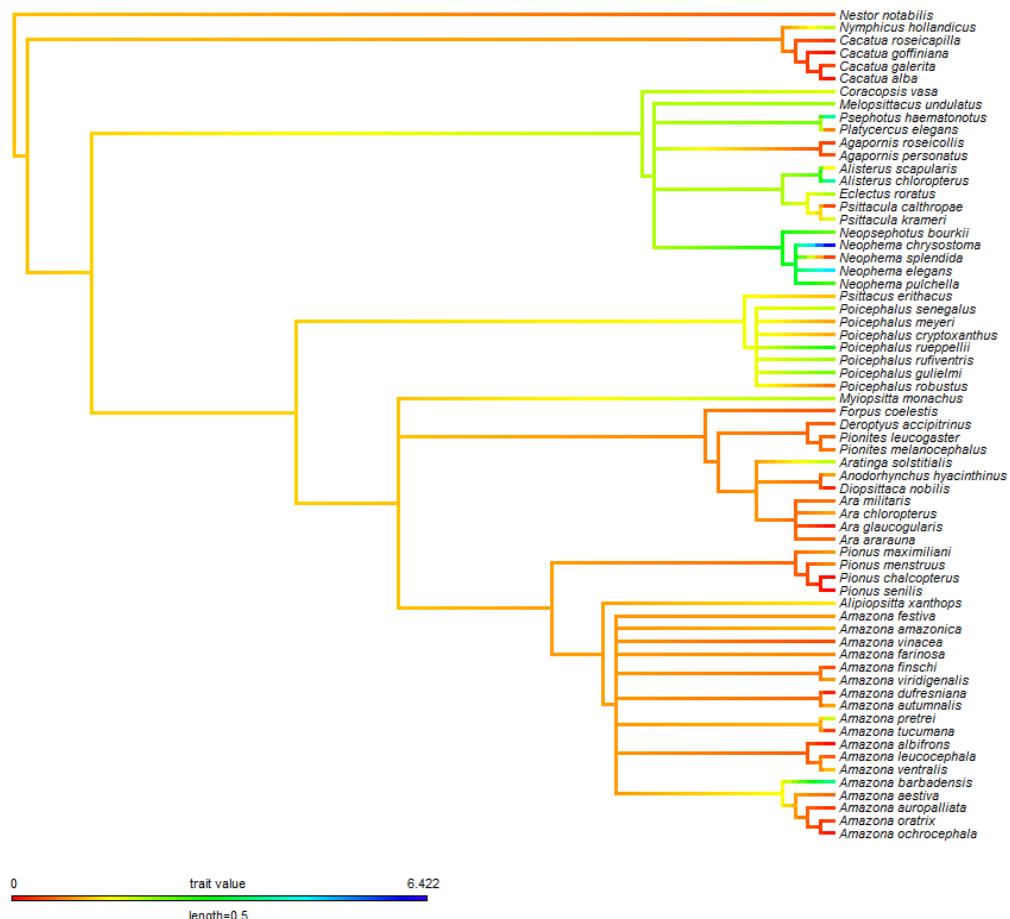
0,053

 $8 \cdot 10^{-7}$ –0,306

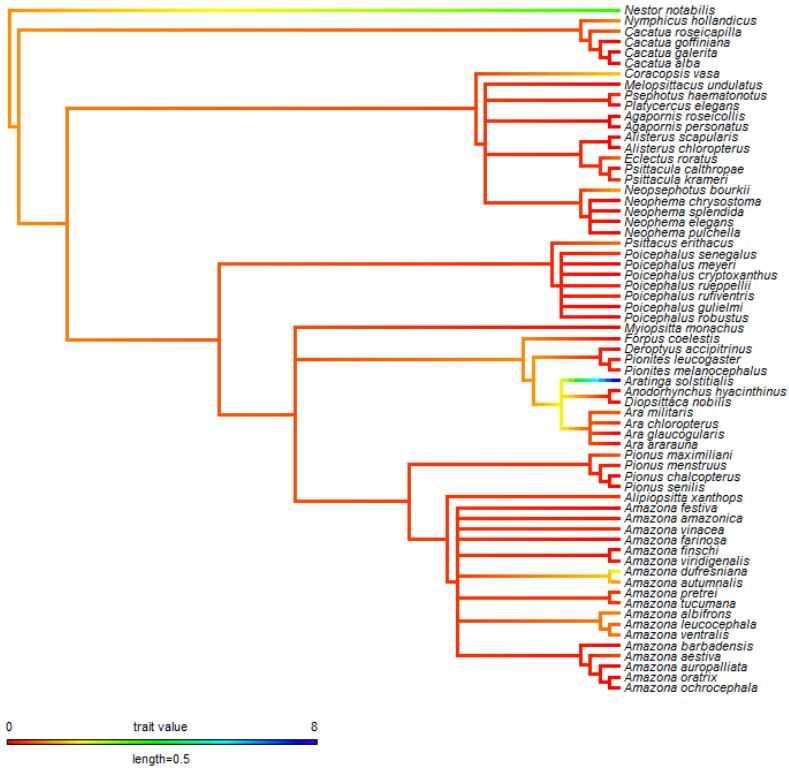
104



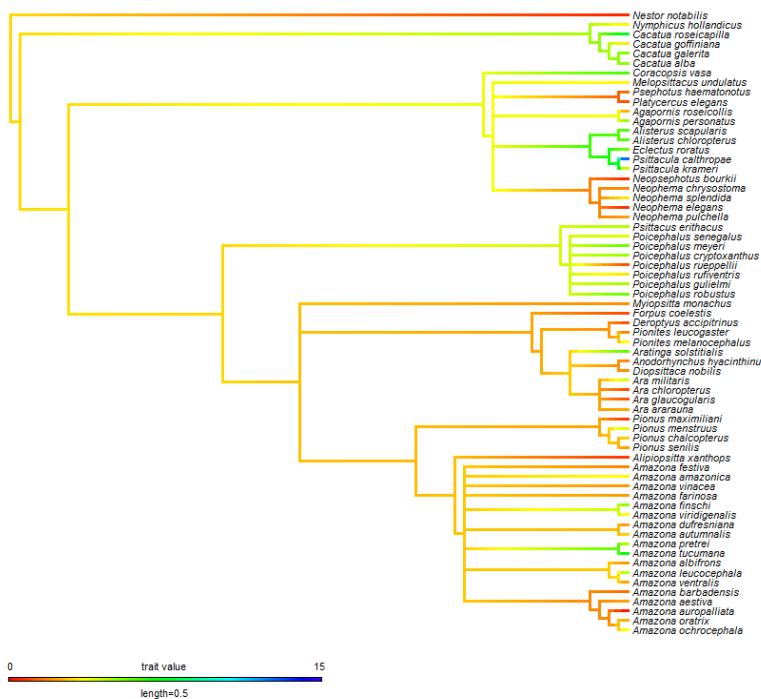
Obrázek 4.1-I. Distribuce průměrné hodnoty H/L poměru napříč papouščí fylogenezí; $\lambda = 0,711$.



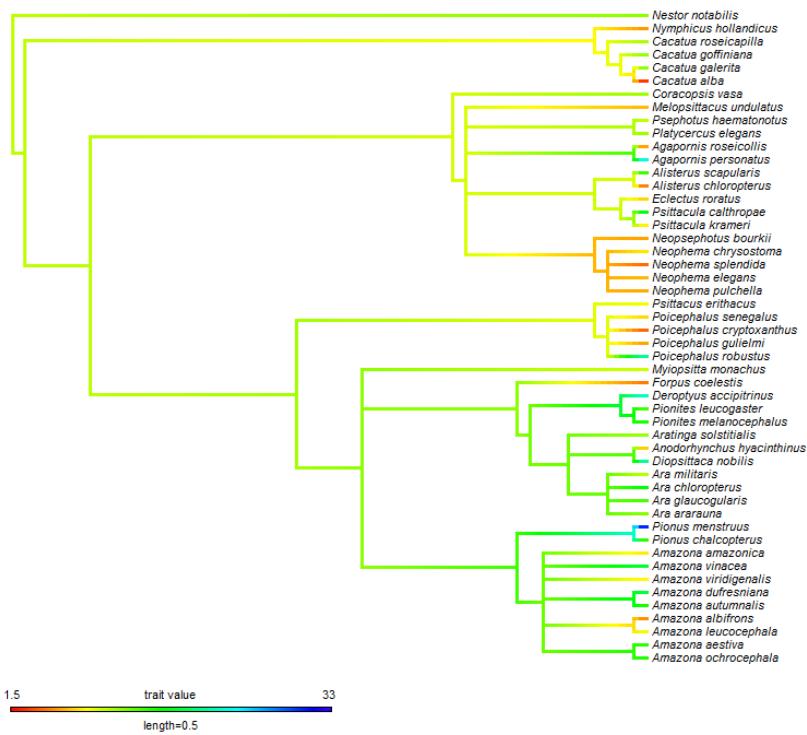
Obrázek 4.1-II. Distribuce průměrné hodnoty relativního počtu bazofilů (%) napříč papouščí fylogenezí; $\lambda = 0,231$.



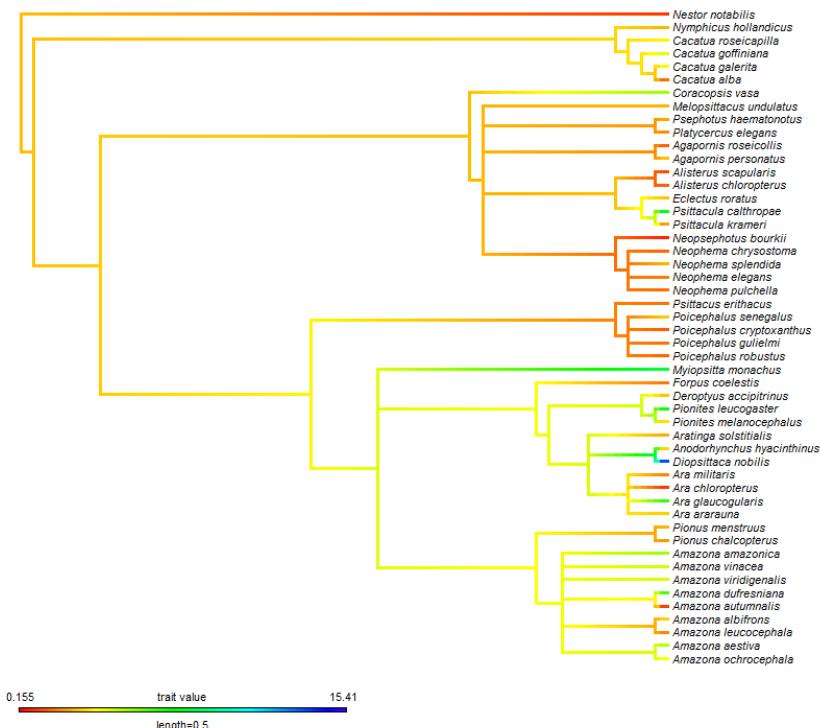
Obrázek 4.1-III. Distribuce průměrné hodnoty relativního počtu eosinofilů (%) napříč papouščí fylogenezí; $\lambda = 0,152$.



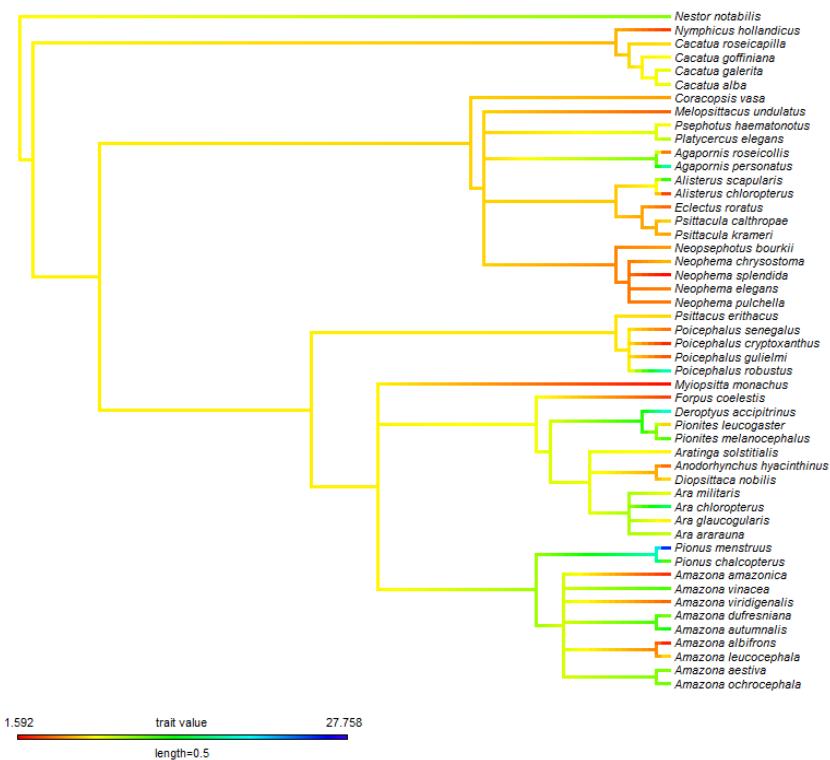
Obrázek 4.1-IV. Distribuce průměrné hodnoty relativního počtu monocytů (%) napříč papouščí fylogenezí; $\lambda = 0,314$.



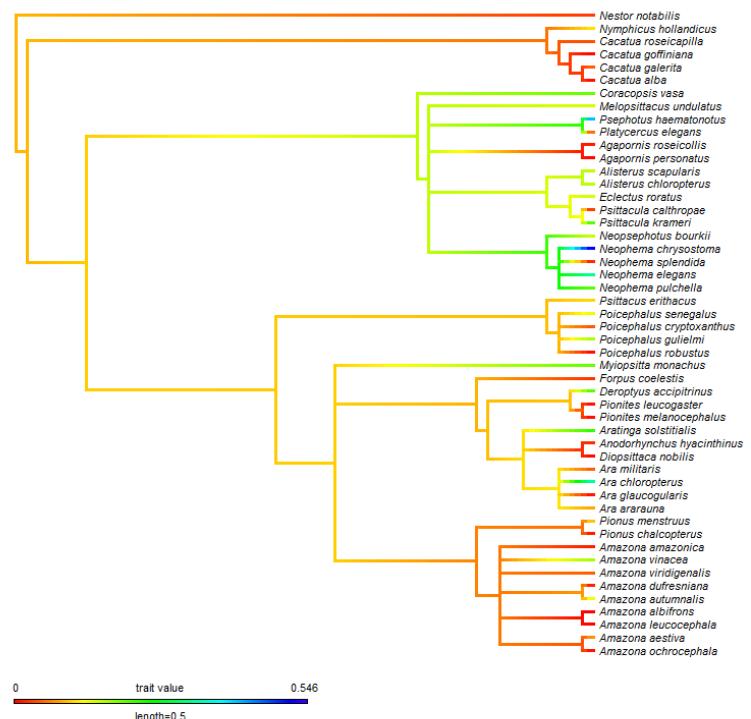
Obrázek 4.1-V. Distribuce průměrné hodnoty pro absolutní počet leukocytů ($10^9/l$) napříč papouščí fylogenezí; $\lambda = 0,183$.



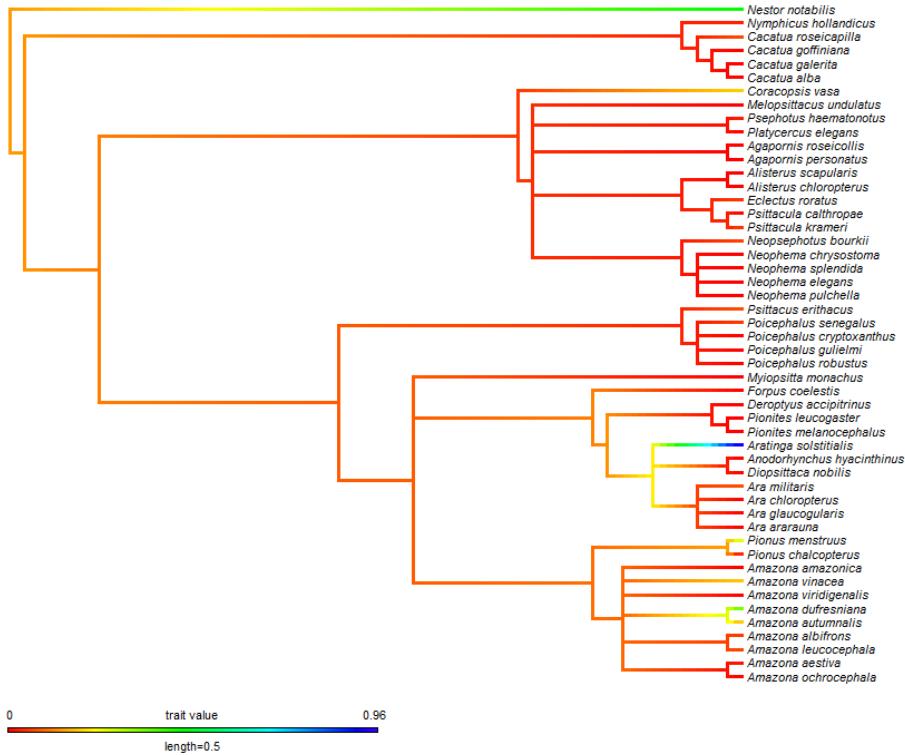
Obrázek 4.1-VI. Distribuce průměrné hodnoty pro absolutní počet lymfocytů ($10^9/l$) napříč papouščí fylogenezí; $\lambda = 0,441$.



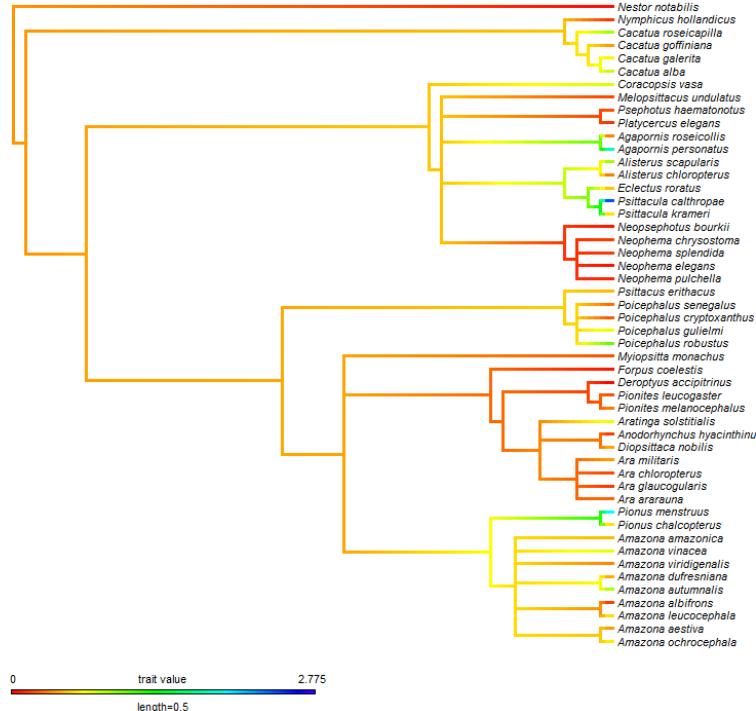
Obrázek 4.1-VII. Distribuce průměrné hodnoty pro absolutní počet heterofilů ($10^9/l$) napříč papouščí fylogenezí; $\lambda = 0,131$.



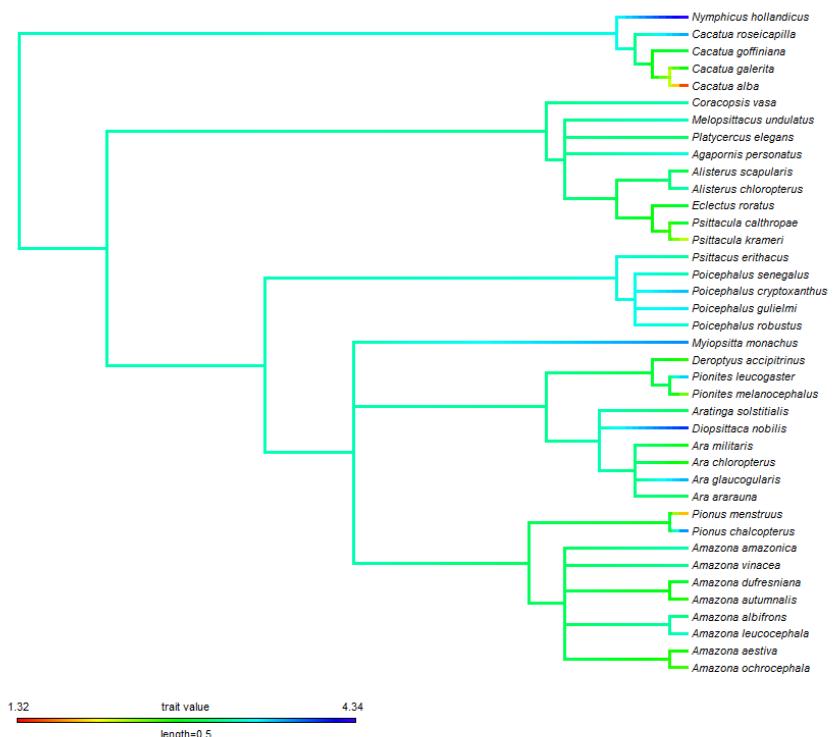
Obrázek 4.1-VIII. Distribuce průměrné hodnoty pro absolutní počet bazofilů ($10^9/l$) napříč papouščí fylogenezí; $\lambda = 0,131$.



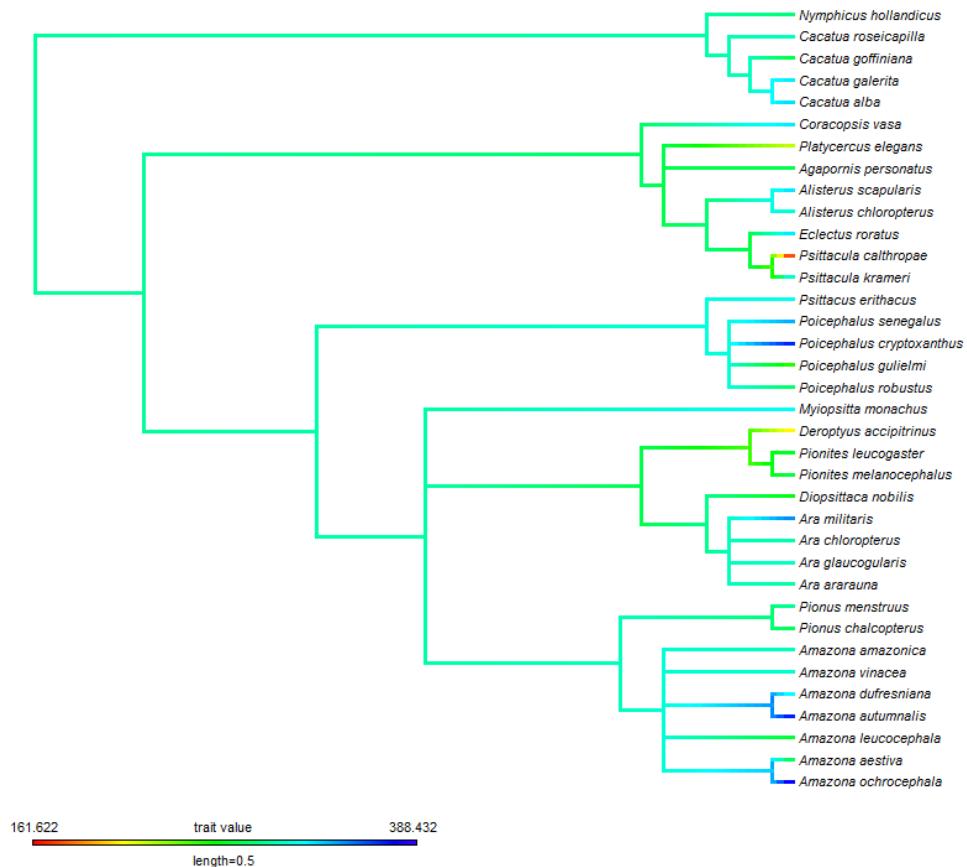
Obrázek 4.1-IX. Distribuce průměrné hodnoty pro absolutní počet eosinofilů ($10^9/l$) napříč papouščí fylogenezí; $\lambda = 0,873$.



Obrázek 4.1-X. Distribuce průměrné hodnoty pro absolutní počet monocytů ($10^9/l$) napříč papouščí fylogenezí; $\lambda = 0,446$.



Obrázek 4.1-XI. Distribuce průměrné hodnoty absolutního počtu erytrocytů ($10^{12}/l$) napříč papouščí fylogenezí; $\lambda = 0,107$.



Obrázek 4.1-XII. Distribuce průměrné hodnoty MCHC (g/l) napříč papouščí fylogenezí; $\lambda = 0,053$.

Statisticky popsané závislosti hodnot hematologických parametrů na testovaných proměnných se zahrnutým vlivem fylogeneze jsou pro porovnání uvedeny v přílohách 12–XIII–XXIV. Tyto závislosti jsou konzistentní s výše popsanými (tab. 4.1-IX–XX) jen do jisté míry.

Hodnoty pro H/L poměr jsou podobně jako v případě testování bez fylogenetického vlivu (tab. 4.1-IX) pozitivně závislé na věku ($p = 0,002$) a negativně na výživovém stavu papouška ($p = 0,008$) a poruchách chování ($p = 0,008$, příloha 12-XIII). Relativní počty bazofilů nejsou, na rozdíl od předchozího testování (tab. 4.1-X), po ošetření efektem fylogeneze signifikantně asociovány s žádnou z vysvětlujících proměnných (příloha 12-XIV). Výsledky relativního rozpočtu eosinofilů byly opět (tab. 4.1-XI), ač marginálně, vztaženy do negativní souvislosti s poruchami chování ($p = 0,084$, příloha 12-XV), avšak efekt infekčních onemocnění byl aplikací vlivu fylogeneze odfiltrován. Projevy autoimunitních poruch však znova prokázaly

svůj vliv na relativní počty monocytů ($p = 0,006$, příloha 12-XVI), ovšem s nižší signifikancí než v případě testování bez zahrnutí efektu fylogeneze (tab. 4.1-XII).

Rozhodujícím faktorem pro nárůst absolutních počtů leukocytů ($p = 0,003$, příloha 12-XVII) a heterofilů ($p = 0,003$, příloha 12-XIX) zůstala pouze přítomnost projevů infekčních chorob, ostatní vlivy, zjištěné předchozím testováním (tab. 4.1-XIII, tab. 4.1-XV), byly odfiltrovány. Absolutní počty lymfocytů se dokonce projevily jako marginálně negativně závislé na věku ($p = 0,080$, příloha 12-XVIII), což při předchozí analýze prokázáno nebylo, avšak vliv dříve zjištěných faktorů potvrzen nebyl (tab. 4.1-XIV). Pro absolutní počty bazofilů nebyl v rámci fylogenezí ošetřené analýzy zjištěn signifikantní vliv žádné proměnné (příloha 12-XX), což je však v konzistenci s předchozími výsledky, kdy taktéž nebyl zjištěn signifikantní efekt jiné proměnné nežli rodu (tab. 4.1-XVI). Ani na absolutní počty eosinofilů neprokázala statisticky významný vliv žádná proměnná (příloha 12-XXI), přestože při analýze bez vlivu fylogeneze byly asociovány s projevy infekčních a behaviorálních poruch a rovněž s potravou (tab. 4.1-XVII). Pokles absolutních počtů monocytů je ovšem opět možné vysvětlit sociálním typem chovu, kdy byl jedinec chován samostatně ($p = 0,020$), či v páru ($p = 0,062$), což bylo pozorováno i při předchozí analýze (tab. 4.1-XVIII). Ačkoliv se ostatní prokázané faktory po přidání efektu fylogeneze na absolutních počtech monocytů znova nedemonstrovaly, jako faktor navíc se s marginálně pozitivním signifikantním vlivem projevila infekční onemocnění ($p = 0,064$, příloha 12-XXII).

