

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

**Jednohostitelské kokcidie ocasatých obojživelníků:
diverzita a vývojové cykly**

Jana Lišková

Bakalářská práce

Katedra biologických disciplín
Studijní program: B4106 Zemědělská specializace
Obor: Biologie a ochrana zájmových organizmů

Vedoucí práce: Mgr. Miloslav Jirků, Ph.D.

České Budějovice 2010

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma “Jednohostitelské kokcidie ocasatých obojživelníků“, vypracovala samostatně a veškerou použitou literaturu jsem v práci uvedla.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě, fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG, provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích, 16.4. 2010

Podpis:

Anotace CZ

Bakalářská práce je zaměřena na studium jednohostitelských kokcií ocasatých obojživelníků. Cílem bylo shrnout relevantní literární informace v kontextu současných znalostí o taxonomii, systematice a biologii kokcií obecně a provést koprologické vyšetření čolků ze dvou lokalit na přítomnost oocyst kokcií v trusu.

Klíčová slova: Apicomplexa, kokcidie, Amphibia, Caudata, taxonomie, koprologické vyšetření, *Eimeria*, *Isospora*

Annotation EN

The study is focused on homoxenous coccidia of caudate amphibia. The aims include review of relevant literature information in the context of current knowledge on taxonomy, systematics and biology of coccidia in general and coprological examination of newts from two localities for a presence of coccidian oocysts in fecal samples.

Key words: Apicomplexa, coccidia, Amphibia, Caudata, taxonomy, coprological examination, *Eimeria*, *Isospora*

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Miloslavu Jirků za vedení bakalářské práce. Děkuji také Ing. Haně Chobotské ze správy CHKO Třeboňsko za pomoc při výběru lokalit vhodných pro terénní část práce a vyřízení výjimky (č.j. SR/0018/TR/2009 - 3) ze zákona o ochraně přírody a krajiny, nezbytné pro odchyt a manipulaci s volně žijícími obojživelníky. Také bych chtěla poděkovat své rodině a kamarádům za podporu a pochopení.

SOUHRN

Řád Caudata (ocasatí obojživelníci) zahrnuje v současnosti ~600 popsáných druhů ve více než 60-ti rodech a devíti čeledích, jež představují ~9% žijících druhů obojživelníků. Pouze 2.5% druhů (15/600) osmi rodů a tří čeledí však bylo dosud vyšetřeno na přítomnost kokcií, čehož výsledkem byly popisy 22 druhů kokcií dvou rodů čeledi Eimeriidae. Výzkum parazitů obojživelníků má navíc zejména v posledních dekádách zvláštní význam v souvislosti s globálním ubýváním obojživelníků jež se celosvětově projevuje vymíráním populací i celých druhů.

Kokcidie jsou významí protisté parazitující u všech tříd obratlovců, stejně jako u mnoha bezobratlých a představují jedny z nejdíverzifikovanějších eukaryot. Ve srovnání s kokciemi jiných skupin hostitelů jsou kokcidie obojživelníků téměř neznámé a dostupné publikace se většinou omezují na popis jediného vývojového stádia, oocysty. Obtížnost práce s těmito specializovanými citlivými kokciemi je pak jedním z hlavních důvodů nedostatku informací. V práci jsou shrnuty současné znalosti obecné biologie, taxonomie a systematiky jednohostitelských kokcií s důrazem na kokcidie ocasatých, spolu s výsledky vlastního průzkumu výskytu kokcií u coasatých na Třeboňsku. Rod *Eimeria* v současnosti zahrnuje 20 druhů parazitujících u ocasatých, z toho 6 druhů v Palearktické oblasti, 11 druhů v Nearktické oblasti a 3 druhy v oblasti Orientální. Revize druhů r. *Eimeria* z ocasatých odhalila dva morfotypy oocyst patrně korelující s charakterem endogenního vývoje, z nichž oba mají svůj analogický protějšek u kokcií žab, přičemž jeden morfotyp dříve popsáný z žab podle současných znalostí u ocasatých chybí. Pouze dva druhy r. *Isospora* se vyskytují u ocasatých, oba v Nearktické oblasti.

Vlastní průzkum založený na koprologické diagnostice vůbec poprvé potvrdil výskyt kokcií u ocasatých rovněž na území ČR, konkrétně druhy *E. propria* a *E. canaliculata* u čolka obecného a čolka velkého.

OBSAH	Strana
SOUHRN	3
1. ÚVOD	5
2. CÍLE PRÁCE	7
3. KOMENTOVANÝ PŘEHLED LITERÁTURY	7
3.1. KOKCIDIE – TAXONOMIE A ŽIVOTNÍ CYKLY	7
3.2. KOKCIDIE OCASATÝCH OBOJŽIVELNÍKŮ	11
3.3. ČELEĎ EIMERIIDAE MINCHIN, 1903	11
3.4. ROD <i>Eimeria</i> SCHNEIDER, 1875	11
3.5. ROD <i>Isospora</i> SCHNEIDER, 1881	14
4. PRAKTICKÁ ČÁST – VYŠETŘENÍ ČOLKŮ Z PŘÍRODY	21
5. POUŽITÁ LITERATURA	23

1. ÚVOD

Kmen Apicomplexa Levine, 1970 nahradil dlouho užívaný taxon Sporozoa Leuckart, 1879, jež zahrnoval Myxozoa, Microsporidia, Haplosporidia, spolu s taxony jež jsou v současnosti klasifikována jako Apicomplexa. Ačkoliv někteří systematikové (Corliss 1984) namítali, že Sporozoa jsou z hlediska zoologické nomenklatury prioritní, kmen Apicomplexa je nyní široce uznáván jako platný (Corliss 1994). Apicomplexa jsou charakterizována apikálním komplexem složeným z několika specializovaných organel na předním (apikálním) konci jejich invazních stádií, zoitů. Apikální komplex se podílí na průniku zoitů do hostitelských buněk. Podle nejnovějšího taxonomického souhrnu Perkins et al. (2000) zohledňovaného v této studii, zahrnují Apicomplexa tři třídy, Perkinsasida, Aconoidasida a Conoidasida. Perkinsasida zahrnují jediný rod se šesti popsány druhy jež parazitují v mořských mlžích a úšních. Aconoidasida zahrnují dva taxonomicky bohaté řády Haemosporidia a Piroplasmida. V rámci třídy Conoidiasida, jež zahrnuje většinu známých příslušníků apikomplex, jsou v současné době rozlišovány dvě podtřídy, Gregarinasina (paraziti bezobratlých) a Coccidiasina (paraziti bezobratlých a obratlovců).

Ze čtyř uznávaných řádů třídy Coccidiasina jsou tři spíše okrajové, zahrnující málo známé parazity bezobratlých. Čtvrtý řád Eucoccidiorida, jehož příslušníci se běžně označují jako kokcidie, je taxonomicky extrémně bohatý a zahrnuje nepřeborné množství čeledí a rodů s nejasnými fylogenetickými vztahy. Na rozdíl od drtivé většiny zástupců získaly vzhledem k jejich medicínskému významu v minulosti velkou pozornost druhy parazitující u člověka a domestikovaných zvířat a znalosti celého řádu jsou tak pohřbeny od těchto několika detailně prostudovaných druhů. To se odráží v mnoha nesprávných taxonomických interpretacích a častých taxonomických změnách (Tenter et al. 2002). Naštěstí zavádění nových metod umožňuje provádění komplexnějších morfologických a molekulárních analýz než kdykoliv v minulosti. Díky obnovenému zájmu o taxonomii a fylogenezi kokcidií v posledních dvaceti letech je dnes zřejmé, že tradiční klasifikace kokcidií je zcela umělá, často založená na morfologických znacích bez taxonomické hodnoty, konkrétně na morfologii oocyst.

Systematika organismů, včetně kokcidií, by měla odrážet skutečné vztahy mezi nimi. Molekulárně fylogenetické analýzy tedy poskytují dobrý nástroj právě k objasnění systematiky. Molekulární analýzy nás informují o fylogenetických vztazích v rámci vybrané skupiny organismů, tedy o jejich skutečných evolučních vztazích. Studium fylogenetických vztahů by však nemělo být jediným cílem, neboť

skutečnou výzvou jsou analýzy kombinující molekulární fylogenetiku s morfologickými a biologickými charakteristikami. Pouze takový přístup může vést k pochopení mechanismů a událostí, jež formovaly evoluční historii jednotlivých taxonů.

Jak bylo naznačeno výše, umělá systematika kokcií je založena převážně na ne-informativních znacích. Zobecnění znalostí o několika málo dobře prozkoumaných taxonech na všechny skupiny kokcií často nesouhlasí s výsledky molekulárně fylogenetických analýz a ústí v přetrvávající taxonomický chaos. Bohužel, existující molekulárně fylogenetické analýzy jsou založeny na velmi malém vzorku celkové diverzity kokcií, což značně omezuje promítání nových znalostí o fylogenetických vztazích do systematiky a taxonomie. Jedním ze způsobů jak vyplnit mezery v našich znalostech, by mohl být posun naší pozornosti od zavedených modelů (kokcie teplokrevných hostitelů) k dosud opomíjeným taxonům hostitelů i samotných kokcií. Jak naznačuje práce Kopečná et al. (2006), začlenění těchto chybějících článků do fylogenetických analýz je dobrý způsob jak objasnit fylogenetické vztahy kokcií i apikomplexu obecně. V případě kokcií pak takový přístup vyžaduje rozšíření výzkumu různorodých, leč málo známých taxonů parazitujících u bezobratlých a poikilotermních obratlovců (Jirků et al. 2002, Kopečná et al. 2006, Morrison et al. 2004).

