

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Myxosporeové infekce rejskovitých (Soricidae)

Tomáš Tymł
Diplomová práce

Školitel: Prof. MVDr. Iva Dyková, DrSc.
Školitel specialista: RNDr. Václav Pižl, CSc.

České Budějovice, duben 2010

Tyml T (2010) Myxosporeové infekce rejskovitých. [Myxosporean infections in shrews (Soricidae).]
Faculty of Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: Práce se zabývá detailním studiem infekcí vyvolaných u terestrických savců čeledi rejskovitých (Soricidae) myxosporidií *Soricimyxum fegati* Prunescu, Prunescu et Lom, 2007 a hypotetickými hostiteli aktinosporeové fáze životního cyklu původce.

Annotation: Myxosporean infections caused by *Soricimyxum fegati* Prunescu, Prunescu et Lom, 2007 in terrestrial mammals of the family Soricidae were studied in detail together with hypothetical hosts of actinosporean phase of the life cycle of agent.

Tato práce byla financována Výzkumným centrem ichtyoparazitologie LC522 a Výzkumným záměrem Parazitologického ústavu (BC, AVČR) Z60220518.

Prohlašuji, že jsem uvedenou práci vypracoval samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.
30.4. 2010 v Českých Budějovicích

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své rigorózní práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 6. dubna 2010

.....
Tomáš Týmł

Děkuji všem, kteří přispěli k mé práci radou, pomocí nebo dodáním materiálu. Děkuji zejména Prof. MVDr. Ivě Dykové, DrSc. za zajímavé téma diplomové práce, cenné rady a čas, který mi věnovala. Děkuji také celé Laboratoři protistologie ryb za vytvoření příjemného zázemí.

Obsah

1.	Úvod a literární přehled	1
2.	Cíle práce	5
3.	Materiál	6
3.1.	Rejskovití (Soricidae)	6
3.2.	Žížaly (Lumbricidae)	9
3.3.	Roupice (Enchytraeidae)	10
4.	Metody	12
4.1.	Diagnostika infekcí <i>Soricimyxum fegati</i> průkazem spor	12
4.2.	Diagnostika infekcí <i>Soricimyxum fegati</i> pomocí PCR, sekvenování a analýza genetické variability	12
4.3.	Vyšetřování žížal jako potenciálních hostitelů aktinosporeové fáze životního cyklu <i>Soricimyxum fegati</i>	16
4.4.	Experimentální infekce	16
5.	Výsledky	18
5.1.	Hostitelé <i>Soricimyxum fegati</i>	18
5.2.	Prevalence infekcí <i>S. fegati</i> ve sledovaném období	19
5.3.	Histopatologické změny vyvolané infekcí <i>Soricimyxum fegati</i> u rejskovitých	20
5.4.	Přehled parazitologických nálezů u rejskovitých	25
5.5.	Výsledky vyšetření žížal	28
5.6.	Výsledky experimentálních infekcí	31
5.7.	Molekulární charakteristika <i>S. fegati</i>	31
6.	Diskuse a perspektivy další práce	33
7.	Souhrn	40
8.	Literatura	41

1. Úvod a literární přehled

Soricimyxum feigati Prunescu, Prunescu, Pucek et Lom, 2007, kterým se zabývá magisterská práce, patří mezi myxosporea. Třídy Myxosporea Bütschli, 1881 a Malacosporea Canning, Curry, Feist, Longshaw et Okamura, 2000 jsou řazeny do kmene Myxozoa Grassé, 1970. Jsou to drobné mnohobuněčné organismy druhotně pozměněné parazitickým způsobem života. Zástupci třídy Malacosporea jsou známi zejména jako paraziti sladkovodních mechovek (Bryozoa Ehrenberg, 1931). Pouze jediný druh - *Tetracapsuloides bryosalmonae* Canning, Tops, Curry, Wood et Okamura 2002 je parazitem lososovitých ryb (Lom a Dyková 2006). Třída Myxosporea je druhově nesrovnatelně početnější. Lom a Dyková (2006) uvádějí více než 2 200 popsaných druhů 62 rodů.

Pro životní cyklus myxosporeí je typické střídání dvou stadií – myxosporeového a aktinosporeového ve dvou různých hostitelích. Myxosporeová fáze životního cyklu probíhá nejčastěji v rybách a na jejím konci vznikají spory (myxospory), které jsou infekční pro hostitele aktinosporeového stádia. Myxospora je mnohobuněčný útvar tvořený nejčastěji dvěma (ale i více) valvogenními buňkami, které vytvářejí chlopně, nejčastěji dvěma (ale i více) kapsulogenními buňkami, které tvoří pólové váčky obsahující vymrštitelné pólové vlákno a jednou nebo dvěma sporoplazmami s haploidními jádry (Hausmann a Hülsmann 2003). Poté, co se myxospora dostává do vodního prostředí, může být požřena hostitelem budoucí aktinosporeové fáze. Aktinosporeová fáze životního cyklu probíhá nejčastěji v máloštětinatcích (Annelida: Oligochaeta), vzácněji v mnohoštětinatcích (Annelida: Polychaeta) nebo sumýšovcích (Sipuncula). Infekce kroužkovce začíná ve střevním traktu, kde pólová vlákna umožňují přichycení ke střevní stěně. Ze spory se uvolňuje sporoplazma, která proniká do mezibuněčných prostor střevního traktu hostitele. Následuje vegetativní a sexuální vývoj, který končí produkcí spor aktinosporeového typu. Protože během aktinosporeové fáze probíhá i sexuální vývoj, jsou Annelida označována za definitivní hostitele myxosporeí. Aktinospora je triradiálně souměrná. Sestává ze 3 (a násobků 3) pólových váček a 3 (a opět násobků 3) chlopni často opatřených plovákovitými výběžky. Aktinospory jsou uvolňovány ze svého hostitele do vody, kde se pomocí plovákovitých výběžků pasivně pohybují ve vodním sloupci. Při kontaktu s hostitelem své myxosporeové fáze vystřelí spora pólová vlákna, ta se uchytí na rybě a sporoplazma začne

pronikat epidermis hostitele. Hostitelská specifita některých myxosporeí byla prokázána i ve fázi vystřelení pólových vláken (Yokoyama a kol. 2006). U některých druhů bylo zjištěno, že k infekci hostitele myxosporeového stádia dochází pozřením infikovaného definitivního hostitele (El-Matbouli a Hoffmann 1989). Uvnitř mezihostitele probíhá vegetativní rozmnožování (proliferativní fáze) a sporogoniální fáze během které se vyvíjejí spory myxosporeového typu. Presporogoniální (proliferativní) stádia migrují tkáněmi hostitele a střídají nitrobuněčnou a mezibuněčnou lokalizaci (Dyková a Lom 2007). Sporogoniální fáze probíhá v místě konečné lokalizace, která je u řady druhů specifická (Molnár 1994). Sporogoniální stádia (plasmodium nebo pseudoplasmodium) mohou být lokalizována v dutinových orgánech a kanálcích (coelozoické druhy) nebo ve vlastních tkáních (histozoické druhy). Nápadným morfologickým znakem myxosporeových stadií vývoje je přítomnost „buňky v buňce“, kdy somatická buňka obaluje generativní buňku. Produkci spor myxosporeového typu, které jsou infekční pro definitivního hostitele končí myxosporeová fáze životního cyklu. Od prvního popsaného životního cyklu myxosporeí (Wolf a Markiw 1984) byly objasněny vývojové cykly nejméně 30 dalších druhů (Kent a kol. 2001, Lom a Dyková 2006). Kromě několika výjimek (Køie a kol. 2007, Rangel a kol. 2009) jsou životní cykly s účastí aktinospor popsány u myxosporidií ze sladkovodních (případně anadromních nebo katadromních) druhů ryb. U některých druhů myxosporidií se vzhledem k úspěšným experimentům předpokládá i možnost přímého životního cyklu, tj. přenos infekcí mezi rybami (Diamant 1997; Redondo a kol. 2002; Yasuda a kol. 2002).

U naprosté většiny druhů myxosporeí byla popsána jen myxosporeová fáze životního cyklu. Paprskoploutvé ryby zcela převažují ve spektru známých hostitelů. Kromě 35 nálezů v parybách jsou nálezy myxosporeí v hostitelích z dalších skupin obratlovců spíše ojedinělé. Třináct druhů je popsáno z obojživelníků a čtyři z plazů (vodních želv) (Eiras 2005). Ptáci byli zahrnuti mezi hostitele myxosporeí recentním popisem *Myxidium anatidum* z domestikované kachny (*Anas platyrhynchos* L.) (Bartholomew a kol. 2008).

Náhodné nálezy myxosporeových spor ve stolici pacientů trpících chronickými průjmy a u imunosuprimovaných pacientů byly většinou vysvětleny pasáží spor (obsažených v konzumovaném rybím mase) zažívacím traktem. Jakkoliv jde o nálezy provokující, neexistuje zatím žádný důvod pro úvahy o člověku jako hostiteli myxosporeové fáze životního cyklu (McClelland a kol. 1997; Boreham a kol. 1998; Moncada a kol. 2001).

Ve vývoji poznatků o životních cyklech myxosporeí mají mimořádný význam nálezy myxosporeí u terestrických živočichů. Za prvního poznaného terestrického hostitele myxosporeí je považován krtek (*Talpa europaea* L.), i když u něj nebyly nalezeny myxospory, jen útvary podobné vývojovým stádiím myxosporeí (Friedrich a kol. 2000). Dalším velkým překvapením byl nález myxosporeí u rejsků obecných (*Sorex araneus* L.) z Bialowiežského pralesa. V roce 2007 byl popsán nový druh *Soricimyxum fegati* Prunecu, Prunescu, Pucek et Lom, 2007 a zachycena téměř celá myxosporeová fáze životního cyklu s výraznými projevy patogenity pro hostitele (Prunescu a kol. 2007). Skutečnost, že u rejsků obecných z Bialowiežského pralesa byl popsán vývoj myxosporidie od plasmodií po zralé spory iniciovala orientační vyšetření rejsků ze tří lokalit na Českobudějovicku. Získali jsme pozitivní výsledky a data, kterými jsme mohli korigovat a doplnit popis *S. fegati* (Dyková a kol. 2007). Zároveň jsme si uvědomili, že pokusy o řešení otázek životního cyklu této myxosporidie musí vycházet z detailních znalostí bionomie hostitelů. Pro shrnutí těchto poznatků jsme použili základní české prameny a práce zahraničních autorů, kteří se systematicky zabývají rejsky jako modelovými objekty.

Rejsek obecný je zástupcem čeledi Soricidae, která společně s ježky (Erinaceidae) a krtky (Talpidae) tvoří řád hmyzožravců (Eulipotyphla). Hmyzožravci jsou drobní savci s obvykle protaženou lebkou a pohyblivým rypáčkem, který je vybavený množstvím smyslových chlupů. Na rozdíl od zraku jsou hmat, čich a sluch pro hmyzožravce velmi důležitými smysly. O významu čichu pro jejich způsob života svědčí výrazné čichové laloky na mozku (Nowak 1999). Hmyzožravcům se podařilo osídlit množství různých biotopů. Kromě pozemního způsobu života se některé skupiny adaptovaly trvalému životu pod zemí nebo vyhledávání potravy ve vodě. Jejich potrava je zejména živočišná, převládá hmyz a jiní bezobratlí živočichové.

Rejskovití jsou nejpočetnější čeledí hmyzožravců. Jejich společným znakem je velmi rychlý metabolismus, s tím související vysoká spotřeba potravy a celoroční aktivita i v mírném pásmu (Aitchison 1987). Se sníženou dostupností potravy během zimních měsíců souvisí mimořádný jev - tzv. Dehnelův fenomén. Podstatou tohoto fenoménu je snížení celkové hmotnosti během zimy v důsledku snížení hmotnosti některých orgánů (Gębczyński 1965). Některé rody (*Neomys*, *Blarina*) produkují nervový jed, který používají při lovu kořisti (Pucek 1959). Překvapivou adaptací na vyhledávání kořisti je používání echolokace (Forsman a Malmquist 1988).

Druhové zastoupení rejskovitých je u nás je stejné jako v Polsku, na území obou států žije 7 druhů tří rodů (Anděra 2000; Aulagnier a kol. 2009). Stejně jako v Bialowiežském pralese (Rychlik 2000) jsou na většině našeho území nejhojnější 4 druhy: rejsek obecný (*Sorex araneus* L.), rejsek malý (*Sorex minutus* L.), rejsec vodní (*Neomys fodiens* Pennant, 1771) a rejsec černý (*Neomys anomalus* Cabrera, 1907). Na příhodných lokalitách (trvale zamokřených, s tekoucí nebo stojatou mělkou vodou), mohou žít všechny 4 druhy společně, sympatricky. Zástupci rodu rejsec (*Neomys*) jsou semiakvatictí, potravu vyhledávají na březích vod nebo přímo ve vodě, zatímco rejsek obecný a malý jsou terestricktí a potravu vyhledávají mimo vodu. Odlišnosti ve vyhledávání potravy jsou i mezi jednotlivými druhy. Zejména v případě rejska obecného a rejska malého je rozdíl nápadný. Převážnou část potravy rejska malého tvoří hmyz a pavouci žijící na povrchu půdy nebo na vegetaci (Dickman 1988), zatímco rejsek obecný vyhledává potravu zejména pod povrchem půdy a tomu odpovídá i jeho nejčtenější kořist - žížaly (Lumbricidae) (Churchfield 1980; Churchfield a Rychlik 2006; Rychlik a Jancewicz 2002). Složení potravy se může měnit v průběhu roku podle aktuální dostupnosti různých kořistí. Například v potravě rejska malého se v zimních měsících objevují také žížaly (Pernetta 1976). Zdá se, že právě rozdíly ve způsobu získávání potravy mezi jednotlivými druhy, umožňují jejich koexistenci na stejných lokalitách (Churchfield a Rychlik 2006).

Dalšími druhy rejskovitých žijících na našem území jsou rejsek horský (*Sorex alpinus* Schinz, 1837), bělozubka šedá (*Crocidura suaveolens* Pallas, 1811) a bělozubka bělobřichá (*Crocidura leucodon* Hermann, 1780). Rejsek horský je svým výskytem omezený na horské oblasti a zde navíc na chladná údolí s kamenitými břehy potoků (Anděra 2000). Bělozubka šedá žije v našich podmínkách zejména synantropně, v xerothermních lokalitách, ale také v okolí potoků (Anděra 2000). Neobvyklé je také spektrum biotopů obývané bělozubkou bělobřichou. Vyskytuje se u nás na suchých křovinatých stráních, i na vlhkých lokalitách, v okolí rybníků a potoků (Anděra 2000). Rejsek horský a bělozubka bělobřichá jsou relativně vzácní a setkat se s nimi můžeme pouze na specifických lokalitách.