Po ošetření vlivem fylogeneze zůstaly hodnoty absolutních počtů erytrocytů pozitivně závislé pouze na venkovním umístění papouška ($p = 0,024$, příloha 12-XXIII), přestože kromě této proměnné byla dříve zjištěna pozitivní asociace i s projevy autoimunitních poruch, výživovým stavem, sociálním typem chovu, pohlavím a s datem odběru (tab. 4.1-XIX). Hodnoty MCHC pak disponují negativní závislostí na přítomnosti zrnin ve stravě ($p = 0,045$, příloha 12-XXIV), ač byla při předcházejícím testování objevena negativní souvislost s ovocem a zeleninou ve stravě a s venkovním umístěním (tab. 4.1-XX).

4.2 Analýza složení gastrointestinální mikrobioty

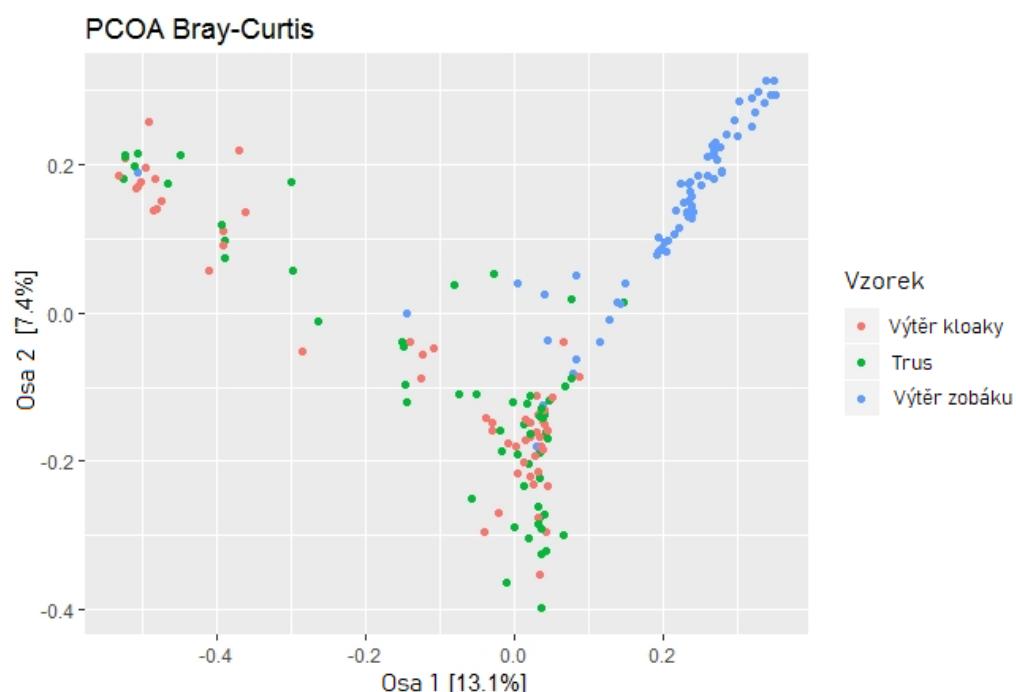
Výsledky analýzy složení gastrointestinální mikrobioty byly získány na základě sekvenace bakteriálního genu pro 16S rRNA ze 132 vzorků trusu, 12 vzorků střev, 228 výtěrů kloaky a 236 výtěrů zobáku z 61 druhů papoušků (tab. 4.2-I). Zbylé vzorky získané pro účely této diplomové práce se nepodařilo během jednotlivých kroků výše uvedeného procesu zpracovat, ať už z důvodů neúspěšné extrakce bakteriální DNA z těchto vzorků, či selhání následné sekvenace DNA.

Tabulka 4.2-I. Pro každý druh papouška je uveden počet osekvenovaných mikrobiologických vzorků.

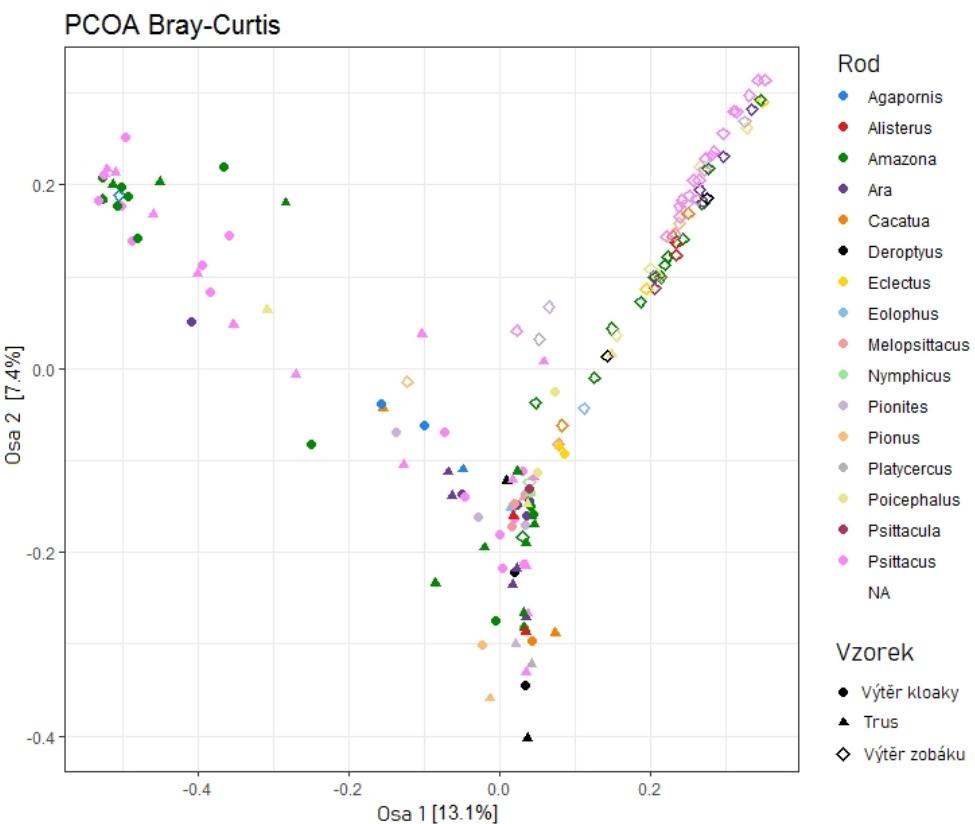
Druh	Orální výtěr	Trus	Výtěr kloaky	Střeva	Druh	Orální výtěr	Trus	Výtěr kloaky	Střeva
<i>Agapornis personatus</i>	0	1	1	0	<i>Deroptyus accipitrinus</i>	2	2	2	0
<i>Agapornis roseicollis</i>	3	2	3	2	<i>Diopsittaca nobilis</i>	1	0	1	0
<i>Alipiopsitta xanthops</i>	2	0	2	0	<i>Eclectus roratus</i>	5	4	5	0
<i>Alisterus chloropterus</i>	2	2	0	0	<i>Forpus coelestis</i>	2	2	2	2
<i>Amazona aestiva</i>	14	11	14	0	<i>Melopsittacus undulatus</i>	16	12	16	2
<i>Amazona albifrons</i>	1	1	1	0	<i>Myiopsitta monachus</i>	1	1	1	0
<i>Amazona amazonica</i>	5	3	4	0	<i>Neophema elegans</i>	2	2	2	2
<i>Amazona auropalliata</i>	4	0	4	0	<i>Neophema chrysostoma</i>	1	0	1	0
<i>Amazona autumnalis</i>	10	1	10	0	<i>Neophema pulchella</i>	2	1	2	0
<i>Amazona barbadensis</i>	2	0	2	0	<i>Neophema splendida</i>	1	1	1	0
<i>Amazona dufresniana</i>	1	1	1	0	<i>Neosephotus bourkii</i>	4	4	4	0
<i>Amazona farinosa</i>	2	0	1	0	<i>Nymphicus hollandicus</i>	3	3	3	2
<i>Amazona festiva</i>	1	0	1	0	<i>Pionites leucogaster</i>	7	2	7	0
<i>Amazona finschi</i>	2	0	2	0	<i>Pionites melanocephalus</i>	6	2	6	0
<i>Amazona leucocephala</i>	4	1	4	0	<i>Pionus chalcopterus</i>	1	0	0	0
<i>Amazona ochrocephala</i>	2	2	2	0	<i>Pionus maximiliani</i>	3	1	3	0
<i>Amazona oratrix</i>	2	0	2	0	<i>Pionus menstruus</i>	4	2	4	0
<i>Amazona pretrei</i>	2	0	2	0	<i>Pionus senilis</i>	1	0	1	0
<i>Amazona tucumana</i>	1	0	2	0	<i>Platycercus elegans</i>	1	1	1	0
<i>Amazona ventralis</i>	3	0	3	0	<i>Poicephalus cryptoxanthus</i>	1	1	1	0
<i>Amazona vinacea</i>	2	1	1	0	<i>Poicephalus gulielmi</i>	1	0	1	0
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	1	1	1	0	<i>Poicephalus meyeri</i>	1	0	1	0
<i>Ara ararauna</i>	15	8	16	0	<i>Poicephalus robustus</i>	3	1	2	0
<i>Ara glaucogularis</i>	2	2	2	0	<i>Poicephalus rueppellii</i>	4	0	4	0
<i>Ara chloropterus</i>	2	2	0	0	<i>Poicephalus rufiventris</i>	4	0	4	0
<i>Ara militaris</i>	3	3	3	0	<i>Poicephalus senegalus</i>	4	3	4	0
<i>Aratinga solstitialis</i>	1	1	1	0	<i>Psephotus haematonotus</i>	2	2	2	2
<i>Cacatua alba</i>	2	2	2	0	<i>Psittacula calthropae</i>	1	0	1	0
<i>Cacatua galerita</i>	1	2	1	0	<i>Psittacula krameri</i>	2	0	2	0
<i>Cacatua goffiniana</i>	1	1	1	0	<i>Psittacus erithacus</i>	44	30	43	0
<i>Cacatua roseicapilla</i>	5	2	5	0	NA	8	5	7	0
Celkem						62	236	228	12

4.2.1 Konzistence ve složení bakteriálních komunit

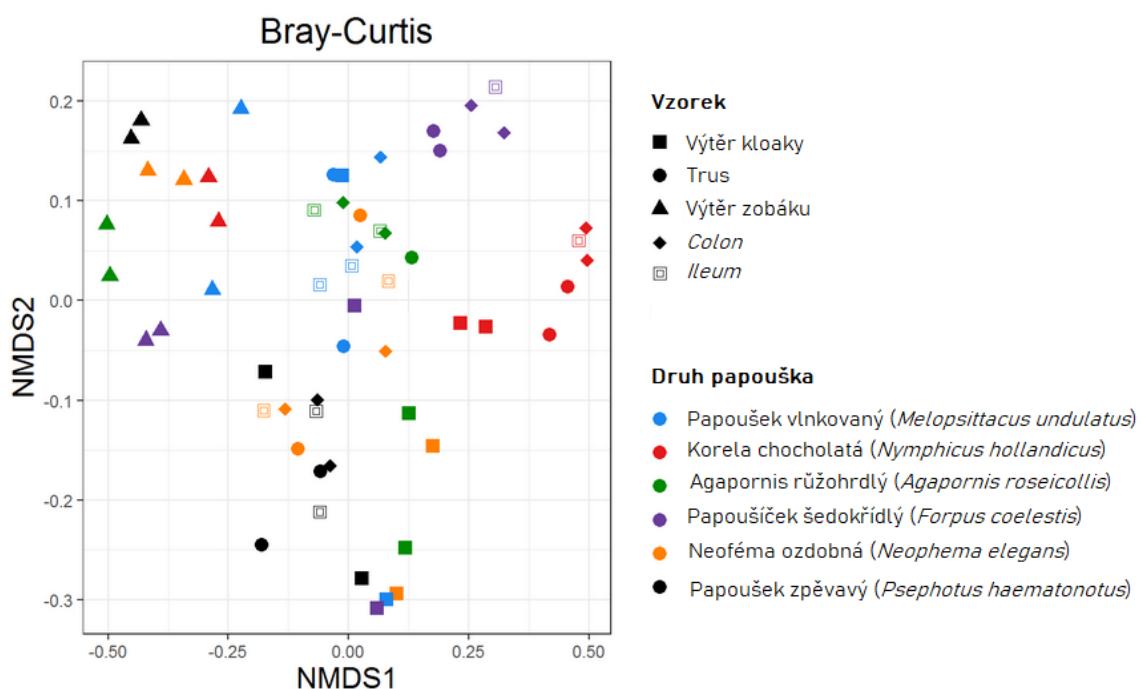
Nejprve byla zhodnocena míra konzistence ve složení bakteriálních komunit mezi všemi typy vzorků na základě vizualizací PCoA ordinací (graf 4.2-I, graf 4.2-II) a NMDS (graf 4.2-III). Ve srovnání s kloakálními výtěry, vzorky trusu a střeva je značná odlišná bakteriální kompozice v orálních výtěrech (graf 4.2-I, graf 4.2-II, graf 4.2-III). Vzhledem k tomu dále nebyly orální výtěry zahrnuty do Prokrustovy analýzy (tab. 4.2-II), která poskytuje přesné statistické vyjádření odlišnosti ve složení. Na variabilitu ve složení mikrobioty testovaných vzorků má dle grafické vizualizace značný vliv rovněž fylogeneze (graf 4.2-II, graf 4.2-III).



Graf 4.2-I. Beta diverzita: PCoA odvozena od Bray-Curtisových distancí mezi vzorky trusu a výtěry kloaky a zobáku.

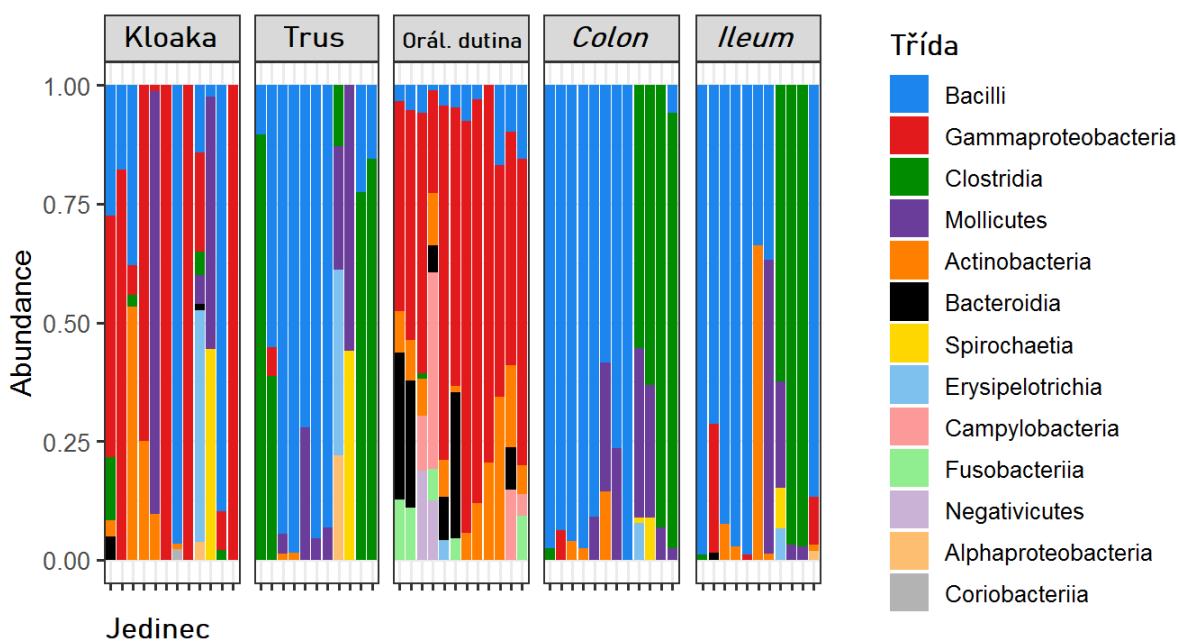


Graf 4.2-II. Beta diverzita: PCoA odvozena od Bray-Curtisových distancí mezi vzorky trusu a výtěry kloaky a zobáku vztažena na jednotlivé rody papoušků.

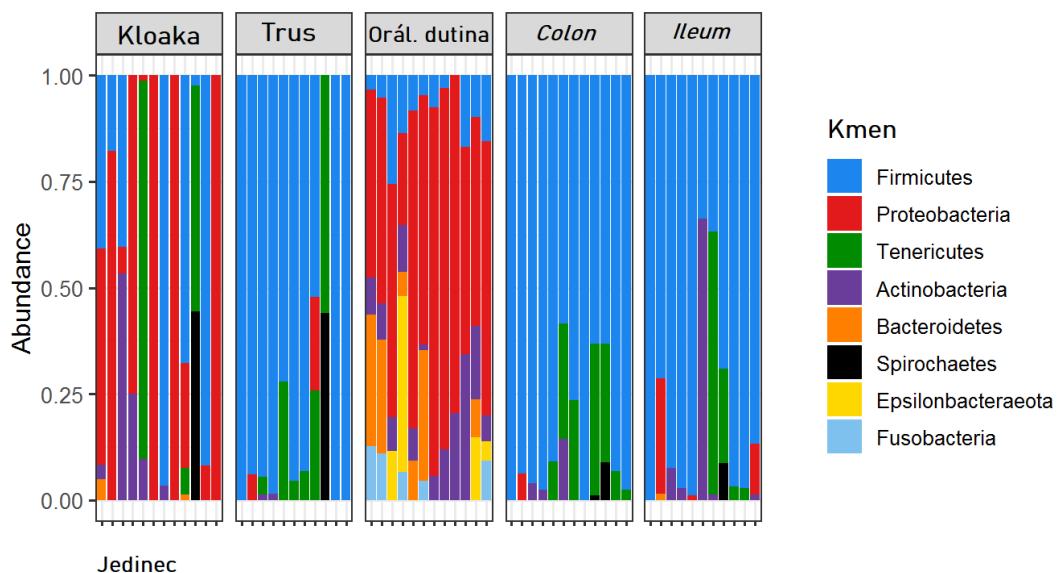


Graf 4.2-III. Beta diverzita: NMDS založeno na Bray-Curtisově distancích mezi vzorky trusu, střev a výtěry kloaky a zobáku, vztaženo na jednotlivé druhy papoušků.

Z grafů (graf 4.2-IV, graf 4.2-V) porovnávajících distribuci bakteriálních OTU v jednotlivých mikrobiologických vzorcích mezi jedinci papoušků je dále patrné, že se bakteriální komunity v kloace ve svém složení liší od střevních a fekálních bakteriálních komunit, které jsou si kompozičně znatelně bližší. V proximální části trávicího traktu, reprezentované orálními výtěry, je dále viditelný dominantní výskyt kmene *Proteobacteria*. Pro distální část, představovanou vzorky trusu a střevních tkání, je pak typický výskyt kmene *Firmicutes* (graf 4.2-V).

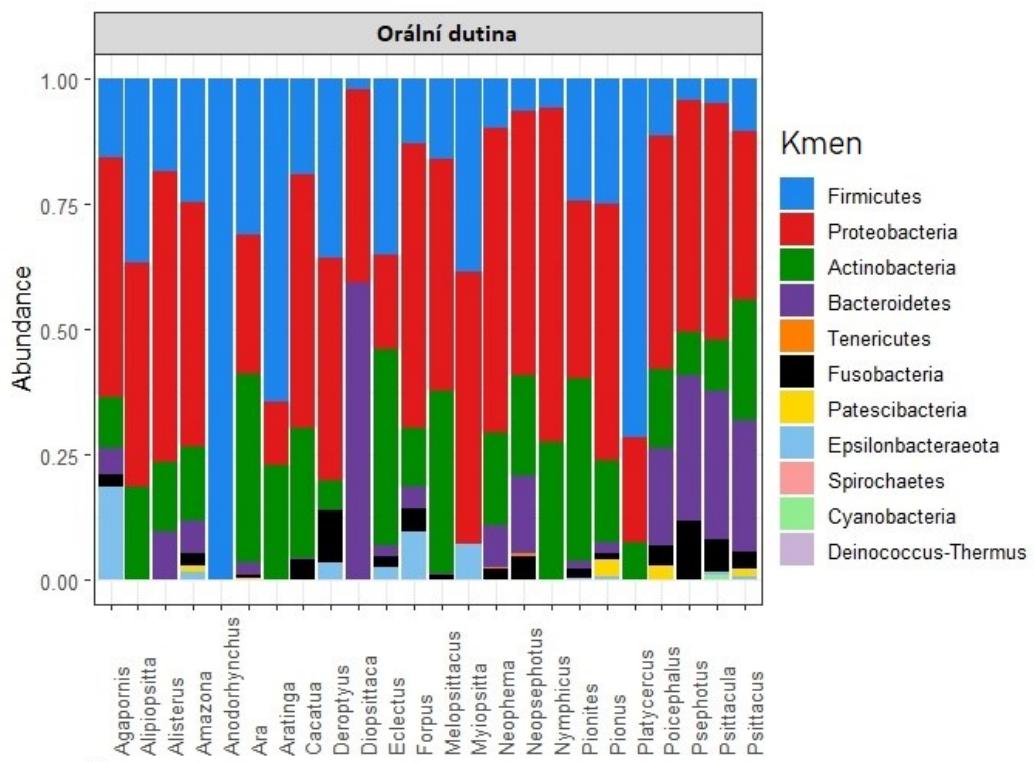


Graf 4.2-IV. Porovnání distribuce bakteriálních tříd ve vzorkách trusu, střev a výtěrech kloaky a zobáku mezi papouščími jedinci, n = 12.

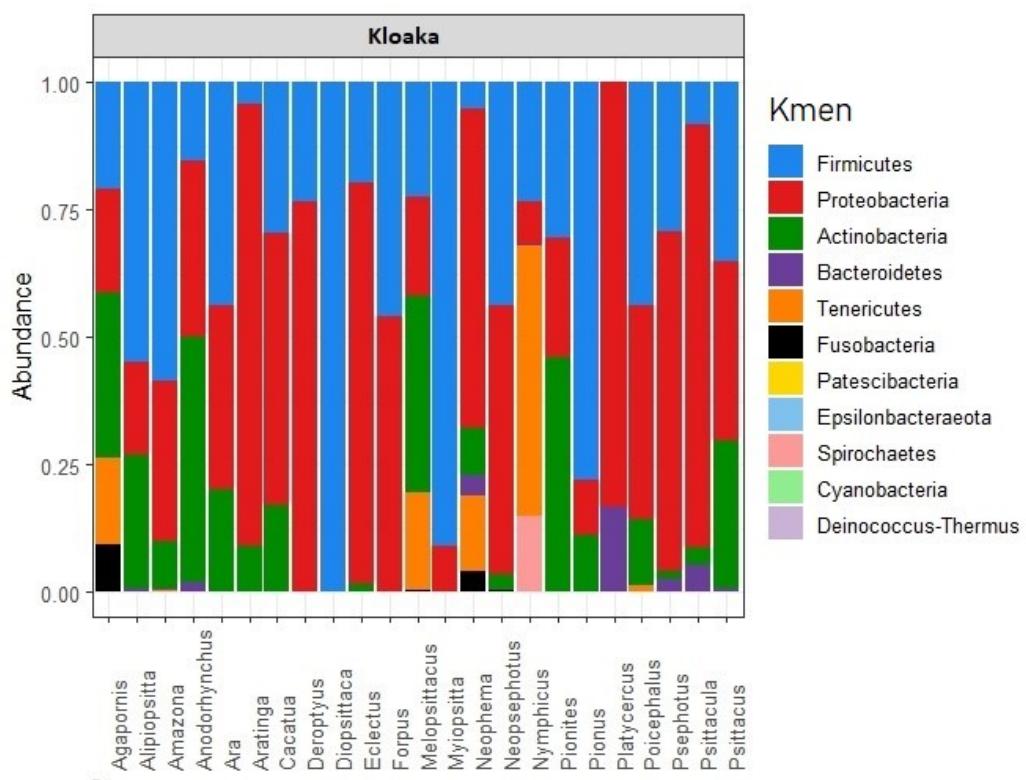


Graf 4.2-V. Porovnání distribuce bakteriálních kmenů ve vzorkách trusu, střev a výtěrech kloaky a zobáku mezi papouščími jedinci, n = 12.

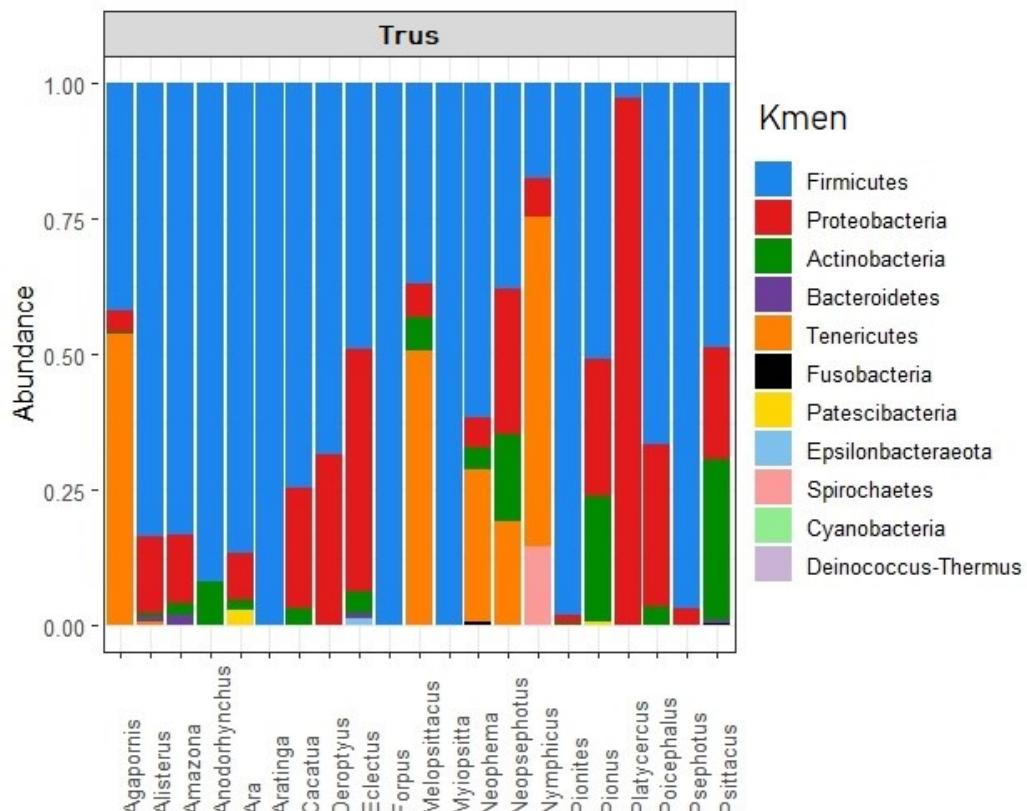
Následující grafy znázorňují distribuci bakteriálních OTU ve výtěrech zobáku (graf 4.2-VI), kloaky (graf 4.2-VII) a ve vzorcích trusu (graf 4.2-VIII) mezi vybranými rody papoušků. Na výsledné podobě složení mikrobioty v těchto typech mikrobiologických vzorků se tak kromě efektu jedince (graf 4.2-IV, graf 4.2-V) pravděpodobně uplatňuje i fylogenetický vliv.



