

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra zoologie

MOLEKULÁRNÍ DETERMINACE DRUHŮ MYŠIC RODU *APODEMUS*



Magisterská diplomová práce
předložená
na Katedře zoologie
Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků
na získání titulu Mgr. v oboru
Zoologie

Autor: **Bc. Denisa Mazurová**

Vedoucí práce: **Mgr. Vojtech Baláž, Ph.D.**

Olomouc

2024

Prohlašuji, že jsem bakalářskou diplomovou prací na téma „Molekulární determinace myšic rodu *Apodemus*“ vypracovala samostatně pod odborným dohledem vedoucího diplomové práce a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Olomouci dne 20. 7. 2024

Podpis

Mazurová, D. (2024). Molekulární determinace druhů myšic rodu *Apodemus* [Diplomová práce]. Olomouc: Katedra Zoologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. 44 s. Česky.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zaměřuje na molekulární determinaci druhů myšic rodu *Apodemus*: *A. sylvaticus*, *A. flavicollis* a *A. uralensis*. Cílem bylo optimalizovat metodu PCR pro jejich přesnou identifikaci a analyzovat přítomnost přenášených patogenů. Výsledky ukázaly, že metoda PCR je efektivní při rozlišení mezi *A. sylvaticus* a *A. flavicollis* a potřebuje další úpravy pro determinaci *A. uralensis*. Zároveň byl výraznou převahou jedinců *A. flavicollis* dokázán předpokládaný výskyt tohoto druhu v přírodních biotopech a výskyt *A. sylvaticus* spíše v urbánním prostředí. V části zabývající se patogeny přenášenými *Apodemus spp.*, *A. flavicollis* vykazovala vysokou prevalenci patogenů (např. *Bartonella*, *Borrelia*, *Babesia* a další), zatímco *A. sylvaticus* nesla pouze bakterii *Bartonella*.

Klíčová slova: *Apodemus*, molekulární determinace, PCR, zoonotické patogeny

Mazurová, D. (2024). Molecular determination of *Apodemus* species [master's thesis]. Olomouc: Department of Zoology, Faculty of Science, Palacky University Olomouc. 44 pp. In Czech.

Abstract

This thesis focuses on the molecular determination of species of the genus *Apodemus*: *A. sylvaticus*, *A. flavicollis*, and *A. uralensis*. The aim was to optimize the PCR method for their precise identification and to analyze the presence of transmitted pathogens. The results showed that the PCR method is effective in distinguishing between *A. sylvaticus* and *A. flavicollis* and requires further adjustments for the determination of *A. uralensis*. Additionally, the predominance of *A. flavicollis* individuals confirmed the expected occurrence of this species in natural habitats, while *A. sylvaticus* was more commonly found in urban environments. Regarding pathogens transmitted by *Apodemus* spp., *A. flavicollis* exhibited a high prevalence of pathogens (e.g., *Bartonella*, *Borrelia*, *Babesia*, and others), while *A. sylvaticus* carried only the bacterium *Bartonella*.

Key words: *Apodemus*, molecular determination, PCR, zoonotic pathogens

OBSAH

OBSAH	6
1 Úvod.....	1
1.1. Rod <i>Apodemus</i>	1
1.1.1 Charakteristika rodu	1
1.1.2 Myšice na území České republiky.....	1
1.1.3 Zástupci rodu <i>Apodemus</i> jako škodlivé organismy	6
1.2. Determinace druhů myšic r. <i>Apodemus</i>	10
1.3. Metoda PCR	13
1.4. Využití metody ve vědě.....	14
2 Cíl Práce.....	16
3 Materiál a metody	17
3.1 Sběr a zpracování vzorků	17
3.2. Izolace DNA	18
3.3. Molekulární determinace.....	18
3.3.1 PCR	19
3.3.2 Elektroforéza	22
3.3.3 Analýza výskytu patogenů u myšic.....	24
4 Výsledky	25
4.1. PCR testování	25
4.1.1 Testování dle metody Bugarski-Stanojević a Gil de Mendonça	25
4.1.2 Optimalizace teplot pro primery <i>A. flavicollis</i>	26
4.1.3 Optimalizace teplot pro primery <i>A. sylvaticus</i>	27
4.1.4 Testování primeru pro <i>A. uralensis</i>	27
4.1.5 Finanční prostředky	28
4.2. Výsledky testování	28
4.2.1 Druhové složení výzkumného vzorku.....	28
4.2.2 Sekvenování	29
4.2.3 Patogeny ve vzorcích myšic	31
5 Diskuze	33
6 Závěr.....	37
LITERATURA.....	38
PŘÍLOHY	I

Seznam tabulek

Tabulka 1 Poměr chemikálií v reakční směsi, množství použité směsi a DNA pro testování	20
Tabulka 2 Program thermocycleru pro pilotní testování	20
Tabulka 3 Teplotní gradient nasedání primerů pro <i>A. flavicollis</i> a <i>A. sylvaticus</i> u dvou vzorků <i>Apodemus</i> spp.	21
Tabulka 4 Program thermocycleru upravený pro optimální nasedání primerů <i>A. flavicollis</i>	21
Tabulka 5 Fisherův test na porovnání prevalencí Bartonelly u <i>A. flavicollis</i> a <i>A. sylvaticus</i> (Program QP 3.0).....	31

Seznam obrázků

Obrázek 1 Myšice temnopásá vs. myšivka horská (Převzato z: BioLib.cz a Biogeografie MUNI).....	2
Obrázek 2 Mapa rozšíření myšice temnopásé (<i>Apodemus agrarius</i>) v ČR v letech 1950-2011 (Anděra, 2011).....	3
Obrázek 3 Mapa rozšíření myšice křovinné (<i>Apodemus sylvaticus</i>) v ČR v letech 1950-2011 (Anděra, 2011).....	4
Obrázek 4 Mapa rozšíření myšice lesní (<i>Apodemus flavicollis</i>) v ČR v letech 1950-2011 (Anděra, 2011).....	5
Obrázek 5 Mapa rozšíření myšice malooké (<i>Apodemus uralensis</i>) v ČR v letech 1950-2011 (Anděra, 2011).....	6
Obrázek 6 Kraniální rozměry (Barčiová a Macholán, 2009).....	11
Obrázek 7 Lokalita sběru Salaš (Poster na Zoologické dny, Balážová et al., 2024)	17
Obrázek 8 Lokalita sběru Olomouc (Mapy Seznam.cz, vyznačeno křížky).....	18
Obrázek 9 Nástroj BLAST s vloženou sekvencí haplotypu pro porovnání identity.	24
Obrázek 10 Elektroforéza úvodního testování se vzorky z Olomouce.	26
Obrázek 11 První elektroforéza s vzorky testovanými s primery pro <i>A. flavicollis</i>	27
Obrázek 12 Sekvenované vzorky <i>A. sylvaticus</i> s primery forward a reverse, seznam od firmy SeqMe	29
Obrázek 13 Haplotypy <i>A. sylvaticus</i> , program BioEdit	30
Obrázek 14 Porovnání identity haplotypu Olomouckého vzorku č. 4 se vzorky v databázi GenBank.	30
Obrázek 15 Porovnání identity haplotypu zbylých vzorků se vzorky v databázi GenBank.	31

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat především vedoucímu mé diplomové práce, Mgr. Vojtechu Balážovi, PhD., za jeho odborné rady, ochotu a trpělivost. Dále si velmi vážím spolupráce s Mgr. Alenou Balážovou a s kolegy z Veterinární univerzity Brno. Konečně chci poděkovat i své mamince, Ing. Elence Mazurové, za korekturu.

Tato práce byla podpořena z projektu **IGA_PrF_2024_029**.

1 ÚVOD

1.1. Rod *Apodemus*

1.1.1 Charakteristika rodu

Myšice rodu *Apodemus* řadíme do podčeledi myši (Murinae), která je jedinou podčeledí z osmi v rámci čeledi myšovití (Muridae) na našem území. Čeď Muridae je v současné době největší skupinou hlodavců. Pro zástupce této čeledi je typická protáhlá hlava s velkýma ušima a očima a dlouhý ocas (Anděra a Gaisler, 2012).

Rod *Apodemus* je skupina drobných hlodavců, kteří dorůstají velikosti okolo 7 až 13 cm. Tento rod obsahuje druhy, které mají více či méně noční aktivitu. Jejich ocas je obvykle dvoubarevný, na vrchní straně tmavší než na spodní, a je tvořen zrohovatělou pokožkou v podobě ocasních kroužků. Na rozdíl od jiných hlodavců se myšicím kůže z ocasu snadno stáhne jako únikový mechanismus při napadení predátorem. Část ocasu, která zůstane odkrytá, zaschne, odlomí se a již nedoroste. Je to jeden z příkladů autotomie (Iwasa a Hasegawa, 2022).

Morfologické znaky jednotlivých druhů jsou velmi podobné; někteří juvenilní jedinci jednoho druhu mohou vypadat jako dospělci jiného, a navíc často využívají podobné biotopy, což komplikuje jejich určování. Mnohdy je možné spolehlivě určit druh pouze pomocí kombinace mnoha metrických a morfologických znaků lebky, ale ani tato metoda není dokonalá. Determinace myšic je často navíc ztížena kvůli značné variabilitě v biometrických znacích, které bývají ovlivněny geografickým výskytem, věkem a výběrem stanoviště (Anděra a Gaisler, 2012).

1.1.2 Myšice na území České republiky

Na území našeho státu se vyskytují čtyři druhy myšic rodu *Apodemus*, a to: *Apodemus sylvaticus* Linnaeus, 1758, *Apodemus agrarius* Pallas, 1779, *Apodemus uralensis* Pallas, 1811 a *Apodemus flavicollis* Melchior, 1834. Myšice obývají v různém druhovém zastoupení celé území republiky a obývají jak nížinné, tak výšinné krajiny. Kvůli velmi obtížné determinaci tří z těchto druhů (*A. sylvaticus*, *flavicollis* a *uralensis*), které patří do podrodu *Sylvaemus*, je někteří autoři uvádějí pouze jako *Apodemus* sp. (Anděra, 2002).

Apodemus agrarius je jediným evropským druhem který, řadíme do podrodu *Apodemus* (Anděra a Gaisler, 2012).

***Apodemus agrarius* (Pallas, 1771)**

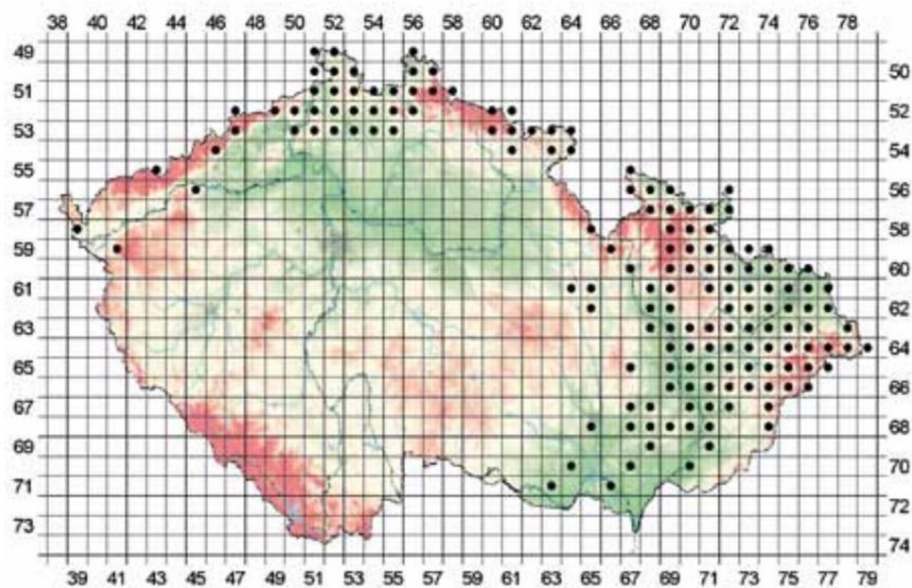
Myšice temnopásá je jednoznačně nejjednodušeji rozpoznatelný druh ze všech čtyř myšic obývajících naše území. Jak už její název napovídá, jako jediná má na hřbetě tmavý, okolo 2-3 mm silný pruh, který se táhne od hlavy až k ocasu. Tento znak má společný s myšivkou horskou (*Sicista betulina* Pallas, 1779), oproti které je však myšice temnopásá větší, má kratší ocas. Vyskytuje se hlavně v polních kulturách v nižších nadmořských výškách, nejčastěji okolo 200-400 m n. m. Myšivka horská je u nás vzácná, jedná se o zvláště chráněný druh v kategorii silně ohrožený (zákon č. 114/1992 Sb., vyhláška č. 395/1992 Sb.). Je vázaná na horské biotopy a pod 450 m n.m. se vyskytuje výjimečně (Anděra a Horáček, 2005).



Obrázek 1 Myšice temnopásá vs. myšivka horská (Převzato z: BioLib.cz a Biogeografie MUNI)

Myšice temnopásá se u nás nachází v severní a severovýchodní části Čech, na Moravě a ve Slezsku. V poslední dekádě 20. století bylo zaznamenáno rozšíření jejího areálu výskytu na jih Moravy o více než 100 km, čehož důvodem mohly být i rozsáhlé povodně v jejím původním areálu. Nepravidelně se rovněž vyskytuje i v jiných částech Čech. Celkový areál rozšíření je obrovský a rozdělený do dvou izolovaných oblastí, ve východní Asii, a pak od střední Asie po střední Evropu. Jejím šíření do nitra Evropy brání široké horské oblasti karpatského a hercynského systému (Anděra a Horáček, 2005).

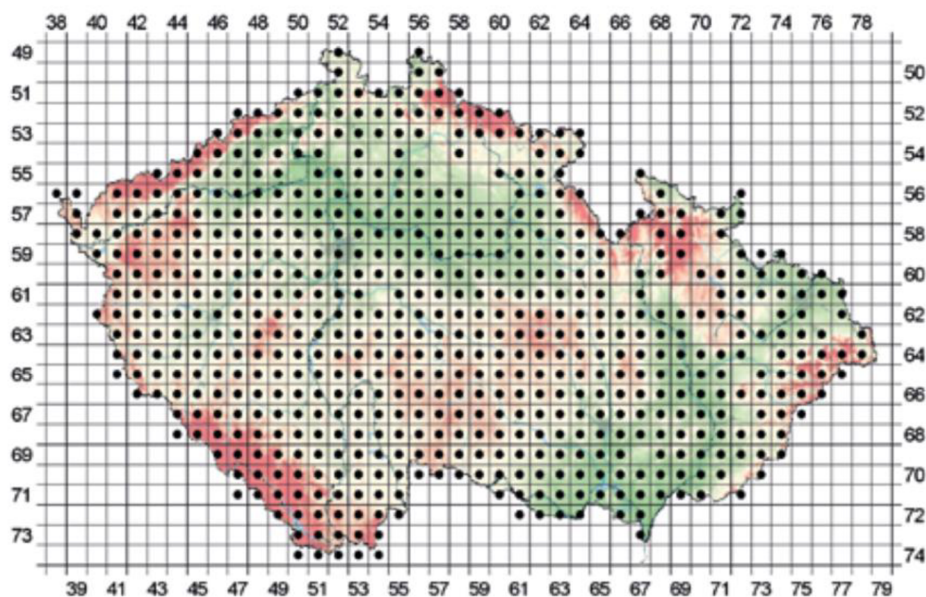
Obývá otevřené krajiny s bujnou vegetací, vyhledává především vlhčí prostředí. Je poměrně přizpůsobivá, ale hustějším lesům se vyhýbá. Po stromech a keřích na rozdíl od některých jiných myšic nešplhá. Samci jsou mnohem aktivnější, dochází mezi nimi k soubojům často vedoucím i ke zraněním. Samice mají oproti ostatním druhům myšic 4 páry bradavek (Aulagnier et al., 2018).