2. Cíle práce

Cíle práce byly formulovány na základě výsledků orientačního vyšetření rejsků (*Sorex araneus* a *S. minutus*) na přítomnost infekcí *Soricimyxum fegati* Prunescu, Prunescu, Pucek a Lom, 2007 následujícím způsobem:

- ověřit hypotézu hostitelské specifity *Soricimyxum fegati* vyšetřením co největšího souboru rejskovitých (Soricidae);
- pokusit se najít hostitele předpokládané aktinosporeové fáze vyšetřováním potenciálních hostitelů z lokalit, na kterých byla potvrzena přítomnost *S. fegati*;
- podaří-li se získat dostatečný počet zralých spor *S. fegati*, zaměřit se na získání aktinosporeové fáze životního cyklu experimentální infekcí.

3. Materiál

3.1. Rejskovití (Soricidae)

Odchyty rejsků (Soricidae) probíhaly v období od 2. 8. 2007 do 23.10. 2009. Výběr lokalit vycházel ze souhrnu poznatků o bionomii rejskovitých (Anděra 2000) a z vlastních zkušeností. Většina odchyťových ploch se nacházela v okolí menších vodních toků. Podle nomenklatury Natura 2000 (Chytrý a kol. 2001) patřila většina vytypovaných lokalit k tzv. mokřadním vrbinám, mokřadním olšinám (Obr. 1) a údolním jasanovo-olšovým luhům.

Přehled vyšetřených druhů rejskovitých, počty vyšetřených jedinců a místa odchyťů jsou uvedeny v tabulce 1. Z druhů žijících na území České republiky chybí mezi vyšetřovanými druhy rejsek horský a bělozubka bělobřichá. Oba druhy jsou zahrnuté ve vyhlášce č. 175/2006 Sb. o ochraně přírody a krajiny. Tato vyhláška řadí bělozubku bělobřichou mezi ohrožené druhy a rejseka horského mezi silně ohrožené druhy. V červeném seznamu ohrožených druhů obratlovců je uveden jako druh zranitelný z důvodu svého reliktního výskytu pouze rejsek horský (Plesník a kol. 2003).

Většina odchycených jedinců pocházela z několika vytypovaných lokalit (tabulka 1). V roce 2007 byly odchyty prováděny ve spolupráci s J. Zimou jr. a získaný materiál posloužil zároveň k populačně-genetické studii sledující význam přírodních bariér (Zima 2008). V odchytech na těchto lokalitách jsme pokračovali i v následujících letech a získaný materiál byl shromažďován i nadále pro populačně-genetické studie (Populační struktura savců v kontextu fragmentace krajiny). Materiál získaný z jednorázových odchyťů na jiných lokalitách, náhodných nálezů a ze zahraničí shrnuje tabulka 2. Nepodařilo se nám získat materiál z typové lokality v Bialowiežském pralese. (Práce autorů popisu *S. fegati* byla založena na materiálu, který byl fixován pro histologii a zpracován v Rumunsku. Povolení k odchyťům rejsků se nám nepodařilo od polských autorit získat).

Tabulka 1: Soubor rejskovitých získaný opakovanými odchyty ve vytypovaných lokalitách

Druhy čeledi Soricidae					Celkové počty	Lokalita – GPS souřadnice
<i>Sorex araneus</i>	<i>Sorex minutus</i>	<i>Crocidura suaveolens</i>	<i>Neomys fodiens</i>	<i>Neomys anomalus</i>		
9	11		1		21	Boršov nad Vltavou 48°55'3.89"N; 14°24'56.07"E
12	14	1			27	Březí 48°54'23.42"N; 14°25'28.31"E
14	12	1	2	2	31	Záhorčice 48°55'1.53"N; 14°24'52.4"E
6	1				7	Švábův Hrádek 48°58'7.86"N; 14°26'21"E
22	14	2			38	Čejkovice 49°0'0.71"N; 14°22'42.37"E
10	6				16	Haklovy Dvory 48°59'26.87"N; 14°23'26.42"E
3	1		2	1	7	Rančice 48°53'18.77"N; 14°24'56.5"E
9	3			1	13	Kynšperk nad Ohří 50°6'58.75"N; 12°31'10.68"E
85	62	4	5	4	160	Celkové počty

Materiál získaný opakovanými odchyty rejskovitých na vytypovaných lokalitách v České republice (celkem 160 jedinců) jsme doplnili o rejsky získané z jednorázových odchyťů na území ČR a o náhodné nálezy uhynulých jedinců (celkem 22 jedinců), včetně dvou přímo v areálu Biologického centra AV ČR. Zaslouhou studentů PřF JU, kteří prováděli odchyty drobných hlodavců pro koevoluční studie a zásluhou přátel jsem navíc získal materiál z 64 jedinců odchycených v zahraničí. Přehled druhů, počty jedinců a zdroj materiálu uvádím v tabulce 2.

Tabulka 2: Soubor rejskovitých z jednorázových odchytů, náhodných nálezů a ze zahraničí

Lokalita	Druh čeledi Soricidae									Původ materiálu
	<i>Sorex araneus</i>	<i>Sorex minutus</i>	<i>Crocidura suaveolens</i>	<i>Crocidura leucodon</i>	<i>Crocidura russula</i>	<i>Myosorex varius</i>	<i>Myosorex</i> sp.	<i>Sylvisorex</i> sp.	neurčení	
Slatina okres Cheb		3								vlastní odchyt
Rudolfovo okres České Budějovice			3							Oleg Ditrich
Sedlec u Mikulova okres Břeclav		3								vlastní odchyt
Poděbrady	2									Jana Kvičarová
Ejovice okres Rokycany	2									Jana Martinů, Eva Nováková
České Budějovice	7	2								Oleg Ditrich, Jana Kvičarová
Zambie (více lokalit)									20	Vladimír Mazoch, Jan Zima
Jihoafrická republika Stellenbosch						5				Cecile Reed
Kamerun Babanki							5	5		Václav Mikeš
Španělsko Barcelona					22					Jana Kvičarová
Itálie Civitanova del Sannio, Brinzio	1			3						Jana Martinů
Slovensko Košice	2			1						Jana Kvičarová

Odchyt rejsek byl prováděn nejčastěji do padacích pastí (plastové nádoby; průměr 9cm, hloubka 15cm) (Obr. 2), které byly na vhodných lokalitách rozmístěny nelineárně (v 5m vzdálenostech). Padací pasti byly kontrolovány po 12 hodinách (ráno a večer). Jiné způsoby odchytů (do sklapovacích pastí nebo živochytěk) byly sice vyzkoušeny ve stejných lokalitách jako padací pasti, ale nebyly dále používány pro jejich velmi malou úspěšnost.

3.2. Žížaly (Lumbricidae)

Žížaly vytypované jako potenciální hostitelé aktinosporeových stadií životního cyklu *Soricimyxum feigati* byly sbírány pouze na lokalitách, z nichž pocházeli rejsci infikovaní touto myxosporidií. Shromažďování žížal pro vyšetření na přítomnost aktinosporeových stadií životního cyklu *S. feigati* probíhalo dvěma způsoby, metodou tzv. "tepelné extrakce" ze vzorků půdy a sběrem prováděným přímo na vytypovaných lokalitách.

"Tepelná extrakce" žížal ze vzorků půdy patří mezi tzv. etologické metody, které využívají reakcí žížal na podráždění nebo výrazné zhoršení prostředí (Pižl 2002). Pro použití této metody je Ústav půdní biologie AV ČR (ÚPB) vybaven zařízením (Obr. 3, 4), které z jedné strany půdní profil přivezený z terénu ohřívá žárovkou o výkonu 100W a z opačné strany je vrstva půdy s bylinným/travním porostem ochlazována cirkulující vodou do které unikají žížaly a další půdní „bezobratlí“. Tyto organismy opouštějí přehřívající se a vysychající vrstvu půdy. Tímto způsobem lze žížaly odebírat v průběhu několika následujících dnů (celková doba extrakce závisí zejména na počátečním stavu/vlhkosti odebraného vzorku půdy). Nesporná výhoda tepelné extrakce je téměř úplné vytěžení vzorku půdy. K nevýhodám patří časová náročnost postupu a nutnost přepravit k extrakčnímu zařízení velké objemy půdy, což může působit potíže, zejména jde-li o přepravu vzorků půdy z nesporně přístupných lokalit.

Jako velmi efektivní se ukázal sběr žížal při přerytí půdy v části vytypované lokality. Převážná část žížal byla získána tímto způsobem. Oba způsoby sběru samozřejmě limitovala struktura půdy a její vlhkost. S písčitou nebo zamokřenou půdou se manipulovalo obtížně a početnost žížal byla výrazně nižší.

Žížaly byly sbírány celkem na čtyřech lokalitách (Boršov nad Vltavou, Haklovy Dvory, Čejkovice a Kynšperk nad Ohří).

3.3. Roupice (Enchytraeidae)

Z půdních máloštětinatých vhodných pro experimentální infekce sporami *S. fegati* byla zvolena roupice *Enchytraeus crypticus* Westheide a Graefe, 1992 z laboratorní kultury Ústavu půdní biologie AV ČR. Roupice splňovaly potřebu "náhradního" (hypotetického/potenciálního) hostitele aktinosporeové fáze *S. fegati* prostého specifických patogenů a umožňovaly pracovat s minimálními infekčními dávkami spor.



1. Mokřadní olšina u obce Rančice s výskytem rejsků (*S. araneus*, *S. minutus*) a rejsců (*N. fodiens* a *N. anomalus*).
 2. Padací past na jedné z lokalit. 3, 4. Tepelné extraktory v areálu Ústavu půdní biologie (Biologické centrum AV ČR).

4. Metody

4.1. Diagnostika infekcí *Soricimyxum fegati* průkazem spor

V roce 2007 jsme začali vyšetřovat rejšky z jihočeských lokalit pomocí nativních (roztlkových) preparátů. Z jednotlivých orgánů (jater, ledvin, plic, srdce, sleziny, mozku a svaloviny) každého potenciálního hostitele *Soricimyxum fegati* jsme vyšetřovali 8-10 nativních preparátů. K vyhledávání spor ve žlučových cestách a k celkovému parazitologickému vyšetření rejšků jsme použili světelný mikroskop Olympus BX51 vybavený Nomarského diferenciálním interferenčním kontrastem. Veškeré nálezy jsme dokumentovali pomocí kamery DP70.

Nativní vyšetření orgánů bylo systematicky doplňováno histologickým vyšetřením, i když v mnoha případech byly postmortální změny ve značně pokročilém stadiu. Tkáňové excize byly fixovány rychle penetrujícím roztokem podle Davidsona (směs ethanolu, formaldehydu, kys. octové a glycerolu), odvodněny a prosyceny Histoplastem S (Serva). K barvení histologických řezů pořízených rotačním mikrotomem (Microm, Heidelberg) byl použit hematoxylin-eosin (HE), trichrom podle Massona, Giemsa a výjimečně další selektivní barvení.

4.2. Diagnostika infekcí *Soricimyxum fegati* pomocí PCR, sekvenování a analýza genetické variability

Od začátku listopadu 2007 byla od každého vyšetřovaného jedince ukládána část jater do 96% ethanolu (EM-grade). Z takto fixované jaterní tkáně byly vždy z několika míst odkrojeny její malé části (~1mm³) a po odpaření zbylého ethanolu byla tkáň pomocí tekutého dusíku a sterilní skleněné tyčinky rozmělněna. Ze vzorků připravených uvedeným postupem byly extrahovány nukleové kyseliny pomocí JETquick Tissue DNA Spin Kit (Genomed), postupem podle návodu výrobce. Získaná DNA byla uložena v mrazničce při -20°C.

V DNA extrahované z jaterní tkáně byla přítomnost myxozoí prokazována pomocí dvou po sobě následujících amplifikačních reakcí (nested PCR). V každé reakci byla použita jiná

dvojice primerů. První dvojice, vnějších primerů, byla zastoupena univerzálními eukaryotickými primery (Barta a kol. 1997):

Erib1 (5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3') - forward

Erib10 (5'-CTTCCGCAGGTTACCTACGG-3') - reverse

V další reakci byla použita dvojice primerů specifických pro myxosporeovou SSU rDNA (Fiala 2006):

MyxospecF (5'-TTCTGCCCTATCAACTWGTTG-3') - forward

MyxospecR (5'-GGTTTCNCDGRGGGMCCAAC-3') - reverse

Obě reakce byly prováděny v celkovém objemu 12,50 μ l. Reakční směs: 1,25 μ l 10x Taq buffer complete (Top-Bio, 15mM MgCl₂); 1,00 μ l dNTP Mastermix (Invitek; 2 mM každé báze); 0,50 μ l forward primer a 0,50 μ l reverse primer (25 pmol/ μ l); 0,50 μ l Taq Purple polymeráza (Top-Bio, 1 U/ μ l); 8,25 μ l PCR vody (sterilní deionizovaná voda) a 0,50 μ l DNA. Amplifikační program se skládal u obou reakcí z následujících kroků: denaturace (95°C, 10min); 20 cyklů: 94°C (30 sek), 1. reakce: 48°C / 2. reakce: 52°C (60 sek), 72°C (60 sek); závěrečná elongace (72°C, 10 min).

Při přípravě vzorků pro sekvenování úseků SSU rDNA byl použit kromě výše uvedených ještě další (forward) primer - Myxgen4F (5'-GTGCCTTGAATAAATCAGAG-3') (Diamant a kol. 2004). Pomocí různých kombinací primerů Erib1, Erib10, MyxospecF, MyxospecR a Myxgen4F byly amplifikovány různě dlouhé úseky DNA, z jejichž sekvencí byla získána konečná sekvence vymezená primery MyxospecF - Erib10.

Reakce po nichž následovala izolace PCR produktu byly prováděny v celkovém objemu 25 μ l. Reakční směs: 2,50 μ l 10x Taq buffer complete (Top-Bio, 15mM MgCl₂); 2,00 μ l dNTP Mastermix (Invitek; 2 mM každé báze); 1,00 μ l forward primer a 1,00 μ l reverse primer (25 pmol/ μ l); 1,00 μ l Taq Purple polymeráza (Top-Bio, 1 U/ μ l); 16,50 μ l PCR vody (sterilní deionizovaná voda) a 1,00 μ l DNA. Amplifikační program se ve většině případů skládal z následujících kroků: denaturace (95°C, 10min); 4 cykly: 94°C (60 sek), 44°C (60 sek), 72°C (2 min); 32 cyklů: 94°C (60 sek), 48°C (60 sek), 72°C (2 min); závěrečná elongace (72°C, 10 min). V některých případech bylo nutné použití dvou po sobě jdoucích reakcí (nested PCR).