V rámci kokcií jsou nejméně známé taxony ze studenokrevných hostitelů. Absence informací o kokciích poikilotermů nemusí být na první pohled nápadná, protože se moc neodráží na úrovni alfa taxonomie, přičemž jsou stále popisovány nové druhy (Duszynski et al. 2000). Zásadní je nicméně nedostek informací o detailní morfologii oocyst a endogenních vývojových stádií, hostitelskou specifitou, životními cykly a ekologií. Z tohoto pohledu jsou z kokcií obratlovců nejméně známé taxony parazitující u obojživelníků.

Obojživelníci (Amphibia) představují unikátní skupinu obratlovců zahrnující 6662 známých druhů (www.amphibiaweb.org 16.4.2010). Podle recentních analýz se snižují populace 42% druhů a 32% druhů je ohroženo, což potvrzuje i trvalý nárůst počtu vymřelých a ohrožených druhů. V některých případech je úbytek obojživelníků vysvětlený antropogenními změnami životního prostředí, u jiných však není souvislost s environmentálními faktory zřejmá. Z konkrétních příčin poklesu populací obojživelníků lze uvést například ničení biotopů, introdukce nepůvodních druhů, znečištění prostředí a UV záření, přičemž zřejmě největší hrozbou jsou pro obojživelníky globální změny související s oteplováním klimatu. Ačkoliv byl v posledních dvou dekádách potvrzen zásadní význam infekčních onemocnění na masové ubývání obojživelníků, zejména Chytridiomykózy a

retrovirózy, vliv jiných parazitárních onemocnění na populace obojživelníků nebyl až na ojedinělé výjimky studován (Daszak et al. 2003, Skerratt et al. 2007, Stuart et al. 2004,). Z důvodů uvedených výše je předložená práce zaměřena na kokcidie čeledi Eimeriidae parazitující u ocasatých obojživelníků.

2. CÍLE PRÁCE

1. Rešeršní zpracování současných poznatků o kokcidiích ocasatých obojživelníků.
2. Vlastní průzkum diverzity kokcidií ocasatých obojživelníků z vybraných lokalit v ČR na základě detekce oocyst v koprologickém materiálu.
3. Vyhodnocení získaných poznatků a jejich porovnání s publikovanými údaji.

3. KOMENTOVANÝ PŘEHLED LITERATURY

3.1. KOKCIDIE - TAXONOMIE A ŽIVOTNÍ CYKLY

Byť někteří autoři zahrnují Haemosporida, Piroplasmida, nebo obě tyto skupiny ke kokcidiím, zahrnují **kokcidie sensu stricto**, tedy řád Eucoccidiorida, dvě podskupiny (podřády) – Adeleorina a Eimeriorina (Perkins et al. 2000).

Informace v následujících odstavcích vycházejí zejména z taxonomických souhrnů kmene Apicomplexa od Levine (1985), Perkins et al. (2000) a Tenter et al. (2002), případně několika dalších autorů – viz citace.

Diagnostické znaky. Kokcidie skupiny Eimeriorina jsou odlišeny od skupiny Adeleorina dvěma klíčovými znaky: **i.** nezávislý vývoj gamet bez syzygie, a **ii.** produkce velkého množství mikrogamet v mikrogametocytech.

Kokcidie jsou obligátní intracelulární paraziti různých tkání bezobratlých i obratlovců, jejichž životní cykly mohou být homoxenní (jednohostitelské), heteroxenní či fakultativně heteroxenní (vícehostitelské). Sporozoity se vyvíjejí buď v environmentálně odolných oocystách nebo souvrství membrán analogických stěně oocysty a jsou často obdány sekundárním obalem zvaným sporocysta. Jedinými pohyblivými stádii jsou zoiti a mikrogamety, přičemž mikrogamety jsou zároveň jediná bičkatá stádia. Zygoty jsou vesměs nepohyblivé.

Taxonomie. Kokcidie představují jedny z nejdiferenzovanějších eukaryot (a tedy i apicomplex) a zahrnují jedny z nejodvozenějších apicomplex (Levine 1985, Perkins et al. 2000). Kokcidie skupiny Eimeriorina se dělí na nižší taxony podle morfologických znaků a životních cyklů (Levine 1985, Perkins et al. 2000, Tenter et al. 2002). Zatímco pozice eimeriorinidních kokcidií v rámci apikomplex je v tradiční

klasifikaci protist celkem ustálená, taxonomie čeledí a nižších taxonů byla a je značně inkonzistentní (Tenter et al. 2002).

Dle současné taxonomie (Perkins et al. 2000) zahrnuje podřád Eimeriorina sedm čeledí: Aggregatidae, heteroxenní v mořských bezobratlých; Calyptosporidae, heteroxenní v rybách a korýších; Eimeriidae, homoxenní v obratlovcích; Elleipsisomatidae, heteroxenní v krtcích a rostočích; Lankesterellidae, heteroxenní v obojživelnících nebo plazech a bezobratlých; Sarcocystidae, heteroxenní v obratlovcích; Selenococcidiidae, homoxenní v korýších; Spirocystidae, homoxenní v máloštětináčích. Tyto čeledi nicméně představují velmi různorodou skupinu apicomplex zahrnující mnoho rodů a druhů, jejichž taxonomické zařazení je zcela umělé a často neodpovídá fylogenetickým vztahům.

Taxonomie kokcií je tradičně založena na fenotypových charakteristikách, zejména morfologii známých vývojových stádií a hostitelské specifitě. Zvláštní taxonomický význam má tradičně počet sporocyst v oocystě a počet sporozoitů v jednotlivých sporocystách, což byly a v mnoha případech stále jsou, hlavní diagnostické znaky jednotlivých rodů. Morfologické detaily dospělých (vysporulovaných) oocyst jsou pak hlavními diagnostickými znaky pro identifikaci jednotlivých druhů (Duszynski and Wilber 1997) – viz **Fig. 1.** – morfologie oocysty.

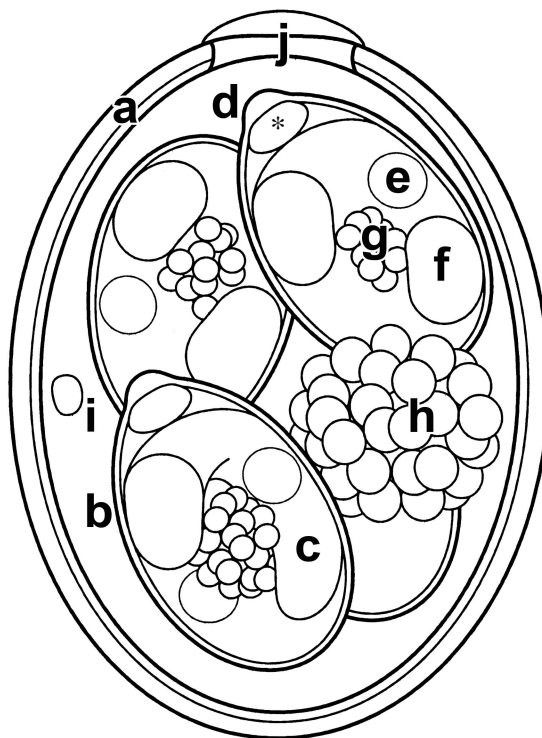


Fig. 1. Základní morfologické znaky vysporulované (dospělé) oocysty rodu *Eimeria* obsahující 4 sporocysty:

- a stěna oocysty
- b sporocysta
- c sporozoit
- d Stiedovo tělísko - pod ním substiedální tělísko (*)
- e jádro sporozoitu
- f refraktilní tělísko
- g reziduum sporocysty
- h reziduum oocysty
- i pólové tělísko
- j mikropyle s pólovou čepičkou

Autor preokresby: Miloslav Jirků ©

Jak bylo naznačeno výše, jsou umělý charakter taxonomie spolu s rozšiřováním datasetů molekulárně fylogenetických studií kokcidií zdrojem neustálých změn na všech taxonomických úrovních. Uvedme dva konkrétní příklady, jak hluboce může právě zahrnutí nových taxonů do molekulárně fylogenetických studií ovlivnit naše chápání příbuzenských vztahů různých skupin apikomplex:

1) Jednoznačně byla vyvrácena příslušnost skupiny Cryptosporidiidae ke kokcidiím hned několika studiemi, jež shodně prokázaly, že se jedná o evolučně vyhraněnou skupinu příbuznou (sesterskou) gregarinám (Carreno et al. 1999). Recentně pak byla prokázána příbuznost gregarin a kryptosporidií také na úrovni morfologické (Valigurová et al. 2007).

2) V jiném případě bylo zpochybněno zařazení čeledi Aggregatidae mezi Eimeriorina (Eimeriina) fylogenetickou analýzou Kopečná et al. (2006), jež naznačila příbuznost zástupců rodu *Aggregata* k adelinám (Adeleorina), tedy kokcidiím parazitujících v bezobratlých.

Uvedená zjištění naznačují, že další snahy o objasnění taxonomie a systematiky kokcidií a apikomplex obecně, musí být založeny na kombinaci molekulárně fylogenetických analýz a hledání autapomorfii definujících vyšší taxony. Nicméně, takový postup je ve většině případů obtížný, ne-li nemožný, z důvodu nedostatku relevantních informací o jednotlivých druzích a nedostatečných datasetů pro molekulárně fylogenetické studie.

Životní cykly. Eimeriorina zahrnují taxony s typickým kokcidiovým životním cyklem sestávajícím z jedné či více generací asexuálního množení – **merogonie**, sexuální reprodukce – **gamogonie**, následovanou asexuálním množením – **sporogonií**.

