

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

# **Krevní paraziti ryb na Svalbardu**

Diplomová práce

**Bc. Iva Pospíšilová**

Školitel: doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Školitel specialista: RNDr. Tomáš Tymel

České Budějovice 2014

**Pospíšilová, I., 2014:** Krevní paraziti ryb na Svalbardu. [Blood parasites of fish from Svalbard. Mgr. Thesis, in Czech.] – 78 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

This thesis reviews knowledge about diversity of blood parasites of fish. Blood smears of fish used in this study were obtained in Billefjorden (Svalbard archipelago, Arctic). *Desseria myoxocephali*, the type species of *Desseria*, is the only one parasite that was found in the smears. A partial 18S rDNA sequence of *D. myoxocephali* was prepared and phylogenetic analyses were computed. *D. myoxocephali* forms a lineage together with *Dactylosoma ranarum* and *Babesiosoma stableri* within adeleorinid clade.

**Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.**

**Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.**

České Budějovice, 12. 12. 2014

Iva Pospíšilová

Touto cestou bych chtěla poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Olegu Ditrichovi za zadání zajímavého tématu diplomové práce, za odborné vedení a trpělivost. Můj obrovský dík patří také RNDr. Tomáši Tymlovi za jeho cenné rady, pomoc a poskytnuté fotografie ryb. Oběma také děkuji za poskytnutý materiál. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Mgr. Martinovi Kostkovi, PhD. za pomoc při navrhování prumerů. Diplomová práce byla také podpořena projekty LM2010009 Czech Polar (MŠMT) a CZ.1.07/2.2.00/28.0190 (EU).

## Obsah:

<b>1. Úvod</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Studování hostitelé</b>	<b>2</b>
<i>1.1.1. Boreogadus saida</i>	2
<i>1.1.2. Clupea harengus</i>	4
<i>1.1.3. Gadus morhua</i>	5
<i>1.1.4. Myoxocephalus scorpius</i>	7
<i>1.1.5. Gymnocanthus tricuspis</i>	8
<b>1.2. Imunitní systém ryb</b>	<b>9</b>
<b>1.3. Krevní paraziti ryb</b>	<b>13</b>
<i>1.3.1. Trypanosoma</i>	14
<i>1.3.2. Trypanoplasma</i>	16
<i>1.3.3. Sanguinicolidae</i>	19
<i>1.3.4. Myxosporea</i>	22
<b>1.3.5. Apikomplexa</b>	<b>23</b>
<i>1.3.5.1. Babesiosoma a Dactylosoma</i>	25
<i>1.3.5.2. Haemogregarina</i>	26
<i>1.3.5.3. Desseria</i>	30
<b>2. Cíle práce</b>	<b>32</b>
<b>3. Materiál a metody</b>	<b>33</b>
<b>3.1. Materiál</b>	<b>33</b>
<b>3.2. Metody</b>	<b>34</b>
<b>3.3.1. Mikroskopická diagnostika</b>	<b>34</b>
<b>3.3.2. Molekulární metody</b>	<b>34</b>
<b>4. Výsledky</b>	<b>41</b>
<b>5. Diskuse</b>	<b>48</b>
<b>6. Souhr</b>	<b>52</b>
<b>7. Seznam použité literatury</b>	<b>53</b>



# 1. Úvod

Svalbard je souostroví ležící v Severním ledovém oceánu severně od kontinentální Evropy (**Obr. 1**), přibližně uprostřed mezi Norskem a Severním pólem ( $78^{\circ}0'$  s.š.,  $16^{\circ}0'$  v.d). Skládá se z ostrovů Spitsbergen, Nordaustlandet, Barentsøya, Edgeøya, Kong Karls Land, Hopen, Prins Karls Forland, Bjørnøya. Okolo 60 % tohoto souostroví je pokryto ledovcem, který je na ústupu již od ukončení „malé doby ledové“ od konce 19. století. Tímto táním se vytváří v různých částech Svalbardu fjordy (Hagen a kol. 1993, Svendsen a Mangerud 1997). Podnebí oblasti je modifikováno teplým Západním Špicberským proudem, vzhledem k jeho severní poloze je tedy relativně mírné. Průměrná denní teplota se pohybuje kolem  $6,5^{\circ}\text{C}$ . Nejteplejšími měsíci jsou červenec a srpen, kdy teplota dosahuje  $5 - 6^{\circ}\text{C}$ . V zimě klesá teplota až na  $-14^{\circ}\text{C}$ , zem je pokryta ledem a sněhem a převládá tma (Rachlewicz 2003).



Obr. 1: Souostroví Svalbard (převzato z Earth – site: URL1, převzato z National Geographic: URL2).

V porovnání s mírným podnebím je na Svalbardu nízká druhová rozmanitost. Nicméně druhy, které se zde vyskytují, jsou v hojném počtu. Během teplých měsíců pozorujeme

početná hejna mořských ptáků, kteří odlétají na zimní měsíce do teplejších krajín. V zimní přírodě zůstávají jen nejodolnější druhy živočichů, jako jsou medvědi lední, lišky polární mroži, tuleni a bělokuři. Druhy, které zde žijí, se musely přizpůsobit extrémním podmínkám, kde je největší výzvou získání potravy pro přežití a reprodukci (Overrein 2009). Jedním ze zdrojů potravy pro ostatní živočichy jsou ryby, které obývají rozlehlé fjordy a moře kolem souostroví. Mezi druhy, které v těchto vodách žijí, patří *Boreogadus saida*, *Clupea harengus*, *Gadus morhua*, *Gymnocathus tricuspis* nebo *Myoxocephalus scorpius* (Gulliksen 1999). Je tedy zřejmé, že život v moři a na pevnině jsou úzce spjaty a to nejen potravním řetězcem.

## 1.1. Studování hostitelé

### 1.1.1. *Boreogadus saida* - Treska polární

Řadíme ji do třídy Actinopterygii (paprskoploutví), řádu Gadiformes (hrdloploutví), čeledi Gadidae (treskovití) a rodu *Boreogadus* (Bailly 2014).



Obr. 2: *Boreogadus saida* (foto:Tomáš Týmł)

Treska polární (**Obr. 2**) je pravděpodobně jednou z nejrozšířenějších ryb Arktidy, kde se také stala nejhojnější potravou pro mořské ptáky, savce a větší ryby. Vyskytuje se v Severním Atlantiku, konkrétně v Bílém moři, na Islandu, v okolí jižního Grónska po řeku Miramichi

a Nový Brunswik v Kanadě. Dále v Severním Pacifiku v Beringově moři, v okolí ostrova Pribilof a Bristolského zálivu (Cohen 1990).

V Arktickém mořském ekosystému zaujímají důležitou roli v potravním řetězci mezi základní kořistí a nejvyššími obratlovčími dravci jako jsou velryby, tuleni a mořští ptáci (Boekelheide 1980, Lowry a Frost 1981). Tuto roli zaujímají díky tomu, že jsou jednou z energeticky nejbohatších kořistí v Arktidě (Elliott a Gaston 2008).

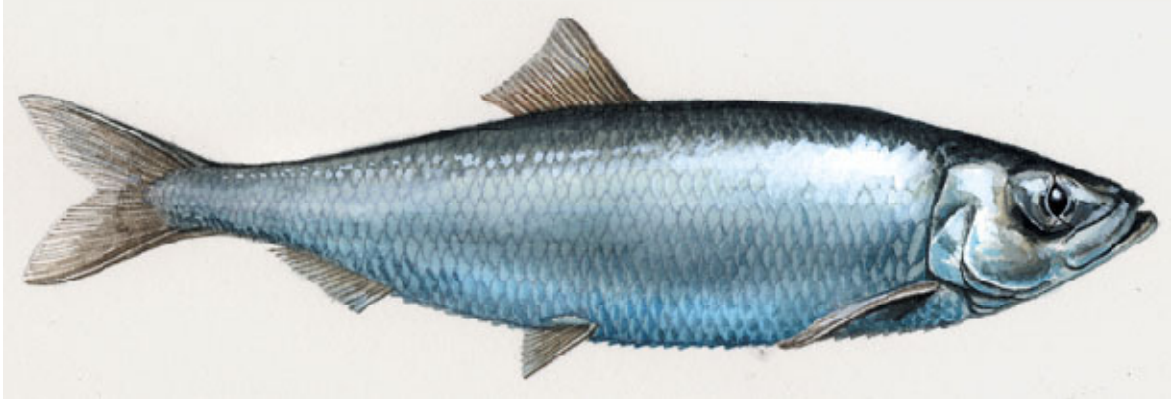
Často agregují do obrovských hejn, která obsahují stovky jedinců (Benoit a kol. 2008). Mladé i dospělé tresky se zdržují ve vodě, která má více jak  $-1,4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Benoit 2014). Vyskytují se v hloubkách 0 – 60 m, což platí pro mladší jedince. Dospělé tresky nalézáme v hloubkách několika stovek metrů, nejčastěji okolo 200 – 400 m (Benoit 2014). Velmi zřídka je spatříme na otevřené vodní hladině, neboť jejich typickým habitatem jsou místa obložená ledovými krami nebo díry v tajícím ledu či v trhlinách (Loone a Gulliksen 1989).

V polovině prosince jsou ryby březí, tedy asi měsíc před samotným třením, které probíhá v zimě od prosince do března (Bain a Sekerak 1978, Craig a kol. 1982). Larvy se vyvíjejí 45 – 90 dní (Rass 1968), k jejich přeměně v juvenilní stádia dochází při dosažení délky 30 – 50 mm. Ve věku jednoho roku dosahují velikosti 60 – 100 mm, kdy už jsou téměř dospělí, neboť dospělí jedinci dosahují velikosti 300 – 380 mm (Rass 1968, Hognestad 1968, Sekerek 1982).

Rozmanitost potravy je sezónní v závislosti na distribuci kořisti. V období, kdy je voda pokryta ledem, se primárně živí pozdními stádii pelagického zooplanktonu (Lowry a Frost 1981, Craig a kol. 1982, Lonne a Gulliksen 1989). V jejich žaludku nalezneme buchanky (*Calanus glacialis*, *Metridia longa*), které představují významný příjem uhlíku pro ryby (Bradstreet a kol. 1986, Benoit a kol. 2010). Další důležitou, ale poněkud příležitostnou složkou potravy jsou různonožci (Benoit a kol. 2010).

