



# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

## *ENCEPHALITOOZON* SPP. U VOLNĚ ŽIJÍCÍCH DROBNÝCH SAVCŮ – IDENTIFIKACE POMOCÍ NESTED PCR A GENOTYPIZACE

AUTOR            Lenka Brlicová  
ŠKOLA            Gymnázium Brno, Terezy Novákové 2  
KRAJ             Jihomoravský  
OBOR             7. Zemědělství, potravinářství, lesní  
                      a vodní hospodářství

Brno 2018



# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

*ENCEPHALITOOZON* SPP. U VOLNĚ ŽIJÍCÍCH  
DROBNÝCH SAVCŮ – IDENTIFIKACE POMOCÍ  
NESTED PCR A GENOTYPIZACE

*ENCEPHALITOOZON* SPP. IN WILD SMALL MAMMALS  
– IDENTIFICATION WITH NESTED PCR AND GENOTY-  
PING

AUTOR            Lenka Brlicová  
ŠKOLA            Gymnázium Brno, Terezy Novákové 2  
KRAJ             Jihomoravský  
ŠKOLITEL        Doc. MVDr. Eva Bártová, Ph.D.  
                      Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat  
                      Fakulta veterinární hygieny a ekologie  
                      Veterinární a farmaceutická univerzita Brno  
OBOR             7. Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní  
                      hospodářství

Brno 2018

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svou práci na téma *Encephalitozoon* spp. u volně žijících drobných savců jsem vypracovala samostatně pod vedením Doc. MVDr. Eva Bártové, Ph.D. a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou věcně citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Dále prohlašuji, že tištěná i elektronická verze práce SO jsou shodné a nemám závažný důvod proti zveřejnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a změnami některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne 12. 2. 2018

Podpis:



VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat



GYMNÁZIUM BRNO-ŘEČKOVICE

Terezy Novákové 2, Brno-Řečkovice



### **Poděkování**

Děkuji své školitelce doc. MVDr. Evě Bártové, Ph.D. za obětavou pomoc, podnětné připomínky a nekonečnou trpělivost, kterou mi během práce poskytovala. Dále děkuji doc. RNDr. Aleně Žákovské, Ph.D. za vedení při odchytu zvířat, MVDr. Jiřině Markové za pomoc při laboratorních vyšetřeních a Mgr. Lence Bučkové za podnětné rady a připomínky.

## Anotace

Zástupci rodu *Encephalitozoon* jsou obligátní intracelulární parazité z kmene Microsporidia napadící široké spektrum živočichů, včetně člověka. V rámci své dřívější práce (Brlicová, 2017) jsem se zabývala detekcí *E. cuniculi* u volně žijících drobných savců. Parazit *E. cuniculi* byl detekován pomocí single PCR u 1 % vyšetřených vzorků. V rámci této předkládané práce jsem vyšetřila stejné vzorky, ale pomocí metody nested PCR, což je modifikace single PCR, která zvyšuje její senzitivitu a specificitu. Parazit *Encephalitozoon* spp. byl pomocí citlivější metody detekován u 10 % vzorků (n = 10). Primery použité v nested PCR však umožňují detekci více mikrosporidiálních parazitů, které se odlišují na základě rozdílné velikosti výsledného produktu. Pro rozlišení jednotlivých druhů rodu *Encephalitozoon* je nutné provést genotypizaci. Všechny deset pozitivních vzorků bylo zasláno na genotypizaci. Podařilo se genotypizovat tři z nich, které byly určeny jako *E. cuniculi* II. větve. I přes to, že se nepodařilo genotypizovat všechny vzorky, má práce dokazuje, že metoda nested PCR je oproti single PCR citlivější a pro vyšetření tkání na přítomnost parazitů *Encephalitozoon* spp. vhodnější.

**Klíčová slova:** Microsporidia, nested PCR, hlodavci, hmyzožravci, encefalitozoonóza

## Annotation

Members of a genus *Encephalitozoon* are obligate intracellular parasites of the phylum Microsporidia, which affects wide spectrum of animals including human. I have already focused on the topic of the presence of *Encephalitozoon cuniculi* in wild small mammals. Using single PCR, the parasite was detected in 1 % of the examined tissues. In this study, I examined the same samples, but using nested PCR method. Nested PCR is a modification of the single PCR that increases the sensitivity and specificity of the reaction. Parasite *Encephalitozoon* spp. was detected in 10 % of the tissues (n=10) using this more sensitive method. However, primers used for the nested PCR allows detection of more microsporidial parasites. The differentiation of the parasites is based on the different length of the product. However, the distinction of the species of the genus *Encephalitozoon* is only possible when genotyping is performed. All positive samples were sent for genotyping, however genotyping was successful in only three samples. Those samples were identified as *E. cuniculi*, concretely II. strain of parasite. Although the other samples were not genotyped, this study confirms, that nested PCR is more sensitive than single PCR and preferable for detection of *Encephalitozoon* spp. in animal tissues.

**Keywords:** Microsporidia, nested PCR, rodents, insectivorous, encephalitozoonosis

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD.....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>CÍLE.....</b>	<b>8</b>
<b>3</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED.....</b>	<b>9</b>
3.1	TAXONOMICKÉ ZAŘAZENÍ .....	9
3.2	SPORY .....	10
3.3	ŽIVOTNÍ CYKLUS .....	11
3.4	ENCEFALITOOZONÓZA U ZVÍŘAT .....	12
3.5	ENCEFALITOOZONÓZA U LIDÍ .....	15
3.6	DIAGNOSTIKA .....	16
3.7	LÉČBA .....	18
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>19</b>
4.1	ODCHYTY VOLNĚ ŽIJÍCÍCH SAVCŮ .....	19
4.2	PITVA A ODBĚR VZORKŮ .....	26
4.3	IZOLACE DNA .....	26
4.4	SINGLE PCR .....	28
4.5	NESTED PCR .....	28
4.6	GELOVÁ ELEKTROFORÉZA .....	29
4.7	GENOTYPIZACE.....	30
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>33</b>
6.1	PARAZIT <i>ENCEPHALITOOZON</i> SPP. U VOLNĚ ŽIJÍCÍCH DROBNÝCH SAVCŮ .....	33
6.2	SROVNÁNÍ METOD SINGLE A NESTED PCR .....	35
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>37</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>38</b>

# 1 Úvod

*Encephalitozoon* spp. je parazitický organizmus, který napadá široké spektrum živočichů, včetně člověka. K diagnóze těchto parazitů ze tkání se běžně používá PCR metoda, pomocí které byly vyšetřeny i vzorky tkání volně žijících hlodavců a hmyzožravců v rámci mé dřívější práce „*Encephalitozoon cuniculi* u volně žijících drobných savců“ (Břilicová, 2017). Metoda PCR má několik modifikací. Jednou z nich je i nested PCR, která spočívá v provedení dvou na sebe navazujících PCR reakcí. Nested PCR má zvyšovat senzitivitu a specificitu single PCR reakce. V rámci této práce jsem se proto zaměřila na vyšetření stejných vzorků jako v předchozí práci, ale s využitím nested PCR a genotypizace a s možností porovnání citlivosti obou metod.



## 2 Cíle

Pro svoji práci jsem si stanovila následující cíle:

- Vyšetřit odchycené drobné savce na přítomnost parazita *Encephalitozoon* spp. metodou nested PCR a genotypizace
- Porovnat citlivost nested PCR použitou v této práci s citlivostí single PCR použitou v dřívejší práci (Brlicová, 2017).

# 3 Literární přehled

## 3.1 Taxonomické zařazení

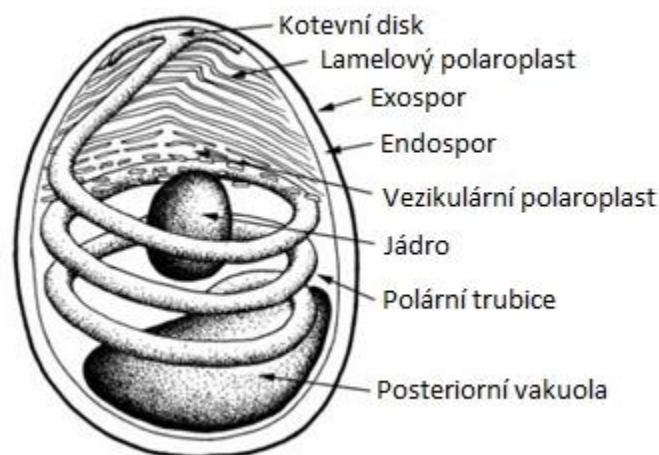
Mikrosporidie se řadí do domény eukaryotických živočichů. Dříve byl kmen Microsporidia řazen mezi prvoky, ovšem na základě přítomnosti chitinu v obalu spory byl následně řazen do říše hub (Fungi; Garcia, 2002). Rod *Encephalitozoon* byl poprvé detekován v roce 1922, do rodu *Encephalitozoon* se řadí tyto druhy *Encephalitozoon cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* a *E. romaleae*. *E. cuniculi* byl poprvé popsán u králíka postiženého paralýzou, jednalo se zároveň o první doloženou nákazu savcem zástupcem kmene Microsporidia (Wright a Craighead, 1922). Vzhledem k morfologicky nerozlišitelné stavbě bylo definování dalších druhů možná až molekulární analýzou (Hinney et al., 2016). V roce 1991 byl poprvé izolován druh *E. hellem*, a to u tří HIV pozitivních pacientů (Didier et al., 1991). *E. intestinalis* byl popsán v roce 1993 také při izolaci u HIV pozitivních pacientů, ovšem poprvé pod názvem *Septata intestinalis* (Cali et al., 1993). Ke přejmenování došlo až dva roky později, v roce 1995 na základě genetické sekvence, která byla z více než 90 % identická se sekvencí dalšího druhu rodu *Encephalitozoon* (Hartskeerl et al., 1995). Poslední dosud známým druhem je *E. romaleae*, který se od ostatních druhů odlišuje v této sporou. Byl popsán v roce 2009 u zástupce řádu rovnokřídlých *Romalea microptera* (Lange et al., 2009).

Rod *Encephalitozoon* je charakteristický extrémně krátkým genomem. Nejkratší dosud známý eukaryotický genom má *E. intestinalis*, a to 2,3 Mbp (milion pár bází; Corradi et al., 2010). Genom druhů *E. hellem* a *E. romaleae* je tvořen 2,5 Mbp, a v případě *E. cuniculi* se jedná o 2,9 Mbp (Katinka et al., 2001; Pombert et al., 2012). Jde o minimum genetické informace, se kterou je parazitická eukaryotická buňka schopna přežít. Tento genom postrádá metabolické dráhy, které byly dříve považovány za nezbytné pro životaschopnost eukaryotické buňky. Naproti tomu genom obsahuje geny dekodující transportéry, které získávají energii a metabolity z hostitelské buňky (Tsaousis et al., 2008). Na základě nálezů genu zvířecího původu v genomech *E. hellem* a *E. romaleae* je však dokonce možné, že parazit dokáže z hostitelské buňky získat i určitou část genetické výbavy (Selman et al., 2011). Parazité vykazují genetickou diverzitu i v rámci rodu. V případě *E. cuniculi* jsou dosud známy celkem 4 kmene, které se odlišují podle opakování sekvence 5'-GTTT-3' (Didier et al., 2000; Keeble, 2011; Nell et al., 2014). U *E. hellem* bylo dosud popsáno 2 kmene, které se dále dělí na další tři kmene (A-C), které odlišuje lokus ITS sekvence genu proteinu polární trubice, SSU

rRNA a (Mathis et al., 1999; Xiao et al., 2001). Na rozdíl od kmeny *E. intestinalis* byla zaměřena jen jedna studie, která analyzovala celkem 9 rozdílných kmenů (Galván et al., 2013).

## 3.2 Spory

*Encephalitozoon spp.* jsou parazité vyskytující se ve formě jednobuněčných monojaderných bezbičíkatých spor (Obr. 1) oválného tvaru (Hinney et al., 2016). Velikost spor se liší v závislosti na druhu. Nejmenší zralé spory má *E. hellem* (1 x 1,5-2 μm), o něco větší jsou spory *E. cuniculi* (1,5 x 2,5 μm) a *E. intestinalis* (1,3-2 x 2,5-3 μm; Didier et al., 1991; Molina et al., 1995; Jordan et al., 2006). Největší spory má ovšem *E. romalea*, a to 2 x 4 μm (Lange et al., 2009). Typickým rysem mikrosporidiální spory je absence některých organel typických pro eukaryotické buňky, konkrétně se jedná o mitochondrii, centrioly a peroxizom. Golgiho aparát je atypický a velmi primitivní. Spora z hlediska chybějících organel a obdobné stavby ribozomů velmi podobá buňkám prokaryotickým (Bigliardi et al., 2001). Funkci mitochondrií pravděpodobně zastává organela mitozom, z čehož pozůstatek mitochondrie, se kterou má společnou dvojitou membránu a které velmi podobné proteiny (Bakatselou et al., 2003). Tato organela hraje roli v biosyntéze Fe-S klastru, postrádá ovšem proteiny umožňující buněčné dýchání a biosyntézu hemu (Goldberg et al., 2008).