Obrázek 2 Mapa rozšíření myšice temnopásé (*Apodemus agrarius*) v ČR v letech 1950-2011 (Anděra, 2011)

***Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758)**

Myšice křovinná patří k nejběžnějším drobným savcům České republiky. Je velká 75-110 mm, s ocasem obvykle kratším než její tělo. Zbarvená bývá na hřbetu do hněda či světle rezava s neostrým přechodem na bílé až šedivé břicho. Na krku může mít menší žlutou skvrnu (Anděra a Horáček, 2005). Myšice křovinná má u nás největší areál rozšíření, v roce 2011 byla nalezena na 92,6 % České republiky v nadmořské výšce od 140 do 1 500 m n. m. s nejčastějším výskytem v oblastech okolo 400 m n. m. (Anděra, 2011). Kromě České republiky obývá téměř celou Evropu, s výjimkou Skandinávie a Finska, dále severozápadní Afriku a Asii až do Číny. Myšice křovinná obývá široké množství biotopů; i přes to, že upřednostňuje otevřenou krajinu, ji najdeme na nejrůznějších stanovištích od lesů přes zemědělskou krajinu až po urbánní zástavby. Přes zimu často hromadně hnízdí v obytných nebo hospodářských budovách. Je rovněž pionýrský druh, tudíž často osídluje rekultivovaná, dříve například průmyslem zdevastovaná území. Její hnízdo bývá ukryto na povrchu i pod zemí, na stromy šplhá méně často než jiné příbuzné druhy. Při odchycích bývá pozorován vychýlený poměr pohlaví, častěji jsou chyceni samci, jelikož jsou opět aktivnější než samice, především v období rozmnožování (Baláž, Ambros a Tulis, 2012).

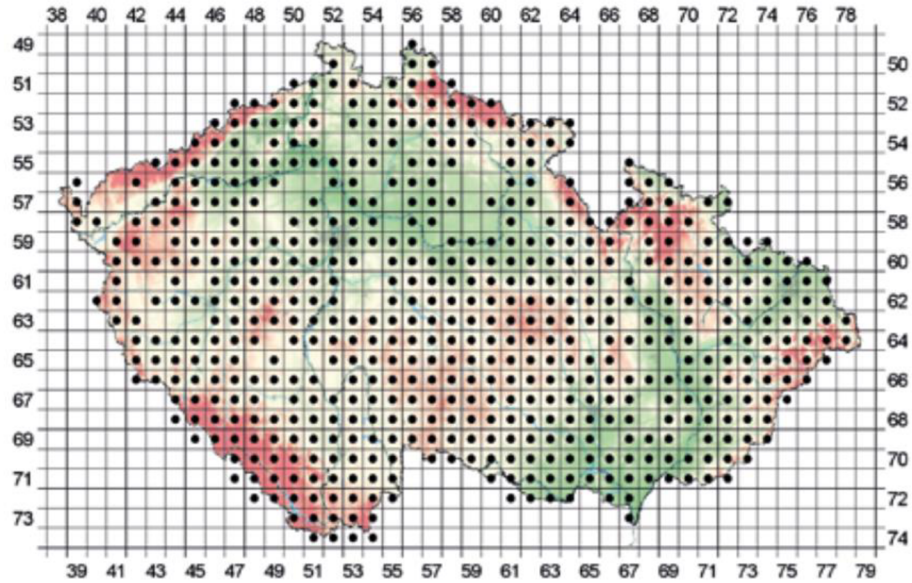


Obrázek 3 Mapa rozšíření myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) v ČR v letech 1950-2011 (Anděra, 2011)

***Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834)**

Myšice lesní je od myšice křovinné velmi špatně rozpoznatelná, nicméně předpokládá se, že u nás rovněž obývá téměř celé území (86,6 %). Nejčastěji se vyskytuje v nadmořské výšce 400-600 m n. m., nejvýše ji nalezneme v Krkonoších nebo Hrubém Jeseníku (Anděra, 2011). Myšice lesní tedy vypadá jako myšice křovinná, avšak dorůstá větších rozměrů a žlutá skvrna na hrdle bývá přítomná u všech jedinců, tato skvrna je výraznější a zasahuje na přední končetiny – z toho vyplývá její dřívější název; myšice žlutohrdlá. S jistotou však můžeme morfometricky určit pouze dospělé samce, kteří mají délku zadního chodidla nad 24 mm. Dospělí jedinci bývají také o něco výrazněji zbarvení, ryšavá až kaštanová barva hřbetu je ostře oddělena od bílého břicha.

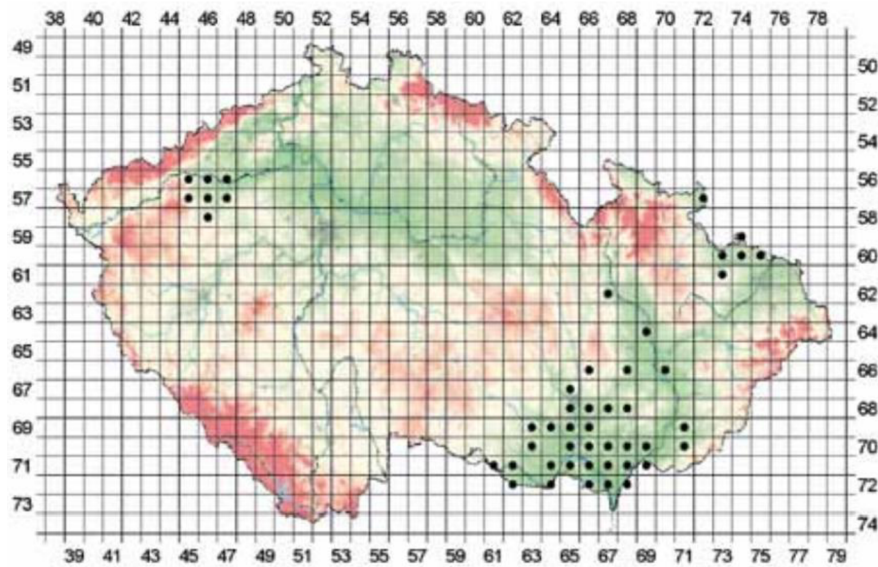
Myšice lesní je rozšířená téměř v celé Evropě, na rozdíl od myšice křovinné ji můžeme najít i v jižní Skandinávii, ale nežije v Africe. Preferuje listnaté a smíšené lesy, ale obývá například i sady a v zimě obytné a hospodářské budovy. Její hnízdo najdeme uvnitř nebo okolo stromů, pod kameny nebo v norách hrabošů a krtků. Díky velmi dobře vyvinutým motorickým schopnostem se může pohybovat i v korunách stromů. Myšice lesní je výhradně noční zvíře (Aulagnier et al., 2018). V zimě nespí, ale tuhé mrazy přečkává ve stavu strnulosti. Časté jsou pro ni výrazné meziroční populační výkyvy (Anděra a Sovák, 2005), v obdobích vysokých populačních hustot jsou jedinci sami schopni zastavit reprodukci.



Obrázek 4 Mapa rozšíření myšice lesní (*Apodemus flavicollis*) v ČR v letech 1950-2011 (Anděra, 2011)

***Apodemus uralensis* (Pallas, 1811)**

Původně stepní druh *Apodemus uralensis*, dříve také *Apodemus microps*, má v českém jazyce název myšice malooká. Ze zkoumaných druhů je pro naše území nejnovější, byla u nás zaznamenána až v roce 1952 a je zde nejméně prozkoumaným druhem rodu *Apodemus*. Je menší než ostatní druhy, menší má i oči, uši, a její chodidla jsou krátké. Ocas má dvoubarevný a kratší než tělo. Vzhledem je velmi podobná juvenilním myšicím křovinným. Obývá především nezalesněnou krajinu, méně pak i okraje vodních toků, louky, paseky a další. Podle vzhledu uší, očí a krátkých chlupů na čenichu se předpokládá, že značnou část života stráví v norách (Anděra a Horáček, 2005). Dle předchozího mapování se myšice malooká vyskytuje pouze na necelých 8 % našeho území s velmi úzkým rozpětím nadmořských výšek přibližně okolo 160-400 m n. m. Nicméně, tento druh myšice je od myšice křovinné a lesní velmi obtížně rozeznatelný, což může vést ke zkreslení výsledků. Její výskyt byl doposud zaznamenán ve třech oblastech; na jižní Moravě a Slezsku a na Žatecku, ne výše než ve 400 m n. m. Kromě naší země obývá Slovensko, Polsko, Ukrajinu a její areál pokračuje až na jihovýchod, kde je hranice rozšíření nejasná a je možné, že zasahuje až do Číny a Mongolska (Anděra, 2011).



Obrázek 5 Mapa rozšíření myšice malooké (*Apodemus uralensis*) v ČR v letech 1950-2011 (Anděra, 2011)

1.1.3 Zástupci rodu *Apodemus* jako škodlivé organismy

Vzhledem k tomu, že hlodavci tvoří téměř polovinu všech savčích druhů a jsou rozšířeni téměř na všech místech světa, není překvapivé, že často interagují s člověkem. Mnoho druhů jsou významnými škůdci a způsobují ohromné škody především na obilninách (Heroldová a Tkadlec, 2007). Zároveň jsou rezervoáry nejrůznějších zoonotických onemocnění, tedy chorob přenášených ze zvířat na člověka (Balážová, 2021).

Choroby přenášené hlodavci bývají nejčastěji původu bakteriálního, virového nebo to mohou být parazitičtí prvoci a helminti. Tyto nemoci bývají různě rizikové, některé mívají mírné příznaky, některé jsou zdraví ohrožující či dokonce smrtelné. Mohou být na člověka přenášeny přímým kontaktem s patogenem ve vzduchu či v moči a fekáliích, konzumací kontaminovaného jídla a vody, nebo skrze bezobratlé vektory. Patogeny přenášené hlodavci na člověka jsou jedním z hlavních zdrojů vypuknutí nových nálezů a více než jedna miliarda případů onemocnění ve světě je zapříčiněna právě zoonózami (Han et al., 2015).

Rezervoár nemocí

U myšic byl dosud prokázán výskyt nejrůznějších patogenů, které mohou být přeneseny na člověka, zde jich několik bude zmíněno. Známou chorobou, která se vyskytuje v lidské populaci a jejímž rezervoárem mohou být myšice, je lymfská borelióza. Lymfskou boreliózu způsobuje alespoň deset druhů bakterie z druhového komplexu *Borrelia burgdorferi* (sensu lato), z nichž tři jsou patogenní pro člověka. V Evropě nejčastěji

přenášejí hlodavci (včetně myšic) dva druhy těchto bakterií (*Borrelia afzelii*, *B. garinii*) způsobujících lymskou boreliózu a jejich hlavním vektorem je klíště *Ixodes ricinus*. Výskyt *Borrelie burgdorferi* byl u myšic potvrzen v Evropě několikrát (Hovmark et al., 1988, Humair, Rais, Gern, 1998, Huegli et al., 2005, Burri et al., 2014, Balážová et al., 2021).

Mezi další bakteriální patogeny, které byly u myšic prokázány, patří například *Anaplasma phagocytophilum* (Rickettsiales) způsobující granulocytickou anaplazmózu, kterou na člověka či jiná zvířata přenáší rovněž klíšťa, a také bakterie rodu *Bartonella* (Rhizobiales), které mohou způsobit i akutní chronická onemocnění a jsou přenášeny hemofágními bezobratlými jako jsou koutule, vši a blechy (Angelakis a Raoult, 2014). Kromě bakterií s bezobratlými vektory mají myšice i takové, které jsou přenášeny přímo. Například bakterie *Leptospira interrogans* (Spirochaetales) je přenášena na člověka prostřednictvím moči nebo kontaktem s hlodavcem (Trembl, Pejčoch a Holešovská, 2002, Balážová et al., 2021).

Jak bylo výše uvedeno, myšice mohou být rovněž rezervoáry virových onemocnění. Jedním takovým virem, který u myšic můžeme nalézt, je Dobrava-Belgrade virus, který je jedním z několika Orthohantavirů patogenních pro člověka. Z druhů, které se vyskytují u nás, je jejich rezervoárem myšice temnopásá (*A. agrarius*) a myšice lesní (*A. flavicollis*). Tento virus nakazí člověka pouze nezáměrně, pokud vdechne aerosolové částice hlodavčího trusu. Infekce tímto virem mává často mírné projevy, avšak může vyústit až v hemoragickou horečku s renálním syndromem, která bývá i smrtelná (až 12% úmrtnost). Její výskyt byl potvrzen v myšici lesní u nás (Zelená et al., 2019), v polských Karpatech (Kolodziej et al., 2021) i na dalších místech v Evropě (Christova et al., 2014). Orthohantavirů, které všechny mohou způsobit hemoragickou horečku, je u malých hlodavců detekováno hned několik druhů, k těm nejčastějším dále patří Tula virus, který byl v myšicích detekován i u nás na Moravě u myšice lesní (Zelená et al., 2019), myšice křovinné (*A. sylvaticus*) a údajně i myšice malooké (*A. uralensis*) (Heroldová et al., 2010). Dalšími častými jsou viry Seewis a Puumala. Z toho Dobrava-Belgrade a Puumala viry byly detekovány i u pacientů v České republice (Zelená et al., 2019).

Kromě těchto virů je v myšicích přítomný také virus způsobující klíšťovou encefalitidu. Klíšťa virus získají krmením na nakaženém zvířeti, kterým jsou nejčastěji malí hlodavci, nebo společným krmením na neinfikovaném zvířeti s klíšťaty, která už virus v sobě mají. Malí hlodavci, ke kterým patří i *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*, jsou primárními hostiteli larev a v menší míře i nymf klíšťat. Tyto myšice například oproti normíkům rudým

(*Myodes glareolus*) poskytují klíšťatům vhodnější podmínky a lépe napomáhají šíření při společném krmení (Bakker et al., 2023).

Babezióza je onemocnění způsobené prvoky rodu *Babesia*, kteří jsou přenášeni klíšťaty. Nákaza může být bezpříznaková, jako tomu většinou bývá v Asii a USA, v Evropě však může způsobovat i mírná nespecifická onemocnění, podle toho, o jakou linii se jedná. Někdy dochází i k závažným nemocem, především u novorozenců. Hlodavci mohou být rezervoáry této infekce, nejčastěji přenáší *Babesia microti* (Meerburg, Singleton a Kijlstra, 2008). U nás jsou potvrzeny *B. microti* a *B. venatorum*, ve výzkumné lokalitě Salaš v pohoří Chříby byla *Babesia* zaznamenána u patnácti jedinců *Apodemus* spp. (Balážová, 2019).

Mezihostitel parazitů

Myšice ve svém těle mohou mít velké množství parazitů, kteří mohou a nemusejí být nebezpeční pro člověka. Jedním z významných parazitů, které myšice přechovávají, je *Toxoplasma gondii* (Coccidia, Apicomplexa). *Toxoplasma* je obligátní nitrobuněčný parazit významný jak medicínsky, tak veterinárně (Owen a Trees, 1997). Způsobuje nemoc toxoplazmózu, kterou je odhadem nakaženo až 30 % celosvětové populace. Příznaky toxoplazmózy jsou většinou velmi mírné, ale u lidí se slabší imunitou může způsobovat i závažné onemocnění vedoucí k jiným zdravotním komplikacím. Rovněž je nakažení toxoplazmózou nebezpečné pro těhotné ženy, jelikož infekce může být předána skrz placentu a může způsobit patologické změny na plodu. Nejčastěji se lidé nakazí konzumací neuvařeného vepřového masa, ale způsobů nákazy je mnoho (Ivovic, Potusek a Buzan, 2019). *Toxoplasma* má složitý životní cyklus, pro který kromě definitivního hostitele potřebuje i mezihostitele, kterým může být jakékoliv teplokrevné zvíře. Častým mezihostitelem bývají malí hlodavci, včetně myšic (Thomasson et al., 2011), kteří pak mohou být sežráni kočkou, tedy definitivním hostitelem toxoplasmy (Meerburg, Singleton a Kijlstra, 2008). Ve střevech kočkovitých šelem se toxoplasma sexuálně rozmnožuje (Berenreiterová et al., 2011) a prostřednictvím oocyst ve výkalech se dál šíří (Meerburg, Singleton a Kijlstra, 2008). Jak již bylo dříve řečeno, příznaky nakažení u člověka bývají spíše latentní, ale bylo zjištěno, že toxoplasma ovlivňuje chování a osobnost člověka; například zpomaluje reakční čas, což dále vede k zvýšené pravděpodobnosti dopravních nehod. Také u mužů zvyšuje koncentraci testosteronu (Flegr, 2013). V České republice byla toxoplasma nalezena i u myšic a zároveň bylo zjištěno, že je častější u savců vyskytujících se v blízkosti lidských obydlí (Hejlíček, Literák a Nezval, 1997), mezi které myšice patří.