### 1.1.2. *Clupea harengus* – Sled' obecný

Řadíme jej do třídy Actinopterygii (paprskoploutví), řádu Clupeiformes (bezostní), čeledi Clupeidae (sled'ovití) a rodu *Clupea* (Bailly 2014).



Obr. 3: *Clupea harengus* (převzato z Animal Diversity Web: URL3).

Nachází se v zóně pelargických mořských vod, ale také v pobřežních oblastech. Běžní jsou v severním Atlantiku, kde je lze spatřit od jihozápadního Grónska a Labradoru na jih k Jižní Karolíně. Dále jsou hojní ve východní části Severního Atlantiku, zejména v pásmu od Islandu a severního Grónska jižně k Biskajskému zálivu a na východ ke Špicberkům, Nové Zemi v Rusku včetně Baltského moře (Whitehead 1985).

Sledi dorůstají přibližně 39 cm, ale dospívají už při dosažení 25 – 27 cm (O'Brien a kol. 1993). Maximální věk se pohybuje mezi 15 – 18 lety (Anthony 1972). Barva těla je temně ocelově modrá nebo zelenavě modrá, stříbrné boky a břicho. Břišní a řitní ploutve jsou průsvitně bílé. Prsní ploutve jsou podél horního okraje tmavé stejně jako ocasní a hřbetní ploutvičky (Bigelow a Schroeder 1953).

Sledi obecní (**Obr. 3**) agregují do obrovských hejn (sta až tisíce jedinců) během pozdního léta a časného podzimu. Hejna se pohybují mezi místem tření a zimovištěm v pobřežních oblastech nebo kolem území, kde shání potravu. Mladí jedinci se nacházejí na mělčině poblíž pobřeží, zatímco dospělí jedinci se vyskytují spíše na moři, kde tráví den v hlubší vodě (Whitehead 1984). Během noci se shromažďují v mělčích oblastech. Světlo je pro ně důležitým faktorem při kontrolování jejich vertikální distribuce (Whitehead 1985).

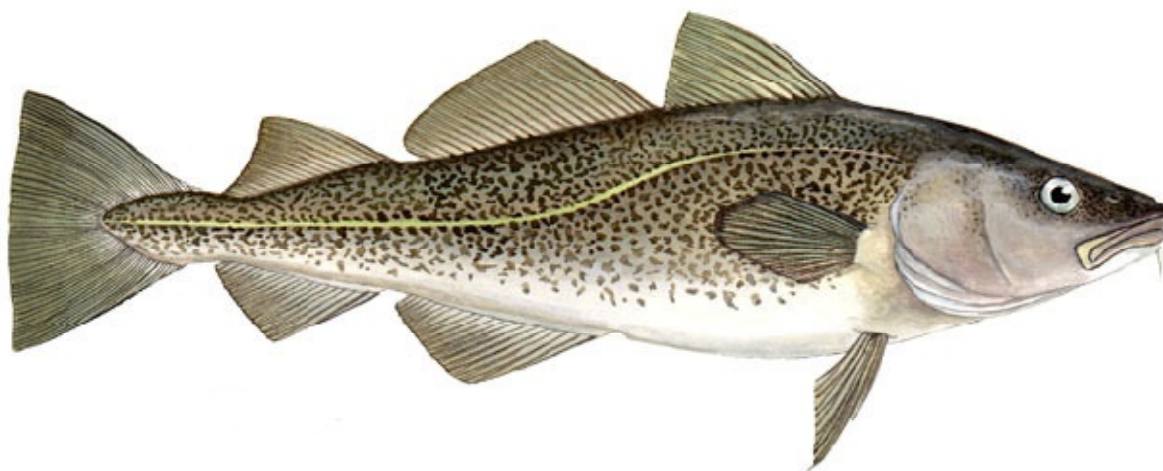
Období tření probíhá během jara a podzimu, kdy se obrovská hejna sled'ů shromažďují u dna, kde samice provádí specializované pohyby a kladou vajíčka na podloží, po té samci uvolňují do okolí mlíčí a dochází k oplodnění (Haegeler a Schweigert 1985). Nakladená vajíčka vyvíjejí mírně negativní vztlak a rychle se k sobě lepí, postupně z nich vzniká jakási

jednotná vícevrstevná podložka z 5 – 10 vrstev (Napier 1993). Toto seskupování a lepení se k sobě může mít za důsledek vysokou mortalitu vajíček ve spodní vrstvě z nedostatku kyslíku (Holst a kol. 2004). Samička obvykle naklade 10 tisíc – 60 tisíc vajíček, jejich vylíhnutí trvá přibližně 3 týdny v závislosti na teplotě, která je také hlavním faktorem určující dobu tření (Berenbeim a Sigaev 1978). Při vyšších teplotách dochází k dřívějšímu tření i líhnutí (Lambert 1987).

Jídelníček těchto ryb zahrnuje plankton, hlemýždě, rozsivky, krevety i larvy desetinožců. Sami jsou potravou mnoha predátorů, jako například tresek, makrel, tuňáků, lososů, tuleňů, velryb i lidí (Bigelow a Schroeder 1953, Whitehead 1985).

### 1.1.3. *Gadus morhua* – Treska obecná

Řadíme ji do třídy Actinopterygii (paprskoploutví), řádu Gadiformes (hrdloploutví), čeledi Gadidae (treskovití) a rodu *Gadus* (Bailly 2014).



Obr. 4: *Gadus morhua* (převzato z Animal Diversity Web: URL3).

Vyskytuje se v oblastech severního Atlantiku a Arktidy, přesněji v zálivu Ungava v Kanadě, podél severoamerického pobřeží až k mysu Hatteras, dále v Severní Karolíně v západním Atlantiku. Pozorovat ji lze i v okolí východního a západního pobřeží Grónska, kolem Islandu, Barentsova moře včetně oblasti okolo Medvědího ostrova podél Evropského pobřeží po Biskajský záliv (Narberhaus a kol. 2012).

Treska obecná (**Obr. 4**) je jednou z komerčně nejvýznamnějších ryb Severního Atlantiku a hraje klíčovou roli v několika ekosystémech (Ottersen a kol. 2006). Je to ryba, která se drží



při dně a její distribuce je závislá spíše na výskytu kořisti než na teplotě. Žije skoro ve všech vodách, od téměř sladké až po oceánskou vodu v širokém rozsahu teplot – od mrznoucí až k 20 °C vodě (Reide 2004).

Tento druh ryby je rozšířen v různých biotopech, od pobřeží po kontinentální šelf. Vzácně se nachází v hloubkách až 600 m, ale nejvíce se vykytují v hloubkách okolo 150 – 200 m. Jedná se o ryby, které spatříme spíše na otevřeném moři, tedy jedná – li se o dospělé jedince; nedospělí jedinci preferují mělčiny v sublitorální vodě se členitými stanovišti, která jsou poseta mořskou trávou, oblastmi se šterkem a kameny, jež poskytují ochranu před predátory. Během dne tvoří hejna shlukující se v hloubce 30 – 80 m nade dnem a v noci se rozptylují za účelem krmení. Některé skupiny malých tresek jsou relativně stabilní, co se místa týče, ovšem někteří jednotlivci i skupiny mohou migrovat na velmi dlouhé vzdálenosti. Jedinci migrují z rodných vod a někdy se ani nevrátí, leckdy urazí až 5 km za den (Cohen a kol. 1990, Uzars a Plikshs 2000).

Období tření začíná během pozdního podzimu a trvá až do dubna či května následujícího roku (Auditore a kol. 1994). Během období tření se samci a samice shlukují do velkých hejn, ve kterých samice opakovaně kladou jikry v období 1 – 2 měsíců od oplodnění. Samice nakladou v průměru 8 vajíček v rozmezí od 1 do 19 vajíček na samici (Kjesbu 1989). Produkce vajíček a zásoba spermií přesně koreluje s velikostí jedinců (Oosthuizen a Dann 1974).

Strava tresky obecné se dá popsat jako příležitostná, neboť se živí vším, co je schopna zachytit. V larválním stádiu se živí malými organismy, především zooplanktonem. Nedospělí jedinci pojídají krevety a jiné malé koryše. Dospělé tresky konzumují chobotnice, mušle, škeble, ostnokožce, pláštěnce, mnohoštětinatce a dokonce i malé ryby svého druhu. Se zdrojem potravy zřejmě souvisí i barva těchto ryb. Ryby, které se živí koryši, mají nahnědlou barvu, u modrozelených převládají v jídelníčku ryby (Cohen 1990, Reide 2004).

#### 1.1.4. *Myoxocephalus scorpius* – Vranka mořská

Řadíme ji do třídy Actinopterygii (paprskoploutví), řádu Scorpaeniformes (ropušnicotvární), čeledi Cottidae (vrankovití) a rodu *Myoxocephalus* (Bailly 2014).



Obr. 5: *Myoxocephalus scorpius* (foto: Tomáš Tymel).

*Myoxocephalus scorpius* (Obr. 5) je běžný, široce rozšířený druh ryby pobřežních oblastí Severního a východního Atlantiku zahrnující jihovýchodní pobřeží Grónska, ostrov Jan Mayen, Island až po Britské ostrovy, na jih od Biskajského zálivu, Severní moře, Baltské moře, Špicberky a jižní část Barentsova moře. Dále ji nalzáme v západním Atlantiku v Jamesonově zálivu v Kanadě a pobřežních oblastech okolo New Yorku (Robins 1986).

Patří mezi bentické druhy (Coad a Reist 2004), nacházejí se u dna na skalnatém podloží pokrytém pískem či blátem, dále je pozorujeme mezi přisedlými řasami (Fedorov 1986) v hloubkách od 0 – 451 metrů. Během léta se drží v pobřežních oblastech a v zimě se přesouvají do hlubších míst (Parin a kol. 2002).