Obrázek 1: Spora *E. cuniculi* (Keeling, 2002; upraveno autorkou)

Zásadní význam pro parazitické spory hrají invazivní organely. Jejich přítomnost podmiňuje schopnost infekce hostitelské buňky, uvnitř které může parazit podstoupit dělení. Invazivní organely umožňují transport sporoplazmy do hostitelské buňky. Samotnou funkci přenosu zajišťuje polární trubice tvořená membránou a glykoproteinovými vrstvami. V klidném stavu dosahuje délky 50 μm a průměru 0,1 až 0,2 μm. Při své aktivaci je ovšem schopná mnohonásobného zvětšení (Keeling a Fast, 2002). Ke spore je uchycena pomocí kotveního disku v anteriorní části spory, následně se vine téměř skrz celou sporu. K úspěšné infekci buňky jsou potřebné i další invazivní organely, které umožňují funkci polární trubice. Jednou z nich je posteriorní vakuola, organela oválného tvaru s membránou, která zabírá ¼ až celé spory. Polární trubice se sice vakuoly dotýká, ta je ovšem od trubice oddělena vlastní membránou (Weidner, 1972). Význam posteriorní vakuoly spoívá v její schopnosti absorpce vody, čímž organela zvětší svůj objem. Vzniká tak tlak potřebný pro vypuzení trubice ven ze spory (Lom, 1972). Obdobnou funkci plní také na sebe vzájemně navazující lamelový a vezikulární polaroplast v anteriorní části spory (Keeling a Fast, 2002).

Obal spory je tvořen trojitou vrstvou, která se skládá z vnitřní plazmatické membrány, endosporu a vnějšího exosporu. Endospor je tvořen elektron-lucentní strukturou obsahující alfa-chitin a bílkovinnou složku (Vávra a Larsson, 1999). Spory jsou jediná životaschopná forma mikrosporidií. Obal spory musí být schopný odolat nejen vnějším podmínkám po dobu mimo hostitele, ale také imunitní reakci hostitele na infekci. Za příznivých podmínek, tedy při průměrných teplotách a v suchém prostředí, jsou spory schopné přežít až 4 týdny mimo hostitele. Nejdelší dobu dokážou spory přežít při teplotě 4 °C a 100% vlhkosti, a to až 98 dnů (Waller, 1979).

### 3.3 Životní cyklus

*Encephalitozoon* spp. jsou obligátní intracelulární parazité. Mohou se tedy rozmnožovat pouze uvnitř hostitelské buňky, navíc musí být spora přítomna v cytoplazmě hostitelské buňky. Samotný hostitelský cyklus je pro všechny druhy rodu *Encephalitozoon* obdobný, liší se hostitelskou specificitou a cílovými orgány.

K infekci zdravého zvířete dochází při požití spory, například z potravy nebo vody kontaminované sporami nebo požitím nakafleňného masa, možná je také vdechnutí spory (Rinder et al., 2004; Didier et al., 2004; Didier a Weiss, 2006; Graczyk et al., 2007). Ke kontaminaci

prostředí dochází při vylučování spor močí, výkaly nebo sputem infikovaných jedinců (Li et al., 2003; Sinski, 2003). Je možný také přenos infekce transplacentárně z matky na plod (Cox et al., 1979; Baneux a Pognan, 2003). U ptáka byl popsán transovariální přenos (Reetz, 1994). Poté, co se spora dostane do těla hostitele, putuje krví k cílovým orgánům, které se liší v rámci jednotlivých druhů. V případě *E. hellem* a *E. intestinalis* jsou typickým místem infekce zejména orgány gastro-intestinálního traktu (Soule et al., 1997; Bornay-Llinares et al., 1998). Naproti tomu *E. cuniculi* napadá zejména buňky ledvin a centrálního nervového systému (Harcourt-Brown, 2004). Spory se ovšem mohou vyskytovat i v dalších tkáních. Následně dochází k zahájení invazivní fáze. Spora se aktivuje, dochází k vypuzení polární trubice ven ze spory, skrze kterou je do hostitelské buňky přepravena sporoplazma spory. Uvnitř hostitelské buňky se vytváří parazitoforní vakuola, která je tvořena vrstvami endoplazmatického retikula a odděluje parazita od plazmy hostitelské buňky (Franzen et al., 2004; Rönnebaumer et al., 2008). Právě uvnitř této organely dochází k vegetativní fázi slouflicí k namnožení parazita. Dělení probíhá procesem merogonie (typ nepohlavního rozmnožování). Nejdříve dochází k rozdělení sporoplazmy, čímž vznikají meronty. Z merontů se poté, co projdou opakovaným binárním dělením, stávají sporonty, které se buď hned, nebo po jednom dělení vyvíjejí ve sporoblasty. V této fázi se v nově vzniklých sporách vyvíjejí potěbné organely. Poté dochází k plazmoptýze hostitelské buňky a nové spory se uvolní do tkáňového moku. Spory následně napadají nové hostitelské buňky a celý proces se opakuje (Jordan et al., 2006; Keeble, 2011).

### 3.4 Encefalitozoonóza u zvířat

Typickým hostitelem *E. cuniculi* je králík domácí. Jedná se o jediný druh, u kterého tento parazit způsobuje klinické příznaky, a to především u jedinců s oslabenou imunitou vlivem stáří nebo přidružené infekce (Keeble, 2011). Vlivem poškození mozkové tkáně dochází ke vzniku vestibulárního syndromu, který se projevuje nakloněním hlavy (Harcourt-Brown, 2004). Infekce mozku často bývá spojena také s poruchou motoriky, ztrátou rovnováhy nebo ataxií, tedy poruchou hybnosti, v nejzávažnějších případech může dojít i k ochrnutí nebo úhynu jedince (Jordan et al., 2006; Keeble, 2011). Typický je také vznik propadlin na povrchu ledvin v důsledku zánětu způsobeného parazitem (Harcourt-Brown, 2004). V případě infekce parazity *E. hellem* a *E. intestinalis* se může vyskytnout diarreha (Raynaud et al., 1998).

V České republice byla u králíků zjištěna metodou ELISA prevalence 36 % (Neumayrová et al., 2014). Kromě králíků napadá *E. cuniculi* také další domácí zvířata. V České republice však byli kromě králíků na přítomnost parazita sledováni pouze koně. Parazit byl metodou PCR detekován ve stolici 6,9 % koní (Wágnerová et al., 2012). *E. cuniculi* ovšem může infikovat také ptáky. V rámci studie, která se zabývala exotickými ptáky chovanými v České republice, bylo metodou PCR zaznamenáno 17,4 % pozitivních vzorků stolice (Kašáková et al., 2009). I přes to, že hlavním hostitelem *E. intestinalis* je člověk, byl tento parazit detekován i u některých domácích zvířat včetně psa, kočky, krávy, prasete a dalších zvířat (Bornay-Llinares et al., 1998; Maláková et al., 2010; Velásquez et al., 2012). Žádná studie ovšem nebyla zaměřena na výskyt parazita u domácích zvířat v České republice. Parazit *E. hellem* je typický zejména pro ptáky. V České republice byl při vyšetření vzorků stolice exotických ptáků metodou PCR parazit zaznamenán u 10,1 % jedinců (Kašáková et al., 2009).

### **Volně žijící zvířata**

U volně flujících zvířat je, stejně jako u domácích, nejčastěji zaznamenán parazit *E. cuniculi* (Tab 1). *E. intestinalis* a *E. hellem* byly zaznamenány také u zajíce polního (*Lepus europaeus*; De Bosschere et al., 2007), u volně flujících hlodavců byly tyto parazity zaznamenány jen v rámci studií uvedených v Tab. 1.

Tab 1: Výskyt parazit *Encephalitozoon* spp. u volně žijících savců a ptáků

Čeleď/třída	Země	Rod parazita	Metoda	Prevalence	Zdroj
hlodavci	Japonsko	<i>E. cuniculi</i>	PCR/seq	10,5 %	Tsukada et al., 2013
		<i>E. intestinalis</i>	PCR/seq	3,1 %	
		<i>E. hellem</i>	PCR/seq	10,5 %	
	Rakousko	<i>E. cuniculi</i>	PCR	6,5 %	Fuehrer et al., 2010
	Velká Británie	<i>E. cuniculi</i>	DAT	5,3 %	Meredith et al., 2015
	Švýcarsko	<i>E. cuniculi</i>	IFAT, WB	13%	Müller-Doblies et al., 2002
	ČR/Německo	<i>E. cuniculi</i>	PCR	8,7 %	Sak et al., 2011a
		<i>E. hellem</i>	PCR	8%	
Slovensko	<i>E. cuniculi</i>	PCR	0,4 %	Danišová et al., 2015	
	<i>E. intestinalis</i>	PCR	0,4 %		
hmyzožravci	Japonsko	<i>E. cuniculi</i>	PCR/seq	16,7 %	Tsukada et al., 2013
		<i>E. intestinalis</i>	PCR/seq	5,6 %	
		<i>E. hellem</i>	PCR/seq	5,6 %	
zajícovití	Itálie	<i>E. cuniculi</i>	PCR	9,7 %	Zanet et al., 2013
	ČR	<i>E. cuniculi</i>	IFAT	2,9 %	Bártová et al., 2015
	Rakousko	<i>E. cuniculi</i>	IFAT	0,8 %	
	Slovensko	<i>E. cuniculi</i>	IFAT	0,5 %	
primáti	Centr. Afr. Rep	<i>E. cuniculi</i>	PCR/seq	7,5 %	Sak et al., 2013
	Rwanda	<i>E. cuniculi</i>	PCR/seq	11%	Sak et al., 2014
šelmy	ČR	<i>E. cuniculi</i>	PCR	3,3 %	Hůrková a Modrý, 2006
	Brazílie	<i>E. cuniculi</i>	M, PCR	11,7 %	Lallo et al., 2012a
		<i>E. intestinalis</i>	M, PCR	6,7 %	
		<i>E. hellem</i>	M, PCR	6,7 %	
	Velká Británie	<i>E. cuniculi</i>	PCR	49,5 %	Meredith et al., 2015
	Irsko	<i>E. cuniculi</i>	PCR	0,5 %	Murphy et al., 2007
		<i>E. intestinalis</i>	PCR	0,5 %	
ptáci	Brazílie	<i>E. cuniculi</i>	M, PCR	1%	Lallo et al., 2012b
		<i>E. intestinalis</i>	M, PCR	1,5 %	
		<i>E. hellem</i>	M, PCR	16,30%	
	Polsko	<i>E. hellem</i>	M, PCR	3,5 %	Slodkowicz-Kowalska et al., 2006
		<i>E. intestinalis</i>	M, FISH	0,2 %	
	Slovensko	<i>E. cuniculi</i>	M+PCR/seq	40,4 %	Malčková et al., 2013

PCR ó polymerázová et zová reakce; seq ó sekvenace; DAT ó p ímý aglutina ní test; IFAT ó nep ímý imunofluorescen ní test; WB ó imunoblot; M ó mikroskopické vy-et ení

### 3.5 Encefalitozoonóza u lidí

Parazité *E. cuniculi*, *E. intestinalis* a *E. hellem* jsou společně s *Enterocytozoon bieneusi* nejčastějšími původci mikrosporidiezy u člověka (Didier et al., 2004).

K infekci dochází nejčastěji požitím masa nebo potravin potřešných možná infikovaných zvířat, dále také manipulací s infikovanými jedinci i s jejich masem. Spory se ovšem mohou vyskytovat i v pitných, užitkových a odpadních vodách (Dowd et al., 2003; Izquierdo et al., 2011). K rozšíření infekce může dojít také při odstranění infikovaného zvířete z veřejného prostoru, při čemž spory se dostávají do ovzduší (Graczyk et al., 2007). U člověka může dojít k infekci i při transplantaci orgánů (Hocevar et al., 2014). Pro zdravého jedince nepředstavuje nákaza sporami *Encephalitozoon* spp. velké riziko. Encefalitozoonóza však může mít i letální průběh, a to zejména u imunokompromitovaných jedinců, nejčastěji pacientů nakaženými virem HIV nebo po transplantaci orgánů. Průběh onemocnění a s ním spojené komplikace závisí na druhu parazita.