Graf 4.2-VI. Distribuce bakteriálních kmenů ve výtěrech zobáku u vybraných papouščích rodů.



Graf 4.2-VII. Distribuce bakteriálních kmenů ve výtěrech kloaky u vybraných papouščích rodů.

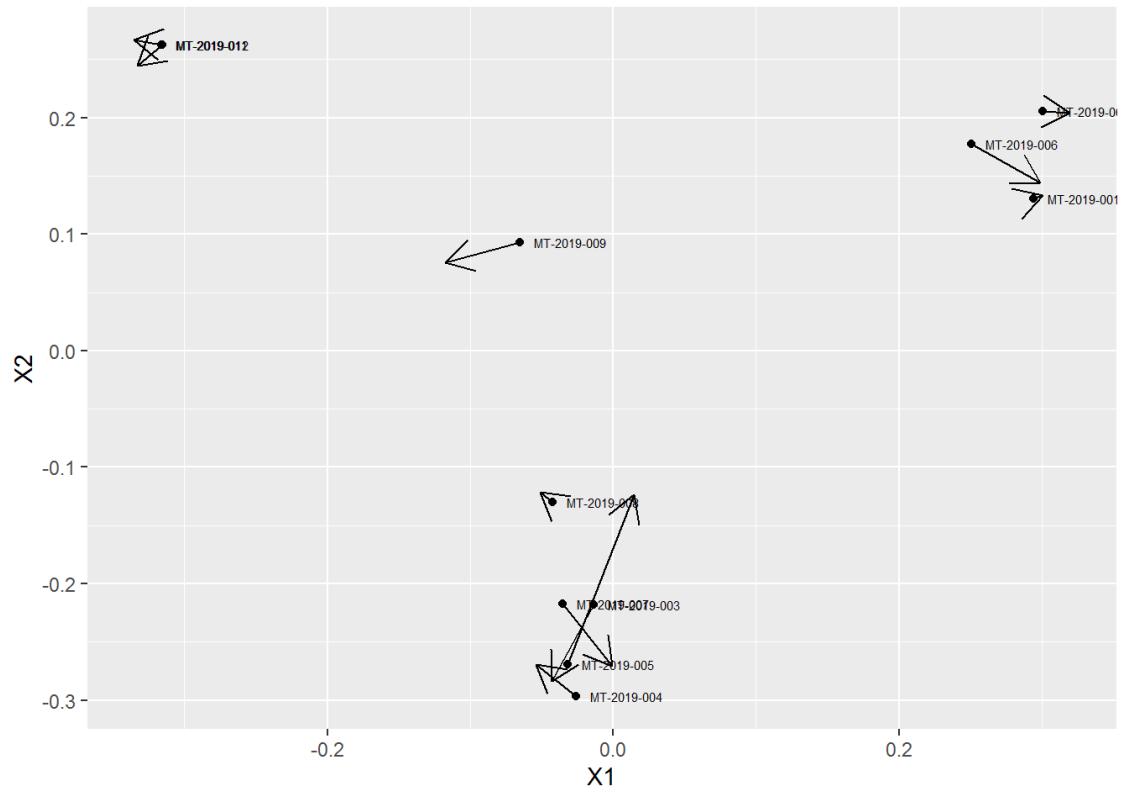


Graf 4.2-VIII. Distribuce bakteriálních kmenů ve vzorkách trusu vybraných rodů papoušků.

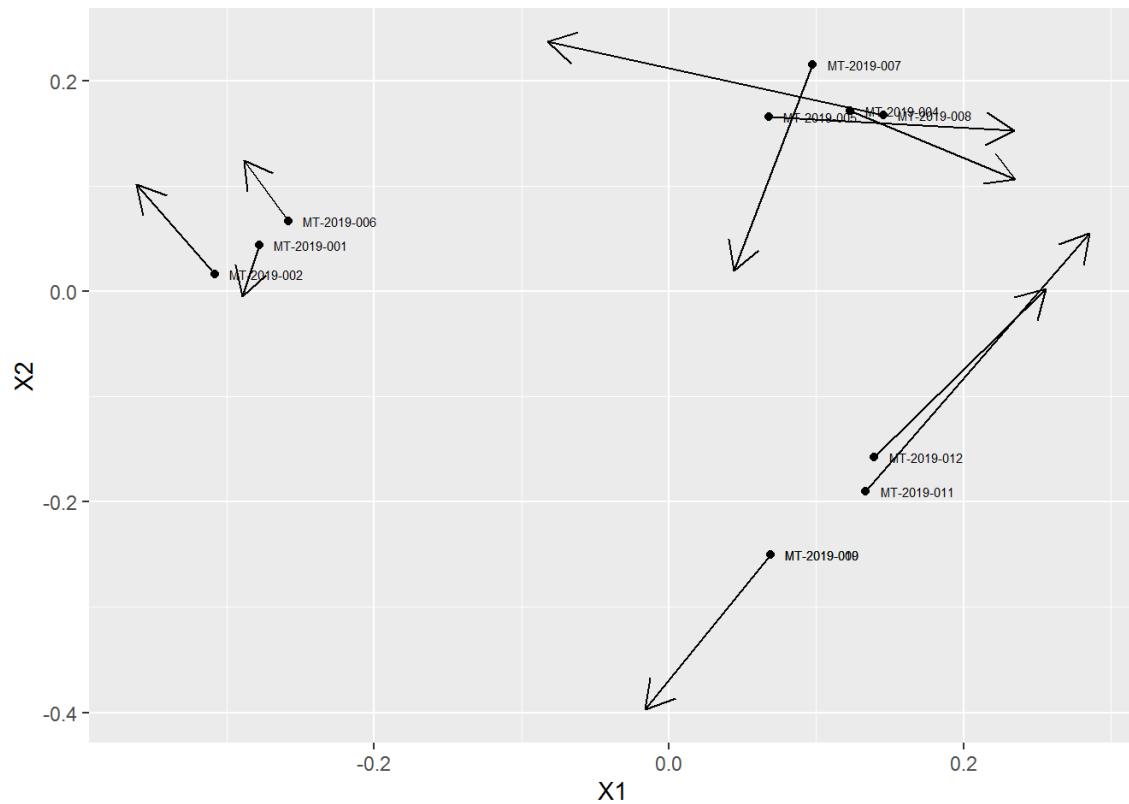
Z výsledků Prokrustovy analýzy je zřejmá poměrně vysoká korelace mezi vzorky *colonu* a *ilea* (ss = sum of squares, součet druhých mocnin vzdáleností mezi odpovídajícími si body ze dvou asociačních matic, ss = 0,04, p = 0,001, tab. 4.2-II, graf 4.2-IX). Znatelná korelace může být viděna také mezi vzorky trusu a *colonu* (ss = 0,34, p = 0,001, graf 4.2-X) a *ilea* (ss = 0,14, p = 0,001). Ovšem konzistence v taxonomickém složení bakteriálních komunit mezi výtěry kloaky a *colonu* (ss = 0,96, p = 0,912, graf 4.2-XI) či *ilea* (ss = 0,87, p = 0,514) lze zhodnotit jako relativně nízkou. Vysoká míra variability ve složení byla také zjištěna mezi mikrobiotou ze vzorků trusu a kloaky (ss = 0,76, p = 0,194, graf 4.2-XII).

Tabulka 4.2-II. Konzistence ve složení bakteriálních komunit v mikrobiologických vzorkách s využitím Prokrustovy rotace PCoA ordinací založených na Bray-Curtisově vzdálenostech, ss (sum of squares, součet druhých mocnin vzdáleností mezi odpovídajícími si body ze dvou asociačních matic), n = 12.

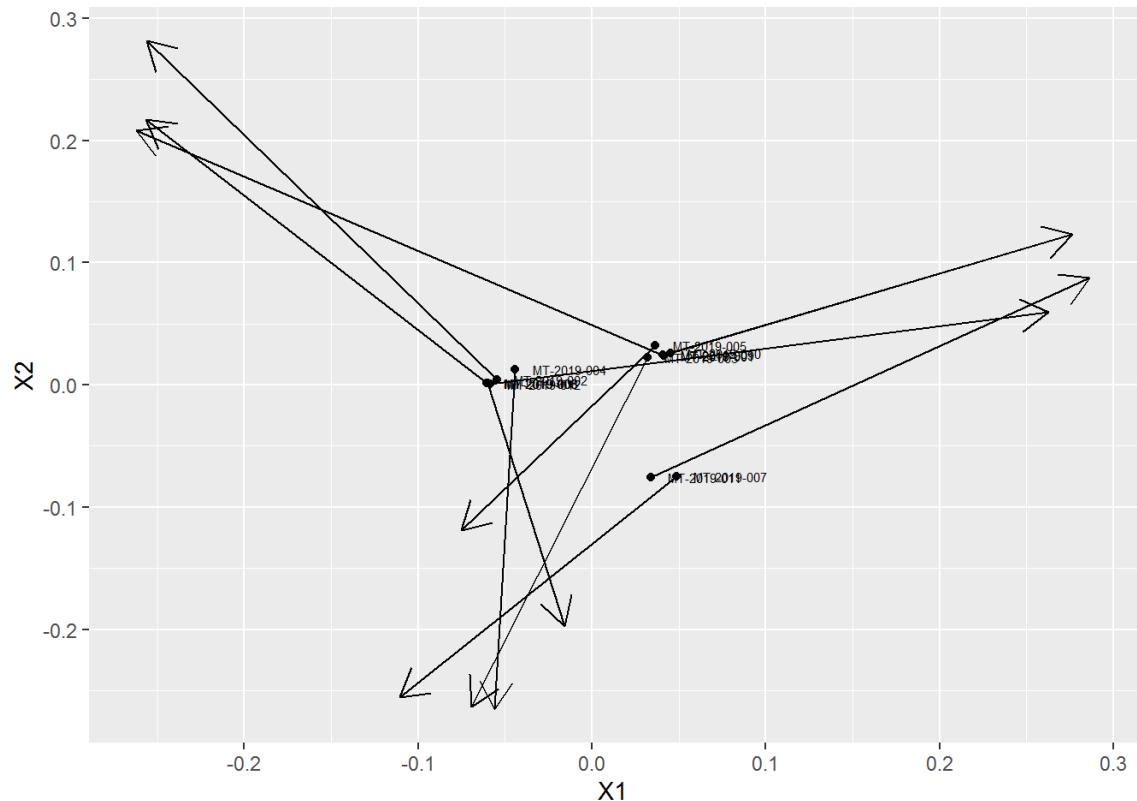
Vzorek	ss	korelace symetrické rotace	p
<i>colon/ileum</i>	0,04	0,98	0,001
<i>colon/trus</i>	0,34	0,81	0,001
<i>colon/kloaka</i>	0,96	0,21	0,912
<i>ileum/kloaka</i>	0,87	0,36	0,514
<i>ileum/trus</i>	0,14	0,93	0,001
<i>kloaka/trus</i>	0,76	0,49	0,194



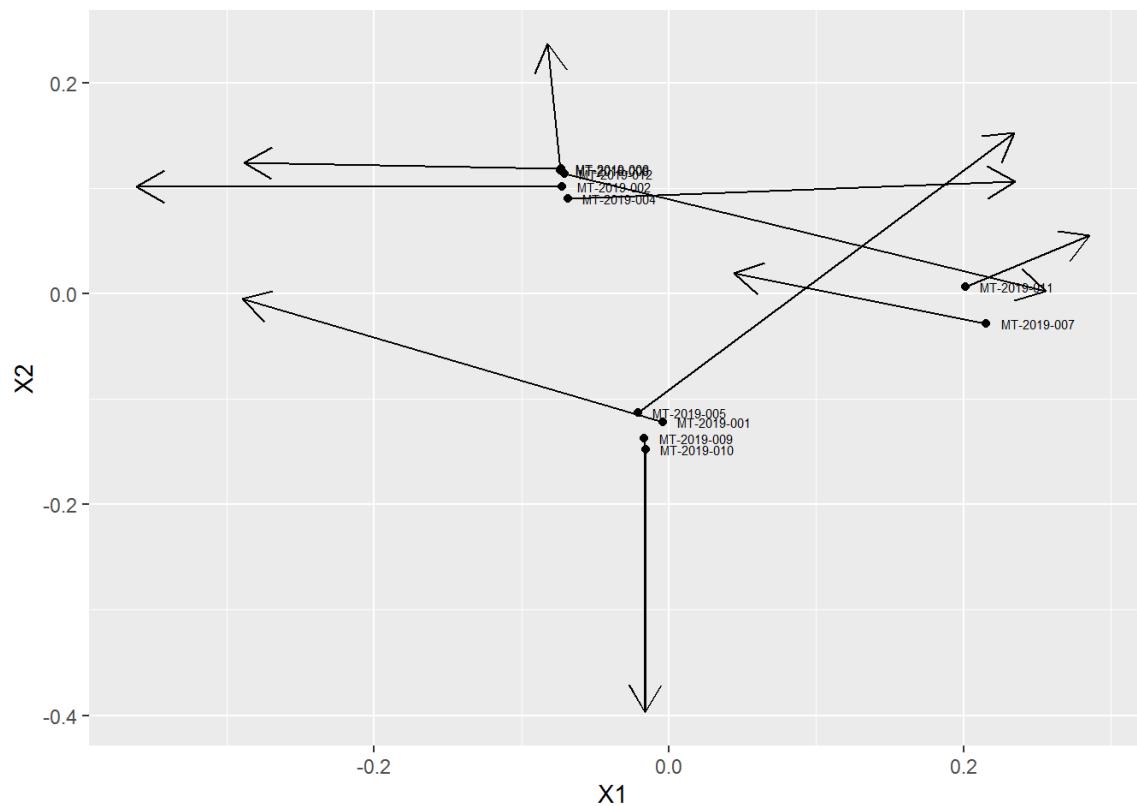
Graf 4.2-IX. Korelace duplikovaných dat mikrobiálních komunit mezi vzorky *colonu* a *ilea*. Prokrustova analýza založená na PCoA s Bray-Curtisovým indexem, n=12.



Graf 4.2-X. Korelace duplikovaných dat mikrobiálních komunit mezi vzorky *colonu* a trusu. Prokrustova analýza založená na PCoA s Bray-Curtisovým indexem, n=12.



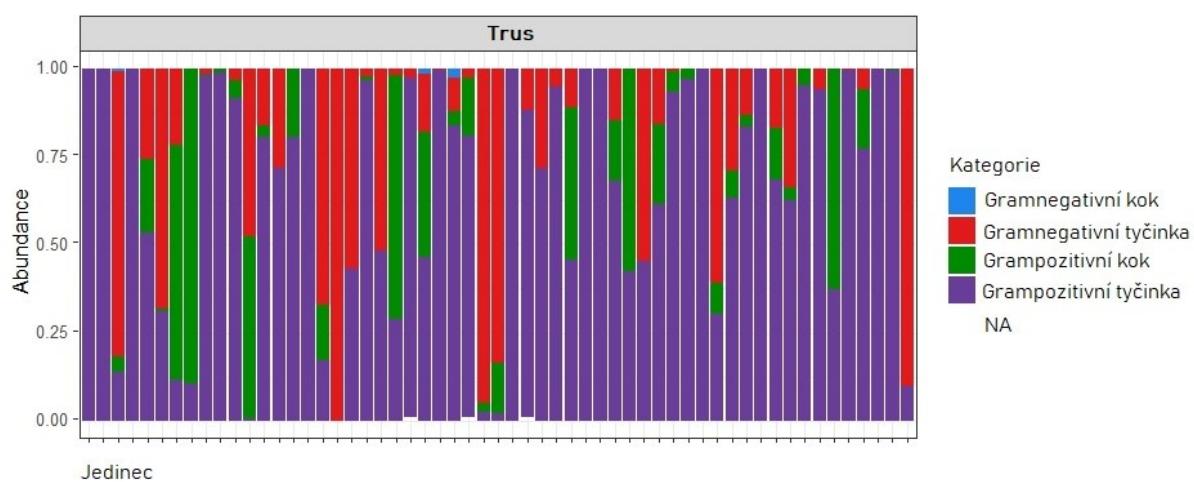
Graf 4.2-XI. Korelace duplikovaných dat mikrobiálních komunit mezi vzorky *colonu* a výtěry kloaky. Prokrustova analýza založená na PCoA s Bray-Curtisovým indexem, n=12.



Graf 4.2-XII. Korelace duplikovaných dat mikrobiálních komunit mezi výtěry kloaky a vzorky trusu. Prokrustova analýza založená na PCoA s Bray-Curtisovým indexem, n=12.

4.2.2 Komparativní analýza

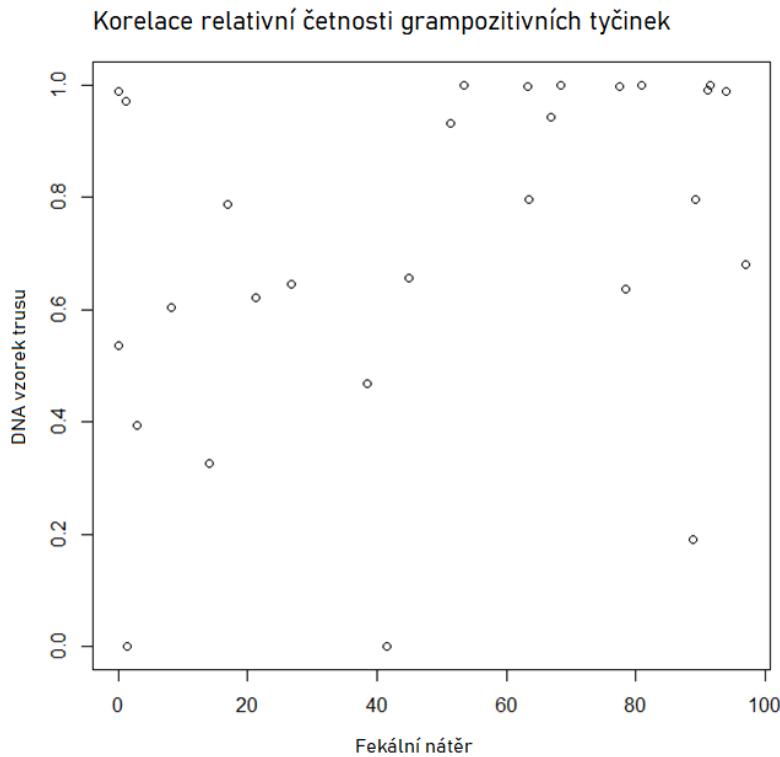
U bakteriálních OTU zjištěných ve vzorkách trusu byla stanovena jejich morfologická kategorie (grampozitivní kok / grampozitivní tyčinka / gramnegativní kok / gramnegativní tyčinka) a pro každý fekální vzorek bylo určeno, v jaké relativní početnosti je v něm každá tato kategorie zastoupená (graf 4.2-XIII). Abundance kategorií ve vzorcích trusu pro DNA metabarcoding byly dále porovnány s 36 výsledky Gramova vyšetření fekálních nátěru zhotovených z trusu týž jedinců. Významná míra pozitivní korelace četnosti bakteriální morfologické kategorie ve vzorku trusu s relativním (%) zastoupením dané kategorie ve fekálním nátěru byla zjištěna pouze v případě grampozitivních tyčinek ($r = 0,68$, $p < 0,001$, tab. 4.2-III, graf 4.2-XIV) a grampozitivních koců ($r = 0,43$, $p = 0,012$).



Graf 4.2-XIII. Distribuce bakteriálních morfologických kategorií ve vzorkách trusu papouščích jedinců, $n = 57$.

Tabulka 4.2-III. Korelace bakteriálních morfologických kategorií v DNA vzorku trusu a fekálním nátěru; p (p hodnota), r (Pearsonův korelační koeficient), $n = 36$.

Abundance v DNA vzorku / relativní zastoupení na fekálním nátěru	p	r
Kategorie		
grampozitivní koky	0,012	0,43
grampozitivní tyčinky	< 0,001	0,68
gramnegativní koky	0,776	-0,05
gramnegativní tyčinky	0,836	0,04



Graf 4.2-XIV. Korelace hodnot abundance grampozitivních tyčinek v DNA vzorcích trusu s relativním (%) zastoupením grampozitivních tyčinek ve fekálním nátěru vyšetřeném Gramovou metodou; $r = 0,68$, $p < 0,001$.

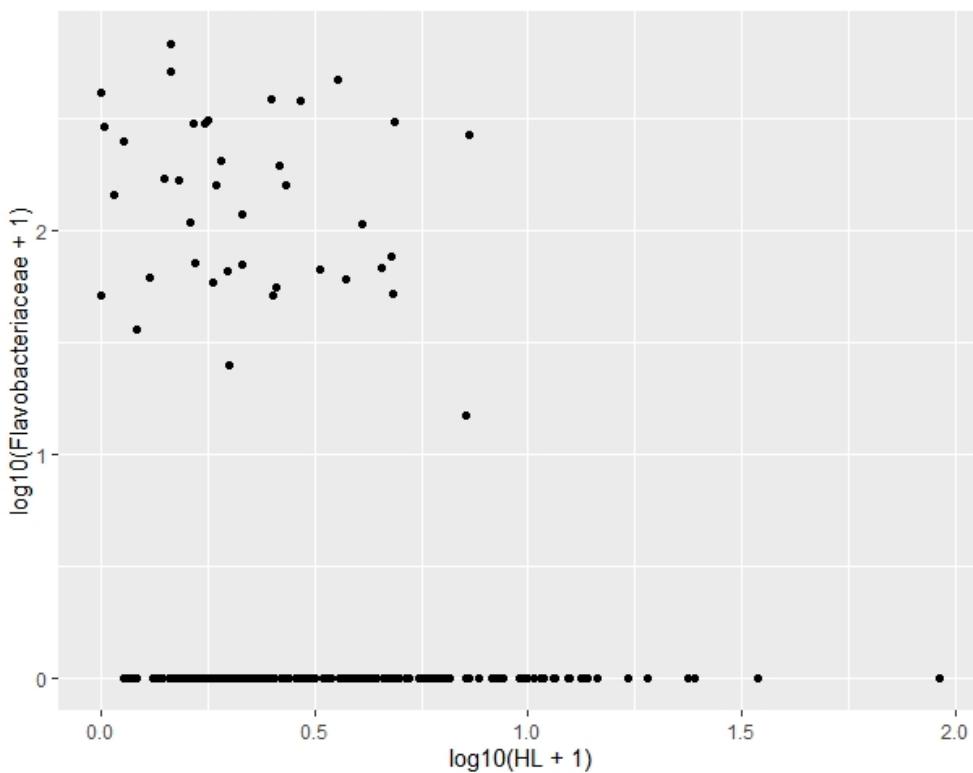
4.2.3 Závislost bakteriálních OTU na hematologických parametrech

Nakonec byla porovnáváním lineárních mixovaných modelů metodou MCMC testována souvislost mezi taxonomickým složením gastroinstestinální mikrobioty a variabilitou hematologických parametrů. Po úpravě zjištěných p hodnot byla signifikantní závislost nalezena pouze mezi hodnotami H/L poměru a vybranými bakteriálními OTU přítomnými ve výtěrech zobáku a kloaky (tab. 4.2-IV, tab. 4.2-V). Fekální mikrobiota signifikantní vliv na H/L poměr neprokázala (tab. 4.2-VI), stejně tak nebyla prokázána asociace mezi bakteriálními OTU a zbylými testovanými hematologickými parametry.

Z bakteriálních komunit přítomných v orální dutině papoušků byla prokázána negativní asociace čeledi Flavobacteriaceae s hematologickými hodnotami H/L poměru ($p = 0,006$, tab. 4.2-IV, graf 4.2-XV).

Tabulka 4.2-IV. Závislost hodnot H/L poměru na přítomnosti bakteriálních OTU v orální dutině; MCMCglmm: family = "poisson", nitt = 501000, burnin = 1000, thin = 200; n = 228; post.mean (posteriorní průměr), eff.samp (efektivní velikost vzorku), p BH (p hodnota upravená Benjaminiho-Hochbergovou metodou).

Proměnná	post.mean	95% konfidenční interval	eff. samp	p MCHC	p BH
H/L poměr					
Streptococcus	0,398	0,019–0,812	2500	0,057	0,303
Pseudomonas	-0,816	-2,831–1,211	2474,806	0,41	0,73
Volucribacter	-0,152	-0,894–0,547	2500	0,679	0,776
Pasteurellaceae	0,387	-0,282–1,039	2348,035	0,246	0,563
Moraxella	-2,193	-4,986–0,198	2183,078	0,078	0,314
Basilea	-0,493	-1,465–0,362	1098,825	0,236	0,563
Neisseriaceae	-0,322	-1,429–0,877	2114,622	0,585	0,756
Suttonella	-0,591	-2,006–0,635	2500	0,366	0,73
Leptotrichiaceae	-0,706	-1,725–0,156	2813,8	0,133	0,425
Campylobacter	-0,638	-3,029–1,935	2056,8	0,614	0,756
Flavobacteriaceae	-4,915	-8,073 – -2,142	2268,393	< 0,001	0,006
Bacteroidales	-1,261	-2,458 – -0,012	2500	0,035	0,282
Corynebacterium 1	-0,396	-2,59–2,251	2500	0,747	0,797
Corynebacterium	0,114	-0,193–0,405	2500	0,456	0,73
Aerococcaceae	0,261	-0,58–1,153	2692,335	0,576	0,756
Lactobacillus	0,089	-2,039–2,285	2500	0,919	0,919

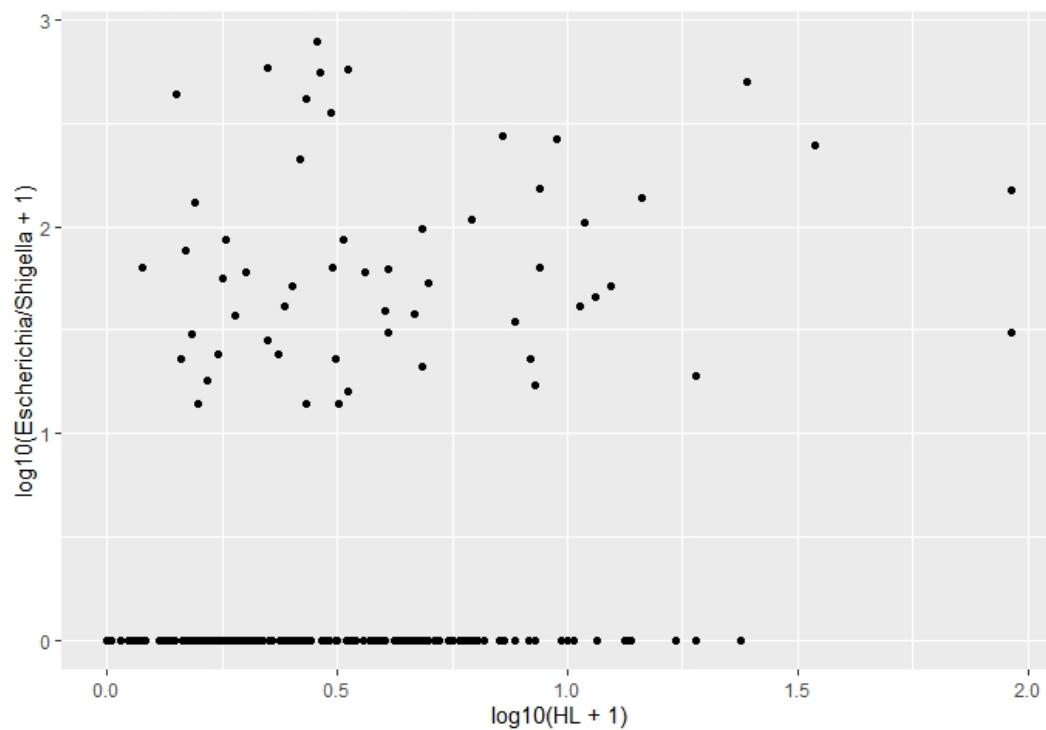


Graf 4.2-XV. Závislost hodnot H/L poměru na přítomnosti čeledi Flavobacteriaceae v orální dutině.