Mají celkem 7 - 11 hřbetních trnů a 13 – 19 měkkých hřbetních paprsků. Na jejich těle se nenachází žádné anální trny, ale měkké paprsky ano (9 – 15). Bývají zelenavě hnědé s tmavými skvrnami a mléčně bílými skvrnami nad prsní ploutví. Spodní část těla samců je zbarvena červeně a samic oranžově s bílými skvrnami, toto zbarvení ještě více vyniká v době tření (Fedorov 1986).

Tření probíhá v období pozdního podzimu až do jara v závislosti na geografickém rozšíření druhu, například jedinci žijící v Baltském moři se troy od pozdního listopadu přes prosinec až do března, v té době kladou vajíčka o průměru 2,4 mm mezi skály a řasy (Ennis 1970, Lamp 1966). Naproti tomu, jedinci pocházející z Bílého moře kladou vejce o průměru 2 – 2,5 mm od listopadu do ledna (Pavlov a kol 1992). Dospělost samic je také různá dle

rozšíření, některé dospívají už ve věku jednoho roku, jiné až ve dvou letech (Luksenburg a Pedersen 2002). Nakladená vajíčka od jedné nebo více samic střeží jeden sameček, ten může hlídat i dvě snůšky vajíček od jedné samice (Ennis 1970).

Živí se jinými rybami, velkými korýši, příležitostně mnohoštětinatci a různonožci (Fedorov 1986).

Vranky obecně patří mezi hostitele mnoha parazitů. Na žábrách a v zažívacím traktu jsou velmi často přítomna Trematoda, mezi která řadíme *Podocotyle* spp. nebo zástupce čeledi Hemiuridae (Komendová 2014). Dále u nich nacházíme parazity patřící mezi Nematoda, např. *Anisakis* spp. (Petrushevski a Kogteva 1954). V zažívacím traktu se také vyskytuje *Diplocotyle olrikii*, který náleží mezi Cestoda (Komendová 2014). Na žábrách jsou často přítomni zástupci kmene Ciliophora, konkrétně rod *Trichodina* (Khan 2011, Komendová 2014). Ve žluči byli nalezeni zástupci kmene Myxozoa, například *Ceratomyxa longispina* nebo *Myxidium incurvatum* (Khan 2011).

### 1.1.5. *Gymnocanthus tricuspis* – Vranka severní

Řadíme ji do třídy Actinopterygii (paprskoploutví), řádu Scorpaeniformes (ropušnicotvární), čeledi Cottidae (vrankovití) a rodu *Gymnocanthus* (Bailly 2014).



Obr. 6: *Gymnocanthus tricuspis* (foto: Tomáš Týmł).

Vranky severní nacházíme v okolí Arktidy, v severovýchodním až severozápadním Atlantiku, zálivu Svatého Vavřince v Kanadě a vzácně v okolí Maine v USA. V severovýchodním Atlantiku jsou to konkrétně oblasti východního pobřeží Grónska, Islandu,



severního pobřeží Norska po Bílé a Barentsovo moře, dále Špicberky a souostroví Nová Země (Fedorov 1986).

*Gymnocanthus tricuspis* (**Obr. 6**) se nachází v hloubkách 0 – 451 m. (Parin a kol. 2002), kde se teplota vody pohybuje od – 2 do 13 °C (Fedorov 1986).

Dosahují maximální délky 300 mm (Andiyashev 1964) a mají tvar těla typický pro vranky s velkou hlavou a širokými ústy. Tělo je tmavé s černými skvrnami na bocích, které tvoří dva černohnědé pruhy. Samice mají světle nažloutlý spodek těla a břicho samců je pokryto oblými bílými skvrnami. Ocasní, řitní a prsní ploutve jsou světlé u obou pohlaví (Fedorov 1986).

Žijí v doupatech v písku a na bahnitopísčitých dnech, kde se živí malými bentickými různonožci a mnohoštětinatci (Fedorov 1986).

Stejně jako ostatní vranky i *Gymnocanthus tricuspis* je významným hostitelem mnoha parazitů (viz. paraziti *Myoxocephalus scorpius*).

## 1.2. Imunitní systém ryb

Základní funkcí imunitního systému je chránit organismus před infekcí. Pokud jde o ryby, tak fyziologie i imunita jsou ovlivňovány sezónními změnami (časové změny) v souvislosti se změnami abiotických faktorů (teplota vody) a interakcí s patogeny a parazity (Rohlenová a kol. 2011).

Imunitní odpověď ryb je stejně jako u člověka dvou typů (**Obr. 7**), prvním typem je přirozená neboli nespecifická imunita, která je považována za základní prvek v boji proti patogenům díky omezení adaptivního imunitního systému, poikiloternní povaze ryb, omezenému repertoáru protilátek a pomalé proliferaci paměťových lymfocytů (Whyte 2007). Obecně je tento typ imunity rozdělen do tří oddílů zahrnujících epiteliální/slizniční bariéry, humorální faktory (buněčné receptory, molekuly obsažené v plasmě a tkáňových tekutinách) a buněčné komponenty (Magnadottir 2006, Subremanian a kol. 2007, Subramanian a kol. 2008).

Úplně první obranou ryb je fyzikální bariéra v podobě kůže, která se neustále stýká s patogeny, jež se pohybují volně ve vodě, kde ryby žijí (Esteban 2012). Kožní sliz obsahuje lektiny, C – reaktivní protein, lysozym, proteiny komplementu, hemolysiny a imunoglobulin M, který hraje důležitou roli při inhibici vstupu patogenů (Yano 1997). Epidermis je schopný reagovat na různé útoky zhuštěním a buněčnou hyperplazií. Svojí integritou je nezbytný pro

osmotickou rovnováhu a prevenci vstupu cizího agens. Kůže chrání nejen před vstupem patogenů, ale i před únikem vody, rozpuštěných látek a živin (Kubo 2011, Esteban 2012).

Mezi první linii obrany patří také *tool – like* receptory (TLR), jež jsou rozpoznány receptory (PRPs) podílejících se na rozpoznání patogenů na základě jejich spojení s molekulárními vzory (PAMP). Aktivují imunitní odpověď hostitele. U ryb bylo doposud rozeznáno okolo 17 TLR, z nichž každý má svou vlastní specifitu pro rozpoznání patogenů (Uma a kol. 2012).

Dalším obranným mechanismem je nespecifická buněčná cytotoxicita, kterou u ryb zajišťují buňky svou funkcí podobné buňkám (Natural killers - NK) u savců specifické pro tento typ obrany (Evans a Jaso – Friedmann 1992). Tyto buňky se nazývají nespecifické cytotoxické buňky (NCC). Podobnost s buňkami savčími je v typu cílových buněk sensitivních k lýze, v mechanismu rozpoznání cílových buněk, požadavcích na komplementový lytický cyklus. Podobně jako NK buňky vyžadují NCC buňky kontakt s cílovou buňkou, na kterou je namířena cytotoxicita. Jejich výhoda spočívá v tom, že je zapotřebí menší množství těchto buněk a méně času na zabití cílové buňky (Evans a Jaso – Friedmann 1992).

Jedním z nejdůležitějších procesů u poikilotermních živočichů je fagocytóza, neboť je nejméně ovlivněna teplotou (Blazer 1991, Lange a Magnadottir 2003, Magnadottir a kol. 2005). Mezi hlavní buňky fagocytózy patří neutrofilie a makrofágy (Secombes a Fletcher 1992), jež odstraňují bakterie především produkcí forem reaktivního kyslíku. Neutrofilie produkují myeloperoxidázu ve svých cytoplazmatických granulích, které v přítomnosti halogenidu a peroxidu vodíku zabíjejí bakterie halogenací jejich buněčné stěny (Fischer a kol. 2006).

Stejně jako u vyšších obratlovců i u ryb nechybí v imunitní odpovědi komplement, který je aktivován třemi cestami – klasickou (aktivována vazbou protilátky na buněčný povrch) (Holland a Lambris 2002), alternativní (aktivována přímo mikroorganismy) a lektinovou (aktivována vazbou proteinového komplementu sestávajícího z mannosy/mannanu vázajícího lektin v bakteriálních buňkách) (Sakai 1992). Nejdůležitější z těchto tří cest je alternativní cesta (Yano 1996).

Další složkou nespecifické imunity je Tumor necrosis faktor (TNF).  $TNF\alpha$  a  $TNF\beta$  jsou důležitými aktivátory makrofágů vedoucí ke zvýšení respirační aktivity, fagocytóze produkci oxidu dusnatého (Mulero a Meseguer 1998, Taffalla a kol. 2001, Yin a kol. 1997).

U ryb jsou také přítomny interferony, které nehrají roli v imunitě proti parazitům, ale projevují se u virových infekcí (Robertsen 2006). Interleukiny regulují imunitní odpověď stimulací T- buněk (Magnadottir 2010, Mathew a kol. 2002).

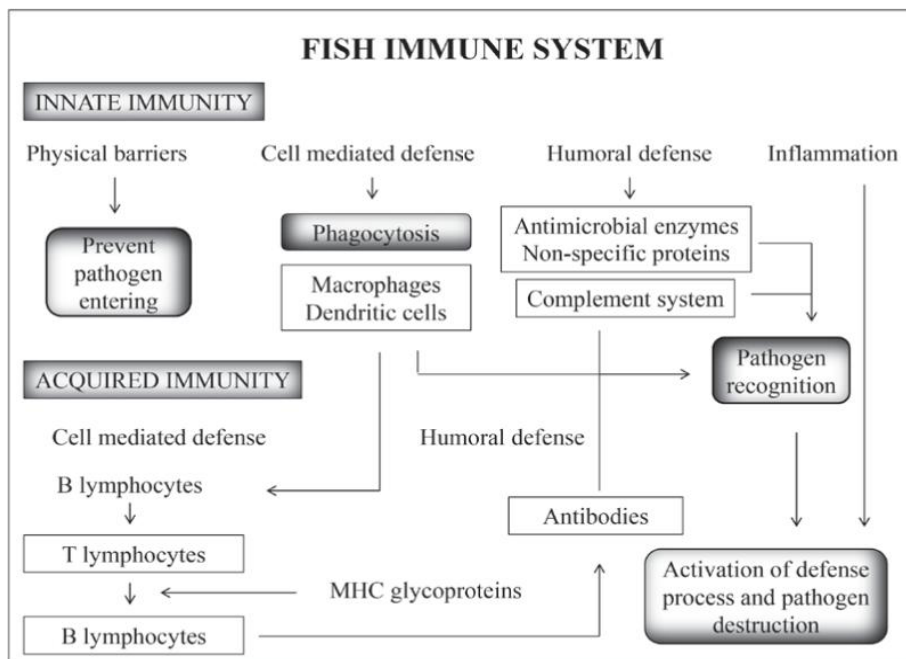
Důležitou složkou imunity je lyzozym, který se vyskytuje v séru, kožním slizu a tkáních bohatých na leukocyty (ledviny a střeva) (Grinde a kol. 1988, Lie a kol. 1989). Vyvolává opsonizaci komplementu a fagocytózu buněk (Magnadottir 2006).