Dalším parazitem, který byl detekován u myšic a napadá epiteliální buňky v trávicím traktu a dýchací soustavě obratlovců, je *Cryptosporidium* (Coccidia, Apicomplexa). V Evropě bývají myšice infikovány často čtyřmi druhy nebo genotypy *Cryptosporidia* (*C. apodemi*, *C. ditrichi*, *Cryptosporidium Apodemus* genotyp I and *Cryptosporidium Apodemus* genotyp II) a výjimečně ještě čtyřmi dalšími (Čondlová et al., 2019). *Cryptosporidium* způsobuje u lidí nemoc kryptosporidiózu, která je zodpovědná za gastroenteritidu, abdominální bolesti a průjem. Primárně se přenáší konzumací fekáliemi kontaminovaných potravin nebo vody, které obsahují oocysty parazita (Gerace, Lo Presti a Biondo, 2019).

Škůdce v hospodářství a lesnictví

Malí hlodavci bývají v zemědělském prostředí významnými škůdci nejrůznějších plodin, především obilovin (Heroldová a Tkadlec, 2011). Myšice jsou převážně semenožravé, většinu jejich stravy tedy tvoří semena a dále také ovoce, zelené části rostlin, ale i hmyz (Angelstam, Hansson a Perhsson, 1987, Baláž, Ambros a Tulis, 2012). Na jižní Moravě bylo zjištěno, že 68 % škůdců obilných plodin tvoří kryptické druhy myšic rodu *Apodemus* a každý z nich má jiný způsob sběru zrn (Heroldová et al., 2007). Dle této studie dokonce největší část hlodavců v této oblasti tvořila *Apodemus uralensis* (46 %), bohužel však neobsahuje informaci o způsobu determinace konkrétních druhů.

V České republice škodí myšice také na cukrové řepě, jejíž pěstební plocha se pohybuje okolo 50 tisíc hektarů. Myšice jsou častými obyvateli řepných polí, většinou zde škody nepůsobí, nicméně při přemnožení zde hledají obživu v podobě semen řepy (Heroldová a Suchomel, 2016).

Myšice páchají škody nejen v zemědělské krajině, ale také v lesích. Jakožto běžní obyvatelé lesních habitatů jsou zde významnými konzumenty semen dřevin a semenáčků. Myšice lesní (*A. flavicollis*) je nejčastějším obyvatelem lužních lesů a nejlépe zpracovává větší semena. Myšice křovinná (*A. sylvaticus*) se v lužních lesích vyskytuje také často, ale není tak úspěšná. Myšice mají významný vliv na úbytek produkce semen a při vysokých populačních hustotách ovlivňují obnovu dřevin (převážně dubů) v lužních lesích (Suchomel, 2007).

1.2. Determinace druhů myšic r. *Apodemus*

Druhy podrodu *Sylvaemus* díky podobným nárokům na prostředí žijí často sympatricky, v některých oblastech i syntopicky. Jak již bylo dříve zmiňováno, z důvodu velké fenotypové podobnosti druhů a překryvu znaků, je velmi obtížné přesné určování jedinců podle morfologických znaků (Michaux et al., 2001). Fylogenetická a morfologická podobnost těchto druhů je přikládána velmi rychlému evolučnímu vzniku několika druhů z jednoho původního asijského předka (Jojíc et al., 2013). Navíc kvalitativní znaky nejsou měřitelné, tudíž jsou často hodnoceny subjektivně. Je tedy zřejmé, že je nutné kromě determinace podle pozorovatelných morfologických znaků využít i jiné metody.

Morfologie a morfometrie

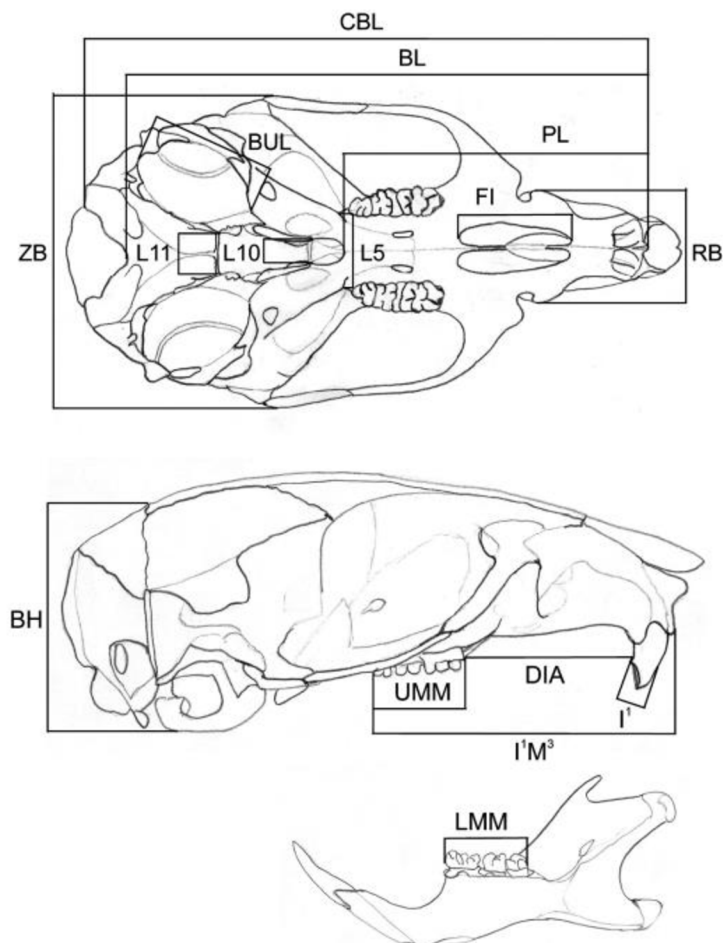
Pro určování v terénu pomocí morfologických znaků je možné použít biometrickou metodu s odlovem živých zvířat (Bartolommei et al., 2016). Tato metoda vyžaduje změření délky zadního chodidla zvířete a jeho zvážení. Pomocí těchto dvou znaků je možné rozlišit myšici lesní (*A. flavicollis*) od myšice křovinné (*A. sylvaticus*). Tato metoda je relativně spolehlivá, ale především kvůli sezónní proměnlivosti těchto znaků není stoprocentní ani zobecnitelná.

Další z metod, kterou lze pro přesnější určování využít, je morfometrie lebky a chrupu (Todorović et al., 1971, Đulić and Tvrtković, 1974, Kryštufek and Janžekovič, 2005, Frynta et al., 2006, Çolak et al., 2007, Barčiová and Macholán, 2009). Klíč (obr. 2) k rozlišení myšice lesní a křovinné na našem území podle kraniálních a dentálních rozměrů vytvořili Barčiová a Macholán (2009), nicméně ačkoliv je tato metoda velmi přesná (98,3% úspěšnost), není univerzálně použitelná. Jedním z důvodů je geografická variabilita v rámci těchto druhů. Na různých stanovištích mohou mít jedinci různou velikost a vzhledem k omezenému výzkumnému areálu v této studii je pravděpodobné, že v jiných oblastech budou u stanovených hodnot odchylky. Druhým důvodem je také neaplikovatelnost metody na juvenilní jedince, jelikož metoda počítá s plně vyvinutými třetími moláry na vrchním patře. Morfometrickými metodami byl zjištěn jeden nevariabilní determinační znak, a to, že u všech evropských populací mají dospělí jedinci *A. sylvaticus* delší *foramen incisivum* než dospělí jedinci *A. flavicollis* (Niethammer, 1969). I přes nevariabilitu tohoto znaku nelze pouze na základě jediného parametru spolehlivě druh určit ve všech případech.

Kromě rozměrů zubů a lebky může být porovnáván i jejich tvar (Janžekovič a Kryštufek, 2004, Frynta et al., 2006), který je u obou druhů odlišný. Tato metoda je

přesnější, nicméně i přesto není platná ve všech případech a je nutné mít referenční skupinu jedinců, kteří byli určeni jak morfologicky, tak molekulárně, abychom si mohli být určením jisti.

Všeobecně jsou metody, při kterých porovnáváme pozorovatelné a měřitelné znaky, nedokonalé kvůli intraspecifické variabilitě; i hodnoty stanovené při měření se často překrývají a nelze využít pouze jednu jako identifikační kritérium (Bugarski-Stanojević, 2013). Někteří autoři také upozorňují, že bez genetického testování jejich metoda nemůže mít 100% úspěšnost (Bartolommei et al., 2016), případně pokud má být úspěšnost 100 %, je k tomu nutné využít velké množství různých morfometrických parametrů (Reutter et al., 1999).



Obrázek 6 Kranální rozměry (Barčiová a Macholán, 2009)

Biochemická a molekulární determinace

Pro spolehlivější určení druhů je vedle morfologické determinace zapotřebí využít analýzu na úrovni buněk či genů. Pro rozlišení druhů bylo již vyzkoušeno množství postupů, které využívají nejrůznější cytologické a genetické přístupy. Jednou z metod, kterou lze k determinaci využít, je chromozomální proužkování – Q/C banding, což je barvení chromozomů quinakrinem a Giemsovým barvivem, díky němuž lze najít rozdíly v karyotypech *A. sylvaticus* a *A. flavicollis*. Jejich karyotypy jsou si rovněž velmi podobné, avšak podle současných poznatků je rozdíl mezi těmito druhy v množství a distribuci heterochromatinu na chromozomech a množství přítomných B-chromozomů (Filippucci et al., 1998, Bugarski-Stanojević et al., 2008; Gornung et al., 2009).

Dalším způsobem rozlišení druhů je proteinová elektroforéza, jejíž výsledky korespondují s morfologickými znaky jednotlivých druhů a pomáhají objasnit fylogenetické vztahy v rámci rodu *Apodemus* (Britton-Davidian et al., 1991; Orlov et al., 1996; Filippucci et al., 2002).

K rozlišení druhů myšic rodu *Apodemus* bylo dále využito sekvenování cytochromu b mitochondriální DNA (Michaux et al., 1998, 2001, 2002; Bellinvia, 2004, Liu et al., 2004), ke kterému je potřebný pouze malý vzorek mtDNA, který lze získat z fragmentu ucha či ocasu; tudíž je možné využít k testování živá zvířata, nebo muzejní vzorky.

V České republice dosud nebyla provedena studie, která by se věnovala molekulární determinaci všech třech kryptických druhů, které žijí na našem území. Ze zahraničí máme studie, které se molekulární determinaci věnují, ty se však zabývají většinou rozlišováním pouze například *A. sylvaticus* a *A. flavicollis* (Jojic et al., 2013) nebo se věnují většímu množství druhů v rámci například fylogenetického výzkumu (Liu et al., 2004, Bugarski-Stanojević et al., 2011), kdy jsou využívány složitější metody. Všechny zmíněné metody jsou efektivní a replikovatelné, avšak nelze je využívat na pravidelné bázi. Většina těchto metod je buď finančně náročná (např. sekvenace), nebo zdlouhavá. Metoda, která by jednoduše a efektivně pomocí molekulárních determinant rozlišila všechny tři fenotypově velmi podobné druhy, které na našem území žijí, doposud vytvořena nebyla.

1.3. Metoda PCR

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction) je nejvyužívanější metodou moderní molekulární biologie, která umožňuje amplifikaci (znásobení) celých genů nebo jejich úseků. K jejich amplifikaci je potřeba primerů, tedy řetězců oligonukleotidů, které svou skladbou komplementují specifickému úseku amplifikované DNA (Lorenz, 2012). Pro reakci je dále potřeba Taq polymerázy, která byla původně izolována z bakterie *Thermus aquaticus*. Tato bakterie žije ve velmi vysokých teplotách a odolává denaturaci (Gelfand, 1998). Reakce probíhá v termocykleru, kde nejprve dochází k denaturaci – rozvolnění DNA, poté k nasedání primerů (anglicky: annealing) na vlákno DNA, a nakonec probíhá syntéza nových řetězců (Schochetman, Ou a Jones, 1988). Produkty PCR jsou pak dále využívány k nejrůznějším účelům, například ve výzkumu rakoviny (Bernard a Wittwer, 2003) nebo k identifikaci patogenů (Balážová, 2021).

Jejich další využití však závisí na kvalitě výsledného PCR produktu, dokonalý produkt je znásobená přesná kopie původního vzorku DNA. Tato metoda však není dokonalá, někdy dochází ke vzniku umělých molekul v důsledku mutací nebo nechtěných reakcí. Je to standardní vlastností Taq polymerázy, i přesto jsou však enzymy používány při PCR vysoce přesné. Konkrétně při použití Taq polymerázy dochází k chybě přibližně pouze při jednom z šesti tisíc nukleotidů; a to je považována za polymerázu s nízkou přesností (Potapov a Ong, 2017).

PCR metoda je jednoduchá na pochopení i provedení a zprostředkovává rychlé výsledky (Garibyan a Avashia, 2013). Pro reakci je také potřeba velmi malé množství DNA, tudíž lze získaný vzorek i ředit a využít víckrát (Taberlet et al., 1993).

PCR metod je hned několik typů. Metoda PCR, která bude použita a optimalizována v této práci, se nazývá end-point PCR a jedná se o klasický typ této metody. Dochází při ní k replikaci maximálního počtu kopií purifikované DNA. DNA se amplifikuje v thermocykleru a poté je analyzována pomocí agarového gelu. V gelu se oddělují fragmenty DNA v médiu upraveném pomocí PCR podle jejich velikosti. Menší fragmenty se posunují v gelu dále a výsledné produkty ve formě různě dlouhých proužků se nazývají amplikony. Jejich délku díky barvivu, které se na DNA váže, můžeme prostřednictvím UV světla porovnávat. Při této metodě tedy zjistíme, zda se v dané DNA vyskytuje zkoumaný úsek. Žádné další informace nám neposkytne, narozdíl od jiných metod, jako je například kvantitativní PCR (qPCR), při které můžeme změřit původní množství DNA ve vzorku a při

použití interkalačních barev (např Sybr Green) odlišit produkty na základě jejich teploty tání. Dalšími typy jsou například reverse-transcriptase PCR (RT PCR) pro analýzu RNA, nebo Multiplex PCR využívající více sad primerů a amplifikující více specifických produktů naráz. Každá z těchto metod se využívá k jiným účelům (QIAGEN, b.d.). Dle výrobců prostředků k realizaci PCR je end-point PCR nejméně přesná s nižší citlivostí, ale finančně nejméně náročná, jednoduchá na plánování i provedení (Thermo Fisher Scientific, b.d.).

Jako vhodná genová sekvence u savců se v posledních letech ukázal cytochrom b, vzhledem ke své vysoké interspecifické variabilitě (Naidu et al., 2021). Jedná se o protein nacházející se v mitochondriální DNA, který obsahuje největší množství informací specifických pro daný druh, a tedy pomáhá identifikovat vztahy mezi příbuznými organismy (Castresana, 2001).

1.4. Využití metody ve vědě

Pokud chceme vytvořit mapu výskytu nějakého druhu, je nejprve nutné s přesností druh rozeznat. Z předchozího textu vyplývá, že mapování výskytu jednotlivých kryptických druhů myšic v oblastech, kde žijí sympatricky, je velmi komplikované. V současné době existuje mapa rozšíření hlodavců na území České republiky (Anděra, 2011), která shrnuje všechny nálezy hlodavců z předchozích studií a obsahuje i záznamy z pozorování vědců i laiků. Kromě toho, že mapa už je poměrně zastaralá, je řada zdrojů v ní rovněž velmi starých, některé jsou datovány až do padesátých let dvacátého století. Můžeme tedy odhadovat, že molekulární determinace myšic u většiny záznamů neproběhla. Jediným zdrojem, který se zde zabýval přímo myšicemi, je studie Macholána a Garčiové (2008), která zde byla zmíněna v kapitole o morfometrické determinaci. Je tedy zřejmé, že kromě nálezů získaných extenzivním morfometrickým měřením není kvůli obtížnosti určení druhů, a tudíž snadné záměny, mapovaný výskyt bezchybný a spolehlivý.

