

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Kokcidie u myši domácích (*Mus musculus*): detekce,
diverzita, distribuce, prevalence a fylogenetické vztahy**

Bakalářská práce

Šárka Tesařová

Školitel: MVDr. Jana Kvičerová, Ph.D.

Školitel specialista: prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D.

České Budějovice 2021

Tesařová Š., 2021: Kokcidie u myší domácích (*Mus musculus*): detekce, diverzita, distribuce, prevalence a fylogenetické vztahy. [Coccidia of house mouse (*Mus musculus*): detection, diversity, distribution, and phylogenetic relationships. Bc. Thesis, in Czech.] – 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This study investigates coccidia of the family Eimeriidae in DNA samples isolated from the faeces of domestic mice (*Mus musculus*) using molecular biology approaches in combination with computer software analyses. The study concerns the prevalence of coccidia in these rodent hosts, and phylogenetic relationships of individual *Eimeria* species detected in *M. musculus*.

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

V Českých Budějovicích dne 12. 4. 2021

.....

Šárka Tesařová

Ráda bych poděkovala mé školitelce MVDr. Janě Kvičerové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady a připomínky. Děkuji za její přátelský přístup a ochotu mi vždy se vším poradit. Dále bych také chtěla poděkovat všem členům laboratoře prof. Hypši z Katedry parazitologie PřF JU za pomoc při práci v laboratoři. Mé poděkování patří také prof. Ing. Martinu Kváčovi, Ph.D. z Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR za poskytnutí vzorků DNA do této bakalářské práce. Na závěr bych chtěla poděkovat svým rodičům za jejich psychickou i finanční podporu během celého mého studia.

Obsah

1. ÚVOD	1
1.1 Obecná charakteristika kmene Apicomplexa	2
1.2 Taxonomie kmene Apicomplexa	4
1.3 Čeleď Eimeriidae	5
1.3.1 Charakteristika významných rodů čeledi Eimeriidae	6
1.4 Rod <i>Eimeria</i>	8
1.4.1 Životní cyklus kokcií rodu <i>Eimeria</i>	9
1.4.2 Hostitelská specifita kokcií rodu <i>Eimeria</i>	10
1.4.3. Detekce kokcií rodu <i>Eimeria</i> a determinace druhů	11
1.5 Kokcidie rodu <i>Eimeria</i> u myši domácí (<i>Mus musculus</i>)	13
1.6 Hlodavci jako součást biosféry a jako hostitelé infekčních agens	14
1.7 Myš domácí (<i>Mus musculus</i>)	16
2. CÍLE PRÁCE	19
3. METODIKA	20
3.1 Původ vzorků	20
3.2 Molekulární analýzy	23
3.2.1 PCR	23
3.2.2 Elektroforéza	24
3.2.3 Enzymatické čištění PCR produktů	25
3.3 Zpracování sekvencí, fylogenetické analýzy	26
3.3.1 Zpracování sekvencí	26

3.3.2	Fylogenetické analýzy	26
4.	VÝSLEDKY	28
5.	DISKUSE	37
6.	ZÁVĚR	43
7.	POUŽITÉ ZDROJE	44
7.1	Použitá literatura	44
7.2	Internetové zdroje	54
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	55
9.	PŘÍLOHY	

1. ÚVOD

Parazitem je označován organismus, který získává živiny z jiného či jiných organismů (takzvaných hostitelů). Jedná se o vztah, kdy jeden z partnerů (parazit) má ze soužití prospěch, kdežto druhý (hostitel) škodu. Nejde tedy pouze o odborný termín, ale o životní strategii (Northrop-Clewes a Shaw, 2000; Rueckert *et al.*, 2019). Paraziti tráví většinu svých životních cyklů uvnitř (endoparaziti) nebo na povrchu (ektoparaziti) svých hostitelů. Svým hostitelům škodí, ale obvykle je nezabíjejí. Jejich cílem je přežít a rozmnožovat se. Většinou vedou ke snížení biologické zdatnosti (životaschopnosti, fitness) svých hostitelů (Rueckert *et al.*, 2019). Jsou k tomuto způsobu života dobře adaptováni, a to jak po stránce morfologické (tvar těla, fixační struktury) a fyziologické (specifické způsoby výživy, lokalizace v hostiteli, reprodukční schopnost), tak schopností ovlivňovat hostitele (ovlivňování imunitního systému, ovlivňování chování hostitele). Paraziti mohou pro člověka představovat infekční hrozbu. Mohou se vyskytovat a vyvíjet v různých částech (orgánech, tkáních) těla svých hostitelů, a lze se jimi nakazit například konzumací potravin či vody kontaminovaných vývojovými stádii parazita, dále také kontaktem s kontaminovanými předměty a povrchy, kousnutím, nebo prostřednictvím kontaminované půdy.

Parazitismus je velmi rozšířen, a patří mezi jednu z neúspěšnějších životních strategií; dokonce se uvádí, že existuje více druhů parazitických, než druhů volně žijících. Zástupci „klasických“ parazitů, tak, jak je známe jako tradiční biologické kategorie (tj. parazitičtí prvoci, červi a členovci), patří do domény Eukaryota. Ta je na základě molekulární fylogenetiky, morfologických a ultrastrukturálních znaků a biochemických vlastností rozdělena na pět „superskupin“ (dříve říší), z nichž téměř každá obsahuje nějakého parazitického zástupce. S parazity se tak setkáváme v rámci skupin Amoebozoa, Excavata, Opisthokonta, a Sar (Stramenopila, Alveolata, Rhizaria) (Adl *et al.* 2012). Mezi Alveolata patří kmen Apicomplexa, jehož zástupci jsou jedni z nejvýznamnějších a celosvětově rozšířených parazitů člověka i zvířat; patří sem například rody *Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Cryptosporidium* nebo *Eimeria* (Keeling *et al.*, 2005; Rueckert *et al.*, 2019).

1.1 Obecná charakteristika kmene Apicomplexa

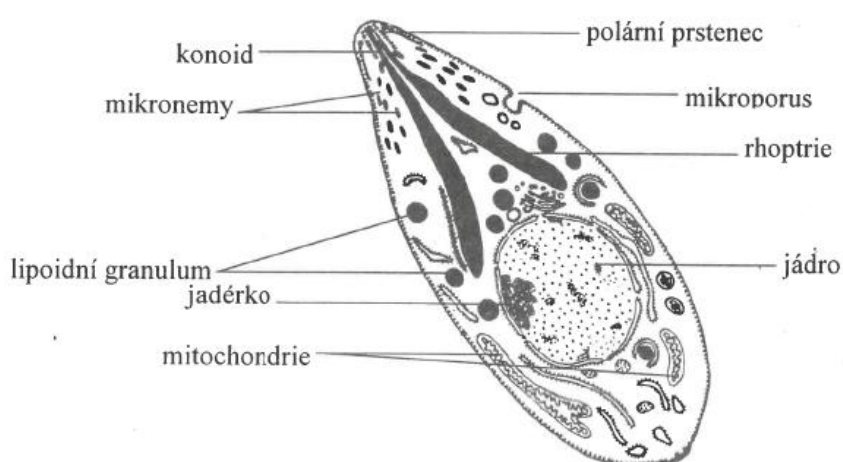
Kmen Apicomplexa je velkou a různorodou skupinou jednobuněčných eukaryot, jejichž zástupci žijí výhradně paraziticky. Jsou to intracelulární paraziti infikující různé hostitele od primitivních bezobratlých až po vyspělé obratlovce včetně člověka (Barta, 1989). Tito paraziti jsou rozšířeni na všech kontinentech. Mnoho druhů tvoří silnostěnné cysty, které chrání parazita ve vnějším prostředí měsíce až roky. Paraziti jsou závislí na svých hostitelích po většinu svého životního cyklu. U zvířat ve volné přírodě bývá obvykle patogenita většiny druhů nízká, avšak v chovech (např. drůbežářský průmysl) mohou způsobovat vysokou mortalitu, a tudíž i velké ekonomické ztráty. Z lékařského hlediska Apicomplexa představují nejvýznamnější parazity (Votýpka *et al.*, 2016).

Přechod od predace k intracelulárnímu parazitismu je jedním z nejpozoruhodnějších rysů v jejich vývoji. Předpokládá se, že k této události došlo v době divergence dinoflagelátů a apikomplex. Na základě skutečnosti, že všichni zástupci kmene Apicomplexa jsou parazitičtí, předpokládá se, že se původně vyvinuli v bezobratlých hostitelích, a teprve později došlo k jejich hostitelskému přeskoku na obratlovce (Kopečná *et al.*, 2006).

Název kmene je odvozen od latinských slov *apex* (nahore) a *complexus* (obsahuje), neboť se vyznačuje přítomností evolučně jedinečného komplexu morfologických struktur, tzv. apikálního komplexu, u některých svých vývojových stádií - zoitů (Adl *et al.*, 2019). Apikální komplex je sada organel složená ze sekrečních a cytoskeletárních struktur (Votýpka *et al.*, 2016). Zprostředkovává procesy invaze do buněk hostitele. Tento komplex byl poprvé pozorován u parazita *Toxoplasma gondii* pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM), a poté byl intenzivně studován i u jiných parazitů (Okamoto a Keeling, 2014). Nachází se v přední části zoitů a je viditelný pouze elektronovým mikroskopem (Dyson *et al.*, 1994). Jeho původ je nejasný; Jedním z důvodů je skutečnost, že se vyskytuje pouze v invazních stádiích parazita (zoitech), kde je bičíkový aparát morfologicky redukován na pár centriolů; bičíky jsou známy pouze u některých gamet, které však postrádají apikální komplex. Nikdy neexistuje současně s jinými cytoskeletárními strukturami, například s bičíky (Okamoto a Keeling, 2014).

Apikální komplex se obvykle skládá z polárního kruhu, který slouží jako organizační centrum pro subpelikulární mikrotubuly. Uspořádání subpelikulárních mikrotubul se liší

mezi jednotlivými zástupci apikomplex (Morrisette a Sibley, 2002; Portman *et al.*, 2013). Další součásti jsou rhoptrie, mikronemy a denzní granula, což jsou sekreční orgány, které vytvářejí proteiny a lipidy nezbytné pro vstup do hostitelské buňky. U některých zástupců apikomplex se vyskytuje konoid tvořený tubuly z tubulinových polymerů s koncovými kroužky (Portman *et al.*, 2013) (Obr. 1). Zástupci kmene Apicomplexa mají apikoplast, vysoce redukováný nefotosyntetický plastid, který syntetizuje mastné kyseliny a izoprenoidy nezbytné pro životní funkce a přežití parazita (Votýpka *et al.*, 2016).



Obr. 1: Morfologie zaita kokcidie rodu *Eimeria* (převzato z Chroust *et al.*, 1998).

Apicomplexa mají charakteristický způsob buněčného dělení, při kterém se tvoří dceřiné buňky uvnitř mateřské buňky (tzv. endodygonie). Pelikuly, které jsou tvořeny z alveolárních vaků, a proteinová kostra s asociovanými subpelikulárními mikrotubuly patří mezi první struktury vytvořené v nových dceřiných buňkách, což umožňuje zajištění opory pro jádra a orgány. Markery pro konoid se objevují na počátku tvorby dceřiných buněk, což naznačuje, že se apikální komplex formuje již na začátku tohoto procesu. Apikální komplex tak hraje klíčovou roli jak při dělení buněk, tak při průniku do hostitelských buněk (Katris *et al.*, 2014).

1.2 Taxonomie kmene Apicomplexa

Podle nejnovější revize taxonomie eukaryot (Adl *et al.*, 2019) je kmen Apicomplexa členěn následovně:

Alveolata Cavalier-Smith, 1991

- skupina vyznačující se kortikálními alveoly (někdy může dojít k jejich druhotné ztrátě), a mitochondriemi s tubulárními nebo ampulovitými kristami.

Apicomplexa Levine 1980, *emend.* Adl *et al.*, 2005

- paraziti s apikálním komplexem skládajícím se z rhoptrií, mikroném, konoidu, subpelikulárních mikrotubulů, a jednoho nebo více polárních prstenců. Charakteristický je aktivní klouzavý pohyb sporozoitů (tzv. gliding).

Aconoidasida Mehlhorn *et al.*, 1980

Haemospororida Danilewsky, 1885

Piroplasmorida Wenyon, 1926

Nephromycida Cavalier-Smith, 1993, *emend.* Adl *et al.*, 2019

Conoidasida Levine, 1988

- zástupci s kompletním apikálním komplexem (včetně konoidu) přítomným minimálně ve všech nepohlavních, pohyblivých stádiích, tzv. zoitech.

Coccidia Leuckart, 1879

- vývoj gamet je intracelulární; zygota je pohyblivá zřídka; ze zygoty vznikají oocysty, uvnitř nichž jsou obvykle lokalizovány sporocysty.

Adeleorina Léger, 1911

Eimeriorina Léger, 1911

- mikrogamety a makrogamety se vyvíjejí nezávisle; zygota je nepohyblivá; sporozoity jsou obvykle uzavřeny uvnitř sporocysty, která se nachází v oocystě.

Gregarinasina Dufour, 1828

Archigregarinorida Grasse, 1953

Eugregarinorida Léger, 1900

Neogregarinorida Grasse, 1953

Cryptogregarinorida Cavalier-Smith, 2014, *emend.* Adl *et al.*, 2019

Blastogregarinea Chatton a Villeneuve, 1936, *emend.* Simdyanov *et al.*, 2018

1.3 Čeleď Eimeriidae

Skupina Eimeriorina se dělí na dvě čeledi, Eimeriidae a Sarcocystidae. Kokcidie čeledi Eimeriidae patří k nejpočetnějším zástupcům parazitických protist obratlovců. Vyznačují se poměrně složitým životním cyklem, ve kterém dochází ke střídání pohlavního a nepohlavního rozmnožování (McAllister *et al.*, 2017). Identifikace a determinace rodů a druhů kokcidií je založena na mnoha faktorech – například na morfologii oocyst, hostitelské specifitě, biologických charakteristikách, či na lokalizaci infekce v hostiteli (Pellérdy, 1974; Long, 1982; Duszynski a Wilber, 1997; Šlapeta *et al.*, 2000; Berto *et al.*, 2014). Většina tradičních taxonomických studií a popisů druhů je však založena pouze na morfologii vysporulovaných oocyst. Ukázalo se však, že některé morfologické znaky oocyst (např. délka a šířka oocyst, jejich tvar, délka a šířka sporocyst) jsou v průběhu vývoje kokcidií nekonzistentní, nebo se jejich rozměry mezi jednotlivými druhy vzájemně překrývají (Duszynski, 1971; Long a Joyner, 1984; Parker a Duszynski, 1986; Kvičerová a Hypša, 2013), což značně znesnadňuje, až mnohdy zcela znemožňuje determinaci druhu.

V současné době čeleď zahrnuje 18 rodů s jednohostitelským neboli monoxenním vývojovým cyklem. Většina druhů monoxenních kokcidií se vyznačuje vysokou hostitelskou specifitou, tj. schopností infikovat obvykle jen jeden živočišný druh. Vícehostitelský neboli heteroxenní vývojový cyklus je v rámci této čeledi výjimkou (Chroust *et al.*, 1998); patří sem například druh *Goussia carpelli* z rodu *Goussia*, parazitující u kaprovitých ryb (Jirků *et al.*, 2009).

1.3.1 Charakteristika významných rodů čeledi Eimeriidae

Caryospora

Zástupci tohoto rodu se vyznačují tvorbou jedné sporocysty s osmi sporozoity. Parazituji zejména v tenkém střevě hadů a dravých ptáků. Vývojový cyklus většiny druhů je výhradně monoxenní. U několika druhů byl však popsán fakultativně heteroxenní vývojový cyklus, při kterém dochází ke tvorbě specifických stádií, takzvaných karyocyst. Karyocysta představuje klidové, tzv. dormantní stádium, obsahující „spící“ sporozoity, tzv. hypnozoity (Upton *et al.*, 1984). Vývoj fakultativně heteroxenních druhů pak může probíhat dvěma způsoby. Infikuje-li se primární hostitel (pták, had) vysporulovanými oocystami, dojde u něj k vylučování oocyst, a tudíž ke stejnému průběhu jako při monoxenním typu vývoje. K odlišnému vývoji pak dochází u sekundárních (transportních) hostitelů (např. hlodavců), u kterých po pozření vysporulované oocysty dochází ke tvorbě karyocyst. Každá karyocysta pak obsahuje jeden hypnozoit. Tento hypnozoit se stává infekčním ve chvíli, kdy dravec či had pozře takto infikovaného hlodavce (Pellérdy, 1974; Chroust *et al.*, 1998).

Cyclospora

Zástupci rodu *Cyclospora* mají kulaté oocysty se dvěma sporocystami se Stiedovými tělísky. Každá sporocysta obsahuje dva sporozoity. Mají monoxenní vývojový cyklus. Parazituji u primátů a u člověka, v nichž se vyvíjejí uvnitř epiteliálních buněk tenkého střeva (Duszynski a Upton, 2001). Mohou způsobovat průjmová onemocnění. U člověka je řadíme mezi takzvané oportunní parazity, tj. parazity, kteří mohou vyvolat závažný klinický průběh infekcí u imunosuprimovaných osob (Ortega *et al.*, 1993, 1994).

Eimeria

Do tohoto rodu patří celá řada významných parazitů domácích a hospodářských zvířat (např. drůbeže, králíků, skotu, prasat apod.). Oocysty zástupců rodu *Eimeria* jsou obvykle vejčitého nebo elipsovitého tvaru a velikosti (délky) okolo 20 μm . Uvnitř oocysty se nacházejí čtyři sporocysty se Stiedovými tělísky. Stiedovo tělísko má podobu čepičky nacházející se na jednom pólu sporocysty; funguje jako „zátko“, pomocí které se sporocysty otevírají, aby mohlo dojít k uvolnění sporozoitů. Každá sporocysta obsahuje vždy dva sporozoity. Vývojový cyklus tohoto rodu je monoxenní (Pellérdy, 1974; Long, 1982).