Výsledky amplifikačních reakcí byly kontrolovány elektroforézou na 1% agarózovém gelu a pro obarvení DNA bylo použito ethidium bromid (PCR Ethidium bromid, Top-Bio) v koncentraci 0,5 μ g/ml. Výsledek separace amplifikovaných úseků DNA byl kontrolován UV lampou a dokumentován pomocí kamery (Scion Corporation). DNA byla z agarózového gelu získána pomocí kitu (JetQuick Gel Extraction kit, Genomed) podle postupu uvedeného výrobcem a uložena v mrazničce při -20°C.

PCR produkt byl ligován do vektoru pDrive Cloning Vector (Qiagen®). Ligace probíhala 60 min při pokojové teplotě v ligační směsi: 0,5 µl T4 DNA Ligase (Invitrogen™); 1,0 µl 5x DNA Ligase Reaction Buffer (Invitrogen™); 0,5 µl pDrive Cloning Vector (Qiagen®) a 3 µl PCR produktu. Připraveným rekombinantním plasmidovým vektorem byly transformovány kompetentní bakterie *E. coli* DH5α (Invitrogen™). Bakterie (50 µl) byly po přidání k ligační směsi inkubovány 10 min na ledu. Následně byly ve vodní lázni prudce zahřáty na 42°C tak, aby došlo k teplotnímu šoku a po 30 sek byly vráceny zpět na led (na 2 min). Poté byly přeneseny do 200 µl SOC (2% trypton; 0,5% Yeast extract; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM glukóza) média zahřátého na pokojovou teplotu a následujících 45min kultivovány v třepacím inkubátoru při 37°C. Dále následovala kultivace na LB agarózových plotnách (LB agar: 3 g Bacto-agar; 2 g Bacto-tryptone; 1 g Bacto-yeast extract; 2 g NaCl; 800 µg ampicilinu; 200ml destilované H₂O) na kterých bylo před nanesením bakterií rozetřeno 40µl X-galu (80 µg/ml) s IPTG (50 µM). Agarózové plotny s bakteriemi byly uloženy do inkubátoru (nastaveného na 37°C) na 14-16 hodin.

Namnožené kolonie bakterií nesoucí plasmid (bílé kolonie - pravděpodobně obsahující cizorodou DNA vloženou do plasmidu) byly přeneseny do 30 µl PCR vody a 10 min třepány v inkubátoru při 37°C. Přítomnost cizorodé DNA v plasmidu byla kontrolována pomocí PCR a následně agarózové elektroforézy, která umožnila zkontrolovat délku zaklonovaného úseku DNA.

Reakce probíhala v celkovém objemu 13 µl. Reakční směs: 1,25 µl 10x Taq buffer complete (Top-Bio, 15mM MgCl₂); 1,00 µl dNTP Mastermix (Invitrogen; 2 mM každé báze); 0,50 µl forward primer a 0,50 µl reverse primer (25 pmol/µl); 0,50 µl Taq Purple polymeráza (Top-Bio, 1 U/µl); 7,25 µl PCR voda (sterilní deionizovaná voda) a 2 µl buněčné suspenze. Amplifikační program se skládal z následujících kroků: denaturace (95°C, 10min); 20 cyklů: 95°C (30 sek), 54°C (60 sek), 72°C (60 sek); závěrečná elongace (72°C, 10 min).

Kolonie bakterií, u nichž se podařilo prokázat úspěšné zaklonování potřebných úseků DNA, byly dále kultivovány v 3 ml LB média s 12 µl ampicilinu v třepacím inkubátoru při 37°C po dobu 14-16 hodin. Plasmidy z namnožených bakterií byly izolovány pomocí JETquick Plasmid Miniprep Kit (Genomed), kde bylo postupováno podle návodu výrobce. Získané plasmidy byly uchovávány v mrazničce při -20°C.

Sekvenace probíhala na přístroji ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) v laboratoři genomiky (BC AV ČR, v. v. i.) s využitím plného servisu (včetně čištění produktů pomocí BDXT) a se sekvenačním kitem BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Pro sekvenaci byly použity nejčastěji primery M13F a M13R. V případech, kdy se podařilo zaklonovat úsek ohraničený primery MyxospecF a Erib10, byly pro sekvenaci použity také vnitřní primery MyxospecR a Myxgen4F. V jednom případě byly pro následující fylogenetickou analýzu připraveny a osekvenovány 3 různé klony celého úseku ohraničeného primery MyxospecF a Erib10. Označeny jsou 172a, 172b a 172c.

Získané sekvence úseků SSU rDNA byly nejprve kontrolovány v programu Sequence scanner software v 1.0 (Applied Biosystems). Ke kontrolní identifikaci sekvencí byl použit algoritmus BLAST v databázi NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) a zároveň byly v této databázi vyhledány sekvence SSU rDNA příbuzných druhů, které v následující analýze sloužily jako srovnávací skupina (outgroup). Úseky sekvencí byly spojeny do výsledné sekvence pomocí programu Seqman (součást komerčního balíku DNASTAR). Jako outgroup byly použity sekvence následujících druhů (v závorkách jsou uvedeni hostitelé a přístupové kódy v databázi GenBank): *Chloromyxum truttae* (*Salmo salar*, AJ581916), *Sphaeromyxa hellandi* (*Melanogrammus aeglefinus*, DQ377693), *Sphaeromyxa zaharoni* (*Pterois miles*, AY538662), *Myxidium hardella* (*Hardella thurjii*, AY688957), *Myxidium chelonarum* (*Batagur smithi*, DQ377694), *Myxidium truttae* (*Salmo salar*, AF201374), *Zschokkella nova* (*Carassius auratus gibelio*, DQ377690) a *Myxidium anatidum* (*Anas platyrhynchos*, EF602629). Alignment byl vytvořen pomocí programu ClustalX2 ver. 2.0.11 (Larkin a kol. 2007). V programu BioEdit ver. 7.0.5.3 (Hall 1999) byl alignment vizuálně kontrolován a zkracován o nejednoznačně srovnané úseky a o úseky výrazně přesahující kratší sekvece. V programu PAUP* 4b10 (Swofford 2003) byla provedena Neighbor-joining (NJ) analýza. Větve se zápornou délkou byly zkráceny na nulovou délku.

4.3. Vyšetřování žížal jako potenciálních hostitelů aktinosporeové fáze životního cyklu *Soricimyxum fegati*

Žížaly získané z lokalit, z nichž byli odloveni rejskovití infikovaní *S. fegati* (v celkovém počtu 1164), byly z části vyšetřovány histologicky, z části pomocí PCR. Pro histologické vyšetření byly žížaly 5–7 dní ponechány v chladu (10°C) na vlhkém filtračním papíře. Tímto způsobem jsme docílili vyprázdnění střeva a zabránili komplikacím během přípravy histologických řezů. Žížaly byly fixovány v nataženém stavu (v předem připravených žlábcích), po myorelaxaci docílené chladem. Histologické zpracování žížal rozdělených po fixaci na několik částí bylo provedeno stejným způsobem jako zpracování tkání rejsků (4.1.). Pravidelně bylo vyšetřováno pět semiseriových řezů z každého histologického bločku, v podezřelých případech mnohem více.

Výrazně větší část nashromážděných žížal byla vyšetřena pomocí nested PCR za použití stejné sestavy primerů jako v případě vyšetřování jater rejsků. DNA byla získávána z rozmělněné tkáně žížal tak, aby součástí vzorku byla i DNA ze zaživacího ústrojí. Tento postup nám neumožňoval předchozí zařazení žížal do druhů nebo alespoň rodů. Kvůli snížení nákladů byla DNA extrahovaná vždy z 5 jedinců najednou.

4.4. Experimentální infekce

Při kultivaci roupic (*Enchytraeus crypticus*) jako "náhradních" (potenciálních/hypotetických) hostitelů aktinosporeové fáze *S. fegati* jsme postupovali podle metodiky, kterou popsal Křišťůfek a kol. (1999). Mírně jsme modifikovali jen koncentraci agarů (1,3%) a teplotu inkubace (10°C) s cílem prodloužit délku života roupic. Pro jednotlivé pokusy byla vždy připravována synchronizovaná kultura, tj. kultura roupic přibližně stejného stáří jednorázovým přenesením kokonů na čerstvou agarovou plotnu (Křišťůfek 2000). Na agar, který byl pravidelně zvlhčován autoklávovanou vodovodní vodou, jsme přidávali malé množství potravy (rozemleté a autoklávované ovesné vločky).

K prvním infekčním pokusům, jejichž cílem bylo ověřit design experimentů, byly získány spory *Zschokkella nova* Klokacewa, 1914, myxosporidie fylogeneticky příbuzné *S. fegati*. Dostatečné množství spor bylo možné získat opakovaně ze žlučových měchýřů amurů

Ctenopharyngodon idella (Valenciennes, 1844) zpracovávaných na sádkách v Třeboni (Rybářství Třeboň a.s.). Spory *Z. nova* byly promyty sterilní vodovodní vodou a uchovávány při 4°C až do začátku infekčních pokusů (nejdéle 6 dnů). Na agarové plotny se synchronizovanými kulturami *E. crypticus* (10 jedinců na misce) byly nanесeny spory *Z. nova* v počtech 10^3 , 10^4 a 10^5 a poté byly kultury udržovány při 10°C s přidavkem minimálního množství potravy a pravidelným vlhčením. Po 30 a 100 dnech byly rouvice fixovány (i) roztokem podle Davidsona a zpracovány parafinovou histologickou technikou, (ii) 3% glutaraldehydem a zalitím do pryskyřice (Spurr). Výsledek pokusu, tj. přítomnost/nepřítomnost aktinosporeových stádií v rouvicích byla kontrolována v histologických a polotenkých řezech.

Pro infekční pokus se sporami *S. fegati* se podařilo získat pouze 100 spor *S. fegati* z jater rejska obecného (*S. araneus*). Pokus byl proveden stejným způsobem jako předchozí se sporami *Z. nova*. Kultura roupic (10 jedinců) byla zpracována za 30 dnů po podání spor *S. fegati*.

5. Výsledky

5.1. Hostitelé *Soricimyxum fegati*

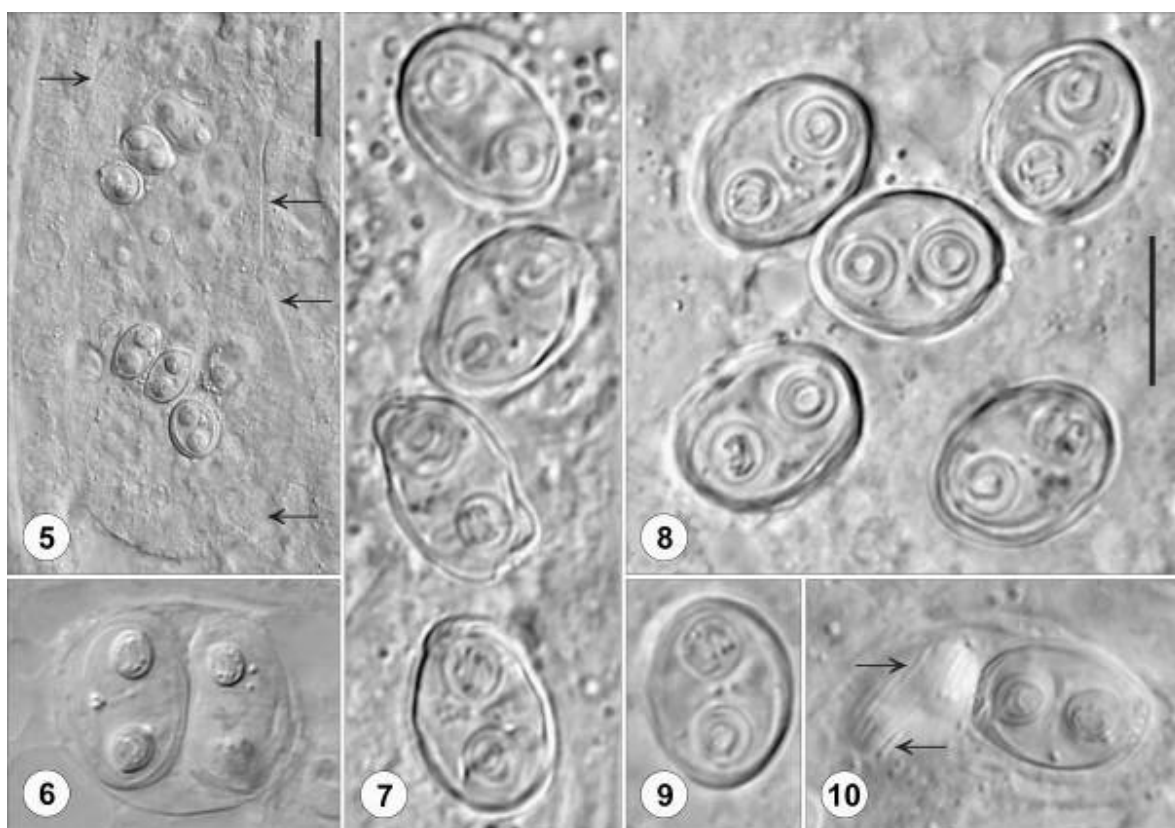
Ve vyšetřeném souboru rejskovitých, získaných na území ČR v období od 2.8. 2007 do 3.11. 2009, jsme diagnostikovali infekci *S. fegati* u 66 jedinců. Kromě již známého hostitele, rejska obecného, jsme prokázali infekci *S. fegati* také u rejska malého a bělozubky šedé a vyvrátili jsme tak hypotézu hostitelské specifity vázané na jeden druh.

Morfometrické charakteristiky nativních spor *S. fegati* z nově poznanych hostitelů se nelišily od charakteristiky spor *S. fegati* z rejska obecného. Morfologii zralých spor z rejska obecného dokumentují Obr. 5–10.

V souboru rejskovitých, které jsme získali z různě vzdálených evropských i mimoevropských lokalit (Tab. 2) se nám podařilo pomocí PCR prokázat dalšího hostitele, bělozubku tmavou *Crocidura russula* (Hermann, 1780). Dva infikovaní jedinci pocházeli ze skupiny 22 bělozubek tmavých odchycených v blízkosti Barcelony. Ve vzorcích, které byly k dispozici pro nativní vyšetření se nám nepodařilo najít spory. Porovnání nálezů u rejskovitých z našeho území se španělskými se proto může opírat pouze o molekulární data.