Životní cykly kokcidií začínají uvolněním oocyst do vnějšího prostředí skrze výkaly hostitele. Oocysty mnoha zástupců, např. kokcidie čel. Eimeriidae se Stiedovým tělískem, ve vnějším prostředí po několik dní dospívají (sporulují) a stávají se teprve zde infekčními, zatím co oocysty jiných, např. zástupci čel. Sarcocystidae, již opouští hostitele v infekčním stavu. Po požití vnímavým hostitelem se stěna oocysty v trávicím traktu rozpadá. U druhů majících sporocysty, kterých je většina, se dále rozpadají tzv. **excystační struktury** ve stěně sporocysty, čímž se do gastrointestinálního traktu hostitele uvolní infekční sporozoity. Sporozoity cestují tělem hostitele a infikují buňky v konkrétním cílovém orgánu. Bezprostředně po penetraci sporozoitů do nové hostitelské buňky, což je začátek endogenního vývoje, se vytváří trofozoity, z nichž se stávají meronty (schizonti). Následuje většinou několik generací merontů, jež produkují merozoity infikující další a další

buňky. Po merogonii nastává gamogonie, kdy se z merozoitů poslední generace sexuálně již diferencovaných merozoitů vytváří makrogamonti (makrogamety) a mikrogamonti (z nichž se dělením vytváří velký počet mikrogamet). Po splynutí mikrogamety s makrogametou se kolem vzniklé zygoty vytváří souvrství membrán, z níž se vytvoří stěna oocysty a vlastní protoplazma zygoty se mění na jednobuněčného sporonta, čímž vzniká nezralá (neinfekční) oocysta. Endogenní vývoj je zakončen uvolněním oocyst z hostitelské tkáně do dutin parazitovaných orgánů (střevo, játra, ledviny atd.) a začíná exogenní vývoj, kdy jsou oocysty uvolněny do vnějšího prostředí ve výkalech či moči. U některých druhů se oocysty do vnějšího prostředí neuvolňují, ale buď (i) jsou sporozoity uvolněny opět do těla hostitele – jak je tomu u Lankesterellidae, nebo se oocysty v hostiteli hromadí, což je případ některých druhů rodů *Goussia*, *Eimeria* a *Calyptospora* z ryb a obojživelníků (Duszynski et al. 1979, Overstreet 1981).

V rámci skupiny Eimeriorina je převážná většina zástupců čel. Eimeriidae homoxenní a prodělávají tedy celý cyklus v jednom hostiteli. Naopak čel. Sarcocystidae zahrnuje převážně druhy obligátně či fakultativně heteroxenní, u nichž po merogonii následuje vytváření tkáňových cyst v různých orgánech mezihostitele, zatímco gamogonie a následná tvorba oocyst probíhá již v trávicím traktu definitivního hostitele, většinou predátora.

Jak bylo uvedeno výše, obsahují nedospělé (nevysporulované) oocysty jednu cytoplasu (sporont) jež se dělí na (i) blastomery z nichž se tvoří sporocysty obsahující sporozoity, nebo (ii) přímo nahé sporozoity bez sporocysty. Vývoj nedospělé oocysty v dospělou infekční oocystu se nazývá **sporulace**. Během sporulace se uvnitř sporocyst tvoří reziduální tělíška (reziduum sporocysty), přičemž u některých druhů se vytváří podobný útvar, reziduum oocysty, vytváří rovněž mimo sporocysty. Pouze plně vysporulované oocysty obsahují sporozoity, jež jsou infekční pro nového hostitele. sporulace některých kokcií probíhá buď uvnitř – **endogenní sporulace** (rody *Goussia*, *Sarcocystis*, *Hyaloklossia* atd.), či vně – **exogenní sporulace** hostitele (kokcie se Stiedovým tělíškem, *Toxoplasma* atd.). Oocysty druhů s exogenní sporulací potřebují různě dlouhou dobu ve vnějším prostředí, aby vysporulovaly a staly se tak infekčními, zatímco oocysty druhů s endogenní sporulací jsou infekční ihned po uvolnění z hostitele. Pro úspěšnou exogenní sporulaci potřebují oocysty určité podmínky, z nichž nejdůležitější jsou teplota a vlhkost. Naopak po vysporulování jsou již oocysty více či méně odolné vůči vnějším vlivům, přičemž nejodolnější jsou silnostěnné oocysty druhů z teplokrevných obratlovců a plazů a nejcitlivější naopak tenkostěnné oocysty druhů

z ryb a obojživelníků. Ve vhodných podmínkách zůstávají vysporulované oocysty infekční i několik let.

3.2. KOKCIDIE OCASATÝCH OBOJŽIVELNÍKŮ

Řád Caudata (ocasatí obojživelníci) zahrnuje v současnosti asi šest set popsáných druhů ve více než 60-ti rodech a devíti čeledích, jež představují ~9% žijících druhů obojživelníků (Frost and Darrel 2010). Nicméně, pouze 2.5% druhů (15/600) z osmi rodů a tří čeledí bylo dosud vyšetřeno na přítomnost kokcií.

Dosud bylo z ocasatých obojživelníků popsáno 22 druhů kokcií dvou rodů, z nichž všechny patří do čeledi Eimeriidae: *Eimeria* (20 druhů), *Isospora* (2 druhy). Pro všechny druhy je typická velmi tenká stěna oocysty, podobně jako u druhů parazitujících u ryb a žab, rovněž vázaných primárně na vodní, nebo vlhké prostředí. Kokcidie ocasatých obojživelníků jsou vesměs velmi málo známé. U drtivé většiny je známa pouze morfologie jediného vývojového stádia – oocysty, přičemž lokalizace a morfologie stádií endogenního vývoje je známa pouze u dvou druhů (*E. grobbeni*, *E. ambystomae*). Následuje stručná charakteristika čeledí a rodů kokcií parazitujících u ocasatých. Základní taxonomická a morfologická data pro jednotlivé druhy jsou shrnuta v Table 1. na straně 16-17. a doplněna perokresbami oocyst jednotlivých druhů z původních popisů – viz Fig. 2-4. Komentáře v oddílech “Poznámky” konfrontují tradiční taxonomii se současným stavem znalostí, přičemž v oddíle “Diskuze” jsou konfrontovány poznatky získané revizí literatury s poznatky jiných autorů s důrazem na druhy parazitující u ocasatých. Doplnující taxonomické a morfologické informace lze najít v souhrnu Duszynski et al. (2007). Veškeré morfometrické údaje v celém textu jsou v μm .

3.3. Čeleď Eimeriidae (Minchin, 1903)

Čeleď Eimeriidae zahrnuje jednohostitelské kokcidie obratlovců. Ačkoliv nedávné studie prokázaly u některých druhů r. *Isospora* a r. *Goussia* ze savců respektive ryb, možnost fakultativně heterxenního životního cyklu (Dubey and Mehlhorn 1978, Frenkel and Dubey 1972, Steinhagen 1991, Steinhagen and Körting 1990), nenarušují tyto výjimky pravidlo homoxenního životního cyklu u drtivé většiny eimeridů (viz Poznámky níže). Podle Upton (2000) neexistují kritéria, jež by spolehlivě odlišovaly čeledi Aggregatidae a Eimeriidae, přičemž jediný rozdíl mezi nimi spočívá v homoxenních (Eimeriidae) a heteroxennímch (Aggregatidae) životních cyklech.

3.4. Rod *Eimeria* Schneider, 1875

Rod *Eimeria* patří s více než 1300 popsanými druhy k druhově nejbohatším eukaryotním taxonům (Duszynski et al. 2000). Drtivá většina studií o druzích r. *Eimeria* se však omezuje na často nedostatečné popisy nových druhů založené na morfologii oocyst, zatím co endogenní vývoje zůstávají většinou neznámé.

Diagnostické znaky: Rod je tradičně charakterizován přítomností čtyř dizoických (dva sporozoity obsahují) sporocyst v oocystě.

Typový druh: *Eimeria falciformis* (Eimer, 1870); Typový hostitel: *Mus musculus*; Lokalizace infekce: střevo.

Popsáno 20 druhů z ocasatých: Palearktická oblast, 6 druhů; Nearktická oblast, 11 druhů; Orientální oblast, 3 druhy.

Poznámky: Z nominálních druhů r. *Eimeria* je kolem 500 (29%) popsáno z poikilotermních hostitelů (Duszynski et al. 2000). Z nich pouze dva, *Eimeria tropidura* Aquino-Shuster, Duszynski and Snell, 1990 z ještěřů r. *Microlophus* (Iguanidae) a *Eimeria ranae* Dobell, 1909 z evropských skokanů r. *Rana* byly dosud zahrnuty do molekulárně fylogenetických studií (Jirků et al. 2009, Morrison et al. 2004). Téměř veškeré znalosti o příbuzenských vztazích eimerií jsou proto odvozeny z analýz druhů z ptáků a savců, jež reprezentují jen malou část skutečné diverzity rodu.

Taxonomický chaos v rámci rodu dobře ilustruje následující příklad. Studie morfologie endogenních vývojových stádií vedly k reklasifikaci druhů r. *Eimeria* z plazů a ustavení dvou rodů, *Acroeimeria* Paperna and Landsberg, 1989 a *Choleoeimeria* Paperna and Landsberg, 1989 (Paperna and Landsberg 1989). Přes přesvědčivé důkazy o relevantnosti navržených taxonomických změn na základě komplexní analýzy vývojových cyklů jsou velkou částí taxonomů uvedené dva "nové" rody odmítány, takže jsou stále popisovány nové druhy chybně přiřazované k r. *Eimeria* (např. Asmundsson et al. 2006, Upton 2000). Totéž platí o rodech *Epieimeria* Dyková and Lom, 1981 a *Goussia* Labbé, 1896 z poikilotermů. Navzdory preferencím konzervativních taxonomů odmítajících opodstatněné rozdělení r. *Eimeria*, potvrzují kombinované molekulárně-fylogenetické a morfologické analýzy (např. Jirků et al. 2002, Jirků et al. 2009a,b), že rody *Choleoeimeria* a *Goussia* nejsou r. *Eimeria* blízce příbuzné, což podporuje koncept odděleného rodového statusu těchto rodů. Rod *Eimeria* proto formálně zahrnuje několik evolučně jasně vymezených linií: (i) "opravdové" eimerie z ptáků, savců a obojživelníků jež spojuje přítomnost Stiedova tělíska ve stěně sporocysty, (ii)

intestinální epicelulární druhy z plazů – r. *Acroeimeria*, (iii) žlučnickové plazí druhy – r. *Choleoeimeria*, (iv) příslušníky r. *Goussia* z ryb a obojživelníků a pravděpodobně další, dosud nerozpoznané linie. Ve zkratce, r. *Eimeria* tak, jak je tradičně definován, je parafyletický, definován nespecifickými znaky. Další významnou skutečností rovněž odhalenou v poslední dekádě díky zavádění molekulárních metod je skutečnost, že nelze vytýčit hranice mezi různými rody kokcií se Stiedovým tělískem (Jirků et al. 2009a,b).