Goussia

Oocysty tohoto rodu mají čtyři sporocysty, na nichž se nacházejí dvě chlopně spojené podélným švem. Ty slouží jako excystační struktury - sporocysty se jimi otevírají, aby mohlo dojít k uvolnění sporozoitů. Každá sporocysta obsahuje dva sporozoity. Stěna oocyst je zpravidla tenká a elastická, těsně obepínající sporocysty. Dalším z typických znaků rodu je absence rezidua oocysty. Většina druhů je monoxenních, avšak existují výjimky. Tento rod byl popsán u sladkovodních a mořských ryb a u obojživelníků (Jirků *et al.*, 2009).

Isospora

Oocysty rodu *Isospora* tvoří dvě sporocysty. V každé sporocystě se nacházejí čtyři sporozoity. Sporocysty mají Stiedovo tělísko. Jedná se většinou o parazity plazů a ptáků, zejména pěvců. Mají monoxenní vývojový cyklus (Long, 1982; Carreno a Barta; 1999, Barta *et al.*, 2005).

Tyzzeria

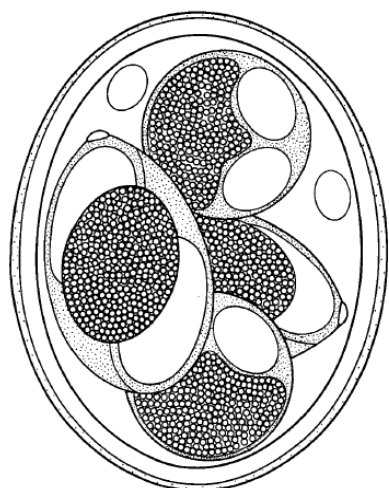
Rod *Tyzzeria* tvoří oocysty bez sporocyst. Každá oocysta obsahuje 8 volných sporozoitů, které jsou obklopeny tenkou vrstvou membrány. Parazituje například u kachen a hus. Vývojový cyklus je monoxenní (Long, 1982; Ghimire, 2010).

Wenyonella

Rod *Wenyonella* tvoří oocystu se čtyřmi sporocystami, v každé sporocystě se nacházejí čtyři sporozoiti. Typický je monoxenní vývojový cyklus podobný kokcidiím rodu *Eimeria* a *Isospora*. Tento rod parazituje u plazů (Pellérdy, 1974; Ghimire, 2010).

1.4 Rod *Eimeria*

Rod *Eimeria* je druhově nejpočetnějším rodem v rámci kmene Apicomplexa. Dosud bylo popsáno více než 1700 druhů kokcií rodu *Eimeria*, a to z různých hostitelů, zejména obratlovců (Duszynski a Upton, 2001). Pro rod je typický monoxenní vývojový cyklus. Po ukončení endogenního vývoje v hostiteli jsou nezralé (tzv. nevysporulované) oocysty vylučovány trusem do vnějšího prostředí, kde dozrávají do infekčního stádia, tzv. vysporulovaných oocyst. Vysporulovaná oocysta obsahuje čtyři sporocysty, v každé sporocystě se nacházejí dva sporozoity (Obr. 2). Některé druhy rodu *Eimeria* jsou veterinárně významné, zejména druhy infikující drůbež, skot nebo králíky, neboť mohou být vysoce patogenní. Mezi klinické projevy infekce střevními eimeriemi patří průjem, inapetence, anorexie, celková slabost až ataxie, které vedou ke snížení fitness hostitele, až k jeho smrti. Ve velkochovech hospodářských a farmových zvířat proto bývá prováděna řada hygienických opatření sloužících ke kontrole kokcidiózy, jako je například pravidelné důkladné čištění a dezinfekce. V současné době je účinná vakcinace proti kokcidióze způsobené zástupci rodu *Eimeria* k dispozici pouze pro kur domácí; pokusy o vytvoření vakcíny pro jiné druhy hospodářských zvířat (např. krůty, králíky) byly zatím neúspěšné (Florin-Christensen a Schnittger, 2018).



Obr. 2: Vysporulovaná oocysta *Eimeria vermiformis* (převzato z Ernst *et al.*, 1971).

Jednotlivé druhy rodu *Eimeria* lze rozlišovat na základě těchto znaků a charakteristik (Joyner a Long, 1974; Duszynski a Wilber, 1997; Tenter *et al.*, 2002; Berto *et al.*, 2014):

- tvar, velikost a morfologie oocyst, sporocyst a vnitřních struktur vysporulovaných oocyst
- druh hostitele, míra hostitelské specifity
- morfologie endogenních stádií a jejich lokalizace v hostiteli
- míra patogenity
- délka prepatentní a patentní periody, doba sporulace
- sekvence jednoho či více genů daného druhu eimerie

1.4.1 Životní cyklus kokcií rodu *Eimeria*

Životní cyklus kokcií rodu *Eimeria* je monoxenní, to znamená, že všechny jeho fáze probíhají v jednom hostitelském jedinci. Má fázi endogenní, k níž dochází v hostiteli, a zahrnuje nepohlavní i pohlavní rozmnožování. Po ní následuje fáze exogenní – zrání oocyst (**sporulace**), ke které dochází ve vnějším prostředí mimo organismus hostitele. Oocysty, které jsou do vnějšího prostředí vylučovány trusem hostitele, nejsou vysporulované. Stanou se tak až ve vnějším prostředí za vhodných podmínek (vhodná teplota a vlhkost, přítomnost vzdušného kyslíku). Vysporulované oocysty jsou odolné a mohou v prostředí přežívat i déle než rok (Duszynski a Upton, 2001; Chartier a Paraud, 2012).

Po pozření vysporulované oocysty vhodným hostitelem dochází k uvolnění sporozoitů ze sporocyst a následně i z oocyst. Tento jev se nazývá **excystace**. Za působení mnoha faktorů (tělesná teplota hostitele, redukční potenciál, faktory podmiňující excystaci) dochází k rozrušení stěny oocysty nebo k rozvolnění švů a Stiedových tělísek sporocysty, a následně pak k uvolnění sporozoitů (Duszynski a Upton, 2001; Chartier a Paraud, 2012).

K průniku sporozoitu do hostitelské buňky slouží organely apikálního komplexu. Penetrací sporozoity pronikají do epiteliálních buněk střeva, kde dochází k mitotickému dělení. Nepohlavní rozmnožování, **merogonie** (nazývaná též schizogonie), probíhá obvykle ve střevě a to v tenkém nebo v tlustém, v závislosti na konkrétním druhu eimerie (Chartier

a Paraud, 2012). Vzniklé meronty produkují merozoity, které se poté uvolňují z roztržené hostitelské buňky a iniciují další merogonii. Obvykle existuje několik (většinou 2-7) těchto nepohlavních generací, které se liší počtem a morfologií merozoitů (Duszynski a Upton, 2001; Votýpka *et al.*, 2016).

Merozoity poslední generace se po průniku do hostitelské buňky přemění v pohlavní stádia, gamonty. Dochází k takzvané **gametogonii**. Rozlišujeme samčí mikrogamonty a samičí makrogamonty. Samčí mikrogamonty se na rozdíl od samičích makrogamontů mnohokrát dělí za vzniku mikrogamet. Makrogamont se již nedělí, pouze roste, a připravuje se na oplození mikrogamontem; obsahuje jediné jádro a elektronově denzní tělíška nazývaná Wall Forming Bodies (WFB), tvořící stěny budoucí oocysty; existují dva typy těchto tělíšek - WFB I o průměru přibližně 1,6 μm , a WFB II o průměru až 1,8 μm . Po průniku mikrogamontu do hostitelské buňky napadené makrogamontem dochází k fúzi obou těchto haploidních stádií, a tudíž k oplození (Florin-Christensen a Schnittger, 2018). Vzniklé diploidní zygoty se následně vyvíjejí v oocysty, které jsou vylučovány do vnějšího prostředí trusem hostitele nevysporulované, a tudíž neinfekční. Jejich zrání (sporulace) tak musí být dokončeno ve vnějším prostředí. Celý vývojový cyklus obvykle trvá 1-3 týdny v závislosti na druhu eimerie a podmínkách prostředí (Pellérdy, 1974; Long, 1982; Duszynski a Upton, 2001; Votýpka *et al.*, 2016).

1.4.2 Hostitelská specifita kokcií rodu *Eimeria*

Termín hostitelská specifita vyjadřuje, do jaké míry je parazit přizpůsoben svému hostiteli/hostitelům a počtu druhů hostitele, které může úspěšně parazitovat. Je ovlivněna interakcí mnoha faktorů: hostitele a jeho vlastnostmi (pohlaví, stáří, výživný stav, stav imunitního systému, potravní strategie, chování), parazita (například jeho způsobem šíření), biotickými a abiotickými faktory prostředí, a v neposlední řadě také nejrůznějšími (ko)evolučními událostmi. Paraziti jsou přizpůsobeni konkrétnímu prostředí hostitele. Vysoce specifictí paraziti jsou silně přizpůsobeni svému hostiteli, což umožňuje jejich vyšší dlouhověkost v hostiteli. Paraziti s nižší hostitelskou specifitou jsou schopni využívat několik hostitelských druhů, což naopak usnadňuje možnost jejich šíření a zvyšuje jejich rozptyl (Poulin, 2007).

Paraziti rodu *Eimeria* jsou historicky považováni za vysoce hostitelsky specifické (Pellérdy, 1974; Long, 1982; Duszynski, 1986). Pokusy infikovat jiné než původní hostitele různými druhy eimerií většinou selhávaly; i přes několik protichůdných závěrů většina odborných prací však nakonec potvrdila poměrně vysokou hostitelskou specifitu eimerií. Ve většině experimentálních studií byla hostitelská specifita hodnocena dokončením endogenního vývoje v daném experimentálním hostiteli, tedy produkcí oocyst (De Vos, 1970; Duszynski, 1986; Kvičerová *et al.*, 2007). Přestože rod *Eimeria* patří k nejpočetnější skupině kokcidií, těchto studií bylo provedeno jen několik. Hostitelská specifita tak zůstává ne zcela objasněna. Přestože míra hostitelské specifity zástupců rodu *Eimeria* není dosud spolehlivě objasněna, je pro ně typické, že nedochází k jejich přenosu mezi jednotlivými čeledmi hostitelů. Existuje jediná dosud známá výjimka, a to *Eimeria chinchillae*, popsaná z činčily (čeleď Chinchillidae), která je schopna infikovat i několik různých rodů čeledi Muridae (De Vos, 1970). Mezi další parazity s nižší hostitelskou specifitou patří například *Eimeria sciurorum*, která je schopna infikovat hostitele různých druhů rodu *Sciurus* (Kvičerová *et al.*, 2020). Naopak k parazitům s vyšší hostitelskou specifitou řadíme například drůbeží nebo králičí eimerie (Wenyu *et al.*, 2020) nebo druh *Eimeria alorani*, který byl v Evropě prokázán pouze u jediného druhu myšice, *Apodemus agrarius* (Mácová *et al.*, 2018).

V současné době je na základě molekulárních dat zřetelná korelace mezi hostitelskou specifitou a fylogenetickými vztahy – jednotlivé druhy eimerií tvoří hostitelsky-specifické fylogenetické linie - například linie eimerií infikujících hospodářská zvířata, drůbež, králíky, hlodavce, ryby apod. (Morrison *et al.*, 2004; Matsuabayashi *et al.*, 2005; Kvičerová a Hypša, 2013).

1.4.3. Detekce kokcidií rodu *Eimeria* a determinace druhů

Pro studium a determinaci jednotlivých druhů rodu *Eimeria* je nutné dodržovat zásady správné manipulace. S oocystami je nutné zacházet opatrně, udržovat je životaschopné a nepoškozené. Po odběru vzorků trusu je ideální jejich fixace ve 2,5-4% vodném roztoku dichromanu draselného ($K_2Cr_2O_7$). Co nejdříve po odběru by měly být takto fixované vzorky přelity do Petriho misky, případně do otevřené vzorkovnice (bez uzávěru),

kde by měly být ponechány za pokojové teploty a za přístupu kyslíku po dobu 7-10 dnů, aby mohlo dojít ke sporulaci případných oocyst kokcií (Duszynski a Wilber, 1997).

Oocysty jsou vývojová stádia kokcií, která zajišťují odolnost parazita proti mechanickému poškození. Umožňují jedinci parazita přežít a zůstat déle infekční ve vnějším prostředí. Nejčastěji lze detekovat pomocí klasické světelné mikroskopie; velikost oocyst těchto protist většinou nepřesahuje 30 μm (Votýpka *et al.*, 2016). Mezi nejčastější metody detekce s následnou světelnou mikroskopií patří flotační metoda (Foreyt, 1990). Pro pozorování morfologických ultrastruktur, například apikálního komplexu, apikoplastu, či excystačních struktur, jsou upřednostňovány metody elektronové mikroskopie. K detekci kokcií lze použít také metody molekulární biologie založené na PCR s následným Sangerovým sekvenováním, nebo na „sekvenování nové generace“ (Next Generation Sequencing, NGS) (Votýpka *et al.*, 2016).

Popis a determinace druhů eimerií jsou založeny zejména na morfologii vysporulovaných oocyst. Pro identifikaci je vhodné analyzovat z jednoho vzorku alespoň 30-50 vysporulovaných oocyst, u kterých jsme schopni změřit délku a šířku oocyst, délku a šířku sporocyst, a vypočítat poměr délky a šířky oocyst a sporocyst (tzv. shape-index, SI). Pomocí tohoto poměru se popisuje tvar oocyst (například subsférický, vejčitý, elipsoidní, hruškovitý). Dále je důležitá stěna oocysty - počet jejích vrstev, přibližná tloušťka jednotlivých vrstev, a charakter jejího povrchu (hladký či drsný). K determinaci dále slouží informace o přítomnosti/nepřítomnosti morfologických struktur jako je mikropyle, pólová čepička, rezidua (oocysty, sporocysty), útvary na sporocystě (Stiedovo tělísko, substiedální a parastiedální tělísko, švy, hřebeny). Pro charakterizaci je také vhodné pořízení fotodokumentace a zhotovení perokresby oocysty s detailním popisem, a dále srovnání námi zjištěných oocyst s již popsány druhy ze stejného či příbuzných hostitelů (Duszynski a Wilber, 1997; Berto *et al.*, 2014).

Dalším kritériem pro determinaci druhu je hostitelská specifita. Je však nutné si uvědomit, že jednotlivé druhy kokcií nebývají zcela striktně hostitelsky specifické. Nález oocyst v novém hostitelském druhu nebo na nové lokalitě proto nemusí nutně znamenat objev nového druhu parazita (Berto *et al.*, 2014).

K determinaci druhu je rovněž možné použít metody molekulární biologie, například PCR amplifikaci specifických úseků DNA. Na základě srovnávacích analýz výsledných sekvencí daných markerů se sekvencemi uloženými ve veřejně přístupných databázích (například GenBank) lze identifikovat rod, někdy dokonce i druh kokcidie. Vhodná je amplifikace a porovnávání sekvencí několika různých genů (např. ribozomálních, mitochondriálních a plastidových). Tyto metody nejsou technicky náročné a jsou dostupné. Optimální pro spolehlivou determinaci druhu eimerií je kombinace všech (nebo alespoň několika) výše uvedených technik (Berto *et al.*, 2014).

1.5 Kokcidie rodu *Eimeria* u myši domácí (*Mus musculus*)

Myš domácí (*M. musculus*) je celosvětově nejběžněji používaným savčím modelovým organismem pro biomedicínský výzkum (Jarquín-Díaz *et al.*, 2019). Podle dostupných zdrojů však existuje pouze několik studií, které se zabývaly prevalencí kokcidií u volně žijících populací *M. musculus* (Jarquín-Díaz *et al.*, 2019). Z trusu *M. musculus* bylo popsáno několik druhů kokcidií rodu *Eimeria*. Níže uvádím detailnější informace o čtyřech nejčastěji se vyskytujících druzích (přehled ostatních dosud popsaných druhů kokcidií rodu *Eimeria* u *M. musculus* je uveden v Příloze (Tab. I).

E. falciformis

Průběh životního cyklu a vliv na hostitele jsou u této kokcidie relativně dobře prostudovány (Pellérdy, 1974). Endogenní vývoj probíhá ve slepém střevě a v horní polovině tlustého střeva (Haberkorn, 1970). Oocysty *E. falciformis* popsané z *M. musculus* měří $14-27 \times 11-24 \mu\text{m}$, a mají vejčitý, elipsoidní nebo subsférický tvar. Stěna oocyst je hladká a téměř bezbarvá. Reziduum oocysty je přítomno nebo chybí. Uvnitř sporocysty se vyskytují polární granula. Sporocysty jsou vejčitého tvaru, měří přibližně $10-12 \times 6-8 \mu\text{m}$, a mají Stiedovo tělísko. Sporocysty obsahují reziduum a dva podélně ležící sporozoity (Levine a Ivens, 1990).

E. ferrisi

E. ferrisi byla poprvé popsána na základě oocyst nalezených v trusu volně žijících *M. musculus* v okolí farmy Illinois v USA. Vysporulovaná oocysta měří $12-22 \times 13-19 \mu\text{m}$.

Oocysty jsou elipsoidního až subsférického tvaru s hladkou, bezbarvou stěnou, nemají mikropyle ani reziduum. Sporocysty obsahují velké množství malých granulí a měří 8-11 × 5-7 μm. Tato kokcidie je považována za vhodný modelový organismus pro studium nejrůznějších biologických a ekologických aspektů savčích kokcií (Levine a Ivens, 1990; Koudela a Černá, 1991).

E. papillata

Vysporulovaná oocysta *E. papillata* má nejčastěji subsférický, případně sférický tvar. Měří 18-26 × 16-24 μm. Oocysta má pouze jednu stěnu, která je hnědožluté barvy. Mikropyle chybí. Sporocysty měří 10-13 × 6-9 μm. Mají Stiedovo tělísko a reziduum. Reziduum sporocysty je tvořeno z mnoha malých granul, které jsou zformovány v masu nepravidelného tvaru, v níž se nacházejí sporozoity (Ernst *et al.*, 1971).