Poslední složkou nespecifické imunity jsou C – reaktivní protein (CRP) a amyloidní proteiny séra, které se zvyšují při zranění, traumatu nebo infekci (Cook a kol. 2003).

Druhým typem imunity je specifická imunitní odpověď, ke které dochází prostřednictvím mechanismů zahrnující kompletní síť specializovaných buněk, proteinů, genů a biochemických zpráv (Uribe a kol. 2011).

Nejdůležitějším imunoglobulinem u ryb je tetramerní imunoglobulin M (IgM) (Acton a kol. 1971). Některé z ryb mají tento imunoglobulin ještě v podobě monomeru obsaženého v séru, ovšem faktory vedoucí k jeho projevu jsou dosud neznámy (Wilson a Warr 1992). Druhým imunoglobulinovým isotopem identifikovaným u ryb je IgD (Wilson a kol. 1997). Hladina protilátek je závislá u některých ryb (např. *Gadus morhua*) na teplotě a kvalitě vody v různých obdobích (Magnadottir a kol. 1999, Sanchez a kol. 1993). Protilátky u ryb nalézáme na kůži (Hatten a kol. 2001), ve střevech (Rombout a kol. 1986), v žábrovém slizu (Lumsden a kol. 1993) a ve žluči (Jenkins a kol. 1994).

Imunologická paměť je také velmi důležitá. U ryb se rozvíjí ještě před druhým setkáním s antigenem (Arkoosh a Kattari 1991). Počet antigen specifických B buněk je přímo úměrný frekvenci prekurzorů antigen specifických B buněk. T buňky, užívající specifický receptor, rozpoznávají patogeny pouze ve spojení s MHC markery na APC. Rozpoznání vede k produkci paměťových T buněk, což bude přetrvávat po infekci, tyto buňky budou připraveny k opětovnému setkání. MHC na povrchu buněk je klíčovým nástrojem odmítání patogenů. MHC I je primárně zahrnut v odpovědi proti virovým proteinům. MHC II je vyjádřen specifickým APC a je zahrnut v presentování opsonizace a degradace patogenů B a T buňkami (Magnadotti 2010).



Obr. 7: Schéma imunitního systému ryb (Biller – Takahashi, Urbinati 2014).

Imunitní systém je pro život ryb nezbytný, neboť parazité se vyskytují ve všech živých taxonech a zahrnují nejméně jednu třetinu veškerého eukaryotického života na Zemi (DeMeeus a Renaud 2002), což vede k neuvěřitelnému rozsahu adaptací a obrovské rozmanitosti hostitelských prostředí (Cornell a kol. 1999).

Parazité hrají významnou roli ve vývoji svých hostitelů (Boots a kol. 2009), přispívají například ke ztrátě fitness způsobené vykořisťováním hostitele, to vede v konečné fázi k tzv. závodům ve zbrojení, které řídí evoluční změny v obou interagujících organismech (Hochberg a kol. 1992, Moller a kol. 2004, Paterson a kol. 2010). Genotypové a fenotypové změny v hostiteli i parazitovi jsou zodpovědné za vznik koadaptivních procesů (Gandon a kol. 1996). Využívání hostitele parazitem může vyvolat imunitní odpověď (Šimkova a kol. 2008), která mívá dopad na celkovou metabolickou bilanci a může ohrozit životní rysy hostitele, jako jsou růst, přežití a reprodukce (Moller a kol. 2001).

Parazitární infekce ryb jsou velmi časté a to zejména u volně žijících populací z různých vodních prostředí, kde jsou splněny ekologické požadavky důležité pro mezihostitele a pro uskutečnění parazitárního přenosu. Rozmanitost infekcí je pozoruhodná a odráží různorodost prastaré linie rybích hostitelů, kteří se vyvíjí od devonu, tedy od období před 400 miliony let (Rhode 2005). Pro identifikaci parazitů a nemocí jimi způsobených jsou k dispozici četné monografie a jiné taxonomické texty, ovšem u většiny skupin je třeba odborných morfologických znalostí a využití molekulárních technik (Woo 2006).

### 1.3. Krevní paraziti ryb

Krevní paraziti ryb, jinak také hemoparasiti, jsou celosvětově rozšířenou skupinou organismů. Přítomnost nemocí, které vyvolávají, úzce souvisí s přítomností a distribucí jejich vektorů (Sitotaw2014). Do skupiny těchto parazitů patří zástupci Kinetoplastida, Conoidasida, Aconoidasida Myxosporea a Digenea (Horák a kol. 2014, Khan a kol. 1976, Khan 1980, Molnár 1988).

Kinetoplastida rodů *Trypanosoma* a *Trypanoplasma* jsou běžnými bičíkatými parazity mořských i sladkovodních ryb (Wright a kol. 1999). Ačkoli jsou tyto rody zdánlivě příbuzné svou morfologií a přenosem zprostředkovaným pijavkou, existují dostatečné biologické rozdíly pro jejich rozdělení (Paperna 1996). Zástupci rodu *Trypanoplasma* nejsou na rozdíl od trypanosom výlučně cévní paraziti, ale mohou se vyskytovat i jako ektoparasiti na povrchu těla ryb a v zažívacím traktu (Woo 1987).

Nejpočetnějším kmenem vyskytujícím se v krvi ryb jsou Apicomplexa (Conoidasida, Coccidia), mezi která patří rody *Haemogregarina*, *Babesiosoma*, *Dactylosoma* a *Desseria* (Molnár 1996). Vývojová stádia všech zmiňovaných rodů se nacházejí v krevních buňkách cirkulujícího systému a někdy i volně mimo buňky. Stejně jako Kinetoplastea jsou zpravidla přenášena krev sajícími bezobratlými (Wootten 2012).

V cytoplasmě erytrocytů se mohou vyskytovat i parazité z čeledi Haemohormidiidae (Aconoidasida) rodu *Haemohormidium* (Molnár 1996). Přenos parazita mezi rybami je uskutečněn stejně jako u většiny krevních parazitů prostřednictvím pijavek (Khan 1980).

Mezi krevní parazity ryb patří i *Myxosporea* (Myxozoa), přestože jsou lokalizována spíše v tkáních a vnitřních orgánech, některá z jejich vývojových stádií se hojně vyskytují volně v krvi ryb (Molnár 1988). Životní cyklus parazitů je celkem složitý a zahrnuje dva hostitele, druhým obligátním hostitelem bývají kroužkovci (Freeman a Shinn 2011).

V cévách a na zábrách ryb se vyskytují krevní motolice rodů *Sanguinicola* a *Cardicola* (Digenea, Sanguinicolidae) (Horák a kol. 2014), které způsobují závažná onemocnění kaprovitých ryb v Evropě a lososů v USA. Přenos těchto parazitů mezi rybami je zprostředkován prostřednictvím mezihostitelů, kterými jsou plži, mlži nebo mnohoštětinatci (Wootten 2012).

V případě volně žijících ryb neexistuje žádná účinná léčba jedinců nakažených krevními parazity, kteří u svých hostitelů způsobují anémii, kachexii, abscesy apod. Jedinou možností je oddělení vektorů od hostitele, což je velmi obtížné a téměř neproveditelné. U ryb

chovaných v nádržích nebo rybnících je neúčinnější ochranou karanténa po dobu 30 dní, diagnostika infekce s následnou specifickou a profylaktickou léčbou (Harms 1996).

### **1.3.1. Trypanosoma**

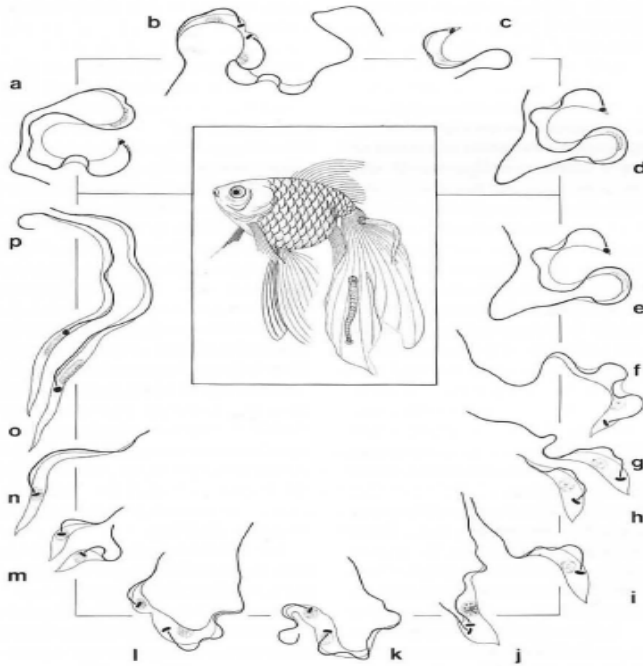
Podle aktuální klasifikace (Adl a kol. 2012), patří rod *Trypanosoma* do říše Excavata Cavalier - Smith, 2002, emend. Simpson, 2003 a dále mezi Discoba Simpson in Hampl et al., 2009; Discicristata Cavalier-Smith, 1998; Euglenozoa Cavalier-Smith, 1981, emend. Simpson, 1997; Kinetoplastea Honigberg, 1963; Metakinetoplastina Vickerman in Moreira et al., 2004 a Trypanosomatida Kent, 1880, emend. Vickerman in Moreira et al., 2004.