Aby bylo možné identifikovat rezervoáry a přenašeče patogenů a například vytvořit efektivní ochranu před jejich šířením, je nejprve nutné determinovat jejich druhovou příslušnost. Studie z roku 2021 (Balážová) zabývající se zoonotickými patogeny drobných hlodavců ve výzkumné oblasti Salaš zaznamenala nejvyšší počet jedinců kryptických druhů myšic *Apodemus spp.* U těchto jedinců byly nalezeny všechny zoonotické patogeny, které studie zkoumala. Je tedy známo, že myšice rodu *Apodemus*; podrodu *Sylvaemus*, uchovávají velké množství patogenů, bohužel však zatím nelze přiřadit konkrétní patogeny konkrétnímu druhu.

Ani při epidemiologickém výzkumu není determinace druhů hlavní náplní práce, nýbrž pomocným ukazatelem. Proto by měla být jednoduchá, spolehlivá a finančně nenáročná. Pro identifikaci parazitů a patogenů se také využívá metoda PCR a qPCR (Balážová, 2021), což znamená, že DNA odchycených vzorků se při tomto výzkumu musí izolovat v každém případě. Proto je tato determinační metoda výhodná, jelikož přidává při výzkumu pouze pár kroků navíc.

Metoda PCR využívající sekvenci cytochromu b je jednoduchou molekulární metodou, prostřednictvím které lze otestovat velké množství vzorků s téměř stoprocentní úspěšností. Vzorku DNA, který je pro testování potřebný, postačí velmi malé množství a je možné jej získat bez usmrcení zvířete. U této metody není tak vysoká finanční ani časová zátěž jako v případě například sekvenace či morfometrie, tudíž je vhodná k druhovému mapování areálu (Branicki, Kupiec a Pawlowski, 2003).

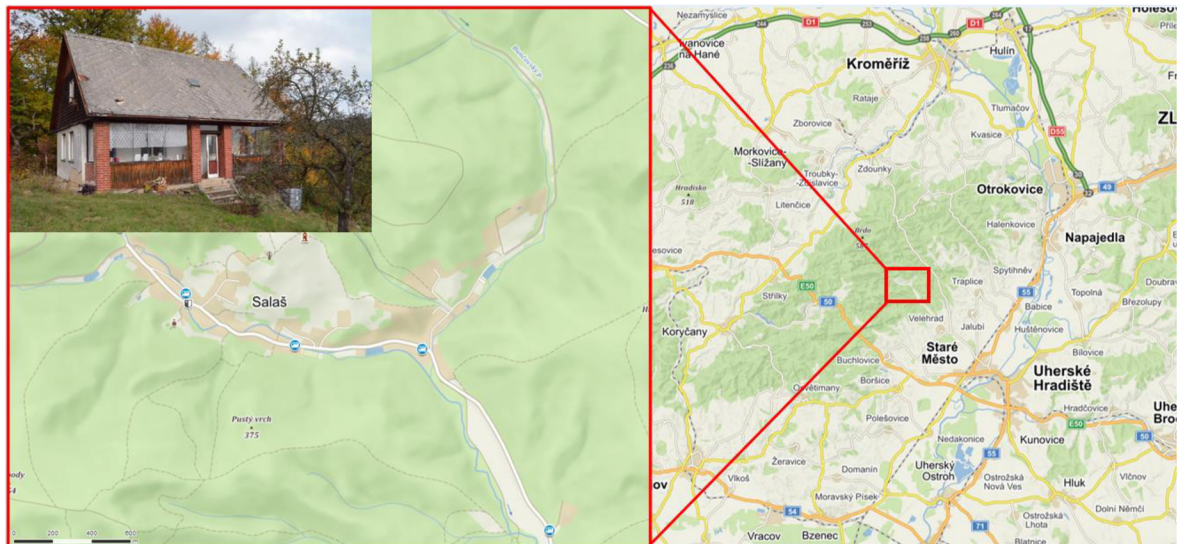
2 CÍL PRÁCE

- 1 Tato práce má za cíl otestovat a optimalizovat PCR metodu k určování kryptických druhů myšic rodu *Apodemus* (*Apodemus flavicollis*, *A. sylvaticus*, *A. uralensis*).
- 2 Metoda bude dále použita v epidemiologické studii z modelové lokality Salaš.

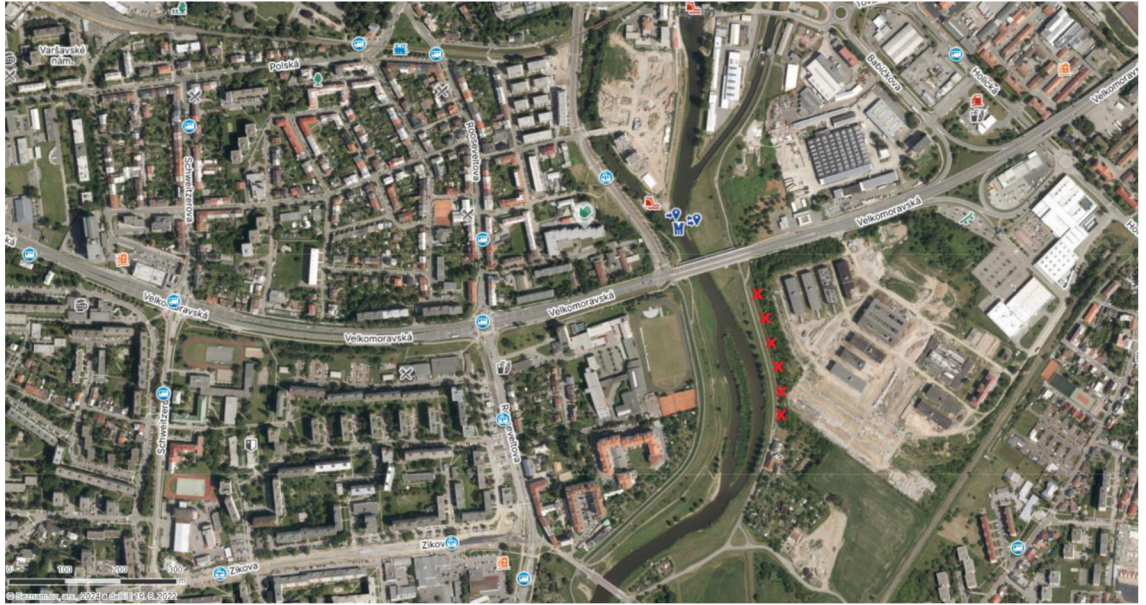
3 MATERIÁL A METODY

3.1 Sběr a zpracování vzorků

Pro tuto práci bylo využito 423 nerozlišených jedinců *Apodemus* spp., kteří byli získáni sběrem kolegů z Veterinární univerzity Brno v letech 2019-2022 na modelové lokalitě u obce Salaš (Zlínský kraj, obr. 7) pro výzkum patogenů vyskytujících se v našich hlodavcích. Dále bylo využito 5 jedinců rodu *Apodemus* získaných vlastním sběrem v Olomouci v rámci předmětu Parazitologie. Všechny vzorky byly získány z jedinců odchycených pomocí natahovacích pastí rozmístěných v předpokládaných habitatech myšic přibližně 5 metrů od sebe. Pasti byly kladeny ve večerních hodinách a sbírány po rozednění. Následně byly jedinci vypitváni a byly jim odebrány velmi malé segmenty (>4 mm) pěti tkání (srdce, ledviny, slezina, sval, plíce) a uchovány v 96% čistém ethanolu na izolaci DNA. Na Salaši byly pasti kladeny ve všech přítomných biotopech – okraje lesa a les, zahrady, rozhraní pole, podél potoků a také v budově; v Olomouci byly pasti kladeny rovněž podél vodního toku (řeka Morava), ale v blízkosti urbánní zástavby (obr. 8).



Obrázek 7 Lokalita sběru Salaš (Poster na Zoologické dny, Balážová et al., 2024)



Obrázek 8 Lokalita sběru Olomouc (Mapy Seznam.cz, vyznačeno křížky)

3.2. Izolace DNA

DNA byla získána z pěti tkání, čtyři orgány (srdce, játra, ledvina, slezina) a jeden kousek svalu, každý kousek měl přibližně 20-25 mg. Izolace DNA proběhla pomocí kitu NucleoSpin Tissue (Macharey-Nagel, Düren, Germany) podle manuálu výrobce. Nakonec bylo přidáno 50 μ l pufru pro eluci čisté DNA. Získaná DNA byla uskladněna při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.3. Molekulární determinace

Pro molekulární determinaci byla využita PCR metoda s kombinací primerů pocházejících ze dvou studií (Gil de Mendonça, 2012, Bugarski-Stanojević et al., 2013). Postup byl poté upraven pro optimální funkčnost (viz níže).

DNA sekvence

K determinaci byly použity sekvence DNA cytochromu b z dříve zmíněných použitých studií.

Master Mix

Pro chemickou reakci byly využity chemikálie firmy Top-Bio (Vestec, Česká republika): 2x koncentrovaný PPP Master Mix, který obsahuje Taq DNA polymerázu a optimalizovaný reakční pufr. Dále obsahuje barvivo a aditiva. Balení, ve kterém je Master Mix dodáván, obsahuje i PCR H_2O .

3.3.1 PCR

Prostředky

- a) Materiál
 - Osmijamkové PCR stripy s víčky
 - zkumavka na reakční směs
 - filtrované špičky (20 µl, 200 µl, 1000 µl)
- b) Chemie
 - PCR voda
 - Master Mix
 - Primery
 - Izolovaná DNA
- c) Technické vybavení
 - PCR box
 - Stojánky na vzorky
 - Chlazené stojánky
 - Centrifuga
 - Vortex
 - thermocycler
 - Pipety (20 µl, 200 µl, 1000 µl)

Postup

Pro PCR determinaci jsme využili již existující metodu, kterou jsme v průběhu studie upravovali podle potřeby. Základní postup však zůstal vždy stejný:

Do 1,5 ml zkumavky byla připravena reakční PCR směs pro daný počet vzorků podle tabulky č. 1 postupným pipetováním jednotlivých chemikálií. Reakční směs byla promíchána ve vortexu a krátce stočena v centrifuze.

Na testování byla připravena jedna zkumavka pro každý vzorek. Do každé zkumavky připravené k PCR bylo napipetováno 20 µl reakční směsi (MasterMix). Poté bylo do všech zkumavek napipetováno 5 µl DNA jednotlivých vzorků. Hotové zkumavky byly pečlivě uzavřeny víčky a stočeny na centrifuze.

Zkumavky byly vloženy do thermocycleru, kde proběhla PCR. Teploty programu využitě při jednotlivých testováních budou uvedeny níže.

Tabulka 1 Poměr chemikálií v reakční směsi, množství použité směsi a DNA pro testování

Chemikálie	Na 1 jamku (μl)
PCR voda	5
PPPM 2×	12,5
Primer F 10μM	1,25
Primer R 10μM	1,25
MasterMix	20
DNA	5

Pilotní testování PCR programu

Při úvodním testování bylo využito všech pět vzorků odchycených v Olomouci, přičemž každý z nich byl testován se třemi MasterMixy; první z nich obsahoval primery pro *A. uralensis*, druhý pro *A. flavicollis* a třetí pro *A. sylvaticus*. V thermocycleru byl nastaven program typu touch down PCR dle dříve zmiňovaných přechozích studií (tabulka 2).

Tabulka 2 Program thermocycleru pro pilotní testování

Krok	Teplota (°C)	Doba trvání	Počet cyklů
Aktivace Taq polymerázy	95	5 min	1x
Denaturace	94	20 sek	1x
Nasedání	60 – 50	30 sek	11x1
Prodloužení	72	1 min	1x
Denaturace	94	20 sek	1x
Nasedání	50	30 sek	29x
Prodloužení	72	10 min	1x

Druhé testování PCR programu

Po pilotním testování bylo potřeba zvýšit teplotu pro redukci nespecificity, k čemuž bylo využito přidání teplotního gradientu do programu thermocycleru. Spodní hranice teplotního gradientu nasedání primerů byla tedy zvýšena na 52 °C a vrchní hranice na 60 °C. Laboratorní postup a poměry chemikálií byly zachovány, použity byly dva ze vzorků myšic z Olomouce. Do thermocycleru bylo do čtyř řádků vloženo dvanáct duplikátů těchto dvou vzorků jak s MasterMixem, který obsahoval primery pro *A. flavicollis*, tak s MasterMixem s primery pro *A. sylvaticus*. V každém řádku byla nastavena jiná teplota nasedání primerů (tabulka 3).

Tabulka 3 Upravený program thermocycleru s teplotním gradientem

Krok	Teplota (°C)	Doba trvání	Počet cyklů
Aktivace Taq polymerázy	95	5 min	1x
Denaturace	94	20 sek	1x
Nasedání	60 – 52	30 sek	11x1
Prodloužení	72	1 min	1x
Denaturace	94	20 sek	1x
Nasedání	52 – 60	30 sek	29x
Prodloužení	72	10 min	1x

Tabulka 3 Teplotní gradient nasedání primerů pro *A. flavicollis* a *A. sylvaticus* u dvou vzorků *Apodemus* spp.

Teplota nasedání (°C)	MM AFlav 1	MM AFlav 2	MM ASyl 1	MM ASyl 2
52				
53				
...				
60				

Třetí testování PCR

Další testování proběhlo pouze s primery pro *A. flavicollis*, kdy bylo postupně otestováno prvních 133 vzorků z výzkumné oblasti Salaš v thermocycleru v programu s teplotou upravenou dle tabulky č. 4 pro optimální nasedání těchto primerů.

Tabulka 4 Program thermocycleru upravený pro optimální nasedání primerů *A. flavicollis*

Krok	Teplota (°C)	Doba trvání	Počet cyklů
Aktivace Taq polymerázy	95	5 min	1x
Denaturace	94	20 sek	1x
Nasedání	60	30 sek	11x1
Prodloužení	72	1 min	1x
Denaturace	94	20 sek	1x
Nasedání	52 – 60	30 sek	29x
Prodloužení	72	10 min	1x

Čtvrté testování

Při dalším testování došlo k optimalizaci teplot pro nasedání primerů *A. sylvaticus*, testovány byly tudíž jen vzorky s těmito primery. Pro optimalizaci byly opět využity vzorky

z Olomouce. Program byl použit stejný jako při přechozích testováních, pouze teplotní gradient nasedání byl zvýšen na 58-70 °C.

Páté testování

Otestováno bylo zbylých 290 vzorků ze Salaše s primery a programem pro *A. flavicollis*, který už byl optimalizován ve třetím testování.

Šesté testování

Vzorky, které při testování s primery na *A. flavicollis* byly determinovány jako jiný druh, byly otestovány s primery pro *A. uralensis* a *A. sylvaticus*. Otestováno bylo 8 vzorků ze sběru na Salaši a 3 vzorky z Olomouce, každý z nich jak s primerem pro *A. flavicollis*, tak *A. sylvaticus*.

3.3.2 Elektroforéza

Prostředky

- a) Materiál
 - Vzorky DNA upravené PCR metodou
 - Filtrované špičky (20 µl)
 - Podložka pro nalévání gelu a hřebeny na tvorbu jamek
 - Varná Erlenmeyerova baňka
- b) Chemie
 - Agaróza
 - Pufr
 - Barvivo
 - Ladder (velikostní marker)
- c) Technické vybavení
 - Nádoba na elektroforézu
 - Mikrovlnná trouba
 - VWR dokumentační systém
 - Pipeta (20 µl)

Postup

Pro vyhodnocení výsledků PCR testování byla využita elektroforéza v 1,5 % agaru, tedy směsi agarózy (1,5 mg) a pufru (TBE, 100 ml). Do agaru bylo přidáno barvivo (10 µg) a byly vytvořeny jamky, do kterých se posléze napipetovalo 5 µl vzorku. V každém gelu byl použit velikostní marker (3 µl), tzv. žebřík, pro určení přibližné délky amplifikované DNA. Elektroforetická separace byla spuštěna při 400 mA, 120 V na 30 minut.

Gely byly po proběhlé elektroforóze fotograficky zdokumentovány v systému VWR GelDoc, fotky uloženy ve formátu tiff a jpg a také v souboru typu sdg, který je výchozím typem souboru pro návazné zpracování výsledků v programu Gel Documentation from VWR.

Sekvenace

1 Purifikace

K sekvenaci byly vybrány PCR produkty nejdříve purifikovány pomocí Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid, Tchaj-wan) dle výrobcem doporučeného standardního protokolu s drobnými úpravami. Eluční činidlo EB bylo před samotnou elucí DNA ohřáto na 60 °C a vzorky byly inkubovány v kolonce po dobu cca 3-5 min. Celkový objem EB byl snížen na 25 µl k zakoncentrování produktu.