Z kloakální mikrobioty byl na hodnoty H/L poměru zaznamenán pozitivní efekt bakterií rodu *Escherichia*, či *Shigella*, jež jsou na základě genu 16S rRNA neodlišitelné ($p = 0,024$, tab. 4.2-V, graf 4.2-XVI).

Tabulka 4.2-V. Závislost hodnot H/L poměru na přítomnosti bakteriálních OTU v kloace; MCMCglmm: family = "poisson", nitt = 501000, burnin = 1000, thin = 200; n = 221. *Na základě genu 16S rRNA nelze tyto bakteriální rody rozlišit.

Proměnná	post.mean	95% konfidenční interval	eff.samp	p MCMC	p BH
H/L poměr					
Enterococcus	1,755	-0,303–3,903	2500	0,091	0,456
Streptococcus	1,276	-2,575–5,219	2500	0,521	0,773
Clostridium sensu stricto	0,313	-2,265–2,656	2500	0,786	0,873
Pseudomonas	-0,283	-1,3–0,643	1886,507	0,567	0,773
Serratia	0,144	-0,975–1,346	2500	0,815	0,873
Escherichia/Shigella*	2,136	0,627–3,648	2500	0,002	0,024
Ralstonia	-0,384	-2,586–1,583	2500	0,703	0,873
Curvibacter	1,023	-0,737–2,747	2273,559	0,242	0,604
Corynebacteriaceae	1,436	-0,892–3,883	2318,868	0,217	0,604
Corynebacterium 1	0,046	-1,472–1,636	2500	0,938	0,938
Corynebacterium	0,959	-1,401–3,304	2500	0,415	0,692
Staphylococcus	1,48	-1,551–5,206	1931,529	0,352	0,692
Lactobacillus	-0,768	-1,576 – -0,01	2500	0,05	0,378
Candidatus Arthromitus	-2,846	-7,797–2,244	1878,547	0,225	0,604
Ureaplasma	-2,177	-7,873–2,642	2272,328	0,4	0,692



Graf 4.2-XVI. Závislost hodnot H/L poměru na přítomnosti bakterií rodu Escherichia/Shigella v kloace.

Asociace mezi složením krve a fekální mikrobioty papoušků nebyla s dostatečnou hladinou signifikance prokázána (tab. 4.2-VI).

Tabulka 4.2-VI. Závislost hodnot H/L poměru na přítomnosti bakteriálních OTU v trusu; MCMCglmm: family = "poisson", nitt = 501000, burnin = 1000, thin = 200; n = 198.

Proměnná	post.mean	95% konfidenční interval	eff.samp	p MCMC
H/L poměr				
Lactobacillales	-2,974	-11,114–4,619	76,049	0,393
Streptococcus	0,565	-1,269–2,218	1976,026	0,522
Clostridium sensu stricto	2,004	-0,418–4,544	2500	0,105
Tyzzerella	0,013	-13,681–13,513	2500	0,972
Pseudomonas	0,731	-1,842–3,196	2500	0,562
Escherichia/Shigella	1,401	-1,35–4,083	2500	0,281
Corynebacterium	-1,241	-3,025–0,528	2500	0,156
Corynebacterium 1	-1,29	-7,549–4,754	154,684	0,631
Enterococcus	-3,835	-9,146–0,444	2349,629	0,078
Lactobacillus	-0,551	-1,404–0,246	2500	0,199
Candidatus Arthromitus	0,821	-4,014–6,314	1720,616	0,742
Ureaplasma	-0,517	-3,701–3,259	957,896	0,758

5 Diskuze

5.1 Hematologická analýza

Role hematologie jako nástroje pro veterinární diagnostiku a posouzení kondičního stavu papoušků je široce uznávaná (Campbell a Ellis 2007). Kromě klinických faktorů byly v rámci této diplomové práce vyšetřené hodnoty jednotlivých krevních znaků vztaženy i do souvislosti s informačními údaji o papouškově, včetně výživových a environmentálních vlivů. Pro získání náhledu na probíhající imunologické procesy byly využity výsledky hematologického vyšetření relativních počtů leukocytů 198 krevních vzorků papouščích jedinců z 53 různých druhů a absolutních počtů leukocytů 124 vzorků 40 druhů. Celkový krevní obraz byl dále doplněn o absolutní počet erytrocytů, vyšetřený u 139 krevních vzorků 45 druhů papoušků, a hodnoty erytrocytárního indexu MCHC, získané na základě analýzy 104 vzorků 31 druhů. Vzhledem k částečné pacientskému charakteru hodnoceného datasetu jsou některé vyšetřené rozsahy hematologických parametrů mimo předpokládané fyziologické hodnoty uváděné pro papoušky (Fudge 2000).

Bylo zjištěno, že hodnoty H/L poměru a absolutních počtů monocytů statisticky významně ovlivňuje věk papouška. Tato korelace je v rozporu s hematologickou analýzou krevních vzorků mláďat papouška patagonského (*Cyanoliseus patagonus*) (Masello et al. 2009). V rámci podobných výzkumů papoušků rodu kakadu (*Cacatua* sp.) (Clubb et al. 1991a), ara (*Ara* sp.) (Clubb et al. 1991b) a eklekta různobarvého (*Eclectus roratus*) (Clubb et al. 1990) byly zjištěny vyšší hodnoty absolutních počtů leukocytů u mladších jedinců. Papoušci byli vzorkováni ve stáří 30 dnů a dále 90 dnů, přičemž u dřívějšího vzorkování byly vyšetřené hodnoty H/L poměru vyšší než při vzorkování následném, při kterém byl zaznamenán významný pokles. Výsledky této práce mají však opačný rys. Podobný výsledek byl zjištěn při zkoumání krevních parametrů amazoňana fialovoprsého (*Amazona vinacea*), kdy byla u testovaného juvenilního jedince vyšetřena nižší hodnota H/L poměru oproti dospělým jedincům (E. M. dos S. Schmidt et al. 2009). Ke stejným závěrům došel i výzkum datasetu jedinců arů škraboškových (*Cyanopsitta spixii*) ve věku od 7 měsíců do 18 let, který je mému datovému souboru podobnější (Foldenauer et al. 2007) než datasety výše uvedené. Autoři zde však tento fenomén vysvětlují jako možné specifikum daného druhu papouška. Vzhledem

k částečně pacientskému charakteru mého datasetu byla patrně pozitivní korelace H/L poměru a věku pozorována v důsledku vyšší míry stresu a přehnané zánětlivé reakce spojené se staršími jedinci (Salvioli et al. 2006), v rámci níž může být jako doprovodný efekt pozorován i nárůst monocytů (Fudge 2000).

Dále byla zjištěna závislost absolutních počtů erytrocytů na pohlaví papouška, kdy byly naměřeny vyšší hodnoty u samců v porovnání se samicemi. Závislost proměnlivosti hematologických parametrů na pohlaví je mezi jednotlivými druhy papoušků poměrně široce testována. Vyloučena byla například u aratingy žluté (*Guaruba guarouba*) (Prioste et al. 2012), alexandra malého (*Psittacula krameri*) (Nazifi a Vesal 2003), či amazoňana kubánského (*Amazona leucocephala leucocephala*) (Tell a Citino 1992). Signifikantní rozdíly v hematologických parametrech nebyly prokázány ani mezi samci a samicemi ary škraboškového (*Cyanopsitta spixii*) (Foldenauer et al. 2007) a ary hyacintového (*Anodorhynchus hyacinthinus*) (Kolesnikovas et al. 2012). U samic amazoňana oranžovokřídlého (*Amazona amazonica*) však byly popsány signifikantně vyšší hodnoty absolutního počtu leukocytů a lymfocytů než u samců (Vergneau-Grosset et al. 2016), což v méém datasetu prokázáno nebylo. Fenomén vyššího absolutního počtu erytrocytů u samců, který byl pozorovaný na mých datech, byl však popsán v rámci testování amazónka červenohlavého (*Pionopsitta pileata*) a amazoňana fialovoprsého (*Amazona vinacea*) (E. M. dos S. Schmidt et al. 2009), ovšem s prokazatelně vyšší mírou signifikance, než bylo zjištěno v této diplomové práci. Lze usoudit, že v rámci papoušků je běžné rozdíly v krevních parametrech mezi pohlavními pozorovat. Důvodem může být rozdílnost samců a samic v nákladech na energeticky náročné aktivity, jako je například produkce gamet či schopnost sebezáchovy ve zhoršujících se environmentálních podmínkách (Jakubas, Wojczulanis-Jakubas a Kulaszewicz 2013).

Délka běháku je asociovaná negativně s absolutním počtem leukocytů a pozitivně s relativním počtem bazofilů. Údaj o délce běháku může posloužit jako jeden z indikátorů celkové velikosti jedince, se kterou bývá pozitivně korelován. Zvláště malé druhy papoušků, vzhledem k povaze veterinárního vyšetření, velice snadno podléhají stresu, což může vést ke zhoršení jejich zdravotního stavu a následným změnám ve složení krve směrem k leukocytóze (Sakas a Bauck 2002). V rámci leukocytózy by se však v takovém případě dal

předpokládat i výskyt relativní heterofilie, která ovšem pozorována nebyla. Na místo toho leukogramy signifikantně poukazují na zvýšené hodnoty bazofilů. Ohledně relativně vzácného výskytu bazofilů v krvi papoušků panují mezi autory konzistentní názory. V konkrétním případě amazoňanů nebyla pozorována variabilita mezi různými druhy (Tell a Citino 1992, E. M. dos S. Schmidt et al. 2009, Fudge 2000). Ač mé výsledky naznačují výskyt vyšších hodnot relativních počtů bazofilů u větších papoušků, při porovnání publikovaných rozsahů těchto hodnot mezi vybranými druhy papoušků tento trend pozorován nebyl (Fudge 2000). Vyšší průměrné hodnoty relativních bazofilů byly popsány v rámci papoušků rodu aratinga, nejvyšší pak u aratingy sluneční (*Aratinga solstitialis*) a aratingy nandej (*Aratinga nenday*) (Fudge 2000), tyto druhy však disponují střední velikostí. Je tedy možné, že v rámci mého datasetu se změřená délka běháku neprokázala jako spolehlivý ukazatel velikosti papouška, či jsou hodnoty rozsahů relativních bazofilů nekompletně popsány a možný výskyt mezidruhové variability tak nebyl zaznamenán.

Datum odběru vzorku se projevilo jako významné pouze v souvislosti s absolutním počtem erytrocytů. Na základě výsledků jsou patrné vyšší hodnoty absolutních počtů erytrocytů na podzim, nejvyšší pak v první polovině zimního období. Dále byla ověřena pozitivní korelace těchto hodnot s hodnotami hematokritu. O fenoménu vyšších hodnot hematokritu v zimě se v souvislosti s ptačími taxony hypotetizovalo poměrně široce. Fair, Whitaker a Pearson (2007) také shrnuli, že majorita výzkumů zabývajících se vztahem hematokritu a ročního období u ptáků tento fenomén potvrzuje. V případě ary škraboškového (*Cyanopsitta spixii*) (Foldenauer et al. 2007) byly sice naměřeny nejvyšší hodnoty hematokritu v zimě, avšak vyšší hodnoty byly, na rozdíl od mých dat, pozorovány na jaře než na podzim. Vysvětlením mých výsledků může být zvýšená hodnota hematokritu jako evoluční adaptace na vysokou absorpci kyslíku v období silnější termogeneze (Carey a Morton 1976), patrně se však budou tyto hodnoty mezidruhově lišit.

Hodnoty výživového stavu papouška se dále prokázaly jako pozitivně korelované s absolutními počty erytrocytů a negativně korelované s H/L poměrem. Pokles absolutních erytrocytů, a tedy i hodnoty hematokritu, jako doprovodný efekt zhoršeného výživového stavu, nastalého v důsledku nepředvídatelného rozvrhu podávání potravy, byl pozorován i v rámci experimentu s vránou šedou (*Corvus cornix*) (Acquarone et al. 2002) a strakou

obecnou (*Pica pica*) (Cucco et al. 2002). Podobně tak byla zjištěna i provázanost hladovění se sníženými hodnotami hematokritu a absolutního počtu erytrocytů u racka stříbřitého (*Larus argentatus*) (Totzke et al. 1999). V rámci této studie byl také, stejně jako v případě mé práce, u jedinců se zhoršeným výživovým stavem zjištěn i vyšší H/L poměr. Hodnota výživového stavu pozitivně korelovaná s hematokitem a negativně s H/L poměrem byla také výstupem u výzkumu mláďat zvonohlíka zahradního (*Serinus serinus*) (Hoi-Leitner et al. 2001). Zvýšené množství erytrocytů a lymfocytů taktéž zajistila správně vybalancovaná strava u amazoňana modročelého (*Amazona aestiva*) (Di Santo et al. 2019). Lze tak předpokládat, že v důsledku potravní deprivace může být pozorována stresová odpověď v podobě heterofilie a s tím spojený pokles erytrocytů (Gross a Siegel 1983). Shrnutí těchto výsledků částečně podporuje hypotézu limitace zdrojů, popisující kompromis mezi investicí do imunitního systému a chování spojeného s vysokými nutričními výdaji, v jehož důsledku může dojít k stresem indukované imunosupresi (Gustafsson et al. 1994, Råberg et al. 1998, Klasing 1988, Norris a Evans 2000).

V souvislosti se složením potravy byl zjištěn efekt ovoce a zeleniny ve stravě jako vysvětlující faktor pro pokles hodnoty indexu MCHC. Přestože ke spolehlivé klasifikaci anémie by bylo záhadno posoudit i hodnotu indexu MCV, udávající střední objem erytrocytů, z charakteru korelace lze usoudit, že výsledky poukazují k hypochromní mikrocytární anémii, jež mohla nastat v důsledku nedostatku železa, plynoucího z nutričně nekompletní kompozice stravy (Fudge 2000, Salazar, Teves a Li 2018). Vliv granulí ve stravě se dále ukázal jako podstatný pro pokles relativních počtů monocytů a vliv ovoce a zeleniny pro nárůst absolutních počtů leukocytů, lymfocytů a eosinofilů. Bylo popsáno, že množství a kvalita stravy poskytuje možnost vyšší investice do imunitního systému a může tak pozitivně ovlivnit jeho vývoj (Masello et al. 2009, Hoi-Leitner et al. 2001). Příčina zvýšených hodnot počtů eosinofilů u ptačích pacientů zůstává stále předmětem diskuzí a funkce těchto granulocytů dosud nebyla zcela objasněna. Panují však názory ohledně možného navýšení eosinofilů v důsledku přítomnosti parazitů v organismu, stejně jako je tomu u savců (Deem et al. 2005).

Dalším rozhodujícím faktorem bylo umístění chovného zařízení. Venkovní chov papouška byl pozitivně asociován s absolutním počtem erytrocytů a lymfocytů a naopak negativně asociován s hodnotou MCHC. Vnitřní chov papouška u testovaných jedinců zajistil pokles

absolutních počtů lymfocytů, které byly také jako jediný parametr pozitivně ovlivněny samotným typem chovného zařízení, konkrétně klecí. Nárůst lymfocytů může být pozorován v souvislosti s důkladnější imunizací (Eeva et al. 2005), jež je venkovním umístěním umožněna. Protože hodnoty absolutních počtů erytrocytů byly již výše popsány v kontextu s ročním obdobím, efekt venkovního umístění může v této souvislosti figurovat jako doprovodný. Změny hodnot hematokritu spojené s ročním obdobím mohou vznikat v důsledku kombinace několika faktorů, které zahrnují proměnlivost teploty či fotoperiody (Rehder, Bird a Laguë 1982). Environmentální rozdíly se mohou taktéž promítnout do hodnot MCHC (Salazar, Teves a Ii 2018).

Sociální typ chovu se prokázal jako významný v souvislosti s nárůstem absolutních počtů erytrocytů a bazofilů v případě, že byl jedinec chován samostatně či v páru. V takové konstelaci byl naopak pozorován pokles absolutních počtů monocytů. Relativní počet monocytů poklesl pouze v případě chovu jednotlivě, ale při párovém chovu narůstal. Vzhledem k hejnovému charakteru převážné skupiny papoušků mohou být proměnlivosti v různých hematologických parametrech spjaty se sociální deprivací. Ta může v konečném důsledku vést ke stresu, projevujícím se zvýšenou hladinou heterofilů v krvi, na úkor které mohou naopak monocyty relativně ubývat. Monocytóza u papoušků nebývá v důsledku stresu pozorována (Fudge 2000). Dále byla v rámci výzkumu lesňáčka oranžovotemenného (*Seiurus aurocapillus*) prokázána vyšší frekvence teritoriální agrese, spojená se zvýšenými hladinami hematokritu, jako příčina vysokých energetických výdejů a z toho pramenící nízké imunologické kondice (Mazerolle a Hobson 2002). Alternativně tak lze na mých datech poukázat na zvýšenou hladinu hematokritu jako výsledek sociálního stresu.

Významným členem testovaného modelu byly klinické projevy infekčních a autoimunitních onemocnění a poruch chování. Pozitivní závislost byla prokázána mezi symptomy infekčních chorob a absolutním počtem leukocytů, jmenovitě heterofilů, naopak negativní závislost mezi absolutními a relativními počty eosinofilů. Z důvodů spatřených změn v hodnotách eosinofilů bude při budoucím sběru dat vhodné provést i vyšetření na parazitární nákazy, které na mých datech realizováno nebylo. V rámci diagnostiky slouží heterofilie v periferní krvi ptáků, včetně papoušků, běžně jako ukazatel zánětlivých procesů spojených s bakteriálními infekcemi (Vaz et al. 2016, Salazar, Teves a Ii 2018, Sioson a

Tacuboy 2017, Razmyar et al. 2016, V. Schmidt et al. 2008, Forbes, Simpson a Goudswaard 1992, Fudge 1997, Fudge 2000) a dle mých výsledků takto může sloužit i nadále.

Patologické stavy spojené s autoimunitními poruchami byly pozitivně asociovány s absolutním počtem erytrocytů, lymfocytů a relativním počtem monocytů, negativně pak s absolutním počtem heterofilů. Redukce objemu plasmy, obvykle v důsledku dehydratace, se projevuje zvýšeným množstvím erytrocytů. Možná je tedy provázanost dehydratace s těmito typy poruch, z čehož může plynout pozorovaná erytrocytóza (Fudge 2000). Zvýšené hladiny erytrocytů byly také již výše popsány jako důsledek zhoršení zdravotního stavu a snížení imunologické kondice (Mazerolle a Hobson 2002). V rámci mého datasetu byla u dvou ze tří jedinců diagnostikovaných ulcerativní dermatitidou jako projevem autoimunitní poruchy provedena kultivace klinického materiálu z rány. V obou případech se jednalo o zástupce druhu papouška šedého (*Psittacus erithacus*). V prvním případě byl zjištěn četný výskyt bakterií *Acinetobacter pitti* a *Enterococcus faecalis*, ve druhém četná přítomnost bakterií *Staphylococcus aureus* a *Klebsiella oxytoca*. Jedná se o nálezy běžné (Lamb et al. 2014). I v rámci podobných studií byla ulcerativní dermatitida jako častý symptom autoimunitního onemocnění v souvislosti s papoušky pozorována jako důsledek zejména bakteriálních infekcí (Briscoe et al. 2008, Huynh et al. 2014, Abou-Zahr et al. 2018), které se mohou promítat do složení krve ve zjištěném směru. Negativní asociace heterofilů s bakteriálními infekcemi je netypická, avšak v případě těchto onemocnění je pravděpodobná infiltrace heterofilních granulocytů do tkáňových lézí, což mohou odhalit až histopatologická vyšetření (V. Schmidt et al. 2008). V periferní krvi pak tyto prozánětlivé buňky detekovatelné nejsou. Přestože jsou výsledky ohledně asociace s autoimunitními poruchami statisticky signifikantní, byly získány na základě vyšetření pouze tří pacientů. Z toho důvodu těmto výstupům přikládám nízkou důvěryhodnost, tvoří však základ pro další výzkum.

Poruchy chování pak byly dány do negativní souvislosti s absolutním a relativním počtem eosinofilů, absolutním počtem monocytů a s H/L poměrem, avšak na relativní počty bazofilů projevily pozitivní vliv. Negativní asociace s hodnotami H/L poměru je v rozporu s výsledky jiných autorů (Clubb et al. 2007). Je možné předpokládat, že některé zaznamenané projevy poruch chování, například apatie či slabost, se ve složení krve neprojevují v podobě klasické stresové odpovědi, v důsledku čehož nebyla pozorována heterofilie. Ztráta či škubání per je

ovšem u papoušků jeden z nejproblematičtějších klinických stavů z důvodu složitého hledání příčiny. Na základě histopatologických vyšetření biopsií pokožky a peří jedinců vykazujících ztráty či škubání per byly jako podmiňující faktory, kromě přítomnosti cirkoviru způsobujícího onemocnění zobáku a peří papoušků (Hakimuddin et al. 2015, Reavill, Schmidt a Fudge 1990), zjištěny například inaktivní folikuly, epidermální atrofie, stafylokoková dermatitida, bakteriální pulpítida, dermatomykóza, hypersenzitivní reakce či kožní parazité (Reavill, Schmidt a Fudge 1990). V rámci stejné studie, z celkově 213 testovaných jedinců 12 papouščích rodů, projevujících se ztrátou či škubáním peří v důsledku některého z uvedených nálezů, byla u 40 jedinců pozorována lymfocytóza a u 80 heterofilie. 59 jedinců dále vykazovalo vyšší hodnoty bazofilů, eosinofilů či monocytů (Reavill, Schmidt a Fudge 1990). Zvýšené hodnoty bazofilů v periferní krvi byly také dány do souvislosti se silným stresem u drůbeže v důsledku hladovění či transportu (M. Maxwell 1993, M. Maxwell a Robertson 1995). Zda je však tento typ zátěže u těchto zvířat srovnatelný se stresovou reakcí papoušků projevujících se trháním peří je sporné.

Z důvodu možného pozorování ptačího pacienta s absolutní lymfopenií a zároveň relativní lymfocytózou je nasnadě, že výsledky pro absolutní a relativní rozpočty mají specifickou vypovídající hodnotu vztahující se k individuálním případům. Relativní počty leukocytů jsou v případě ptáků obecně udávány za více vypovídající než počty absolutní, vzhledem k vyšší variabilitě mezi výsledky absolutních rozpočtů (Fudge 2000). Ta může být způsobena odlišnou metodou vzorkování, rozlišnou dobou přepravy vzorku či metodologickým přístupem při vyhodnocování vzorku. Naopak relativní rozpočty by měly poskytovat spolehlivější zhodnocení leukocytární distribuce, pokud byl krevní roztěr správně připraven (Fudge 2000). Hodnoty absolutních počtů heterofilů a lymfocytů, naměřené v rámci mého datasetu, však překvapivě odhalily zdánlivě kvalitnější schopnost monitorovat průběh infekčních a autoimunitních onemocnění ve srovnání s hodnotou H/L poměru. Jak ale bylo uvedeno již výše, výsledky ohledně autoimunitních poruch jsou zatíženy slabou statistickou podporou v důsledku nízkého počtu jedinců vykazujících projevy těchto onemocnění.

Rod papouška projevil signifikantní vliv na všechny testované hematologické parametry, vyjma MCHC a absolutních počtů heterofilů. Na základě tohoto poznatku byla dále provedena fylogenetická analýza, jež odhalila nejsilnější fylogenetický signál v hodnotách

pro H/L poměr a pro absolutní počty eosinofilů. Role H/L poměru jako důležitého evolučního znaku propojujícího imunitu, fyziologii a ekologii jedince byla poprvé popsána Miniasem (2019), který nízké hodnoty H/L považuje za ancestrální znak, což v mé datovém souboru prokázáno nebylo. Nižší hodnoty H/L poměru byly v mé datasetu zjištěny zejména v rámci druhů amazoňanů, což je v konzistenci s výsledky jiných autorů (Frederico F. Vaz et al. 2016, Fudge 2000, Deem et al. 2005). V případě absolutních počtů eosinofilů byly zjištěny vysoké hodnoty u aratingy sluneční (*Aratinga solstitialis*), což může být způsobeno specifickou evoluční adaptací. Vzhledem k zastoupení tohoto druhu v mé datasetu pouze v počtu dvou jedinců se však pravděpodobně jedná o individuální variabilitu než o vliv fylogeneze.

Zahrnutí efektu fylogeneze do testovaného modelu mnoho vysvětlujících vlivů na variabilitu hematologických parametrů odfiltrovalo. Stejně vlivy byly zaznamenány pouze na hodnoty H/L poměru, ovšem s nižší hodnotou signifikance. U poloviny testovaných krevních znaků (relativních počtů eosinofilů a monocytů a absolutních počtů leukocytů, heterofilů, monocytů a erytrocytů) byly znova potvrzeny jen některé, původní analýzou zjištěné, efekty, avšak ve většině případů s nižší, či marginální signifikancí. V případě testování hodnot absolutních počtů lymfocytů a MCHC nebyly znova prokázány dříve zjištěné efekty, ale byly zjištěny efekty nové. U relativních počtů bazofilů a absolutních počtů bazofilů a eosinofilů nebyl po přidání fylogenetického vlivu zjištěn žádný vysvětlující efekt. Na základě toho lze poukázat nejen k značné závislosti hematologických parametrů na individuálních, environmentálních a klinických faktorech, ale také k jejich silné mezdruhové variabilitě.