E. vermiformis

U tohoto druhu je relativně dobře prostudován životní cyklus i jeho vliv na hostitele. Většina informací pochází z laboratorních experimentů (Jarquín Díaz *et al.*, 2019). Vysporulovaná oocysta *E. vermiformis* měří 18 – 26 × 15 – 21 μm. Oocysta má elipsoidní tvar, někdy zužující se ke každému konci. Stěna oocysty je složena ze 2 vrstev, přičemž vnější vrstva je tenčí než vnitřní. Mikropyle a reziduum oocysty chybí. Sporocysty měří 11-14 × 6-10 μm. Chybí reziduum oocysty. Reziduum sporocysty je tvořeno z mnoha malých granul. Uvnitř každé sporocysty se nacházejí dva částečně stočené sporozoity (Ernst *et al.*, 1971).

1.6 Hlodavci jako součást biosféry a jako hostitelé infekčních agens

Hlodavci (řád Rodentia) jsou často považováni za škůdce, kteří způsobují ekonomické ztráty, znehodnocují potraviny, nebo dokonce ohrožují lidské zdraví, jelikož slouží jako rezervoáry mnoha zoonotických infekčních agens (Meerbug *et al.*, 2009). Bylo popsáno zhruba 1700 druhů hlodavců, ale pouze 5-10 % druhů způsobuje škody v zemědělství a v městském prostředí. V mnoha zemích konzumují někteří hlodavci velké množství zemědělských plodin, a snižují tak celkové výnosy (Stenseth *et al.*, 2003). Hlodavci patří k celosvětově rozšířeným savcům. Jsou zvýhodněni tím, že jsou malí, mají

vysokou schopnost reprodukce, a není pro ně problém najít si potravu. Hlodavci jsou důležitou součástí mnoha ekosystémů, protože mohou fungovat jako zdroj potravy predátorů či jako rozptylovači semen (Beltrame *et al.*, 2014). Bylo popsáno zhruba 1700 druhů hlodavců, ale pouze 5 - 10 % druhů způsobuje škody v zemědělství a v městském prostředí. V mnoha zemích konzumují někteří hlodavci velké množství zemědělských plodin, a snižují tak celkové výnosy (Stenseth *et al.*, 2003).

Nemoci přenášené hlodavci se mohou šířit různými způsoby. Buď přímou cestou (například pokousáním), nebo nepřímo prostřednictvím vody či potravin kontaminovaných močí či trusem hlodavců. K nemocem, které hlodavci přenášejí, patří například hantavirový plicní syndrom, což je akutně probíhající onemocnění způsobené viry rodu *Orthohantavirus*. K dalším onemocněním patří například leptospiróza, tularémie, a mnoho dalších. Hlodavci jsou také hostiteli ektoparazitů, například vši, roztočů a klíšťat (Meerburg *et al.*, 2009), a endoparazitů, jako jsou například tasemnice, parazitické hlístice, či kokcidie.

Kokcidie rodu *Eimeria* parazitující u hlodavců se dělí na dvě dobře odlišitelné fylogenetické linie. Při jejich bližším zkoumání bylo zjištěno, že se tyto linie liší přítomností (OR+) nebo absencí (OR-) rezidua oocysty (Zhao a Duszynski, 2001a, b). Podobný trend byl pozorován i u eimerií parazitujících u králíků (Kvičarová *et al.*, 2008). Reziduum oocysty se tvoří během sporulace a je jedním z důležitých morfologických znaků; jeho funkce však dosud zůstává neobjasněna. K zástupcům s přítomností rezidua patří například *Eimeria albigulae*, *Eimeria arizonensis* a *Eimeria reedi*. Mezi eimerie bez rezidua řadíme například *E. falciformis*, *E. papillata* nebo *Eimeria sevilletensis* (Zhao Duszynski, 2001b).

Pozdější analýzy však prokázaly, že toto rozdělení na dvě linie není u eimerií hlodavců zcela jednoznačné; například *Eimeria myoxi* (OR-) popsaná z plcha zahradního tvoří jakousi třetí, samostatnou linii (Kvičarová *et al.*, 2011), a u druhů eimerií parazitujících u myšic rodu *Apodemus* při klastrování nezáleží, zda mají nebo nemají reziduum oocysty (Kvičarová a Hypša, 2013; Mácová *et al.*, 2018).

1.7 Myš domácí (*Mus musculus*)

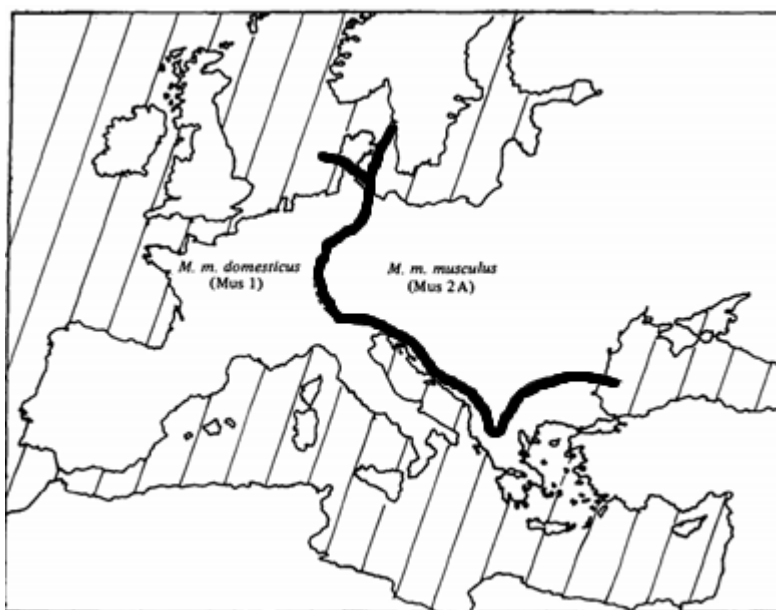
Mus musculus (Rodentia: Muridae: Murinae) je jedním z nejrozšířenějších druhů savců na světě. Vyskytuje se ve všech mírných a tropických oblastech, kromě oblastí tropické Afriky. Takto široké rozšíření pramení z neobvykle vysoké schopnosti tohoto druhu přizpůsobit se nejrůznějším podmínkám prostředí (např. chlad, přežívání v hloubce v trvalé tmě, nebo na rašelinistích). Je to všežravec, k rozmělnění potravy jí slouží výkonné žvýkací svaly a ostré řezáky. Je velmi agilní, dokáže se snadno protáhnout úzkými trhlinami, dobře šplhá, skáče i plave. Myši jsou vysoce geneticky adaptabilní a mají vyšší stupeň mutability, což v kombinaci s rychlým a efektivním rozmnožováním znamená, že se rychle přizpůsobují novým podmínkám (Latham a Mason, 2004; Anděra a Horáček, 2005).

Rozlišujeme dva typy populací *M. musculus* – komenzální a divoké. Komenzální žijí v těsném spojení s člověkem a jeho sídly. Mají tak snadný přístup k zásobám potravin. Divoké myši často žijí v norách ve volné přírodě. Komenzální populace nevykazují rozdíly v rozmnožování během roku na rozdíl od divokých populací, u kterých rozmnožování záleží na sezóně. Populace divokých myši jsou méně husté a mají sezónně nestabilní přísun potravin (Weber a Olsson, 2008).

M. musculus má vysokou reprodukční schopnost. Jejich generační časy jsou krátké, gravidita trvá přibližně 3 týdny, a jedinci se osamostatňují za měsíc po narození. Ve volné přírodě se rozmnožují sezónně; v budovách se za vhodných podmínek množí po celý rok. Podmínky prostředí určují počet vrhů. Ročně může mít tento druh 5-10 vrhů, v jednom vrhu bývá obvykle 4-7 jedinců (Anděra a Horáček, 2005). Myši se rodí v hnízdech slepé, hluché a bez srsti. Mláďata jsou vychovávána v hnízdech ve tvaru mísy umístěných na bezpečném místě. V prvních 2-3 týdnech života se spoléhají se zajištěním základních potřeb na matku. Rychle rostou a vyvíjejí se, postupně se u nich začíná objevovat pigmentace, srst, a sluchové vjemy (Latham a Mason, 2004).

Druh *M. musculus* zahrnuje tři hlavní poddruhy s různým geografickým rozšířením – *Mus musculus castaneus*, *Mus musculus domesticus* a *Mus musculus musculus*. Genetická a genomická data naznačují, že se tyto poddruhy začaly oddělovat před 350-500 tisíci lety (Phifer-Rixey a Nachman, 2015). Rozdělení na poddruhy proběhlo s největší

pravděpodobností na severu indického subkontinentu. *M. m. domesticus* se vyskytuje v západní Evropě a Středomořské pánvi, *M. m. musculus* ve střední Evropě až po severní Čínu, a *M. m. castaneus* v jihovýchodní Asii. Rozšíření do odlišných částí světa souvisí s lidskou činností. Expanze vytvořila zóny sekundárního kontaktu na periferii kontinentu. V Evropě *M. m. domesticus* a *M. m. musculus* vytvořily hybridní zónu (Boursot *et al.*, 1993). Hybridní zóny jsou definovány jako oblasti, kde se setkávají geneticky odlišné populace, které produkují hybridy. V oblasti sekundárního kontaktu *M. m. domesticus* a *M. m. musculus* existuje úzká zóna hybridizace. Tato zóna prochází přes Jutský poloostrov a od pobaltského pobřeží východního Holštýnska přes centrální Evropu a Balkánský poloostrov k pobřeží bulharského Černého moře (Božíková *et al.*, 2005) (Obr.3).



Obr. 3: Mapa Evropy znázorňující hybridní zónu mezi *M. m. domesticus* a *M. m. musculus*, která je naznačená linií vedoucí od Dánska po Černé moře (převzato z Vanlerberghe *et al.*, 1986).

Myš domácí je běžný druh hlodavce vyskytující se na celém území České republiky. Nalezneme ji často na různých typech stanovišť, např. v blízkosti lidských obydlí, ale i na extrémních stanovištích jako jsou hlubinné doly, rašeliniště, vrcholky hor. Většinu území naší republiky obývá *M. musculus musculus*, nejzápadnější část území České republiky obývá poddruh *M. m. domesticus* (Anděra, 2011; Sak *et al.*, 2011; Kváč *et al.*, 2013).

2. CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce byla detekce kokcií čeledi Eimeriidae ve vzorcích DNA, izolované z trusu myši domácích (*M. musculus*), pomocí metod molekulární biologie (PCR amplifikace vybraných genů, elektroforéza, sekvenování Sangerovou metodou) v kombinaci s analýzami počítačovým softwarem (molekulárně-fylogenetické analýzy). Jednalo se přibližně o 150 vzorků DNA získaných z různých lokalit výskytu poddruhů *M. musculus musculus* a *M. musculus domesticus* v západní části České republiky a ve východní části Německa.

Dílčí cíle této práce byly následující:

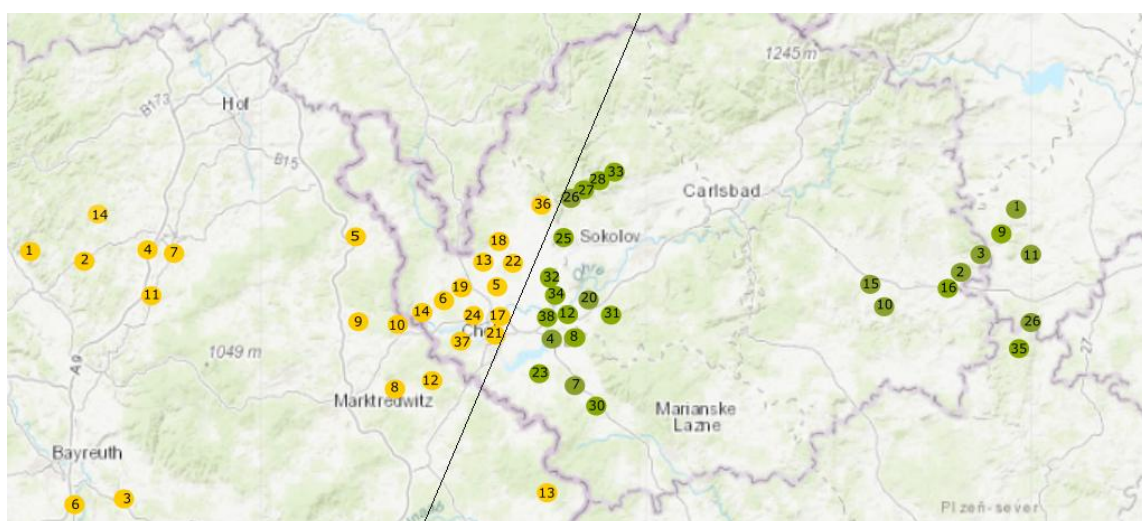
- Zjištění prevalence kokcií u těchto hlodavců na uvedených lokalitách.
- Analýza druhového spektra kokcií parazitujících u *M. musculus* na uvedených lokalitách.
- Rekonstrukce fylogenetických vztahů jednotlivých druhů zjištěných kokcií parazitujících *M. musculus*.
- Zhodnocení, zda mezi dvěma poddruhy myši existují významné rozdíly v prevalenci nebo v druhovém spektru kokcií.

3. METODIKA

3.1 Původ vzorků

Pro účely bakalářské práce jsem měla k dispozici již vyizolovanou DNA ze vzorků trusu *M. musculus* z různých lokalit v západní části České republiky a východní části Německa, včetně lokalit nacházejících se v takzvané hybridní zóně *M. musculus musculus* a *M. musculus domesticus* (Obr. 4, Tab. 1-2). Hlodavci byli odchyceni v roce 2009 převážně do dřevěných živolovných pastí kladených v blízkosti lidských obydlí. Vzorky vyizolované DNA mi poskytl prof. Ing. Martin Kváč, Ph.D. z Parazitologického ústavu Biologického centra AV ČR. Celkem se jednalo o 145 vzorků DNA, která byla izolována komerčním kitem (GeneAll Exgene Stool DNA Mini Kit; GeneAll Biotechnology Co., Ltd., Korea).

Obr. 4: Lokality odchytů *M. musculus* (zdroj, autor 2021, vytvořeno v <https://www.mapotic.com/>¹).



žlutá barva – *M. m. domesticus*; zelená barva – *M. m. musculus*; černá přímka znázorňuje průběh hybridní zóny.

Tab. 1: Lokality odchytů *M. musculus* s negativními a pozitivními vzorky na přítomnost kokciidií v České republice.

Lokalita		Kód vzorku					
1	Chrástany, okr. Louny	3042	3050				
2	Vrbice, okr. Karlovy Vary	3044	3065	3073	3077	3078	
3	Vrbička, okr. Louny	3047	3048	3046			
4	Obilná, okr. Cheb	3049	3052	3063	3064	3071	3090
5	Nový Drahov, okr. Cheb	3051	3054	3056	3057	3055	
6	Lužná, okr. Cheb	3053					
7	Dolní Žandov, okr. Cheb	3061	3062	3096			
8	Odrava, okr. Cheb	3070	3074	3097	3066		
9	Nepomyšl, okr. Louny	3068	3088				
10	Kozlov, okr. Karlovy Vary	3081	3082				
11	Kryry, okr. Louny	3083					
12	Mostov, okr. Cheb	3089	3098				
13	Starý rybník, okr. Cheb	3092					
14	Hůrka, okr. Cheb	3107	3108	3123			
15	Teleč, okr. Karlovy Vary	3109	3110				
16	Týniště, okr. Karlovy Vary	3111	3112				
17	Jindřichov, okr. Cheb	3113	3114	3115	3116		
18	Křižovatka, okr. Cheb	3122	3143	3164	3171		
19	Poustka, okr. Cheb	3127	3159	3204			
20	Chlum Sv. Máří, okr. Sokolov	3128	3129	3131			
21	Dolní Dvory, okr. Cheb	3133	3148				
22	Nová Ves, okr. Cheb	3139	3182	3183			
23	Lipová, okr. Cheb	3152	3187	3191			
24	Střížov, okr. Cheb	3155	3157	3168	3178		
25	Kopanina, okr. Cheb	3167	3180	3181			
26	Pastuchovice, okr. Plzeň-sever	3170	3172	3173	3225		
27	Květná, okr. Cheb	3174	3175	3176	3177		
28	Krajková, okr. Sokolov	3184	3185				
29	Nový Kostel, okr. Cheb	3216	3189				
30	Stará Voda, okr. Cheb	3194					
31	Rudolec, okr. Sokolov	3214	3196				
32	Děvín, okr. Cheb	3202					
33	Josefov, okr. Sokolov	3203					
34	Milhostov, okr. Cheb	3205					

35	Žihle, okr. Plzeň - sever	3217					
36	Hrzín, okr. Cheb	3221					
37	Dolní Pelhřimov, okr. Cheb	3222					
38	Nebanice, okr. Cheb	3100	3102				

červená barva – vzorek pozitivní na přítomnost eimerií; zelená barva – vzorek negativní na přítomnost eimerií

Tab. 2: Lokality odchyťů *M. musculus* s negativními a pozitivními vzorky na přítomnost kokcií v Německu.