2 Zjišťování kvality čistého PCR produktu:

Koncentrace purifikované DNA byla orientačně změřena pomocí spektrofotometru ND-1000 (Nanodrop®). Jako blank bylo použito eluční činidlo EB z purifikačního kitu. Výsledkem byla koncentrace DNA v ng/µl, poměr absorbancí při vlnových délkách 260 a 280, a poměr absorbancí při vlnových délkách 260nm a 230nm. Poměry absorbancí slouží pro kontrolu čistoty DNA. Pro čistou DNA platí, že poměr 260/280 musí být v rozmezí 1,8–2,2, a poměr 260/230 nesmí přesáhnout hodnotu 1,8.

Dle doporučení bylo potřeba purifikovanou DNA naředit, tak aby do sekvenační analýzy vstupovalo 50 ng. Po změření koncentrace byly jednotlivé vzorky zředěny v PCR-grade vodě, tak by bylo dosaženo přibližně této hodnoty.

Do sekvenační analýzy byly přidány primery použité pro PCR, tj. primery pro *A. sylvaticus*, a produkty byly sekvenovány oboustranně, tj. každý vzorek byl odeslán k sekvenaci dvakrát, jednou s forward primerem, a jednou s reverse primerem. Sekvenace byla provedena firmou SEQme (Dobříš, Česká republika) metodou Sangerova sekvenování (StandardSeq).

Sekvenované vzorky (9 vzorků):

Olomouc: 1, 3, 4

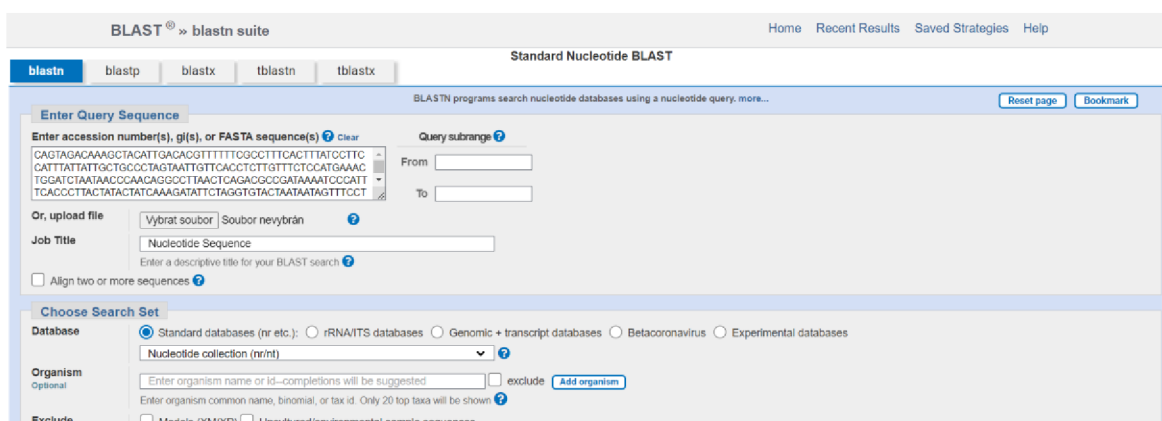
Salaš: 43, 113, 128, 179, 248, 356

3 Úprava sekvencí

Získané sekvence ve formátu .ab1, který obsahuje zápis nukleotidů i záznam chromatogramu, byly individuálně zkontrolovány a část s nejistými sekvencemi byly ručně ořezány, vše ve freeware programu BioEdit. Sekvence z reverse primeru byly převedeny do „reverse complemet“ tak, aby šly alignovat (seřadit) se sekvencemi z forward primeru. Sekvence z forward a reverse primerů pro každý jednotlivý vzorek byly spojeny.

4 Sekvenční identita vzorků

Pro určení míry podobnosti a identifikaci haplotypů jsme vytvořili matici p-distancí. Jednotlivé haplotypy byly srovnány se sekvencemi pomocí nástroje nucleotide BLAST pro určení taxonomické identity a míru shody s již publikovanými sekvencemi. Viz obr. 9.



Obrázek 9 Nástroj BLAST s vloženou sekvencí haplotypu pro porovnání identity.

Námi získaných 9 sekvencí a identifikované 2 haplotypy jsme srovnali se sekvencemi identického úseku příbuzných druhů získaných z databáze GenBank.

3.3.3 Analýza výskytu patogenů u myšic

K analýze prevalence patogenů nalezených u myšic odchycených na Salaši mezi lety 2014-2019 (289 jedinců) posloužily data ze studie Balážové (2021), ve které byly myšice testovány na bakterie rodu *Anaplasma*, *Rickettsia*, *Leptospira*, *Bartonella* a *Borrelia* a prvoky rodu *Babesia*.

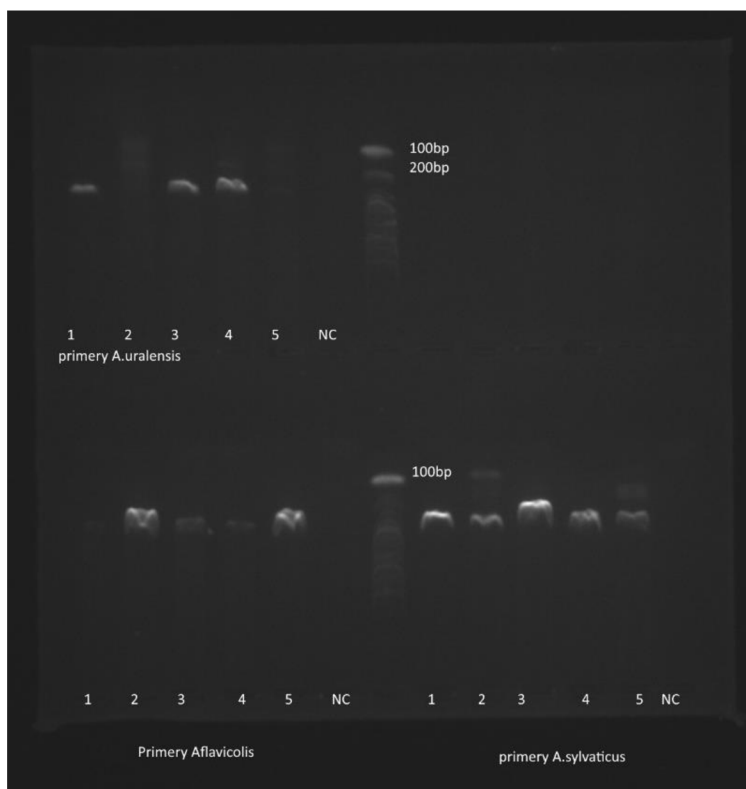
Výsledky testů přítomnosti patogenů byly rozříděny dle příslušnosti k druhům (*A. flavicollis*, *A. sylvaticus*) a statisticky srovnány v programu QP 30.

4 VÝSLEDKY

4.1. PCR testování

4.1.1 Testování dle metody Bugarski-Stanojević a Gil de Mendonça

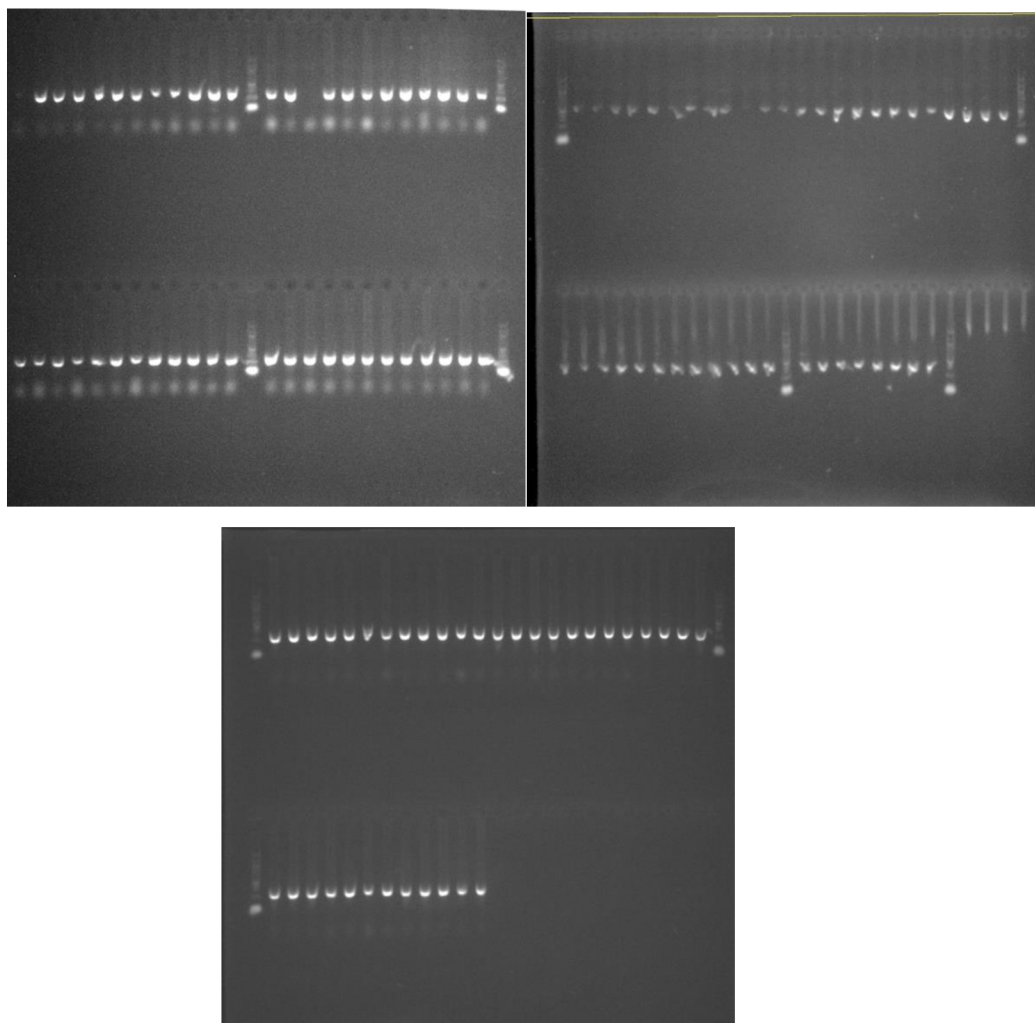
Při úvodním testování bylo využito všech pět vzorků získaných z myšic odchycených v Olomouci a proběhlo podle metod, které byly použity v předchozích studiích (Gil de Mendonça, 2012 a Bugarski-Stanojević, 2013). Vyzkoušeny při nich byly MasterMixy s primery pro *A. uralensis*, *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*. Bylo zjištěno, že teplota nasedání primerů je příliš nízká a primery nasedaly i na nespecifická místa DNA. Proto při vizualizaci pomocí elektroforézy vzorky DNA putovaly k záporné katodě i v případech, kdy se nejednalo o daný druh, pro který byl primer použit. Nevytvářely tudíž vždy zřetelný proužek o správné délce korespondující s PCR produktem specifickým pro daný druh. Na obrázku č. 10 můžeme vidět, že u všech testovaných roztoků vznikly různě silné proužky u různých vzorků DNA, tudíž v tomto okamžiku nebylo možné determinovat, o který druh se jedná a bylo třeba provést úpravu metody.



Obrázek 10 Elektroforéza úvodního testování se vzorky z Olomouce.

4.1.2 Optimalizace teplot pro primery *A. flavicollis*

Prvním krokem pro optimalizaci determinační metody bylo upravení teplot v teplotním gradientu programu thermocycleru při testování vzorků s primery pro *A. flavicollis*. Pro tuto optimalizaci byl využit vzorek z původního testování, který měl u primerů pro *A. flavicollis* nejzřetelnější proužek (vzorek 1), tudíž mohlo být odhadnuto, že se jedná o *A. flavicollis*. Při testování s úpravou teplot bylo zjištěno, že 60 °C je dostatečná teplota, při které se redukuje nespécifita a primery nasedají pouze na místa specifická pro DNA *A. flavicollis*. Jakmile byly optimální teploty nalezeny, byla otestována první sada vzorků ze Salaše oproti těmto primerům. Při vizualizaci vzorků prostřednictvím elektroforézy bylo zjištěno, že tři vzorky z této sady neamplifikují s primery *A. flavicollis* (obr. 11).



Obrázek 11 První elektroforéza s vzorky testovanými s primery pro *A. flavicollis*.

4.1.3 Optimalizace teplot pro primery *A. sylvaticus*

Úprava teplot pro nasedání primerů *A. sylvaticus* na specifická místa proběhla stejným způsobem jako to bylo u primerů *A. flavicollis*; využit byl vzorek nejvíce vypovídající o přítomnosti úseku DNA specifického pro *A. sylvaticus* (vzorek 2). Teplota gradientu byla rovněž zvýšena na 52 °C až 60 °C a zjištěno bylo, že primery *A. flavicollis* rovněž nasedají na daný úsek DNA při teplotě 60 °C, tudíž mohla být tato teplota využita při testování.

4.1.4 Testování primeru pro *A. uralensis*

Při testování metody s primery *A. uralensis* neamplifikoval žádný vzorek a nevytvářel při elektroforéze zřetelný proužek poukazující na přítomnost DNA shodné s DNA *Apodemus uralensis*. Další testování primerů pro *A. uralensis* bylo pozastaveno a je

v plánu v rámci navazující studie, poté co získáme věrohodný vzorek (např. z Národní genetické banky obratlovců).

4.1.5 Finanční prostředky

Master Mix od firmy Top-Bio, který byl v této studii využit, vychází v obsahu 25 x 0,5 ml, který vystačí na 1000 reakcí, na 6 980 Kč, tedy na jednu zkumavku je to 6,98 Kč. Primer, který je do každé reakční směsi přimícháván ve dvou variantách – forward a reverse, vychází na 1,30 Kč za jednu variantu. Pro každou reakci je nutné použít i manipulační prostředky, jako je pipetovací špička (4,50 Kč) a zkumavka (1,30 Kč). Po započtení spotřebovaného plastiku je samotná PCR jednoho vzorku v ceně cca 15,50 Kč. Při 200 vzorcích se tedy pohybujeme na ceně 310 Kč s použitím jedné pipetovací špičky na vzorek.

Samotná izolace DNA, která PCR testování předchází, je poněkud dražší (cca 117 Kč na vzorek), nicméně izolovaná DNA je dále ředitelná, a tudíž použitelná na množství dalších účelů. Možnosti využití se dále odvíjí od kvality a množství izolovaného produktu.

Agaróza Kobe I (P-Lab) vychází cca 6000 Kč za 1 kg, na jednu vaničku se spotřebuje 1,5 gramu. PufferTBE, ve kterém se agaróza rozpouští, lze zakoupit za cca 1300 Kč na 1litr a pro jednu vaničku se použije 100 ml. Při použití tohoto gelu lze otestovat až 48 vzorků a výsledná cena při dodatečném započtení barviva, kterého se používají 3 µg na vaničku, je necelých 5 Kč.

Sekvenace vzorků je finančně nejnáročnější, v této práci byla použita pouze jako kontrola. V případě velkých souborů vzorků a při použití ověřené determinační metody se s ní nepočítá. Cena sekvenace jednoho vzorku se odvíjí od zpracovatele a objemu analyzovaných vzorků, ale obvykle se pohybuje v rozmezí cca 100-120 Kč za sekvenci.

4.2. Výsledky testování

4.2.1 Druhové složení výzkumného vzorku

Po optimalizaci metody, která pomohla určit všech 423 jedinců bylo zjištěno, že mezi všemi odchycenými vzorky jednoznačně převládá druh *A. flavicollis* s 97,17 %.

V olomouckém odchytu byla druhová skladba 25 % *A. flavicollis* a 75 % *A. sylvaticus*, tedy dva jedinci druhu *Apodemus* *A. flavicollis* a tři jedinci *A. sylvaticus*.

Vzorky ze Salaše byly tvořeny z 98,12 % druhem *Apodemus flavicollis*, 1,41 % *Apodemus sylvaticus* a zbylých 0,47 % nebylo metodou určeno. Je možné, že se jedná o *Apodemus uralensis*, ale je potřeba dalšího testování.