Je nutné vzít v úvahu, že výsledky hematologických analýz mohou být vždy narušeny povahou veterinárního vyšetření či jinými okolnostmi, za kterých byl krevní vzorek odebrán. Pokud nebyla krev odebrána dostatečně bezpečně a rychle, krevní obraz tímto může být ovlivněn (Sakas a Bauck 2002). Stanovená míra opakovatelnosti taktéž potvrzuje obecně známá úskalí metody mikroskopické kvantifikace krevních buněk, zejména s ohledem na relativní počty bazofilů a eosinofilů. Ty jsou mezi ptáky morfologicky proměnlivé, což se může v konečném důsledku projevit nepřesnostmi ve výsledných údajích. Postupné zavedení automatického počítání ptačích krevních buněk, či využití metod průtokové

cytometrie v rámci hematologického testování ptačích taxonů (Fudge 2000) bude však pravděpodobně dostatečným řešením.

Zkreslení výsledků může rovněž plynout z charakteru datasetu obsahujícího značné množství různých druhů papoušků, kdy jsou však některé druhy zastoupeny řídce. To může vytvořit dojem mezidruhové variability, ač se jedná o variabilitu jedinců. Údaje o těchto jedincích byly taktéž na základě informace poskytnuté majitelem doplněny o symptomy mnoha různých onemocnění, což umožnilo provedení analýzy ve velice obecném a širokém pojetí, v důsledku čehož jsou však získané výstupy, ač širokospektrální, poměrně nespecifické. Získané pilotní výsledky však představují potenciál pro obdobné studie vycházející z fylogeneticky či klinicky speciifčejšího datasetu.

5.2 Analýza složení gastrointestinální mikrobioty

Gastrointestinální systém papoušků zahrnuje složité společenství mikroorganismů, které má pro hostitele značný význam, jeho taxonomické složení se však v různých kompartmentech trávicího systému liší. V této práci jsem toto složení popsala na základě sekvenace amplikonu bakteriálního genu 16S rRNA ze 132 vzorků trusu, 12 vzorků střev, 228 výtěrů kloaky a 236 výtěrů zobáku z 61 druhů papoušků. Analýzou hlavních koordinát byla zhodnocena míra konzistence v taxonomickém složení mikrobioty mezi všemi mikrobiologickými typy vzorků papoušků. Patrná je rozdílná bakteriální kompozice zejména v orálních výtěrech. Ačkoliv se orální výtěry papoušků běžně užívají jako materiál k detekci přítomnosti virů (D'Agostino a Isaza 2004), složení bakteriálních komunit v tomto typu vzorku bylo dosud zkoumáno jen velice zřídka. Odlišná kompozice mikrobioty v orálních výtěrech, v porovnání s výtěry kloaky a vzorky trusu, již byla popsána na vzorku 5 druhů papoušků bez klinických projevů (Akhter et al. 2018). Lze také podotknout, že pozorované četnosti bakterií jsou obvykle vyšší v kloace a trusu než v orální dutině zdravých ptáků (Petrak 1982). Tento výsledek může poukazovat k zcela odlišnému spektru nároků na funkci mikrobioty v orální dutině papoušků, než je tomu v případě střev a kloaky.

Složení mikrobioty výtěrů kloaky je znatelně nekonzistentní s mikrobiální kompozicí ve střevních a fekálních vzorcích, které jsou si naopak vzájemně podobnější. V rámci podobných výzkumů takto markantní rozdíly pozorovány nebyly (Akhter et al. 2018). Může

se jednat o chybu, či nebyl stér proveden ideálně. Pozorované vyšší zastoupení kmenu *Proteobacteria* ve výtřech kloaky může být vysvětleno silnější tendencí k environmentálnímu výskytu na povrchu zvířete, zatímco *Firmicutes* koexistují zejména ve střevním prostředí (Leboffe a Pierce 2011, Lamb et al. 2014). Při provádění kloakálního stěru je pak sebráno více povrchových bakterií, což se projeví ve složení. Jiným vysvětlením může být přítomnost rozmnožovacího systému v kloace, která mění podmínky prostředí pro mikrobiální růst a přivádí tak na kloakální mikrobioty zcela jinou formu nároků, než kdyby se jednalo pouze o vývod trávicího traktu. Rozdíly mikrobiálního složení rozmnožovacího a střevního systému byly zaznamenány v rámci savců (Li et al. 2016).

Vzorky nekroptického materiálu tlustého střeva (*colon*) a koncové části tenkého střeva (*ileum*) vykazují v bakteriálním složení silnou konzistenci. To může být důsledkem morfologicky jednodušší stavby ptačího střeva v porovnání se savci (Lavin et al. 2008), kteří také disponují vyšší mírou odlišnosti mezi mikrobiotou jednotlivých střevních segmentů (Gu et al. 2013).

Na výsledné podobě kompozice bakteriálních společenství ve vzorkách trusu, střev a výtřech kloaky a zobáku byl však kromě fylogenetického vlivu pozorován i efekt jedince. Vliv široké škály individuálních faktorů, zahrnujících věk (Bangert et al. 1988), potravu a výživový stav (Turnbaugh et al. 2009), prostředí a genetickou výbavu hostitele (Benson et al. 2010) či imunitní systém (Sedaghat a Karimi Torshizi 2017, Slack et al. 2009) byl již na složení gastrointestinální mikrobioty dříve zaznamenán. Mezidruhové rozdíly byly v rámci papoušků taktéž popsány (Bangert et al. 1988).

Z každého sebraného vzorku trusu byla jedna část uchována pro účely DNA metabarcodingu a s využitím druhé části byl vytvořen fekální nátěr, který byl posléze podroben analýze Gramovou metodou. 36 výsledků Gramova vyšetření fekálních nátěrů bylo porovnáno s abundancí bakteriálních morfologických kategorií ve vzorcích trusu podrobených DNA metabarcodingu. Pearsonův test odhalil signifikantní pozitivní korelací pouze v případě grampozitivních koků a tyčinek. Ty se v rámci fekálních nátěrů papoušků tradičně řadily mezi nejběžněji pozorovanou kategorii (Ritchie et al. 1997, Bangert et al. 1988), ačkoliv jiná studie u papoušků uvedla kategorii gramnegativní za nejvíce frekventovanou (Akhter et al. 2018). Tento ne zcela kladný výsledek mohl vzniknout v důsledku barvící metody, či proto, že bakteriální sekvence obdržené na základě

sekvenování metodou Illumina nebylo vždy možné spolehlivě rozlišit do úrovní druhů, či alespoň rodů. Tyto taxonomické úrovně jsou však často nezbytné pro přesné určení tvaru bakteriální buňky (Leboffe a Pierce 2011). Pro další analýzy tak bude vhodné zařadit pouze sekvence bakteriálních OTU, u kterých je známá taxonomická anotace alespoň na rodové úrovni.

V souvislosti s hematologickými parametry byl zjištěn efekt bakteriálních OTU pouze na hodnoty H/L poměru ve výtěrech zobáku a kloaky. Mezi mikrobiotou orální dutiny byl odhalen negativní vztah H/L poměru s čeledí Flavobacteriaceae. Tato gramnegativní čeleď je známá především z infekčních vzorků tkáně po kousnutí kočkou (Oddsson et al. 1995) či prasetem (Goldstein et al. 1990). Zároveň byla popsána jako výjimečná součást fekální mikrobioty u zdravých chovaných papoušků, kde nebyl prokázán projev patogenního potenciálu (Bangert et al. 1988). Přítomnost byla zjištěna rovněž ve výtěrech hltanu u zdravě jevíčího se rákosníka obecného (*Acrocephalus scirpaceus*) (Stenkat et al. 2014). Prezence čeledi Flavobacteriaceae, zahrnující oportunistické patogeny (Vancanneyt et al. 1994), u zdravých volně žijících či domestikovaných ptáků indikuje možnost, že kolonizace těmito bakteriemi se projevuje subklinicky. Protože mají vybraní zástupci této bakteriální čeledi potenciál jako infekční agens i pro člověka (Jean et al. 2014), je nutné vzít eventualitu subklinického projevu onemocnění v potaz zejména při blízkém kontaktu s těmito zvířaty. V rámci tohoto datasetu však byla zjištěna provázanost vyšší abundance bakterií čeledi Flavobacteriaceae s poklesem H/L poměru. Nižší H/L poměr byl dále asociovaný s projevy poruch chování, kupříkladu se škubáním peří či apatií. Výskyt těchto bakterií u papouščích jedinců projevujících se behaviorálními poruchami je tedy na základě získaných výsledků možný, avšak jak již bylo zmíněno výše, přesná diagnóza těchto poruch je značně komplikovaná. Vzhledem k negativní asociaci H/L poměru i s výživovým stavem papouška se dále naskytuje možnost pozorovat nárůst abundance bakterií čeledi Flavobacteriaceae v důsledku nutričně různorodé a vyvážené stravy. V souvislosti se složením střevní mikrobioty byl efekt různorodé stravy zaznamenán (Turnbaugh et al. 2009).

V rámci kloakální mikrobioty byla zjištěna pozitivní asociace H/L poměru s bakteriemi rodu *Escherichia*, či *Shigella*, neodlišitelných na základě amplifikace genu 16S rRNA. Gramnegativní tyčinka *Escherichia coli* bývá tradičně udávaná za infekční agens, způsobující

enteritidu, pneumonii a septikémii, a jednu z nejběžnějších příčin úmrtí u papoušků (Petrak 1982). Novější poznatky však potvrdily, že papoušci žijící v přirozeném prostředí mají prokazatelně vyšší tendenci k potlačení onemocnění, ač je u nich bakterie přítomna. Je tedy pravděpodobné, že při chovu v zajetí působí environmentální faktory iniciující proces onemocnění (Becker Saidenberg et al. 2012). Obvykle byl také výskyt *Escherichie coli* v trusu zdravých chovaných papoušků, na rozdíl od savců a drůbeže, považován za neběžný (Graham a Graham 1978). Aktuálnější projekt však poukazuje k této bakterii jako k nejčastěji izolované u papoušků pocházejících ze stejné zoologické zahrady (Akhter et al. 2018). Vyšší míra abundance *Escherichie coli* ve složení kloakální mikrobioty byla zjištěna u chovaných papoušků, ve srovnání s volně žijícími, (Xenoulis et al. 2010) a také v rámci konkrétních rodů papoušků, například u rodu kakadu (*Cacatua* sp.) (Flammer a Drewes 1988). Pozitivní souvislost abundancí *Escherichie coli* jako složky kloakálního bakteriálního společenství byla zjištěna s vyšetřenými hodnotami H/L poměru, který se také v rámci mého datasetu projevil jako indikátor věku. Z toho plyne možné zvýšení početnosti této bakterie u starších papouščích jedinců. Takový efekt byl u papoušků pozorován v rámci fekální mikrobioty (Bangert et al. 1988).

6 Závěr

Ač mohou být uvedené výsledky hematologické a mikrobiální analýzy papoušků rušeny signálem pocházejícím z problematického datasetu, jedná se vzhledem k pilotnímu charakteru práce o výstupy, jejichž analogie zatím nebyla uvedena jinými autory. Na základě získaných poznatků lze poukázat nejen k značné závislosti krevních parametrů na řadě individuálních, environmentálních a klinických faktorů, ale také k jejich silné mezidruhové variabilitě. Překvapivé je zjištění kvalitnější schopnosti hodnot absolutních počtů heterofilů a lymfocytů monitorovat průběh infekčních a autoimunitních onemocnění papoušků ve srovnání s hodnotou H/L poměru. Hodnoty relativních počtů bazofilů se neočekávaně projevily jako nejužitečnější ukazatel pro sledování projevů poruch chování. V souvislosti s hematologickými parametry byl odhalen efekt bakteriální čeledi Flavobacteriaceae, jako součástí orální mikrobioty, a bakterií *Escherichia*, či *Shigella*, přítomných v bakteriálních komunitách v kloace, na hodnoty H/L poměru. Mikrobiota v orální dutině papoušků se také vyznačila jasně odlišnou taxonomickou kompozicí v porovnání s mikrobiotou kloakální a

střevní. Naopak bakteriální společenství přítomná ve dvou střevních kompartmentech papoušků jsou ve složení poměrně konzistentní. Mezi mikrobiotou vzorků trusu a výtěry kloaky a zobáku je též průkazná intraspecifická i intespecifická variabilita v kompozici. Výsledky získané na základě sekvenace bakteriálního 16S rRNA genu a analýzou fekálních nátěrů Gramovou metodou jsou konzistentní jen v případě vyhodnocení abundance grampozitivních koků a tyčinek. Závěry této práce by měly být nejenom přínosem pro základní výzkum evoluce imunologických adaptací, ale zároveň mohou mít praktický aplikační potenciál ve veterinární a zoohygienické praxi.

7 Seznam termínů

Band – viditelná čárka DNA na gelu obsahující značné množství DNA fragmentů stejné velikosti.

Bar kód – molekulární fragment užívaný pro rozlišení sekvenčních readů během sekvenace.

Colon – tračník, tlusté střevo.

Dataset – datový soubor.

Demultiplexování – přiřazení sekvencí DNA k příslušnému vzorku na základě bar kódů po osekvenování.

Denoising – odstranění šumu, při kterém dojde k eliminaci sekvenčních chyb ze získaných readů nebo k identifikaci správné biologické sekvence mezi ready.

Diferenciál – diferenciální rozpočet leukocytů.

Erytrocyt – červená krvinka.

F primer – z anglického forward, přední primer.

Gramnegativní – bakterie, které jsou po barvení dle Grama pozorovány pod mikroskopem jako červenorůžové.

Grampozitivní – bakterie, které se po barvení dle Grama jeví pod mikroskopem jako modrofialové.

H/L poměr – poměr relativního počtu heterofilů k relativnímu počtu lymfocytů.

Choana – vnitřní nozdra, zadní otvor nosní dutiny.

Ileum – kyčelník, koncová část tenkého střeva.

Leukocyt – bílá krvinka.

MCMC – Markov chain Monte Carlo.

MCHC – z anglického mean cell hemoglobin concentration, střední hodnota koncentrace hemoglobinu v jedné červené krvince.

OTU – z anglického operational taxonomic unit, operační taxonomická jednotka, definice užívaná ke klasifikaci skupin blízce příbuzných jedinců.

Paired-end – dva konce stejné molekuly DNA. Při paired-end sekvenování je fragment DNA sekvenován z obou konců, výsledkem jsou paired-end ready.

PCoA – z anglického Principal Coordinates Analysis, analýza hlavních koordinát.

PCR – z anglického polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce.

Poolování – smísení PCR produktů o ekvimolární koncentraci DNA do jedné zkumavky.

Primer – oligonukleotidová sekvence komplementární k úsekům ohraničující DNA sekvenci, která má být amplifikována.

R primer – z anglického reverse, zadní primer.

Read – odvozená sekvence páru bází odpovídající fragmentu DNA nebo jeho části.

Repeatabilita – opakovatelnost, přesnost metody za stejných podmínek.

Sekvenační adaptor – obsahuje unikátní indexovou sekvenci sloužící pro označení vzorků při přípravě DNA knihovny, což umožňuje sekvenaci 96 různých vzorků v jediném sekvenačním běhu.

8 Seznam tabulek

Tabulka 1.1-I. Fyziologická rozmezí hodnot krevních parametrů u ptačích taxonů.....	2
Tabulka 2.3-I. Rody papoušků z řádu Psittaciformes reprezentující dataset.....	14
Tabulka 2.3-II. Základní charakteristika datového souboru 308 ovzorkovaných papoušků.....	15
Tabulka 2.3-III. Základní popisná statistika pro věk, n = 178.....	15
Tabulka 2.3-IV. Základní popisná statistika pro váhu, n = 70.....	15
Tabulka 2.3-V. Základní popisná statistika pro délku běháku, n = 197.....	16
Tabulka 2.3-VI. Klinické projevy poskytnuté majiteli.....	16
Tabulka 3.3-I. Postup barvení Gramovou metodou.....	30
Tabulka 4.1-a. Vyšetřené hodnoty krevních parametrů.....	33
Tabulka 4.1-I. Stanovená míra repeatability metody diferenciálního rozpočtu leukocytů.....	33
Tabulka 4.1-II. Korelace hematologických parametrů	34
Tabulka 4.1-III. Základní statistický popis relativ. zastoupení jednotlivých subtypů leukocytů.....	34
Tabulka 4.1-IV. Základní popisná statistika pro abs.počty leukocytů včetně jejich subtypů, n = 124. .	34
Tabulka 4.1-V. Základní statistický popis absolutních počtů erytrocytů, n = 139.....	35
Tabulka 4.1-VI. Základní statistický popis hodnot hematokritu, n = 124.....	35
Tabulka 4.1-VII. Základní statistický popis pro hodnoty koncentrací hemoglobinu, n = 107.	35
Tabulka 4.1-VIII. Základní popisná statistika pro hodnoty erytrocytárního indexu MCHC, n = 104.	35
Tabulka 4.1-IX. Závislost hodnot H/L poměru na rodu.....	36
Tabulka 4.1-X. Závislost hodnot relativních počtů bazofilů na rodu.	38
Tabulka 4.1-XI. Závislost hodnot relativních počtů eosinofilů na rodu.	38
Tabulka 4.1-XII. Závislost hodnot relativních počtů monocytů na rodu	40
Tabulka 4.1-XIII. Závislost hodnot absolutních počtů leukocytů na rodu.	41
Tabulka 4.1-XIV. Závislost hodnot absolutních počtů lymfocytů na rodu1.....	42
Tabulka 4.1-XV. Závislost hodnot absolutních počtů heterofilů na autoimunitních poruchách.....	43
Tabulka 4.1-XVI. Závislost hodnot absolutních počtů bazofilů na rodu.	44
Tabulka 4.1-XVII. Závislost hodnot absolutních počtů eosinofilů na rodu.....	44
Tabulka 4.1-XVIII. Závislost hodnot absolutních počtů monocytů na rodu	46
Tabulka 4.1-XIX. Závislost hodnot absolutních počtů erytrocytů na rodu	47
Tabulka 4.1-XX. Závislost hodnot MCHC na umístění	49
Tabulka 4.1-XXI. Vliv fylogeneze na jednotlivé hematologické parametry.....	49
Tabulka 4.2-I. Pro každý druh papouška je uveden počet mikrobiologických vzorků.....	59
Tabulka 4.2-II. Konzistence ve složení bakteriálních komunit.....	65
Tabulka 4.2-III. Korelace bakteriálních morfologických kategorií	68
Tabulka 4.2-IV. Závislost hodnot H/L poměru na přítomnosti bakteriálních OTU v orální dutině.....	70
Tabulka 4.2-V. Závislost hodnot H/L poměru na přítomnosti bakteriálních OTU v kloace.	71
Tabulka 4.2-VI. Závislost hodnot H/L poměru na přítomnosti bakteriálních OTU v trusu.....	72

9 Seznam grafů

Graf 4.1-I. Vliv rodu papouška na H/L poměr.....	36
Graf 4.1-II. Vliv věku na H/L poměr.....	37
Graf 4.1-III. Vliv poruch chování na H/L poměr.....	37
Graf 4.1-IV. Vliv poruch chování na relativní počty bazofilů (%).....	38
Graf 4.1-V. Vliv infekčních chorob na relativní počty eosinofilů (%).....	39
Graf 4.1-VI. Vliv poruch chování na relativní počty eosinofilů (%).....	39
Graf 4.1-VII. Vliv autoimunitních poruch na relativní počty monocytů (%)	40
Graf 4.1-VIII. Vliv infekčních onemocnění na absolutní počty leukocytů ($10^9/l$).....	41
Graf 4.1-IX. Vliv autoimunitních poruch na absolutní počty lymfocytů ($10^9/l$).....	42
Graf 4.1-X. Vliv infekčních chorob na absolutní počty heterofilů ($10^9/l$).	43
Graf 4.1-XI. Vliv autoimunitních poruch na absolutní počty heterofilů ($10^9/l$).....	44
Graf 4.1-XII. Vliv poruch chování na absolutní počty eosinofilů ($10^9/l$).	45
Graf 4.1-XIII. Vliv infekčních onemocnění na absolutní počty eosinofilů ($10^9/l$).....	45
Graf 4.1-XIV. Vliv poruch chování na absolutní počty monocytů ($10^9/l$).....	46
Graf 4.1-XV. Vliv autoimunitních poruch na absolutní počty erytrocytů ($10^{12}/l$).....	47
Graf 4.1-XVI. Vliv pohlaví na absolutní počty erytrocytů ($10^{12}/l$).....	48
Graf 4.1-XVII. Vliv data odběru vzorku na absolutní počty erytrocytů ($10^{12}/l$).....	48
Graf 4.2-I. Beta diverzita mezi vzorky trusu a výtěry kloaky a zobáku.....	60
Graf 4.2-II. Beta diverzita mezi vzorky trusu a výtěry kloaky a zobáku, rody.....	61
Graf 4.2-III. Beta diverzita mezi vzorky trusu, střev a výtěry kloaky a zobáku,druhy.	61
Graf 4.2-IV. Porovnání distribuce bakteriálních tříd.	62
Graf 4.2-V. Porovnání distribuce bakteriálních kmenů.	63
Graf 4.2-VI. Distribuce bakteriálních kmenů ve výtěrech zobáku, rody.....	63
Graf 4.2-VII. Distribuce bakteriálních kmenů ve výtěrech kloaky, rody.....	64
Graf 4.2-VIII. Distribuce bakteriálních kmenů ve vzorkách trusu, rody.	64
Graf 4.2-IX. Korelace duplikovaných dat mikrobiálních komunit mezi vzorky <i>colonu</i> a <i>ilea</i>	66
Graf 4.2-X. Korelace duplikovaných dat mikrobiálních komunit mezi vzorky <i>colonu</i> a trusu	66
Graf 4.2-XI. Korelace duplikovaných dat mikrobiálních komunit mezi vzorky <i>colonu</i> a výtěry kloaky .	67
Graf 4.2-XII. Korelace duplikovaných dat mikrobiálních komunit mezi výtěry kloaky a vzorky trusu. .	67
Graf 4.2-XIII.Distribuce bakteriálních morfologických kategorií ve vzorkách trusu, jedinci.	68
Graf 4.2 XIV. Korelace hodnot abundance grampozitivních tyčinek.....	69
Graf 4.2-XIV. Závislost hodnot H/L poměru na přítomnosti Flavobacteriaceae v orální dutině.	70
Graf 4.2-XV. Závislost hodnot H/L poměru na přítomnosti bakterií Escherichia/Shigella v kloace	72

10 Seznam obrázků

Obrázek 2.2-I. Záznamová karta vyplňovaná během vzorkování.....	11
Obrázek 2.3-I. Konsensuální fylogenetický strom.	13
Obrázek 3.2-I. Krevní buňky v Bürkerově komůrce.....	19
Obrázek 3.2-II. Leukocyty pozorované v periferní krvi.....	21
Obrázek 4.1-I. Distribuce průměrné hodnoty H/L poměru.....	50
Obrázek 4.1-II. Distribuce průměrné hodnoty relativního počtu bazofilů (%)	51

Obrázek 4.1-III. Distribuce průměrné hodnoty relativního počtu eosinofilů (%)	52
Obrázek 4.1-IV. Distribuce průměrné hodnoty relativního počtu monocytů (%).4	52
Obrázek 4.1-V. Distribuce průměrné hodnoty pro absolutní počet leukocytů ($10^9/l$).....	53
Obrázek 4.1-VI. Distribuce průměrné hodnoty pro absolutní počet lymfocytů ($10^9/l$).	53
Obrázek 4.1-VII. Distribuce průměrné hodnoty pro absolutní počet heterofilů ($10^9/l$).....	54
Obrázek 4.1-VIII. Distribuce průměrné hodnoty pro absolutní počet bazofilů ($10^9/l$).....	54
Obrázek 4.1-IX. Distribuce průměrné hodnoty pro absolutní počet eosinofilů ($10^9/l$)	55
Obrázek 4.1-X. Distribuce průměrné hodnoty pro absolutní počet monocytů ($10^9/l$).	55
Obrázek 4.1-XI. Distribuce průměrné hodnoty absolutního počtu erytrocytů ($10^{12}/l$).....	56
Obrázek 4.1-XII. Distribuce průměrné hodnoty MCHC (g/l).....	57

11 Seznam literatury

- Abou-Zahr, Tariq, Daniel Calvo Carrasco, Naomi Shimizu Dvm, Neil A. Forbes, Thomas A. G. Dutton, Fiona Froehlich, and Filippo De Bellis. 2018. "Superficial Chronic Ulcerative Dermatitis (SCUD) in Psittacine Birds: Review of 11 Cases (2008-2016)." *Journal of Avian Medicine and Surgery* 32 (1): 25–33. <https://doi.org/10.1647/2017-250>.
- Acquarone, Camilla, Marco Cucco, Shara Cauli, and Giorgio Malacarne. 2002. "Effects of Food Abundance and Predictability on Body Condition and Health Parameters: Experimental Tests with the Hooded Crow." *Ibis* 144 (October): E155–63. https://doi.org/10.1046/j.1474-919X.2002.t01-2-00094_1.x.
- Akhter, J., Hossain M.T., Islam T.M., Siddaque M.P., and Md Islam. 2018. "Isolation and Identification of Microflora from Apparently Healthy Caged Parrots of Dhaka Zoo of Bangladesh," December.
- Allegretti, L., L. Revollo, C. S. Astolfi-Ferreira, J. L. Chacón, L. M. Martins, G. H. F. Seixas, and A. J. P. Ferreira. 2014. "Isolation and Molecular Identification of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacterium Spp. from Faeces of the Blue-Fronted Amazon Parrot in Brazil." *Beneficial Microbes* 5 (4): 497–503. <https://doi.org/10.3920/BM2013.0082>.
- Baker, J. R. 1980. "A Survey of Causes of Mortality in Budgerigars (*Melopsittacus Undulatus*)."*The Veterinary Record* 106 (1): 10–12. <https://doi.org/10.1136/vr.106.1.10>.
- Bangert, R. L., B. R. Cho, P. R. Widders, E. H. Stauber, and A. C. Ward. 1988. "A Survey of Aerobic Bacteria and Fungi in the Feces of Healthy Psittacine Birds." *Avian Diseases* 32 (1): 46–52.
- Bates, Douglas, Martin Mächler, Ben Bolker, and Steve Walker. 2015. "Fitting Linear Mixed-Effects Models Using Lme4." *Journal of Statistical Software* 67 (1): 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>.
- Becker Saidenberg, André, Neiva Maria Robaldo Guedes, Gláucia Helena Fernandes Seixas, Mariangela da Costa Allgayer, Erica Pacífico de Assis, Luis Fabio Silveira, Priscilla Anne Melville, and Nilson Roberti Benites. 2012. "A Survey for Escherichia Coli Virulence Factors in Asymptomatic Free-Ranging Parrots." *ISRN Veterinary Science* 2012 (July). <https://doi.org/10.5402/2012/984813>.
- Benjamini, Yoav, and Yosef Hochberg. 1995. "Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing." *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 57 (1): 289–300.