Discicristata zahrnují kromě Euglenozoa také Heterolobosea a jsou vybavená, jak už název napovídá, mitochondriemi s diskovitými kristami. Kinetoplastea disponují unikátní organelou - kinetoplastem, který obsahuje množství mitochondriální DNA s mimořádnou strukturou a specifickým způsobem replikace (Shlomai 2004). Nukleotid trypanosom je tvořen z jemných síťovitých vláken DNA, která jsou organizována do mini a maxikruhů, což je odlišuje od jejich příbuzných trypanoplasem (Lom a Dyková 1992). Disponují pouze jedním bičíkem, který volně vychází z malé úzké bičíkové kapsy nebo je pevně přichycen k povrchu těla a vytváří tak undulující membránu (Lom a Dyková 1992).

Všichni zástupci rodu *Trypanosoma* jsou parazité přenášení zpravidla krevsajícími bezobratlími. Nejčastěji se vyskytují v krvi nebo uvnitř buněk svých hostitelů (pokud je hostitelem obratlovec) nebo v zažívacím ústrojí (bezobratlí). Vektorem lidských trypanosom jsou mouchy z rodu *Glossina* (Glossinidae) nebo ploštice z rodu *Triatoma* (Triatominae) (Schofield a Kabayo 2008). Ptačí trypanosomy jsou přenášeny muchničkami z rodu *Eusimulium* (Diptera, Simuliidae) nebo mouchami, komáry či roztoči (Votýpka a Svobodová 2004). Rybí trypanosomy přenášejí pijavky z rodu *Hemiclepsis* (Hirudinea, Glossiphoniidae), *Johannsonia* nebo *Piscicola* (Hirudinea, Piscicolidae) (Epstein 1968, Karlsbakk 2004). U svých hostitelů mohou trypanosomy způsobit závažná onemocnění, v případě člověka jde o takzvanou spavou nemoc (vyvolána *T. brucei*) nebo Chagasovu nemoc (*T. cruzi*). Působí onemocnění také mnoha dalších savců, např. naganu (*T. vivax* *T. brucei*, u přežvýkavců a *T. simiae* u prasat), u koní durinu (*T. equiperdum*) nebo mal de caderas (*T. equinum*) a onemocnění mnoha druhů savců surra (*T. evansi*). Známé nákazy jsou i u jiných skupin obratlovců, např. *T. bennetti*, *T. corvi* a *T. culicavium* u ptáků (Zídková a kol. 2012), *T. grayi* u krokodýlů (Adams a kol. 2010) nebo *T. ranarum* u obojživelníků (Barta a Desser 1984).

Z rybovitých obratlovců (Chondrichthyes, Osteichthyes) byla popsána řada druhů, velká část z nich je ale pravděpodobně neplatná (Woo 2006). Trypanosomy jsou celosvětově rozšířeným druhem parazitů, kteří se vyskytují od jižní polokoule až po nejsevernější části zeměkoule. Na jižní polokouli v okolí Nového Zélandu nalézáme rybí trypanosomu *T. coelorhynchi*, jež infikuje hlavouny (*Coelorhynchus australis*) a moridy (*Physiculus bachus*) (Laidr 1951). Dalším zástupcem je *T. barretoii*, která infikuje rybu hypostomus paranánský (*Hypostomus paulinus*) v brazilských vodách (Lopes 1990). V Jižním moři v Číně se vyskytuje *T. epinepheli* infikující kanice (*Epinephelus fuscoguttatus*) (Su 2014). Přibližně na stejné rovnoběžce, ale na americkém kontinentu, v Mexickém zálivu lze pozorovat *T. bullocki* v platýsovcích (*Paralichthys lethostigma*) (Becker a Overstreet 1979). V Evropě jsou nejčastějšími trypanosomami *T. danilewski* a *T. carassii*, které byly obě poprvé izolovány z krve kaprů (*Cyprinus carpio*) (Laveran a Mesnil 1904), ale další výzkumy ukázaly, že se vyskytují i v krvi karasů (např. *Carassius auratus*), línů (*Tinca tinca*), úhořů (*Anguilla anguilla*) a dokonce i některých ryb v Indii (Thompson 1908, Pavlovskii 1964, Lom 1973, Qadri 1962). Nejsevernějším druhem, který snáší velmi dobře nízké teploty, je *T. murmanensis*, jež je nejvýznamnějším druhem této oblasti. Konkrétně se vyskytuje v Barentsově moři, v okolí Ruska i Kanady, kde infikuje tresky (např. *Gadus morhua*) a vranky (*Myoxocephalus octodecemspinosus*) (Khan 1980, Nikitin 1927).

Všechny známé životní cykly zahrnují kromě ryby také pijavku (třída Hirudinea), např. u *T. murmanensis* (známá z mořských ryb) je vektorem pijavka *Johanssonia arctica* (Khan 1976), u sladkovodní *T. carassii* (**Obr. 8**) jsou vektorem *Piscicola geometra* nebo *Hemiclepsis marginata* (Lom a Dyková 1992). Životní cyklus *T. murmanensis* začíná namnožením se parazitů v podobě amastigotů (není pozorovatelný bičík) a sféromastigotů (kulovitý tvar buňky a viditelný bičík) v zažívacím traktu pijavky. Ze sféromastigotů se vyvíjí epimastigoti (štíhlé tělo s bičíkem vytvářející undulující membránu), kteří migrují do sacího ústrojí pijavky, kde se transformují do infekčních metatrypanosom a ty přechází do ryby během sání (Khan 1976). Vývoj končí po 62 dnech, tedy pokud je teplota 0 °C – 10 °C, při teplotě 4 °C – 6 °C končí po 42 dnech. Tři dny po infikování se v krvi ryb objevují malé štíhlé trypomastigoti (tzv. trypanosomová forma s bičíkem na zadním konci těla), kteří během 29. – 55. dne dorůstají do velkých forem. Pleomorfní povaha parazita je nejvíce patrná po 29 dnech, kdy parazitémie začíná klesat a v krvi se objevují formy typické pro různé životní cykly (Khan 1976).



Obr. 8: Životní cyklus *Trypanosoma carassii*: a – d: Volné formy v krevním řečišti; b: Nerovnoměrné dělení; e - p: Proliferace v pijavkách, transformace do epimatigotů; i: Nerovnoměrné dělení (j – n) a transformace do dlouhých forem (o, p), které se vyvíjejí v metacyklické trypomastigoty vstupující do krevního řečiště ryby (Lom a Dyková 1992).

Nejlépe popsané projevy onemocnění jsou z pokusných infekcí *T. carassii* u závojatek. Nákaza se může projevovat anémií a anorexií a je přímo závislá na parazitěmii. Histopatologické změny byly pozorovány zejména ve slezině, játrech a ledvinách, nicméně zánětlivá reakce zaznamenána nebyla (Dyková a Lom 1979).

Nejběžnější diagnostickou metodou u ryb je stále pomocí krevního roztěru obarveného Giemsou, v případě silnějších infekcí lze pozorovat pohyblivé se trypanosomy v kapce čerstvé krve nebo v roztakovém preparátu žaber (Lom a Dyková 1992). Hematokritová centrifugace může být nápomocná v případě slabých infekcí. Dalšími možnými metodami jsou PCR detekce nebo kultivace (Woo 2006).

### 1.3.2. *Trypanoplasma*

Současná klasifikace (Adl a kol. 2012) řadí rod *Trypanoplasma* do říše Excavata Cavalier - Smith, 2002, emend. Simpson, 2003 a dále mezi Discoba Simpson in Hampl et al., 2009; Discicristata Cavalier - Smith, 1998; Euglenozoa Cavalier - Smith, 1981, emend. Simpson, 1997; Kinetoplastea Honigberg, 1963; Metakinetoplastina Vickerman in Moreira et al., 2004 a Parabodonida Vickerman in Moreira et al., 2004.



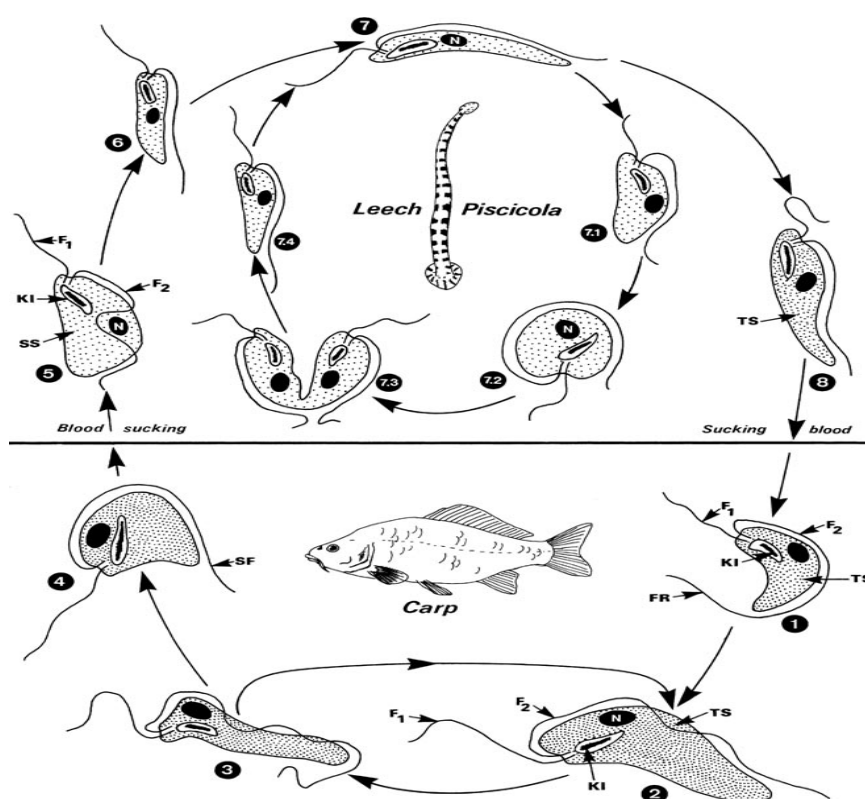
Trypanoplasmy patří mezi Parabodonida, která se vyznačují tím, že jejich pankinetoplastová kDNA netvoří jednotnou síť, ale je rovnoměrně distribuována po celé mitochondriální plasmě (Vickerman 1990). Kinetosom je situován v pravém okraji dorzolaterální drážky. Nukleotid je tvořen jemnými síťovitými vlákny DNA a leží na opačné straně než kinetoplast, tedy v levém okraji drážky (Vickerman 2000). Stavbou těla jsou velmi podobné trypanosomám, ale na rozdíl od nich mají dva bičíky, z nichž jeden je anteriorní (přední) a druhý posteriorní (zadní). Oba bičíky mohou být až 3 x delší než tělo, ovšem zadní bičík je vždy kratší než přední. Bičíky jsou připojeny napevno k tenké membráně a posteriorní bičík spolu s ní vytváří undulující membránu (Lom a Dyková 1992).