Tato druhová skladba koreluje s typickým výběrem habitatu druhů; tedy v urbánním prostředí převládá *A. sylvaticus*, která se u lidských obydlí vyskytuje častěji, a naopak v přírodním biotopu na Salaši (les, louka, okolí vodního toku atd.) výrazně dominuje *A. flavicollis*, která preferuje zalesněné plochy.

4.2.2 Sekvenování

Sekvenování nebylo nutné, ale bylo provedeno za účelem potvrzení identity produktu primerů *A. sylvaticus* jako doplňující test, zda vyšší teplota neseďání zvýšila specifitu reakce, protože při prvních testech PCR vykazovaly nespecifickou amplifikaci u vzorků *A. flavicollis*.

#	Název vzorku	Primer	Sekvence primeru	Velikost templátu (bp)
1	1	A.sylF	GAGGAGGATTCTCAGTAGAC	320
2	2	A.sylF	GAGGAGGATTCTCAGTAGAC	320
3	3	A.sylF	GAGGAGGATTCTCAGTAGAC	320
4	4	A.sylF	GAGGAGGATTCTCAGTAGAC	320
5	5	A.sylF	GAGGAGGATTCTCAGTAGAC	320
6	6	A.sylF	GAGGAGGATTCTCAGTAGAC	320
7	7	A.sylF	GAGGAGGATTCTCAGTAGAC	320
8	8	A.sylF	GAGGAGGATTCTCAGTAGAC	320
9	9	A.sylR	TTAATATGGGGTGGGGTGTTA	320
10	10	A.sylR	TTAATATGGGGTGGGGTGTTA	320
11	11	A.sylR	TTAATATGGGGTGGGGTGTTA	320
12	12	A.sylR	TTAATATGGGGTGGGGTGTTA	320
13	13	A.sylR	TTAATATGGGGTGGGGTGTTA	320
14	14	A.sylR	TTAATATGGGGTGGGGTGTTA	320
15	15	A.sylR	TTAATATGGGGTGGGGTGTTA	320
16	16	A.sylR	TTAATATGGGGTGGGGTGTTA	320
17	17	A.sylF	GAGGAGGATTCTCAGTAGAC	320
18	18	A.sylR	TTAATATGGGGTGGGGTGTTA	320

Obrázek 12 Sekvenované vzorky *A. sylvaticus* s primery forward a reverse, seznam od firmy SeqMe

Sekvenované úseky byly upraveny v programu bioEdit a blastovány oproti již zveřejněných sekvencí v databázi GenBank. Získali jsme 9 sekvencí o délce 301 párů bazí a v nich identifikovali dva jednoznačné haplotypy (oba přítomné u olomouckých jedinců)

s odlišností pouze 2 párů bazí viz výsledek analýzy DNA distance. U tří sekvencí (356, 113 a 248) byla nejistota zařazení k haplotypům dána neurčenými nukleotidy na jedné nebo dvou pozicích.

Haplotype	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0067
10L	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0067
30L	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0067
43	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0067
128	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0067
179	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0067
356	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0033
113	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
248	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
40L	0.0067	0.0067	0.0067	0.0067	0.0067	0.0067	0.0033	0.0000	0.0000	0.0000

Obrázek 13 Haplotypy *A. sylvaticus*, program BioEdit

Na základě funkce „Standard nucleotide BLAST“ v databázi Genbank <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> bylo potvrzeno, že všechny sekvenované vzorky jsou identické se sekvencemi *Apodemus sylvaticus*.

Haplotyp 40L

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per Ident	Acc Len	Accession
Apodemus sylvaticus haplotype Norway_4 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	1140	KX159676.1
Apodemus sylvaticus haplotype Germany_Norway cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	1140	KX159647.1
Apodemus sylvaticus haplotype Germany_1 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	1140	KX159645.1
Apodemus sylvaticus haplotype France_Sweden cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	1140	KX159546.1
Apodemus sylvaticus haplotype France_20 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	1140	KX159537.1
Apodemus sylvaticus haplotype France_19 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	1140	KX159536.1
Apodemus sylvaticus isolate ROT129 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	786	OQ939794.1
Apodemus sylvaticus voucher MNHN VE39 cytochrome b (Cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	701	KM581739.1
Apodemus sylvaticus voucher S4599 cytochrome b (Cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	701	KM581719.1
Apodemus sylvaticus isolate DM1121 mitochondrion, complete genome	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	16307	MT410952.1
Apodemus sylvaticus isolate Miu07/194 cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	654	GU060533.1
Apodemus sylvaticus isolate Netherlands446 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	818	FJ389641.1
Apodemus sylvaticus isolate Denmark1200 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	818	FJ389621.1
Apodemus sylvaticus isolate Sweden4600 cytochrome b (cytb) gene, partial cds; mitochondrial	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	818	FJ389620.1
Apodemus sylvaticus mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b, tissue library, JRM-375	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	965	AJ511907.1
Apodemus sylvaticus mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b, tissue library, JRM-372	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	965	AJ511908.1
Apodemus sylvaticus mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b, tissue library, JRM-374	Apodemus sylvaticus	545	545	100%	2e-150	99.34%	963	AJ511890.1

Obrázek 14 Porovnání identity haplotypu Olomouckého vzorku č. 4 se vzorky v databázi GenBank.

Haplotyp ostatních vzorků

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Apodemus sylvaticus haplotype Norway_4 cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	1140	KX159676.1
Apodemus sylvaticus haplotype Germany_Norway cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	1140	KX159647.1
Apodemus sylvaticus haplotype Germany_1 cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	1140	KX159645.1
Apodemus sylvaticus haplotype France_Sweden cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	1140	KX159546.1
Apodemus sylvaticus haplotype France_20 cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	1140	KX159537.1
Apodemus sylvaticus haplotype France_19 cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	1140	KX159536.1
Apodemus sylvaticus isolate ROTI29 cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	788	OQ939794.1
Apodemus sylvaticus voucher S4599 cytochrome b (Cytb) gene, partial cds, mitochondrial	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	701	KM581719.1
Apodemus sylvaticus isolate DM1121 mitochondrion, complete genome	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	16307	MT410952.1
Apodemus sylvaticus isolate Mu07194 cytochrome b gene, partial cds, mitochondrial	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	654	GU060533.1
Apodemus sylvaticus isolate Netherlands446 cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	818	FJ389641.1
Apodemus sylvaticus isolate Denmark1200 cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	818	FJ389621.1
Apodemus sylvaticus isolate Sweden4600 cytochrome b (cytb) gene, partial cds, mitochondrial	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	818	FJ389620.1
Apodemus sylvaticus mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b, tissue library JRM-375	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	965	AJ511907.1
Apodemus sylvaticus mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b, tissue library JRM-372	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	965	AJ511908.1
Apodemus sylvaticus mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b, tissue library JRM-374	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	963	AJ511890.1
Apodemus sylvaticus mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b, tissue library JRM-373	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	965	AJ511889.1
Apodemus sylvaticus mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b, tissue library JRM-104	Apodemus sylvaticus	556	556	100%	1e-153	100.00%	963	AJ511877.1

Obrázek 15 Porovnání identity haplotypu zbylých vzorků se vzorky v databázi GenBank.

4.2.3 Patogeny ve vzorcích myšic

S přiřazením námi identifikovaných druhů pomocí molekulární analýzy bylo zjištěno, že všechny zkoumané patogeny ze studie Balážové (2021) se vyskytují u *A. flavicollis*. Celkový vzorek myšic druhu *A. flavicollis* čítal 280 jedinců, z toho 26 jedinců bylo pozitivních na anaplasmu (9,2 %), 21 na rickettsii (7,5 %), 16 na leptospiru (5,7 %), 27 na borrelii (9,6 %) a 15 na babesii (5,3 %).

Myšice druhu *A. sylvaticus* nesly pouze bakterii rodu *Bartonella*. Z celkového počtu vzorků byla bartonella nalezena u 204 myšic druhu *A. flavicollis* a u 3 myšic druhu *A. sylvaticus*. Porovnání prevalence těchto druhů je uvedeno v tabulce č. 5.

Tabulka 5 Fisherův test na porovnání prevalence Bartonelly u *A. flavicollis* a *A. sylvaticus* (Program QP 3.0)

	celkový počet vzorků	počet infikovaných	p-hodnota
<i>A. flavicollis</i>	280	204	0.097
<i>A. sylvaticus</i>	7	3	

Soubor obsahoval rovněž dva molekulárně neidentifikované vzorky, u nichž byla nalezena v obou případech bakterie rodu *Bartonella* a v jednom případě taktéž *Borrelia*.

U všech ostatních patogenů byla v důsledku jejich negativního výskytu u druhu *A. sylvaticus* při statistickém porovnání s *A. flavicollis* p-hodnota rovna jedné.

5 DISKUZE

Při testování fungovaly primery pro *A. flavicollis* velmi dobře, po mírném upravení teploty nasedání primerů při PCR vznikaly vizualizací elektroforézou zřetelné proužky o správné velikosti **cca 300** párů bází, tudíž bylo snadné tuto metodu pro zjištění přítomnosti DNA *A. flavicollis* dále použít. Vzorky testované s primery *A. sylvaticus* už tak jednoznačné nebyly, při PCR u některých vzorků primery mírně nasedaly i na nespecifická místa DNA, proto proužky vzniklé při elektroforéze nebyly ve správné velikosti a dokonale zřetelné. V důsledku optimalizace teplot PCR programu, tedy zvýšení teploty nasedání primerů, byla zvýšena specificita a tím pádem primery spíše nasedaly pouze na místa DNA souhlasící se sekvencí primerů specifických pro cílový druh. Pokud se jednalo o DNA *A. sylvaticus*, vzorky vždy amplifikovaly s dostatečně zřetelným výsledkem. Specificita PCR pro *A. sylvaticus* po úpravách programu byla potvrzena i sekvenací získaných produktů. Tuto metodu jsme tedy vyhodnotili jako vhodnou pro molekulární determinaci těchto dvou obtížně rozeznatelných druhů.

Dle očekávání byly nalezeny v urbánním prostředí oba druhy, jelikož se oba druhy v blízkosti budov vyskytují, i když *A. sylvaticus* tento habitat vyhledává častěji (Zbytkovský, Anděra a Hanák, 2004). V přírodě byly nalezeny téměř jen jedinci *A. flavicollis*. Výsledky sběru v přírodním biotopu tedy odpovídají předpokladům; *A. sylvaticus* vyhledává a vytváří hnízda nejčastěji v okolích stromů, kde byla většina pastí kladena. Tuto skutečnost potvrzuje i studie Zbytkovského, Anděry a Hanáka (2004) mapující skladbu drobných savců na území Českomoravské vrchoviny, při které byly pasti kladeny v okolí vodních toků a hospodářských budov. Při odchytu v druhovém zastoupení výrazně převažovala *A. sylvaticus*. Je tedy zřejmé, že *A. flavicollis* dává přednost lesním biotopům, které byly i hlavní lokalitou sběru naší studie. Mimo jiné tento výsledek koresponduje s předchozím výzkumem (Suchomel, 2007), při kterém bylo zjištěno, že pokud se tyto dva druhy spolu v lesním habitatu vyskytují, je konkurenceschopnější *A. flavicollis* v důsledku úspěšnějšího získávání potravy.

Apodemus uralensis v této studii stoprocentně potvrzena nebyla; sada primerů pro testování *A. uralensis* vykazovala nespecifické amplifikace u vzorků s potvrzenou identitou pro *A. flavicollis* a *A. sylvaticus*. Dva vzorky z celého souboru ze Salaše, které

neamplifikovaly produkt ani s *A. flavicollis* nebo *A. sylvaticus* primery pak při *A. uralensis* PCR testování neamplifikovaly dostatečně jasný výsledek, který by dokázal vyvrátit či potvrdit její přítomnost. Ovšem při studii Balážové (2021) bylo u těchto vzorků nalezeno několik patogenů; jedná se tedy o dostatečně objemný a správně vyizolovaný vzorek DNA. Jedním z důvodů nejednoznačných výsledků by tedy mohlo být, že pro tvorbu primerů nebyl vybrán vhodný úsek DNA, který by byl dostatečně druhově specifický. Jedna ze studií (Gil de Mendonça, 2012), podle které byl pár primerů použit, prostřednictvím PCR identifikovala většinu vzorků jako *A. uralensis* a DNA neamplifikovala při použití primerů pro *A. sylvaticus* se vzorky *A. uralensis*. Nicméně, druhá studie, která zde byla použita jako základ testování (Bugarski-Stanojević, 2013), použila při svém testování s primery pro *A. sylvaticus* i *A. flavicollis* jako kontrolní skupinu *A. uralensis*, vyhodnotila 6 vzorků ze 17 jako pozitivní při testování oproti oběma těmto primerům. Tyto vzorky byly nejdříve potvrzeny jinými molekulárními metodami jako *A. uralensis*, ale dle autora údajně dochází k překryvu sekvence cytochromu b v evropských populacích těchto tří kryptických myšic. Jedná se tedy zřejmě o nesrovnalosti s použitými primery a je potřeba identifikovat chybu v metodě a upravit ji tak, aby dokázala poskytnout jednoznačné výsledky.

V České republice je výskyt *Apodemus uralensis* mapován v Atlasu savců ČR (Anděra, 2011) a molekulárními či morfometrickými metodami byl její výskyt potvrzen i v sousedních zemích v blízkosti hranic s Českou republikou, konkrétně například v Polsku poblíž Beskyd (Cichocky, Ważna a Rupert, 2011) a na 40 % území Slovenska (Danko a Krištofik, 2012). Je tedy vysoce pravděpodobné, že se u nás *Apodemus uralensis* opravdu vyskytuje a pokud by tato studie proběhla ve větším měřítku s optimalizovanou metodou, nejspíš by se ve vzorku objevila.

Úseky DNA cytochromu b *Apodemus sylvaticus*, které byly při tomto výzkumu získány a sekvenovány, obsahují úseky shodné u všech zkoumaných jedinců a zároveň jsou 100% shodné s velkým množstvím vzorků získaných i v dalších částech světa (Norsko, Švédsko, Francie, Holandsko aj.), a není zde korelace s DNA jiných druhů. Jedná se tedy o úsek DNA, který je jednoznačně schopný určit totožnost jedince, a proto vhodný pro molekulární determinaci tohoto druhu.

Jak již dříve bylo řečeno, myšice spolehlivě můžeme určit pouze prostřednictvím morfometrických a genetických metod, přičemž morfometrie je velmi zdoluhavý proces a variabilita znaků ji činí neuniverzální. Pokud by tedy někdo chtěl provádět například mapování výskytu na větším území, jako je například celá Česká republika, tento způsob

není optimální. Navíc od 60. let 20. století morfologie zaostává a genetická analýza je v popředí, protože je schopná odhalit informace nad rámec fenotypu (Lee a Palci, 2015). Molekulární metody mají oproti těm morfologickým navíc řadu výhod. Vzorky potřebné k jejich provedení lze získat snadněji, v mnohem větším množství a bez předchozího důkladného taxonomického vzdělání (Oyston et al., 2022). Díky databáze GenBank jsou sekvence genů také vždy snadno dostupné.

Z finančního hlediska se v případě PCR s použitím elektroforézy jedná o levnou a spolehlivou metodu určování velkého množství vzorků. Kromě nízkého finančního zatížení se rovněž jedná o postup relativně časově úspornější než morfometrická identifikace a nesporně jednodušší, využívající základní molekulárně biologické vybavení. Postup práce je velmi jednoduchý pro naučení a je uveden v příloze (B).

V případě patogenů u druhů odchycených na Salaši je jednoznačně nejvyšší prevalence bakterie rodu *Bartonella* spp. Takový výsledek byl očekávaný, tato bakterie byla ve velkém zastoupení nalezena u *Apodemus flavicollis* již v dřívějších studiích ze zahraničí (Špitalská et al., 2017, Mardosaitė-Busaitienė, 2019) i v rámci České republiky (Obiegala et al., 2019). Ve světě bylo dosud zaznamenáno pouze 24 případů nákazy bartonellou, kde zdrojem patogenu byli malí hlodavci, avšak tato skutečnost může být způsobena i nedostatečnou informovaností lékařů o nákaze samotné, nebo nedostatečné laboratorní vybavení pro její odhalení (Krügel et al., 2022). Co se týče *A. sylvaticus*, podle vzorku získaného při této studii nelze vytvářet závěry o prevalenci bartonelly. *Bartonella* spp. se vyskytovala u menšího procenta jedinců z našeho vzorku, nicméně pokud bychom chtěli znát pravděpodobnost výskytu u tohoto druhu, bylo by nutné získat větší počet jedinců. Výskyt bartonelly u *A. sylvaticus* rovněž není tak dobře mapován v předchozích studiích, nicméně její výskyt byl potvrzen v menším množství než u *A. flavicollis* (Holmberg et al., 2003, Knap et al., 2007) nebo nenalezen vůbec (Špitalská et al., 2017).