- Benson, Andrew K., Scott A. Kelly, Ryan Legge, Fangrui Ma, Soo Jen Low, Jaehyoung Kim, Min Zhang, et al. 2010. "Individuality in Gut Microbiota Composition Is a Complex Polygenic Trait Shaped by Multiple Environmental and Host Genetic Factors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (44): 18933–38. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007028107>.
- Breheny, Patrick, and Woodrow Burchett. 2017. "Visualization of Regression Models Using Visreg." *The R Journal* 9 (2): 56–71.
- Brilhante, R. S. N., D. S. C. M. Castelo-Branco, G. D. P. Soares, D. J. Astete-Medrano, A. J. Monteiro, R. A. Cordeiro, J. J. C. Sidrim, and M. F. G. Rocha. 2010. "Characterization of the Gastrointestinal Yeast Microbiota of Cockatiels (*Nymphicus Hollandicus*): A Potential Hazard to Human Health." *Journal of Medical Microbiology* 59 (Pt 6): 718–23. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.017426-0>.
- Briscoe, Jeleen A., Daniel O. Morris, Shelley C. Rankin, Mattie J. Hendrick, and Karen L. Rosenthal. 2008. "Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*-Associated Dermatitis in a Congo African Grey Parrot (*Psittacus Erithacus Erithacus*)."*Journal of Avian Medicine and Surgery* 22 (4): 336–43. <https://doi.org/10.1647/2008-014.1>.
- Briscoe, Jeleen A., Karen L. Rosenthal, and Frances S. Shofer. 2010. "Selected Complete Blood Cell Count and Plasma Protein Electrophoresis Parameters in Pet Psittacine Birds Evaluated for Illness."*Journal of Avian Medicine and Surgery* 24 (2): 131–37. <https://doi.org/10.1647/2007-047.1>.
- Britt, J. O., E. B. Howard, and W. J. Rosskopf. 1980. "Psittacine Tuberculosis." *The Cornell Veterinarian* 70 (3): 218–25.
- Callahan, Benjamin J., Paul J. McMurdie, Michael J. Rosen, Andrew W. Han, Amy Jo A. Johnson, and Susan P. Holmes. 2016. "DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data." *Nature Methods* 13 (7): 581–83. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.
- Campbell, Terry W., and Christine Ellis. 2007. *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*. 3rd ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub.
- Canny, Carol J., Daniel A. Ward, Sharon Patton, and Susan E. Orosz. 1999. "Microsporidian Keratoconjunctivitis in a Double Yellow-Headed Amazon Parrot (*Amazona Ochrocephala Oratrix*)."*Journal of Avian Medicine and Surgery* 13 (4): 279–86.
- Caporaso, J. Gregory, Kyle Bittinger, Frederic D. Bushman, Todd Z. DeSantis, Gary L. Andersen, and Rob Knight. 2010. "PyNAST: A Flexible Tool for Aligning Sequences to a Template Alignment." *Bioinformatics (Oxford, England)* 26 (2): 266–67. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp636>.
- Carey, C., and M. L. Morton. 1976. "Aspects of Circulatory Physiology of Montane and Lowland Birds." *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Comparative Physiology* 54 (1): 61–74. [https://doi.org/10.1016/s0300-9629\(76\)80073-4](https://doi.org/10.1016/s0300-9629(76)80073-4).
- Choi, Ki Young, Tae Kwon Lee, and Woo Jun Sul. 2015. "Metagenomic Analysis of Chicken Gut Microbiota for Improving Metabolism and Health of Chickens — A Review." *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 28 (9): 1217–25. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0026>.
- Chu, Jun, Qiang Zhang, Tianyuan Zhang, Er Han, Peng Zhao, Ahrar Khan, Cheng He, and Yongzheng Wu. 2016. "Chlamydia Psittaci Infection Increases Mortality of Avian Influenza Virus H9N2 by Suppressing Host Immune Response." *Scientific Reports* 6 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep29421>.
- Clubb, Susan L., Carolyn Cray, Kristopher L. Arheart, and Michelle Goodman. 2007. "Comparison of Selected Diagnostic Parameters in African Grey Parrots (*Psittacus Erithacus*) with Normal Plumage and Those Exhibiting Feather Damaging Behavior." *Journal of Avian Medicine and Surgery* 21 (4): 259–64. <https://doi.org/10.1647/2006-039R.1>.
- Clubb, Susan L., Richard M. Schubot, Kim Joyner, Joseph G. Zinkl, Sharon Wolf, Julie Escobar, Kevin J. Clubb, and Makendra B. Kabbur. 1990. "Hematologic and Serum Biochemical Reference

- Intervals in Juvenile Eclectus Parrots (*Eclectus Roratus*).” In . <https://doi.org/10.2307/27671042>.
- Clubb, Susan L., Richard M. Schubot, Kim Joyner, Joseph G. Zinkl, Sharon Wolf, Julie Escobar, and Mahendra B. Kabbur. 1991b. “Hematologic and Serum Biochemical Reference Intervals in Juvenile Macaws (*Ara Sp.*).” In . <https://doi.org/10.2307/27671042>.
- Clubb, Susan, Richard Schubot, Kim Joyner, Joseph Zinkl, Sharon Wolf, Julie Escobar, and Mahendra Kabbur. 1991a. “Hematologic and Serum Biochemical Reference Intervals in Juvenile Cockatoos.” *Journal of the Association of Avian Veterinarians* 5 (April): 16–26. <https://doi.org/10.2307/27671000>.
- Coleman, Chris W., and Richard Oliver. 1994. “Lymphosarcoma in a Juvenile Blue and Gold Macaw (*Ara Araruana*) and a Mature Canary (*Serinus Canarius*).” *Journal of the Association of Avian Veterinarians* 8 (2): 64–68. <https://doi.org/10.2307/27671119>.
- Collins, Chris, Brigitte Flanagan, and J. Scott Henning. 2012. “An Atypical Presentation of a *Pasteurella Multocida* Infection Following a Cat Bite: A Case Report.” *Cutis* 89 (6): 269–72.
- Cucco, Marco, Roberta Ottonelli, Mara Raviola, and Giorgio Malacarne. 2002. “Variations of Body Mass and Immune Function in Response to Food Unpredictability in Magpies.” *Acta Oecologica* 23 (August): 271–76. [https://doi.org/10.1016/S1146-609X\(02\)01154-2](https://doi.org/10.1016/S1146-609X(02)01154-2).
- D'Agostino, Jennifer J., and Ramiro Isaza. 2004. “Clinical Signs and Results of Specific Diagnostic Testing among Captive Birds Housed at Zoological Institutions and Infected with West Nile Virus.” *Journal of the American Veterinary Medical Association* 224 (10): 1640–43. <https://doi.org/10.2460/javma.2004.224.1640>.
- Daimon, T, and A Caxton-Martins. 1977. “Electron Microscopic and Enzyme Cytochemical Studies on Granules of Mature Chicken Granular Leucocytes.” *Journal of Anatomy* 123 (Pt 3): 553–62.
- Datta, K., J. L. Soni, and I. C. Datta. 1990. “An Avian Model for the Study of Acute Hemolytic Anemia in the Domestic Fowl (*Gallus Domesticus*).” *Biomedica Biochimica Acta* 49 (7): 607–11.
- Deem, Sharon L., Andrew J. Noss, Rosa Leny Cuéllar, and William B. Karesh. 2005. “HEALTH EVALUATION OF FREE-RANGING AND CAPTIVE BLUE-FRONTED AMAZON PARROTS (*AMAZONA AESTIVA*) IN THE GRAN CHACO, BOLIVIA.” *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 36 (4): 598–605. <https://doi.org/10.1638/04094.1>.
- DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E. L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu, and G. L. Andersen. 2006. “Greengenes, a Chimera-Checked 16S rRNA Gene Database and Workbench Compatible with ARB.” *Applied and Environmental Microbiology* 72 (7): 5069–72. <https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>.
- Di Santo, Ludmilla G., Lucas B. Braos, Aline E. Kawanami, Juliana P. Oliveira, Nathan R. N. Cruz, Fernanda S. Mendonça, Mayara C. Peixoto, and Aulus C. Carciofi. 2019. “Feed Processing Effects on Digestibility, Palatability, Excreta Fermentation Products and Blood Parameters in Blue-Fronted Amazon Parrots (*Amazona Aestiva*)†.” *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 103 (1): 339–53. <https://doi.org/10.1111/jpn.13011>.
- Donnelly, Kyle A., Alexandre Le Roux, Taryn A. Donovan, Jessica Grodio, and Katherine Quesenberry. 2018. “Acute Necrotizing Pancreatitis in a Yellow-Naped Amazon Parrot (*Amazona Auropalliata*).” *Journal of Avian Medicine and Surgery* 32 (3): 232–39. <https://doi.org/10.1647/2017-268>.
- Drabkin, D. L. 1949. “The Standardization of Hemoglobin Measurement.” *The American Journal of the Medical Sciences* 217 (6): 710.
- Drew, Mark L., Kim Joyner, and Robert Lobingier. 1993. “Laboratory Reference Intervals for a Group of Captive Thick-Billed Parrots (*Rhynchositta Pachyrhyncha*).” *Journal of the Association of Avian Veterinarians* 7 (1): 35–38. <https://doi.org/10.2307/30134307>.
- Edgar, Robert C., Brian J. Haas, Jose C. Clemente, Christopher Quince, and Rob Knight. 2011. “UCHIME Improves Sensitivity and Speed of Chimera Detection.” *Bioinformatics (Oxford, England)* 27 (16): 2194–2200. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr381>.
- Eeva, Tapio, Dennis Hasselquist, Åsa Lange fors, Lea Tummeleht, Mikko Nikinmaa, and Petteri Ilmonen. 2005. “Pollution Related Effects on Immune Function and Stress in a Free-Living

- Population of Pied Flycatcher *Ficedula Hypoleuca*." *Journal of Avian Biology* 36 (5): 405–12. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2005.03449.x>.
- Ewenson, Erynn L., Richard A. Zann, and Graham R. Flannery. 2001. "Body Condition and Immune Response in Wild Zebra Finches: Effects of Capture, Confinement and Captive-Rearing." *Naturwissenschaften* 88 (9): 391–94. <https://doi.org/10.1007/s001140100250>.
- Fair, Jeanne, Shayna Whitaker, and Brandon Pearson. 2007. "Sources of Variation in Haematocrit in Birds." *Ibis* 149 (3): 535–52. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2007.00680.x>.
- Ferrer, Luis, Antonio Ramis, Jesús Fernández, and Natàlia Majó. 1997. "Granulomatous Dermatitis Caused by *Mycobacterium Genavense* in Two Psittacine Birds." *Veterinary Dermatology* 8 (3): 213–19. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.1997.d01-10.x>.
- Flammer, Keven, and Lynne A. Drewes. 1988. "Species-Related Differences in the Incidence of Gram-Negative Bacteria Isolated from the Cloaca of Clinically Normal Psittacine Birds." *Avian Diseases* 32 (1): 79–83. <https://doi.org/10.2307/1590952>.
- Foldenauer, Ulrike, Raffy Jim Borjal, Amrita Deb, Abdi Arif, Abid Sharif Taha, Ryan William Watson, Hanspeter Steinmetz, Marcellus Bürkle, and Sven Hammer. 2007. "Hematologic and Plasma Biochemical Values of Spix's Macaws (*Cyanopsitta Spixii*)."*Journal of Avian Medicine and Surgery* 21 (4): 275–82. <https://doi.org/10.1647/2007-004R.1>.
- Forbes, N. A., G. N. Simpson, and M. F. Goudswaard. 1992. "Diagnosis of Avian Aspergillosis and Treatment with Itraconazole." *The Veterinary Record* 130 (23): 519–20. <https://doi.org/10.1136/vr.130.23.519-b>.
- Fudge, Alan M. 1997. "A Review of Methods to Detect *Chlamydia Psittaci* in Avian Patients." *Journal of Avian Medicine and Surgery* 11 (3): 153–65.
- Fudge, Alan M. 2000. *Laboratory Medicine: Avian and Exotic Pets*. Philadelphia: Saunders.
- Gibbons, Paul M., Martin D. Busch, Lisa A. Tell, Jennifer E. Graham, and Linda J. Lowenstein. 2002. "Internal Papillomatosis with Intrahepatic Cholangiocarcinoma and Gastrointestinal Adenocarcinoma in a Peach-Fronted Conure (*Aratinga Aurea*)."*Avian Diseases* 46 (4): 1062–69. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[1062:IPWICA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[1062:IPWICA]2.0.CO;2).
- Giraud, A., I. Matic, O. Tenaillon, A. Clara, M. Radman, M. Fons, and F. Taddei. 2001. "Costs and Benefits of High Mutation Rates: Adaptive Evolution of Bacteria in the Mouse Gut." *Science (New York, N.Y.)* 291 (5513): 2606–8. <https://doi.org/10.1126/science.1056421>.
- Godwin, J. S., E. R. Jacobson, and J. M. Gaskin. 1982. "Effects of Pacheco's Parrot Disease Virus on Hematologic and Blood Chemistry Values of Quaker Parrots (*Myopsitta Monachus*)."*The Journal of Zoo Animal Medicine* 13 (3): 127–32. <https://doi.org/10.2307/20094596>.
- Goldstein, E. J., D. M. Citron, T. E. Merkin, and M. J. Pickett. 1990. "Recovery of an Unusual Flavobacterium Group IIb-like Isolate from a Hand Infection Following Pig Bite." *Journal of Clinical Microbiology* 28 (5): 1079–81.
- Gomes, A. M., L. L. Costa, D. a. R. Vilela, M. V. R. Marques, A. G. Carvalhaes, S. Y. Marin, M. P. Costa, R. S. Horta, J. S. Resende, and N. R. S. Martins. 2010. "Detection of *Mycoplasma Gallisepticum* in Dead Captive Psittacines in Belo Horizonte, Brazil." *Brazilian Journal of Poultry Science* 12 (2): 75–78. <https://doi.org/10.1590/S1516-635X2010000200001>.
- Graham, C. L., and D. L. Graham. 1978. "Occurrence of *Escherichia Coli* in Feces of Psittacine Birds." *Avian Diseases* 22 (4): 717–20.
- Griffiths, Richard, Mike C. Double, Kate Orr, and Robert J. G. Dawson. 1998. "A DNA Test to Sex Most Birds." *Molecular Ecology* 7 (8): 1071–75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00389.x>.
- Gross, W. B., and H. S. Siegel. 1983. "Evaluation of the Heterophil/Lymphocyte Ratio as a Measure of Stress in Chickens." *Avian Diseases* 27 (4): 972–79. <https://doi.org/10.2307/1590198>.
- Gu, Shenghua, Dandan Chen, Jin-Na Zhang, Xiaoman Lv, Kun Wang, Li-Ping Duan, Yong Nie, and Xiao-Lei Wu. 2013. "Bacterial Community Mapping of the Mouse Gastrointestinal Tract." *PLOS ONE* 8 (10): e74957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074957>.
- Gustafsson, L., D. Nordling, M. S. Andersson, B. C. Sheldon, A. Qvarnström, William Donald Hamilton, and Jonathan Charles Howard. 1994. "Infectious Diseases, Reproductive Effort and the Cost

- of Reproduction in Birds." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 346 (1317): 323–31. <https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0149>.
- Hadfield, Jarrod D. 2010. "MCMC Methods for Multi-Response Generalized Linear Mixed Models: The MCMCglmm R Package." *Journal of Statistical Software* 33 (1): 1–22. <https://doi.org/10.18637/jss.v033.i02>.
- Hakimuddin, F., F. Abidi, O. Jafer, C. Li, U. Wernery, Ch. Hebel, and K. Khazanehdari. 2015. "Incidence and Detection of Beak and Feather Disease Virus in Psittacine Birds in the UAE." *Biomolecular Detection and Quantification* 6 (November): 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.10.001>.
- Hannon, David E., David A. Bemis, and Michael M. Garner. 2012. "Mycobacterium Marinum Infection in a Blue-Fronted Amazon Parrot (*Amazona aestiva*).” *Journal of Avian Medicine and Surgery* 26 (4): 239–47. <https://doi.org/10.1647/2011-058>.
- Hawkey, C. M., M. G. Hart, J. A. Knight, J. H. Samour, and D. M. Jones. 1982. "Haematological Findings in Healthy and Sick African Grey Parrots (*Psittacus erithacus*).” *The Veterinary Record* 111 (25–26): 580–82.
- Heinsohn, Robert, Sarah Legge, and John A. Endler. 2005. "Extreme Reversed Sexual Dichromatism in a Bird Without Sex Role Reversal." *Science* 309 (5734): 617–19. <https://doi.org/10.1126/science.1112774>.
- Hewitt, William. 2012. *Theory and Application of Microbiological Assay*. Academic Press.
- Hoi-Leitner, Maria, Marilo Romero-Pujante, Herbert Hoi, and A. Pavlova. 2001. "Food Availability and Immune Capacity in Serin (*Serinus serinus*) Nestlings." *Behavioral Ecology and Sociobiology* 49 (5): 333–39. <https://doi.org/10.1007/s002650000310>.
- Hořejší, Václav, Jiřina Bartůňková, Tomáš Brdička, and Radek Špíšek. 2017. *Základy Imunologie*. 6., aktualizované vydání. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton.
- Horobin, Richard W., and John A. Kiernan, eds. 2002. *Conn's Biological Stains: A Handbook of Dyes, Stains and Flourochromes for Use in Biology and Medicine*. 10th ed. Oxford: Bios.
- Huynh, Minh, Silvia Carnaccini, Todd Driggers, and H. L. Shivaprasad. 2014. "Ulcerative Dermatitis and Valvular Endocarditis Associated with *Staphylococcus aureus* in a Hyacinth Macaw (*Anodorhynchus hyacinthinus*).” *Avian Diseases* 58 (2): 223–27. <https://doi.org/10.1637/10690-101413-Reg.1>.
- Isobe, T., and H. S. Lillehoj. 1992. "Effects of Corticosteroids on Lymphocyte Subpopulations and Lymphokine Secretion in Chickens." *Avian Diseases* 36 (3): 590–96.
- Jakubas, Dariusz, Katarzyna Wojczulanis-Jakubas, and Izabela Kulaszewicz. 2013. "Factors Affecting Haematological Variables and Body Mass of Reed Warblers (*Acrocephalus scirpaceus*) and Sedge Warblers (*A. schoenobaenus*).” *Annales Zoologici Fennici* 50 (3): 146–57. <https://doi.org/10.5735/086.050.0302>.
- Jean, S. S., W. S. Lee, F. L. Chen, T. Y. Ou, and P. R. Hsueh. 2014. "Elizabethkingia meningoseptica: An Important Emerging Pathogen Causing Healthcare-Associated Infections." *Journal of Hospital Infection* 86 (4): 244–49. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.01.009>.
- Jiang, Hongshan, Rong Lei, Shou-Wei Ding, and Shuifang Zhu. 2014. "Skewer: A Fast and Accurate Adapter Trimmer for next-Generation Sequencing Paired-End Reads." *BMC Bioinformatics* 15 (June): 182. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-15-182>.
- Klasing, Kirk C. 1988. "Influence of Acute Feed Deprivation or Excess Feed Intake on Immunocompetence of Broiler Chicks." *Poultry Science* 67 (4): 626–34. <https://doi.org/10.3382/ps.0670626>.
- Klindworth, Anna, Elmar Pruesse, Timmy Schweer, Jörg Peplies, Christian Quast, Matthias Horn, and Frank Oliver Glöckner. 2013. "Evaluation of General 16S Ribosomal RNA Gene PCR Primers for Classical and Next-Generation Sequencing-Based Diversity Studies." *Nucleic Acids Research* 41 (1): e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>.
- Kolesnikovas, Cristiane K. M., Claudia Niemeyer, Rodrigo H. F. Teixeira, Adauto L. V. Nunes, Luciana C. Rameh-de-Albuquerque, Sávio S. Sant'Anna, and José L. Catão-Dias. 2012. "Hematologic and

- Plasma Biochemical Values of Hyacinth Macaws (*Anodorhynchus Hyacinthinus*).” *Journal of Avian Medicine and Surgery* 26 (3): 125–29. <https://doi.org/10.1647/2011-020R1.1>.
- Kreisinger, Jakub, Lucie Schmiedová, Adéla Petrželková, Oldřich Tomášek, Marie Adámková, Romana Michálková, Jean-François Martin, and Tomáš Albrecht. 2018. “Fecal Microbiota Associated with Phytohaemagglutinin-induced Immune Response in Nestlings of a Passerine Bird.” *Ecology and Evolution* 8 (19): 9793–9802. <https://doi.org/10.1002/ece3.4454>.
- Lamb, Stephanie, Alicia Sobczynski, Darius Starks, and Nicholas Sitinas. 2014. “Bacteria Isolated From the Skin of Congo African Grey Parrots (*Psittacus Erythracus*), Budgerigars (*Melopsittacus Undulatus*), and Cockatiels (*Nymphicus Hollandicus*).” *Journal of Avian Medicine and Surgery* 28 (4): 275–79. <https://doi.org/10.1647/1082-6742-28.4.275>.
- Lavin, Shana R., William H. Karasov, Anthony R. Ives, Kevin M. Middleton, and Theodore Garland Jr. 2008. “Morphometrics of the Avian Small Intestine Compared with That of Nonflying Mammals: A Phylogenetic Approach.” *Physiological and Biochemical Zoology* 81 (5): 526–50. <https://doi.org/10.1086/590395>.
- Leboffe, Michael J., and Burton E Pierce. 2011. *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory*. Englewood, Colo.: Morton Pub. Co.
- Lee, Won-Jae, and Koji Hase. 2014. “Gut Microbiota-Generated Metabolites in Animal Health and Disease.” *Nature Chemical Biology* 10 (6): 416–24. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1535>.
- Ley, Ruth E., Micah Hamady, Catherine Lozupone, Peter J. Turnbaugh, Rob Roy Ramey, J. Stephen Bircher, Michael L. Schlegel, et al. 2008. “Evolution of Mammals and Their Gut Microbes.” *Science (New York, N.Y.)* 320 (5883): 1647–51. <https://doi.org/10.1126/science.1155725>.
- Li, Jing, Weina Guo, Bernhard Kaltenboeck, Konrad Sachse, Yi Yang, Guangwu Lu, Jilei Zhang, et al. 2016. “Chlamydia Pecorum Is the Endemic Intestinal Species in Cattle While *C. Gallinacea*, *C. Psittaci* and *C. Pneumoniae* Associate with Sporadic Systemic Infection.” *Veterinary Microbiology* 193 (September): 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.008>.
- Lucas, Alfred M., and Casimir Jamroz. 1961. *Atlas of Avian Hematology* /. Washington, D.C. : U.S. Dept. of Agriculture,. <https://www.biodiversitylibrary.org/bibliography/6392>.
- MacLachlan, N. James, and Edward J. Dubovi. 2010. *Fenner’s Veterinary Virology*. Academic Press.
- Magurran, Anne E. 2004. *Measuring Biological Diversity*. Malden: Blackwell.
- Masello, Juan F., R. Gustavo Choconi, Matthias Helmer, Thomas Kremerberg, Thomas Lubjuhn, and Petra Quillfeldt. 2009. “Do Leucocytes Reflect Condition in Nestling Burrowing Parrots *Cyanoliseus Patagonus* in the Wild?” *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 152 (2): 176–81. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.09.018>.
- Maxwell, M. H. 1993. “Avian Blood Leucocyte Responses to Stress.” *World’s Poultry Science Journal* 49 (1): 34–43. <https://doi.org/10.1079/WPS19930004>.
- Maxwell, M. H., P. M. Hocking, and G. W. Robertson. 1992. “Differential Leucocyte Responses to Various Degrees of Food Restriction in Broilers, Turkeys and Ducks.” *British Poultry Science* 33 (1): 177–87. <https://doi.org/10.1080/00071669208417455>.
- Maxwell, M., and G. Robertson. 1995. “The Avian Basophilic Leukocyte: A Review.” *Worlds Poultry Science Journal - WORLD POULTRY SCI J* 51 (November): 307–25. <https://doi.org/10.1079/WPS19950021>.
- Mazerolle, Daniel F., and Keith A. Hobson. 2002. “Physiological Ramifications of Habitat Selection in Territorial Male Ovenbirds: Consequences of Landscape Fragmentation.” *Oecologia* 130 (3): 356–63. <https://doi.org/10.1007/s00442-001-0818-z>.
- McFall-Ngai, Margaret, Michael G. Hadfield, Thomas C. G. Bosch, Hannah V. Carey, Tomislav Domazet-Lošo, Angela E. Douglas, Nicole Dubilier, et al. 2013. “Animals in a Bacterial World, a New Imperative for the Life Sciences.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (9): 3229–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218525110>.
- McMurdie, Paul J., and Susan Holmes. 2013. “Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data.” *PloS One* 8 (4): e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>.

- McRee, Anna Elizabeth, Thomas N. Tully Jr, Javier G. Nevarez, Hugues Beaufre, Melanie Ammersbach, Stephen D. Gaunt, Rory G. Fuller, and L. Michael Romero. 2018. "EFFECT OF ROUTINE HANDLING AND TRANSPORTATION ON BLOOD LEUKOCYTE CONCENTRATIONS AND PLASMA CORTICOSTERONE IN CAPTIVE HISPANIOLAN AMAZON PARROTS (AMAZONA VENTRALIS)." *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 49 (2): 396–403. <https://doi.org/10.1638/2016-0100.1>.
- Merino, Santiago, and Andrés Barbosa. 1997. "Haematocrit Values in Chinstrap Penguins (*Pygoscelis Antarctica*): Variation with Age and Reproductive Status." *Polar Biology* 17 (1): 14–16. <https://doi.org/10.1007/s003000050099>.
- Minias, Piotr. 2015. "The Use of Haemoglobin Concentrations to Assess Physiological Condition in Birds: A Review." *Conservation Physiology* 3 (1). <https://doi.org/10.1093/conphys/cov007>.
- Minias, Piotr. 2019. "Evolution of Heterophil/Lymphocyte Ratios in Response to Ecological and Life-history Traits: A Comparative Analysis across the Avian Tree of Life." *Journal of Animal Ecology*, January. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12941>.
- Moreno, J., A. de León, J. A. Fargallo, and E. Moreno. 1998. "Breeding Time, Health and Immune Response in the Chinstrap Penguin *Pygoscelis Antarctica*." *Oecologia* 115 (3): 312–19. <https://doi.org/10.1007/s004420050522>.
- Morishita, Teresa Y., Linda J. Lowenstine, Dwight C. Hirsh, and Dale L. Brooks. 1996. "Pasteurella Multocida in Psittacines: Prevalence, Pathology, and Characterization of Isolates." *Avian Diseases* 40 (4): 900–907. <https://doi.org/10.2307/1592315>.
- Nazifi, Saeed, and Nasser Vesal. 2003. "Hematological Values of Healthy Roseringed Parakeets (*Psittacula Krameri*)."*Journal of Applied Animal Research - J APPL ANIM RES* 24 (December): 165–68. <https://doi.org/10.1080/09712119.2003.9706452>.
- Neuwirth, Erich. 2014. *RColorBrewer: ColorBrewer Palettes* (version 1.1-2). <https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer>.
- Norris, Ken, and Matthew R. Evans. 2000. "Ecological Immunology: Life History Trade-Offs and Immune Defense in Birds." *Behavioral Ecology* 11 (1): 19–26. <https://doi.org/10.1093/beheco/11.1.19>.
- Oddsson, K., G. Stefansdottir, B. Mogensen, and S. Guðmundsson. 1995. "[Animal and human bites in Iceland.]" *Laeknablaðid* 81 (2): 126–32.
- Oksanen, Jari, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGlinn, Peter R. Minchin, et al. 2019. *Vegan: Community Ecology Package* (version 2.5-6). <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Ots, I., A. MurumÄgi, and P. HÖrak. 1998. "Haematological Health State Indices of Reproducing Great Tits: Methodology and Sources of Natural Variation." *Functional Ecology* 12 (4): 700–707. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1998.00219.x>.
- Panigrahy, B., F. D. Clark, and C. F. Hall. 1983. "Mycobacteriosis in Psittacine Birds." *Avian Diseases* 27 (4): 1166–68. <https://doi.org/10.2307/1590218>.
- Panigrahy, B., J. E. Grimes, M. I. Rideout, R. B. Simpson, and L. C. Grumbles. 1979. "Zoonotic Diseases in Psittacine Birds: Apparent Increased Occurrence of Chlamydiosis (Psittacosis), Salmonellosis, and Giardiasis." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 175 (4): 359–61.
- Parga, Maria L., Helene Pendl, and Neil A. Forbes. 2001. "The Effect of Transport on Hematologic Parameters in Trained and Untrained Harris's Hawks (*Parabuteo unicinctus*) and Peregrine Falcons (*Falco peregrinus*)."*Journal of Avian Medicine and Surgery* 15 (3): 162–69. [https://doi.org/10.1647/1082-6742\(2001\)015\[0162:TEOTOH\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1647/1082-6742(2001)015[0162:TEOTOH]2.0.CO;2).
- Petrak, Margaret L. 1982. *Diseases of Cage and Aviary Birds*. Subsequent edition. Philadelphia: Lea & Febiger.
- Polo, Javier, Victor Peinado, Ginés Viscor, and Jesus Palomeque. 1998. "Hematologic and Plasma Chemistry Values in Captive Psittacine Birds." *Avian Diseases* 42 (July): 523–35. <https://doi.org/10.2307/1592679>.