Diskuze. Z druhů r. *Eimeria* parazitujících u obojživelníků zatím byla do molekulárně-fylogenetických studií zahrnuta pouze zmiňovaná *E. ranae* ze skokanů, přičemž byla prokázána její příslušnost k typickým kokciím se Stiedovým tělískem – viz Jirků et al. 2009a. Stejná studie však na základě distribuce morfologických znaků odhalila mezi příslušníky r. *Eimeria* ze žab existenci tří morfotypů na základě korelací mezi kombinacemi morfologických znaků oocyst a charakterem endogenního vývoje. Konkrétně: Morfotyp 1 charakterizovaný přítomností rezidua oocysty, výrazným Stiedovým tělískem a extranukleárním endogenním vývojem v enterocytech (celkově podobný jiným druhům rodu). Morfotyp 2 charakterizovaný absencí rezidua oocysty, přítomností malého - často špatně rozeznatelného Stiedova tělíška a intranukleárním endogenním vývojem v enterocytech. A konečně Morfotyp 3 charakterizovaný absencí rezidua oocysty, absencí Stiedova tělíška, velmi malými oocystami (<12 μm) a endogenní sporulací. Pouze dva druhy nebylo možné k uvedeným morfotypům přiřadit z důvodu morfologické výlučnosti, či chybějících informací.

Překvapivě podobně dopadlo i rozřídění *Eimeria* spp. z ocasatých (Table 1., str. 16-17), kde se profilují dva základní morfotypy – Morfotyp 1 charakterizovaný přítomností rezidua oocysty a typicky protaženými sporocystami. U některých druhů je v literatuře Stiedovo tělísko uváděno, jindy nikoliv. Jak naznačuje naše pozorování Stiedova tělíška u *E. propria* (viz kapitola 4.), která jej dle literatury nemá, může být domnělá absence často jen otázkou přehlédnutí, zejména v případech popisů z 19. počátku 20. století, kdy ne všichni autoři popisů tuto strukturu vůbec hledali. Podle literatury bez Stiedova tělíška. Srovnatelná morfologie není známá u *Eimeria* spp. z žádného jiného typu hostitele z více než 1300 druhů rodu a jedná se tedy zřejmě o morfotyp *Eimeria* spp. typický pro ocasaté obojživelníky. Morfotyp 1 z Tab. 1. by mohl být analogický Morfotypu 1 z Jirků et al. (2009a), přičemž podobnost naznačuje též extranukleární lokalizace endogenních vývojových stádií *Eimeria ambystomae* v enterocytech. Bohužel je v rámci Morfotypu 1 u ocasatých znám charakter endogenního vývoje pouze u tohoto

zástupce, takže se jedná pouze o spekulaci. Morfotyp 2 z Tab. 1. zdá se rovněž mít analogii v Morfotypu 2 z Jirků et al. (2009a), kde všichni zástupci sdílí absenci rezidua oocysty a přítomnost malého, často stěží rozeznatelného Stiedova tělíska. Tento závěr dále podporuje další shoda, konkrétně intranukleární lokalizace endogenních vývojových stádií v enterocytech známá u *Eimeria grobbeni* a *Eimeria salamandrae* opět shodná pro Morfotyp 2 v Tab. 1. níže (tedy u ocasatých) a Morfotyp 2 ze studie Jirků et al. (2009a).

Pro úplnost, žabí Morfotyp 3 z práce Jirků et al. (2009a) nemá mezi známými druhy z ocasatých žádného morfologicky příbuzného zástupce. V Tab. 1. nebylo možné zařadit k jednotlivým morfotypům pouze dva druhy, *Eimeria kingi* a *Eimeria opacum*, přičemž nebyť přítomnosti rezidua oocysty, odpovídal by *E. kingi* nejspíše Morfotypu 2, což může být skutečnost, pokud se jedná o atypické polární tělísko. V případě *E. opacum* nelze vyloučit, že se jedná o pseudoparazita, tedy náhodnou pasáž, jelikož velmi podobné oocysty jednou zjistil M. Jirků (nepublikovaná data) u skokana *Rana temporaria* z ČR, přičemž ani jeden z pokusů experimentálně infikovat pulce a dospělé *R. temporaria* nebyl úspěšný. Do trávicího traktu obojživelníka by se mohly oocysty náhodně dostat např. pozřením koprofágního hmyzu a jelikož nepřipomínají oocysty žádné známé skupiny kokcií, nelze jejich původ prozatím vystopovat.

Zda se v případě diskutovaných morfotypů jedná o přirozené skupiny, nelze bez dosbírání potřebných údajů o endogenním vývoji a získání sekvencí vhodných molekulárních markerů v tuto chvíli říci, avšak shody zdají se být spíše nenáhodné – tím spíše, že podobné morfotypy byly nezávisle na sobě zjištěny hned u dvou skupin hostitelů v rámci jedné třídy obojživelníků.

Pokud jde o hostitelské spektrum kokcií ocasatých, lze na základě souhrnu v Tab. 1. konstatovat, že některé druhy jsou schopny parazitovat u několika příbuzných druhů jednoho rodu (např. *E. ambystomae*), nebo dokonce několika příbuzných rodů hostitelů (*Eimeria canaliculata*, *Eimeria sphaerica*, *Eimeria tertia*), ale žádný nepřekračuje hranice čeledi. Hostitelská specifita na úrovni rodu hostitele je známá u některých eimerií žab i jiných tříd hostitelů, zatím co hostitelské spektrum zahrnující několik rodů v rámci čeledi je spíše neobvykle široké u kokcií obecně a může být způsobeno podobnou ekologií, příp. fyziologií hostitelů.

Výčet popsáných druhů v Tab. 1 prozrazuje zajímavou skutečnost, totiž že nejvíce druhů je popsáno z oblastí s nejnižší diverzitou obojživelníků, tedy Holartické oblasti, což je samozřejmě v rozporu s obecně platným pravidlem, že vyšší

diverzita hostitelů znamená vyšší diverzitu parazitů, takže se zjevně jedná pouze o artefakt způsobený absencí znalostí.

3.5. Rod *Isospora* Schneider, 1881

Diagnostické znaky: Rod je tradičně definován přítomností dvou tetrazoických sporocyst v oocystě.

Typový druh: *Isospora rara* Schneider, 1881; Typový hostitel: *Limax cinereoniger*.

Popsány dva druhy z ocasatých: Oba druhy jsou z Nearktické oblasti.

Poznámky: Neplatný druh, *Isospora rara* – pseudoparazit slimáka, představoval typový druh rodu přes 120 let. Ačkoliv zatím nebyl formálně ustanoven nový typový druh, Barta et al. (2005) navrhli používat jméno *Isospora* pro druhy se Stiedovým tělískem parazitující u ptáků (zástupci čel. Eimeriidae) a jméno *Cystoisospora* pro druhy mající jako excystační strukturu nikoliv Stiedovo tělísko, ale švy ve stěně sporocysty, jež parazitují u savců (příslušníci čel. Sarcocystidae). Z >350 popsáných druhů r. *Isospora*, bylo kolem jednoho sta (29%) popsáno z poikilotermů (Duszynski et al. 2000). Žádný druh r. "*Isospora*" z poikilotermů dosud nebyl zahrnut v publikované fylogenetické analýze znalosti o fylogenetických vztazích *Isospora* sensu lato je odvozována ze sekvencí několika málo savčích a ptačích druhů (Morrison 2004). Rod "*Isospora*" v tradičním pojetí je dle molekulárně-fylogenetických analýz složen ze dvou nepříbuzných linií. Zatímco druhy se Stiedovým tělískem parazitující u ptáků vykazují jasnou afinitu ostatním kokcidiím se Stiedovým tělískem, druhy bez Stiedova tělíska (se švy ve stěně sporocysty) patří mezi Toxoplasmatinae v rámci čeledi Sarcocystidae. dostupné informace ukazují jak (i) význam sporocystových excystačních struktur pro klasifikaci kokcidií (Jirků et al. 2002), tak skutečnost, že (ii) savčí a ptačí druhy původního rodu *Isospora* reprezentují nepříbuzné linie kokcidií, tedy že rod je umělým taxonem. Nejsou sice dostupné žádné sekvence druhů r. *Isospora* z obojživelníků, ale je pravděpodobné, že ty, jež nemají Stiedovo tělísko a excystují skrze sutury patří k sarkocystám.

Table 1. Souhrn morfologie oocyst všech pojmenovaných druhů kokcií ocasatých obojživelníků. Symboly a zkratky: SB – Stiedovo tělísko; Polar gr. – polární tělísko; Ooc. res. – rezidium oocysty; hvězdička* označuje typové lokality u druhů známých z více oblastí; memb. – rezidium oocysty obdáno membránou; scatter. – rezidium oocysty složeno z granul rozptýlených mezi sporocystami; globul. – rezidium oocysty složeno ze shluku velkých globulárních útvarů; ? – nejistý údaj. Morfotypy viz Diskuze, perokresby oocyst viz Fig. 2-4.