U člověka se nejčastěji vyskytuje druh *E. intestinalis*. Tento parazit způsobuje chronický průjem, pokud se ovšem parazit dostane do flukálních cest a flukulu, může dojít i ke vzniku cholangitidy nebo cholecystitidy (Weber et al., 1994; Raynaud et al., 1998; Sheikh et al., 2000). Dále se může parazit rozšířit také do ledvin, plic a nosní dutiny (Didier et al., 1996). V případě *E. hellem* patří mezi klinické příznaky keratokonjunktivitida, tracheobronchitida, sinusitida, nefritida a cystitida, postihuje tedy zejména orgány vylučovací a dýchací soustavy a zrakový orgán (Didier et al., 1991). *E. cuniculi* nejčastěji postihuje urogenitální a respirační soustavu, dále byl parazit zaznamenán také ve stěhách a mozku pacienta a byl spojen také s keratokonjunktivitidou (Schwartz et al., 1996; Weber et al., 1997; Mertens et al., 1997; Desportes-Livage, 2000; Fournier et al., 2000). Při naze parazitem rodu *Encephalitozoon* dochází zejména k patologickým změnám, které se odvíjejí od místa a rozsahu infekce. Typická je tvorba granulomatózního zánětu, tedy chronického zánětu spojeného s tvorbou mikroskopických ložisek o granulom (Jordan et al., 2006). V případě *E. cuniculi* je typický vznik propadlin na povrchu ledvin (Keeble, 2011). Parazit *E. hellem* a *E. intestinalis* se vyskytují typicky v gastro-intestinálním traktu a v orgánech vylučovací soustavy (De Bosschere et al., 2007).

V České republice byl parazit *E. cuniculi* detekován metodou PCR u 32,5 % lidí ve vzorcích stolice (Sak et al., 2011b). Na Slovensku byly protilátky proti *E. cuniculi* zjištěny



nep ímým imunofluorescen ním testem IFAT u 5,7 % zdravých jedinc a u 37,8 % lidí s oslabenou imunitou (Halánová et al., 2003). V Egypt byly pomocí metody IFAT zji-t ny protilátky proti *E. cuniculi* u 11,4 % zdravých lidí a u 77,3 % jedinc s oslabenou imunitou (Abu-Akkada et al., 2015). V Jižní Korei byl *E. intestinalis* detekován metodou PCR ve stolici 5% lidí trpících pr jmem (Kim et al., 2015). Tento parazit byl dále detekován ve stolici u 60,2 % pacient podstupující chemoterapeutickou lé bu p i mikroskopickém zobrazení za použití r zných barviv (Hamamci et al., 2015).

### 3.6 Diagnostika

Ur ení diagnózy u zví at je velmi obtížné, protože pokud se nemoc projeví, tak nej ast ji v kombinaci s jiným onemocněním, se kterým m ě může mít velice podobné p íznaky. Existují p ímé (pr kaz parazita) a nep ímé metody (pr kaz protilátek proti parazitovi).

K p ímému pr kazu se využívá **detekce spor v mo i** pomocí speciálního barvení a následného mikroskopického vy-et ení. P i barvení modifikovaným trichomem se spory zabarvují do r flovo- ervena, Gramovo barvení zp sobuje tmav fialové a Giemsovo modré zbarvení (Jordan et al., 2006; Keeble, 2011). Tato metoda je pom rn rychlá a levná, ov-em s níží citlivostí a navíc není možné rozli-it jednotlivé druhy kmenu Microsporidia (spory mohou být zam n ny s bakteriemi nebo kvasinkami). K ur ení správné diagnózy se využívá zejména barvení vzork mo i, stolice a dal-ích t lních tekutin pomocí barviv Uvitex 2B nebo modifikovaným trichomem (van Gool a Dankert, 1995).

U lov ka se diagnóza ur uje zejména vy-et ením t lních tekutin pomocí již zmín ných metod. Vy-et ení pomocí elektronové mikroskopie umož uje rozli-it ty i nej ast j-í parazity mikrosporidiálního p vodu vyskytující se u lov ka, což je možné na základ rozm ru jednotlivých spor, po tu smy ek polární trubice a p ípadné tvorby parazitoformní vakuoly uvnit hostitelské bu ky (Keeling a Fast, 2002). Jako dopln ní ke správnému ur ení diagnózy jsou vhodná také zobrazovací vy-et ení nebo vy-et ení krve. Dal-í metodou, která se u lidí používá zejména p i selhávání ledvin, je vy-et ení pomocí renální biopsie, tedy histopatologickým vy-et ením vzorku tkán ledvin. Teoreticky m ě tato technika poskytnout kone nou diagnózu v p ípadech postižení ledvin v asovém odstupu dev t týdn po infekci (Harcourt-Brown, 2004).

K diagnostice nebo prevalence studii se často používají sérologické metody, které fungují na základě detekce protilátek proti *E. cuniculi* v krevním séru. Běžně se používá **enzymová imunoanalýza** (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay), která využívá dvě vlastnosti imunoglobulinů, a to schopnost proteinů vázat se na povrch plastu, a možnost vázat enzymy na Fc fragmenty imunoglobulinových molekul. V tomto případě se používá tzv. nepřímá ELISA, tedy test pro detekci specifických protilátek. Další sérologickou metodou je **nepřímý imunofluorescenční test** (IFAT; Indirect Immunofluorescence Antibody Test), který poskytuje kvalitativní i kvantitativní potvrzení přítomnosti protilátek v séru. Technika je založena na jevu fluorescence. Sérum je obarveno fluorochromem, nejčastěji fluoresceinem, chemickou látkou, která po dopadu světla o určité vlnové délce, v tkáni se jedná o ultrafialové záření, zářím světlem emisním o delší vlnové délce. Následně probíhá vizualizace fluorescenčním mikroskopem (svujihlava.cz, clione.ne.jp). Tato technika se ukázala být velmi citlivým a specifickým testem pro vyšetření kočky (Künzel et al., 2014). Méně používaná je **imunoblot** (Western blot, WB), která je oproti jiným sérologickým vyšetřením dražší a časově náročnější. Poskytuje ovšem větší specifickou přesnost výsledků (zdroj: borelioza.cz). Ufitelem testem může být také **test přímé aglutinace** (Direct agglutination test, DAT; Meredith et al., 2015). Tyto testy ovšem pouze potvrzují nebo vyvrací přítomnost spor (Hinney et al., 2016).

Další možností je přímá detekce pomocí metod molekulární biologie. Jednou z nich je **metoda PCR**, která byla použita také v této práci. Tuto metodu lze využít k případu *E. cuniculi* ve vzorku moči, mozkomíšního moku nebo v tkáních vyšetřovaného jedince. V případě vyšetření z moči nemusí negativní výsledek v PCR znamenat, že jedinec není infikován spory *Encephalitozoon* spp. Spory mohou být močí vyloučeny v nepravidelných cyklech (Harcourt-Brown, 2004). Tato metoda umožňuje při pozitivním výsledku určit i kmen parazita způsobující infekci (Xiao et al., 2001).

**Postmortálně** lze stanovit diagnózu na základě případu patologických změn, které se liší v závislosti na druhu parazita. Typické patologické změny způsobené *E. cuniculi*, zahrnují například prohlubnění stěn ledvin a granulomy nebo jinak poškozená tkáň mozku. Spory však nemusí být v ledvinách nalezeny, a to i přes rozsáhlé změny této tkáně, protože mohly být vyloučeny ještě před úhynem infikovaného zvířete (Csokai et al., 2009). V mozku však spory zůstávají delší dobu, a proto při potvrzení spor v mozkové tkáni lze určit finální diagnózu.

### 3.7 Léčba

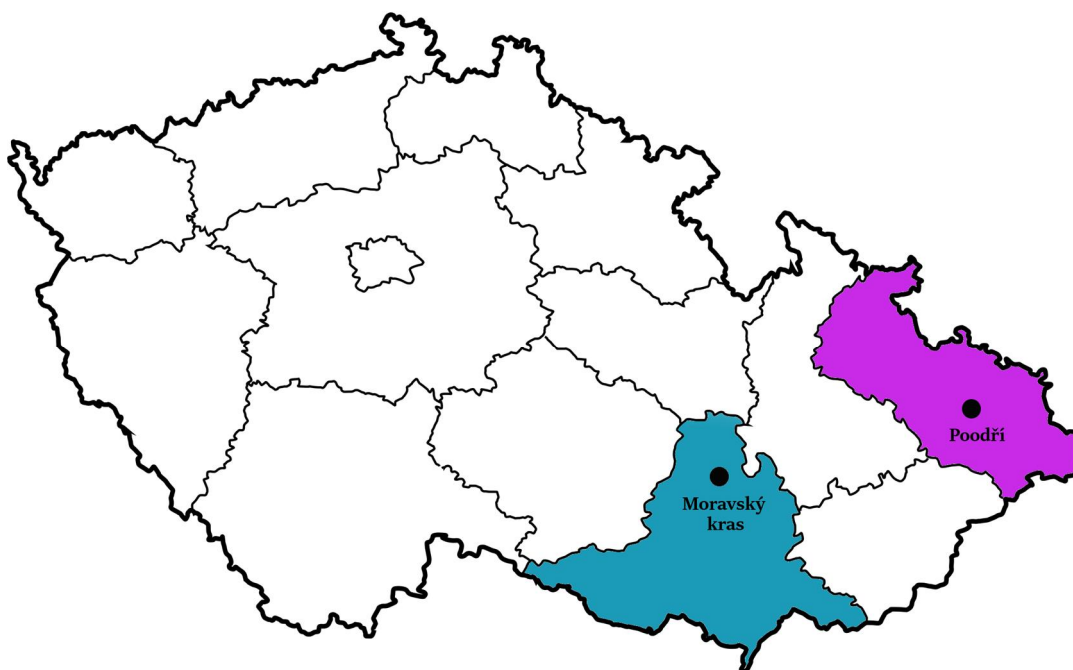
Pro léčbu encefalitozoonózy dosud neexistuje jednotný postup. V roce 2001 byl zaznamenán úspěch v léčbě experimentálně infikovaných králíků (Suter et al., 2001). Léčba byla založena na potlačení zánětu, zamezení množení spor a léčbu ostatních aktuálních chorob jedince, v závažných případech také minimalizování příznaků postižení nervové soustavy. Podle laboratorních studií je poměrně úspěšným a hlavně pro králíky zdravotně nezávadným lékem fenbendazol. Jde o širokospektrální antianthelmintikum, řadí se mezi benzimidazoly, které velmi efektivně odstraňují spory z mozkové tkáně a tím pádem také redukuje klinické příznaky u méně závažných případů. Experimentálně bylo fenbendazolem léčeno osm pirozeně infikovaných králíků během čtyř měsíců. Po zmíněném časovém období nebyla v mozkové tkáni nalezena známka po parazitovi. Fenbendazol může být použit i preventivně (Suter et al., 2001). Benzimidazoly se váží na  $\beta$ -tubulin ve stejném místě jako alkaloid kolchicin, a inhibují mikrotubulární polymeraci, čímž zabírají růst spory (Friedman a Platzer, 1978; Didier, 1997; Molina et al., 1998). K léčbě záchvátů, nklánění hlavy a nekontrolovatelných pohybů je možné použít diazepam nebo midazolam, což jsou léčivé látky patřící mezi benzodiazepiny, které mají zklidující účinek a uvolňují svalové křeče. Při léčbě uveitidy jsou nejvíce účinné kortikosteroidní léky (Jordan et al., 2006).

K léčbě mikrosporidiálních onemocnění lovka se nejčastěji používá širokospektrální antiparazitikum albendazol ze skupiny benzimidazolů, který zabírají množení spor (Groß, 2003). Modely in vitro prokázaly 90% úspěšnost albendazolu na růst spor (Bacchi et al., 2004). Bylo zaznamenáno několik případů, při kterých byla léčba tímto lékem úspěšná (De Groote et al., 1995; Didier et al., 1996; Molina et al., 1998; Groß 2003). Důležitá je ale prevence: dostatečná tepelná úprava masa před konzumací, vyhýbání se pití vody z neověrovaných vodních zdrojů a mytí rukou po každém potenciálním styku s infekcí, zejména při kontaktu s nakazenými zvířaty, mytí ovoce a zeleniny před požitím. V rámci jihokorejské studie byla prokázána přítomnost spor *E. hellem* v 8,8 % vzorků půdy, což může vést ke kontaminaci zeleniny (Kim et al., 2015).

# 4 Materiál a metodika

## 4.1 Odchyty volně žijících savců

V rámci této navazující práce byly vyšetřeny stejné vzorky, jako v práci p. vodní (Břilicová, 2017). Jednalo se o volně žijící hlodavce a hmyzožravce odchytené v letech 2015 a 2016 v CHKO Poodří a Moravský kras (Obr. 2). Odchyt probíhal ve spolupráci s Masarykovou univerzitou Brno (Ústav experimentální biologie, oddělení fyziologie a imunologie živočichů) na základě schválených projektů (Moravský kras 50637/ENV/16-2457/630/16, Poodří 41/2015). Soubor drobných savců pro vyšetření pomocí metod molekulární biologie byl vytvořen podle několika kritérií. Snánila jsem se mít v souboru co nejvíce odchytených druhů a u jednotlivých druhů mít stejný nebo alespoň obdobný počet jedinců, zástupců dle pohlaví, doby a lokality odchyty, tak aby bylo možné výsledky mezi sebou porovnat. Jednalo se celkem o 100 savců, z toho 85 hlodavců z čeledi myšovitých (Muridae, Tab. 2 a 3) a 15 hmyzožravců z čeledi rejskovitých (Soricidae, Tab. 4 a 5). Přehled celkového počtu odchytených drobných savců podle druhu, pohlaví, lokality a doby odchyty jsou shrnuty v Tab. 6, 7 a 8.