Tab. 3: Prevalence *S. fegati*

Hostitelé <i>S. fegati</i>	Počet vyšetřených	Počet infikovaných <i>S. fegati</i>	Prevalence
<i>Sorex araneus</i>	98	51	52,0%
<i>Sorex minutus</i>	70	14	20,0%
<i>Crocidura suaveolens</i>	10	1	10,0%
<i>Crocidura russula</i>	22	2	9,1%



5. Zralé spory *Soricimyxum fegati* v plasmodiu (kontury označené šipkami) lokalizovaném v luminu žlučového rejska obecného. Měřítko = 20 μm . 6. Dvě spory *S. fegati* vyvíjející se v pansporoblastu. 7–9. Morfologie zralých spor *S. fegati* v různých polohách a v různých rovinách zaostření. 10. Na povrchu chlopně spory jsou patrná žebra (označená šipkami). Měřítko pro obr. 6–10 = 10 μm . Převzato z Dyková a kol. (2007)

5.2. Prevalence infekcí *S. fegati* ve sledovaném období

Nápadným jevem pozorovaným během vyšetřování rejskovitých byla určitá sezónní závislost infekcí *S. fegati* u vyšetřovaných hostitelů. Poměr vyšetřených jedinců a počet nálezů *S. fegati* během jednotlivých měsíců ukazuje tabulka 4. Zeleně zvýrazněné jsou měsíce, v nichž byla zjištěna nápadně vyšší prevalence infekcí *S. fegati* ve srovnání s ostatními měsíci. Další pohled na sezónnost poskytlo histologické vyšetření 158 potenciálních hostitelů. Celkem 5x byla v histologických řezech nalezena časná plasmodia, případně i proliferativní stadia migrující parenchymem jater. Jeden z těchto pěti nálezů připadá na konec dubna (rejsek obecný) další čtyři na konec června a první polovinu července (2x rejsek obecný, 2x rejsek malý). Podobná závislost na sezóně roku byla patrná u útvarů, které připomínají xenomy mikrosporidií (viz další

podkapitola). Nálezů těchto stadií jsou rozděleny na 2 období v průběhu roku a patrně souvisejí i s druhem hostitele (Tab. 4).

Tab. 4: Infekce *S. fegati* v jednotlivých měsících roku*

Hostitel	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<i>Sorex araneus</i>		10/9	6/5	1/1	4/1	6/2	16/7	4/4	1/1	3/3
<i>Sorex minutus</i>	1/1	6/5	3/3		9/2		5/1	3/1	2/1	

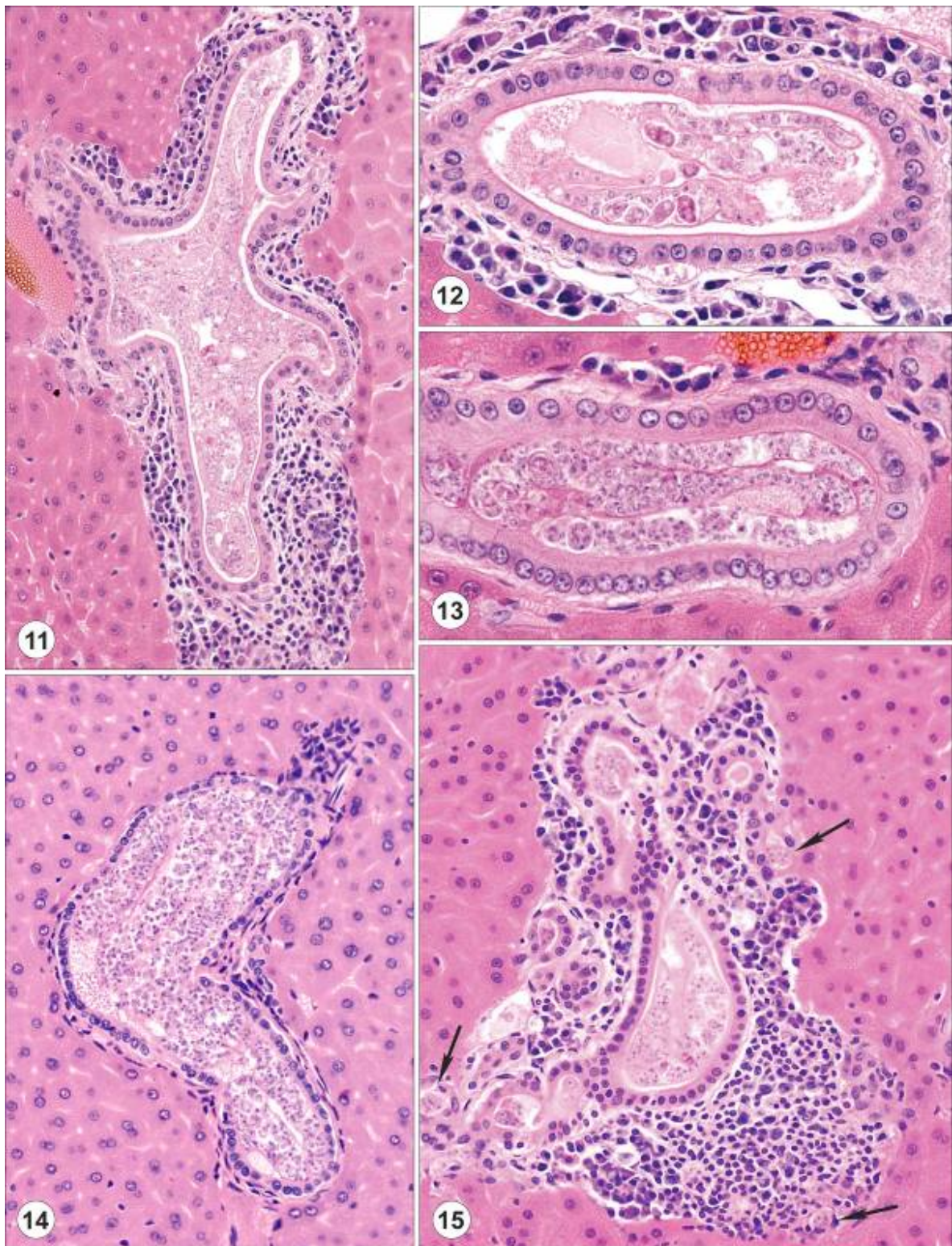
Pro zhodnocení byla použita jen část souboru - rejskovitů z celoročně sledovaných lokalit.

* římské číslice v prvním řádku tabulky udávají měsíce roku; číslo před lomítkem udává počet vyšetřených jedinců daného druhu během měsíce, za lomítkem je uveden počet jedinců infikovaných *S. fegati*

5.3. Histopatologické změny vyvolané infekcí *Soricimyxum fegati* u rejskovitých

Infekce *S. fegati* byla histologicky prokázána v intrahepatických žlučovodech 43 rejskovitých 3 druhů. V celém souboru vyšetřených jedinců byla dominantní histopatologickou změnou působenou *S. fegati* pericholangitis charakterizovaná mononukleárními infiltráty s převahou lymfocytů a monocytů (Obr. 11, 12). Intenzita infekcí a rozsah zánětlivých změn se u jednotlivých hostitelů lišil, nebyly ale zjištěny žádné rozdíly v charakteru změn vázané na druh hostitele. U všech vyšetřených jedinců bylo možné najít žlučovody, které obsahovaly plasmodia *S. fegati* ale nebyly na příčném ani podélném řezu obklopeny zánětlivou reakcí (Obr. 13, 14).

Srovnáním velkého počtu řezů z velkého počtu infikovaných jedinců jsme dospěli k závěru, že přítomnost/nepřítomnost a intenzita reakce hostitele nezávisí na velikosti a stadiu vývoje intraluminálních plasmodií. Klíčem k objasnění patogeneze bylo získání materiálu z časných stadií rozvoje infekce. Ukázalo se, že reakci hostitele vyvolávají časná, tzv. proliferativní stadia *S. fegati*, která se cirkulačním systémem dostávají do jater, migrují jaterním parenchymem a pronikají přes epitel žlučových kanálků do jejich lumina (Obr. 15). Absence tkáňové reakce pozorovaná v okolí některých žlučovodů je vysvětlena skutečností, že rostoucí plasmodia se svým tvarem přizpůsobují žlučovým kanálkům a vyplňují dlouhé segmenty kanálků včetně těch, které jsou značně vzdálené od původního místa průniku časných stadií a poškození stěny kanálku. Vyšetřený materiál nám neumožnil posoudit změny ve žlučovém měchýři. Žlučové měchýře rejsků byly při pitvě prázdné a neobsahovaly zbytky plasmodií nebo zralé spory.



11, 12. Plasmodia *S. fegati* v intrahepatickém žlučovodu rejska malého. V okolí žlučovodů je patrná reakce hostitele. HE, $\times 295$ (11), $\times 740$ (12). **13.** Absence reakce hostitele v okolí žlučovodu s plasmodiem obsahujícím spory. HE, $\times 740$. **14.** Reakce hostitele chybí i v okolí žlučovodu bělozubky šedé. HE. **15.** Časně stadium infekce *S. fegati* s intenzivní reakcí hostitele vyvolanou migrací proliferativních stadií (šipky) do žlučovodů. HE, $\times 295$ (14, 15).

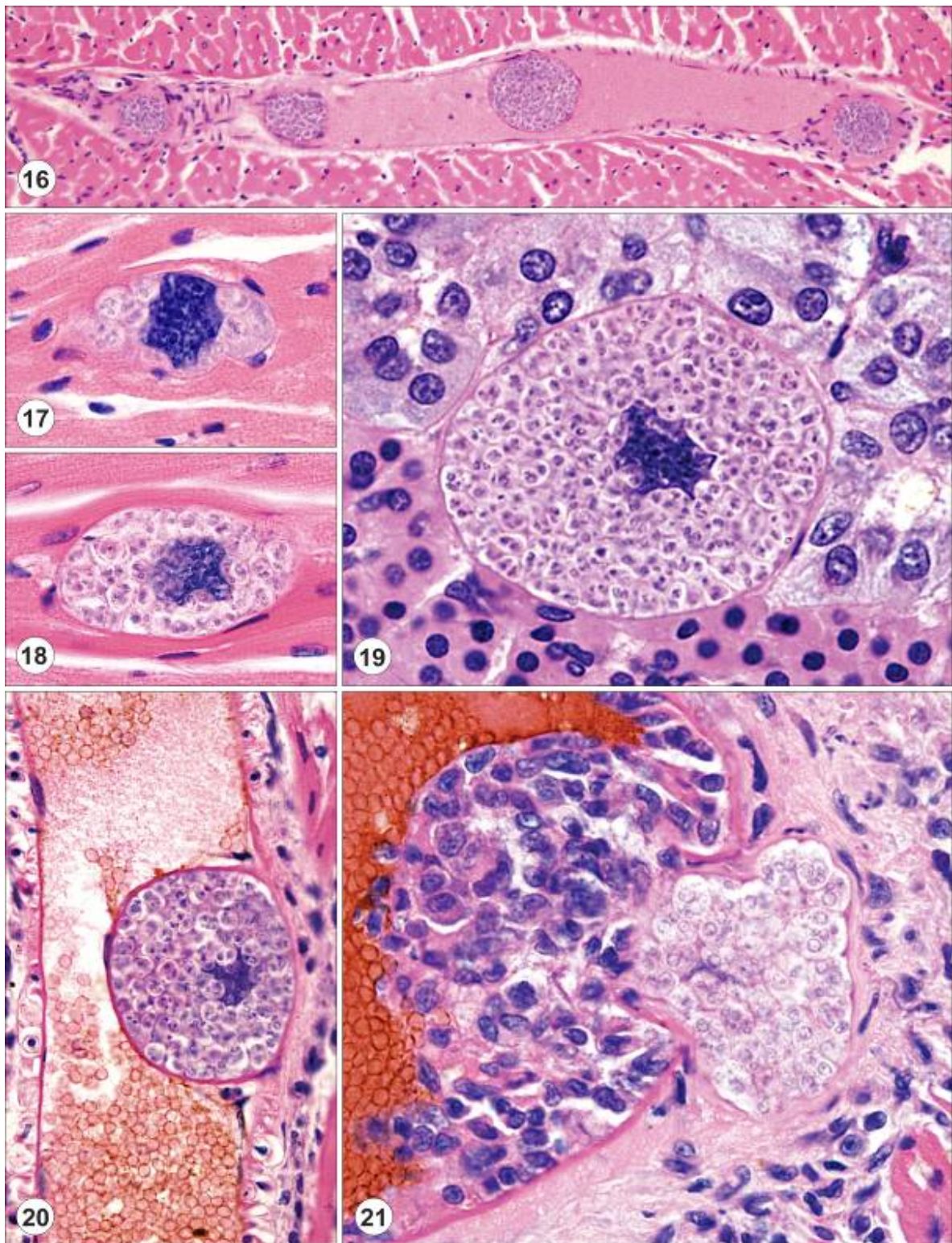
Kromě změn v játrech, jsme histologickým vyšetřením dalších orgánů prokázali výskyt útvarů, které se podobaly xenomům mikrosporidií (Obr. 16). Byly nalezeny u 19 jedinců (13 *S. araneus*, 5 *S. minutus* a 1 *Crocidura suaveolens*), přičemž u 7 jedinců byly současně nalezeny spory *S. fegati* ve žlučovodech a u 4 proliferativní stadia v okolí žlučovodů (podrobně v tab. 5). Prostudovali jsme více než 50 útvarů podobných xenomům, které se lišily velikostí a lokalizací. V žádném z těchto "xenomů" jsme nenašli zralé spory. Ve všech jsme pozorovali hypertrofované, nepravidelné jádro a uniformní vývojová stadia. Tím se tyto útvary lišily od skutečných xenoparazitárních útvarů mikrosporidií. Nejčasnější stadia vývoje těchto útvarů jsme našli v korové vrstvě nadledvinek a ve svalových vláknech myokardu. Byla obklopena jen tenkou vrstvou pojivové tkáně bez známek reakce hostitele (Obr. 17, 18).

Většina "xenomů" byla lokalizována ve stěnách koronárních cév (Obr. 20). Extrémní počet (4 "xenomy") jsme našli v jedné koronární cévě u *C. suaveolens* (Obr. 16). Méně časté byly nálezy v játrech, ledvinách, nadledvince (Obr. 19) a slinivce břišní. Rozsah poškození cévních stěn způsobený vývojem "xenomů" se v jednotlivých případech lišil, stejně jako intenzita reakce hostitele. Ve dvou případech jsme pozorovali, že vývoj "xenomu" ve stěně koronární cévy způsobil vznik trombu (Obr. 21). Poznání etiologie těchto změn, tj. primárně potvrzení/vyloučení *S. fegati* jako původce, je předmětem samostatné studie založené na PCR a hybridizaci *in situ*.