Species	Host(s)	Oocyst shape Oocyst size L/W (if specified by author)	Polar gr. Ooc. res.	Sporocyst shape Sporocyst size Character of Stieda Body	Localities	Relevant references
Genus <i>Eimeria</i>						
Morphotype 1 – oocyst residuum present; sporocysts markedly long, elongate-elliptical to spindle-shaped; SB probably always present, but likely overlooked due to the generally slender and elongate shape of sporocysts						
<i>Eimeria ambystomae</i> Saxe 1955	Larval <i>Ambystoma tigrinum</i> , <i>Ambystoma mavortium</i> , <i>Ambystoma texanum</i>	Elliptical 31.2 (24.5–36) × 17.7 (15–20)	- + scatter.	Lanceolate 21.9 (17–24.5) × 5.1 (4–6) SB present	USA: Iowa - Dickinson County*, Colorado, Indiana, Nebraska, New Mexico, Texas France	Duszynski et al. 1972; McAllister and Upton 1987; Saxe 1955;
<i>Eimeria canaliculata</i> Lavier, 1936	<i>Ichthyosaura alpestris</i> , <i>Lissotriton vulgaris</i> , <i>Lissotriton helveticus</i> , <i>Triturus cristatus</i>	Cylindrical symmetrical 39.5 (36.0–42.0) × 24 (20.0–27.0) L/W 1.6	- + globul.	Lanceolate 25–30 × 6 SB may be present	France	Lavier 1936
<i>Eimeria distorta</i> Saxe 1955	Larval <i>Ambystoma tigrinum</i>	Elongate-elliptical 29.2 (27–31) × 15.5 (14–16) L/W 1.9	- + scatter.	Elongate elliptical 12.4 × 7.3 SB absent	USA: Iowa - Dickinson County	Saxe 1955
<i>Eimeria longaspora</i> Barrow and Hoy 1960	<i>Notophthalmus viridescens</i>	Spherical to subspherical 34.9 (30–40) × 33.1 (26–38) L/W 1.1 Size increases in time up to 48 × 46	- +	Lanceolate, pointed poles 24.0 (23–26.5) × 3.8 SB absent	USA: Michigan - Douglas Lake, University of Michigan Biological Station	Barrow and Hoy 1960
<i>Eimeria megaresidua</i> Barrow and Hoy 1960	<i>Notophthalmus viridescens</i>	Elliptical 56.2 (55–58) × 47.9 (45–49) L/W 1.2	- +	Lanceolate, pointed poles 27.6 (18–34) × 9.5 (8–10) SB absent	USA: Michigan - Douglas Lake, Sedge Point Pool, University of Michigan Biological Station	Barrow and Hoy 1960
<i>Eimeria microcapi</i> Duszynski, Riddle, Anderson and Mead, 1972	<i>Ambystoma mavortium</i>	Elliptical, micropyle present 38.1 (35–41) × 25.3 (23–26) L/W 1.5 (1.3–1.7)	- +	Navicular, slightly pointed poles 18.1 (16–19) × 7.4 (6–8) SB if present, very small and difficult to distinguish	USA: Colorado - Weld County	Duszynski et al. 1972
<i>Eimeria nipponensis</i> Upton, McAllister and Trauth, 1993	<i>Cynops pyrrhogaster</i>	Elliptical 50.2 (44.5–55) × 34.5 (32–38) L/W 1.5	- + memb.?	Spindle-shaped Measurements not given SB absent	Japan	Upton, McAllister and Trauth, 1993
<i>Eimeria propria</i> (Schneider 1881) Doflein 1909	<i>Ichthyosaura alpestris</i> , <i>Lissotriton vulgaris</i> , <i>Triturus cristatus</i>	Cylindrical, symmetrical 38–41 × 22–24 L/W ~1.7	+? +	Cylindrical - pointed poles 18–22 × 7–8 SB as thickening of wall ☼	France	Doflein 1909; Labbé 1894; Lavier 1936, 1937; Matubayasi 1937; Schneider 1881, 1887; Simond 1897
<i>Eimeria pyrrhogaster</i> Upton, McAllister and Trauth, 1993	<i>Cynops pyrrhogaster</i>	Subspherical to ovoidal 42.8 (38–45) × 39.9 (34.5–45) L/W 1.1	- + memb.	Spindle-shaped, attached to OR 22.2 × 8.2 SB absent	Japan – exact locality or country not given	Upton, McAllister and Trauth, 1993
<i>Eimeria saitamensis</i> Upton, McAllister and Trauth, 1993	<i>Cynops pyrrhogaster</i>	Spherical 23–26 × 23–26	- +	Spindle-shaped 15.4 × 6.1 SB absent	Japan – exact locality or country not given	Upton, McAllister and Trauth, 1993
<i>Eimeria spherica</i> (Schneider 1887) Levine and Becker 1933	<i>Ichthyosaura alpestris</i> , <i>Lissotriton vulgaris</i> , <i>Lissotriton helveticus</i> , <i>Triturus cristatus</i>	Spherical 35 (22–38) L/W 1.0	- +	Elliptical - slightly pointed poles 12–15 × 6–7 SB may be present (line drawing)	France – exact locality or country not given	Lavier 1936, 1937; Levine and Becker 1933; Matubayasi 1937; Phisalix 1933; Schneider 1887; Steinhaus 1891

<i>Eimeria tertia</i> Lavier 1936	<i>Ichthyosaura alpestris</i> , <i>Triturus cristatus</i>	Ovoidal 26 (22–33) × 21 (18–25) L/W 1.2	- +	Elliptical, slightly pointed poles 12–15 × 6–7 SB may be present (line drawing)	France – exact locality or country not given	Lavier 1936, 1937
<i>Eimeria urodela</i> Duszynski, Riddle, Anderson and Mead, 1972	<i>Ambystoma mavortium</i> , <i>Ambystoma tigrinum</i>	Spherical 22.3 (14–26) × 22.1 (14–26) L/W 1.0 (1.0–1.1)	- +	Lanceolate 16.3 (12–19) × 5.8 (4–7) SB small, at pointed pole	USA: Colorado - Weld County*; Indiana	Duszynski et al. 1972
<i>Eimeria trauthi</i> McAllister and Upton 2008	<i>Ambystoma opacum</i>	Subspherical to elliptical 36.6 × 33.1 (33–40 × 29–37) L/W 1.1 (1.1–1.2)	- + memb.	Elongate-elliptical 20.8 × 8.1 (19–22 × 7–9) L/W 2.6 (2–3) SB as thickening of wall	USA: Northern Louisiana	McAllister and Upton 2008
Morphotype 2 – oocyst residuum absent; sporocysts ovoidal (with one pole pointed); SB malé, špatně odlišitelné						
<i>Eimeria waltoni</i> Saxe 1955	<i>Ambystoma tigrinum</i>	Subspherical 22.2 (20–24) × 19.2 (17–21) L/W 1.2	+ -	Ovoidal 12.2 (11–14) × 7.2 (6–8) SB - small knob at pointed pole	USA: Iowa - Dickinson County, near the Lakeside Laboratory	Saxe 1955
<i>Eimeria grobbeni</i> Rudovsky 1925	<i>Salamandra atra</i>	Subspherical, micropyle present 10–11 × 9–10 L/W unknown	- -	Ovoidal, one pole pointed 5–6 × 4 SB small knob-like - pointed pole	Austria	Lavier 1936
<i>Eimeria salamandrae</i> (Steinhaus 1889) Dobell 1909	<i>Salamandra salamandra</i>	Spherical 18–30 L/W 1.0?	- -	Unknown Unknown Unknown	Europe – exact locality or country not given	Dobell 1909; Doflein and Reichenow 1953; Druner 1894; Heidenhain 1888; Labbé 1894; Simond 1897; Steinhaus 1889
<i>Eimeria tarichae</i> Levine 1980	<i>Taricha torosa</i>	Subspherical to slightly elliptical 11–13 × 10–12 L/W unknown	- -	Ovoidal, one pole slightly pointed L × W not given SB absent	USA: California - Los Angeles County, San Bernardino Mountains, Fish Canyon	Doran 1953; Levine 1980
Miscellaneous species – resembling Morphotype 2						
<i>Eimeria kingi</i> Saxe 1955 Uncertain status of oocyst residuum.	<i>Ambystoma tigrinum</i>	Subspherical 20.4 (16–23) × 18.3 (14–21) L/W 1.1	- +	Ovoidal 8.8 (7–10) × 6.5 (5–8) SB small knob-like - pointed pole	USA: Iowa - Dickinson County, near the Lakeside Laboratory	Saxe 1955
<i>Eimeria opacum</i> Upton, McAllister and Trauth 1993 Suspected pseudoparasite.	<i>Ambystoma opacum</i>	Spherical to slightly subspherical 29.4 (27–32) × 23.8 (25–31) L/W 1.0 (1.0–1.1)	- -	Elliptical from one side, kidney- shaped from another 17.4 (16–21) × 9.1 (8–11) SB present	USA: Arkansas - Grant County, 6.4 km SW Sheridan	Upton, McAllister and Trauth 1993
Genus Isospora						
<i>Isospora hightoni</i> Upton, McAllister and Trauth, 1993	<i>Plethodon albagula</i>	Spherical, rarely subspherical, micropyle present 22.9 × 22.8 (21–24 × 21–24) L/W ratio: 1.0 (1.0–1.0+)	- +	Ovoidal, one pole slightly pointed 16.6 × 11.1 (14.5–17.5 × 10.5–14) L/W ratio 1.5 (1.4–1.6) SB - large knob at pointed pole	USA: Arkansas - Grant County, 6.4 km SW Sheridan	Upton, McAllister and Trauth, 1993
<i>Isospora jeffersonianum</i> Doran, 1953	<i>Ambystoma jeffersonianum</i>	Spherical 18.5–22.5 L/W 1.0	- -	Elongate ovoidal, one pole slightly pointed 15.5–16 × 7–8 L/W ratio: not given SB small knob at pointed pole	USA: Minnesota - Beltrami County, near Bemidji	Doran, 1953

Poznámka: symbol sluníčko ☼ označuje vlastní nepublikovaný údaj, konkrétně poprvé pozorované Stiedovo tělísko u *E. propria*.