Lokalita		Kód vzorku					
1	Kübelhof, okr. Kulmbach	3059	3060	3126	3142	3190	3125
2	Weickenreuth, okr. Hof	3076	3080				
3	Emtmannsberg, okr. Bayreuth	3104	3117	3124			
4	Plösen, okr. Hof	3105	3106				
5	Eckarsreuth, okr. Bayreuth	3118	3101	3158	3161	3165	
6	Ottmansreuth, okr. Bayreuth	3119	3120	3150	3160	3208	3210
7	Straas, okr. Hof	3121	3140	3144			
8	Wolfsbühl, okr. Tirschenreuth	3134	3135				
9	Neuenreuth, okr. Wunsiedel im Fichtelgebirge	3136	3137	3138	3145		
10	Hohenberg, okr. Wunsiedel im Fichtelgebirge	3141	3147	3151			
11	Friedmamdorf, okr. Hof	3162					
12	Munckenreuth, okr. Tirschenreuth	3163	3179				
13	Hilterhof, okr. Tirschenreuth	3166	3169	3206	3207		
14	Lehsten, okr. Hof	3198	3199	3200	3201	3224	

modrá barva – vzorek pozitivní na přítomnost eimerií; žlutá barva – vzorek negativní na přítomnost eimerií

3.2 Molekulární analýzy

3.2.1 PCR

K namnožení (amplifikaci) DNA vyizolované ze vzorků trusu *M. musculus* byla použita metoda polymerázové řetězové reakce (PCR, Polymerase Chain Reaction). Pro tuto reakci byly použity primery specifické pro parazity skupiny Eimeriorina, amplifikující mitochondriální gen pro cytochromoxidázu c podjednotku I (COI), plastidový gen Open Reading Frame 470 (ORF 470), cytochromoxidázu c podjednotku III (COIII), a malou ribozomální podjednotku (18S rRNA) (Tab. III).

Tab. 3: Primery použité pro PCR reakci.

Amplifikovaný gen	Sekvence primeru (5'-3')
COI	forward: GG TTCAGGTGTTGGTTGGAC
	reverse: ATCCAATAACCGCACCAAGAG
ORF 470	forward: GATGATATATCTTATTATTCAATTCCTT
	reverse: TCCAATATGTAACATTTTATTTCC
COIII	forward: AGAAAACCTAAAATCATCATGT
	reverse: AAGTGAGTTCGCATGTTTAC
18S rRNA	forward: GAAACTGCGAATGGCTCATT
	reverse: CTTGCGCCTACTAGGCATTC

Celkový objem jedné PCR reakce činil 25 μ l, pro amplifikaci jednoho vzorku byly použity chemikálie v následujících objemech:

- 2 μ l vyizolované DNA
- 0,5 μ l primer F (20 pmol/ μ l; Generi-Biotech, Česká republika)
- 0,5 μ l primer R (20 pmol/ μ l; Generi-Biotech, Česká republika)
- 3,7 μ l PPP Combi PPP Master Mix (Top-Bio s.r.o., Česká republika)
- 18,3 μ l PCR H₂O

Tyto složky byly pečlivě napipetovány do mikrozkušavek, které byly následně vloženy do termocyklieru (Mastercycler X50s; Eppendorf, Německo), v němž za specifických podmínek v závislosti na konkrétním genu proběhla amplifikace (Tab. 4).

Cyklus tří kroků - denaturace, annealing a elongace - byl u COI a ORF 470 opakován 35×, a u genů COIII a 18S rRNA 30×.

Tab. 4: PCR programy pro amplifikaci jednotlivých genů.

COI			ORF 470		
Krok PCR	Teplota [°C]	Čas [s]	Krok PCR	Teplota [°C]	Čas [s]
Úvodní denaturace	95	30	Úvodní denaturace	95	30
Denaturace	94	45	Denaturace	92	45
Annealing	55	45	Annealing	50	45
Elongace	72	60	Elongace	72	90
Extenze	72	600	Extenze	72	600
COIII			18S rRNA		
Krok PCR	Teplota [°C]	Čas [s]	Krok PCR	Teplota [°C]	Čas [s]
Úvodní denaturace	95	30	Úvodní denaturace	95	30
Denaturace	94	45	Denaturace	92	45
Annealing	48	45	Annealing	53	45
Elongace	72	60	Elongace	72	600
Extenze	72	600	Extenze	72	600

3.2.2 Elektroforéza

Výsledek PCR byl vizualizován elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Do Ehrlenmayerovy baňky bylo naváženo 0,5 g agarózy (PCR agarose; Top-Bio s.r.o., Česká republika) a přidáno 50 ml 1% TAE (Tris Acetát EDTA) pufru (Merck, Německo). V mikrovlnné troubě byla směs uvedena do varu, a poté k ní bylo přidáno fluorescenční barvivo GelRed® (Nucleic Acid Stain, Biotum) (50ml/2µl), které zajišťuje vizualizaci PCR produktů. Takto vzniklá směs byla následně vylita do vaničky s hřebenem, a ponechána tuhnout přibližně 30 minut do konzistence gelu. Gel byl přenesen do elektroforézové vany, kde byl přelit dostatečným množstvím 1% TAE pufru tak, aby byly všechny jamky ponořeny. Ke stanovení velikosti PCR produktů byl použit 1kb ladder (GeneRuler 1kb DNA

Ladder; Thermo Fisher Scientific, USA), který byl o objemu 4 μ l napipetován samostatně do jedné z jamek. Do dalších jednotlivých jamek byly napipetovány PCR produkty o objemu 6 μ l. Elektroforéza probíhala při 100V přibližně 25 minut. Výsledky byly vizualizovány pomocí UV transiluminátoru (UVITEC, Velká Británie) s programem nastaveným na ultrafialovou fluorescenci (UV). Tento přístroj také umožnil ukládání fotografií. Na základě výsledků elektroforézy bylo vyhodnoceno, zda je vzorek pozitivní nebo negativní na přítomnost kokcií skupiny Eimeriorina (Obr. 5).



Obr. 5: Vizualizace PCR produktů na 1% agarózovém gelu s negativními a pozitivními výsledky (zdroj, autor 2021).

jamky: 1 – 1kB DNA ladder; 2,3 – negativní výsledek; 4-6 – pozitivní výsledek; 7-11 – negativní výsledek; 12 – negativní kontrola.

3.2.3 Enzymatické čištění PCR produktů

Pozitivní PCR produkty o požadované velikosti byly enzymaticky přečištěny pomocí enzymů Exo I (Exonuclease I z *Escherichia coli*, 20U/ μ l) a FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase, 1U/ μ l) (Thermo Fisher Scientific, USA). Přímě do mikrozkušavky k PCR produktu bylo přidáno 0,2 μ l každého z uvedených enzymů. Enzymatické čištění pozitivních PCR produktů probíhalo v termocykleru za níže uvedených podmínek:

1. 37 °C 15 min
2. 80 °C 15 min

Po enzymatickém přečištění byly vzorky odeslány do firmy MacroGen Europe B.V. (Amsterdam, Nizozemí) na osekvenování Sangerovou metodou. K sekvenaci byly použity stejné primery jako pro PCR.

3.3 Zpracování sekvencí, fylogenetické analýzy

3.3.1 Zpracování sekvencí

Kvalita získaných sekvencí byla zkontrolována v programu Sequence Scanner v.1.0 (Applied Biosystems, USA), ve kterém byly poté sekvence i ořezány. Následně byla identita sekvencí ověřena pomocí algoritmu BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>²). Kvalitní sekvence (tj. bez smíšeného signálu, s jednoznačnými nukleotidovými bázemi) identifikované jako kokcidie byly dále upraveny v programu EditSeq v.5.05 (DNASTAR Inc., USA). U protein-kódujících sekvencí bylo nutné ověřit správnost čtecího rámce. Toto ověření probíhalo pomocí translace do proteinu. Pokud byl čtecí rámec posunut, bylo nutné ho opravit do správné formy. Dílčí sekvence téhož vzorku získané sekvenací s každým z obou primerů (forward a reverse) byly složeny dohromady v jedinou sekvenci (konsenzus) pomocí programu Seqman II v. 5.05 (DNASTAR Inc., USA). Takto zkontrolované a upravené sekvence byly uloženy ve formátu potřebném pro vytvoření alignmentu.

3.3.2 Fylogenetické analýzy

Pro každý analyzovaný gen (COI, COIII, 18S rRNA, ORF 470) byl vytvořen samostatný dataset. Každý dataset obsahoval sekvence kokcidií hlodavců a dalších druhů živočichů stažené z databáze GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>³), a mnou získané a upravené sekvence eimerií z *M. musculus*. Přístupové kódy (accession numbers) sekvencí z databáze GenBank použitých v analýzách jsou zobrazeny na výsledných fylogenetických stromech (Obr. 6-9). V programu BioEdit Sequence Alignment Editor

v.7.2.6.1 (Hall, 1999) byl pomocí algoritmu ClustalW sestrojen alignment, který byl poté manuálně upraven (ořezán) na jednotnou délku. Sekvence protein-kódujících genů (COI, COIII a ORF 470) byly alignovány jako proteiny; pro další zpracování byl pak alignment převeden zpět do nukleotidové podoby. Sekvence genů, které proteiny nekódují (18S rRNA), byly alignovány jako nukleotidy. Takto upravené alignmenty byly uloženy v odpovídajících formátech (FASTA a PHYLIP), a následně použity pro fylogenetické analýzy. Fylogenetické vztahy byly rekonstruovány metodou Maximální věrohodnosti (Maximum likelihood) v programu PHYML v.2.4.3 (Guindon a Gascuel, 2003). Nejvhodnější evoluční model GTR + Γ + I byl vybrán programem SMS: Smart Model Selection (Lefort *et al.*, 2017; www.atgcmontpellier.fr/sms/⁴). Bootstrapové hodnoty byly počítány pro 1000 replikací. K vizualizaci výsledných fylogenetických stromů byl použit program TreeView v.1.6.6 (Page, 1996), k závěrečné úpravě fylogenetických stromů byl použit program Adobe Illustrator v.25.2 (Adobe Systems Inc.).

4. VÝSLEDKY

Na základě PCR screeningu vzorků DNA pomocí amplifikace genu COI bylo z celkového počtu 145 vzorků 43 (tj. 30 %) pozitivních na přítomnost kokcií rodu *Eimeria* (Tab II); prevalence u *M. m. musculus* činila přibližně 35 % (20/57) a prevalence u *M. m. domesticus* 26 % (23/88) (Tab. 5). Analýzou BLAST bylo prokázáno, že ve 42 případech se jednalo o druh *E. ferrisi* (20 u *M. m. musculus*, a 22 u *M. m. domesticus*), a v jednom případě o druh *E. falciformis* (u *M. m. domesticus*). Z celkového počtu 43 pozitivních vzorků jsem však získala pouze 21 kvalitních sekvencí COI, které bylo možné použít pro fylogenetické analýzy. Zbylých 22 sekvencí (nepoužitelných do analýz) mělo smíšený signál nebo nejednoznačné nukleotidové báze, nebo byly příliš krátké. Finální dataset pro gen COI obsahoval celkem 78 sekvencí, z toho 57 sekvencí bylo převzato z databáze GenBank; v datasetu byly kromě eimerií z *M. musculus* a dalších hlodavců zahrnuty také sekvence eimerií z králíků, vačnatců, drůbeže a jiných ptáků. Výsledný alignment byl ořezán na délku 669 bp. Fylogenetickou analýzou genu COI byla potvrzena přítomnost 2 druhů eimerií, a to *E. ferrisi* (20 sekvencí), a *E. falciformis* (jedna sekvence) (Obr. 6). Skupina sekvencí *E. ferrisi* byla rozdělena na několik podskupin lišících se v jednotkách nukleotidů. Nukleotidově zcela totožné sekvence byly zaznamenány u tří vzorků (3110, 3148 a 3170). Sekvence *E. falciformis* (3140) se lišila od sekvence *E. falciformis* z databáze GenBank v jednom nukleotidu. Vzorek č. 3141 byl velmi odlišný a byl přiřazen k eimeriím z vačnatců (Obr. 6).

Pomocí amplifikace plastidového genu ORF 470 bylo prokázáno 10 *Eimeria*-pozitivních vzorků z celkového počtu 145 analyzovaných vzorků DNA. Prevalence tak činila pouhých 7 %. U obou poddruhů byla zaznamenána shodná prevalence, a to 3,5 % (Tab. 5). Z těchto vzorků byly 3 sekvence kvalitní a použitelné do fylogenetických analýz. Dataset připravený pro fylogenetickou analýzu tvořilo celkem 36 sekvencí, včetně sekvencí hlodavců, králíků a kuru z databáze GenBank. Výsledný alignment byl ořezán na délku 602 bp. Pomocí fylogenetické analýzy bylo zjištěno, že všechny tři sekvence patří druhu *E. ferrisi* získanému z *M. m. musculus* z různých lokalit (Obr. 7).

Analýzou genu COIII jsem získala druhý nejvyšší počet kvalitních sekvencí použitelných do fylogenetických analýz. Z důvodu časové tísně byla PCR provedena pouze u vzorků, které byly *Eimeria*-pozitivní v genu COI (tj. 43 vzorků). Z celkového počtu 43 vyšetřených vzorků bylo 19 pozitivních na přítomnost kokcií rodu *Eimeria*. Celková prevalence na základě těchto dat činila přibližně 44 %; prevalence u poddruhu *M. m. musculus* byla 26 % (11/43), u *M. m. domesticus* 19 % (8/43). Z pozitivních vzorků bylo použito do fylogenetických analýz 14 kvalitních sekvencí. Výsledný dataset připravený pro fylogenetickou analýzu obsahoval celkem 63 sekvencí. Tvořily ho sekvence eimerií z *M. musculus* a dalších hlodavců, ptáků, králíků, a také zástupci rodu *Cyclospora* a *Isospora*. Z datasetu byl vytvořen alignment ořezaný na délku 661 bp. Fylogenetický strom rozdělil eimerie z *M. musculus* na tři různé druhy; i) *E. falciformis* (3 sekvence; 2 z *M. m. musculus* a 1 z *M. m. domesticus*), ii) větev čítající deset sekvencí, které jsem označila jako *Eimeria* sp. ex *M. musculus*, jelikož nebylo možné s jistotou určit, o který druh se jedná, a iii) samostatnou sekvenci vzorku 3122 z *M. m. domesticus*, zcela nepříbuznou skupině hlodavců – byla nejpríbuznější *E. mephitidis* ze skunka pruhovaného, který patří mezi šelmy (Obr. 8).

Stejným postupem jako u genu COIII (tj. pouze u vzorků, které byly pozitivní v genu COI) byla provedena ještě amplifikace genu 18S rRNA. Z celkem analyzovaných 43 vzorků DNA jich bylo 17 pozitivních na přítomnost kokcií rodu *Eimeria*. Celková prevalence činila 40 % (17/43); u poddruhu *M. m. musculus* činila prevalence přibližně 19 % (8/43) a u *M. m. domesticus* 21 % (9/43) (Tab. 5). Do fylogenetických analýz byly použity pouze 3 kvalitní sekvence. S nimi byl vytvořen dataset obsahující celkem 78 sekvencí eimerií z *M. musculus*, ostatních hlodavců, králíků, kuru a dalších zástupců, který byl ořezán na výslednou délku 1325 bp. Fylogenetickou analýzou genu 18S rRNA bylo zjištěna přítomnost 2 druhů eimerií, a to *E. ferrisi* (2 sekvence z *M. m. domesticus*) a *E. falciformis* (1 sekvence z *M. m. musculus*) (Obr. 9).

Tab 5: Přehled prevalencí eimerií zjištěných na základě analýz jednotlivých genů.

Analyzovaný gen	Celková prevalence [%]	Prevalence u <i>M. m. musculus</i> [%]	Prevalence u <i>M. m. domesticus</i> [%]
COI	30	35	26
ORF 470	7	3,5	3,5
COIII	44	26	19
18S rRNA	40	19	21

Nejvíce kvalitních sekvencí použitelných do fylogenetických analýz se mi tedy podařilo získat amplifikací genu COI. Vzorky s čísly 3077, 3082, 3139, 3142, 3148 a 3162 (v COI všechny určeny jako *E. ferrisi*) jsem ve fylogenetickém stromu COIII označila jako *E. sp. ex M. musculus*, a to z toho důvodu, že je nebylo možné jednoznačně zařadit do druhu. Pravděpodobně se jedná rovněž o *E. ferrisi*, avšak nelze to tvrdit s jistotou, jelikož pro druh *E. ferrisi* zatím není dostupná žádná sekvence COIII v databázi GenBank, tudíž nemáme možnost porovnání. U analýzy genu 18S rRNA byly vzorky č. 3142 a 3148 stejného druhu jako u COI, a to *E. ferrisi*; vzorek č. 3061 vyšel v analýze 18S rRNA i COIII jako *E. falciformis*.

Tab. 6: Sekvence *E. ferrisi* jednotlivých genů použité ve fylogenetických analýzách.