Tabulka 5.: Přehled nálezů "xenomů" a jejich lokalizace

Druhy čeledi Soricidae	Označení jedince	Datum odchyty	Lokalizace "xenomu"						Průkaz <i>S. fegati</i> v játrech	
			játra	srdce	slinivka	nadledviny	ledviny	slezina	histologicky	pomocí PCR
<i>Sorex araneus</i>	7	5.8. 2007		/					-	N
<i>Sorex araneus</i>	23	11.8. 2007	/						+	+
<i>Sorex araneus</i>	31	14.8. 2007			/				+/-	N
<i>Sorex araneus</i>	51	23.8. 2007					/		+	+
<i>Sorex araneus</i>	55	25.8. 2007		/					+	+
<i>Sorex araneus</i>	59	27.8. 2007	/	/					-	N
<i>Sorex araneus</i>	60	27.8. 2007			/	/			-	N
<i>Sorex araneus</i>	63	27.8. 2007	/	/					-	N
<i>Sorex araneus</i>	88	18.4. 2008		/					+	+
<i>Sorex araneus</i>	116	18.7. 2008	/						-	+
<i>Sorex araneus</i>	127	14.8. 2008		/					+/-	+
<i>Sorex araneus</i>	132	2.9. 2008					/		+/-	+
<i>Sorex araneus</i>	178	19.6. 2009		/					+/-	+
<i>Sorex minutus</i>	33	15.8. 2007		/					-	N
<i>Sorex minutus</i>	84	1.4. 2008		/					+	+
<i>Sorex minutus</i>	89	18.4. 2008				/			+	+
<i>Sorex minutus</i>	97	30.4. 2008		/					+	+
<i>Sorex minutus</i>	131	2.9. 2008		/					-	+
<i>Crocidura suaveolens</i>	67	29.8. 2007	/	/					-	N

Vysvětlivky k tabulce 5: negativní výsledek (-), pozitivní (+), časná plasmodia/proliferativní stadia (+/-); N = nebylo vyšetřováno, není extrahována DNA



16. Xenomům podobné útvary ("xenomy") nalezené v koronární cévě bělozubky šedé. HE, $\times 145$. **17, 18.** Nejmenší "xenomy" nalezené v srdeční svalovině rejsků malých. HE, $\times 740$. **19.** "Xenom" z nadledvinky rejska obecného lokalizovaný na rozhraní korové vrstvy a dřene. HE, $\times 740$. **20.** "Xenom" prominující do lumina koronární cévy bělozubky šedé. HE, $\times 740$. **21.** Trombus, který vznikl po narušení stěny cévy růstem "xenomu". HE, $\times 740$.

5.4. Přehled parazitologických nálezů u rejskovitých

Nativní a histologické vyšetření rejskovitých zaměřené primárně na detekci myxosporeových infekcí přineslo další parazitologické nálezy, které dokumentují Obr. 22–27 a stručně je shrnuje následující tabulka (tab. 6).

Tabulka 6: Přehled nálezů parazitů v histologických řezech, lokalizace a prevalence

Parazit	Lokalizace	Infikovaní jedinci	Prevalence ¹
<i>Soricimyxum fegati</i>	játra	39	25,0%
<i>Calodium hepaticum</i>	játra, slezina	19	12,2%
<i>Sarcocystis</i> sp.	svalovina (bránice)	8	5,1%
Adiaspora ²	játra	1	0,6%
Cestoda	játra	3	2,0%
Cestoda	střevo ³	1	—
Trematoda	střevo ³	5	—
Nematoda	plíce	9	5,8%
Nematoda	střevo ³	2	—

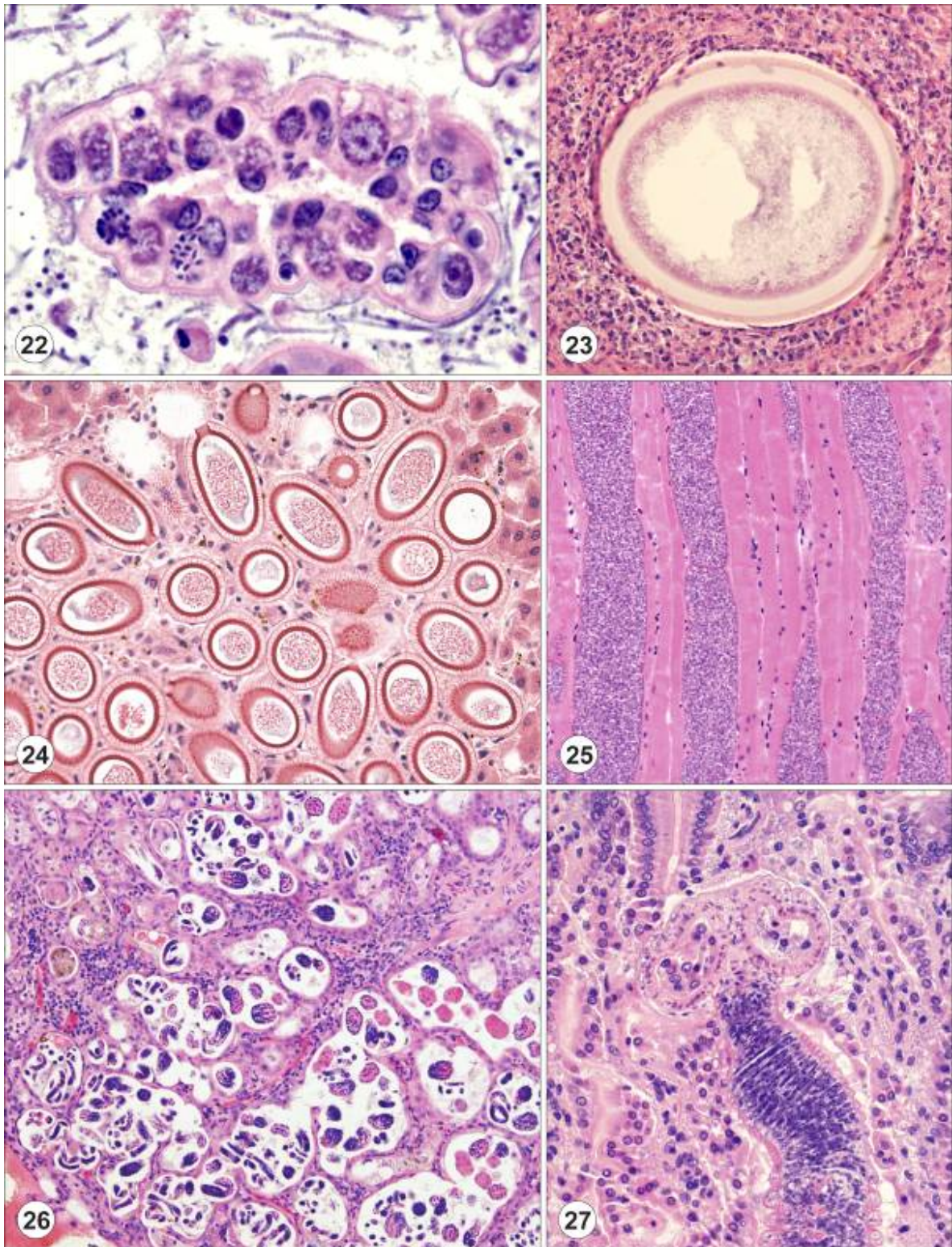
¹⁾ prevalence byla počítána z celkového počtu histologicky vyšetřených rejskovitých (n=156)

²⁾ adiaspora - adiaspiromykóza, původce *Emmonsia crescens*

³⁾ histologické vyšetření střev bylo možné pouze v několika případech, proto není uvedena prevalence střevních parazitů

Jediný nález kokcií ve střevě rejska obecného (Obr. 22) lze patrně vysvětlit skutečností, že u naprosté většiny rejskovitých podlehl zaživací trakt téměř kompletní autolýze ještě před pitvou. Výjimečný byl i nález adiaspory v játrech rejska obecného (Obr. 23). Přesto, že byla většinou vyšetřena jen malá tkáňová excize, našli jsme ve svalovině bránice u 8 rejskovitých

Sarcocystis sp.. Masivní infekci u rejska obecného dokumentuje Obr. 25. Z nematodů nalezených v nativních preparátech a v histologických řezech jsme určili pouze kapilárie *Calodium hepaticum* (Bancroft, 1893) podle tvaru vajíček. Změny vyvolané kapiláriemi (většinou v játrech a ve slezině) byly mimořádně rozsáhlé a pro funkci orgánů zjevně zásadní (Obr. 24). Původce tzv. verminózních pneumonií (Obr. 26), které většinou postihly celé laloky plic, se nepodařilo určit. Rovněž nematody ojediněle nalezené ve střevě a dalších orgánech (žaludek, jícen, ledviny, plíce a mozek) se nepodařilo determinovat. U tasemnic nalezených ve střevě rejsků jsme v histologických řezech rozeznali čtyři kruhové přísavky (Obr. 27). Na našem území bylo zaznamenáno u rejska obecného více druhů tasemnic několika rodů (Prokopič 1956).



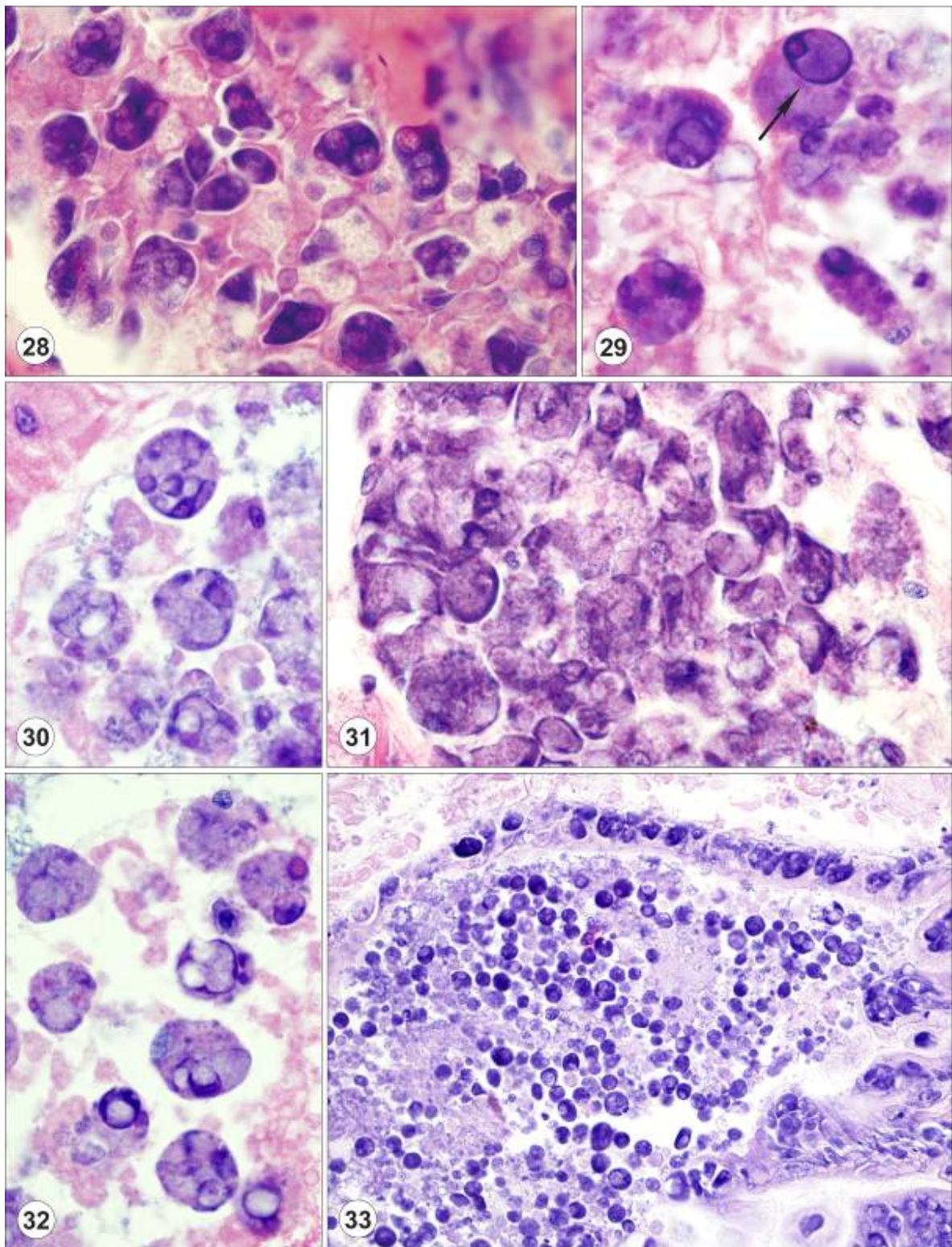
22. Vývojová stadia kokcií v epitelu střeva. Rejsěk obecný, HE $\times 740$. 23. Unikátní nález adiaspory v jaterním parenchymu rejska obecného. HE $\times 295$. 24. Shluk vajíček *Calodium hepaticum* v játrech bělozubky šedé. HE, $\times 295$. 25. Masivní infekce *Sarcocystis* sp. ve svalovině bránice rejska obecného. HE $\times 145$. 26. Verminózní pneumonie u rejska malého. HE, $\times 145$. 27. Tasemnice ve střevě rejska malého. HE, $\times 295$.