Obrázek 2: Mapa ČR s vyznačením míst odchytu hlodavců (zdroj: autorka)

Tabulka 2: Přehled volně ložených drobných savců (čládek hlodavci Rodentia, zejména myšovití Muridae) odchytených v roce 2015

. Druh	Latinský název	Pohl.	M síc	Lokalita	Pozn.
1. Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	f	erven	Pood í	
2. Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	m	erven	Pood í	
3. Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	m	erven	Pood í	
4. Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	f	erven	Pood í	
5. Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	f	erven	Pood í	b ezí
6. Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	f	erven	Pood í	b ezí
7. Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	m	erven	Pood í	
8. Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	m	erven	Pood í	
9. Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	m	erven	Pood í	
10. Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	f	zá í	Moravský kras	
11. Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	f	zá í	Moravský kras	
12. Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	m	zá í	Moravský kras	
13. Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	f	zá í	Moravský kras	
14. Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	f	zá í	Moravský kras	
15. Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	f	zá í	Moravský kras	
16. Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	m	zá í	Moravský kras	
17. Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	f	zá í	Moravský kras	
18. Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	m	zá í	Moravský kras	
19. Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	m	íjen	Moravský kras	
20. Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	m	íjen	Moravský kras	
21. Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	f	íjen	Moravský kras	
22. Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	m	íjen	Moravský kras	
23. Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	f	íjen	Moravský kras	
24. Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	m	íjen	Moravský kras	
25. Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	f	íjen	Moravský kras	
26. Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	m	íjen	Moravský kras	
27. Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	f	íjen	Moravský kras	4 embrya
28. Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	f	íjen	Moravský kras	
29. Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	m	íjen	Moravský kras	
30. Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	f	íjen	Moravský kras	
31. Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	f	íjen	Moravský kras	
32. Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	m	listopad	Pood í	mladý
33. Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	f	listopad	Pood í	mladý
34. Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	f	listopad	Pood í	mladý
35. Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	m	listopad	Pood í	mladý
36. Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	f	listopad	Pood í	mladý
37. Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	f	listopad	Pood í	mladý
38. Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	m	listopad	Pood í	
39. Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	f	listopad	Pood í	6 embryí
40. Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	m	listopad	Pood í	mladý

*m-samec, f-samice*

Tabulka 3: Přehled volně žijících drobných savců (čládek hlodavci Rodentia, zejména myšovití Muridae) odchytených v roce 2016

№	Druh	Latinský název	Pohl.	M síc	Lokalita	Pozn.
1.	Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	f	kv ten	Moravský kras	mladý
2.	Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	m	kv ten	Moravský kras	
3.	Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	m	kv ten	Moravský kras	mladý
4.	Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	f	kv ten	Moravský kras	mladý
5.	Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	f	erven	Moravský kras	4 embrya
6.	Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	f	erven	Moravský kras	mladý
7.	Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	f	erven	Moravský kras	mladý
8.	Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	f	erven	Moravský kras	mladý
9.	Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	m	erven	Poodří	
10.	Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	m	erven	Poodří	
11.	Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	m	erven	Poodří	
12.	Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	f	erven	Poodří	
13.	Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	f	erven	Poodří	
14.	Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	m	erven	Poodří	
15.	Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	m	erven	Poodří	mladý
16.	Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	f	erven	Poodří	mladý
17.	Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	m	erven	Poodří	mladý
18.	Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	f	erven	Poodří	mladý
19.	Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	m	erven	Poodří	
20.	Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	m	erven	Poodří	
21.	Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	f	erven	Poodří	
22.	Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	f	erven	Poodří	
23.	Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	f	erven	Poodří	
24.	Myšice malooká	<i>Apodemus uralensis</i>	m	erven	Poodří	
25.	Myšice malooká	<i>Apodemus uralensis</i>	m	erven	Poodří	
26.	Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	f	srpen	Moravský kras	mladý
27.	Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	m	srpen	Moravský kras	mladý
28.	Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	f	srpen	Moravský kras	
29.	Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	m	září	Moravský kras	mladý
30.	Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	m	září	Moravský kras	
31.	Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	f	září	Moravský kras	mladý
32.	Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	f	září	Moravský kras	mladý
33.	Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	m	září	Moravský kras	
34.	Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	m	září	Moravský kras	mladý
35.	Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	f	září	Moravský kras	
36.	Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	f	říjen	Poodří	
37.	Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	m	říjen	Poodří	mladý
38.	Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	m	říjen	Poodří	
39.	Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	m	říjen	Poodří	mladý
40.	Hraboš polní	<i>Microtus arvalis</i>	m	říjen	Poodří	mladý
41.	Hraboš polní	<i>Microtus arvalis</i>	m	říjen	Poodří	mladý
42.	Hraboš polní	<i>Microtus arvalis</i>	m	říjen	Poodří	mladý

43.	Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	m	íjen	Moravský kras	mladý
44.	Myšice k ovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	f	íjen	Moravský kras	mladý
45.	Myšice lesní	<i>Apodemus flavicolis</i>	f	íjen	Moravský kras	

*m-samec, f-samice*

Tabulka 4: Přehled volně žijících drobných savců (řád hmyzožravci Eulipotyphla, zejména rejskovití Soricidae) odchycených v roce 2015

.	Druh	Latinský název	Pohl.	Měsíc	Lokalita	Pozn.
1.	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	f	červen	Poodří	
2.	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	m	září	Moravský kras	
3.	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	f	íjen	Moravský kras	
4.	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	m	íjen	Moravský kras	
5.	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	f	íjen	Moravský kras	mladý
6.	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	m	íjen	Moravský kras	mladý
7.	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	m	íjen	Moravský kras	
8.	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	m	listopad	Poodří	
9.	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	f	listopad	Poodří	
10.	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	f	listopad	Poodří	

*m-samec, f-samice*

Tabulka 5: Přehled volně žijících drobných savců (řád hmyzožravci Eulipotyphla, zejména rejskovití Soricidae) odchycených v roce 2016

.	Druh	Latinský název	Pohl.	Měsíc	Lokalita	Pozn.
1.	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	m	květen	Moravský kras	
2.	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	m	červen	Poodří	mladý
3.	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	m	srpen	Moravský kras	
4.	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	f	září	Moravský kras	
5.	Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	f	září	Moravský kras	

*m-samec, f-samice*

Tabulka 6: P ehled odchycených drobných savc podle druhu, pohlaví, lokality a doby odchyty v roce 2015

Druh	M	F	Celkem	Pood í	Moravský kras	erven	Zá í	íjen	Listopad
My-ice temnopásá	5	5	10	10	0	1	0	0	9
My-ice lesní	5	5	10	5	5	5	4	1	0
My-ice k ovinná	3	7	10	3	7	2	2	6	0
Norník rudý	5	5	10	1	9	1	3	6	0
Rejsek obecný	5	5	10	4	6	1	1	5	3
Celkem	23	27	50	23	27	10	10	18	12

*M-samec, F-samice*

Tabulka 7: P ehled odchycených drobných savc podle druhu, pohlaví, lokality a doby odchyty v roce 2016

Druh	M	F	Celkem	Pood í	Moravský kras	Kv ten	erven	Srpen/ zá í	íjen
My-ice temnopásá	6	4	10	10	0	0	9	0	1
My-ice lesní	3	7	10	2	8	1	2	6	1
My-ice k ovinná	5	5	10	5	5	0	5	1	4
My-ice malooká	2	0	2	2	0	0	2	0	0
Norník rudý	5	5	10	2	8	3	3	3	1
Hrabo-polní	3	0	3	3	0	0	0	0	3
Rejsek obecný	3	2	5	1	4	1	1	3	0
Celkem	27	23	50	25	25	5	22	13	10

*M-samec, F-samice*

Tabulka 8: P ehled celkového po tu odchycených drobných savc podle druhu, pohlaví, lokality a doby odchyty v letech 2015 a 2016

Druh	M	F	Celkem	Pood í	Moravský kras	Kv ten/ erven	Srpen/ zá í	íjen/ listopad
My-ice temnopásá	11	9	20	20	0	10	0	10
My-ice lesní	8	12	20	7	13	8	10	2
My-ice k ovinná	8	12	20	7	13	7	3	10
My-ice malooká	2	0	2	2	0	2	0	0
Norník rudý	10	10	20	3	17	7	6	7
Hrabo-polní	3	0	3	3	0	0	0	3
Rejsek obecný	8	7	15	5	10	3	4	8
Celkem	50	50	100	47	53	37	23	40

*M-samec, F-samice*

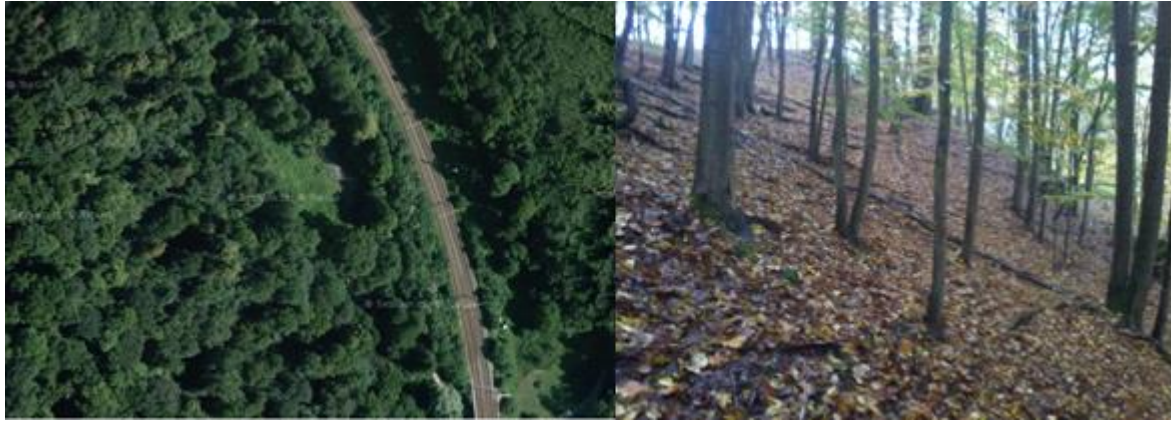


V **Pood í** byly pasti kladeny v blízkosti rybníků : Střední rybník, Grin– v rybník a Malý a Velký roh (Obr. 3; GPS souřadnice 49°44'13"N 18°06'50"E). V okolí rybníků jsou zejména pole a menší lesní plochy. Rybníky slouží jako chovné a nejsou určeny k rekreaci, v odchytové lokalitě se tak vyskytuje minimum lidí. Pasti byly kladeny okolo Grin–ova rybníku a v hustě prorostlém lese. Po obvodu Grin–ova rybníku vede lesní cesta obklopená stromy a keři, pasti byly nastrojeny po obou stranách cesty. Les je obtížně průstuný, kromě husté vegetace se v něm nachází množství spadených a vykotlaných stromů, pařezů, a také mokřady. Odchytová místa okolo rybníků i v lese byla poměrně vlhká, zejména v oblasti mokřadů. Na kolek pastí bylo umístěno také malé vodní ploše a ke kraji pole poblíž vesnice Albrechtiky (GPS souřadnice 49°42'24"N 18°05'50.0"E). Vodní plocha je obklopena zalesněným svahem, přístup je možný jen po lesní cestě, v případě pole byly pasti umístěny na jeho okraji v blízkosti lesu. Obě lokality jsou poměrně suché (Brlíková, 2017).



Obr. 3: Odchytová lokalita Pood í - Studénka (zdroje: google.cz/maps, turistika.cz)

V **Moravském krasu** probíhaly odchyty v oblasti Josefovského údolí v blízkosti Josefovského potoka (Obr. 4; GPS souřadnice 49°18'60"N 16°41'09"E). Lokalita je zalesněná a v blízkosti odchytových oblastí se nachází jen několik stavení. Pasti byly kladeny do zalesněných kopců z obou stran Josefovského potoka, odchytová místa jsou kromě potoka oddělena také silnicí. Na jedné straně potoka je terén poměrně strmý a obtížně dostupný, v lese nevede žádná cesta. Na druhé straně toku je přístupnost snazší, kopce jsou méně strmé a les je řídký zalesněný. V době odchytu byla lokalita poměrně suchá (Brlíková, 2017).