Fig. 2. Perokresby oocyst jednotlivých druhů kokcií ocasatých obojživelníků splňující kritéria Morfotypu 1; pořadí g-f obráceno kvůli formátu; obrázky převzaty z původních popisů - viz Table 1; vše ve stejném měřítku. **a** *Eimeria ambystomae*, **b** *Eimeria canaliculata*, **c** *Eimeria distorta*, **d** *Eimeria longaspora*, **e** *Eimeria megaresidua*, **f** *Eimeria microcarpi*, **g** *Eimeria nipponensis*, **h** *Eimeria propria*.

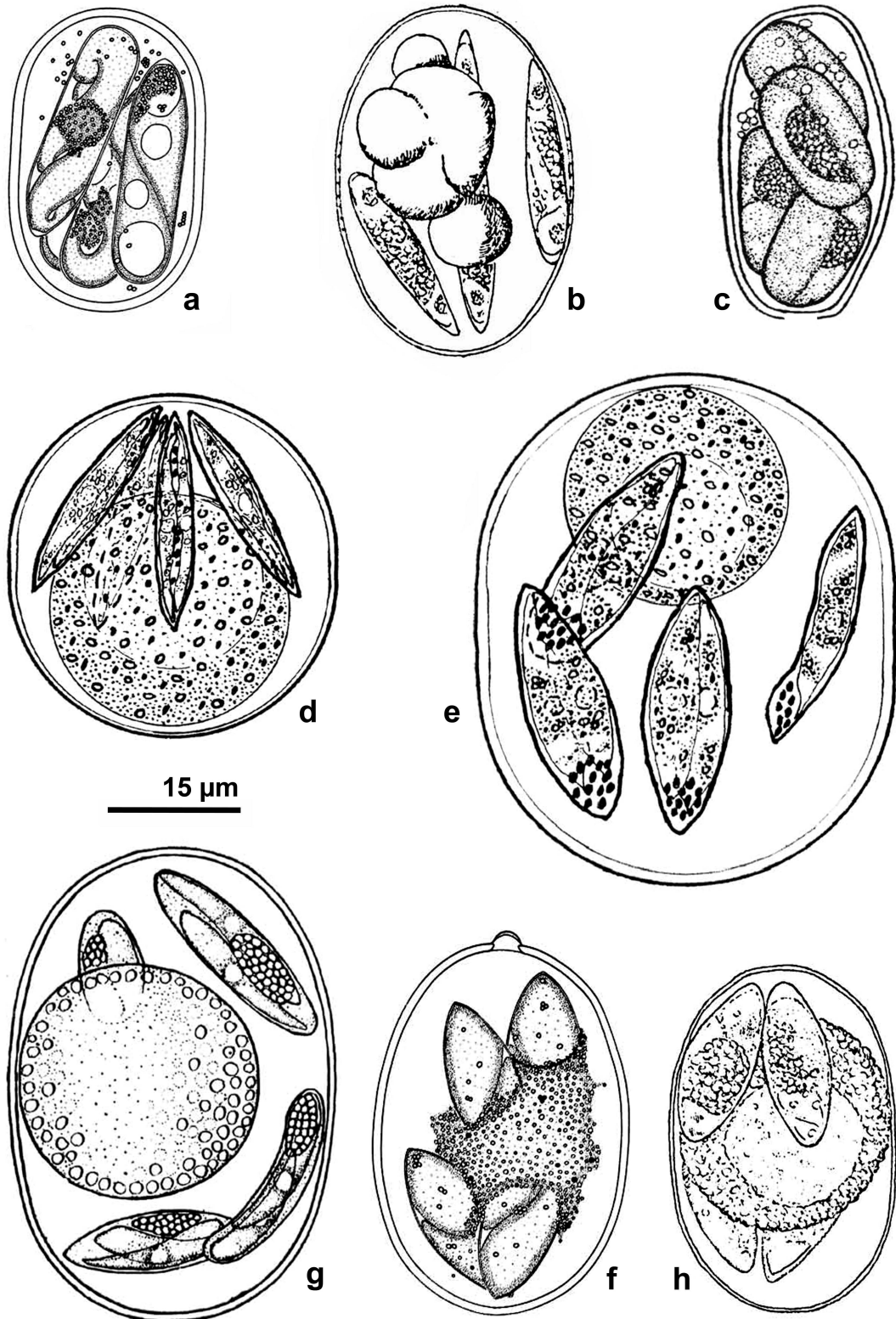


Fig. 3. Perokresby oocyst jednotlivých druhů kokcií ocasatých obojživelníků splňující kritéria Morfotypu 1 - pokračování; obrázky převzaty z původních popisů - viz Table 1; vše ve stejném měřítku. **a** *Eimeria pyrrhogaster*, **b** *Eimeria saitamensis*, **c** *Eimeria spherica*, **d** *Eimeria tertia*, **e** *Eimeria urodela*, **f** *Eimeria trauthi*.

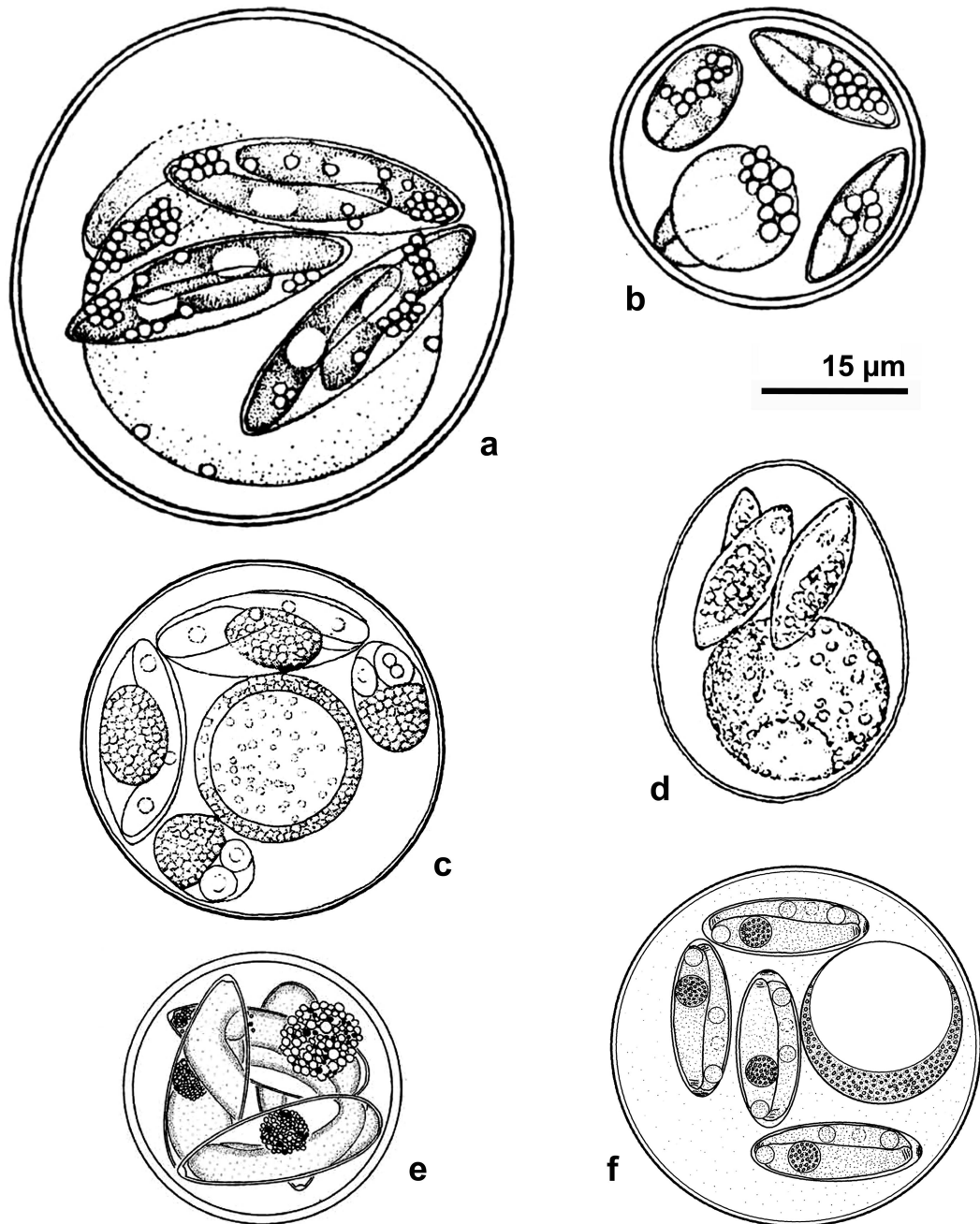
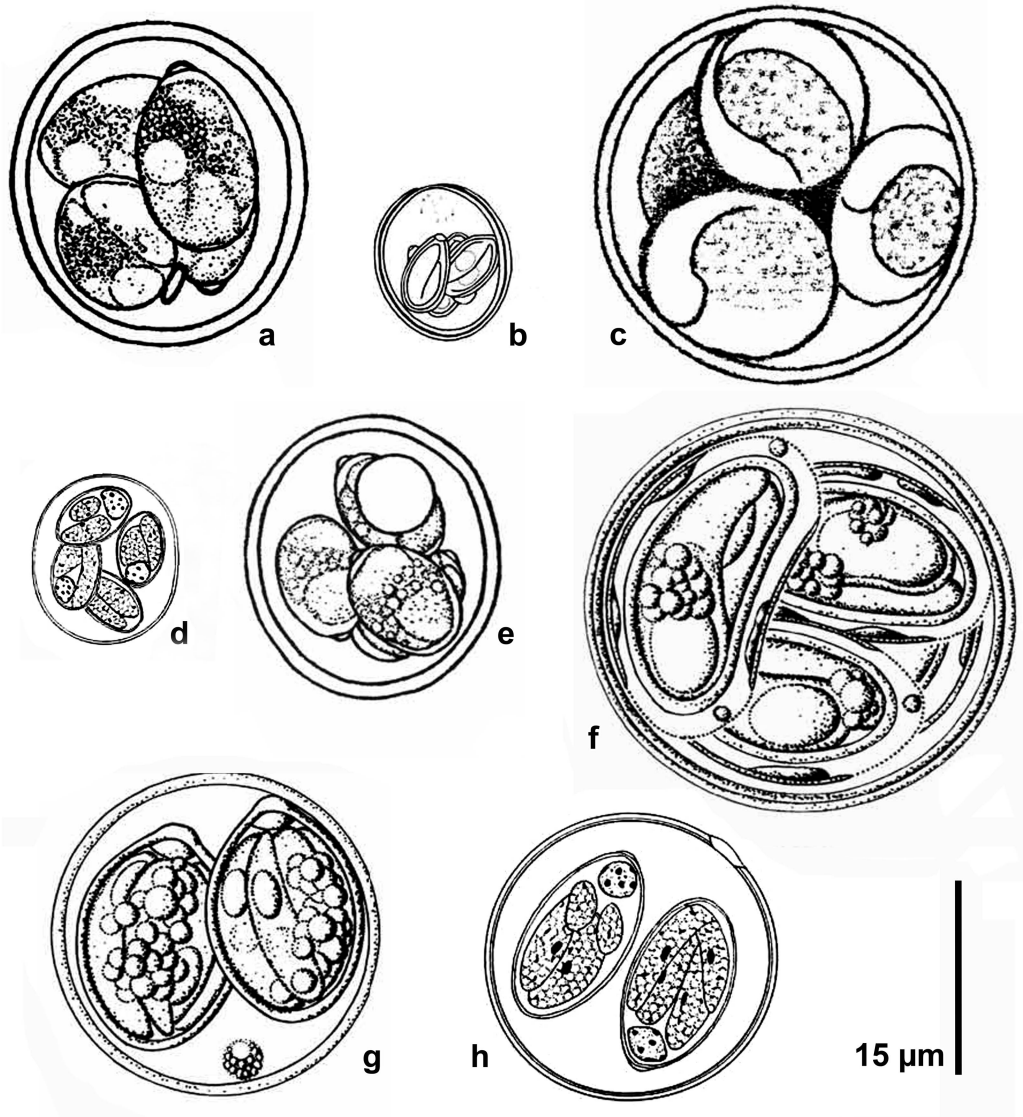