5.5. Výsledky vyšetření žížal

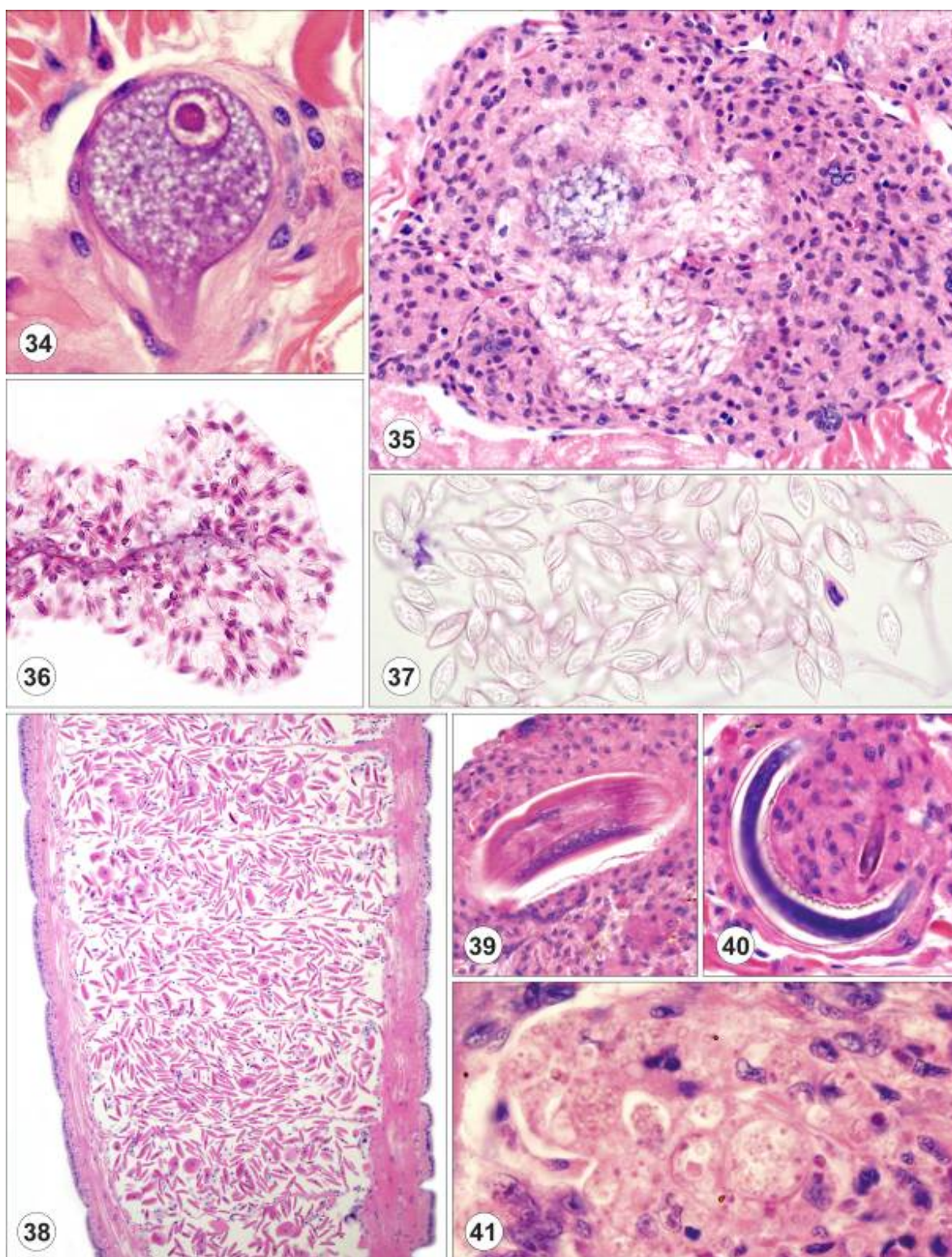
Výsledkem histologického vyšetření 69 žížal šesti druhů: *Dendrobaena octaedra* (Savigny, 1826); *Lumbricus rubellus* Hoffmeister, 1843; *L. polyphemus* Fitzinger, 1833; *Aporrectodea rosea* (Savigny, 1826); *Octolasion lacteum* (Savigny, 1826) *O. tyrtaeum* (Savigny, 1826) byl suspektní nález aktinosporeových stadií v luminu střeva a v coelomové dutině dvou žížal (Obr. 28–33). Nalezené vícebuněčné útvary jsme nedokázali spolehlivě určit ani spojit s dalšími nálezy parazitárních agens. Náznaky struktur, které (z popsáných aktinosporeových stadií) vzdáleně připomínají *Neoactinomyxum*, ponechávají determinaci otevřenou pro případné použití molekulárních metod.

Vyšetření výrazně většího počtu žížal (1095) pomocí PCR diagnostiky nepřineslo pozitivní výsledky. Po zkušebním použití univerzálních eukaryotických primerů Erib1 a Erib10 (Barta a kol. 1997) nedošlo během PCR reakce k amplifikaci žádné eukaryotické DNA. Ke stejnému výsledku jsme dospěli i při přípravě reakční směsi s různě naředěnou DNA (v poměrech 1:1, 1:2 a 1:3 s vodou).

Mezi ostatními nálezy zaznamenanými v histologických řezech dominovaly infekce gregarin (Obr. 34). Různá stadia životního cyklu *Monocystis* cf. *lumbricoides* byla zjištěna u většiny vyšetřených žížal (Obr. 35–38). Běžné byly i nálezy larev nematodů s reakcí hostitele v bezprostředním okolí (Obr. 39, 40) a buněčné reakce vyvolané zraněním žížal (Obr. 41).



28–32. Suspektní aktinosporeová stadia z coelomové dutiny histologicky vyšetřených žíhal. HE, $\times 740$ (28, 29, 31) a Giemsa, $\times 740$ (30, 32) Všechna pozorovaná stadia mají sférický nebo subsférický tvar, obsahují vakuolám i pólovým váčkům podobné útvary. Nejlépe definovaný útvar je vidět na obr. 29. (označený šipkou). 33. Podobné suspektní útvary byly u jedné žízály pozorovány i v luminu střeva. HE, $\times 295$.



34. Trofozoit gregariny s mukronem (Aseptatina). *Aporrectodia rosea*, HE, $\times 740$. 35–38. Infekce žíhal *Monocystis* cf. *lumbricoides*. 35. Gametocysta se sporami v semených váčkách *Octolasion tyrtaeum*, HE, $\times 295$. 36. Oocysty nahradily tkáň semených váčků *O. tyrtaeum*, HE, $\times 295$. 37. Zralé, světlolomné oocysty, HE, $\times 740$. 38. Masivní výskyt sporozoitů, HE, $\times 295$. 39, 40. Larvy nematodů, *O. lacteum*, HE, $\times 145$. 41. Buněčná reakce ve střevě *O. tyrtaeum*, HE, $\times 740$.

5.6. Výsledky experimentálních infekcí

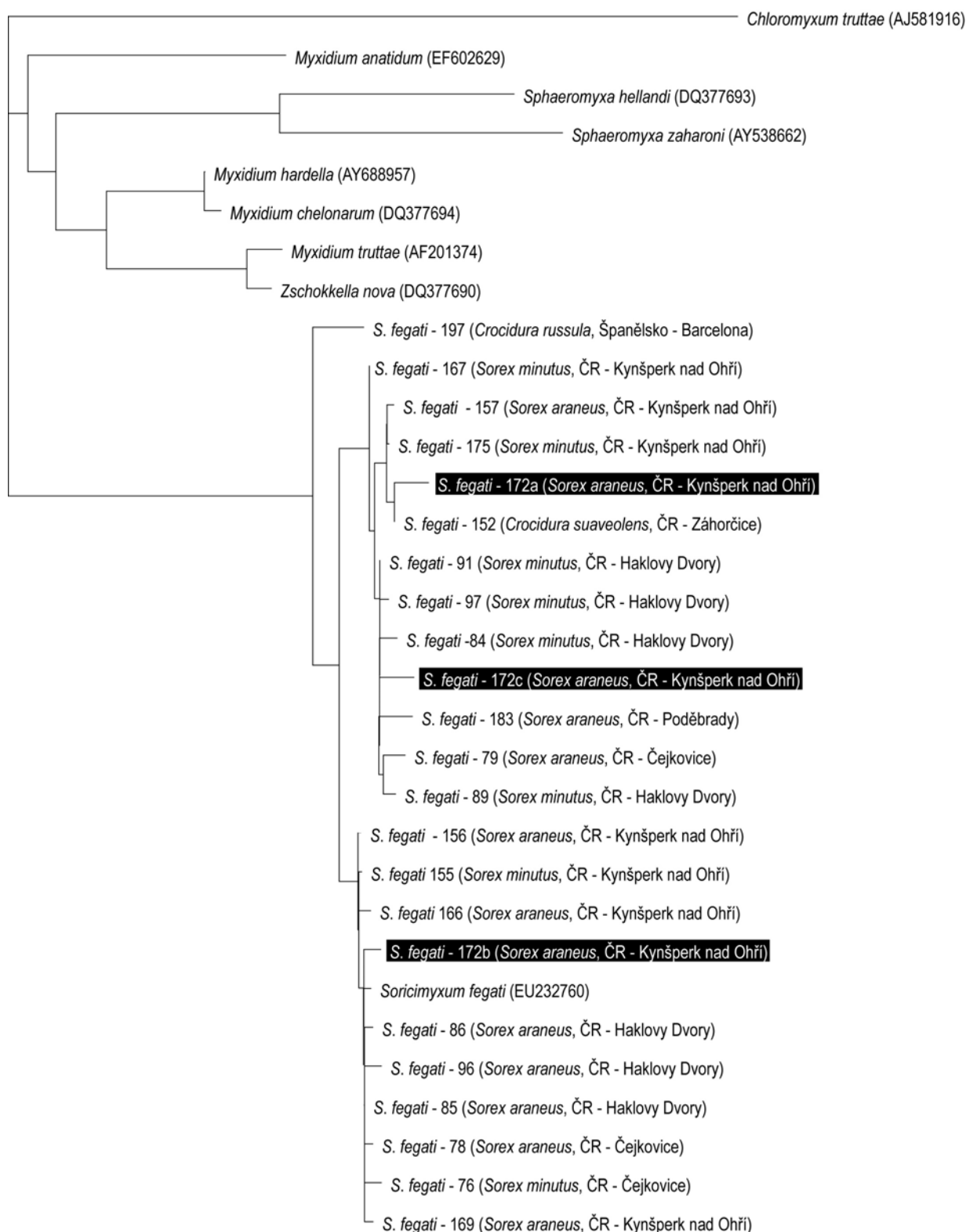
V histologických a polotenkých řezech se po jediném infekčním pokusu nepodařilo nalézt nic, co by nasvědčovalo úspěšné infekci *S. fegati*. Vzhledem k omezenému množství spor *S. fegati* nemohly být prováděny experimentální infekce opakovaně. Neúspěšné byly i metodicky zaměřené pokusy se sporama *Z. nova*, ačkoliv jejich infekční dávka byla podstatně vyšší.

5.7. Molekulární charakteristika *S. fegati*

Podařilo se nám získat 23 neúplných sekvencí SSU rDNA *S. fegati* ze 4 druhů rejskovitých, původem z různých lokalit, v délce od 1143bp do 1702bp. Při spojování jednotlivých úseků sekvencí nebyly v některých případech jejich společné úseky zcela totožné, v těchto částech jsou výsledné sekvence konsenzem dvou překrývajících se částí. Tyto sekvence je nutno považovat za chimérické (tj. jejich koncové části jsou odvozeny od ne zcela totožných dílčích sekvencí). U těchto sekvencí nevíme nic o variabilitě mezi nepřekrývajícími se úseky. Proto byly připraveny i 3 celistvé sekvence různých klonů ze stejného PCR produktu (*Sorex araneus* 172; lokalita Kynšperk nad Ohří). Výchozí PCR produkt pro přípravu těchto sekvencí byl ohraničen primery MyxospecF a Erib10.

Při úpravách byl alignment zkrácen na délku 1179bp. Genetické rozdíly v sekvencích SSU rRNA genů všech analyzovaných izolátů (bez outgroupu) se pohybovaly v rozmezí 0,3–7,9 % a byly rozptýlené po celém osekvenovaném úseku.

Fylogenetická analýza sekvencí SSU rDNA metodou Neighbor-joining dokumentovaná na Obr. 42, a také srovnání alignmentu sekvencí pomocí programu BioEdit (Sequence Identity Matrix) odhalilo výraznou variabilitu (1,1–4,8 %) mezi klony 172a, 172b a 172c (Obr. 11). Tato skutečnost znemožnila vyvozovat z fylogenetických pozic ostatních sekvencí SSU rDNA souvislosti mezi hostiteli, jejich populacemi a lokalitami. Pouze fylogenetická pozice španělského nálezu *Soricimyxum* cf. *fegati* z *C. russula* a největší genetický rozdíl (7,9%) nápadně odlišuje tento materiál od všech ostatních.



42. Fylogenetická analýza sekvencí SSU rDNA metodou Neighbor-joining. Klony (172a-172c) pocházející z jednoho PCR produktu jsou zvýrazněny. Číslo umístěné za *S. fegati* označuje konkrétního hostitele.

6. Diskuse a perspektivy další práce

Rejsek obecný je v původním popisu *Soricimyxum fegati* z Bialowiežského pralesa považován za jediného hostitele myxosporeové fáze *S. fegati* (Prunescu a kol. 2007). Ke stejnému závěru jsme dospěli i po vyšetření prvního souboru rejsek odchycených na Českobudějovicku. V této fázi výzkumu byla infekce *S. fegati* diagnostikována u 10 z 24 rejsek obecných, zatímco výsledek vyšetření 29 rejsek malých byl negativní (Dyková a kol. 2007).

V další fázi výzkumu, kterou prezentuje předložená práce byl předpoklad hostitelské specifity vyvrácen zjištěním nových hostitelů *S. fegati* z čeledi rejskovitých. Prevalence zjištěné na základě vyšetření srovnatelných počtů rejsek obecných (52%) a rejsek malých (20%) svědčí o tom, že rejška obecného (typového hostitele *S. fegati*) můžeme považovat za typického hostitele této myxosporidie.

Hodnocení významu nově zjištěných hostitelů *S. fegati* je v současné době omezeno počtem vyšetřených jedinců, přesto lze předpokládat, že větší spektrum hostitelů zvýšilo pravděpodobnost objasnění životního cyklu tohoto parazita. Vzhledem k tomu, že jsme nezjistili rozdíly v reakci jednotlivých hostitelů na infekci *S. fegati*, neuvažujeme zatím o tzv. atypických hostitelích. Je zajímavé, že u žádného z vyšetřených hostitelů *S. fegati* jsme nezaznamenali tak intenzivní změny jaterního parenchymu, jaké známe z typového histologického materiálu rejška obecného z Bialowiežského pralesa.

Překvapivý výskyt myxosporeí u terestrického savců vyvolává řadu otázek, které se týkají zejména způsobu jejich přenosu mezi hostiteli. Nejjednodušší způsob, tj. přímý přenos, je značně omezen prostředím, ve kterém rejsci žijí. Přímý životní cyklus některých myxosporeí, který se podařilo vyvolat experimentálně pomocí předsporových stadií (Diamant 1997; Redondo a kol. 2002; Yasuda a kol. 2002), by v případě rejsek a terestrického prostředí probíhal obtížně a patrně by *Soricimyxum* nedosahovalo tak vysoké prevalence. Rejsci žijí velmi krátce, zpravidla se nedožívají druhé zimy (Anděra a Horáček 2005). Každoročně tedy dochází k téměř kompletnímu nahrazení populace rejsek další generací. Přesto je prevalence *S. fegati* u rejška obecného poměrně vysoká. To naznačuje, že způsob přenosu *S. fegati* musí být velmi efektivní, vázaný na potravu, kterou rejsci vyhledávají permanentně.

Při úvahách o životním cyklu *S. fegati* vycházíme z předpokladu, že u většiny druhů patřících k více než 60 rodům třídy Myxosporea existuje aktinosporeová fáze, která probíhá v máloštětinacích (Annelida: Oligochaeta), vzácněji v mnohoštětinacích (Annelida: Polychaeta) nebo sumýšovcích (Sipuncula). V našich podmínkách přicházejí v úvahu pouze máloštětinatci, nejpravděpodobněji půdní (Oligochaeta: Enchytraeidae, Lumbricidae). Efektivní způsob přenosu může velmi dobře zajišťovat životní cyklus zahrnující aktinosporeovou fázi v hostiteli, který je potravou rejskovitých. K předpokládané infekci by pak docházelo alimentární cestou.