Obr. 4: Odchytová lokalita Moravský kras - Josefovské údolí (zdroje: google.cz/maps, autorka)

K odchyt m byly pouflity sklapovací a flivolovné pasti (Obr. 5). Jako návnada pro sklapovací pasti byla pouflita slanina, zatímco v p ípad flivolovné pasti se jednalo o sm s oleje, tu áka a starého pe iva. Pasti byly pokládány odpoledne a ráno následujícího dne byly posbírány. V p ípad vícedenního odchytu byly pasti ráno zkontrolovány a znovu byla nastraflena erstvá návnada, pasti byly polofeny o pár metr dál od p vodního místa. Po et nastraflených pastí se v rámci jednotlivých odchyt li-il. flivolovných pastí bylo pokládáno okolo 40, sklapovacích v t-inou v rozmezí 40 - 60, b hem n kterých odchyt v-ak bylo polofeno i 82 a 150 sklapovacích pastí (Brlicová, 2017).



Obr. 5: flivolovná past (vlevo) a sklapovací past (vpravo; zdroj: autorka)

## 4.2 Pitva a odběr vzorků

Pitvy byly prováděny ve stejný den jako odchyty. Pokud byli odchyceni fliví jedinci (chyceni do flivolových pastí), byli uspani éterem a následné usmrcení probíhalo metodou zlomení vazů a následným vykrvením z *arteria carotis*. Z odchycených jedinců byly vy-pitvány ledviny, játra a mozek. Při pitvě byly používány roušky a rukavice (Obr. 6). Vzorky byly do následného zpracování uchovány v mrazáku při teplotě  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Obrázek 6: Pitva (zdroj: Jiřina Marková)

## 4.3 Izolace DNA

K izolaci DNA z jateční tkáň jedinců odchycených v letech 2015 byl použit izolační kit UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit (Obr. 7; MO BIO Laboratories, Carlsba, Kalifornie, USA). Do zkumavek se sklenými kuličkami (Dry bead tubes) bylo přidáno  $700\text{ }\mu\text{l}$  roztoku TD1 a  $20\text{ mg}$  tkáň. Tkáň byla zhomogenizována v přístroji MagNA Lyser při  $3000$  otáček/min (RPM) po dobu  $10\text{ min}$ . Do zkumavek bylo následně přidáno  $15\text{ }\mu\text{l}$  proteinázy K a poté byly zkumavky inkubovány při  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  po dobu  $30\text{ min}$ , následovala centrifugace při  $10\text{ }000\text{ RPM}$  po dobu  $1\text{ minuty}$  při pokojové teplotě. Vzniklý roztok byl pipetován do mikrozkušavky typu Eppendorf se spin kolonkou a následně byly vzorky centrifugovány při  $10\text{ }000\text{ RPM}$  po dobu  $30\text{ s}$ . Ze spodní části zkumavky byl odstraněn roztok, který protekl skrz kolonku během centrifugace, bylo přidáno  $400\text{ }\mu\text{l}$  roztoku TD2 a byly zkumavky opět centrifugovány při  $10\text{ }000\text{ RPM}$  po dobu  $30\text{ s}$ . Poté byl znovu vylit ze spodní části zkumavky a efiltrovaný roztok, bylo přidáno  $400\text{ }\mu\text{l}$  roztoku TD2 a zkumavky byly opět centrifugovány při  $10\text{ }000$  otáček/min po dobu  $1\text{ min}$ . Spin kolonka se umístila do stejné  $2\text{ ml}$  zkumavky. Do stejné kolonky bylo přidáno  $50\text{ }\mu\text{l}$  roztoku TD3, zkumavka byla opět centrifugována při

10 000 otá kách/min po dobu 30 s. Po tomto kroku jifl ve spodní ásti zkumavky z stala izo-  
lovaná DNA, která byla uchována p i teplot -20 °C (zdroj: detailní protokol p iložený  
k izola nímu kitu UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit, mobio.com).



Obr. 7: Příprava izolační směsi (vlevo) a vkládání vzorků do centrifugy (vpravo; zdroj: Jiřina Marková)

K izolaci DNA ze vzorků získaných v roce 2016 byl poufít DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN Inc., Germantown, Maryland, USA). Do mikrocentrifuga níh zkumavek byly p idány suché kuli ky (SiLibeads), 180  $\mu$ l pufru ATL a 20 mg tkán . Zkumavky byly umíst -  
ny do homogeniza ního p ístroje MagNA Lyser, homogeniza ní proces probíhal v p ti cyk-  
lech po 99 s p i 7000 RPM. Poté bylo p idáno 20  $\mu$ l proteinázy K. Zkumavky byly zvortexo-  
vány a následn inkubovány p i teplot 56 °C po dobu 2 hodin. Po inkubaci byly zkumavky  
op t zvortexovány a bylo p idáno 200  $\mu$ l pufru AL. Po dal-ím zvortexování bylo p idáno je-t  
200  $\mu$ l 100% ethanolu a následn byly zkumavky op t zvortexovány. Poté byly 2 ml obsahu  
zkumavek p epipetovány do zkumavek se spin kolonkou (DNeasy mini spin column). Poté  
prob hla centrifugace p i 8000 RPM po dobu 1 minuty. Kolonka byla umíst na do nové zku-  
mavky a bylo p idáno 500  $\mu$ l pufru AW1. Následovala centrifugace p i 8000 RPM po dobu  
jedné minuty. Kolonky byly op t p emíst ny do nové zkumavky a bylo p idáno 500  $\mu$ l pufru  
AW2, zkumavky poté byly zcentrifugovány p i 14000 RPM po dobu 3 minut. Kolonky byly  
znovu umíst ny do nové zkumavky a bylo do st edu kolonky p idáno 50  $\mu$ l pufru AE. Po  
t ech minutách inkubace p i pokojové teplot byly zkumavky zcentrifugovány p i 8000 RPM  
po dobu 1 minuty. Pro získání v t-řho množství DNA bylo je-t jednou p idáno 50  $\mu$ l pufru  
AE a zkumavky byly op t umíst ny do centrifugy p i 8000 RPM po dobu jedné minuty. Izo-

lací bylo získáno celkem 100 µl DNA. Izolovaná DNA byla do vy-et ení uchována p i teplot -20 °C (zdroj: detailní protokol p ilofžený k izola nímu kitu DNeasy Blood & Tissue Kit, qia-gen.com).

#### 4.4 Single PCR

V rámci mé původní práce, byly vzorky vyšetřeny metodou single PCR, která umožňuje rychlé namnožení požadovaného úseku DNA *in vitro*. Směs pro PCR obsahovala: 12,5 µl PPP Master Mixu (Top-Bio s. r. o., Praha, ČR), 1 µl primeru ECUNF (5'- ATG AGA AGT GAT GTG TGT GCG -3') a ECUNR (5'- TGC CAT GCA CTC ACA GGC ATC - 3') o koncentraci 10 pmol, 9,5 µl PCR vody a 1 µl izolované DNA.

Samotná reakce probíhá v termocykleru. Proces začíná po áte ní denurací p i 95 °C po dobu 3 min, která slouží k separaci et zc DNA. Poté se 35× opakuje následující tep- lotní cyklus: 95 °C 30 s (dojde k rozru- ení vodíkových m stk v molekule DNA a tím k rozvoln ní dvou-roubovice, ze které vznikají 2 jednovláknové DNA), 62 °C 30 s (na speci- fická místa DNA nasedají na principu komplementarity dusíkatých bází primery) a 72 °C po dobu 90 s (Tag DNA polymeráza nasedá na primery a za íná p i azovat volné nukleotidy na principu komplementarity). Po skon ení v-ech cykl následuje finální elongace p i 72 °C 10 min (Brlicová, 2017)

#### 4.5 Nested PCR

Metoda nested PCR je modifikace PCR, která vyuffívá dvou specifických sad primer . Sm s pro jeden vzorek byla pro ob reakce stejná a obsahovala: 6,75 µl PPP Master Mixu (Top-Bio s. r. o.), 1 µl každého primeru o koncentraci 10 pmol a 11,25 µl PCR vody. Do prv- ní reakce byly pouflity primery MSP-1 (5'-TGA KGT CCC TGT-3') a MSP-2A (5'-TCA CTC GCC GCT ACT-3'). Samotná PCR reakce probíhala za t chto podmínek: denaturace p i teplot 94 °C po dobu 5 min, poté 40 x (94 °C po dobu 1 min, 55 °C po dobu 30 s a 72 °C po dobu 1 min) a 72 °C po dobu 7 min.

Výsledky této reakce byly následn pouflity jako templátová DNA pro druhou reakci. Pro druhou reakci byla vyuffita druhá sada primer MSP-3 (5'-GGA ATT CAC ACC GCC CGT CRY TAT-3') a MSP-4A (5'-CCA AGC TTA TGC TTA AGT YAM ARG GG-3').

Druhá PCR reakce probíhala za stejných teplotních i časových podmínek jako po áte ní reakce v p ístroji termocykler. Produkty druhé reakce byly naná-eny na gel.

## 4.6 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza sloufí k separaci a analýze molekul nukleových kyselin, a to na základ schopnosti nabitých ástic pohybovat se v elektrickém poli sm rem k anod díky fosfátové skupin záporn nabité molekuly DNA. Rychlost pohybu je závislá na velikosti DNA fragmentu. ím krat-í úseky, tím dál se dostanou, protože se v gelu pohybují rychleji (cit.vfu.cz).

Byl poufít 2% agarózový gel, který se smíchal z 2 g agarózy a 80 ml TBE pufru. Jako vizualiza ní barva bylo poufíto 80 µl barvi ky Midori Green. Agarózový gel byl je-t p ed zatuhnutím nalit do formy, do které byl vlofen h eben pro vytvo ení jamek, do kterých byly po zatuhnutí gelu naná-eny vzorky PCR produkt (Obr. 8). Krom vzork byl do gelu nanesen i velikostní marker (hmotnostní standart) 100 bp (pár bází), který sloufí k odhadu velikosti fragment DNA. Délka fragment se u jednotlivých druh *E. cuniculi* li-í. V p ípad *E. cuniculi* vzniká fragment o velikosti 289 bp, u *E. intestinalis* se jedná o fragment o velikosti 300 bp. Po prob hnutí elektroforézy se provádí vizualizace pod UV sv tlem na UV translu-minátoru (Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, Francie). Pozitivní vzorky byly následn zaslány na genotypizaci.



Obr. 8: Nanášení vzorků do gelu a spuštění gelové elektroforézy (zdroj: Jiřina Marková)

## 4.7 Genotypizace

U vzorků pozitivních v nested PCR byla provedena genotypizace (sekvenace). Produkt druhé PCR reakce byl přečištěn pomocí izolačního kitu Gel / PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., New Taipei City, Taiwan). Přečištěný vzorek o objemu 7,5 µl byl pipetován do mikrotitrační destičky (každý vzorek byl umístěn do dvou jamek). Následně bylo přidáno 2.5 µl primeru MSP-3 do jedné jamky a stejné množství primeru MSP-4A do druhé jamky se stejným vzorkem. Vzorky byly odeslány k sekvenaci do firmy Macrogen (Meibergdreef 31, Amsterdam, Nizozemsko). Výsledky genotypizace byly následně porovnány s databází BLAST ([blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)).

## 5 Výsledky

V rámci této práce bylo vyšetřeno celkem 100 drobných savců, z toho 85 hlodavců a 15 hmyzožravců. Parazit *E. cuniculi* byl pomocí single PCR detekován u jednoho jedince (Brlicová, 2017).

Pomocí nové metody (nested PCR) byl *Encephalitozoon* spp. detekován ve tkáních 10 % drobných savců (Tab. 9). Jednalo se o 8 hlodavců (9,4 %) a 2 hmyzožravce (13,3 %).

Tab. 9: Drobní savci pozitivní na přítomnost parazitů *Encephalitozoon* spp.