Druh eimerie, kód vzorku	Analyzovaný gen			
	COI	ORF 470	COIII	18S rRNA
<i>E. ferrisi</i>				
3048	✓	-	-	-
3049	✓	-	-	-
3065	✓	-	-	-
3073	✓	-	-	-
3077	✓	-	✓	-
3081	✓	-	-	-
3082	✓	-	✓	-
3083	-	-	✓	-
3110	✓	-	-	-

3119	✓	-	-	-	
3120	✓		-	-	
3129	-	✓	✓	-	
3131	✓	-	-	-	
3139	✓	-	✓	-	
3142	✓	-	✓	✓	
3144	-	-	✓	-	
3148	✓	-	✓	✓	
3150	✓	-	-	-	
3160	✓	-	-	-	
3162	✓	-	✓	-	
3170	✓	✓	-	-	
3174	-	✓	-	-	
3175	-	-	✓	-	
3189	✓	-	-	-	
Celkový počet					
	24	19	3	10	2

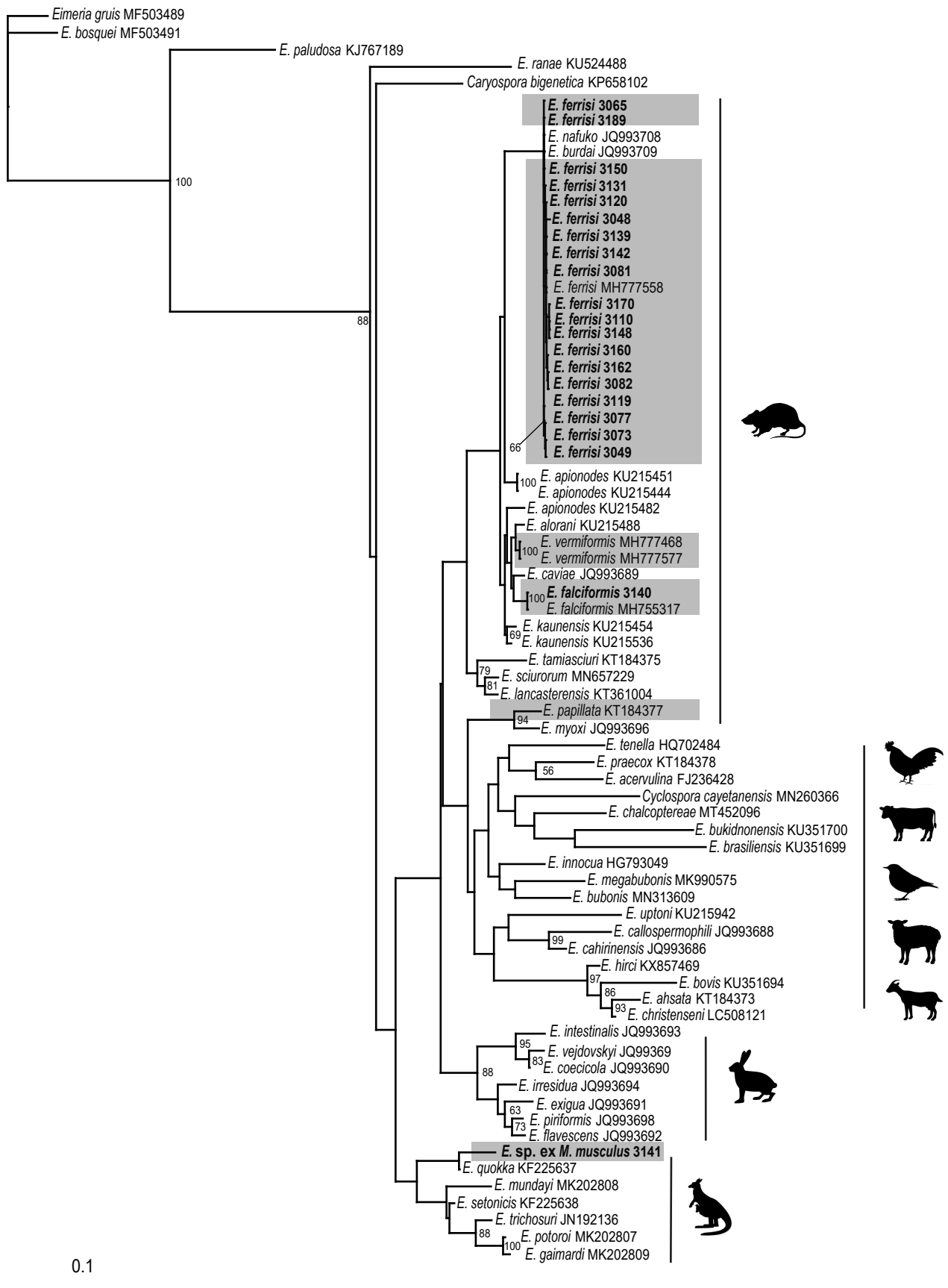
Tab. 7: Sekvence *E. falciformis* jednotlivých genů použité ve fylogenetických analýzách.

Druh eimerie, kód vzorku	Analyzovaný gen				
	COI	ORF 470	COIII	18S rRNA	
<i>E. falciformis</i>					
3052	-	-	✓	-	
3061	-	-	✓	✓	
3140	✓	-	✓	-	
Celkový počet					
	5	1	0	3	1

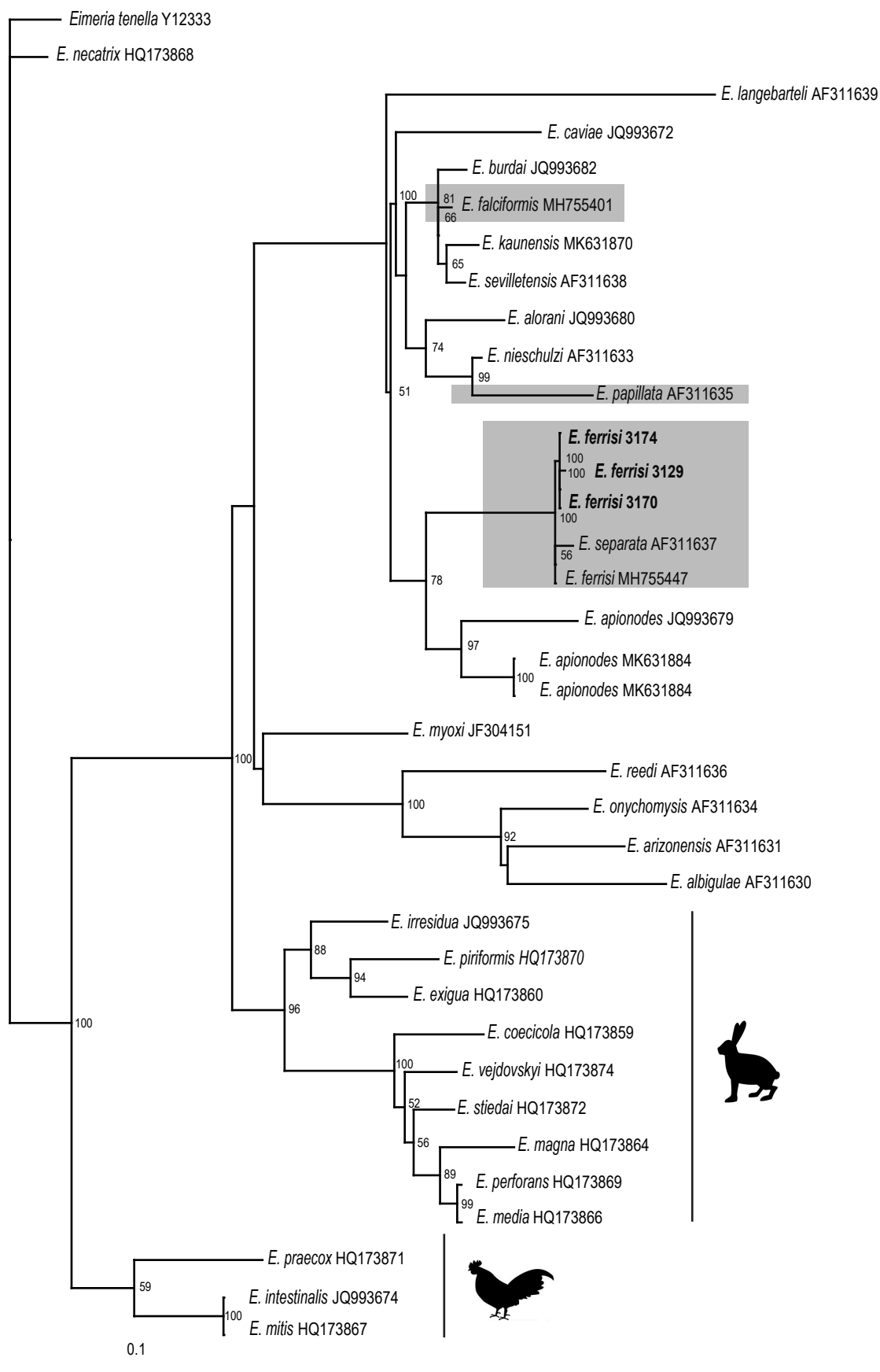
Tab. 8: Sekvence vzorků pozitivních na přítomnost blíže neurčených druhů rodu *Eimeria* získané PCR analýzou jednotlivých genů a použité ve fylogenetických analýzách.

Druh eimerie	Analyzovaný gen				Fylogeneticky nejpříbuznější taxon
	COI	ORF 470	COIII	18S rRNA	
<i>Eimeria</i> sp.					
3122	-	-	✓	-	<i>E. mephitidis</i>
3141	✓	-	-	-	<i>E. quokka</i>

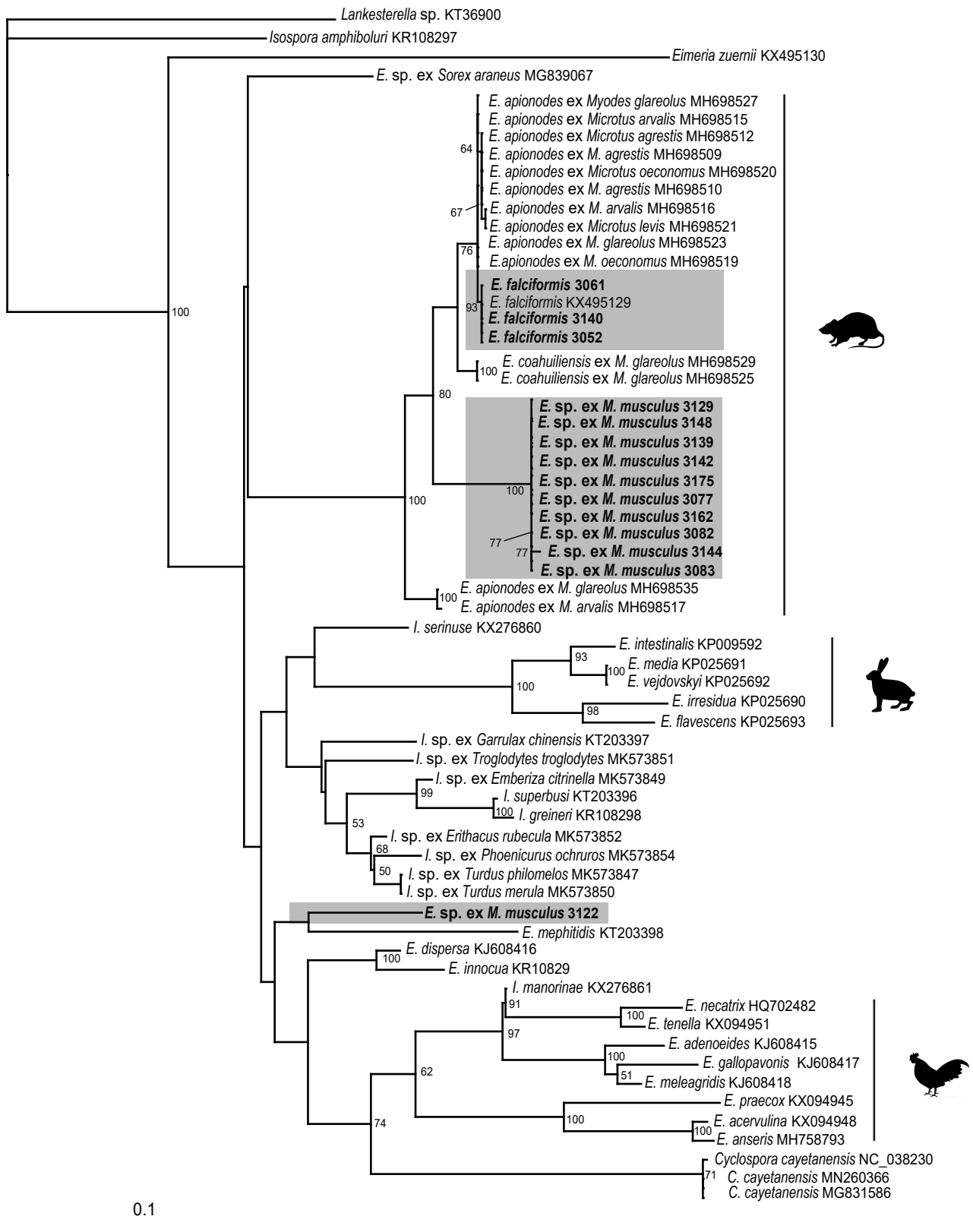
Vzorky, které jsem měla k dispozici, pocházely celkem z 52 lokalit. Většina lokalit se vyskytovala v západní části České republiky (38 lokalit) a ve východní části Německa (14 lokalit) (Tab. 1-2). Podle průběhu hybridní zóny byly určeny lokality s výskytem *M. m. domesticus* a *M. m. musculus* (Tab. III). Vzorky identifikované jako *M. m. domesticus* pocházely z celkem 30 odlišných lokalit, na zbylých 22 lokalitách se vyskytovala *M. m. musculus*. Prevalence eimerií se u těchto dvou poddruhů významně nelišila. Prevalence eimerií vztažená k celkovému počtu analyzovaných vzorků byla u *M. m. domesticus* 26 % a u *M. m. musculus* 35 %. Z celkového počtu 43 pozitivních jedinců bylo téměř vyrovnané i zastoupení pohlaví; infikovaných bylo 51 % samců (22/43) a 49 % samic (21/43). Zjištěná prevalence na základě pohlaví se tedy u vzorků *M. musculus* výrazně nelišila.



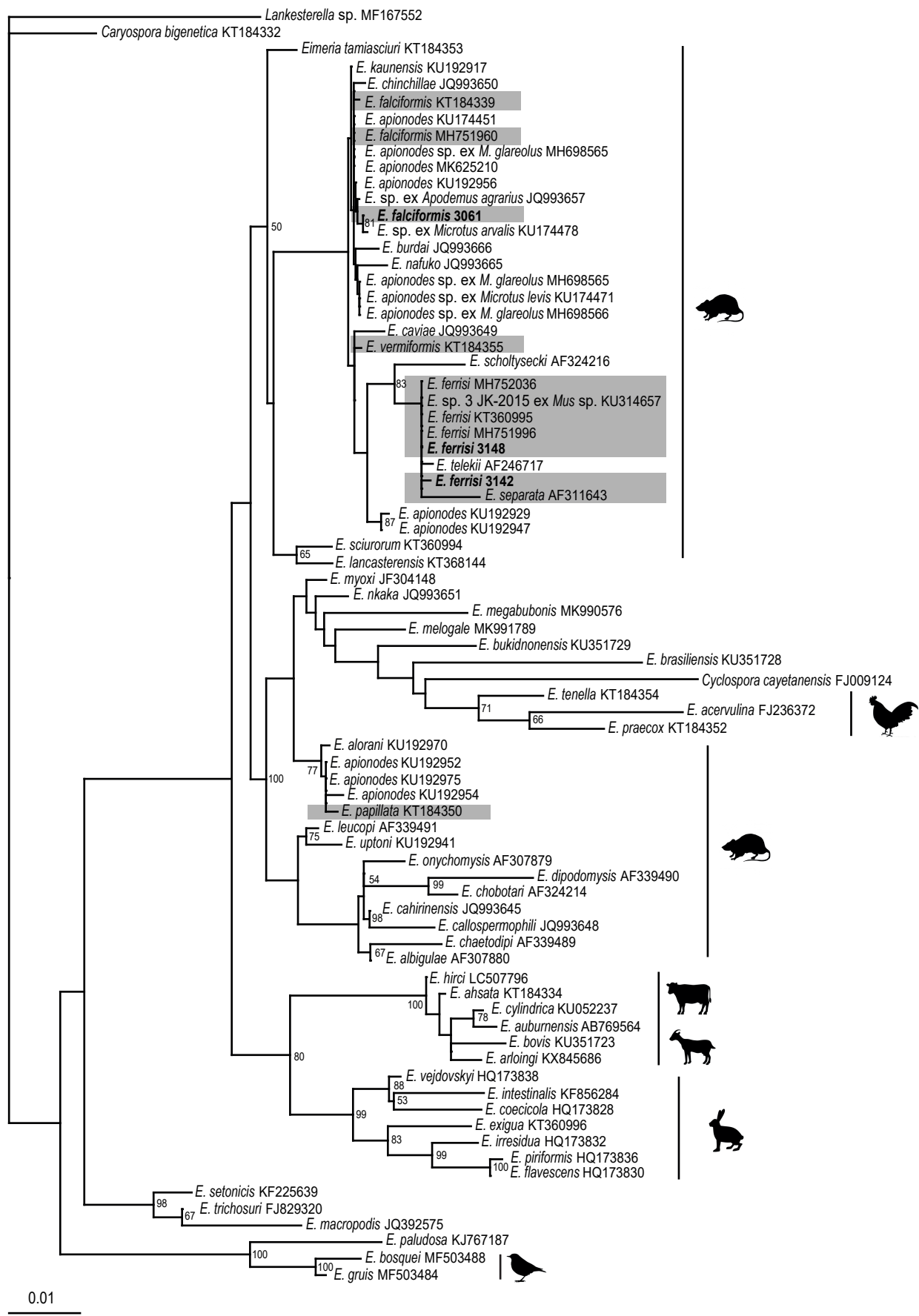
Obr. 6: Fylogenetický strom získaný na základě Maximum likelihood analýzy sekvencí genu COI a parametrů uvedených v kapitole 3.3.2. Číselná hodnota uzlů odpovídá bootstrapovým hodnotám (hodnoty menší než 50 % nejsou uvedeny). Strom je zakořeněn druhem *Eimeria gruis*. Sekvence eimerií pocházejících z *M. musculus* jsou označeny šedými obdélníky, mnou získané sekvence jsou vyznačeny tučným písmem.



Obr. 7: Fylogenetický strom získaný na základě Maximum likelihood analýzy sekvencí genu ORF 470 a parametrů uvedených v kapitole 3.3.2. Číselná hodnota uzlů odpovídá bootstrapovým hodnotám (hodnoty menší než 50 % nejsou uvedeny). Strom je zakořeněn druhem *Eimeria tenella*. Sekvence eimerií pocházejících z *M. musculus* jsou označeny šedými obdélníky, mnou získané sekvence jsou vyznačeny tučným písmem.



Obr. 8: Fylogenetický strom získaný na základě Maximum likelihood analýzy sekvencí genu COIII a parametrů uvedených v kapitole 3.3.2. Číselná hodnota uzlů odpovídá bootstrapovým hodnotám (hodnoty menší než 50 % nejsou uvedeny). Strom je zakořeněn *Lankesterella* sp. Sekvence eimerií pocházejících z *M. musculus* jsou označeny šedými obdélníky, mnou získané sekvence jsou vyznačeny tučným písmem.