Přenos *S. fegati* infikovanou potravou podporuje výrazná disproporce mezi prevalencemi zjištěnými u rejska obecného a rejska malého. Oba druhy žijí společně na stejných lokalitách (Churchfield a Rychlik 2006). Detailní výzkum jejich prostorové a časové segregace prokázal sice nevelké rozdíly mezi rejskem obecným a malým, ale potvrdil rozdílný způsob vyhledávání potravy (foraging behaviour) (Rychlik 2000; Rychlik 2005). Složení potravy rejsků se věnovala řada autorů (Rudge 1968; Pernetta 1976; Churchfield 1982; Churchfield a Rychlik 2006), někteří i na našem území (Bauerová 1984; Andreas 1994). Ve zmíněných studiích panuje shoda zejména ve výrazně vyšším zastoupení žížal v potravě rejska obecného. Rejssek obecný získává potravu často i pod zemí (Churchfield 1980) a tím se snadněji dostává k žížalám. Rejssek malý vyhledává potravu zejména na vegetaci a tomu odpovídá i složení jeho potravy (převážně hmyz, pavoukovci). Za kořistí se dokáže po vegetaci vyšplhat nejméně 3m vysoko (Aulagnier a kol. 2009). V potravě rejska malého se žížaly objevují jako dominantní složka během zimních měsíců, kdy je typická potrava rejska malého nedostupná (Pernetta 1976).

Vzhledem k tomu, že v pořadí druhým nejčastěji nalézaným parazitem v histologických řezech bylo *Calodium hepaticum* (tab. 6), zařadili jsme do spekulací o životním cyklu *S. fegati* i analogii životního cyklu tohoto nematoda. *C. hepaticum* je kospomopolitně rozšířený parazit hlodavců, popsán také u hmyzožravců (Volf a kol. 2007). K úspěšnému přenosu na dalšího hostitele musí být tkáň obsahující vajíčka pozřena jiným jedincem nebo úplně jiným druhem (kanibalismus, predace, nekrofágie) (Farhang-Azad 1977). Teprve pasáž zaživacím traktem umožní uvolňování vajíček do prostředí, kde se stávají infekčními pro další hostitele. Ti se mohou nakazit přímo jejich pozřením nebo pozřením paratenického hostitele, kterým bývají žížaly (Anderson 2000). Podobným způsobem by mohl být zajištěn také přenos *S. fegati*.

Zdrojem infekce by teoreticky mohly být i spory, které z jater rozkládajícího se uhynulého rejška pozřel jiný živočich. Při koprologickém vyšetřování naprosté většiny rejšků, které bylo zaměřeno na kokcidie, nebyly dosud nalezeny myxospory (Kvičerová, osobní sdělení). Tato skutečnost naznačovala, že spory nemusí být do prostředí vylučovány s trusem nakaženého jedince. Vzhledem k malému množství získaných spor jsme ale nemohli ověřit, zda je flotační metoda používaná pro průkaz oocyst kokcií použitelná i pro spory *S. fegati*.

Odhalená genetická variabilita mezi klony PCR produktu může mít dvě různé příčiny: a) může být způsobena opakovanými infekcemi různých geneticky odlišných "populací" *S. fegati*; nebo b) v rámci jednoho genomu *S. fegati* existuje variabilita v sekvencích SSU rRNA genu. Na nesrovnalosti mezi jednotlivými sekvencemi, pocházející z totožného hostitele (jedince) nás v dalších případech upozornily také nejednotné překryvy sekvencí, které jsme zjistili během jejich spojování. V těchto případech ale nevíme, jak vypadá variabilita mimo překrývající se úseky.

Rozhodnout o příčinách variability je v případě těchto nálezů problematické. Vzhledem k obtížné manipulaci s jednotlivými sporami (případně s jinými vývojovými stadii) je téměř nemožné vyhnout se riziku, že získané sekvence pocházejí z různých infekcí geneticky odlišných *S. fegati*. Porovnání dalších klonů PCR produktů z jiných hostitelů (jedinců) nám může napovědět, co způsobilo zmíněnou variabilitu.

Intragenomická variabilita je u myxozoi zmiňována zejména u ITS-1 genů. Whipps a kol. (2004) uvádějí 1,7 % variabilitu mezi klony z totožného vzorku DNA *Myxobolus cerebralis*. U *Tetracapsuloides bryosalmonae* zjistili Henderson a Okamura (2004) relativně nízkou, průměrně 0,26 %, intragenomickou variabilitu. S variabilitou SSU rDNA se setkal Fiala (2006) v případě sekvencí genů ze *Sphaeromyxa hellandi* a *Zschokkella nova* (rozdíly 0,2–0,4 %, respektive 0,35–0,95 % mezi jednotlivými klony). U *S. fegati* je zjištěná variabilita mezi klony výrazně vyšší (1,1–4,8 %) a to i ve srovnání s hodnotami u ITS-1 genů (Henderson a Okamura 2004, Whipps a kol. 2004).

Ačkoliv díky výše zmíněným problémům získané sekvence neumožňují spolehlivé vzájemné porovnávání, sekvence SSU rDNA z *S. fegati* 197 (*C. russula*, Španělsko) je nápadně

jiná a může zastupovat samostatnou linii (Obr. 42). Španělská lokalita je kromě značné vzdálenosti od českých lokalit také výjimečná v druhovém zastoupení rejskovitých. Ve východním Španělsku úplně chybí další 3 dnes již známí hostitelé *S. fegati* (*S. araneus*, *S. minutus*, *C. suaveolens*). Bělozubka tmavá (*C. russula*) se ve svém areálu (sever Afriky: Maroko - Tunisko a západní Evropa - Španělsko až sever Německa) setkává s ostatními hostiteli *S. fegati* až severně od Pyrenejí, s druhy *S. minutus* a *C. suaveolens* také na západním pobřeží Pyrenejského poloostrova (Aulagnier a kol. 2009).

Vzhledem k tomu, že se nám v předchozích letech podařilo získat velké množství materiálu, jedním z nejbližších plánů je využít tento materiál k ověření genetické variability *S. fegati*. K tomu bude potřeba získat další sekvence klonů PCR produktů a po jejich porovnání rozhodnout, zda je gen pro SSU rRNA vhodný k analýze vnitrodruhové resp. mezidruhové variability *S. fegati*. Další možností by bylo získat pro analýzu jiné geny, například LSU r DNA. S tím souvisí i ověření vztahu španělského nálezu z *C. russula* k ostatním. Zde bude důležité důkladnější srovnání a ověření, zda se skutečně jedná o samostatnou linii reprezentující případně samostatný druh rodu *Soricimyxum*. Pokud by se výjimečnost španělského nálezu potvrdila, vyplývala by z toho řada dalších otázek ve vztahu k hostiteli a jeho areálu a zejména nutnost získat a morfologicky charakterizovat spory.

Termín xenom se v současné době používá pro symbiotický vztah hostitelské buňky a mikrosporidie (Lom a Dyková 2005). Mikrosporidie vytváří společně s hostitelskou buňkou, v jejíž cytoplazmě prodělává celý svůj vývoj, morfologicky a fyziologicky pozměněný komplex (Lom a Nilsen 2003, Lom a Dyková 2005). Lom a Dyková (2005) shrnují nálezy podobných útvarů u ostatních protistů. U myxosporeí je jich známo několik. Myxosporeovými původci "xenomů" jsou například *Thelohanellus pyriformis* v línovi (*Tinca tinca*) (Dyková a Lom 1987), *Myxidium lieberkuehni* ve štice (*Esox lucius*) (Lom a kol. 1989). U krtka (*Talpa europaea*) byly "xenomy" nalezeny v mozku u předpokládaných myxosporeových infekcí (Friedrich a kol. 2000). Tvorba "xenomů" u myxosporeí představuje narozdíl od mikrosporidií a jejich xenomů pouze variantu části jejich složitého životního cyklu (Lom a Dyková 2005). Stejně je tomu i v případě nálezů "xenomů" u rejsků.

Autoři původního popisu *S. fegati* přítomnost „xenomů“ vůbec nezmiňují (Prunescu a kol. 2007) a ani nám se je nejprve nepodařilo odhalit (Dyková a kol. 2007). S přibývajícím počtem vyšetřených rejsek začal narůstat i počet nalezených "xenomů". Dodatečně byly "xenomy" nalezeny při revizi typového materiálu v histologických řezech z jater rejsek obecných pocházejících Bialowiežského pralesa.

Přezaliti histologicky zpracovaného materiálu, který obsahoval "xenomy" do pryskyřice a vyšetření ultratenkých řezů nepřineslo žádoucí výsledek. Kvalita zpracovaného materiálu nedovolila odhalit znaky, které by jednoznačně zařadily původce lézí k myxosporidiím. Etiologickou diagnózu "xenomů" u rejskovitých uzavřeme buď na základě zpracování čerstvého materiálu vhodného pro studium ultrastruktury nebo pomocí molekulárních metod po extrakci DNA z deparafinované tkáně nebo hybridizací *in situ*.

Neúspěchy při vyšetřování žížal pomocí PCR diagnostiky způsobilo pravděpodobně velké množství nejrůznějších inhibitorů amplifikace nukleových kyselin v izolované DNA z žížal. Postup, jakým byla DNA izolována (rozmělnění tkáně včetně obsahu zaživacího ústrojí), zvyšuje pravděpodobnost přítomnosti humidových kyselin v konečném produktu extrakce, které patří mezi známé inhibitory PCR (Steffan a kol. 1988; Tebbe a Vahjen 1993; Wilson 1997). Protože na extrakci DNA jsme použili komerční soupravu JETquick Tissue DNA Spin Kit (Genomed), předpokládáme, že ostatní v literatuře uváděné inhibitory - hem, hemoglobin (Akane a kol. 1994; Al-Soud a Rådström 2001) a kolagen (Kim a kol. 2000) byly během extrakce vyloučeny a dalšímu použití izolované DNA nijak nebránily. Tento názor podporuje i standardní využívání zmíněné soupravy v naší laboratoři na izolaci DNA ze vzorků, v nichž jsou tyto látky také přítomny ve velkém množství a k inhibicím přitom nedochází.

Při dalším vyšetřování žížal na přítomnost myxosporieí pomocí PCR detekce bude nutné postupovat tak, abychom co nejvíce omezili přítomnost humidových kyselin v extrahované DNA. Vyloučení zbytků zeminy ze střeva žížal během jejich kultivace na vlhkém filtračním papíře by mohlo být velmi účinné. Stejně jsme postupovali i při přípravě žížal pro histologická vyšetření. Během 4-5 dnů docházelo k úplnému vyloučení původního obsahu zaživacího ústrojí. To by znamenalo i vyloučení/značnou redukci humidových kyselin. Podobně jako Rangel a kol. (2009) bychom chtěli vyzkoušet i vyšetřování coelomové tekutiny. Výhodou jejich postupu je, že

coelomovou tekutinu odebíraly z živých polychaetů, takže bylo možné dodatečné histologické vyšetření. Pokud by se nedařila úspěšná kultivace většího množství žížal, bylo by možné postupovat tak jako doposud, tj. extrahovat DNA z rozmělněné tkáně, s použitím jiných postupů (Thakuria a kol. 2009).

I v případě, že by se zdařil molekulární průkaz aktinosporeového stadia, považujeme za nezbytné pokračovat v histologickém vyšetřování hypotetických hostitelů těchto stadií a ověřovat suspektní nálezy pomocí molekulárních metod. Kromě poznání základní morfologie aktinospory bychom histologickým vyšetřením zjistili, zda se aktinospory vyvíjejí v epitelu zaživacího traktu nebo v coelomu.

Infekční pokusy s *S. fegati* limitovalo množství spor, které se nám podařilo získat během vyšetřování rejskovitých. Vzhledem k tomu, že žlučové měchýře byly při vyšetřování rejskovitých prázdné, nebylo možné spory získávat stejně snadno jako spory *Z. nova*. V jediném případě, kdy jsme při prohlížení roztlakových preparátů pozorovali "velké" množství spor, jsme je uvolnili ze žlučovodu ve snaze zvýšit pravděpodobnost jejich požití roupicemi. Nevyhnuli jsme se tak ale dalším ztrátám a i tato příprava infekční dávky se podepsala na konečném množství spor použitých v experimentu.

Přes nezdary s kulturou *Enchytraeus crypticus* použitou v experimentálních infekcích, nezavrhneme další možné využití roupic jako náhradního hostitele. Kultivace *E. crypticus* by totiž v případě úspěšné nákazy sporami *S. fegati* poskytla skvělou příležitost pro studium aktinosporeové fáze. Roupice je možné pozorovat na agarových plotnách podobně jako kontrolujeme améby během jejich kultivace. Průhledné tělo roupic navíc umožňuje poměrně detailní prohlížení vnitřních orgánů a pravděpodobně by bylo možné tímto způsobem pozorovat i případné změny vyvolané *S. fegati*. Další infekční experimenty s roupicemi *Enchytraeus crypticus*, bude možné provádět pouze v případě získání většího množství spor. Pouhé požití spor *Z. nova* a možnost jejich pozorování v těle roupic by přispělo k dalšímu upřesnění metodiky pokusů se *S. fegati*. Stejně významné by bylo vyzkoušet, zda by roupice přijímaly jako potravu jaterní tkáň. To by výrazně zjednodušilo budoucí infekční experimenty s *S. fegati*.

V úvahách o existenci životního cyklu myxosporeí v terestrickém prostředí nelze opomenout nálezy "xenomů" v mozku krtků *Talpa europaea* L. (Friedrich a kol. 2000). Ačkoliv v "xenomech" nebyly nalezeny zralé spory, nález u 30 z 55 vyšetřených krtků je považován za velmi důležitý a to i vzhledem ke složení potravy krtků (Skoczeń 1966). Té do značné míry odpovídá i složení potravy rejska obecného.

Je škoda, že se nám nepodařilo získat větší počet rejsců (*Neomys*). Rod *Neomys* má mezi rejskovitými nejsilnější vazbu na vodní prostředí (Rychlik 2000). Ve vodě získává většinu potravy (Churchfield 1985; Rychlik a Jancewicz 2002). Pokud se vyskytují *N. fodiens*, *N. anomalus*, *S. araneus* a *S. minutus* na stejné lokalitě, odlišují se způsobem vyhledávání potravy (Rychlik 2000; Rychlik 2005; Churchfield a Rychlik 2006). *N. fodiens* získává potravu v hlubší vodě, *N. anomalus* na mělčinách a březích a *S. araneus* s *S. minutus* hledají potravu převážně mimo vodu, pod zemí (*S. araneus*) nebo na vegetaci (*S. minutus*) (Rychlik 2000; Churchfield a Rychlik 2006). Věříme, že případný nález *S. fegati* u rejsců by zásadním způsobem ovlivnil směr dalšího výzkumu životního cyklu *S. fegati*.

V komunitách sympatricky žijících rejsků bez ohledu na to, kterými druhy jsou tvořeny, je jejich vzájemná kompetice snižována odlišným způsobem vyhledávání potravy. V některých případech se i v geograficky vzdálených komunitách vyskytuje druh, který je podobně jako *S. araneus* potravně zaměřen na žížaly (Ochdachi 1995; Churchfield a kol. 1999; Dudu a kol. 2005).