Fig. 4. Perokresby oocyst jednotlivých druhů kokcií ocasatých obojživelníků splňující kritéria Morfotypu 1 - pokračování; obrázky převzaty z původních popisů - viz Table 1; vše ve stejném měřítku. **a** *Eimeria waltoni*, **b** *Eimeria grobbeni*, **c** *Eimeria salamandrae*, **d** *Eimeria tarichae*, **e** *Eimeria kingi*, **f** *Eimeria opacum*, **g** *Isospora hightoni*, **h** *Isospora jeffersonianum*.



4. PRAKTICKÁ ČÁST – VYŠETŘENÍ ČOLKŮ Z PŘÍRODY

Odchyt zvířat. V květnu až červenci 2009 byli koprologicky vyšetřeni na přítomnost oocyst v trusu dva adultní jedinci čolka velkého *Triturus cristatus* z lokality Hliníř 49°7'48.862"N, 14°41'15.66"E a 12 adultních jedinců čolka obecného *Lissotriton vulgaris* z lokalit Hliníř (n = 10) a Bosna 48°53'8.813"N, 14°56'58.87"E (n = 2) – obě lokality jsou na Třeboňsku. Zvířata byla chytána v noci se svítilnou do podběráku na předem vytipovaných lokalitách. Ihned po odchycení byl každý jedinec umístěn do plastové krabice s 1-2 mm vody a větracími otvory. Krabičky s čolkou byly po převezení do laboratoře očíslovány. Vzhledem k ceklovému nízkému počtu odchycených zvířat bylo upuštěno od pitev a všichni čolci proto byli do dvou dnů po odchytu vypuštěni na původních lokalitách.

Koprologické vyšetření – flotace. Trus byl od každého jedince odebrán pomocí plastové pasteurovy pipety z vody v krabici, zbaven hrubých nečistot filtrací přes čisté čajové sítko a získané vodní suspenze jemného fekálního materiálu byly pak inkubovány pět dní v otevřených 80 ml epruvetách při pokojové teplotě, aby byla za přístupu vzduchu umožněna sporulace případných oocyst. Voda byla v každém vzorku měněna 1-2x denně, aby se omezil rozvoj nárostů řas a bakterií. Dvojchroman draselný standardně používaný pro sporulaci a uchovávání oocyst nebyl po špatných zkušenostech školitele použit a fekální materiál byl tedy inkubován jen v odstáté vodovodní vodě.

Po pěti dnech inkubace byly všechny vzorky vyšetřeny flotační metodou za použití modifikovaného sacharózného Sheatherova roztoku o specifické hmotnosti 1.2 pomocí tzv. flotační metody jak je popsáno dále. Vodní suspenze fekálního materiálu byla zbavena přebytečné vody odlitím, zbytek obsahu jednotlivých vzorkovnic pečlivě promíchán a cca 1/3 byla přelita do centrifugačních zkumavek. Suspenze byly odstředovány na stolní centrifuze po 2 min při 2000 ot/min. Po stočení byla z centrifugačních zkumavek vylita přebytečná voda, přidán Sheatherův roztok, celý obsah jednotlivých zkumavek pečlivě promíchán a vzorky byly opět odstředěny po 2 min při 2000 ot/min. Po stočení byla pomocí drátěné kličky o průměru 5 mm odebrána povrchová blanka z každé zkumavky, přenesena na podložní sklíčko a přikryta sklíčkem krycím. Takto připravené preparáty byly prohlíženy při zvětšení 100x, které již stačí na detekci oocyst. Vyšetřování vzorků, pozorování a měření případných oocyst bylo prováděno na světelném mikroskopu Olympus AX 70 vybaveném digitální kamerou, Nomarskiho interferenčním kontrastem a kalibrovaným okulárovým měřítkem.

Výsledky. Koprologické vyšetření odhalilo přítomnost oocyst kokcií u jednoho *L. vulgaris* (prevalence 10%) a jednoho *T. cristatus* (prevalence 50%) z lokality Hliníř. V obou případech bylo v trusu velmi malé množství oocyst, takže i přes použití koncentrační flotační metody bylo na sklíčku možné nalézt pouze 2-3 oocysty. V obou případech bylo přesto možné jednoznačně určit druh kokcidie. Jednalo se o dva příslušníky r. *Eimeria* Morfotypu 1.

V případě *L. vulgaris* se jednalo o *E. propria* se symetricky elipsovými oocystami o rozměrech 41-45 × 23-25 s tenkou (<1) hladkou stěnou. Sporocysty byly úzce elipsovitě až vřetenovité o rozměrech 20 × 6.5-7. Na jednom pólu sporocyst bylo přítomno relativně špatně rozeznatelné Stiedovo tělísko (1.5-2 × ~1), jež se jevílo jakoby rozšířenina ve stěně sporocysty. Stiedovo tělísko nebylo u některých sporocyst vůbec možné rozeznat (pravděpodobně v závislosti na poloze), což by mohlo být důvodem, proč jej jiní autoři neuvádí. Reziduum oocysty o průměru 20 bylo složeno z granul různé velikosti a obsahovalo velkou vakuolu o průměru 15. Reziduum sporocysty pak bylo tvořeno granuly rozptýlenými mezi sporozoity.

V trusu *T. cristatus* byly zjištěny oocysty *E. canaliculata*, podobně tvarovanými jako u předešlého druhu s rozměry 35-38 × 24-25 a opět s tenkou (<1) hladkou stěnou. Sporocysty byly vřetenovité, velmi úzké s výrazně zašpičatělými póly. Stiedovo tělísko nebylo možné ve dvou pozorovaných oocystách najít. Reziduum oocysty bylo typické pro druh, tedy složeno ze shluku (různě) velkých globulárních útvarů, z nichž některé byly též volně mezi sporocystami. Reziduum sporocysty bylo rovněž tvořeno granuly pipinky rozptýlenými mezi sporozoity.

V případě obou zjištěných druhů kokcií se jedná o nový geografický doklad výskytu a vůbec první doklad výskytu kokcií ocasatých v ČR. Bohužel velmi malé množství oocyst – 2-3 v každém preparátu – znemožnilo další zpracování, takže informace o endogenním vývoji (histologie) ani sekvence se získat nepodařilo.