- Price, Morgan N., Paramvir S. Dehal, and Adam P. Arkin. 2009. "FastTree: Computing Large Minimum Evolution Trees with Profiles Instead of a Distance Matrix." *Molecular Biology and Evolution* 26 (7): 1641–50. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp077>.
- Prioste, Fabiola, Ticiana Zwarg, Rodrigo Teixeira, Ralph Vanstreels, Arnaldo Rocha, and Eliana Matushima. 2012. "Hematologic Reference Values for Clinically Healthy Captive Golden Conures (*Guaruba Guarouba*)."
Avian Diseases 56 (December): 701–3.
<https://doi.org/10.1637/10358-1022512-DIGEST.1>.
- Råberg, L, M Grahn, D Hasselquist, and E Svensson. 1998. "On the Adaptive Significance of Stress-Induced Immunosuppression." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265 (1406): 1637–41.
- Razmyar, J., M. Rajabioun, M. Zaeemi, and A. Afshari. 2016. "Molecular Identification and Successful Treatment of Chlamydophila Psittaci (Genotype B) in a Clinically Affected Congo African Grey Parrot (*Psittacus Erithacus Erithacus*)."
Iranian Journal of Veterinary Research 17 (4): 281–85.
- R Development Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0,[cit. 2019-31-10] Dostupné z: <http://www.R-project.org>.
- Reavill, D.R., R.E. Schmidt, and A.M. Fudge. 1990. "Avian Skin and Feather Disorders: A Retrospective Study."
Proceedings of the Association of Avian Veterinarians, 248–55.
- Rehder, Nancy B, David M Bird, and Paul C Laguë. 1982. "Variations in Blood Packed Cell Volume of Captive American Kestrels."
Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology 72 (1): 105–9. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(82\)90017-2](https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90017-2).
- Revell, Liam J. 2012. "Phytools: An R Package for Phylogenetic Comparative Biology (and Other Things)."
Methods in Ecology and Evolution 3 (2): 217–23. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2011.00169.x>.
- Ritchie, Branson, Greg J. Harrison, Don Zantop, and Linda Harrison. 1997. *Avian Medicine: Principles and Application*. Abridged edition. Lake Worth, Fla: Wingers Pub.
- Robertson, G. W., and M. H. Maxwell. 1990. "Modified Staining Techniques for Avian Blood Cells."
British Poultry Science 31 (4): 881–86. <https://doi.org/10.1080/00071669008417319>.
- Rognes, Torbjørn, Tomáš Flouri, Ben Nichols, Christopher Quince, and Frédéric Mahé. 2016. "VSEARCH: A Versatile Open Source Tool for Metagenomics."
PeerJ 4 (October).
<https://doi.org/10.7717/peerj.2584>.
- Rosenberg, Yvonne J., Aurelio Cafaro, Terry Brennan, Jack G. Greenhouse, Kathy McKinnon, Sharon Bellah, Jacob Valley-Ogunro, Suzanne Gartner, and Mark G. Lewis. 1997. "Characteristics of the CD8+ Lymphocytosis during Primary Simian Immunodeficiency Virus Infections."
AIDS 11 (8): 959.
- Rossi, G. 1998. "A Poorly-differentiated Hepatic Haemangiosarcoma in an Amazona Farinosa Parrot."
Avian Pathology 27 (4): 427–30. <https://doi.org/10.1080/03079459808419364>.
- Rueden, Curtis T., Johannes Schindelin, Mark C. Hiner, Barry E. DeZonia, Alison E. Walter, Ellen T. Arena, and Kevin W. Eliceiri. 2017. "ImageJ2: ImageJ for the next Generation of Scientific Image Data."
BMC Bioinformatics 18 (1): 529. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>.
- Saino, Nicola, José Javier Cuervo, Marco Krivacek, Florentino de Lope, and Anders Pape Møller. 1997. "Experimental Manipulation of Tail Ornament Size Affects the Hematocrit of Male Barn Swallows (*Hirundo Rustica*)."
Oecologia 110 (2): 186–90.
<https://doi.org/10.1007/s004420050148>.
- Sakas, Peter S., and Louise Bauck. 2002. *Essentials of Avian Medicine: A Guide for Practitioners*. 2 edition. Lakewood, Colo.: Amer Animal Hospital Assn.
- Salazar, Zara Michelle B., Karina Isabel P. Teves, and Rodel Jonthan S. Vitor li. 2018. "Determination of Hematological Values and Detection of Chlamydophila Psittaci Antibodies in Captive Blue-Naped Parrots at the Ninoy Aquino Parks and Wildlife Nature Center -."
National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology 8 (5): 735–40.
- Salvioli, S., M. Capri, S. Valensin, P. Tieri, D. Monti, E. Ottaviani, and C. Franceschi. 2006. "Inflamm-Aging, Cytokines and Aging: State of the Art, New Hypotheses on the Role of Mitochondria

- and New Perspectives from Systems Biology." Text. 2006.
<https://doi.org/info:doi/10.2174/138161206777947470>.
- Sargatal, Jordi, and Jürgen H. Haffer. 1997. *Handbook of the Birds of the World. Volume 4: Sandgrouse to Cuckoos*. Edited by Josep del Hoyo and Andrew Elliott. 1 edition. Barcelona: Lynx Edicions.
- Sawa, H., K. Hirai, T. Kinjo, I. Shibata, and S. Shimakura. 1981. "Salmonella Typhimurium Infection in Imported Passerine and Psittacine Birds." *Nihon Juigaku Zasshi. The Japanese Journal of Veterinary Science* 43 (6): 967–69.
- Schmidt, Elizabeth Moreira dos Santos, Rogério Ribas Lange, Janaciara Moreira Ribas, Bárbara Maria Daciuk, Fabiano Montiani-Ferreira, and Antonio Carlos Paulillo. 2009. "Hematology of the Red-Capped Parrot (*Pionopsitta Pileata*) and Vinaceous Amazon Parrot (*Amazona Vinacea*) in Captivity." *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians* 40 (1): 15–17. <https://doi.org/10.1638/2007-0054.1>.
- Schmidt, Volker, Susanne Schneider, Julian Schlömer, Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns, and Elvira Richter. 2008. "Transmission of Tuberculosis between Men and Pet Birds: A Case Report." *Avian Pathology* 37 (6): 589–92. <https://doi.org/10.1080/03079450802428901>.
- Scope, Alexandra, T. Filip, Cornelia Gabler, and Franziska Resch. 2002. "The Influence of Stress from Transport and Handling on Hematologic and Clinical Chemistry Blood Parameters of Racing Pigeons (*Columba Livia Domestica*)." *Avian Diseases* 46 (1): 224–29.
[https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0224:TIOSFT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0224:TIOSFT]2.0.CO;2).
- Sedaghat, A., and M. A. Karimi Torshizi. 2017. "Immune Responses, Intestinal Microbiota, Performance and Blood Characteristics of Japanese Quail Fed on Diets Containing Camphor." *Animal: An International Journal of Animal Bioscience* 11 (12): 2139–46.
<https://doi.org/10.1017/S1751731117001148>.
- Sioson, John, Neil Tacuboy, and Rodel II. 2017. "Determination of the Hematological Values and Detection of Chlamydophila Psittaci Antibodies in Captive Palawan Hill Mynah at the Ninoy Aquino Parks and Wildlife Nature Center." *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology* 8 (January): 1. <https://doi.org/10.5455/njPPP.2017.7.1038918112017>.
- Slack, Emma, Siegfried Hapfelmeier, Bärbel Stecher, Yuliya Velykoredko, Maaike Stoel, Melissa A. E. Lawson, Markus B. Geuking, et al. 2009. "Innate and Adaptive Immunity Cooperate Flexibly to Maintain Host-Microbiota Mutualism." *Science (New York, N.Y.)* 325 (5940): 617–20.
<https://doi.org/10.1126/science.1172747>.
- Smith, Kathleen A., Kristy K. Bradley, Mary G. Stobierski, and Leslie A. Tengelsen. 2005. "Compendium of Measures to Control Chlamydophila Psittaci (Formerly Chlamydia Psittaci) Infection among Humans (Psittacosis) and Pet Birds, 2005." *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226 (4): 532–39.
<https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.532>.
- Spenser, E. L. 1991. "Common Infectious Diseases of Psittacine Birds Seen in Practice." *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 21 (6): 1213–30.
[https://doi.org/10.1016/s0195-5616\(91\)50133-9](https://doi.org/10.1016/s0195-5616(91)50133-9).
- Srinivasan, Palani, Gurusamypalayam Amirthalingam Balasubramaniam, Thippichettipalayam Ramasamy Gopala Krishna Murthy, and Perumal Balachandran. 2013. "Bacteriological and Pathological Studies of Egg Peritonitis in Commercial Layer Chicken in Namakkal Area." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3 (12): 988–94. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60191-4](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60191-4).
- Steiner, Gerald, Thomas Bartels, Allison Stelling, Maria-Elisabeth Krautwald-Junghanns, Herbert Fuhrmann, Valdas Sablinskas, and Edmund Koch. 2011. "Gender Determination of Fertilized Unincubated Chicken Eggs by Infrared Spectroscopic Imaging." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 400 (9): 2775–82. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4941-3>.
- Stenkat, J., M.-E. Krautwald-Junghanns, A. Schmitz Ornés, A. Eilers, and V. Schmidt. 2014. "Aerobic Cloacal and Pharyngeal Bacterial Flora in Six Species of Free-Living Birds." *Journal of Applied Microbiology* 117 (6): 1564–71. <https://doi.org/10.1111/jam.12636>.

- Svensson, E., and J. Merila. 1996. "Molt and Migratory Condition in Blue Tits: A Serological Study." *CONDOR* 98 (4): 825–31.
- Štěpka, Karel. 2013. "Automated Cell Counting in Bürker Chamber." In *Image Analysis*, edited by Joni-Kristian Kämäräinen and Markus Koskela, 236–45. Lecture Notes in Computer Science. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-38886-6_23.
- Tell, Lisa A., and Scott B. Citino. 1992. "Hematologic and Serum Chemistry Reference Intervals for Cuban Amazon Parrots (*Amazona Leucocephala Leucocephala*)."*Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 23 (1): 62–64.
- Thomas, Nancy J., D. Bruce Hunter, and Carter T. Atkinson, eds. 2007. *Infectious Diseases of Wild Birds*. Ames, Iowa: Blackwell Pub.
- Totzke, U., M. Fenske, O. Hüppop, H. Raabe, and N. Schach. 1999. "The Influence of Fasting on Blood and Plasma Composition of Herring Gulls (*Larus Argentatus*)."*Physiological and Biochemical Zoology: PBZ* 72 (4): 426–37. <https://doi.org/10.1086/316675>.
- Turnbaugh, Peter J., Vanessa K. Ridaura, Jeremiah J. Faith, Federico E. Rey, Rob Knight, and Jeffrey I. Gordon. 2009. "The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice."*Science Translational Medicine* 1 (6): 6ra14. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3000322>.
- Vancanneyt, M., P. Segers, L. Hauben, J. Hommez, L. A. Devriese, B. Hoste, P. Vandamme, and K. Kersters. 1994. "Flavobacterium Meningosepticum, a Pathogen in Birds."*Journal of Clinical Microbiology* 32 (10): 2398–2403.
- Vaz, Frederico F., Rosangela Locatelli-Dittrich, Olair C. Beltrame, Elenise A. B. Sipinski, Maria C. Abbud, and Rafael M. Sezerban. 2016. "Hematologic and Biochemical Reference Intervals of Free-Living Red-Tailed Amazon Parrot (*Amazona Brasiliensis*) Nestlings on Rasa Island, Paraná, Brazil."*Veterinary Clinical Pathology* 45 (4): 615–22. <https://doi.org/10.1111/vcp.12399>.
- Vaz, Frederico Fontanelli, Rosangela Locatelli-Dittrich, Olair Carlos Beltrame, Elenise Angelotti Bastos Sipinski, Maria Cecília Abbud, and Rafael Meirelles Sezerban. 2016. "Hematologic and Biochemical Values of Wild Red-Tailed Amazon Parrot (*Amazona Brasiliensis*) Nestlings With Abnormal Clinical Examination in Rasa Island, Brazil."*Journal of Avian Medicine and Surgery* 30 (4): 350–56. <https://doi.org/10.1647/2015-119>.
- Velguth, Karen E., Mark E. Payton, and John P. Hoover. 2010. "Relationship of Hemoglobin Concentration to Packed Cell Volume in Avian Blood Samples."*Journal of Avian Medicine and Surgery* 24 (2): 115–21. <https://doi.org/10.1647/2008-042.1>.
- Venables, W. N., and B. D. Ripley. 2002. *Modern Applied Statistics with S*. 4th ed. Statistics and Computing. New York: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-21706-2>.
- Vergneau-Grosset, Claire, Tamsen Polley, Danielle Carrade Holt, William Vernau, and Joanne Paul-Murphy. 2016. "Hematologic, Plasma Biochemical, and Lipid Panel Reference Intervals in Orange-Winged Amazon Parrots (*Amazona Amazonica*)."*Journal of Avian Medicine and Surgery* 30 (4): 335–44. <https://doi.org/10.1647/2015-129>.
- Wang, Qiong, George M. Garrity, James M. Tiedje, and James R. Cole. 2007. "Naïve Bayesian Classifier for Rapid Assignment of rRNA Sequences into the New Bacterial Taxonomy."*Applied and Environmental Microbiology* 73 (16): 5261–67. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>.
- Wickham, Hadley. 2009. *Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Use R! New York: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3>.
- Xenoulis, Panagiotis G., Patricia L. Gray, Donald Brightsmith, Blake Palculict, Sharman Hoppes, Jörg M. Steiner, Ian Tizard, and Jan S. Suchodolski. 2010. "Molecular Characterization of the Cloacal Microbiota of Wild and Captive Parrots."*Veterinary Microbiology* 146 (3–4): 320–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.024>.

12 Přílohy

V přílohách 12-I–XII jsou k dispozici doplňující statistické údaje k faktorům obsažených v minimálních adekvátních modelech pro jednotlivé hematologické parametry.

Příloha 12-I. Závislost hodnot H/L poměru na rodu; MAM: rod + věk + výživový stav + poruchy chování, n = 198, Chisq = 76,905, p < 0,001.

Formula: $\log(HL + 1) \sim \text{genus} + \text{ageN} + \text{masscat} + \text{Behav} + (1 | \text{breeder}) + (1 | \text{year})$

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	1.98897	0.5793	3.433
genusAlisterus	-0.61385	0.80525	-0.762
genusAmazona	-0.49607	0.45378	-1.093
genusAnodorhynchus	-0.10057	0.57021	-0.176
genusAra	0.05143	0.47208	0.109
genusAratinga	-0.0978	0.84381	-0.116
genusCacatua	-0.25147	0.49829	-0.505
genusCoracopsis	0.15363	0.54237	0.283
genusDeroptyus	0.32117	0.62667	0.513
genusDiopsittaca	-0.82059	0.84285	-0.974
genusEclectus	0.04084	0.51314	0.08
genusMelopsittacus	-0.44188	0.67725	-0.652
genusNeophema	0.09591	0.33659	0.285
genusNestor	1.48529	0.56454	2.631
genusNymphicus	-0.39416	0.68296	-0.577
genusPionites	0.36877	0.4782	0.771
genusPionus	-0.25613	0.47126	-0.544
genusPoicephalus	-0.08477	0.46924	-0.181
genusPsephotus	0.23704	0.34975	0.678
genusPsittacula	-0.21937	0.67767	-0.324
genusPsittacus	0.07443	0.45385	0.164
ageN	0.04414	0.01171	3.77
masscat	-0.20346	0.09494	-2.143
BehavYes	-0.46795	0.15773	-2.967

Příloha 12-II. Závislost hodnot relativních počtů bazofilů na rodu; MAM: rod + délka běháku + poruchy chování, n = 198, Chisq = 69,791, p < 0,001.

Formula: $\log(B + 1) \sim \text{genus} + \text{tars} + \text{Behav} + (1 | \text{breeder}) + (1 | \text{year})$

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	-0.1359	0.362646	-0.375

genusAlisterus	0.901915	0.410595	2.197
genusAmazona	-0.19531	0.332889	-0.587
genusAnodorhynchus	-0.66556	0.596264	-1.116
genusAra	-0.48195	0.407699	-1.182
genusAratinga	0.771	0.572626	1.346
genusCacatua	-0.3067	0.363602	-0.843
genusCoracopsis	0.526897	0.434451	1.213
genusDeroptyus	-0.11164	0.457784	-0.244
genusDiopsittaca	-0.32369	0.568282	-0.57
genusEclectus	0.473397	0.364323	1.299
genusForpus	0.094286	0.447179	0.211
genusMelopsittacus	0.708694	0.315291	2.248
genusNeophema	0.976573	0.349313	2.796
genusNeopsephotus	0.411423	0.56847	0.724
genusNestor	-0.78544	0.646551	-1.215
genusNymphicus	0.858808	0.398177	2.157
genusPionites	-0.40663	0.339863	-1.196
genusPionus	-0.00177	0.342863	-0.005
genusPoicephalus	0.228262	0.334162	0.683
genusPsephotus	1.390095	0.446616	3.113
genusPsittacula	0.348606	0.456778	0.763
genusPsittacus	-0.12719	0.352648	-0.361
tars	0.020992	0.01169	1.796
BehavYes	0.223863	0.11421	1.96

Příloha 12-III. Závislost hodnot relativních počtů eosinofilů na rodu; MAM: rod + infekční onemocnění + poruchy chování, n = 198, Chisq = 94,879, p < 0,001.

Formula: $\log(E + 1) \sim \text{genus} + \text{Infect} + \text{Behav} + (1 | \text{breeder}) + (1 | \text{year})$

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	0.16595	0.23908	0.694
genusAlisterus	-0.16422	0.3699	-0.444
genusAmazona	0.30043	0.25398	1.183
genusAnodorhynchus	0.13678	0.37305	0.367
genusAra	0.03122	0.25784	0.121
genusAratinga	2.29417	0.50619	4.532
genusCacatua	-0.01132	0.27523	-0.041
genusCoracopsis	-0.49012	0.32975	-1.486
genusDeroptyus	0.04063	0.35178	0.116
genusDiopsittaca	0.07404	0.50615	0.146
genusEclectus	0.0416	0.29705	0.14
genusForpus	0.04237	0.29465	0.144
genusMelopsittacus	-0.03706	0.24088	-0.154

genusNeophema	-0.01259	0.25073	-0.05
genusNeopsephotus	1.72712	0.39284	4.397
genusNestor	1.63465	0.37305	4.382
genusNymphicus	0.33359	0.2721	1.226
genusPionites	0.08021	0.28084	0.286
genusPionus	0.24419	0.27741	0.88
genusPoicephalus	0.17414	0.27297	0.638
genusPsephotus	0.33068	0.29465	1.122
genusPsittacula	0.18068	0.38785	0.466
genusPsittacus	0.32435	0.25104	1.292
InfectYes	-0.25139	0.10925	-2.301
BehavYes	-0.19349	0.10266	-1.885

Příloha 12-IV. Závislost hodnot relativních počtů monocytů na rodu; MAM: rod + chov (samostatně/pár/hejno) + granule jako složka stravy + autoimunitní poruchy, n = 198, Chisq = 71,344, p < 0,001.

Formula: Mbox.cox ~ genus + housed + granules + AutoIm + (1 | breeder) + (1 | year)

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	2.710921	0.637519	4.252
genusAlisterus	-0.15321	0.814805	-0.188
genusAmazona	-0.73047	0.587092	-1.244
genusAnodorhynchus	-1.46747	0.877208	-1.673
genusAra	-1.32516	0.593494	-2.233
genusAratinga	0.398503	1.119303	0.356
genusCacatua	0.277539	0.651317	0.426
genusCoracopsis	-0.08021	0.847143	-0.095
genusDeroptyus	-2.35208	0.841264	-2.796
genusDiopsittaca	-0.94283	1.119303	-0.842
genusEclectus	-0.20894	0.674077	-0.31
genusForpus	-1.16937	0.804114	-1.454
genusMelopsittacus	-0.73808	0.631983	-1.168
genusNeophema	-1.05422	0.648016	-1.627
genusNeopsephotus	-2.46411	1.006936	-2.447
genusNestor	-2.3612	0.877208	-2.692
genusNymphicus	-1.43254	0.704301	-2.034
genusPionites	-0.76931	0.644921	-1.193
genusPionus	-1.19548	0.651697	-1.834
genusPoicephalus	-0.02849	0.63849	-0.045
genusPsephotus	-1.08033	0.804114	-1.343
genusPsittacula	0.070043	0.896658	0.078
genusPsittacus	-0.08831	0.589912	-0.15

housedpair	0.009933	0.321567	0.031
housedsingle	-0.46679	0.320239	-1.458
granulesYes	-0.4684	0.206035	-2.273
AutolmYes	2.255806	0.768706	2.935

Příloha 12-V. Závislost hodnot absolutních počtů leukocytů na rodu; MAM: rod + ovoce a zelenina jako složka stravy + délka běháku + infekční onemocnění; n = 124, Chisq = 59,125, p < 0,001.

Formula: $\log(\text{Leu} + 1) \sim \text{genus} + \text{vegfruit} + \text{tars} + \text{Infect} + (1 | \text{breeder}) + (1 | \text{year})$

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	2.13216	0.44945	4.744
genusAlisterus	-0.12911	0.56826	-0.227
genusAmazona	0.79948	0.39845	2.006
genusAnodorhynchus	0.93774	0.69377	1.352
genusAra	1.20358	0.48223	2.496
genusAratinga	0.47123	0.64736	0.728
genusCacatua	0.64603	0.42035	1.537
genusCoracopsis	1.05558	0.51207	2.061
genusDeroptyus	1.49963	0.60206	2.491
genusDiopsittaca	1.00619	0.64428	1.562
genusEclectus	0.44988	0.43587	1.032
genusMelopsittacus	-1.24976	0.63081	-1.981
genusNeophema	0.03309	0.35795	0.092
genusNestor	1.69742	0.75938	2.235
genusNymphicus	-0.50933	0.61938	-0.822
genusPionites	0.82695	0.41749	1.981
genusPionus	2.00003	0.64695	3.091
genusPoicephalus	0.24209	0.41498	0.583
genusPsephotus	0.62129	0.38775	1.602
genusPsittacula	1.19747	0.50987	2.349
genusPsittacus	0.78555	0.41404	1.897
vegfruitYes	0.34506	0.18351	1.88
tars	-0.02711	0.01431	-1.894
InfectYes	0.25999	0.14621	1.778

Příloha 12-VI. Závislost hodnot absolutních počtů lymfocytů na rodu; MAM: rod + umístění (uvnitř/vně) + chovné zařízení (voliéra/klec) + ovoce a zelenina jako složka stravy + autoimunitní porucha; n = 124, Chisq = 4,6377, p = 0,031.

Formula: $\log(aL + 1) \sim \text{genus} + \text{facility} + \text{aviary} + \text{vegfruit} + \text{Autolm} + (1 | \text{breeder}) + (1 | \text{year})$

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	0.50849	0.32118	1.583
genusAlisterus	-0.35625	0.50773	-0.702
genusAmazona	0.49952	0.31339	1.594
genusAnodorhynchus	-0.29401	0.42143	-0.698
genusAra	0.2329	0.30704	0.759
genusAratinga	0.02634	0.54733	0.048
genusCacatua	0.2349	0.34208	0.687
genusCoracopsis	0.08235	0.38152	0.216
genusDeroptyus	0.09741	0.49336	0.197
genusDiopsittaca	1.56577	0.54733	2.861
genusEclectus	-0.02839	0.35786	-0.079
genusMelopsittacus	-0.48071	0.54733	-0.878
genusNeophema	-0.2937	0.30823	-0.953
genusNestor	-0.58812	0.42143	-1.396
genusNymphicus	-1.28373	0.75114	-1.709
genusPionites	0.61012	0.35566	1.715
genusPionus	0.46049	0.54928	0.838
genusPoicephalus	-0.18257	0.3633	-0.503
genusPsephotus	-0.07361	0.33715	-0.218
genusPsittacula	0.50285	0.44061	1.141
genusPsittacus	-0.21822	0.31346	-0.696
facilityout	0.49088	0.19567	2.509
aviarycage	0.44654	0.18536	2.409
vegfruitYes	0.27709	0.14511	1.91
AutoImYes	1.03404	0.49709	2.08

Příloha 12-VII. Závislost hodnot absolutních počtů heterofilů na autoimunitních poruchách; MAM: infekční onemocnění + autoimunitní poruchy; n = 124, Chisq = 10,393, p = 0,005.

Formula: $\log(aH + 1) \sim \text{Infect} + \text{AutoIm} + (1 | \text{breeder}) + (1 | \text{year})$

Fixed effects:

Estimate	Std. Error	t value
(Intercept) 1.9445	0.149	13.049
InfectYes 0.3799	0.1682	2.259
AutoImYes -1.1285	0.4967	-2.272

Příloha 12-VIII. Závislost hodnot absolutních počtů bazofilů na rodu; MAM: rod + chov (samostatně/pár/hejno); n = 124, Chisq = 49,959, p < 0,001.