Obr. 9: Fylogenetický strom získaný na základě Maximum likelihood analýzy sekvencí genu 18S rRNA a parametrů uvedených v kapitole 3.3.2. Číselná hodnota uzlů odpovídá bootstrapovým hodnotám (hodnoty menší než 50 % nejsou uvedeny). Strom je zakořeněn *Lankesterella* sp. Sekvence eimerií pocházejících z *M. musculus* jsou označeny šedými obdélníky, mnou získané sekvence jsou vyznačeny tučným písmem.

5. DISKUSE

Jedním z cílů mé práce bylo zjištění prevalence kokciidií u *M. musculus* odchycených na různých lokalitách v České republice a ve východní části Německa. Prevalence se vypočítá jako podíl počtu pozitivních jedinců k celkovému počtu vyšetřených jedinců v daném časovém období (Gordis, 2014). Na základě analýz genu COI činila celková prevalence eimerií přibližně 30 % (43/145). Prevalence eimerií z území východní části Německa byla přibližně 10 % (15/145) a z území České republiky 19 % (28/145). Prevalence poddruhu *M. m. musculus* činila přibližně 35 % (20/57) a prevalence *M. m. domesticus* 26 % (23/88). Na základě analýz dalších tří genů byla zjištěna celková prevalence eimerií v rozmezí 7-43 % (Tab. 5).

Určení relevantních hodnot prevalence infekčního agens je v populacích volně žijících zvířat často obtížné. Většinou totiž neznáme celkový/skutečný počet jedinců v celé dané populaci, a počet pozitivních jedinců tak nelze vztáhnout k objektivní hodnotě. Také velmi záleží na tom, kolik jedinců bylo vyšetřeno - zda několik jednotlivců nebo například stovky (Gordis, 2014; Jarquín-Díaz *et al.*, 2019). Myši, které žijí v hustých populacích ve volné přírodě, jsou nejčastěji infikovány třemi druhy eimerií - *E. falciformis*, *E. ferrisi*, a *E. vermiformis*. Prevalence těchto tří druhů eimerií se u divokých populací *M. musculus* pohybuje v rozmezí 3-40 % (Ankrom *et al.*, 1975; Ball a Lewis, 1984; Koudela a Černá, 1991; Jarquín-Díaz *et al.*, 2019). Je patrné, že se jedná o poměrně široký interval, ovlivněný mimo jiné i počtem vyšetřených vzorků, tudíž jeho výpovědní hodnota není příliš významná. Mnou zjištěná celková prevalence eimerií se v závislosti na screeningu jednotlivých genů pohybovala mezi 7 až 43 %, což je při daném rozpětí v souladu s výše uvedenými studiemi.

Prevalence kokciidií u volně žijících hlodavců je ovlivněna mnoha faktory – zejména však stářím, hmotností a pohlavím hlodavce, a také ročním obdobím (sezónností) (Ball a Lewis, 1984). Co se týká prevalence eimerií u jiných zástupců z řádu hlodavců, tak například u myšic (*Apodemus* spp.) a hrabošovitých hlodavců (*Microtus* spp., *Myodes glareolus*) v Evropě byla zaznamenána prevalence eimerií 32,7 % (Mácová *et al.*, 2018), což jsou podobné hodnoty, jako jsem prokázala u eimerií parazitujících u *M. musculus*. U hlodavce *Myocastor coypus* (nutrie říční; čeled' Myocastoridae) byla zjištěna prevalence

okolo 46 %, která se snižovala s rostoucím stářím a hmotností nutrií (Ball a Lewis, 1984). U *Apodemus sylvaticus* (myšice křovinná; čeleď Muridae) činila průměrná prevalence eimerií 57 %, a s přibývajícím hmotností myšic klesala (Ball a Lewis, 1984). V porovnání s hodnotami prevalencí eimerií infikujících *M. musculus* vykazuje s pravidelností několikanásobně vyšší prevalence sysel obecný, *Spermophilus citellus* (čeleď Sciuridae). Studie střevních kokcií sysla obecného odhalily prevalenci *Eimeria callospermophili* 71 %, a *Eimeria citelli* dokonce 86 % (Golemansky a Koshev, 2007, 2009). K dalším zástupcům s poměrně vysokou prevalencí kokcií patří veverky rodu *Sciurus* (rovněž čeleď Sciuridae). K nejčastějšímu druhu eimerie parazitující druh *Sciurus vulgaris* (veverka obecná) se řadí *E. sciurorum*, jehož prevalence může činit až 83 % (Bertolino *et al.*, 2003). Z jiných zástupců savců vykazují poměrně vysoké prevalence eimerií králíci (obvykle okolo 47 %), ovce a kozy (okolo 51 %), a skot (přibližně 60 %) (Bettahar *et al.*, 2018; Alca-Canto *et al.*, 2020).

Analýzami sekvencí jsem ve vyšetřovaných vzorcích prokázala přítomnost dvou druhů kokcií, *E. ferrisi* a *E. falciformis*. Oba patří mezi běžně se vyskytující druhy eimerií u *M. musculus* (Ankrom *et al.*, 1975; Ball a Lewis, 1984; Koudela a Černá, 1991; Jarquín-Díaz *et al.*, 2019). Výskyt *E. ferrisi* jsem prokázala u obou poddruhů myši domácí, tj. u *M. m. domesticus* i *M. m. musculus*, což je v souladu se studií Jarquín-Díaz *et al.* (2019). To naznačuje, že pro tento druh kokcidie patrně neexistují zcela striktní geografická či hostitelská omezení. Pro druhy *E. falciformis* a *E. vermiformis* tato informace dosud nebyla publikována. Druh *E. falciformis* jsem zjistila u obou poddruhů myši.

Na základě amplifikace genu COI jsem detekovala 43 *Eimeria*-pozitivních vzorků z celkového počtu 145 vyšetřených vzorků. U vzorků, které napoprvé vyšly negativně, jsem PCR znovu jedenkrát opakovala; v několika případech jsem tak získala o několik málo pozitivních vzorků navíc. I přes tento počet odhalených pozitivních vzorků nebylo možné z každého získat kvalitní sekvence použitelné do fylogenetických analýz. Důvodů, proč tomu tak bylo, může být několik. U několika získaných takto „nekvalitních“ sekvencí byl zaznamenán tzv. smíšený signál. Jelikož pro PCR byly použity primery specifické pro skupinu Eimeriorina, znamená to, že *M. musculus* mohla být infikována více než jedním druhem kokcidie. Pokud by byly použity nespecifické primery, např. pro jakékoliv zástupce

z domény Eukaryota, mohlo by se v případě výskytu smíšeného signálu jednat i o příměs sekvence hostitelského organismu, případně o kontaminaci či koinfekci jiným eukaryotem. Takzvaná koinfekce je definována jako smíšená infekce alespoň dvěma geneticky odlišnými infekčními agens u stejného hostitelského jedince (Hoarau *et al.*, 2020). U hlodavců jsou koinfekce jak různými druhy eimerií, tak různými skupinami parazitů, poměrně běžné. Koinfekce dvěma i více druhy eimerií jsou zcela běžné například u myšic (rod *Apodemus*) a hrabošovitých hlodavců (rody *Microtus*, *Myodes*) (Hůrková *et al.*, 2005; Mácová *et al.*, 2018; Trefancová *et al.*, 2021), nebo u sysla obecného (Golemansky a Koshev, 2007, 2009). Co se týká koinfekce kokcií s jinými parazity, například u *M. musculus* a *Rattus norvegicus* (potkan obecný) byly zaznamenány koinfekce parazity *Toxocara canis* (škrkavka psí) a *Toxoplasma gondii* (Corrêa *et al.*, 2014). Rovněž byly zaznamenány koinfekce prvoky *T. gondii* a *Neospora caninum* u hlodavce *Apodemus sylvaticus* (myšice křovinná) (Thomasson *et al.*, 2011). Dalším příkladem koinfekce u *A. sylvaticus* byla *Eimeria* spp. a gastrointestinální hlístice *Heligmosomoides polygurus* (Clerc *et al.*, 2018).

Dalším důvodem, proč nebylo možné použít některé sekvence do analýz, byla skutečnost, že byly příliš krátké (okolo 100 bp). Důvodem, proč byly získány takto krátké sekvence, může být i výběr kitu pro izolaci DNA, který ovlivňuje koncentraci výsledné izolované DNA, a tím může mít vliv i na následnou délku sekvencí. Různé kity tak mají různou výtěžnost. Komerční kity pro izolaci DNA byly vyvinuty k použití pro konkrétní typy vzorků (například pro izolaci DNA ze vzorků krve, tkání, trusu, půdy apod.) (Dineen *et al.*, 2010). Úspěšnost PCR reakce závisí nejen na koncentraci, ale i na kvalitě extrahované DNA. Izolovaná DNA někdy může obsahovat zbytky extrakčních činidel z kitu (například EDTA, fenol, guanidin), které mohou snižovat citlivost nebo dokonce inhibovat PCR reakce. K extrakci DNA, kterou jsem analyzovala, byl sice použit stool kit, ale dle ústního sdělení školitele specialisty prof. Kváče se nejednalo o nejúčinnější kit, který má jeho laboratoř k dispozici; v tomto případě šlo spíše o výhodu finanční převládající nad kvalitou.

Pro molekulárně-fylogenetické analýzy jsem použila několik různých genů (COI, COIII, 18S rRNA, ORF 470), a to zejména z důvodu, že již bohužel nebyly k dispozici vzorky trusu pro mikroskopické vyšetření, a tak jsem se snažila o záchyt co největšího množství pozitivních vzorků. Dále také z důvodu, že každý z těchto genů má své výhody

a nevýhody, a určitá omezení. Mitochondriální sekvence COI jsou užitečné pro identifikaci druhů v rámci kmene Apicomplexa (Martinsen *et al.*, 2008). Gen pro COI je obecně dobrým markerem pro analýzy mezidruhových i vnitrodruhových vztahů kokcií, avšak jeho sekvence jsou v databázi GenBank zatím stále ještě poměrně málo zastoupeny. Tento gen je obvykle používán jako doplňující gen k analýzám založeným na jaderných genech. V porovnání s 18S rRNA má COI větší variabilitu, nese tudíž téměř vždy spolehlivější druhově specifické informace. Rostoucí využití COI genu způsobilo zavedení tzv. DNA barcodingu, pro jehož účely byl COI použit jako marker sloužící k identifikaci druhů nejrozličnějších organismů. Hebert *et al.* (2003) navrhli použití sekvencí COI genu jako tzv. „čárových kódů“ každého jednotlivého taxonu v globálním systému identifikace organismů (Hebert *et al.* 2003; Dawnay *et al.*, 2007).

Gen 18S rRNA představuje, zejména díky svému bohatému zastoupení v databázi GenBank, široce využívaný gen pro fylogenetické analýzy. Nevýhodou je, že není vhodný k rekonstrukcím fylogenetických vztahů uvnitř druhu (Ogedengbe *et al.*, 2011). Přestože je užitečný pro klasifikaci vyšších taxonomických skupin v rámci kmene Apicomplexa, není nejvhodnějším markerem pro čeleď Eimeriidae, jelikož neposkytuje velké rozlišení (Tenter *et al.*, 2002; Morrison *et al.*, 2004).

ORF 470 patří zatím k málo používaným plastidovým genům, přesto však poskytuje velmi dobré výsledky, neboť je hodně variabilní. Ve srovnání s genem 18S rRNA má ORF 470 vyšší rychlost substituce nukleotidů, tudíž jeho sekvence obsahují více fylogenetické informace. Bylo zjištěno, že v porovnání s 18S rRNA a COI je ORF 470 dokonce lepší pro detekce vnitrodruhové variability eimerií, a bylo doporučeno ho používat (Jarquín-Díaz *et al.*, 2020). Proto jsem ho v analýzách použila i já. Nevýhodou je však jeho malé zastoupení v databázi GenBank.

COIII je jedna ze tří základních podjednotek cytochrom c oxidázy. Je považován za stabilizovaný komplex COIII a COII, což může způsobit zvýšenou rychlost evoluce. Ta pak vede k velké variabilitě sekvencí, což z COIII činí více divergentní gen než je COI (Hikosaka *et al.*, 2009).

Nejvíce kvalitních sekvencí použitelných do fylogenetických analýz se mi podařilo získat pomocí amplifikace mitochondriálních genů COI (21 sekvencí) a COIII (14 sekvencí). Amplifikací genu ORF 470 jsem získala pouze malý počet sekvencí (3). Tento gen je dosud málo používán, a proto v porovnání s ostatními datasey obsahoval můj dataset ORF 470 méně sekvencí. Poslední analyzovaný gen, 18S rRNA, byl použit spíše jako orientační a doplňkový marker. Na základě výsledků fylogenetických analýz všech čtyř genů byly zkonstruovány fylogenetické stromy, na jejichž základě byla prokázána přítomnost dvou druhů eimerií – *E. falciformis* a *E. ferrisi*. Avšak nastaly dva případy, kdy se sekvence vychýlily. Ve fylogenetickém stromu získaném analýzou genu COI se vzorek č. 3141 velmi odlišoval od ostatních hlodavčích eimerií, a zařadil se k eimeriím z vačnatců (Obr. 6). V analýze genu COIII vzorek č. 3122 rovněž tvořil samostatnou odlišnou sekvenci. Tato sekvence byla nejpříbuznější *E. mephitidis* ze skunka pruhovaného (Obr. 8); i tak se ale od ní poměrně výrazně lišila (v 64 nukleotidech z celkové délky sekvence 660 bp; pro porovnání – s *E. ferrisi* se na délce 660 bp lišila v 84 nukleotidech). Jelikož se v obou případech jednalo o dlouhé a čisté sekvence bez smíšeného signálu, na první pohled tedy bezproblémové, vysvětlením této odlišnosti může být, že se i) jedná o nějaký nový dosud nedetekovaný druh/y eimerie parazitující u *M. musculus*, nebo ii) že šlo pouze o pasáž eimerie jiného hostitele trávicím traktem myši. Více jasno by nám do tohoto problému mohlo vnést mikroskopické vyšetření daných vzorků (morfologie oocyst), nebo experimentální infekce *M. musculus* oocystami nalezenými v daných vzorcích trusu. Bohužel vzorky trusu již nejsou k dispozici.

Vzorky DNA použité v mé bakalářské práci zahrnovaly vzorky z lokalit výskytu *M. m. musculus* i *M. m. domesticus*, tedy z obou stran tzv. hybridní zóny. V evropské oblasti sekundárního kontaktu vytvořily tyto dva poddruhy myši domácí hybridní zónu, která probíhá od Norska až k Černému moři a je dlouhá více než 2500 km (Kváč *et al.*, 2013). Tato zóna je jednou z prvních hybridních zón savců, která byla podrobena intenzivnímu vědeckému zkoumání; v současnosti je považována za jednu z nejlépe prostudovaných hybridních zón (Shurtliff, 2011). Kromě studia samotných myši je tato zóna předmětem zájmu studia i parazitů. Například Sak *et al.* (2011) se zde zabývali mikrosporidii. Zjistili, že rozdíl v parazitaci mezi oběma poddruhy myši domácí nebyl významný. Prevalence u *M.*

m. musculus činila 34 %, ve srovnání s *M. m. domesticus* s prevalencí 33 %. U *M. m. musculus* byla zaznamenána vyšší prevalence mikrosporidií u samic (43 %) v porovnání se samci (26 %). U *M. m. domesticus* nebyl zaznamenán signifikantní rozdíl v prevalenci mezi pohlavími. Dalším příkladem porovnání prevalencí infekčních agens u těchto dvou poddruhů myši byla infekce cytomegalovirem (Herpesviridae). Jeho prevalence se mezi oběma poddruhy rovněž významně nelišila (u *M. m. domesticus* 84 % a *M. m. musculus* 76 %). Je zřejmé, že tato virová infekce je na obou stranách česko-bavorské hybridní zóny myši velmi častá (Goüy de Bellocq *et al.*, 2014). Jarquín-Díaz *et al.* (2019) identifikovali v evropské hybridní zóně tři druhy eimerií infikující *M. musculus* s různou prevalencí; *E. ferrisi* 16,1 %, *E. falciformis* 4,2 %, a *E. vermiformis* s prevalencí 1,1 %. Takto velmi nízká prevalence *E. vermiformis* může být důvodem, proč jsem ve svých vzorcích tento druh nedetekovala. Autoři nestudovali, zda se prevalence lišila mezi poddruhy, pohlavími, nebo lokalitami. Na základě mých výsledků nebyl zaznamenán větší rozdíl v prevalencích u žádného z poddruhů (*M. m. domesticus* 16 % a *M. m. musculus* 14 %).

Četným tématem mnoha studií a výzkumu je vztah mezi pohlavím hostitele a jeho napadením parazity. Obecně bylo prokázáno, že rozdíl pohlaví závisí na fyziologii jedince a na chování spojeném se životní strategií. Většina studií na hlodavcích ukazuje, že častějším cílem parazitů je samčí pohlaví. U samců mnoha druhů organismů způsobila sexuální selekce přizpůsobení těla na větší velikost. Tato investice však může nést náklady na zvýšenou zranitelnost vůči parazitům. U obratlovců bývají častějším cílem parazitů samci také proto, že mají vyšší koncentraci testosteronu, a podle hypotézy imunokompetentního handicapu (testosteron působí imunosupresivně) by pak měli být citlivější k invazi parazita (Hillegass *et al.*, 2008; Gholamhossein *et al.*, 2016). Výraznou odlišnost prevalence na základě pohlaví jsem ve svých výsledcích nezaznamenala.