Všechny ostatní patogeny, které byly u myšic nalezeny, se vyskytovaly pouze u *A. flavicollis*. Nicméně u tak malého vzorku *A. sylvaticus* nelze vyvrátit, že i tento druh může být jejich přenašečem. Konečně, dva vzorky, které nebyly molekulární metodou identifikovány, obsahovaly kromě prevalentní bartonelly také borrelii. Pokud by se jednalo o jedince druhu *Apodemus uralensis*, znamenalo by to první potvrzení výskytu těchto dvou patogenů u tohoto druhu v naší zemi. Je tedy zřejmé, že pro další závěry je nutné rozšíření vzorku a rovněž pro úplné získání prevalence u všech druhů je potřeba dalších srovnávacích lokalit.

Otázka překryvu patogenů u synantropizující *A. sylvaticus* a v přírodě žijící *A. flavicollis* je důležitá pro určení rizika zoonóz v různém prostředí a v tomto výzkumném směru se bude pokračovat.

V budoucnu bude dále potřeba získat větší počet vzorků, aby bylo možné optimalizovat i determinační metodu pro *Apodemus uralensis*. Poté bude možné jak mapování výskytu všech třech kryptických myšic na našem území, tak analýza chorob přenášených jednotlivými druhy.

Pokud bychom chtěli metodu ještě zjednodušit, je možné převést současnou end-point PCR na qPCR; tato metoda umožní provádět determinaci bez potřeby elektroforézy, tudíž by byl ušetřen jak další čas, tak finanční prostředky.

6 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo provést a optimalizovat molekulární determinaci tří kryptických druhů myšic: *Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis* a *A. uralensis*. Výzkum se soustředil na optimalizaci metody PCR, specifickou identifikaci jednotlivých druhů a analýzu patogenů přenášených těmito hlodavci.

Výsledky ukázaly, že současná metoda PCR je efektivní pro odlišení dvou nejběžnějších druhů, *A. sylvaticus* a *A. flavicollis*. Přestože bylo zjištěno, že *A. flavicollis* výrazně dominuje v přírodním biotopu na modelové lokalitě Salaš, nebyly nalezeny významné rozdíly ve vztahu k přítomnosti patogenů mezi těmito druhy. *A. flavicollis* vykazuje vysokou prevalenci patogenů, včetně bakterií rodu *Anaplasma*, *Rickettsia*, *Leptospira*, *Bartonella* a *Borrelia*, stejně jako prvoků rodu *Babesia*. Na druhé straně, *A. sylvaticus* nesla pouze bakterii rodu *Bartonella*, ale byl získán pouze malý vzorek tohoto druhu pro vytváření závěrů.

Optimalizace metody PCR, která spočívala především v upravení teplot pro specifické primery, umožnila přesnější a spolehlivější determinaci druhů. Sekvenování potvrdilo identitu amplifikovaných produktů, což potvrdilo validitu použitých metod. Výzkum naznačuje, že další zjednodušení a zefektivnění metody by mohlo být dosaženo přechodem na qPCR, která eliminuje potřebu elektroforézy, čímž by se snížily časové a finanční náklady.

Studie rovněž ukázala potřebu získání většího množství vzorků pro optimalizaci determinace u třetího druhu, *A. uralensis*. Tento krok by umožnil komplexnější mapování výskytu všech tří kryptických druhů na našem území a podrobnější analýzu chorob přenášených jednotlivými druhy.

Závěrem lze konstatovat, že tato práce přispěla k rozšíření znalostí o molekulární determinaci myšic rodu *Apodemus* a otevřela nové možnosti pro budoucí výzkum. Přesto zůstává několik oblastí, které vyžadují další zkoumání, zejména s ohledem na ekologické interakce mezi druhy a jejich roli v přenosu zoonotických patogenů. Další výzkum by měl zahrnovat nejen širší spektrum vzorků, ale také vylepšení molekulárních technik, které umožní ještě přesnější a efektivnější identifikaci a analýzu těchto důležitých hlodavčích druhů.

LITERATURA

- Anděra, M. (2011). Current distributional status of rodents in the Czech Republic (Rodentia) [Aktuální stav poznání výskytu hlodavců v České republice (Rodentia)]. *Lynx, new series*, 42(1), 5–82. <https://doi.org/10.3755/lynx.011>
- Anděra, M. & Gaisler, J. (2012). *Savci České republiky*. Praha: Academia.
- Anděra, M. & Horáček, I. (2005). *Poznáváme naše savce*. Praha: Sobotáles.
- Aulagnier, S., Haffner, P., & Mitchel-Jones, A. J. (2018). *Savci Evropy, severní Afriky a Blízkého východu*. Plzeň: Jiří Ševčík.
- Bakker, J. W., Pascoe, E. L., van de Water, S., & et al. (2023). Infection of wild-caught wood mice (*Apodemus sylvaticus*) and yellow-necked mice (*A. flavicollis*) with tick-borne encephalitis virus. *Scientific Reports*, 13, 21627. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47697-2>
- Barčiová, L., & Macholán, M. (2009). Morphometric key for the discrimination of two wood mice species, *Apodemus sylvaticus* and *A. flavicollis*. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 55, 31-38.
- Bellinvia, E. (2004). A phylogenetic study of the genus *Apodemus* by sequencing the mitochondrial DNA control region. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 42(4), 289-297.
- Berenreiterová, M., Flegr, J., Kuběna, A. A. & Němec, P. (2011). The distribution of *Toxoplasma gondii* cysts in the brain of a mouse with latent toxoplasmosis: Implications for the behavioral manipulation hypothesis. *PLOS ONE*, 6(12), e28925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028925>
- Bernard, P. S. & Wittwer, C. T. (2002). Real-time PCR technology for cancer diagnostics. *Clinical Chemistry*, 48(8), 1178-1185.
- Branicki, W., Kupiec, T., & Pawlowski, R. (2003). Validation of cytochrome b sequence analysis as a method of species identification. *Journal of Forensic Sciences*, 48(1), 1–5. <https://doi.org/10.1520/jfs2002128>
- Britton-Davidian, J., Vahdati, M., Benmehdi, F., Gros, P., Nancé, V., Croset, H., Guerassimov, S. & Triantaphyllidis, C. (1991). Genetic differentiation in four species of

- Apodemus from Southern Europe: *A. sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. agrarius* a *A. mystacinus* (Muridae, Rodentia). *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 56(1), 25-33.
- Bugarski-Stanojević, V., Blagojević, J., Adnađević, T., Jojić, V., & Vujošević, M. (2008). Molecular phylogeny and distribution of three *Apodemus* species (Muridae, Rodentia) in Serbia. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 46, 278-286. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2007.00452.x>
- Castresana, J. (2001). Cytochrome b phylogeny and the taxonomy of great apes and mammals. *Molecular Biology and Evolution*, 18(4), 465–471. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a003825>
- Çolak, R., Çolak, E., Yiğit, N., Kandemir, I., & Sözen, M. (2007). Morphometric and biochemical variation and the distribution of the genus *Apodemus* (Mammalia: Rodentia) in Turkey. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 53(3), 239-256.
- Čondlová, Š., Horčíčková, M., Havrdová, N., Sak, B., Hlásková, L., Perek-Matysiak, A., Kicia, M., McEvoy, J., & Kváč, M. (2019). Diversity of *Cryptosporidium* spp. in *Apodemus* spp. in Europe. *European Journal of Protistology*, 69, 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2019.02.005>
- Danko, Š., & Krištofik, J. (2012). *Cicavce Slovenska: Rozšírenie, bionómia a ochrana*. Bratislava: Veda.
- Filippucci, M., Macholán, M., & Michaux, J. (2002). Genetic variation and evolution in the genus *Apodemus* (Muridae: Rodentia). *Biological Journal of the Linnean Society*, 75, 395-419. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8312.2002.00032.x>
- Flegr, J. (2013). Influence of latent *Toxoplasma* infection on human personality, physiology and morphology: Pros and cons of the *Toxoplasma*-human model in studying the manipulation hypothesis. *Journal of Experimental Biology*, 216(1), 127-133. <https://doi.org/10.1242/jeb.073635>
- Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(3), 1-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>
- Gelfand, D. H. (1989). Taq DNA polymerase. In H. A. Erlich (Ed.), *PCR technology*, (17-22). Palgrave Macmillan. https://doi.org/10.1007/978-1-349-20235-5_2

- Gerace, E., Lo Presti, V. D. M., & Biondo, C. (2019). Cryptosporidium infection: Epidemiology, pathogenesis, and differential diagnosis. *European Journal of Microbiology and Immunology (Bp)*, 9(4), 119-123. <https://doi.org/10.1556/1886.2019.00019>
- Gornung, E., Cristaldi, M. & Castalgia, R. (2009). Comparative cytogenetic analysis of the “Sylvaemus” group of Apodemus (Rodentia, Muridae): *A. sylvaticus* from Sicily and *A. flavicollis* from the central Apennines. *Acta theriologica*, 54, 267-275.
- Hejlíček, K., Literák, I., & Nezval, J. (1997). Toxoplasmosis in wild mammals from the Czech Republic. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(3), 480-485. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-33.3.480>
- Heroldová, M., Pejčoch, M., Bryja, J., Jánová, E., Suchomel, J., & Tkadlec, E. (2010). Tula virus in populations of small terrestrial mammals in a rural landscape. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(6), 599-603. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0211>
- Heroldová, M., & Suchomel, J. (2016). Small mammals in sugar beet stands and their significance in terms of damage to sugar beet production. *Listy Cukrovarnické a Reparské*, 132(3), 96-99.
- Holmberg, M., Mills J. N., McGill, S., Benjamin, G. & Ellis, B.A. (2003). Bartonella infection in sylvatic small mammals of central Sweden. *Epidemiology and Infection*, 130(1):149-157. doi:10.1017/S0950268802008075
- Hovmark, A., Jaenson, T. G. T., Åsbrink, E., Forsman, A., & Jansson, E. (1988). First isolations of *Borrelia burgdorferi* from rodents collected in Northern Europe. *APMIS*, 96, 917-920. <https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1988.tb00962.x>
- Humair, P. F., Rais, O., & Gern, L. (1999). Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: Differential transmission pattern and overwintering maintenance. *Parasitology*, 118(1), 33-42. <https://doi.org/10.1017/S0031182098003564>
- Christova, I., Plyusnina, A., Gladnisha, T., Kalvatchev, N., Trifonova, I., Dimitrov, H., Mitkovska, V., Mohareb, E., & Plyusnin, A. (2015). Detection of Dobrava hantavirus RNA in *Apodemus* mice in Bulgaria. *Journal of Medical Virology*, 87(2), 263-268. <https://doi.org/10.1002/jmv.24033>

- Ivović, V., Potušek, S., & Buzan, E. (2019). Prevalence and genotype identification of *Toxoplasma gondii* in suburban rodents collected at waste disposal sites. *Parasite*, 26, 1-8. <https://doi.org/10.1051/parasite/2019028>
- Knap, N., Duh, D., Birtles, R., Trilar, T., Petrovec, M. & Avšič-Županc, T. (2007). Molecular detection of *Bartonella* species infecting rodents in Slovenia, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 50(1), 45-50, <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00226.x>
- Kolodziej, M., Melgies, A., Joniec-Wiechetek, J., Michalski, A., Nowakowska, A., Pitucha, G., & Niemcewicz, M. (2018). First molecular characterization of Dobrava-Belgrade virus found in *Apodemus flavicollis* in Poland. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 25(2), 368-373.
- Krügel, M., Król, N., Kempf, V.A.J. *et al.* (2022) Emerging rodent-associated *Bartonella*: a threat for human health? *Parasites Vectors* 15(113). <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05162-5>
- Lee, M. S., & Palci, A. (2015). Morphological phylogenetics in the genomic age. *Current Biology*, 25(19), R922-R929. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.009>
- Liu, X., Wei, F., Li, M., Jiang, X., Feng, Z., & Hu, J. (2004). Molecular phylogeny and taxonomy of wood mice (genus *Apodemus* Kaup, 1829) based on complete mtDNA cytochrome b sequences, with emphasis on Chinese species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2004.05.011>
- Lorenz, T. C. (2012). Polymerase chain reaction: Basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 63, e3998. <https://doi.org/10.3791/3998>
- Iwasa, M. A., & Hasegawa, A. (2022). Caudal vertebral fragilities related to loss of a tail part in two species of the Japanese field mice. *Mammal Study*, 47(2), 125-131. <https://doi.org/10.3106/ms2020-0056>
- Mardosaitė-Busaitienė, D., Radzijeuskaja, J., Balčiauskas, L. *et al.* (2019). Prevalence and diversity of *Bartonella* species in small rodents from coastal and continental areas. *Sci Rep*, 9, 12349. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48715-y>
- Meerburg, B. G., Singleton, G. R., & Kijlstra, A. (2009). Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Critical Reviews in Microbiology*, 35(3), 221–270. <https://doi.org/10.1080/10408410902989837>

- Michaux, J. R., Kinet, S., Filippucci, M. G., Libois, R., Besnard, A., & Catzefflis, F. (2001). Molecular identification of three sympatric species of wood mice (*Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, *A. alpicola*) in western Europe (Muridae: Rodentia). *Molecular Ecology Notes*, 1, 260-263. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2001.00100.x>
- Michaux, J. R., Chevret, P., Filippucci, M. G., & Macholan, M. (2002). Phylogeny of the genus *Apodemus* with a special emphasis on the subgenus *Sylvaemus* using the nuclear IRBP gene and two mitochondrial markers: Cytochrome b and 12S rRNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23(2), 123-136. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00007-6](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00007-6)
- Michaux, J. R., Libois, R., Ramalhinho, M. G., & Maurois, C. (1998). On the mtDNA restriction patterns variation of the Iberian wood mouse (*Apodemus sylvaticus*). Comparison with other West Mediterranean populations. *Hereditas*, 129(2), 187-194. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1998.00187.x>
- Naidu, A., Fitak, R. R., Munguia-Vega, A., & Culver, M. (2012). Novel primers for complete mitochondrial cytochrome b gene sequencing in mammals. *Molecular Ecology Resources*, 12(1), 191-196. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03078.x>
- Obiegala, A., Jeske, K., Augustin, M., Król, N., Fischer, S., Mertens-Scholz, K., Imholt, C., Suchomel, J., Heroldova, M., Tomaso, H., Ulrich, R. G. & Pfeffer, M. (2019). Highly prevalent bartonellae and other vector-borne pathogens in small mammal species from the Czech Republic and Germany. *Parasit Vectors*, 12:332. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3576-7>
- Orlov, V., Bulatova, N., Nadjafova, R., & Kozlovsky, A. (1996). Evolutionary classification of European wood mice of the subgenus *Sylvaemus* based on allozyme and chromosome data. *Bonn Zoological Bulletin*, 46, 191-202.
- Owen, M. R., & Trees, A. J. (1998). Vertical transmission of *Toxoplasma gondii* from chronically infected house (*Mus musculus*) and field (*Apodemus sylvaticus*) mice determined by polymerase chain reaction. *Parasitology*, 116(4), 299-304. <https://doi.org/10.1017/S003118209700231X>
- Oyston, J. W., Wilkinson, M., Ruta, M., & et al. (2022). Molecular phylogenies map to biogeography better than morphological ones. *Communications Biology*, 5, 521. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-03482-x>

- Potapov, V., & Ong, J. L. (2017). Examining sources of error in PCR by single-molecule sequencing. *PLOS ONE*, 12(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181128>
- Thermo fisher scientific. *Real-time VS Digital Vs traditional PCR*. Online. In: Thermo fisher scientific. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-vs-digital-vs-traditional-pcr.html>. [citováno 2024-6-10].
- Todorović, M., Mikeš, M. & Savić, I. (1971). Biometric Analysis of the Genus *Apodemus* in Vojvodina (Yugoslavia). *Symposium Theriologicum II. Proceedings of the International Symposium on Species and Zoogeography of European Mammals, Brno 1971*. Academia, Praha, 173–181.
- Reutter, B. A., Hausser, J., & Vogel, P. (1999). Discriminant analysis of skull morphometric characters in *Apodemus sylvaticus*, *A. flavicollis*, and *A. alpicola* (Mammalia; Rodentia) from the Alps. *Acta Theriologica*, 44(3), 299-308.
- Schochetman, G., Ou, C. Y., & Jones, W. K. (1988). Polymerase chain reaction. *The Journal of Infectious Diseases*, 158(6), 1154-1157. <http://www.jstor.org/stable/30137034>
- Suchomel, J. (2007 b): Obratlovci jako škůdci v kulturách a porostech lužních lesů. *Součást sborníku Forest Management systems and regeneration of floodplain forest sites*, Brno MUAFA, 209-219.
- Špitalská, E., Minichová, L., Kocianová, E. *et al.* (2017). Diversity and prevalence of *Bartonella* species in small mammals from Slovakia, Central Europe. *Parasitol Res*, 116, 3087–3095. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5620-x>
- Taberlet, P., Griffin, S., Goossens, B., Questiau, S., Manceau, V., Escaravage, N., Waits, L. P., & Bouvet, J. (1996). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, 24(16), 3189-3194. <https://doi.org/10.1093/nar/24.16.3189>
- Thomasson, D., Wright, E. A., Hughes, J. M., et al. (2011). Prevalence and co-infection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in *Apodemus sylvaticus* in an area relatively free of cats. *Parasitology*, 138(9), 1117-1123. <https://doi.org/10.1017/S0031182011000904>
- Top-Bio. (n.d.). *PPP Master Mix*. Online. In: Top-Bio. Dostupné z: <https://www.top-bio.cz/ppp-master-mix>. [citováno 2024-6-10].
- Qiagen. *DPCR vs qPCR vs end-point PCR*. Online. In: QIAGEN. <https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/bench->

[guide/pcr/digital-pcr/digital-pcr-vs-quantitative-pcr-vs-end-point-pcr](#). [citováno 2024-6-10].