Formula: $\log(aB + 1) \sim \text{genus} + \text{housed} + (1 | \text{breeder}) + (1 | \text{year})$

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	-0.0491	0.07913	-0.62
genusAlisterus	0.13878	0.09926	1.398
genusAmazona	0.02231	0.06841	0.326
genusAnodorhynchus	0.01277	0.0988	0.129
genusAra	0.05284	0.06816	0.775
genusAratinga	0.17527	0.12767	1.373
genusCacatua	0.03011	0.07477	0.403
genusCoracopsis	0.30062	0.09549	3.148
genusDeroptyus	0.19382	0.1253	1.547
genusDiopsittaca	-0.03714	0.1273	-0.292
genusEclectus	0.12641	0.07687	1.644
genusMelopsittacus	0.05337	0.1342	0.398
genusNeophema	0.19382	0.09205	2.106
genusNestor	0.01864	0.0988	0.189
genusNymphicus	0.05282	0.12514	0.422
genusPionites	-0.01967	0.07964	-0.247
genusPionus	0.04832	0.13375	0.361
genusPoicephalus	0.04958	0.0807	0.614
genusPsephotus	0.43909	0.10973	4.001
genusPsittacula	0.25159	0.10327	2.436
genusPsittacus	0.06537	0.06784	0.963
housedpair	0.05881	0.04799	1.225
housedsingle	0.08546	0.04731	1.806

Příloha 12-IX. Závislost hodnot absolutních počtů eosinofilů na rodu; MAM: rod + ovoce a zelenina jako složka stravy + poruchy chování + infekční onemocnění; n = 124, Chisq = 103,29, p < 0,001.

Formula: $\log(aE + 1) \sim \text{genus} + \text{vegfruit} + \text{Infect} + \text{Behav} + (1 | \text{breeder}) + (1 | \text{year})$

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	-0.04943	0.055561	-0.89
genusAlisterus	0.00447	0.076124	0.059
genusAmazona	0.074201	0.053032	1.399
genusAnodorhynchus	-0.00012	0.075809	-0.002

genusAra	0.038642	0.052228	0.74
genusAratinga	0.722937	0.098846	7.314
genusCacatua	0.067565	0.056574	1.194
genusCoracopsis	0.052016	0.063447	0.82
genusDeroptyus	0.00447	0.096114	0.047
genusDiopsittaca	0.045404	0.098795	0.46
genusEclectus	0.07003	0.059571	1.176
genusMelopsittacus	0.000235	0.095999	0.002
genusNeophema	-0.00012	0.067818	-0.002
genusNestor	0.359582	0.075809	4.743
genusNymphicus	0.134318	0.09979	1.346
genusPionites	0.048381	0.062755	0.771
genusPionus	0.505989	0.098795	5.122
genusPoicephalus	0.069655	0.06166	1.13
genusPsephotus	0.026505	0.075809	0.35
genusPsittacula	0.076386	0.075847	1.007
genusPsittacus	0.099008	0.050791	1.949
vegfruitYes	0.047905	0.027862	1.719
InfectYes	-0.04552	0.023692	-1.921
BehavYes	-0.04913	0.021156	-2.322

Příloha 12-X. Závislost hodnot absolutních počtů monocytů na rodu; MAM: rod + věk + poruchy chování + chov (samostatně/pár/hejno); n = 124, Chisq = 55,715, p < 0,001.

Formula: aMbc ~ genus + age + housed + Behav + (1 | breeder) + (1 | year)

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	0.17917	0.13029	1.375
genusAlisterus	-0.08976	0.1299	-0.691
genusAmazona	0.0344	0.08912	0.386
genusAnodorhynchus	-0.13827	0.128	-1.08
genusAra	-0.05563	0.08902	-0.625
genusAratinga	0.19275	0.16686	1.155
genusCacatua	0.15894	0.0978	1.625
genusCoracopsis	0.04629	0.12355	0.375
genusDeroptyus	-0.25589	0.16321	-1.568
genusDiopsittaca	0.21423	0.16766	1.278
genusEclectus	0.05307	0.10156	0.522
genusMelopsittacus	-0.30432	0.17525	-1.736
genusNeophema	-0.11322	0.12107	-0.935
genusNestor	-0.2054	0.128	-1.605
genusNymphicus	-0.08308	0.16274	-0.511
genusPionites	0.03416	0.1048	0.326

genusPionus	0.40195	0.1777	2.262
genusPoicephalus	0.08041	0.1072	0.75
genusPsephotus	-0.09751	0.14771	-0.66
genusPsittacula	0.15529	0.13452	1.154
genusPsittacus	0.10023	0.08992	1.115
age	0.08519	0.04034	2.112
housedpair	-0.09106	0.0626	-1.455
housedsingle	-0.15971	0.06225	-2.565
BehavYes	-0.07931	0.03594	-2.207

Příloha 12-XI. Závislost hodnot absolutních počtů erytrocytů na rodu; MAM: rod + pohlaví + datum odběru + umístění (uvnitř/vně) + chov (samostatně/pár/hejno) + výživový stav + autoimunitní poruchy; n = 139, Chisq = 90,685, p < 0,001.

Formula: Ery^2 ~ genus + sex + date + facility + housed + masscat + AutoIm + (1 | breeder) + (1 | year)

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	-3.07222	3.301728	-0.93
genusAlisterus	3.498693	3.085791	1.134
genusAmazona	1.920601	2.298033	0.836
genusAnodorhynchus	-7.55783	3.341776	-2.262
genusAra	3.938446	2.312373	1.703
genusAratinga	2.780476	4.206575	0.661
genusCacatua	4.743479	2.540921	1.867
genusCoracopsis	2.364431	3.444526	0.686
genusDeroptyus	4.00164	4.517407	0.886
genusDiopsittaca	11.41472	4.197766	2.719
genusEclectus	1.130633	2.565295	0.441
genusForpus	2.111443	3.820294	0.553
genusMelopsittacus	5.58311	3.073173	1.817
genusNeophema	-4.38643	3.274305	-1.34
genusNeopsephotus	5.309045	4.548274	1.167
genusNestor	-6.27543	3.341776	-1.878
genusNymphicus	6.065819	3.021979	2.007
genusPionites	2.24272	2.607929	0.86
genusPionus	-4.34381	4.545009	-0.956
genusPoicephalus	2.925096	2.723171	1.074
genusPsephotus	10.65946	4.548123	2.344
genusPsittacula	2.160642	3.498692	0.618
genusPsittacus	4.654985	2.301743	2.022
sexM	0.968267	0.664644	1.457
date	0.005613	0.003373	1.664
facilityout	3.387396	0.907709	3.732

housedpair	0.722337	1.755172	0.412
housedsingle	2.578302	1.680208	1.535
masscat	1.463416	0.527048	2.777
AutolmYes	4.884796	2.927826	1.668
AutolmYes	4.884796	2.927826	1.668

Příloha 12-XII. Závislost hodnot MCHC na umístění; MAM: umístění (uvnitř/vně) + ovoce a zelenina jako složka stravy; n = 104, Chisq = 9,364, p = 0,025.

Formula: MCHC^2 ~ facility + vegfruit + (1 | breeder) + (1 | year)

Fixed effects:

	Estimate	Std. Error	t value
(Intercept)	114712	9258	12.39
facilityout	-5308	6102	-0.87
vegfruitYes	-16651	8159	-2.041

V přílohách 12-XIII–XXIV jsou uvedeny statisticky popsané závislosti hodnot hematologických parametrů na testovaných proměnných včetně vlivu fylogeneze.

Příloha 12-XIII. Závislost hodnot H/L poměru na testovaných proměnných se zahrnutým vlivem fylogeneze; sex (pohlaví), ageN (věk uvedený číselně)/ age (věk uvedený hodnotou: mládě/dospělec), date (datum), facility (umístění), aviary (chovné zařízení), housed (sociální typ chovu), granules (granule jako složka stravy), grain (zrniny jako složka stravy), vegfruit (ovoce a zelenina jako složka stravy), tars (délka běháku), masscat (výživový stav), Infect (infekční onemocnění), Dig (metabolické poruchy), AutoIm (autoimunitní poruchy), Beh (poruchy chování); n = 198.

Location effects: HL ~ sex + ageN + date + facility + aviary + housed + granules + grain + vegfruit + tars + masscat + Infect + Dig + AutoIm + Beh

	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC	
(Intercept)	7.924856	1.419044	14.68312	10342	0.0196	*
sexM	0.171259	-0.48898	0.788767	9998	0.5973	
ageN	0.191507	0.077099	0.31233	9673	0.0016	**
date	-0.003598	-0.01095	0.003712	9998	0.3231	
facilityIN	2.341729	-2.24636	6.470664	9445	0.2937	
facilityout	0.685853	-1.5833	3.122681	10891	0.5699	
aviarycage	-0.162808	-3.21372	2.519661	10377	0.9112	
housedpair	0.507528	-1.38502	2.446737	9998	0.5943	
housedsingle	1.141929	-1.53847	3.964175	9998	0.4187	
granulesYes	0.437553	-1.12787	1.928568	9998	0.5745	
grainYes	0.88573	-1.9723	3.600378	9998	0.5365	
vegfruitYes	-1.007538	-3.40991	1.521632	9998	0.4163	
tars	0.027414	-0.05476	0.109615	9998	0.5095	
masscat	-1.21571	-2.0956	-0.31362	9998	0.0076	**
InfectYes	1.629758	-0.3904	3.660383	9998	0.1144	
Dig	-0.247113	-1.51501	1.097102	9998	0.7181	
AutoImYes	-1.346801	-6.08909	3.330877	9998	0.5749	
Beh	-1.459189	-2.55008	-0.41949	9998	0.0076	**

Příloha 12-XIV. Závislost hodnot relativních počtů bazofilů (%) na testovaných proměnných se zahrnutým vlivem fylogeneze; n = 198.

Location effects: B ~ sex + age + date + facility + aviary + housed + granules + grain + vegfruit + tars + masscat + Infect + Dig + AutoIm + Beh

	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC
(Intercept)	-0.27457	-3.00146	2.353125	9998	0.836
sexM	0.072286	-0.32004	0.472805	9998	0.716
age	0.077737	-0.45861	0.638105	9998	0.781
date	0.000712	-0.00236	0.003765	9998	0.667
facilityout	0.578526	-0.35624	1.466514	9998	0.212
aviarycage	0.471978	-0.52961	1.534828	9998	0.36

housedpair	-0.15541	-0.88058	0.570137	8989	0.66
housedsingle	0.179162	-0.76073	1.131378	9998	0.718
granulesYes	-0.30713	-0.85038	0.242179	9998	0.269
grainYes	0.159581	-0.7768	1.100424	9998	0.746
vegfruitYes	0.213919	-0.57248	0.999397	9998	0.598
tars	0.002924	-0.02941	0.037919	9998	0.872
masscat	0.019003	-0.31848	0.36176	9998	0.914
InfectYes	-0.18874	-0.84418	0.444895	9998	0.558
Dig	0.076424	-0.38472	0.558965	9998	0.744
AutolmYes	1.258549	-0.79872	3.342451	9998	0.232
Beh	0.273935	-0.07123	0.634451	9998	0.128

Příloha 12-XV. Závislost hodnot relativních počtů eosinofilů (%) na testovaných proměnných se zahrnutým vlivem fylogeneze; n = 198.

Location effects: E ~ sex + age + date + facility + aviary + housed + granules + grain + vegfruit + tars + masscat + Infect + Dig + Autolm + Beh

	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC
(Intercept)	-0.45055	-2.66369	2.029277	9998	0.6793
sexM	-0.22636	-0.57926	0.128148	9998	0.2092
age	0.163759	-0.35208	0.660957	9998	0.5363
date	-0.00013	-0.00265	0.002304	9998	0.9062
facilityout	0.074687	-0.77231	0.930009	9587	0.8588
aviarycage	-0.03123	-0.99298	0.903089	9998	0.9544
housedpair	0.256438	-0.395	0.974219	9998	0.4583
housedsingle	0.690445	-0.20926	1.562662	10462	0.1254
granulesYes	-0.36096	-0.91382	0.202804	9998	0.2086
grainYes	-0.44538	-1.35597	0.543652	9998	0.3615
vegfruitYes	0.206231	-0.48253	0.889012	9998	0.5607
tars	0.007045	-0.02214	0.035607	9998	0.6249
masscat	0.216	-0.09871	0.533963	9998	0.1806
InfectYes	-0.29776	-0.92459	0.35649	9998	0.3577
Dig	0.018828	-0.43518	0.474788	9508	0.9444
AutolmYes	1.67781	-0.20804	3.592878	9998	0.081
Beh	-0.30937	-0.65557	0.037955	9998	0.0842

Příloha 12-XVI. Závislost hodnot relativních počtů monocytů (%) na testovaných proměnných se zahrnutým vlivem fylogeneze; n = 198.

Location effects: M ~ sex + age + date + facility + aviary + housed + granules + grain + vegfruit + tars + masscat + Infect + Dig + Autolm + Beh

	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC	.
(Intercept)	4.748005	-0.51128	10.35245	9594	0.0814	.
sexM	-0.50068	-1.28739	0.271853	9998	0.2142	
age	0.249632	-0.90118	1.433963	9998	0.6851	
date	0.000124	-0.00541	0.005995	9998	0.9568	
facilityout	-1.31461	-3.30712	0.695473	9386	0.195	
aviarycage	-1.03816	-3.20413	1.282658	9998	0.3605	
housedpair	-0.50297	-2.08181	1.077058	9998	0.5271	
housedsingle	-1.32255	-3.28214	0.732248	9495	0.199	
granulesYes	-0.86676	-2.20164	0.415615	9998	0.195	
grainYes	0.765884	-1.41309	2.962101	9998	0.4965	
vegfruitYes	0.300361	-1.34762	1.929442	9998	0.7173	
tars	-0.01969	-0.08771	0.054821	9197	0.5781	
masscat	0.164077	-0.56029	0.933085	9998	0.6597	
InfectYes	0.605316	-0.96083	2.089469	9998	0.4387	
Dig	0.611928	-0.44199	1.666984	9998	0.2557	
AutolmYes	6.289205	1.903287	10.8157	8783	0.0062	**
Beh	-0.26987	-1.08761	0.523341	9998	0.5171	

Příloha 12-XVII. Závislost hodnot absolutních počtů leukocytů ($10^9/l$) na testovaných proměnných se zahrnutým vlivem fylogeneze; n = 124.

Location effects: Leu ~ sex + age + date + facility + aviary + housed + granules + grain + vegfruit + tars + masscat + Infect + Dig + Autolm + Beh

	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC	.
(Intercept)	14.47463	-4.9521	33.07119	9998	0.126	
sexM	0.631688	-2.09702	3.433449	9998	0.6539	
age	-1.33915	-5.08977	2.596688	9998	0.4957	
date	-0.00726	-0.0281	0.013262	9998	0.5161	
facilityIN	-1.4387	-10.6287	7.065421	9998	0.7411	
facilityout	3.722747	-1.95475	9.683803	9998	0.2146	
aviarycage	3.751113	-3.00537	10.36877	9998	0.2731	
housedpair	-1.50011	-6.61885	3.263359	9805	0.5481	
housedsingle	-4.14591	-10.607	2.028445	9311	0.2008	
granulesYes	1.512871	-2.36278	5.661144	9998	0.4613	
grainYes	2.618019	-4.21995	9.242155	9998	0.4493	
vegfruitYes	1.948616	-3.46394	7.503568	9998	0.4923	
tars	-0.01861	-0.26946	0.233634	9360	0.9044	
masscat	-1.38585	-3.68491	0.886365	9998	0.2316	
InfectYes	7.184727	2.660468	11.73181	10258	0.0026	**

Dig	1.806433	-1.35674	4.937418	9998	0.2621
AutolmYes	-5.53069	-17.355	6.665484	9998	0.3575
Beh	0.14176	-2.23113	2.406714	9998	0.8968

Příloha 12-XVIII. Závislost hodnot absolutních počtů lymfocytů ($10^9/l$) na testovaných proměnných se zahrnutým vlivem fylogeneze; n = 124.

Location effects: aL ~ sex + age + date + facility + aviary + housed + granules + grain + vegfruit + tars + masscat + Infect + Dig + Autolm + Beh

	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC
(Intercept)	3.985174	-1.19968	9.402405	9998	0.1384
sexM	-0.02183	-0.79105	0.758232	10090	0.953
age	-1.02784	-2.19986	0.152375	9998	0.0804
date	-0.00018	-0.00516	0.004973	9998	0.9496
facilityIN	-0.75825	-3.38795	1.951897	9998	0.5747
facilityout	0.486622	-1.31285	2.281808	9998	0.5941
aviarycage	0.299377	-1.7468	2.252101	9998	0.7708
housedpair	-0.63584	-2.18749	0.843043	9998	0.4091
housedsingle	-0.39093	-2.30675	1.472296	9548	0.6845
granulesYes	0.326047	-0.89901	1.531082	9998	0.6003
grainYes	0.392688	-1.6914	2.484704	9998	0.7167
vegfruitYes	0.963704	-0.55673	2.66149	9666	0.2418
tars	-0.04884	-0.11796	0.02449	9998	0.1692
masscat	0.32527	-0.35288	0.962018	9998	0.3279
InfectYes	0.577598	-0.84153	1.902909	9998	0.4091
Dig	0.173592	-0.78539	1.093417	10383	0.7225
AutolmYes	-0.44473	-4.07011	2.962933	9998	0.7968
Beh	0.28113	-0.42335	0.974096	9998	0.4355

Příloha 12-XIX. Závislost hodnot absolutních počtů heterofilů ($10^9/l$) na testovaných proměnných se zahrnutým vlivem fylogeneze; n = 124.

Location effects: aH ~ sex + age + date + facility + aviary + housed + granules + grain + vegfruit + tars + masscat + Infect + Dig + Autolm + Beh

	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC
(Intercept)	9.046473	-7.05651	25.77409	9402	0.2563
sexM	0.544383	-2.01878	3.266956	9581	0.6771
age	-0.07457	-3.54813	3.423715	10644	0.9748
date	-0.00695	-0.02564	0.010559	9998	0.4685
facilityIN	-0.58512	-8.32769	7.215393	9998	0.8906
facilityout	3.096835	-1.98256	8.506943	9998	0.2402
aviarycage	3.918331	-2.12416	9.632279	9453	0.1878

housedpair	-1.15173	-5.80396	3.218517	10126	0.6123
housedsingle	-4.26984	-9.97076	1.208171	9998	0.1384
granulesYes	1.294405	-2.35355	4.757929	9998	0.4775
grainYes	2.137163	-4.04036	8.003714	9998	0.4743
vegfruitYes	1.173852	-3.57588	6.13053	9998	0.6393
tars	0.032547	-0.18966	0.231322	9542	0.7485
masscat	-1.6519	-3.74618	0.304772	9998	0.11
InfectYes	5.778144	1.764316	9.64016	9998	0.0034 **
Dig	1.594431	-1.29817	4.431988	10330	0.2659
AutolmYes	-5.2195	-16.2903	5.420657	9998	0.3497
Beh	-0.06332	-2.05054	2.034035	9998	0.9624

Příloha 12-XX. Závislost hodnot absolutních počtů bazofilů ($10^9/l$) na testovaných proměnných se zahrnutým vlivem fylogeneze; n = 124.

Location effects: aB ~ sex + age + date + facility + aviary + housed + granules + grain + vegfruit + tars + masscat + Infect + Dig + Autolm + Beh

	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC
(Intercept)	-6.08E-02	-5.13E-01	3.92E-01	9998	0.764
sexM	-3.23E-02	-9.06E-02	2.39E-02	9998	0.264
age	5.62E-03	-7.12E-02	8.70E-02	9998	0.893
date	3.01E-04	-8.82E-05	6.87E-04	9998	0.12
facilityIN	-9.69E-03	-1.79E-01	1.50E-01	9998	0.909
facilityout	7.67E-02	-4.48E-02	2.02E-01	9998	0.221
aviarycage	5.52E-02	-7.54E-02	1.95E-01	9998	0.431
housedpair	-7.76E-02	-1.86E-01	4.01E-02	10584	0.181
housedsingle	-1.20E-02	-1.43E-01	1.29E-01	9998	0.856
granulesYes	2.53E-02	-5.32E-02	9.97E-02	9998	0.495
grainYes	6.24E-02	-6.92E-02	1.93E-01	10720	0.347
vegfruitYes	-4.76E-03	-1.09E-01	9.94E-02	9998	0.931
tars	1.14E-03	-3.73E-03	5.75E-03	9998	0.626
masscat	-1.41E-02	-5.83E-02	2.72E-02	9998	0.521
InfectYes	3.41E-02	-5.40E-02	1.17E-01	10286	0.435
Dig	3.10E-02	-3.26E-02	8.99E-02	9818	0.314
AutolmYes	9.95E-02	-1.45E-01	3.33E-01	9998	0.408
Beh	2.39E-02	-1.84E-02	6.99E-02	10357	0.281

Příloha 12-XXI. Závislost hodnot absolutních počtů eosinofilů ($10^9/l$) na testovaných proměnných se zahrnutým vlivem fylogeneze; n = 124.

Location effects: aE ~ sex + age + date + facility + aviary + housed + granules + grain + vegfruit + tars + masscat + Infect + Dig + Autolm + Beh

	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC
(Intercept)	1.87E-01	-2.93E-01	6.91E-01	9998	0.415
sexM	-1.30E-02	-6.50E-02	3.72E-02	9998	0.612
age	1.40E-02	-5.78E-02	8.61E-02	9998	0.693
date	4.12E-05	-2.99E-04	3.70E-04	9998	0.807
facilityIN	3.90E-02	-1.01E-01	1.75E-01	9998	0.579
facilityout	-2.58E-02	-1.47E-01	1.01E-01	9998	0.686
aviarycage	-3.34E-02	-1.62E-01	9.70E-02	9998	0.61
housedpair	-1.82E-02	-1.38E-01	1.06E-01	9998	0.769
housedsingle	-2.39E-03	-1.40E-01	1.34E-01	9673	0.973
granulesYes	-1.85E-02	-8.98E-02	4.89E-02	7722	0.587
grainYes	-3.84E-02	-1.61E-01	8.24E-02	9681	0.544
vegfruitYes	4.81E-02	-4.40E-02	1.40E-01	9998	0.31
tars	-3.21E-03	-8.33E-03	2.13E-03	9998	0.233
masscat	1.83E-02	-1.99E-02	5.66E-02	9998	0.349
InfectYes	-3.89E-03	-8.24E-02	7.38E-02	9998	0.921
Dig	1.62E-02	-3.84E-02	6.88E-02	10883	0.552
AutolmYes	-2.96E-02	-2.70E-01	1.91E-01	9998	0.791
Beh	-2.95E-02	-6.84E-02	9.31E-03	9998	0.138

Příloha 12-XXII. Závislost hodnot absolutních počtů monocytů ($10^9/l$) na testovaných proměnných se zahrnutým vlivem fylogeneze; n = 124.

Location effects: aM ~ sex + age + date + facility + aviary + housed + granules + grain + vegfruit + tars + masscat + Infect + Dig + Autolm + Beh

	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC
(Intercept)	1.053645	-0.39183	2.499024	9998	0.148
sexM	-0.09484	-0.27016	0.089017	9998	0.2885
age	-0.08814	-0.39578	0.22603	9998	0.5817
date	-0.00012	-0.0016	0.001423	10361	0.8754
facilityIN	-0.22718	-0.98791	0.494516	9998	0.5425
facilityout	-0.05516	-0.48039	0.398198	9998	0.8016
aviarycage	0.022163	-0.50085	0.546531	9998	0.9374
housedpair	-0.34087	-0.70564	0.038843	9998	0.0618 .
housedsingle	-0.58829	-1.0802	-0.08056	9998	0.02 * .
granulesYes	-0.136	-0.4608	0.189938	9603	0.4159
grainYes	0.162598	-0.37517	0.720165	9998	0.5521
vegfruitYes	-0.10611	-0.54603	0.321118	9998	0.6301
tars	-0.00137	-0.02067	0.017967	9998	0.8742
masscat	0.015681	-0.15396	0.1822	9998	0.842
InfectYes	0.340903	-0.02019	0.696658	9998	0.0636 .
Dig	0.15944	-0.09517	0.405512	9998	0.2146
AutolmYes	-0.21928	-1.0756	0.608606	9610	0.6113

Beh	-0.00321	-0.18981	0.180709	10323	0.9746
-----	----------	----------	----------	-------	--------

Příloha 12-XXIII. Závislost hodnot absolutních počtů erytrocytů ($10^{12}/l$) na testovaných proměnných se zahrnutým vlivem fylogeneze; n = 139.

Location effects: Ery ~ sex + age + date + facility + aviary + housed + granules + grain + vegfruit + tars + masscat + Infect + Dig + AutoIm + Beh

	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	ef	f.samp	pMCMC
(Intercept)	1.2923012	-1.0711954	3.481442		9998	0.261
sexM	0.2421965	-0.2083985	0.660686		10380	0.274
age	0.1466532	-0.3971239	0.707729		9998	0.599
date	0.0003417	-0.0019728	0.002614		9998	0.745
facilityIN	0.1929981	-1.0645792	1.368586		9998	0.769
facilityout	0.9665952	0.1285143	1.798912		10379	0.024 *
aviarycage	0.5789567	-0.363155	1.489963		10626	0.219
housedpair	-0.5702598	-1.271931	0.146015		9998	0.117
housedsingle	-0.213424	-1.0706649	0.626775		9998	0.616
granulesYes	0.0639002	-0.5199664	0.610121		9998	0.822
grainYes	0.6781385	-0.1905341	1.603097		9998	0.135
vegfruitYes	-0.2296142	-0.9194055	0.465844		9670	0.508
tars	-0.0150864	-0.0427212	0.013405		9697	0.284
masscat	0.2500806	-0.0659936	0.558003		9998	0.117
InfectYes	0.1884718	-0.4095128	0.793214		9998	0.54
Dig	0.0022639	-0.4252939	0.427996		9998	0.986
AutoImYes	0.9445573	-1.0364854	2.731304		9998	0.319
Beh	0.1088914	-0.2301977	0.436542		9998	0.516

Příloha 12-XXIV. Závislost hodnot MCHC (g/l) na testovaných proměnných se zahrnutým vlivem fylogeneze; n = 104.

Location effects: MCHC ~ sex + age + date + facility + aviary + housed + granules + grain + vegfruit + tars + masscat + Infect + Dig + AutoIm + Beh

	post.mean	l-95% CI	u-95% CI	eff.samp	pMCMC	
(Intercept)	2.983e+02	1.805e+02	4.122e+02	9998	0.0020	**
sexM	-1.007e+00	-2.149e+01	1.900e+01	9998	0.9224	
age	9.686e+00	-1.728e+01	3.830e+01	9998	0.4863	
date	3.115e-03	-1.208e-01	1.294e-01	9635	0.9988	
facilityout	-2.222e+01	-7.039e+01	2.471e+01	9320	0.3519	
aviarycage	-2.082e+01	-7.495e+01	2.931e+01	9998	0.4241	
housedpair	3.066e+01	-1.411e+01	7.347e+01	9998	0.1686	
housedsingle	3.798e+01	-1.229e+01	8.713e+01	9998	0.1366	
granulesYes	-1.283e+00	-2.766e+01	2.319e+01	9998	0.9110	
grainYes	-5.019e+01	-9.807e+01	-2.654e+00	9998	0.0454	*
vegfruitYes	-2.030e+01	-5.390e+01	1.420e+01	10667	0.2418	
tars	6.139e-01	-8.868e-01	2.123e+00	10301	0.4177	

masscat	8.408e+00	-7.130e+00	2.219e+01	8814	0.2653
InfectYes	-1.268e+01	-4.072e+01	1.525e+01	9603	0.3693
Dig	1.321e+01	-5.427e+00	3.313e+01	9998	0.1722
AutolmYes	-1.473e+01	-9.468e+01	6.024e+01	10458	0.7085
Beh	-9.945e+00	-2.424e+01	4.699e+00	9998	0.1758