6. ZÁVĚR

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala kokcidiemi rodu *Eimeria* u myši domácích (*M. musculus*). Cílem práce bylo zjistit prevalenci, analyzovat druhové spektrum kokcidií parazitujících u tohoto hlodavce, a zkonstruovat fylogenetické vztahy mezi zjištěnými kokcidiemi. Během práce jsem si osvojila základní metody molekulární biologie. Získala jsem 21 sekvencí pro cytochromoxidázu c podjednotku I (COI), 3 sekvence pro plastidový gen Open Reading Frame 470 (ORF 470), 14 sekvencí pro cytochromoxidázu c podjednotku III (COIII) a 3 sekvence pro malou ribozomální podjednotku (18S rRNA). Pomocí metody Maximum Likelihood jsem vypočítala a zkonstruovala čtyři fylogenetické stromy pro každý analyzovaný gen. Na základě analýz jsem potvrdila, že mitochondriální geny COI a COIII představují dobrý marker pro rekonstrukci fylogenetických vztahů uvnitř i mezi druhy kokcidií.

Pomocí PCR screeningu na základě výše uvedených genů jsem zjistila prevalenci eimerií u vyšetřených vzorků *M. musculus* v rozmezí 7-44 %, což je v souladu s dosud publikovanými studii u tohoto hostitele, ale i u myšovitých hlodavců obecně. Analýzou získaných sekvencí a následnými fylogenetickými analýzami byla ve vzorcích zjištěna přítomnost pouze dvou druhů eimerií u *M. musculus*, a to s převažujícím počtem *E. ferrisi* a s minoritním zastoupením *E. falciformis*. Byly však detekovány i dvě sekvence, které se zcela lišily od eimerií myšovitých hlodavců, a jelikož vzorky trusu již nejsou k dispozici, původ těchto eimerií zůstává nejasný. U obou poddruhů, *M. m. musculus* a *M. m. domesticus*, bylo zastoupení obou druhů eimerií víceméně rovnoměrné. Celková prevalence eimerií činila u *M. m. musculus* přibližně 35 %, a u *M. m. domesticus* 26 %. Výraznou odchylku v prevalenci jsem nezaznamenala ani mezi pohlavími.

7. POUŽITÉ ZDROJE

7.1 Použitá literatura

Adl S. M., Bass D., Lane E., Lukeš J., Schoch C. L., Smirnov A., Agatha S., Berney C., Brown M. W., Burki F., Cárdenas P., Čepička I., Chistyakova L., Campo J., Dunthorn M., Edvardsen B., Eglit Y., Guillou L., Hampl V., Heiss A. A., Hoppenrath M., James T. Y., Karnkowska A., Karpov S., Kim E., Kolisko M., Kudryavtsev A., Lahr D. J. G., Lara E., Gall L. L., Lynn H. D., Mann G. D., Massana R., Mitchell E. A. D., Morrow C., Park J. S., Pawlowski J. W., Powell M. J., Richter D. J., Rueckert S., Shadwick L., Shimano S., Spiegel F.W., Torruella G., Youssef N., Zlatogursky V., Zhang Q. (2019): Revisions to the classification, nomenclature, and diversity of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 66: 4-119.

Alcala-Canto, Y., Figueroa-Castillo J. A., Ibarra-Velarde F., Vera-Montenegro Y., Cervantes-Valencia M. E., Alberti-Navarro A. (2020): First database of the spatial distribution of *Eimeria* species of cattle, sheep and goats in Mexico. *Parasitology Research* 119: 1057-1074.

Anděra M. (2011): Current distributional status of rodents in the Czech Republic (Rodentia). *Lynx*, n. s., Praha 42: 5-82.

Anděra M., Horáček I. (Eds). (2005): *Poznáváme naše savce*. Sobotáles. Praha, Česká republika.

Ankrom S. L., Chobotar B., Ernst J. V. (1975): Life cycle of *Eimeria ferrisi* Levine & Ivens, 1965 in the Mouse, *Mus musculus*. *The Journal of Protozoology* 22: 317-323.

Ball S. J., Lewis D. C. (1984): *Eimeria* (Protozoa: Coccidia) in wild populations of some British rodents. *Journal of Zoology* 202: 373-381.

Barta J. R. (1989): Phylogenetic analysis of the class Sporozoea (phylum Apicomplexa Levine, 1970): Evidence for the independent evolution of heteroxenous life cycles. *Journal of Parasitology* 75: 195-206.

- Barta J. R., Schrenzel M. D., Carreno R. A., Rideout B. A. (2005): The genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a junior objective synonym of the genus *Isospora* (Schneider 1881) species infecting birds and resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the correct genus for *Isospora* species infecting mammals. *Journal of Parasitology* 91: 726-727.
- Beltrame M. O., Vieira de Souza M., Araújo A., Sardella N. H. (2014): Review of the rodent paleoparasitological knowledge from South America. *Quaternary International* 352: 68-74.
- Berto B. P., McIntosh D., Lopes C. W. G. (2014): Studies on coccidian oocysts (Apicomplexa: Eucoccidiorida). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* 23: 1-15.
- Bertolino S., Wauters L. A., De Bruyn L., Canestri-Trotti G. (2003): Prevalence of coccidia parasites (Protozoa) in red squirrels (*Sciurus vulgaris*): effects of host phenotype and environmental factors. *Oecologia* 137: 286-295.
- Boursot P., Auffray J. C., Britton-Davidian J., Bonhomme F. (1993): The evolution of house mice. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 119-152.
- Božíková E., Munclinger P., Teeker K. C., Tucker P. K., Macholán M., Piálek J. (2005): Mitochondrial DNA in the hybrid zone between *Mus musculus musculus* and *Mus musculus domesticus*: a comparison of two transects. *Biological Journal of the Linnean Society* 84: 363-378.
- Carreno R. A., Barta J. R. (1999): An eimeriid origin of isosporoid coccidia with Stieda bodies as shown by phylogenetic analysis of small subunit ribosomal RNA gene sequences. *Journal of Parasitology* 85: 77-83.
- Clerc M., Devevey G., Fenton A., Pedersen A. B. (2018): Antibodies and coinfection drive variation in nematode burdens in wild mice. *International Journal for Parasitology* 48: 785-792.
- Corrêa F. M., Chieffi P. P., Lescano S. A. Z., Santos S. V. (2014): Behavioral and memory changes in *Mus musculus* coinfecting by *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 56: 353-356.

- Dawnay N., Ogden R., McEwing R., Carvalho G. R., Thorpe R. S. (2007): Validation of the barcoding gene COI for use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International* 173: 1-6.
- De Vos A. J. (1970): Studies on the host range of *Eimeria chinchillae* De Vos and Van der Westhuizen, 1968. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 37: 29-36.
- Dineen S. M., Aranda R., Anders D. L., Robertson J. M. (2010): An evaluation of commercial DNA extraction kits for the isolation of bacterial spore DNA from soil. *Journal of Applied Microbiology* 109: 1886-1896.
- Duszynski D. W. (1971): Increase in size of *Eimeria separata* oocysts during patency. *Journal of Parasitology* 57: 948-952.
- Duszynski D. W. (1986): Host specificity in the coccidia of small mammals: fact or fiction? *Symposia Biologica Hungarica* 33: 325-337.
- Duszynski D. W., Upton SJ (2001): *Cyclospora, Eimeria, Isospora, and Cryptosporidium* spp. In: Samuel WM, Pybus MJ, Kocan AA (Eds.) *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. 2nd Edition. Iowa State University Press, Iowa, USA.
- Duszynski D. W., Wilber P. G. (1997): A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. *Journal of Parasitology* 83: 333-336.
- Dyson J., Grahame J., Evannett P. J. (1994): The apical complex of the gregarine *Digyalum oweni* (Protozoa: Apicomplexa). *Journal of Natural History* 28: 1-7.
- Eimer G. H. T. (1880): Ueber die Ei oder kugelförmigen sofenannten Psorospermien der Wirbelthiere. Stuber's Verlagshandlung. Wurzburg.
- Ernst J. V., Chobotar B., Hammond D. M. (1971): The oocysts of *Eimeria vermiformis* sp. n. and *E. papillata* sp. n. (Protozoa: Eimeriidae) from the mouse *Mus musculus*. *The Journal of Protozoology* 18: 221-223.
- Florin-Christensen M., Schnittger L. (Eds.). (2018): *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*. Springer International Publishing AG, part of Springer Nature. Cham, Switzerland.
- Foreyt W. J. (1990): Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 6: 655-670.

- Ghimire T. R. (2010): Redescription of genera of family Eimeriidae Minchin, 1903. *International Journal of Life Sciences* 4: 27-47.
- Gholamhossein M., Kordiyeh H., Leila Nourani L. (2016): Relationship between the sex and age of *Mus musculus* (Rodentia: Muridae) with ectoparasites prevalence in northeast of Iran. *Persian Journal of Acarology* 5: 51-62.
- Golemansky V., Koshev S. (2009): Systematic and ecological survey on coccidians (Apicomplexa: Eucoccidida) in European Ground Squirrel (*Spermophilus citellus* L.) (Rodentia: Sciuridae) from Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica* 61: 143-150.
- Golemansky V.G., Koshev Y. S. (2007): Coccidian parasites (Eucoccidia: Eimeriidae) in European Ground Squirrel (*Spermophilus citellus* L., 1766) (Rodentia: Sciuridae) from Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica* 59: 81-85.
- Gordis L. (2014): *Epidemiology*. 5th Edition. Saunders, Elsevier Inc., Philadelphia, USA.
- Goüy de Bellocq J., Baird S. J. E., Albrechtová J., Sobeková K., Piálek J. (2014): Murine cytomegalovirus is not restricted to the house mouse *Mus musculus domesticus*: prevalence and genetic diversity in the European house mouse hybrid zone. *Journal of Virology* 89: 406-414.
- Guindon S., Gascuel O. (2003): A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenesis by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Haberkorn A. (1970): Die Entwicklung von *Eimeria falciformis* (Eimer 1870) in der weißen Maus (*Mus musculus*). *Zeitschrift für Parasitenkunde* 34: 49-67.
- Hall T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Haltia T., Saraste M., Wikström M. (1991): Subunit III of cytochrome c oxidase is not involved in protein translocation: a site-directed mutagenesis study. *The EMBO Journal* 10: 2015-2021.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., deWaard, J. R. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313-321.

- Hikosaka K., Watanabe Y. i., Tsuji N., Kita K., Kishine H., Arisue, N., Palacpac N., Kawazu S., Sawai H., Horii T., Igarashi I., Tanabe K. (2009): Divergence of the mitochondrial genome structure in the Apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. *Molecular Biology and Evolution* 27: 1107-1116.
- Hillegass, M. A., Waterman, J. M., Roth, J. D. (2008): The influence of sex and sociality on parasite loads in an African ground squirrel. *Behavioral Ecology* 19: 1006-1011.
- Hoarau A. O. G., Mavingui P., Lebarbenchon C. (2020): Coinfections in wildlife: Focus on a neglected aspect of infectious disease epidemiology. *PLoS Pathogens* 16: e1008790.
- Hůrková L., Abu Baker M., Jirků M., Modrý D. (2005): Two new species of *Eimeria* Schneider 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) from the broad-toothed field mouse, *Apodemus mystacinus* Danford and Alston 1877 (Rodentia: Muridae) from Jordan. *Parasitology Research* 97: 33-40.
- Chartier C., Paraud C. (2012): Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats, a review. *Small Ruminant Research* 103: 84-92.
- Chroust K., Lukešová D., Modrý D., Svobodová V. (1998): *Veterinární protozoologie. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno. Brno, Česká republika. Skripta.*
- Jarquín-Díaz V. H., Balard A., Jost J., Kraft J., Dikmen M. N., Kvičerová J., Heitlinger E. (2019). Detection and quantification of house mouse *Eimeria* at the species level – challenges and solutions for the assessment of coccidia in wildlife. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 10: 29-40.
- Jirků M., Jirků M., Oborník M., Lukeš J., Modrý, D. (2009): *Goussia* Labbé, 1896 (Apicomplexa, Eimeriorina) in Amphibia: Diversity, biology, molecular phylogeny and comments on the status of the genus. *Protist* 160: 123-136.
- Joyner L. P., Long P. L. (1974): The specific characters of the *Eimeria*, with special reference to the Coccidia of the fowl. *Avian Pathology* 3: 145-157.
- Katris N. J., van Dooren G. G., McMillan P. J., Hanssen E., Tilley L., Waller R. F. (2014): The apical complex provides a regulated gateway for secretion of invasion factors in *Toxoplasma*. *PLoS Pathogens* 10: e1004074.

Keeling, P. J., Burger G., Durnford D. G., Lang, B. F., Lee, R. W., Pearlman R. E., Andrew J., Roger W., Michael W., Gray, M. W. (2005): The tree of Eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 670-676.

Kopečná J., Jirků M., Oborník M., Tokarev Y. S., Lukeš J., Modrý D. (2006): Phylogenetic analysis of coccidian parasites from invertebrates: Search for missing links. *Protist* 157: 173-183.

Koudela B., Černá Z. (1991): Finding of the coccidium *Eimeria ferrisi* Levine et Ivens, 1965 (Eimeriidae, Apicomplexa) in feral house mice (*Mus musculus*) in South Bohemia. *Folia Parasitologica (Praha)* 38: 189-190.

Kváč M., McEvoy J., Loudová M., Stenger B., Sak B., Květoňová D., Ditrich O., Rašková V., Moriarty E., Rost M., Macholán M., Piálek, J. (2013): Coevolution of *Cryptosporidium tyzzeri* and the house mouse (*Mus musculus*). *International Journal for Parasitology* 43: 805-817.

Kvičarová J., Hofmannová L., Scognamiglio F., Santoro M. (2020): *Eimeria sciurorum* (Apicomplexa, Coccidia) from the Calabrian black squirrel (*Sciurus meridionalis*): An example of lower host specificity of eimerians. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 1-7.

Kvičarová J., Hypša, V. (2013): Host-parasite incongruences in rodent *Eimeria* suggest significant role of adaptation rather than cophylogeny in maintenance of host specificity. *PLoS ONE* 8: e63601.

Kvičarová J., Mikeš V., Hypša V. (2011): Third lineage of rodent eimerians: morphology, phylogeny and re-description of *Eimeria myoxi* (Apicomplexa: Eimeriidae) from *Eliomys quercinus* (Rodentia: Gliridae). *Parasitology* 138: 1217-1223.

Kvičarová J., Pakandl M., Hypša V. (2008): Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. *Parasitology* 135: 443-452.

Kvičarová J., Ptáčková P., Modrý D. (2007): Endogenous development, pathogenicity and host specificity of *Eimeria cahirinensis* Couch, Blaustein, Duszynski, Shenbrot and Nevo, 1997 (Apicomplexa: Eimeriidae) from *Acomys dimidiatus* (Cretzschmar 1826) (Rodentia: Muridae) from the Near East. *Parasitology Research* 100: 219-226.

- Latham N., Mason G. (2004): From house mouse to mouse house: the behavioural biology of free-living *Mus musculus* and its implications in the laboratory. *Applied Animal Behaviour Science* 86: 261-289.
- Lefort V., Longueville J. E., Gascuel O. (2017): SMS: Smart model selection PhyML. *Molecular Biology and Evolution* 34: 2422-2424.
- Levine N. D., Bray R. S., Ivens V., Gunders A. E. (1959): On the parasitic protozoa of Liberia. V. Coccidia of Liberian rodents. *The Journal of Protozoology* 6: 215-222.
- Levine N. D., Ivens V. (Eds.). (1990): *The Coccidian Parasites of Rodents*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA.
- Levine N. D., Ivens, V. (Eds.). (1965): *The coccidian parasites (Protozoa, Sporozoa) of rodents*. University of Illinois Press. Urbana, USA.
- Long P. L. (1982): *The Biology of the Coccidia*. University Park Press, Baltimore.
- Long P. L., Joyner L. P. (1984): Problems in the identification of species of *Eimeria*. *Journal of Protozoology* 31: 535-541.
- Máková A., Hoblíková A., Hypša V., Stanko M., Martinů J., Kvičerová J. (2018): Mysteries of host switching: Diversification and host specificity in rodent-coccidia associations. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 127: 179-189.
- Martinsen E.S., Perkins S. L., Schall J. J. (2008): A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 261-273.
- Matsuabayashi M., Takami K., Abe N., Kimata I., Tani H., Sasai K., Baba E. (2005): Molecular characterization of crane Coccidia, *Eimeria gruis* and *E. reichenowi*, found in feces of migratory cranes. *Parasitology Research* 97: 80-83.
- Maziz-Bettahar S., Aissi M., Ainbaziz H., Bachene M.S., Zenia S., Ghisani F. (2018): Prevalence of coccidian infection in rabbit farms in North Algeria. *Veterinary World* 11: 1569-1573.
- McAllister C. T., Motriuk-Smith D., Seville R. S., Connior M. B., Trauth S. E., Robison H. W. (2017): Coccidian parasites (Apicomplexa: Eimeriidae) of Arkansas herpetofauna:

A summary with two new state records. *Journal of the Arkansas Academy of Science* 71: 143-152.

Meerburg B. G., Singleton G. R., Kijlstra A. (2009): Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Critical Reviews in Microbiology* 35: 221-270.

Mirza M. Y. (1975): Three new species of coccidia (Sporozoa: Eimeriidae). *Bulletin of the National Research Centre* 6: 39-51.

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

Morrisette N. S., Sibley L. D. (2002): Cytoskeleton of Apicomplexan parasites. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66: 21-38.

Musaev M. A., Veisov A. M. (1965): *Koktsidii Gryzunov SSR*. Izdat. Akad. Nauk Azerbaid. SSR, Baku. 154.

Northrop-Clewes, C. A., Shaw, C. (2000): Parasites. *British Medical Bulletin* 56: 193-208.

Ogedengbe J. D., Hanner R. H., Barta, J. R. (2011): DNA barcoding identifies *Eimeria* species and contributes to the phylogenetics of coccidian parasites (Eimeriorina, Apicomplexa, Alveolata). *International Journal for Parasitology* 41: 843-850.