Zástupci rodu *Trypanoplasma* (**Obr. 9**) jsou krevní parazité, kteří se nacházejí volně v krvi svého hostitele nebo v jeho tkáních. Vektorem jsou u nich, stejně jako u trypanosom, krev sající pijavky patřící do rodů *Piscicola*, *Calliobdella* a *Hemiclepsis*. Mezi sladkovodní vektory patří *Hemiclepsis marginata*, která se hojně vyskytuje v malých rybnících a pomalu tekoucích vodách v Asii a Evropě (Elliot a Mann 1979, Sawyer 1986, Shanavas a kol. 1989); dále *Piscicola geometra* (**Obr. 9**), která preferuje chladnější rychle tekoucí vody a jezera (Mann 1961, Malecha 1984, Sawyer 1986). Mezi mořské zástupce řadíme pijavku *Piscicola salmositica*, což je jediný známý vektor pro *Trypanoplasma salmositica*. V mořích kolem Severní Ameriky se vyskytuje *Cystobranchnus virginicus* (Becker a Katz 1965, Putz 1972).

Byla popsána řada druhů vyskytujících se mezi rybími obratlovci, u kterých také existují rozdíly v citlivosti mezi jednotlivými populacemi k těmto parazitům. Například losos *Oncorhynchus nerka* je velmi citlivý k *Trypanoplasma salmositica*, zatímco u vranek z rodu *Cottus* spp. se žádné klinické příznaky neprojeví (Lom a Dyková 1992). *Trypanoplasma cataractae* infikuje jelčičky (*Rhinichthys cataractae*), pro něž je nepatogenní; také je rezervoárem pro volně žijící kaprovité ryby, pro které patogenní je (Putz 1972). U *Carassius auratus* nalézáme *T. borreli* způsobující velmi vysokou parazitěmií až 120 tisíc jedinců na 1 ml krve (Lom 1979). Nejvýznamnějším mezi mořskými zástupci je *T. bullocki*, která byla poprvé popsána u platýzů (*Pseudopleuronectes americanus*) v USA (Strout 1965).

Životní cyklus je velmi podobný jako u trypanosom (Lom a Dyková 1992). Vektorem *T. bullocki* je pijavka *Calliobdella vivida* (Burreson 1982). V jejím sacím ústrojí se parazit množí do 24 hodin při teplotě okolo 10 °C. Štíhlé formy trypanoplasem se objevují za 4 dny, soustředí se v přední části sacího ústrojí a o den později je již nalézáme v přední přísavce. Na vývoj parazita v pijavce má velký vliv teplota, při 20 °C jsou bičíkovci v přísavce do 24 hodin, zatímco při teplotě 5 °C dochází ke zpoždění jejich přesunu, který tak trvá až 10 dní. Infikované pijavky mají formy trypanoplasem stále přítomné v sacím ústrojí i po třech po

sobě jdoucích sáních na neinfikovaných rybách (Burreson 1982). Trypanoplasmy projevují výrazný pleomorfismus v průběhu infekce ve svých obratlovčích hostitelích. V akutní fázi infekce se objevují poměrně malí aktivně se dělicí bičíkovci, kteří jsou štíhlí a často mají tvar půlměsíce (např. *T. borreli*) nebo zaobleného trojúhelníku (*T. catasomi*). Později trypanoplasmy rostou a nakonec se z nich stávají tlusté formy, které mají tvar dospělých forem chronické infekce. Tyto formy mají nepravidelný tvar a odrážejí vlnivý pohyb celého těla. Vzhledem k extrémně proměnlivému tvaru buňky, na rozdíl od trypanosom, je obtížné charakterizovat rozdílné tvary vývojových stádií z časné a pozdní fáze infekce (Lom a Dyková 1992).



Obr. 9: Životní cyklus *Trypanoplasma* sp. v rybím hostiteli (kapr) a pijavčím vektoru (*Piscicola geometra*): 1. Transformovaná metacyklická stádia trypanoplasem; 2 - 4: Zkrácená stádia vzniklá binárním stěpením; 4: Volná stádia v krevním řečišti, která mohou být přenesena krevní moučkou do pijavic; 5 - 7: Vývojová stádia uvnitř hltanu, jícnu a horního střeva střeva vektoru; 7 - 8: Štíhlé formy penetrující stěnu střeva (7.1., 7.2., 7.3., 7.4. - zkrácené formy vyskytující se volně v krvi pijavky, která mohou po každém sání osídlovat střevo); 8: Metacyklické formy trypanoplasmy (Mehlhorn 2008).

Mezi příznaky těžké trypanoplasmózy patří chudokrevnost (znatelná na žábrách a někdy na viscerálních orgánech). Dále je patrná abdominální distenze břicha způsobená ascitem, také splenomegalie, letargické stavy spojené se ztrátou normálních reakcí a odmítáním potravy (Thomas a Woo 1988). Dochází také k orgánovým změnám, kdy se

vytváří krvácivá ložiska z přetížení cév a kapilár parazity, ulcerózní léze v dutině břišní a nekrózy střeva (Lom a Dyková 1992).

Trypanoplasmy jsou celosvětově rozšířeným parazitem, který infikuje ryby v Africe (*T. gandeii*), Asii (*T. borreli*) a Evropě (*T. cataractae*). Ovšem nejrozšířenější jsou na severní polokouli, kde je lze zaznamenat v populacích ryb od pobřeží Severní Ameriky (*T. bullocki*) po Golský záliv (Lom a Dyková 1992, Woo 2003). Dále na pobřeží Pacifiku (*T. salmositica*), kde byly poprvé pozorovány u lososů (*Oncorhynchus kisutch*) z USA (Katz 1951). Později se prokázal i jejich výskyt v různých druzích vranek (*Cottus* spp.) ve vodách Kalifornie, Britské Kolumbie a jihozápadní Aljašky (Woo 2003).

Během akutní fáze onemocnění jsou paraziti snadno detekovatelní v kapce čerstvě odebrané krve nebo ascitu pomocí mikroskopu. Identita a morfologie může být potvrzena vyšetřením vzorků obarvených Giemsou (Woo 1969) nebo za použití DNA sondy, která je specifická pro *T. salmositica* (Li a Woo 1996). Centrifugace hematokritu se používá k detekci chronické fáze infekce, neboť je mnohem citlivější a méně časově náročná než techniky s mokrou kapkou (Bower a Margolis 1984, Woo a kol. 1983).

### 1.3.3. Sanguinicolidae

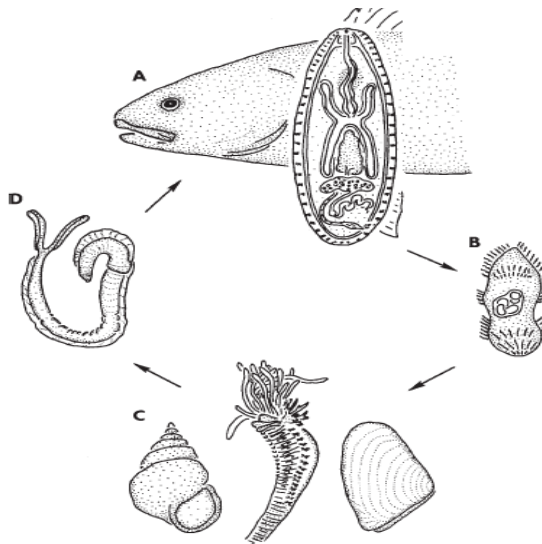
Rody *Sanguinicola* Plehn, 1905 a *Cardicola* Short, 1953 řadíme do třídy Trematoda Rudolphi, 1808; podtřídy Digenea Carus, 1863; řádu Strigeatida Larue, 1926 emend. Sudarikov, 1959; nadčeledi Diplostomatidae Poirier, 1886 a čeledi Sanguinicolidae von Graff, 1907.

Digenea mají ústní přísavku na jednom konci (horní) a ventrální přísavku na druhém (spodním) konci těla. Celý povrch těla je kryt pláštěm, ve kterém mizí přechody mezi buňkami a vytváří tak cytoplazmatické syncytium (Berman 2012). Jedinci čeledi Sanguinicolidae bývají až 211 mm dlouzí, disponují tenkým dorzoventrálně plochým tělem, které je úzké podlouhlé nebo oválné, neprůhledné nebo téměř průhledné. Dospělci některých druhů mají vyduté tělo. Jsou schopni využívat ventrální povrch svého těla jako přísavku, jež umožňuje se udržet na hladkém povrchu, tedy na tepnách, žilách a dokonce i na Petriho miskách. K jejich upevnění slouží také jakési boční tegumentální ostny důležité i pro rychlý pohyb. Na rozdíl od savčích krevních motolic jsou širší a bývají hermafrodité (Bullard a Overstreet 2002).

Sanguinicolidae (synonymum Aporocotylidae) jsou krevní motolice, které infikují vaskulární systém ryb (Bullard a Overstreet 2002). Dělí se do dvou rodů, z nichž jeden nalézáme pouze u mořských ryb – *Cardicola* (Cribb a kol. 2011, Horák a kol. 2014) a druhý - *Sanguinicola*, který infikuje především sladkovodní ryby, ale je znám i jeden druh tohoto rodu (*S. maritimus*) infikující ryby mořské (Hoffman a kol. 1985, Kirk and Lewis 1993, Meade a Pratt 1965, Nikitina 1986, Scheuring 1920). Jako prvního mezihostitelem využívají plže (Gastropoda) nebo mnohoštětinatce (Polychaeta) (Cribb a kol. 2011, Koie 1982, Smith 1997).