5. POUŽITÁ LITERATURA

- Asmundsson IM, Duszynski DW, Campbell JA (2006) Seven new species of *Eimeria* Schneider, 1875 (Apicomplexa: Eimeriidae) from colubrid snakes of Guatemala and a discussion of what to call ellipsoid tetrasporocystic, dizoic coccidia of reptiles. *Systematic Parasitology* 64: 91-103.
- Barta JR, Schrenzel MD, Carreno R, Rideout BA (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.
- Barrow JH, Hoy JB (1960) Two new species of *Eimeria* from the common newt, *Notophthalmus viridescens*. *Journal of Protozoology*, 7: 217-221.
- Carreno RA, Martin DS, Barta JR (1999) *Cryptosporidium* is more closely related to the gregarines than to coccidia as shown by phylogenetic analysis of apicomplexan parasites inferred using small-subunit ribosomal RNA gene sequences. *Parasitology Research* 85: 899-904.
- Corliss JO (1984) The kingdom Protista and its 45 phyla. *BioSystems* 17: 87-126.
- Corliss JO (1994) An interim utilitarian ("User-friendly") hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozoologica* 33: 1-51.
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD (2003) Infectious disease and amphibian population declines. *Diversity and Distribution* 9: 141-150.
- Dobell CC 1909. Research on the intestinal protozoa of frogs and toads. *Quarterly journal of microscopical science* 53:201-277.
- Doflein F (1909) *Lehrbuch der Protozoenkunde*, 2nd edition. Fischer, Jena.
- Doflein F, Reichenow E (1953) *Lehrbuch der Protozoenkunde*. 6th ed. Verlag von Gustav Fischer, Jena.
- Doran DJ (1953) *Isospora jeffersonianum* n. sp. from the blue-spotted salamander, *Ambystoma jeffersonianum* (Green), and *Eimeria grobbeni* Rudovsky, 1925 from the California newt, *Triturus torosus* (Rathke). *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 20: 60-61.
- Druner L (1894) Beiträge zur Kenntnis der Kern- und Zellendegeneration und ihrer Ursache. *Jenaische Zeitschrift für Medizin und Naturwissenschaft* 28: 294-327.
- Heidenhain R (1888) Beiträge zur histologie und physiologie der Dunndarmschleimhaut. *Archiv für die Gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* 43: 1-103.
- Dubey JP, Mehlhorn H (1978) Extraintestinal stages of *Isospora ohioensis* from dogs in mice. *Journal of Parasitology* 64: 689-695.
- Duszynski, DW, Wilber PG (1997) A guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. Invited Critical Comment. *Journal of Parasitology* 83: 333-336.
- Duszynski DW, Bolek MG, Upton SJ (2007) Coccidia (Apicomplex: Eimeriidae) of amphibians of the world. *Zootaxa* 1667: 3-77.
- Duszynski DW, Couch L, Upton SJ (2000) Coccidia of the world. Available at: <http://biology.unm.edu/biology/coccidia/home.html>
- Duszynski DW, Solangi MA, Overstreet RM (1979) A new and unusual eimerian (Protozoa: Eimeriidae) from the liver of the gulf killifish, *Fundulus grandis*. *Journal of Wildlife Diseases* 15: 543-552.

- Duszynski DW, Riddle WA, Anderson DR, Mead RW (1972) Coccidia from the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*, in northeastern Colorado and in northern New Mexico. *Journal of Protozoology* 19: 252-256.
- Frenkel JK, Dubey JP (1972) Rodents as vectors for feline coccidia, *Isospora felis* and *Isospora rivolta*. *Journal of Infectious Diseases* 125: 69-72.
- Frost DR (2010) Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 5.4 (8 April, 2010). Electronic Database accessible at <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/> American Museum of Natural History, New York, USA.
- Jirků M, Modrý D, Šlapeta JR, Koudela B, Lukeš J (2002) The phylogeny of *Goussia* and *Choleoeimeria* (Apicomplexa; Eimeriorina) and the Evolution of Excystation Structures in Coccidia. *Protist* 153: 379-390.
- Jirků M, Jirků M, Oborník M, Lukeš J, Modrý D (2009b): A Model for Taxonomic Work on Homoxenous Coccidia: Redescription, Host Specificity, and Molecular Phylogeny of *Eimeria ranae* Dobell, 1909, with a Review of Anuran-Host Eimeria (Apicomplexa: Eimeriorina). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56: 39-51.
- Jirků M, Jirků M, Oborník M, Lukeš J, Modrý D (2009b): *Goussia* Labbe, 1896 (Apicomplexa, Eimeriorina) in Amphibia: Diversity, Biology, Molecular Phylogeny and Comments on the Status of the Genus. *Protist* 160: 123-136.
- Kopečná J, Jirků M, Oborník M, Tokarev YS, Lukeš J, Modrý D (2006) Phylogenetic Analysis of Coccidian Parasites from Invertebrates: Search for Missing Links. *Protist* 157: 173-183.
- Labbé A (1894) Recherches zoologiques, cytologiques et biologiques sur les parasites endoglobulaires du sang vertebres. *Archives de Zoologie Experimentale et Generale (Series 3)* 2: 55-258.
- Lavier G (1936) Recherches sur les coccidies intestinales des tritons. *Annales de Parasitologie humaine et Comparee* 14: 150-163.
- Lavier G (1937) Sur less coccidies intestinales des tritons. (Note preliminaire). *In: Jorge AA (Ed), Proceedings of the 12th International Congress of Zoology, Section VI, Volume 2, Arquivos do Museu Bocage, Lisboa.* pp. 1383-1390.
- Levine ND (1980) Some corrections of coccidian (Apicomplexa: Protozoa) nomenclature. *Journal of Parasitology* 66: 830-834.
- Levine ND, Becker ER (1933) A catalog and host-index of the species of the coccidian genus *Eimeria*. *Iowa State College Journal of Science* 8: 83-106.
- Matubayasi H (1937) Studies on parasitic protozoa in Japan. III. On protozoa parasitic in the newt, *Triturus pyrrhogaster*. *Annotationes Zoologicae Japonenses* 16: 277-291.
- McAllister CT, Upton SJ (1987a) Endoparasites of the smallmouth salamander, *Ambystoma texanum* (Caudata: Ambystomatidae) from Dallas County, Texas. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 54: 258- 261.
- McAllister CT, Upton SJ (2008) A new species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the marbled salamander *Ambystoma opacum* (Caudata: Ambystomatidae), from northern Louisiana. *Journal of Parasitology* 94: 727-730.
- McAllister CT, Upton SJ and Trauth SE (1993) Endoparasites of western slimy salamanders, *Plethodon albagula* (Caudata: Plethodontidae), from Arkansas. *Journal of the Helminthological Society of Washington* 60: 124-126.

- Morrison DA, Bornstein S, Thebo P, Wernery U, Kinne J, Mattsson JG (2004) The current status of the small subunit rRNA phylogeny of the coccidia (Sporozoa). *International Journal for Parasitology* 34: 501-514.
- Overstreet RM (1981) Species of *Eimeria* in nonepithelial sites. *Journal of Protozoology* 28: 258-260.
- Paperna I, Landsberg JH (1989) Description and taxonomic discussion of eimerian coccidia from African and Levantine geckoes. *South African Journal of Zoology* 24: 345-355.
- Perkins FP, Barta JR, Clopton RE, Peirce MA, Upton SJ (2000) Phylum Apicomplexa. In: Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P (ed), *An Illustratged Guide to the Protozoa*, 2nd edition. Society of Protozoologists, Lawrence, pp. 190-369.
- Phisalix M (1933) Development schizogonique et sporogonique d'une Coccidie, parasite de l'intestin du *Triton alpestre*. *Bulletin de la Societe de Pathologie Exoique* 26: 814-819.
- Saxe LH (1955) Observations on *Eimeria* from *Ambystoma tigrinum*, with descriptions of four new species. *Proceedings of the Iowa Academy of Sciences* 62: 663-673.
- Schneider A (1881) Sur les psorospermies oviformes ou coccidies. *Archives de Zoologie Experimentale et Generale* 9: 387-404.
- Schneider A (1887) Coccidies nouvelles ou peu connues. *Tablettes Zoologiques Poitiers* 2: 5-18.
- Simond PL (1897) L'evolution des sporozoaires du genre coccidium. *Annales de l'Institut Pasteur (Paris)* 11: 545-581.
- Skerratt LF, Berger L, Speare R, Cashins S, McDonald KR, Phillott AD, Hines HB, Kenyon N (2007) Spread of chytridiomycosis has caused the rapid global decline and extinction of frogs. *Ecohealth* 4: 125-134.
- Steinhagen D (1991) Ultrastructural observations on sporozoite stages of piscine Coccidia: *Goussia carpelli* and *G. subepithelialis* from the intestine of tubificid oligochaetes. *Diseases of Aquatic Organisms* 10: 121-125.
- Steinhagen D, Körting W (1990) The role of tubificid oligochaetes in the transmission of *Goussia carpellii*. *Journal of Parasitology* 76: 104-107.
- Steinhaus J (1889) *Karyophagus salamandrae*. Eine in den Darmepithelzellkernen parasitisch lebende Coccidie. *Archiv für Pathologische Anatomie und für Klinische Medizin* 115: 176-185.
- Steinhaus J (1891) *Cytophagus tritonis*. Eine in den Darmepithelzellen parasitisch lebende Coccidie. *Zentralblatt für Bakteriologie* 9: 50-52.
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, Waller RW (2004) Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science* 306: 1783-1786.
- Tenter AM, Barta JR, Beveridge I, Duszynski DW, Mehlhorn H, Morrison DA, Thompson RCA, Conrad PA (2002) The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *International Journal for Parasitology* 32: 595-616.
- Upton SJ (2000) Suborder Eimeriorina Léger, 1911. In: Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P (ed), *An Illustratged Guide to the Protozoa*, 2nd edition. Society of Protozoologists, Lawrence, pp. 318-339.
- Upton SJ, McAllister CT, Trauth, SE (1993) Endoparasites of western slimy salamanders, *Plethodon albagula* (Caudata: Plethodontidae), from Arkansas. *Journal of the Helminthological Society of Washington* 60: 124-126.
- Valigurová A, Hofmannová L, Koudela B, Vávra J (2007) An ultrastructural comparison of the attachment sites between *Gregarina steini* and *Cryptosporidium muris*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54: 495-510.