Druh	Latinský název	Pohlaví	Měsíc	Rok	Lokalita
Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	samice	Listopad	2015	Poodří
Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	samec	Květen	2016	Moravský kras
Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	samec	červen	2016	Poodří
Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	samice	červen	2016	Poodří
Myšice křovinná	<i>Apodemus sylvaticus</i>	samec	červen	2016	Poodří
Myšice temnopásá	<i>Apodemus agrarius</i>	samice	červen	2016	Poodří
Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	samice	srpen	2016	Moravský kras
Rejsek obecný	<i>Sorex araneus</i>	samice	září	2016	Moravský kras
Hraboš polní	<i>Microtus arvalis</i>	samec	říjen	2016	Poodří
Norník rudý	<i>Clethrionomys glareolus</i>	samice	říjen	2016	Poodří

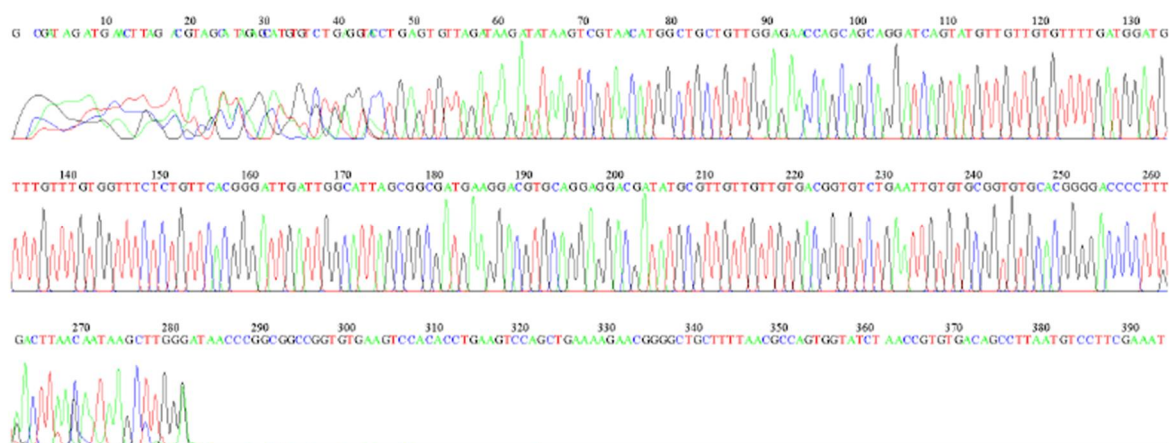
Nejčastěji se parazit vyskytoval u myšice temnopásé a to u 4 z 20 jedinců (20 %; Tab. 10). Z řádu hlodavců se parazita dále vyskytoval také u 2 norníků rudých (10 %), jedné myšice křovinné (5 %) a jednoho hraboše polního (33,3 %). Parazit *Encephalitozoon* spp. nebyl detekován u myšice lesní a myšice malooké. Řád hmyzožravců byl zastoupen pouze jedním druhem, a to rejskem obecným. U tohoto rodu byl tedy parazit detekován v již zmíněných 13,3 % případů. Parazit byl častěji detekován u samic (12 %) než u samců (8 %).



Tab. 10: Pohled celkového počtu odchycených drobných savců podle pohlaví, lokality a doby odchytu.

Druh	M	F	Celkem	Moravský		Květen/ červen	Srpen/ září	říjen/ listopad
				Poodí	kras			
Myšice temnopásá	11	9	20	20	0	10	0	10
Myšice lesní	8	12	20	7	13	8	10	2
Myšice k ovinná	8	12	20	7	13	7	3	10
Myšice malooká	2	0	2	2	0	2	0	0
Norník rudý	10	10	20	3	17	7	6	7
Hrabo-polní	3	0	3	3	0	0	0	3
Rejssek obecný	8	7	15	5	10	3	4	8
Celkem	50	50	100	47	53	37	23	40

PCR produkty pozitivních vzorků byly zaslány na genotypizaci pro bližší identifikaci. Podávají se zgenotypizovat (Obr. 9) tři vzorky, ve všech případech se jednalo o *E. cuniculi*. Jedná se konkrétně o samice rejska obecného odchyceného v září roku 2016 v Moravském krasu a samce hrabo-polního a samice norníka rudého odchycených v říjnu roku 2016 v Poodí (Tab 9.). U všech tří vzorků byl prokázán detekován II. vteve *E. cuniculi*.



Obr. 9: Příklad výsledku genotypizace (zdroj: autorka)

# 6 Diskuze

## 6.1 Parazit *Encephalitozoon* spp. u volně žijících drobných savců

Pomocí nové metody (nested PCR) byl *Encephalitozoon* spp. detekován ve tkáních 10 % drobných savců, a to u 8 hlodavců (9,4 %) a 2 hmyzofravců (13,3 %).

Pozitivní jedinci byli odchyceni zejména v odchytové lokalitě CHKO Poodří (14,9 %), zatímco jedinci odchycení v CHKO Moravský kras byli pozitivní jen ve třech případech (5,7 %). Na základě těchto výsledků je tedy *Encephalitozoon* spp. více rozšířen v CHKO Poodří. Pro větší relevantnost tohoto výsledku by však bylo nutné zvýšit počet vyšetřených jedinců.

Parazit rodu *Encephalitozoon* spp. byl detekován pouze u jednoho jedince odchyceného v roce 2015. Tento výsledek nemusí znamenat, že se parazit v tomto roce vyskytoval výrazně méně než v následujícím roce. Metodika pro izolaci DNA ze tkání v letech 2015 a 2016 se lišila pouze v použitém izolačním kitu. Je tedy možné, že během homogenizace nebyly vytvořeny takové podmínky, které by způsobily prasknutí obalu spory. Spora je velmi odolná, což parazitu umožní přežít nepříznivé podmínky okolního prostředí. Pokud ovšem není spora během homogenizace narušena, nemůže se uvolnit DNA parazita, což vede k negativnímu výsledku i přes to, že je parazit ve tkáni přítomen. Odchyty probíhaly vždy během čtyř měsíců od jara do podzimu, v roce 2015 se jednalo o období od června do listopadu, v roce 2016 se pak jednalo o období od května do října. V průběhu července ovšem nebyl odchyt prováděn v žádném roce. Na přítomnost parazitů *Encephalitozoon* spp. byli nejčastěji pozitivní jedinci odchycení v červnu; jednalo se o 4 jedince z 22 odchycených jedinců (18,2 %). Dále byli pozitivní dva jedinci odchyceni v říjnu (20 %). Jeden pozitivní jedinec byl odchycen v květnu (20 %), srpnu (25 %) a září (11,1 %).

V České republice existuje jedna studie zaměřená na detekci *Encephalitozoon* spp. u volně žijících hlodavců, případně hmyzofravců (Sak et al., 2011a). Parazit *E. cuniculi* byl pomocí PCR detekován v 8,7 % vzorků trusu myši domácí, zatímco v případě *E. hellem* byl výsledek pozitivní v 8 %. Zvířata žijí v blízkosti lidských obydlí, hlodavci tak mohou být zdrojem infekce pro lidi. Na Slovensku byl metodou PCR detekován *E. cuniculi* (0,4 %) i *E. intestinalis* (0,4 %) ve vzorcích trusu myši (Danišová et al., 2015). Ve Švýcarsku (Müller-

Doblies et al., 2002), byla metodou Western blot vyšetřena krevní séra potkanů, kteří byli odchyceni ve městě, zvířata tak mohla přicházet do přímého kontaktu s lidmi. Protilátky byly zjištěny u 13 % jedinců. V rámci zmínovaných prací byla zaměřena na hlodavce flující v blízkosti lidských obydlí, oproti tomu má práce byla zaměřena na zvířata, která byla odchycena v chráněných krajinných oblastech, a nepřicházela tak do přímého kontaktu s domestikovanými zvířaty nebo lovci.

Další studie zaměřená na volně flující drobné savce byla provedena ve Velké Británii (Meredith et al., 2015). Sérologickou metodou přímého aglutinačního testu (DAT) byly protilátky proti *E. cuniculi* detekovány u normálního rudého (10,7 %), hrabě mokradního (5,8 %) a myšice kováčské (1 %). V Rakousku byl parazit detekován metodou PCR v mozkové tkáni 6 % hrabě polních a 7 % hryzčů vodních (Fuehrer et al., 2010). V Japonsku byli u hlodavců a hmyzožravců detekováni všechny druhy rodu *Encephalitozoon* spp. parazitující na savcích (Tsukada et al., 2013). Paraziti *E. cuniculi* a *E. hellem* byli detekováni u 10,5 % hlodavců, *E. intestinalis* u 3,1 % jedinců. V případě hmyzožravců byl parazit *E. cuniculi* detekován u 16,7 % jedinců, zatímco *E. intestinalis* a *E. hellem* byli každý detekováni u 5,6 % jedinců. Vzorky mozkové tkáně nebo ledvin byly vyšetřeny metodou nested PCR a následně byly rovněž sekvenovány.

Drobní savci mohou být potenciálními přenašeči infekce a představovat tak riziko pro jejich konzumenty, zejména tedy pro masožravce, na které však bylo zaměřeno jen několik studií. V České republice byl u masožravých savců detekován pouze *E. cuniculi*, a to u 3,3 % kun; vzorky mozkové tkáně byly vyšetřeny metodou PCR (Hrková a Modrý, 2006). *E. cuniculi* byl dále detekován také 49,5 % lišek vyšetřených ve Velké Británii metodou DAT (Meredith et al., 2015). Lišky byly vyšetřeny také v Irsku a to metodou IFAT, byly detekovány protilátky proti *E. cuniculi* (0,5 %) a *E. intestinalis* (0,5 %; Murphy et al., 2007). Další studie se zaměřila na volně flující nosáky v Brazílii (Lallo et al., 2012a). Vzorky močí byly vyšetřeny metodou PCR a mikroskopickým zobrazením; *E. cuniculi* byl detekován v 11,7 % případů, zatímco parazit *E. intestinalis* a *E. hellem* byl detekován u 6,7 % vzorků.

V současné době není známo přenosu infekce parazity *Encephalitozoon* spp. zcela objasněno. Drobní savci flující v odchytových lokalitách CHKO Moraský kras a CHKO Poodří však mohou pro masožravce a případně dravce flující ve zmíněných lokalitách představovat riziko přenosu infekce.

## 6.2 Srovnání metod single a nested PCR

Při vyšetření vzorků metodou nested PCR bylo pozitivních 10 % jedinců. Pro reakci však byly použity primery, které umožňují detekci více druhů mikrosporidiálních parazitů. Kromě *Encephalitozoon* spp. se jedná o parazity *Vairimorpha necatrix*, *V. lymantriae*, *Ameioba michaelis* a *Ichtyosporidium giganteum* (Katzwinkel-Wladarsch et al., 1996). V případě parazitů *Encephalitozoon* spp. vzniká produkt o velikosti přibližně 300 bp (Tsukada et al., 2013). Pro rozeznání jednotlivých druhů rodu *Encephalitozoon* je však nutné provedení genotypizace.

V rámci této práce bylo na genotypizaci zasláno všech deset pozitivních vzorků, úspěšně se ovšem podařilo sekvenovat pouze tři vzorky. To ovšem neznamená, že zbylých 7 jedinců nebylo parazitem infikováno. Proces genotypizace může být neúspěšný z mnoha důvodů. V tomto případě se zejména jednalo o neadekvátní koncentraci templátové DNA. Produkt PCR reakce je pak pro genotypizaci příliš slabý. Do budoucna je tedy nutné upravit objem vzorku vyšetřeného metodou nested PCR tak, aby byl výsledek reakce větší.

U všech tří genotypizovaných vzorků byl detekován parazit *E. cuniculi*, konkrétně jeho druhá varianty. *E. cuniculi* se geneticky dělí celkem na čtyři varianty na základě opakování genové sekvence 5'-GTTT-3' v ITS sekvenci. První varianty je, vzhledem k výskytu u králíků a myši, nazývána jako varianty králíků; zmíněná sekvence se opakuje třikrát. U druhé varianty, v tlapce hlodavců, se sekvence opakuje dvakrát (Didier et al., 2000). V případě tetraploidních psů v tlapce, se sekvence opakuje čtyřikrát, zatímco u tvrdé lidské v tlapce pětikrát (Talabani et al., 2010; Nell et al., 2014). I přes to, že jednotlivé kmeny mají své typické hostitele, mohou se vyskytovat také u dalších druhů. V rámci studie zabývajícími se přítomností parazitů *Encephalitozoon* spp. u hlodavců a hmyzofravců v Japonsku byly detekovány varianty I a III, zatímco II. varianty nebyla detekována u žádného vzorku (Tsukada et al., 2013). Na základě výsledků genotypizace je v odchytových lokalitách pravděpodobně nejvíce rozšířený druhý kmen parazita. K potvrzení tohoto tvrzení by ovšem byla nutná genotypizace i dalších pozitivních vzorků.

Jedním z cílů, které jsem si pro tuto práci stanovila, bylo porovnání citlivosti metod single a nested PCR. V rámci této práce byly vyšetřeny stejné vzorky a stejná izolovaná DNA, jako v předchozí práci, ve které byl parazit *E. cuniculi* detekován pouze u jednoho jedince (1 %). Jednalo se o samce myši temnopásé, který byl odchycen v únoru roku 2016 v CHKO Poodří (Brlíková, 2017). Při vyšetření metodou nested PCR byl

v případě tohoto vzorku na gelu velmi slabý band (prouflek). Jako pozitivní byly označeny pouze vzorky, které byly v gelové elektroforéze jasně pozitivní. I přesto, že při teplotě -18 °C může být izolovaná DNA skladována až dva roky, je možné, že v případě tohoto vzorku došlo k degradaci DNA. Pro srovnání citlivosti obou metod single a nested PCR bylo ale nutné použít DNA izolovanou v rámci předcházející práce.

Nested PCR je modifikací metody PCR, která je tvořena dvěma na sebe navazujícími PCR reakcemi. Nested PCR má oproti single PCR dvě výhody. Díky celkovému opakování cyklu, během kterého dochází k namnožení požadované PCR sekvence, se zvyšuje výtěk produktu reakce. Tím pádem může být výsledek pozitivní i v případě, že byl produkt v případě single PCR příliš slabý (Therese et al., 2005). Druhý cyklus nested PCR také eliminuje nespecifický produkt, který se v případě mohl vytvořit během první reakce PCR (Schmitt et al., 1994). Nested PCR je tedy oproti single PCR senzitivnější a specifitější.