Existuje velké množství druhů infikující ryby, jedná se například o *S. inermis*, která se vyskytuje u kaprovitých ryb (Kirk a Lewis 1994), také plotic (*Rutilus rutilus*), perlínů (*Scardinius erythrophthalmus*) a línů (*Tinca tinca*) (Smith 1997). Masovou úmrtnost sivenů, v některých případech až 400 tisíc jedinců, způsobuje *S. fontinalis* (Hoffman a kol. 1985). Infekce lososů v Americe jsou způsobené *S. davisi* nebo *S. klamathensis* (Bullard a Overstreet 2002). *Aporocotyle simplex* infikuje platýze v Severním moři (např. *Limanda limanda*, *Pleuronectes platessa*) (Koie 1982, Koie a Petersen 1988).

Krevní motolice ryb patří do skupiny parazitů, v jejichž životním cyklu (**Obr. 10**) chybí druhý mezihostitel a encystovaná nebo zapouzdřená metacerkarie (Smith 1997). Jako prvního mezihostitele využívají plže z podčeledí Bithyniidae (*S. armata*) (Sendersky a Dobrovolsky 2004), Hydrobiidae (*S. alsae*) (Maede a Pratt 1965), Ancyliidae (*S. rutili*) (Simon – Martin a kol. 1987) nebo Pleurocerinae (*S. fontinalis*) (Hoffman a kol. 1985). Několik druhů využívá mnohoštětinatce (Polychaeta) jako prvního mezihostitele, např. *Artacama proboscidae* (*Aporocotyle simplex*) nebo *Longicarpus modestus* (*C. fosteri*), patřící do čeledi Terebellidae (Cribb a kol. 2011, Koie 1982). Dospělí jedinci kladou tenkostěnná ohebná vajíčka do cévního systému konečného hostitele. Některá z vajíček cestují a uchytávají se na rybích žábách, kde se vyvíjejí v embryu. Po vylíhnutí první volně plovoucí forma – miracidium - migruje skrz žábrový epitel a hledá vhodného mezihostitele. Po průniku do mezihostitele se parazit asexuálně rozmnožuje. Sporocysty produkují druhé volně plovoucí neinfekční stádium – cerkarie, které buď napadají vhodného hostitele, nebo hynou. Cerkarie proniká do hostitele přes žábry, kůži, oči, ploutve nebo zažívací trakt a rozvíjí se v juvenilní stádium – schistosomulum před tím, než skončí v určitém místě oběhového systému. Motolice nakonec dozrává, kopuluje a uvolňuje vajíčka (Smith 1972, Smith 1997).



Obr. 10: Životní cyklus čeledi Sanguinicolidae: A: Dospělý jedinec v cévním systému definitivního hostitele. B: Miracidium – volně plovoucí stádium. C: Mezihostitel a asexuální reprodukce. D: Cercarie (Bullard a Overstreet 2002).

Jejich vývojová stádia a vajíčka, která se nehromadí v žábrách, často uvíznou ve vnitřních orgánech nebo v pojivové tkáni a způsobují granulomatózní zánět vedoucí k nevratnému poškození tkáně (Bullard a Overstreet 2002). Při kontaktu ryby s velkým množstvím cercárií dochází k akutním a chronickým stavům, kdy ryby trpí těžkými otoky a epidermálním krvácením, jež vede ke smrti během několika hodin (Kirk a Lewis 1992).

Vyskytují se po celém světě, přes Austrálii (*S. maritimus*), Malajsií (*C. lates*) až po Mexický záliv a dále na sever (Bullard a Overstreet 2002, Herbert a kol. 1995). V okolí Severní Ameriky (*S. davisii*) infikují hejna lososů a v nejseverozápadnějších částech Atlantského oceánu (*C. fosteri*) infikují tuňáky (Bullard a kol. 2004).

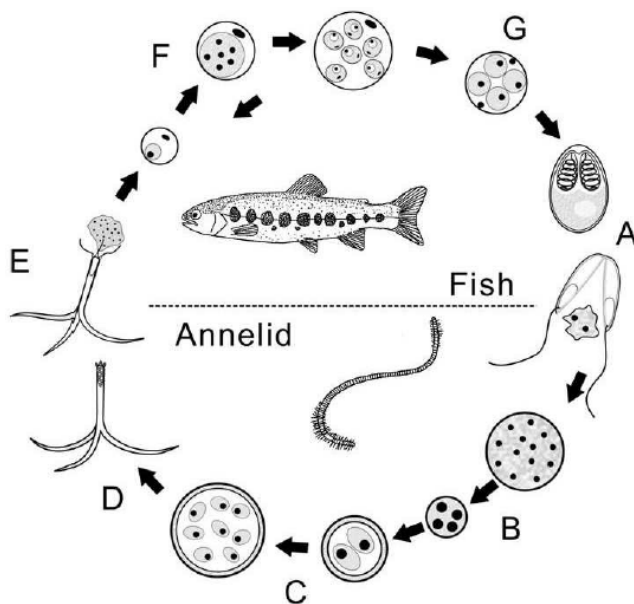
Parazity lze detekovat morfologickou identifikací dospělých motolic během posmrtného vyšetření ryby pomocí mikroskopu s fázovým kontrastem. Zralá i nezralá vajíčka, stejně jako miracidia, mohou být pozorována ve vzorcích žaberní a ledvinné tkáně, také za použití mikroskopu při velkém zvětšení (40 x – 100x). Serologické ani molekulární techniky při stanovení diferenciální diagnostiky dosud nebyly vyvinuty (Kirk a Lewis 1992).

Nejúčinnější strategií jak se vyhnout infekci je oddělení mezihostitelů od definitivních hostitelů, což je u volně žijících ryb velmi obtížné. V uzavřených chovech ryb je zásadní včasná detekce infikovaných ryb a odstranění specifických mezihostitelů (Bullard a Overstreet 2002).

### 1.3.4. Myxosporea

Myxosporea Bütschli, 1881 jsou součástí kmene Myxozoa Grassé, 1970 a patří do říše Opisthokonta Cavalier – Smith, 1987, emend. Adlet al., 2005. Příslušnost myxozoi k žahavcům Cnidaria Hatschek, 1888 byla relativně nedávno přesvědčivě podpořena (Holland a kol. 2011; Jiménez-Guri a kol. 2007 a Nesnidal a kol. 2013).

I když jsou tyto parazity lokalizováni spíše v tkáních orgánů ryb, některá z jejich vývojových stádií se mohou objevit i volně v krvi. Jedná se například o presporogonická a extrasporogonická vývojová stádía rodu *Sphaerospora*, která byla poprvé detekována v krvi kaprů jako Csaba parazit a pojmenována C – protozoa (Molnár 1980). Později bylo zjištěno, že se jedná o vývojová stádía *Sphaerospora renicola* (Hofte a kol. 1984, Grupcheva a kol. 1985, Molnár 1988), jenž jsou proliferativní formou mezi krevním a renálním stádiem (Molnár 1984, Molnár a Kovacs-Gayer 1986). Pokusy McGeorga a kol. (1994) dokázaly, že extrasporogonická vývojová stádía *Sphaerospora* sp. se vyskytují i v krvi lososů (*Salmo salar*) chovaných na rybích farmách nebo v krvi kranasovců (*Rachycentron canadum*, Actinopterygii) v Taiwanu (Chen 2001).



Obr. 11: Obecné schéma životního cyklu třídy Myxosporea. A: Vytlačování polárních vláken k ukotvení spor na střevní epitel, následuje otevření chlopní myxospor; B: Gametogonie; C: Sporogonie aktinosporní fáze; D: Dozrávající aktinosporní stádía vyvíjející se v pansporocystu, aktinospory jsou uvolněny do vody; E: Vytažení polárních vláken při kontaktu aktinospor s kůží či žábry hostitele, usnadnění vstupu sporoplasmy do ryby; F: Presporogonické množení ve stavu buňka v buňce; G: Sporogonie myxosporní fáze (Yokoyama a kol. 2012).

### 1.3.5. Apikomplexa

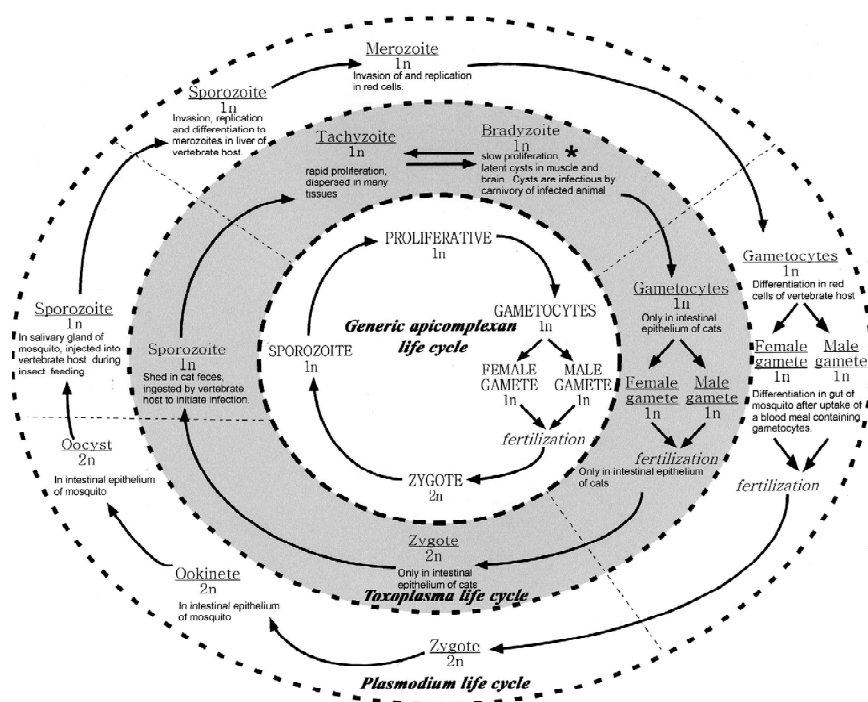
Příslušníci kmene Apikomplexa Levine, 1980, emend. Adl et al. 2005 jsou obligátní celosvětově rozšíření intracelulární parazité, kteří napadají erytrocyty, lymfocyty, makrofágy nebo buňky zažívacího traktu různých druhů obratlovců (Sam – Yellowe 1996). Kmen je rozdělen do čtyř hlavních skupin – *Coccidia*, *Gregarinasina*, *Haemosporidia* a *Piroplasmorina* (Adl a kol. 2012), ty zahrnují více než 6000 známých druhů parazitů (Morrison 2009) způsobující některá vážná onemocnění v lidské a veterinární medicíně, například malárii (*Plasmodium falciparum*), toxoplasmósu (*Toxoplasma gondii*), babesiósu (*Babesia canis*) a další (Sam – Yellowe 1996).