Zelena, H., Strakova, P., Heroldova, M., Mrazek, J., Kastl, T., Zakovska, A., Ruzek, D., Smetana, J., & Rudolf, I. (2019). Molecular epidemiology of hantaviruses in the Czech Republic. *Emerging Infectious Diseases*, 25(11), 2133-2135. <https://doi.org/10.3201/eid2511.190449>

Obrázky

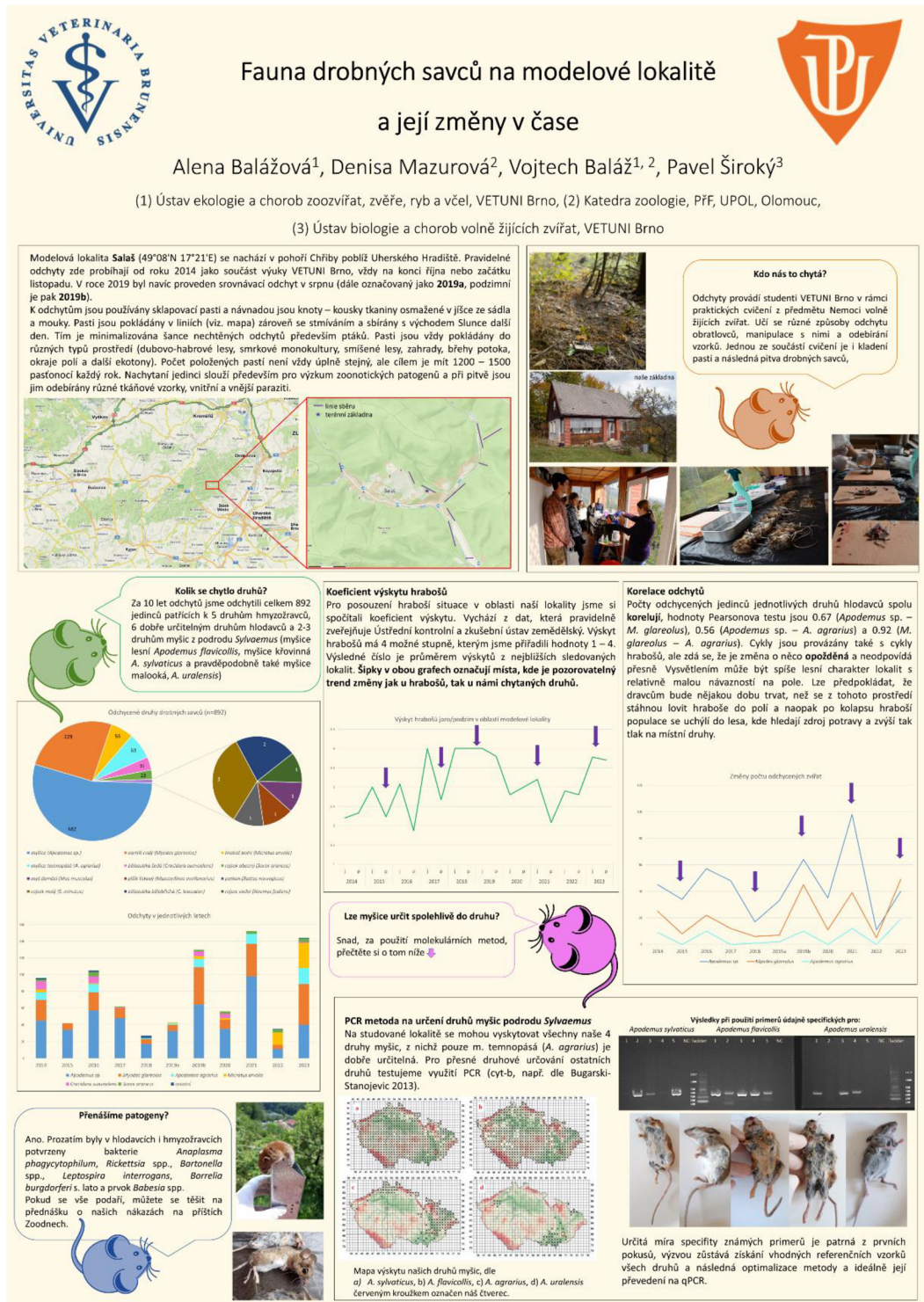
Šegula, B. Myšice temnopásá (*Apodemus agrarius*) [foto]. In: BioLib. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id5771/?taxonid=20611&type=1>. [citováno 2024-6-10].

MUNI. Myšivka horská (*Sicista betulina*) [foto]. In: Biogeografie: Multimediální výuková příručka. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/1431/jaro2010/Z0005/18118868/index_zoo_Sic_bet.html. [citováno 2024-6-10].

Balážová, A., Mazurová, D., Baláž, V. & Široký, P. Mapa výzkumné lokality Salaš, upraveno [foto]. In: *Fauna drobných savců na modelové lokalitě a její změny v čase*. Zoologické dny, 2024.

PŘÍLOHY

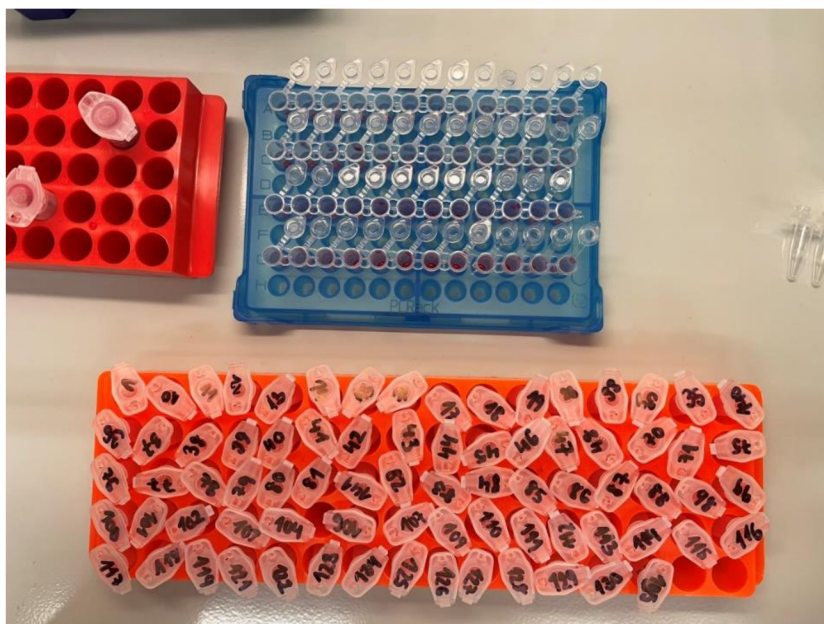
Příloha A. Poster ve spolupráci s kolegy z VETUNI Brno týkající se výzkumu v této práci prezentován na Zoologických dnech 2024.



Příloha B. Postup práce při determinaci druhů metodou PCR.

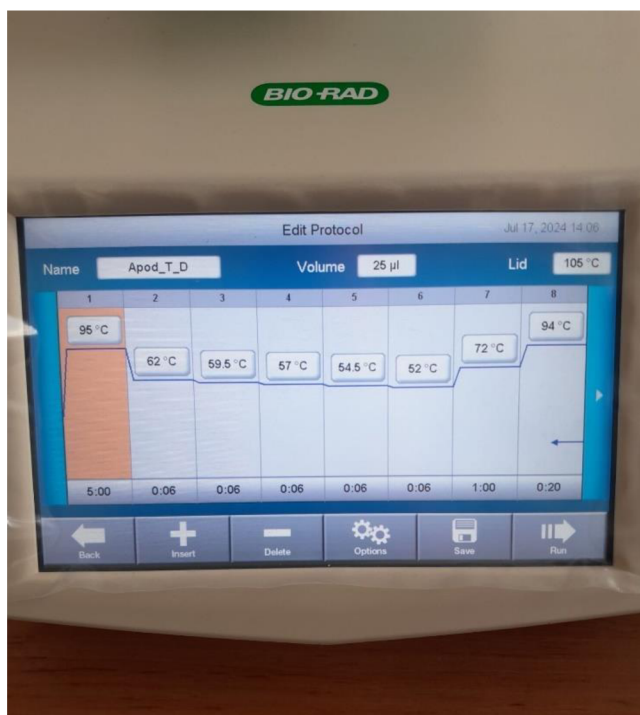
1. Výroba PCR reakční směsi

V prvním kroku je potřeba namíchat reakční směs obsahující: PPP MasterMix, primery pro daný druh ve variantách forward a reverse, PCR vodu a izolovaný vzorek DNA. Nejjednodušší postup je výroba reakční směsi odpovídající svým množstvím počtu vzorků, rozpipetování do zkumavek a následné přidání DNA. Je nutné, aby práce s DNA probíhala v dekontaminačním PCR boxu, který chrání vzorky DNA před kontaminací.



2. Nastavení PCR programu v thermocycleru

Po uzavření zkumavek a jejich vložení do thermocycleru se pečlivě uzavře víko a nastaví se program s danými teplotami pro jednotlivé kroky reakce, počet opakování reakcí a jejich délka, množství směsi obsažené ve zkumavkách a teplota víka thermocycleru. Poté lze program spustit.



3. Příprava gelu na elektroforézu

Směs na výrobu gelu (pufr + agaróza) potřebného k elektroforéze je smíchán přímo do varné sklenice v určeném poměru, pečlivě promíchán a vložen do mikrovlnné trouby. Délka ohřívání závisí na průběhu rozpouštění agarů v pufru, je potřeba pravidelně po krátkých intervalech (cca 30 s) roztok kontrolovat. Rozpuštěná agaróza se pozná tak, že je roztok naprosto čirý.

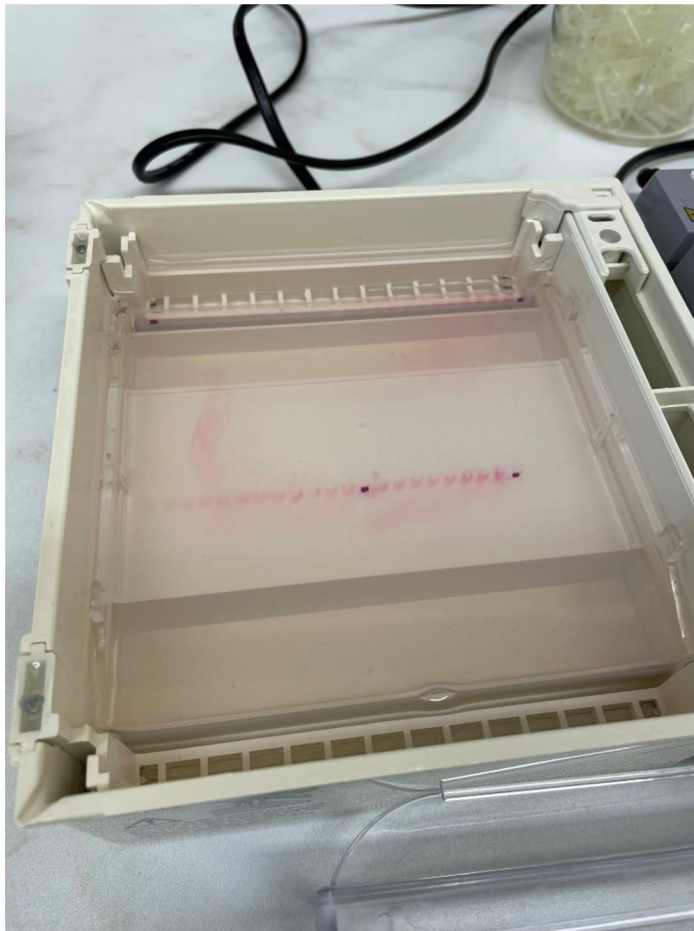


Po rozpuštění nádobu vytáhneme a necháme buď vychladit (delší čekání), nebo zchladíme vložením sklenice do studené vody. Ideální teplota pro další postup je taková, při které po přiložení na ruku nádoba nepálí. Při takové teplotě vložíme barvivo a promícháme.

Do připravené nádobky poté opatrně gel vlijeme tak, aby v něm nezůstaly bubliny. Následně vložíme do gelu hřeben, který nám po zatuhnutí vytvoří jamky pro vložení PCR směsi.

4. Elektroforéza

Po zatuhnutí gelu a opatrném odebrání perforačních hřebenů vložíme gel i s podkladovou destičkou do zařízení pro elektroforézu. Poté vlijeme pufr TBE do nádoby s gelem tak, aby byl celý ponořený. Nyní můžeme pipetovat vzorky do jednotlivých jamek. Pro snadnější odečet délky jednotlivých sekvencí DNA vložíme alespoň do jedné z jamek tzv. žebřík, který vytvoří proužky o různých délkách, se kterými pak proužky jednotlivých vzorků můžeme porovnat.



Po napípetování vzorků uzavřeme nádobu víkem a spustíme přístroj, délka procesu závisí na velikosti molekul. Vzorky, které napípetujeme do jamek, putují gelem od negativně nabitě katody k pozitivně nabitě anodě. Ty jsou na elektroforetickém aparátu vyznačeny.

5. Vizualizace výsledku

Po skončení elektroforézy vyjmeme gel z nádoby a sundáme jej z podkladové desky. Vizualizace je možná pomocí UV světla, jelikož jsou vzorky obarveny barvivem, které se pod vlivem tohoto světla zobrazí. V našem případě byl použit vizualizační přístroj VWR, kde je potřeba vložit gel do tmavého boxu a spustit UV světlo. Poté si lze na obrazovce nastavit parametry, jako je například jas a sytost pro optimální zobrazení. Gel tímto přístrojem můžeme i vyfotit pro pozdější využití.



6. Opatření a dodatky

Při práci s DNA je potřeba vždy vysoké opatrnosti; je nutné používat ochranné oděvy a rukavice a také při pipetování jednotlivých vzorků DNA vždy vyměnit pipetovací špičku. Elektroforézu je vhodné provádět neprodleně po ukončení PCR, jelikož při ponechání vzorků delší dobu může ve směsi dojít k nechtěným reakcím, což může vést ke zkreslení výsledku.

Během probíhající PCR reakce, která v tomto případě trvala přibližně 1,5 h, je možné připravit další vzorky či gel na elektroforézu pro ušetření času.

Veškeré informace o použitých chemikáliích a jejich poměrech, zařízeních a materiálu využitých pro testování jsou uvedeny v této práci v kapitole Materiál a metody.