I přesto, že provedená genotypizace byla úspěšná pouze u tří z deseti pozitivních vzorků, je možné srovnání obou metod. Všechny tři genotypizované vzorky prokázaly přítomnost parazita *E. cuniculi*. Metoda nested PCR je tedy pro vyšetření tkání na přítomnost parazita *E. cuniculi* citlivější.

## 7 Závěr

V rámci této práce jsem si stanovila dva cíle o vyšetření odchycené drobné savce na přítomnost parazit *Encephalitozoon* sp. Metodami nested PCR a genotypizace, a následně porovnat citlivost nested PCR s metodou single PCR použitou v dřívejší práci (Brlíková, 2017). Metodou nested PCR jsem vyšetřila tkáň 100 drobných savců, kteří byli odchyceni v letech 2015 a 2016 v CHKO Moravský kras a Poodří. Parazité *Encephalitozoon* spp. byli detekováni u 10 % jedinců (n=10). Na základě výsledků provedené genotypizace se ve všech případech jednalo o *E. cuniculi*. Pro vyšetření metodou nested PCR byly použity stejné vzorky, které byly vyšetřeny v rámci mé předchozí práce metodou single PCR, kterou byl parazit *E. cuniculi* detekován pouze u jednoho vzorku (1 %). Metoda nested PCR je tedy oproti single PCR citlivější. Nested PCR má ovšem také nevýhody. Vzhledem k použitým primerům je pro přesné určení druhu parazita rodu *Encephalitozoon* nutné pozitivní vzorky genotypizovat. Dále je oproti single PCR tato metoda časově náročnější, a to z důvodu dvou na sebe navazujících PCR reakcí. Nested PCR je ovšem výrazně více senzitivní. Pro vyšetření tkání na přítomnost parazit *Encephalitozoon* spp. je tedy vhodnější.

## 8 Literatura

1. **Abu-Akkada S. S., El Kerdany E. D. H., Mady R. F., Diab R. G., Khedr G. A. E., Ashmawy K. I., Lofty W. M. 2015.** *Encephalitozoon cuniculi* infection among immunocompromised and immunocompetent humans in Egypt. *Iranian Journal of Parasitology* 10: 561-570
2. **Bacchi C. J., Weiss L. M. 2004.** Chemotherapy of microsporidiosis: Benzimidazoles, fumagillin and polyamine analogues. *Opportunistic infection: Toxoplasma, Sarcocystis, and Microsporidia* 9: 159-188
3. **Baneux P. J., Pognan F. 2003.** In utero transmission of *Encephalitozoon cuniculi* strain type I in rabbits. *Laboratory Animal* 37, 132-138
4. **Bakatselou C., Beste D. I., Kadri A. O., Somanatha S, Clark C. G. 2003.** Analysis of genes of mitochondrial origin in genus *Entamoeba*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 50: 210-214
5. **Bártová E., Marková J., Sedlák K. 2015.** Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in European hares (*Lepus europaeus*). *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 22: 674-676
6. **Bigliardi E., Luciano S 2001.** Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes and Infection* 3, 373-379
7. **Bornay-Llinares F. J., da Silva A. J., Moura H., Schwartz D. A., Visvevara G. S., Pieniazek N. J., Cruz-López A., Hernández-Jaúregui P., Guerrero J., Enriquez J. 1998.** Immunologic, microscopic, and molecular evidence of *Encephalitozoon intestinalis* (*Septata intestinalis*) infection in mammals other than humans. *The Journal of Infectious Diseases* 178: 820-826
8. **Brlicová L. 2017.** *Encephalitozoon cuniculi* u voln flíjích drobných savc . St edo-kolská odborná innost. Gymnázium Brno- e kovice, p ísp vková organizace, Brno
9. **Cali A., Kotler D. P., Orenstein J. M. 1993.** *Septata intestinalis* N. G., N. Sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in aids patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 40: 101-112
10. **Corradi N., Pombert J. F., Farinelli L, Didier E. S., Keeling P. J. 2010.** The complete sequence of the smallest known nuclear genome from microsporidian *Encephalitozoon intestinalis*. *Nature Communications* 77: 1-7
11. **Cox J. C., Hamilton R. C., Attwood H. D. 1979.** An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. *Journal of Protozoology* 26, 260-265
12. **Csokai J., Gruber A., Künzel F., Tichy A., Joachim A. 2009.** Encephalitozoonosis in pet rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): pathohistological findings in animals with latent infection versus clinical manifestation. *Parasitology Research* 104: 629-635
13. **Dani-ová O., Valen áková A., Stanko M., Luptáková L., Hasajová A. 2015.** First report of *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon intestinalis* infection of wild mice in Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 22: 251-252

14. **de Bosschere H.**, Wang Z., Orlandi P. A. **2007**. First diagnosis of *Encephalitozoon intestinalis* and *E. hellem* in a European brown hare (*Lepus europaeus*) with kidney lesions. *Zoonoses and Public Health* 54: 131-134
15. **de Groote M. A.**, Visvesvara G., Wilson M. L., Pieniazek N. J., Slemenda S. B., daSilva A. J., Leitch G. J., Bryan R. T., Reves R **1995**. Polymerase chain reaction and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. *Journal of Infectious Diseases* 171, 1375-1378
16. **Desportes-Livage I.** **2000**. Biology of microsporidia. *Contributions to Microbiology* 6, 140-165
17. **Didier E. S.**, Didier J. P., Friedberg D. N., Stenson S. M., Orenstein J. M., Vee R. W., Tio F. O., Davis R. M., Vossbrinck C., Millichamp N., Shadduck J. A. **1991**. Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *Journal of Infectious Diseases* 163: 617-621
18. **Didier E. S.**, Rogers L. B., Orenstein J. M., Baker M. D., Vossbrinck C. R., van Gool T., Hartskeerl R., Soave R., Beaudet L. M. **1996**. Characterisation of *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* isolates cultured from nasal mucosa and bronchoalveolar lavage fluids of two AIDS patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 43: 34-43
19. **Didier E. S.**, Didier P. J., Snowden K. F., Shadduck J. A. **2000**. Microsporidiosis in mammals. *Microbes and Infection* 2: 709-720
20. **Didier E. S.**, Stovall M. E., Green L. C., Brindley P. J., Sestak K., Didier P. J. **2004**. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Veterinary Parasitology* 126: 145-166
21. **Didier E. S.**, Weiss L. M. **2006**. Microsporidiosis: current status. *Current Opinion in Infectious Diseases* 19, 485-492
22. **Dowd S. E.**, John D., Eliopolus J., Gerba C. P., naranjo C. P., Klein R., López B., de Mejía M., Mendoza C. E., Pepper I. L. **2003**. Confirmed detection of *Cyclospora cayentanesis*, *Encephalitozoon intestinalis* and *Cryptosporidium parvum* in water used for drinking. *Journal of Water and Health* 1: 117-123
23. **Fournier S.**, Liguory O., Salfati C., David-Ouaknine F., Derouin F., Deazes J. M., Molina J. M. **2000**. Disseminated infection due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: Case report and review. *HIV Medicine* 1: 155-161
24. **Fuehrer H. P.**, Blöschl I., Siehs C., Hassl A. **2010**. Detection of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Encephalitozoon cuniculi* in the brains of common voles (*Microtus arvalis*) and water voles (*Arvicola terrestris*) by gene amplification techniques in western Austria (Vorarlberg). *Parasitology Research* 107, 469-473
25. **Franzen C.**, Muller A., Hartmann P., Salzberger B. **2004**. Quantitation of microsporidia in cultured cells by flow cytometry. *Journal of the International Society for Advancement of Cytometry* 60: 107-114
26. **Friedman P. A.**, Platzer E. G. **1978**. Interaction of anthelmintic benzimidazoles and benzimidazole derivatives with bovine brain tubulin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) ó General Subjects* 544: 605-614



27. **Galván A.**, Magnet A., Izquierdo F., Fenoy S., Henriques-Gil N., del Aguila C. **2013**. Variability in minimal genomes: Analysis of tandem repeats in the microsporidia *Encephalitozoon intestinalis*. *Infection, Genetics and Evolution* 20: 26-33
28. **Garcia L. S.** **2002**. Laboratory identification of the microsporidia. *Journal of clinical microbiology* 40: 1892-1901
29. **Goldberg A. V.**, Molik S., Tsaousis A. D., Neumann K., Kuhnke G., Delbac F., Vivares C. P., Hirt R. P., Lill R., Embley T. M. **2008**. Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature* 452: 624-628
30. **Graczyk T. K.**, Sunderland D., Rule A. M., da Silva A. J., Moura I. N., Tamang L., Girouard A. S., Schwab K. J., Breyse P. N. **2007**. Urban feral pigeons (*Columba livia*) as a source for air and waterborne contamination with *Enterocytozoon bieneusi* spores. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4357-4358
31. **Groß U.** **2003**. Treatment of microsporidiosis including albendazole. *Parasitology Research* 90: 14-18
32. **Halánová M.**, Cisláková L., Valen áková A., Bálent P., Adam J., Trávní ek M. **2003**. Serological screening of occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in humans and animals in Eastern Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 10: 117-120
33. **Hamamci B.**, Cetinkaya U., Berk V., Kaynar L., Kuk S., Yazar S. **2015**. Prevalence of *Encephalitozoon intestinalis* and *Enterocytozoon bieneusi* in cancer patients under chemotherapy. *Mikrobiyoloji Bulteni* 49: 105-113
34. **Harcourt-Brown F. M.** **2004**. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 13: 86-93
35. **Hartskeel R. A.**, van Gool T., Schuitema A. R. J., Didier E. S., Terpstra W. J. **1995**. Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology* 110: 277-285
36. **Hinney B.**, Sak B., Joachim A., Kvá M. **2016**. More than a rabbit's tale ó *Encephalitozoon* spp. in wild mammals and birds. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 5, 76-87
37. **Hocevar S. N.**, Paddock C. D., Spak C. W., Rosenblatt R., Diaz-Luna H., Castillo I., Luna S., Friedman G. C., Anthony S., Stoddard R. A., Tiller R. V., Peterson T., Blau D. M., Sriram R. R., da Silva A., de Almeida M., Benedict T., Goldsmith C. S., Zaki S. R., Visvesvara G. S., Kuehnert M. J. **2014**. Microsporidiosis acquired through solid organ transplantation: A public health investigation. *Annals of Internal Medicine* 160, 213-220
38. **H rková L.**, Modrý D. **2006**. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. *Veterinary Parasitology* 137: 150-154
39. **Izquierdo F.**, Hermida J. A. C., Fenoy S., Mezo M., Gonzalez-Warleta M., del Aquila C. **2011**. Detection of microsporidia in drinking water, wastewater and recreational rivers. *Water Research* 45: 4837-4843
40. **Jordan C. N.**, Zajac A. M., Lindsay D. S. **2006**. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *VetFolio* 28: 108-116

41. **Ka-íková D.**, Sak B., Kvá M., Ditrich O. **2009**. Sources of potentially infectious human microsporidia: molecular characterisation of microsporidia isolates from exotic birds in the Czech Republic, prevalence study and importance of birds in epidemiology of the human microsporidial infections. *Veterinary Parasitology* 165: 125-130
42. **Katinka M. D.**, Duprat S., Cornillot E., Méténier G., Thomarat F., Prensier G., Barbe V., Peyretailade E., Brottier P., Wincker P., Delbac F., Alaoui H. E., Peyret P., Saurin W., Gouy M., Weissenbach J., Vivarés C. P. **2001**. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414: 450-453
43. **Katzwinel-Wladarsch S.**, Lieb M., Heise W., Loscher T., Rinder H. **1996**. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine and International Health* 1: 373-378
44. **Keeble E.** **2011**. Encephalitozoonosis in rabbits: what we do and don't know. *Practice* 33: 426-435
45. **Keeling P. J.**, Fast N. M. **2002**. Microsporidia: Biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology* 56: 93-116
46. **Kim K.**, Yoon S., Cheun H. I., Kim J. H., Sim S., Yu J. R. **2015**. Detection of *Encephalitozoon* spp. from human diarrheal stool and farm soil samples in Korea. *Journal of Korean Medical Science* 30: 227-232
47. **Künzel F.**, Perschke R., Tichy A., Joachim A. **2014**. Comparison of an indirect fluorescent antibody test with Western blot for the detection of serum antibodies against *Encephalitozoon cuniculi* in cats. *Parasitology Research* 113: 4457-4462
48. **Lallo M. A.**, Calábria P., Bondan E. F., Milanelo L. **2012a**. Identification of *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon* (Microsporidia) spores in stool and urine samples obtained from free-living south american coatis (*Nasua nasua*). *Applied and Environmental Microbiology* 78: 4490-4492
49. **Lallo M. A.**, Calábria P., Milanelo L. **2012b**. *Encephalitozoon* and *Enterocytozoon* (microsporidia) spores in stool from pigeons and exotic birds ó Microsporidia spores in birds. *Veterinary Parasitology* 190: 418-422
50. **Lange C. E.**, Johny S., Baker M. D., Whitman D. W., Solter L. F. **2009**. A new *Encephalitozoon* species (Microsporidia) isolated from the lubber grasshopper, *Romalea microptera* (Beauvois)(Orthoptera: Romaleidae). *Journal of Parasitology* 95: 976-986
51. **Li X.**, Tate K. W., Dunbar L. A., Huang B., Atwill E. R. **2003**. Efficiency for recovering *Encephalitozoon intestinalis* spores from waters by centrifugation and immunofluorescence microscopy. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 50: 579-580
52. **Lom J.** **1972**. On the structure of the extruded microsporidian polar filament. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 38: 200-213
53. **Mal eková B.**, Halánová M., Sulínová Z., Molnár L., Ravaszová P., Adam J., Halán M., Valocký I., Baranovi M. **2010**. Seroprevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon intestinalis* in humans and animals. *Veterinary Science* 89: 358-361
54. **Mal eková B.**, Valen áková A., Molnár L., Ko í-ová A. **2013**. First detection and genotyping of human-associated microsporidia in wild waterfowl of Slovakia. *Acta Parasitologica* 58, 13-17