7. Souhrn

V období od 2.8. 2007 do 23.10. 2009 byl získán soubor 246 jedinců čeledi rejskovitých (Soricidae), z toho vlastním odchytem 166 a 80 z jiných zdrojů;

Získaný materiál byl vyšetřen se zaměřením na myxosporeové infekce *Soricimyxum fegati* Prunecu, Prunescu, Pucek et Lom, 2007;

Infekce *S. fegati* byla diagnostikována celkem u 66 rejskovitých (*S. araneus* 51, *S. minutus* 14, *C. suaveolens* 1) z nichž druhy *S. minutus* a *C. suaveolens* představují nové hostitele u nichž byla infekce prokázána nálezem spor i tkáňových lézí;

C. rusula je prezentována jako další nový hostitel, na základě sekvence SSU rDNA získané po extrakci DNA z jaterního parenchymu;

Popis změn působených *S. fegati* v jaterním parenchymu rejskovitých byl doplněn popisem cévních změn, které připomínají xenomy mikrosporidií;

Bylo získáno 62 vzorků DNA *S. fegati* ze 4 druhů hostitelů původem z 13 lokalit;

Bylo připraveno celkem 23 částečných sekvencí SSU rDNA, z nichž 3 reprezentují 3 různé klony získané z téhož výchozího vzorku DNA *S. fegati*;

Srovnání sekvencí 3 klonů z téhož vzorku DNA *S. fegati* upozornilo na překvapivě velkou sekvenční variabilitu genu použitého pro molekulární charakteristiku *S. fegati*;

Analýza získaných sekvencí provedená metodou Neighbor-joining seskupila 22 sekvencí SSU rDNA do klastrů, v nichž nebylo možné najít společného jmenovatele pokud jde o hostitele nebo lokalitu. Jedním z důvodů jsou nejasnosti ohledně vnitrodruhové variability. Samostatnou větev vytvořila sekvence DNA získaná z jater *C. russula*;

Z hypotetických hostitelů aktinosporeové fáze životního cyklu *S. fegati* bylo vyšetřeno celkem 1164 žížal (69 histologicky, 1095 molekulární metodou). Pouze u dvou jedinců jsme při histologickém vyšetření našli aktinosporám podobné útvary.

8. Literatura

Aitchison CW (1987) Winter energy requirements of soricine shrews. *Mammal Review* 17:25–38

Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K (1994) Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *Journal of Forensic Sciences* 39:362–372

Al-Soud WA, Rådström P (2001) Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *Journal of Clinical Microbiology* 38:485–493

Anderson RC (2000) *Nematode parasites of Vertebrates. Their development and transmission*, 2nd edit., CABI Publishing, Wallingford, United Kingdom

Anděra M (2000) *Atlas rozšíření savců v České republice – Předběžná verze III. Hmyzožravci (Insectivora)*. Národní Muzeum, Praha

Anděra M, Horáček I (2005) *Poznáváme naše savce*. 2. vydání. Sobotáles, Praha

Andreas M (1994) *Potrava rejsků *Sorex minutus* a *Sorex araneus**. - Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta UK, Praha

Aulagnier S, Haffner P, Mitchell-Jones AJ, Moutou F, Zima J (2009) *Mammals of Europe, North Africa and the Middle East*. A&C Black Publishers Ltd., London

Barta JR, Martin DS, Liberator PA, Dashkevicz M, Anderson JW, Feighner SD, Elbrecht A, Perkins-Barrow A, Jenkins MC, Danforth HD, Ruff MD, Profous-Juchelka H (1997) Phylogenetic relationships among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *Journal of Parasitology* 83:262–271

Bartholomew JL, Atkinson SD, Hallett SL, Lowestine LJ, Garner MM, Gardiner CH, Rideout BA, Keel MK, Brown JD (2008) Myxozoan parasitism in waterfowl. *International Journal for Parasitology* 38:1199–1207

Bauerová Z (1984) The food eaten by *Sorex araneus* and *Sorex minutus* in a spruce monoculture. *Folia Zoologica* 33:125–132

Boreham RE, Hendrick S, O'Donoghue PJ, Stenzel DJ (1998) Incidental finding of *Myxobolus* spores (Protozoa, Myxozoa) in stool samples from patients with gastrointestinal symptoms. *Journal of Clinical Microbiology* 36:3728–3730

Diamant A (1997) Fish-to-fish transmission of a marine myxosporean. *Diseases of Aquatic Organisms* 30:99–105

Diamant A, Whipps CM, Kent ML (2004) A new species of *Sphaeromyxa* (Myxosporia: Sphaeromyxina: Sphaeromyxidae) in devil firefish, *Pterois miles* (Scorpaenidae), from the northern Red Sea: morphology, ultrastructure, and phylogeny. *Journal of Parasitology* 90:1432–1442

Dickman CR (1988) Body size, prey size, and community structure in insectivorous mammals. *Ecology* 69:569–580

Dyková I, Lom J (1987) Host cell hypertrophy induced by contact with trophozoites of *Thelohanellus pyriformis* (Myxozoa: Myxosporia). *Archiv für Protistenkunde* 133:285–293

Dyková I, Lom J (2007) Histopathology of protistan and myxozoan infections in fish. An atlas. Academia, Praha

Dyková I, Tyml T, Fiala I, Lom J (2007) New data on *Soricimyxum fegati* (Myxozoa) including analysis of its phylogenetic position inferred from the SSU rRNA gene sequence. *Folia Parasitologica* 54:272–276

Dudu A, Churchfield S, Hutterer R (2005) Community structure and food niche relationships of coexisting rain-forest shrews in the Masako Forest, northeastern Congo. V: Advances in the Biology of Shrews II (eds. Merritt JF, Churchfield S, Hutterer R, Sheftel R). Special Publication of the International Society of Shrew Biologists No. 1, New York

Eiras JC (2005) An overview on the myxosporean parasites in amphibians and reptiles. *Acta Parasitologica* 50:267–275

El-Matbouli M, Hoffmann R (1989) Experimental transmission of two *Myxobolus* spp. developing bisporogeny via tubificid worms. *Parasitology Research* 75:461–464

Farhang-Azad A (1977) Ecology of *Capillaria hepatica* (Bancroft 1983) (Nematoda). II. Egg-releasing mechanisms and transmission. *Journal of Parasitology* 63:701–706

Fiala I (2006) The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. *International Journal for Parasitology* 36:1521–1534

Friedrich C, Ingolic E, Freitag B, Kastberger G, Hohnmann V, Skofitsch G, Neumaister U, Kepka O (2000) A myxozoan-like parasite causing xenomas in the brain of the mole *Talpa europaea* L., 1758. *Parasitology* 121:483–492

Forsman KA, Malmquist MG (1988) Evidence for echolocation in the common shrew, *Sorex araneus*. *Journal of Zoology* 216:655–662

Gębczyński M (1965) Seasonal and age changes in the metabolism and activity of *Sorex araneus* Linnaeus 1758. *Acta Theriologica* 22:303–331

Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98

Hausmann K, Hülsmann N (2003) Systém prvoků. In: Hausmann K, Hülsmann N (eds) *Protozoologie*. Academia, Praha

Henderson M, Okamura B (2004) The phylogeography of salmonid proliferative kidney disease in Europe and North America. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 271:1729–1736

Churchfield S (1980) Subterranean foraging and burrowing activity of the common shrew. *Acta Theriologica* 25:451–459

Churchfield S (1982) The influence of temperature on the activity and food consumption of the common shrew. *Acta Theriologica* 27:295–304

Churchfield S (1985) The feeding ecology of the European Water shrew. *Mammal Review* 15:13–21

Churchfield S, Nesterenko VA, Shvarts EA (1999) Food niche overlap and ecological separation amongst six species of coexisting forest shrews (Insectivora: Soricidae) in the Russian Far East. *Journal of Zoology* 248:349–359

Churchfield S, Rychlik L (2006) Diets and coexistence in *Neomys* and *Sorex* shrews in Białowieża forest, eastern Poland. *Journal of Zoology* 269:381–390

Chytrý M, Kučera T, Kočí M [eds.] (2001) Katalog biotopů České republiky. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha

Kent ML, Andree KB, Bartholomew JL, El-Matbouli M, Desser SS, Devlin RH, Feist SW, Hedrick RP, Hoffmann RW, Khattra J, Hallett SL, Lester RJG, Longshaw M, Palenzuela O, Siddal ME, Xiao C (2001) Recent Advances in Our Knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 48:395–413

Kim S, Labbe RG, Ryu S (2000) Inhibitory effects of collagen on the PCR for detection of *Clostridium perfringens*. *Applied and Environmental Microbiology* 66:1213–1215

Køie M., Karlsbakk E., Nylund A. 2007: A new genus *Gadimyxa* with three new species (Myxozoa, Parvicapsulidae) parasitic in marine fish (Gadidae) and the two-host life cycle of *Gadimyxa atlantica* n. sp. *Journal of Parasitology* 93:1459–1467

Křišťůfek V (2000) Potravně preferenční a reprodukční testy s *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). V: Křišťůfek V, Elhottová D, Frouz J, Šustr V (eds.) Sborník 7. metodického semináře: Interakce půdních mikroorganismů, bezobratlých a kořenů rostlin. ÚPB AV ČR, České Budějovice

Křišťůfek V, Fischer S, Bührmann J, Zeltins A, Schrempf H (1999) In situ monitoring of chitin degradation by *Streptomyces lividans* pCHIO12 within *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta) feeding on *Aspergillus proliferans*. *FEMS Microbiology Ecology* 28:41–48

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948

Lom J, Dyková I (2005) Microsporidian xenomas in fish seen in wider perspective. *Folia Parasitologica* 52:69–81

Lom J, Dyková I (2006) Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica* 53:1–36

Lom J, Dyková I, Feist S (1989) Myxosporea-induced xenoma formation in pike (*Esox lucius* L.) renal corpuscles associated with *Myxidium lieberkuehni* Infection. *European Journal of Protistology* 24:271–280

Lom J, Nilsen F (2003) Fish microsporidia: fine structural diversity and phylogeny. *International Journal for Parasitology* 33:107–127

McClelland RS, Murphy MD, Cone DK (1997) Report of spores of *Henneguya salminicola* (Myxozoa) in human stool specimens: possible source of confusion with human spermatozoa. *Journal of Clinical Microbiology* 35:2815–2818

Molnár K (1994) Comments on the host, organ and tissue specificity of fish myxosporeans and on the types of their intrapiscine development. *Parasitologica Hungarica* 27:5–20

Moncada LJ, Lopez MC, Murcia ML, Nicholls, Frecia L, Guio OL, Corredor A (2001) *Myxobolus* sp., another opportunistic parasite in immunosuppressed patients. *Journal of Clinical Microbiology* 39:1938–1940

Nowak RM (1999) Walker's mammals of the world. - 6th ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore

Ochdachi S (1995) Burrowing habits and earthworm preferences of three species of *Sorex* in Hokkaido. *Journal of the Mammalogical Society of Japan* 20:85–88

Pernetta JC (1976) Diets of the shrews *Sorex araneus* L. and *Sorex minutus* L. in Wytham grassland. *Journal of Animal Ecology* 45:899–912

Pižl V (2002) Žížaly České republiky. Sborník přírodovědného klubu v Uherském Hradišti, Supplementum 9, Agentura NP, Uherské Hradiště

Plesník J, Hanzal V, Brejšková L [eds.] (2003) Červený seznam ohrožených druhů České republiky. Obratlovci - Příroda 22, Agentura ochrany přírody a krajiny ČR, Praha

Prokopič J (1956) Helmintofauna rejska obecného (*Sorex araneus* L.) v ČSR. *Československá parazitologie* 3:109–131

Prunescu CC, Prunescu P, Pucek Z, Lom J (2007) The first finding of myxosporean development from plasmodia to spores in terrestrial mammals: *Soricimyxum feigati* gen. et sp. n. (Myxozoa) from *Sorex araneus* (Soricimorpha). *Folia Parasitologica* 54:159–164

- Pucek M (1959) The effect of the venom of the European water shrew (*Neomys fodiens fodiens* Pennant) on certain experimental animals. *Acta Theriologica* 3:93–104
- Rangel LF, Santos MJ, Cech G, Székely Cs (2009) Morphology, molecular data, and development of *Zschokkella mugilis* (Myxosporidia, Bivalvulida) in a polychaete alternate host, *Nereis diversicolor*. *Journal of Parasitology* 95:561–569
- Redondo MJ, Palenzuela O, Rianza A, Macías Á, Álvarez-Pellitero P (2002) Experimental transmission of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *Journal of Parasitology* 88:482–488
- Rudge MR (1968) The food of the common shrew *Sorex araneus* L. (Insectivora: Soricidae) in Britain. *Journal of Animal Ecology* 37:565–581
- Rychlik L (2000) Habitat preferences of four sympatric species of shrews. *Acta Theriologica* 45:173–190
- Rychlik L (2005) Overlap of temporal niches among four sympatric species of shrews. *Acta Theriologica* 50:175–188
- Ryhlík L, Jancewicz E (2002) Prey size, prey nutrition, and food handling by shrews of different body sizes. *Behavioral Ecology* 13:216–223
- Skoczeń S (1966) Stomach contents of the mole *Talpa europaea* Linnaeus, 1758 from southern Poland. *Acta Theriologica* 11:551–575
- Steffan RJ, Goksøyr J, Bej AK, Atlas RM (1988) Recovery of DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 54:2908–2915
- Swofford DL (2003) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA

Thakuria D, Schmidt O, Liliensiek A-K, Egan D, Doohan FM (2009) Field preservation and DNA extraction methods for intestinal microbial diversity analysis in earthworms. *Journal of Microbiological Methods* 76:226–233

Tebbe CC, Vahjen W (1993) Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and yeast. *Applied and Environmental Microbiology* 59:2657–2665

Volf P, Horák P a kol. (2007) *Paraziti a jejich biologie*. Triton, Praha/Kroměříž

Wilson IG (1997) Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63:3741–3751

Whipps CM, El-Matbouli M, Hedrick RP, Blazer V, Kent ML (2004) *Myxobolus cerebralis* internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences support recent spread of the parasite to North America and within Europe. *Diseases of Aquatic Organisms* 60:105–108

Wolf K, Markiw EM (1984) Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science* 225:1449–1452

Yasuda H, Ooyama T, Iwata K, Tun T, Yokoyama H, Ogawa K (2002) Fish-to-fish transmission of *Myxidium* spp. (Myxozoa) in cultured tiger puffer suffering from emaciation disease. *Fish Pathology* 37:29–33

Yokoyama H, Kim J-H, Urawa S (2006) Differences in host selection of actinospores of two myxosporeans, *Myxobolus arcticus* and *Thelohanellus hovorkai*. *Journal of Parasitology* 92:725–729

Zima J jr. (2008) *Populačně-genetické parametry rejska obecného a rejska malého v kontextu přírodních a antropogenních bariér*. – Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta JČU, České Budějovice