Okamoto N., Keeling P. J. (2014): The 3D Structure of the apical complex and association with the flagellar apparatus revealed by serial TEM tomography *Psammosa pacifica*, a distant relative of the Apicomplexa. *PLoS ONE* 9: e84653.

Ortega Y. R., Gilman R. H., Sterling C. R. (1994): A new coccidian parasite (Apicomplexa: Eimeriidae) from humans. *Journal of Parasitology* 80: 625-629.

Ortega Y. R., Sterling C. R., Gilman R. H., Cama V. A., Diaz F. (1993): *Cyclospora* species - a new protozoan pathogen of humans. *The New England Journal of Medicine* 328: 1308-1312.

Page R. M. D. (1996): TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.

- Parker B. B., Duszynski DW (1986): Polymorphism of eimerian oocysts: a dilemma posed by working with some naturally infected hosts. *Journal of Parasitology* 72: 602-604
- Pellérdy L. (1954): Zur Kenntnis der Coccidien aus *Apodemus flavicollis*. *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae* 4: 187-191.
- Pellérdy L. P. (1974): *Coccidia and Coccidiosis*. 2nd edition. Akademiai Kiadó. Budapest, Hungary.
- Phifer-Rixey M., Nachman M. W. (2015): Insights into mammalian biology from the wild house mouse *Mus musculus*. *eLife* 4: 1-13.
- Portman N., Foster C., Walker G., Šlapeta J. (2013): Evidence of intraflagellar transport and apical complex formation in a free-living relative of the Apicomplexa. *Eukaryotic Cell* 13: 10-20.
- Poulin R. (2007) Host Specificity. In: *Evolutionary Ecology of Parasites* (ed. Poulin R.). 2nd edition. Princeton University Press, Princeton, USA. pp. 41-69.
- Rueckert S., Pipaliya S. V., Dacks, J. B. (2019): Evolution: Parallel paths to parasitism in the Apicomplexa. *Current Biology* 29: 836-839.
- Sak B., Kváč M., Květoňová D., Albrecht T., Piálek J. (2011): The first report on natural *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. infections in wild East-European House Mice (*Mus musculus musculus*) and West-European House Mice (*M. m. domesticus*) in a hybrid zone across the Czech Republic-Germany border. *Veterinary Parasitology* 178: 246-250.
- Shurtliff Q. R. (2011): Mammalian hybrid zones: a review. *Mammal Review* 43: 1-21.
- Schneider A. C. U. (1875): Note sur la psorospermie oviforme du poulpe. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale* 4: 11-14.
- Stenseth N. C., Leirs H., Skonhøft A., Davis S. A., Pech R. P., Andreassen, H. P., Singleton G. R., Lima M., Machang'u R. S., Makundi R. H., Zhang Z., Brown P. R., Shi D., Wan, X. (2003): Mice, rats, and people: the bio-economics of agricultural rodent pests. *Frontiers in Ecology and the Environment* 1: 367-375.

- Šlapeta J. R., Modrý D., Votýpka J., Jirků M., Oborník M., Lukeš J., Koudela B. (2000): *Eimeria telekii* n.sp. (Apicomplexa: Coccidia) from *Lemniscomys striatus* (Rodentia: Muridae): morphology, pathology and phylogeny. *Parasitology* 122: 133-143.
- Tenter A. M., Barta J. R., Beveridge I., Duszynski D. W., Mehlhorn H, Morrison D. A., Thompson RCA, Conrad P. A. (2002): The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *International Journal for Parasitology* 32: 595-616.
- Thomasson D., Wright E. A., Hughes J. M., Dodd N.S., Cox A.P., Boyce K., Gerwash O., Abushahma M., Lun Z. R., Murphy R. G., Rogan M. T., Hide, G. (2011): Prevalence and co-infection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in *Apodemus sylvaticus* in an area relatively free of cats. *Parasitology* 138: 1117-1123.
- Trefancová A, Kvičeroová J, Mácová A, Stanko M, Hofmannová L, Hypša V (2021): Switch, disperse, repeat: host specificity is highly flexible in rodent-associated *Eimeria*. *International Journal for Parasitology*. Accepted.
- Upton S. J., Current W. L., Ernst J. V., Barnard S. M. (1984): Extraintestinal development of *Caryospora simplex* (Apicomplexa: Eimeriidae) in experimentally infected mice, *Mus musculus*. *The Journal of Protozoology* 31: 392-398.
- Vanlerberghe F., Dod B., Boursot P., Bellis M., Bonhomme F. (1986): Absence of Y chromosome introgression across the hybrid zone between *Mus musculus domesticus* and *Mus musculus musculus*. *Genetical Research* 48: 192.
- Votýpka J., Modrý D., Oborník M., Šlapeta J., Lukeš J. (2016): Apicomplexa. In Archibald J. (Eds). *Handbook of the Protists*. Springer. Cham, Switzerland. 1-58.
- Weber E. M., Olsson I. A. S. (2008): Maternal behaviour in *Mus musculus* sp.: An ethological review. *Applied Animal Behaviour Science* 114: 1-22.
- Wenyu Li, Wang M., Chen Y., Chen C., Liu X., Sun X., Jing Ch., Xu L., Yan R., Li X., Song X. (2020): EtMIC3 and its receptors BAG1 and ENDOUL are essential for site-specific invasion of *Eimeria tenella* in chickens. *Veterinary Research* 51: 1-15.
- Yakimoff W. L., Gousseff W. F. (1938): The coccidia of mice (*Mus musculus*). *Parasitology* 30: 1-3.

Zhao X., Duszynski D. W. (2001a): Molecular phylogenies suggest the oocyst residuum can be used to distinguish two independent lineages of *Eimeria* spp in rodents. *Parasitol Res* 87: 638-643.

Zhao X., Duszynski D. W. (2001b): Phylogenetic relationships among rodent *Eimeria* species determined by plastid ORF470 and nuclear 18S rDNA sequences. *Int J Parasitol* 31: 715-719.

7.2 Internetové zdroje

1. MAPOTIC [online]. [cit. 2021-08-04].

Dostupné z: <https://www.mapotic.com>

2. NCBI GenBank [online]. [cit. 2021-03-02].

Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

3. NCBI BLAST [online]. [cit. 2021-03-02].

Dostupné z: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi2>

4. ATGC [online]. [cit. 2021-08-04].

Dostupné z: www.atgc-montpellier.fr/sms/

8. Seznam použitých zkratk

DNA	deoxyribonukleová kyselina
EXO I	enzym exonukleáza I
NGS	sekvenování nové generace
OR	reziduum oocysty
PCR	polymerázová řetězová reakce
PG	polární granulum
SB	Stiedovo tělísko
SI	shape index (poměr délky a šířky)
SR	reziduum sporocysty
TAE	Tris Acetát EDTA
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
WFB	wall forming bodies (elektronově denzní tělíska)

9. Přílohy

Tab. I: Přehled dosud popsaných druhů kokcií rodu *Eimeria* u *M. musculus*.

Druh kokcie	Tvar a velikost oocysty [μm]	Stěna oocysty	Reziduum oocysty (OR), reziduum sporocysty (SR), mikropyle (M), Stiedovo tělísko (SB), polární granulum (PG)	Tvar a velikost sporocysty [μm]	Autor popisu
<i>E. apionodes</i>	hruškovitý, 20 × 17	hladká, tenká	OR-, SR+, M-, PG+	protáhlý, 12 × 8	Pellerdy, 1954
<i>E. arasinaensis</i>	elipsoidní, 12-24 × 10-20	bezbarvá	OR-, M+, PG+	ve tvaru čárky	Musaev a Veisov, 1965
<i>E. baghdadiensis</i>	elipsoidní, 20-24 × 17-20	hladká, žlutozelená	OR-, SR+, M-, SB+, PG+	protáhlý, 10-13 × 6-8	Mirza, 1975
<i>E. falciformis</i>	vejčitý/elipsoidní/subsférický, 14-27 × 11-24	hladká, bezbarvá	OR+/-, SR+, M-, SB+, PG+/-	vejčitý/elipsoidní, 10-12 × 6-8	Eimer, 1870, Schneider, 1875
<i>E. ferrisi</i>	elipsoidní/subsférický, 12-22 × 11-18	hladká, bezbarvá	OR-, SR+/-, M-, SB+, PG+	vejčitý/elipsoidní, 8-11 × 5-7	Levine a Ivens, 1965
<i>E. hansonorum</i>	subsférický, 15-22 × 13-19	hladká, nažloutlá	OR-, SR+, M-, SB+, PG+	vejčitý, 9 × 7	Levine a Ivens, 1965
<i>E. hindlei</i>	vejčitý, 22-27 × 18-21	hladká	OR-, SR+, M-, PG+	vejčitý, 9 × 6	Yakimoff a Gousseff, 1938
<i>E. keilini</i>	24-32 × 18-21	hladká	OR-, M-, SB-, PG-	12 × 6	Yakimoff a Gousseff, 1938
<i>E. krijgsmanni</i>	oválný, 18-23 × 13-16	hladká, nažloutlá	OR-, SR+, M-, SB-, PG+	elipsoidní/vejčitý, 6-14 × 4-10	Yakimoff a Gousseff, 1938

<i>E. musculi</i>	sférický, 21 × 26	hladká	OR-, SR-, M-, PG-		Yakimoff a Gousseff, 1938
<i>E. musculoidei</i>	subsférický/elipsoidní, 17-22 × 15-19	nažloutlá, hnědožlutá	OR-, SR+, M-, SB-, PG+	zahnutý, 10-12 × 7	Levine, Bray, Ivens, Gunders 1959
<i>E. papilata</i>	sférický, 18 – 26 × 16 – 24	hnědožlutá	OR -, SR +, M-, SB+, PG +	vejčitý, 10-13 × 6-9	Ernst, Chobotar a Hammond, 1971
<i>E. paragachaica</i>	elipsoidní, vejčitý, 24-32 × 18-24	bezbarvá	OR+, SR+, M+, SB+, PG+	hruškovitý, 10-14 × 6-9	Musaev a Veisov, 1965
<i>E. schueffneri</i>	cyklindrický, 18-26 × 15-16	hladká, bezbarvá	OR-, SR-, M-, PG-	vejčitý	Yakimoff a Gousseff, 1938
<i>E. vermiformis</i>	subsférický/elipsoidní, 18-26 × 15-21	hnědožlutá	OR-, SR+, M-, SB+, PG+	11-14 × 6-10	Ernst, Chobotar a Hammond, 1971
<i>E. sp.</i> , Musaev & Veisov, 1965	vejčitý/sférický, 16-22 × 14-18	hladká, bezbarvá	OR+, SR+, PG-	oválný, 6-10 × 4-7	Musaev a Veisov, 1965
<i>E. sp.</i> , Veisov 1973	elipsoidní/vejčitý, 12-23 × 10-20	-	-	-	Veisov, 1973

Tab. II: Výsledky PCR amplifikace jednotlivých genů (COI, ORF 470, COIII, 18S rRNA) u všech vyšetřovaných vzorků.

Původ	Číslo vzorku	Výsledek				Původ	Číslo vzorku	Výsledek			
		CO I	ORF 470	CO III	18S rRNA			CO I	ORF 470	CO III	18S rRNA
CZ	3042	N	N	N	N	DE	3147	P	N	N	P
CZ	3044	N	N	N	N	CZ	3148	P	P	P	P
CZ	3046	N	N	N	N	DE	3150	P	N	P	P
CZ	3047	N	N	N	N	DE	3151	N	N	N	N
CZ	3048	P	N	P	N	CZ	3152	N	N	N	N
CZ	3049	P	N	P	N	CZ	3154	N	N	N	N
CZ	3050	N	N	N	N	CZ	3155	N	N	N	N
CZ	3051	N	N	N	N	CZ	3157	N	N	N	N
CZ	3052	P	N	P	N	DE	3158	N	N	N	N
CZ	3053	N	N	N	N	CZ	3159	N	N	N	N
CZ	3054	N	N	N	N	DE	3160	P	N	N	N
CZ	3055	N	N	N	N	DE	3161	N	N	N	N
CZ	3056	N	N	N	N	DE	3162	P	P	P	P
CZ	3057	N	N	N	N	DE	3163	N	N	N	N
DE	3059	N	N	N	N	CZ	3164	N	N	N	N
DE	3060	N	N	N	N	DE	3165	N	N	N	N
CZ	3061	P	N	P	P	DE	3166	N	N	N	N
CZ	3062	N	N	N	N	CZ	3167	N	N	N	N
CZ	3063	N	N	N	N	CZ	3168	N	N	N	N
CZ	3064	N	N	N	N	DE	3169	N	N	N	N
CZ	3065	P	N	N	N	CZ	3170	P	P	N	N
CZ	3066	N	N	N	N	CZ	3171	P	P	N	P
CZ	3068	N	N	N	N	CZ	3172	N	N	N	N
CZ	3070	N	N	N	N	CZ	3173	P	N	N	N
CZ	3071	P	N	N	N	CZ	3174	P	P	N	N
CZ	3073	P	N	P	N	CZ	3175	P	P	P	P
CZ	3074	N	N	N	N	CZ	3176	N	N	N	N
DE	3076	N	N	N	N	CZ	3177	P	P	N	N
CZ	3077	P	N	P	P	CZ	3178	N	N	N	N
CZ	3078	P	N	N	N	DE	3179	P	N	N	N
DE	3080	N	N	N	N	CZ	3180	N	N	N	N

CZ	3081	P	N	N	P	CZ	3181	N	N	N	N
CZ	3082	P	N	P	P	CZ	3182	P	P	N	P
CZ	3083	P	N	P	N	CZ	3183	N	N	N	N
CZ	3088	N	N	N	N	CZ	3184	N	N	N	N
CZ	3089	N	N	N	N	CZ	3185	N	N	N	N
CZ	3090	N	N	N	N	CZ	3187	N	N	N	N
CZ	3096	N	N	N	N	CZ	3189	P	P	N	N
CZ	3097	N	N	N	N	DE	3190	P	N	N	P
CZ	3098	N	N	N	N	CZ	3191	N	N	N	N
CZ	3099	N	N	N	N	CZ	3194	N	N	N	N
CZ	3100	N	N	N	N	CZ	3196	N	N	N	N
DE	3101	N	N	N	N	DE	3198	N	N	N	N
CZ	3102	N	N	N	N	DE	3199	N	N	N	N
DE	3104	N	N	N	N	DE	3200	N	N	N	N
DE	3105	N	N	N	N	DE	3201	N	N	N	N
DE	3106	N	N	N	N	CZ	3202	N	N	N	N
CZ	3107	N	N	N	N	CZ	3203	N	N	N	N
CZ	3109	N	N	N	N	CZ	3204	P	N	N	N
CZ	3110	P	N	N	N	CZ	3205	N	N	N	N
CZ	3111	N	N	N	N	DE	3206	N	N	N	N
CZ	3112	N	N	N	N	DE	3207	N	N	N	N
CZ	3113	N	N	N	N	DE	3208	N	N	N	N
CZ	3114	N	N	N	N	DE	3210	P	N	N	N
CZ	3115	N	N	N	N	DE	3211	P	N	N	N
CZ	3116	N	N	N	N	CZ	3214	N	N	N	N
DE	3117	N	N	N	N	CZ	3216	N	N	N	N
DE	3118	N	N	N	N	CZ	3217	N	N	N	N
DE	3119	P	N	P	N	CZ	3221	N	N	N	N
DE	3120	P	N	N	N	CZ	3222	N	N	N	N
DE	3121	N	N	N	N	DE	3224	N	N	N	N
DE	3122	P	N	P	N	CZ	3225	N	N	N	N
CZ	3123	N	N	N	N						
DE	3124	N	N	N	N						
DE	3125	P	N	N	N						
DE	3126	N	N	N	N						
CZ	3127	N	N	N	N						
CZ	3128	N	N	N	N						

CZ	3129	P	P	P	P						
CZ	3131	P	N	N	P						
CZ	3133	N	N	N	N						
DE	3134	P	N	N	N						
DE	3135	N	N	N	N						
DE	3136	N	N	N	N						
DE	3137	N	N	N	N						
DE	3138	N	N	N	N						
CZ	3139	P	N	P	N						
CZ	3140	P	N	P	P						
DE	3141	P	N	N	N						
DE	3142	P	N	P	P						
CZ	3143	N	N	N	N						
DE	3144	P	N	P	P						
DE	3145	N	N								

CZ, Česká republika; DE, Německo, P, pozitivní výsledek PCR reakce; N, negativní výsledek PCR reakce.

Tab. III: Přehled počtu pozitivních vzorků vyšetřených jedinců *M. m. domesticus* a *M. m. musculus* na jednotlivých lokalitách.

<i>Mus musculus musculus</i>		<i>Mus musculus domesticus</i>	
Lokalita	Počet pozitivních vzorků	Lokalita	Počet pozitivních vzorků
Dolní Žandov	1	Děvín	0
Chlum Sv. Máří	2	Dolní Dvory	1
Chrást'any	0	Dolní Pelhřimov	0
Josefov	0	Eckarsreuth	0
Kozlov	2	Emtmannsberg	0
Krajková	0	Friedmamdorf	1
Kryry	1	Hilterhof	0
Květná	3	Hohenberg	2
Lipová	0	Hrzín	0
Mostov	0	Hůrka	0
Nebanice	0	Jindřichov	0
Nepomyšl	0	Kopanina	0
Obilná	3	Křižovatka	3

Odrava	0	Kübelhof	2
Pastuchovice	2	Lehsten	0
Rudolec	0	Lužná	0
Stará Voda	0	Milhostov	0
Teleč	1	Munchenreuth	1
Týniště	0	Neuenreuth	0
Vrbice	4	Nová Ves	2
Vrbička	1	Nový Drahov	0
Žihle	0	Nový Kostel	1
		Ottmansreuth	6
		Plösen	0
		Poustka	1
		Starý rybník	0
		Straas	2
		Střížov	0
		Weickenreuth	0
		Wolfsbühl	1
Celkový počet	20		23