55. **Mathis A.**, Tanner I., Weber R., Deplazes P. **1999**. Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *International Journal for Parasitology* 29: 767-770
56. **Meredith A. L.**, Cleaveland S. C., Brown J., Mahajan A., Shaw D. J. **2015**. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in wild rodents, foxes and domestic cats in three sites in the United Kingdom. *Transboundary and Emerging Diseases* 62: 148-156
57. **Mertens R. B.**, Didier E. S., Fishbein M. C., Bertucci D. C., Rogers L. B., Orestein J. M. **1997**. *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis: infection of the brain, heart, kidneys, trachea, adrenal glands, and urinary bladder in a patient with AIDS. *Modern Pathology* 10: 68-77
58. **Molina J. M.**, Chastang C., Goguel J., Michiels J. F., Sarfati C., Desportes-Livage I., Horton J., Derouin F., Modai J. **1998**. Albendazole for treatment and prophylaxis of microsporidiosis due to *Encephalitozoon intestinalis* in patients with AIDS: A randomized double-blind controlled trial. *The Journal of Infectious Diseases* 177: 1373-1377
59. **Müller-Doblies U. U.**, Herzog K., Tanner I., Mathis A., Deplazes P. **2002**. First isolation and characterisation of *Encephalitozoon cuniculi* from a free-ranging rat (*Rattus norvegicus*). *Veterinary Parasitology* 107: 279-285
60. **Murphy T. M.**, Walochnik J., Hassl A., Moriarty J., Mooney J., Toolan D., Sanchez-Miquel C., O'Loughlin, McAuliffe A. **2007**. Study on the prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) in rural Ireland. *Veterinary Parasitology* 146: 227-234
61. **Nell B.**, Fuchs-Baumgartinger A., Fritsche J., Borer-Germann S., Thyssen C., Hoffmann I., Hinney B. **2014**. Distribution of *Encephalitozoon cuniculi* infections in the cat resulting in ophthalmological symptoms in Europe. *Veterinary Ophthalmology* 6: 24
62. **Neumayerová H.**, Juránková J., Jeklová E., Kudláková H., Faldyna M., Kovarik K., Jánová E., Koudela B. **2014**. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits from different farming systems. *Veterinary Parasitology* 204: 184-190
63. **Pombert J. F.**, Selman M., Burki F., Bardell F. T., Farinelli L., Solter L. F., Douglas W. W., Weiss L. M., Corradi N., Keeling J. P. **2012**. Gain and loss of multiple functionally related, horizontally transferred genes in the reduced genomes of two microsporidian parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 31: 12638-12643
64. **Rayanud L.**, Delbac F., Broussolle V., Rabodonirina M., Girault V., Wallon M., Cozon G., Vivares C. P., Peyron F. **1998**. Identification of *Encephalitozoon intestinalis* in travelers with chronic diarrhea by specific PCR amplification. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 37-40
65. **Reetz J.** **1994**. Natural transmission of microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) by way of the chicken egg. *Tierärztliche Praxis* 22: 147-150
66. **Rinder H.** **2004**. Transmission of microsporidia to humans: water-borne, food-borne, air-borne, zoonotic, or anthroponotic? *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 54: 54-57

68. **Rönnebäumer K.**, Gross U., Bohne W. **2008**. The Nascent parasitophorous vacuole membrane of *Encephalitozoon cuniculi* is formed by host cell lipids and contains pores which allow nutrient uptake. *Eukaryotic Cell* 7: 1001-1008
69. **Sak B.**, Kvá M., Kv to ová D., Albrecht T., Piálek J. **2011a**. The first report on natural *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. infections in wild East-European house mouse (*Mus musculus musculus*) and West-European house mice (*M. m. domesticus*) in a hybrid zone across the Czech Republic-Germany border. *Veterinary Parasitology* 178, 246-250
70. **Sak B.**, Brady D., Pelikánová M., Kv to ová D., Rost M., Kostka M., Tolarová V., Hrzová Z., Kvá M. **2011b**. Unapparent microsporidial infection among immunocompetent humans in the Czech Republic. *Journal of Clinical Microbiology* 49, 1064-1070
71. **Sak B.**, Petrflková K. J., Kv to ová D., Myná ová A., Shutt K. A., Pobajbíková K., Kalousová B., Modrý D., Benavides J., Todd A., Kvá M. **2013**. Long-term monitoring of microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at different stages of habituation in Dzanga Sangha protected areas, Central African Republic. *PLoS One* 8: e71840
72. **Sak B.**, Petrflková K. J., Kv to ová D., Myná ová A., Pomaajbíková K., Modrý D., Cranfield M. R., Mudakikwa A., Kvá M. **2014**. Diversity of microsporidia, *Cryptosporidium* and *Giardia* in mountain gorillas (*Gorilla beringei beringei*) in Volcanoes National Park, Rwanda. *PLoS One* 9: e109751
73. **Scurell E. J.**, Holding E., Hopper J., Denk D., Fuchs-Baumgartinger A., Silbermayi K., Nell B. **2015**. Bilateral lenticular *Encephalitozoon cuniculi* infection in a snow leopard (*Panthera uncia*). *Veterinary Ophthalmology* 18: 143-147
74. **Selman M.**, Pombert J. F., Solter L., Farinelli L., Weiss L. M., Corradi N. **2011**. Acquisition of an animal gene by microsporidian intracellular parasites. *Current Biology Eukaryotic Cell* 12: 496-502
75. **Sheikh R. A.**, Prindiville T. P., Yenamandra S., Munn R. J., Ruebner B. H. **2000**. Microsporidial AIDS cholangopathy due to *Encephalitozoon intestinalis*: case report and review. *American Journal of Gastroenterology* 95: 2364-2371
76. **Schwartz D. A.**, Sobotka I., Leitch G. J., Cali A., Visvenara G. S. **1996**. Pathology of microsporidiosis emerging parasitic infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 120: 173-188
77. **Siksi E.** **2003**. Environmental contamination with protozoan parasite infective stages: Biology and risk assessment. *Acta Microbiologica Polonica* 52: 97-107
78. **Slodkiewicz-Kowalska A.**, Graczyk T. K., Tamang L., Jedrzejewski S., Nowosad A., Zduniak P., Solarczyk P., Girouard A. S., Majewska A. C. **2006**. Microsporidian species known to infect humans are present in aquatic birds: Implications for transmission via water? *Applied and Environmental Microbiology* 72: 4540-4544
79. **Soule J. B.**, Halverson A. L., Becker R. B., Pistole M. C., Orenstein J. M. **1997**. A patient with acquired immunodeficiency syndrome and untreated *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* microsporidiosis leading to small bowel perforation.
80. **Suter C.**, Müller-Doblies U. U., Hatt J. M., Deplazes P. **2001**. Prevention and treatment of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits with fenbendazole. *Veterinary Record* 148: 478-480

81. **Talabani H.**, Sarfati C., Pillebout E., van Gool T., Derouin F., Menotti J. **2010**. Disseminated infection with a new genovar of *Encephalitozoon cuniculi* in renal transplant recipient. *Journal of Clinical Microbiology* 48: 2651-2653
82. **Therese K. L.**, Jayanthi U., Madhavan H. N. **2005**. Application of nested polymerase chain reaction (nPCR) using MPB 64 gene primers to detect *Mycobacterium tuberculosis* DNA in clinical specimens from extrapulmonary tuberculosis patients. *Indian Journal of Medical Sciences* 122: 165-170
83. **Tsaousis A. D.**, Kunji E. R. S., Goldberg A. V., Lucocq J. M. , Hirt R. P., Embley M. T. **2008**. A novel route for ATP acquisition by the remnant mitochondria of *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 453: 553-556
84. **Tsukada R.**, Tsuchiyama A., Sasaki M., Park C. H., Fujii Y., Takesue M., Hatai H., Kudo N., Ikadai H. **2013**. *Encephalitozoon* infections in rodentia and soricomorpha in Japan. *Veterinary Parasitology* 198, 193-196
85. **van Gool T.**, Dankert J. **1995**. Human microsporidiosis: clinical, diagnostic and therapeutic aspects of an increasing infection. *Clinical Microbiology and Infection* 1: 75-85
86. **Vávra J.**, Larsson J. I. R. **1999**. Structure of the microsporidia. *Microsporidia and Microsporidiosis*, American Society for Microbiology Press, Washington D. C., 7-84
87. **Velásquez J. N.**, Chertcoff A. V., Etchart C., di Risio C., Campos S., Cucher M. A., Carnevale S. **2012**. First case report of infection caused by *Encephalitozoon intestinalis* in a domestic cat and a patient with AIDS. *Veterinary Parasitology* 190: 583-586
88. **Wágnerová P.**, Sak B., Květoňová D., Buřtová Z., Civičková H., Maršálek M., Květa M. **2012**. *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon cuniculi* in horses kept under different management systems in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology* 190: 573-577
89. **Waller T.** **1979**. Sensitivity of *Encephalitozoon cuniculi* to various temperatures, disinfectants and drugs. *Laboratory Animals* 13: 227-230
90. **Weber R.**, Deplazes P., Flepp M., Mathis A., Baumann R., Sauer B., Kuster H., Luthy R. **1997**. Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine* 336: 474-478
91. **Weidner E.** **1972**. Ultrastructural study of microsporidian invasion into cells. *Parasitology Research* 40: 227-242
92. **Wright J. H.**, Craighead E. M. **1922**. Infectious motor paralysis in young rabbits. *Journal of Experimental Medicine* 16: 135-140
93. **Xiao L.**, Li L., Moura H., Sulaiman I., Lal A. A, Gatti S., Scaglia M., Didier E. S., Visvesvara G. S. **2001**. Genotyping *Encephalitozoon hellem* isolates by analysis of the polar tube protein gene. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 2191-2196
94. **Zanet S.**, Palese V., Trisciuglio A., Alonso C. C., Ferroglio E. **2013**. *Encephalitozoon cuniculi*, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infection in invasive Eastern Cottontail Rabbits *Silvilagus floridanus* in Northwestern Italy. *Veterinary Parasitology* 197: 682-684

## Internetové odkazy

1. [borelioza.cz/cs/test\\_western\\_blot](http://borelioza.cz/cs/test_western_blot) (stařeno 23. 10. 2016)
2. [svujihlava.cz/28-diagnosticke-metody.html](http://svujihlava.cz/28-diagnosticke-metody.html) (stařeno 23. 10. 2016)
3. [clione.ne.jp/~sample/sentan/manual/Eng/IFAT.pdf](http://clione.ne.jp/~sample/sentan/manual/Eng/IFAT.pdf) (stařeno 23. 10. 2016)
4. Detailní protokol p ilofný k izola nímu kitu UltraClean® Tissue & Cells DNA Isolation Kit, [mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12334-S.pdf](http://mobio.com/media/wysiwyg/pdfs/protocols/12334-S.pdf) (stařeno 9. 10. 2016)
5. Detailní protokol p ilofný k izola nímu kitu DNeasy Blood & Tissue Kit [qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit/#orderinginformation](http://qiagen.com/us/shop/sample-technologies/dna/genomic-dna/dneasy-blood-and-tissue-kit/#orderinginformation) (stařeno 28. 1. 2016)
6. [cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-metody\\_molekularni\\_biologie&lang=cz50](http://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-metody_molekularni_biologie&lang=cz50). (stařeno 23. 10. 2016)
7. [www.turistika.cz/fotogalerie/42295/jistebnicke-rybniky](http://www.turistika.cz/fotogalerie/42295/jistebnicke-rybniky) (stařeno 22. 12. 2016)