Název Apikomplexa je odvozen od apikálního komplexu, což je soubor unikátních organel, mezi něž patří rhoptrie, mikronemy, apikální polární prstenec a konoid (Morrissette a Sibley 2002). Rhoptrie a mikronemy jsou jedinečné sekreční organely, které obsahují produkty potřebné pro motilitu, adhezi k hostitelské buňce, invazi do buňky a založení parazitoformní vakuoly, což je jakási vakuola chránící parazita před lysosomálním atakem imunitního systému hostitele (Aikawa 1988, Carruthers a kol. 1999, Carruthers a Sibley 1997, Chobotar a Scholtyseck 1982, Dumbremetz a kol. 1993, Scholtyseck a Melhorn 1970). Konoid lze popsat jako malou kuželovitou strukturu složenou ze spirály neidentifikovaných vláken (Nichols a Chiappino 1987, Scholtyseck a Melhorn 1970); předpokládá se, že hraje mechanickou roli při invazi do buňky a je přítomen pouze u některých apikomplex. Apikální kruh patří mezi charakteristický znak všech jedinců tohoto kmene (Nichols a Chiappino 1987, Russell a Burns 1984). Slouží jako jeden ze tří mikrotubulárních center. Kromě apikálního komplexu má tento kmen další unikátní strukturální rysy, jako chloroplastu podobné organely zvané apikoplast (Kohler a kol. 1997, Mc Fadden a kol. 1997, Striepen a kol. 2000, Wilson a Williamson 1997).

Tělo parazitů je ohraničeno pelikulou, což je kompozitní struktura sestávající se z plazmatické membrány a úzce vyznačeného komplexu vnitřních membrán (IMC) (Aikawa 1967, Dumbremetz a Torpier 1978). Pelikula bývá úzce spojena s řadou cytoskeletálních elementů, včetně aktinu, myosinu, mikrotubulů a sítě podobné středním filamentům (Morrissette a Sibley 2002).

Základní životní cyklus těchto parazitů je složitý (**Obr. 12**). Obecně platí, že existují čtyři transformace k dokončení cyklu – zygota, sporozoity, merozoity a gametická stádia. Typický životní cyklus apikomplex je ustanoven dle toho, jak podstupují série pohlavního

a nepohlavního rozmnožování zahrnující jednoho nebo dva hostitele (Lee a kol. 2000, Levine 1973). Životní cyklus probíhá tak, že se samčí gamonti vyvíjejí v jednu nebo více mikrogamet (gametogeneze), jedna z mikrogamet oplodní makrogamet produkující zygotu, která rozdělí oocystu do mnoha sporozoitů (sporogonie), každý ze sporozoitů se obvykle asexuálně dělí do mnoha primárních merozoitů (primární merogonie). Vzniklé merozoity se dále asexuálně dělí do dalších merozoitů (sekundární merogonie), nakonec se merozoity diferencují do gamontů (gamontogonie), což je prekurzorem pro sexuální fázi (Siddall 1995).



Obr. 12: Životní cyklus kmene Apikomplexa a jeho rodů *Plasmodium* a *Toxoplasma*. (Morrisette a Sibley 2002).

Mezi různými skupinami apikomplex jsou malé rozdíly v životních cyklech. Například u kokcií vyvolává přístup atmosférického kyslíku sporulaci zygoty a tvorbu haploidních sporozoitů, takže do prostředí jsou uvolňovány neinfekční oocysty (Levine 1973). Naproti tomu tvorba oocyst a sporulace u hematozoí probíhá ve střevech bezobratlých hostitelů a uvolněné sporozoity jsou přenášeny do nového hostitele během sání (Krotoski 1985).

Z apikomplex je mezi rybími parazity nejrozšířenější podtřída *Coccidia* (Molnár 1996). Zástupci této podtřídy se běžně vyskytují mezi mořskými (např. *Haemogregarina*, *Desseria*) i sladkovodními (např. *Eimeria*) rybami (Davies 1995, Davies a Johnston 2000). Celkově se ví velmi málo o hostitelské specifitě rybích apikomplex (Molnár 1996). Bylo zjištěno, že



mohou infikovat několik úzce příbuzných hostitelských druhů obvykle stejného rodu (Belova a Krylov 2000).

### **1.3.5.1. Babesiosoma a Dactylosoma**

Současná klasifikace (Adl et al. 2012) řadí rody *Babesiosoma* a *Dactylosoma* do třídy Conoidasida Levine, 1988; řádu Coccidia Leuckart, 1879; podřádu Adeleorina Léger, 1911 a čeledi Dactylosomatidae Jakowska et Nigrelli, 1955.

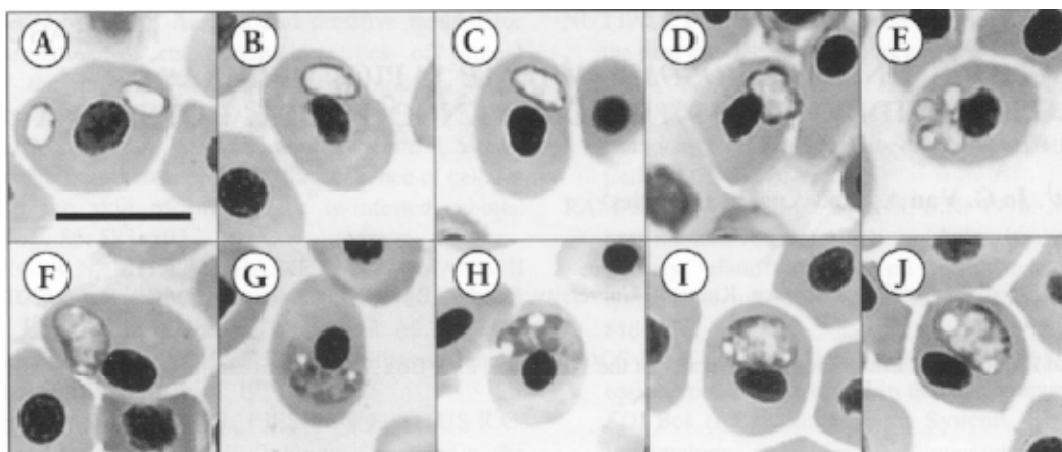
Jak už samotný název napovídá Conoidasida, mezi něž patří i Adeleorina, jsou třídou protozoí, která obsahuje kompletní apikální komplex včetně konoidu (Woo 2003). Dactylosomatidae jsou charakterističtí tvorbou malých buněk, pohyblivou zygotou (sporokineta) a merogonií lokalizovanou pouze v erytrocytech (Lom a Dyková 1992). Rody *Dactylosoma* a *Babesiosoma* jsou si velmi podobné, lze je odlišit na základě produkce merozoitů. *Babesiosoma* mají méně granulovanou a více vakuolizovanou cytoplasmu než jejich příbuzný rod. Během merogonie (pučením nebo binárním dělením) neprodukuje více než 4 merozoity uspořádané do růžice či kříže. Gametocyty jsou klubkovité či podlouhlé buňky dosahující délky 7  $\mu\text{m}$  (Barta a Desser 1989). *Dactylosoma* produkují během merogonie 4 – 16 náhodně uspořádaných merozoitů (Barta a kol. 1987).

Parazité patřící do rodů *Babesiosoma* a *Dactylosoma* se nacházejí uvnitř erytrocytů studenokrevných obratlovců, zejména obojživelníků a ryb (Barta 1991). Všechny druhy byly nalezeny v hostitelích, kteří jsou v úzkém kontaktu s vodou, to naznačuje, že vektorem pro tyto rody jsou hematofágní pijavky patřící mezi Piscicolidae (Hirudinea) a Glossiphoniidae (Hirudinea) (Barta 1991, Lom a Dyková 1992).

Mezi zástupce, které nalzáme u obojživelníků, patří například *Dactylosoma ranarum* infikující skokany (*Pelophylax* kl. *esculentus*) nebo *Babesiosoma stableri* u ropuch (*Bufo americanus*, *Rana septentrionalis*, *Rana clamitans*, *Rana catesbeiana*) (Barta 1991; Barta a kol. 1989, 2012). V rybích obratlovcích mají tyto parazité také hojné zastoupení, například u sivenů nalzáme *D. salvelini* (*Salvelinus fontinalis*), u cejnovek (*Lethrinus nebulosus*) *D. lethrinorum* (Lom a Dyková 1992), dále *B. rubimarensis* u ploskozubců (*Epinhelus summana*) nebo *B. tetragonis* u pakaprovců (*Catostomus* sp.) (Lom a Dyková 1992, Saunders 1960).

Negm – Eldin (1998) popsal životní cyklus *B. mariae* (Obr. 13), po té co jí experimentálně infikoval ryby. Jako vektor pro přenos použil pijavku *Batrachobdeloides tricarinata* (Hirudinea, Glossiphoniidae). V infikovaných rybách došlo ke třem po sobě

jdoucím merogonickým cyklům v erythrocytech. Třetí cyklus produkoval merozoity, ze kterých se později stávají gamonti, kteří jsou větší než merogonická stádia. Parazitémie v rybách přetrvává až 7 měsíců. V sacím ústrojí pijavky se gamonti sdružují v zygotu a fúzí. Vytvořená zygota prochází sporogonií ve střešní tkáni a vzniká 8 sporozoitů. Sporozoity procházejí typickou merogonií ve slinné tkáni (jako u ryby v erythrocytech). Merozoity buď zahájí další cyklus merogonie, nebo se přesouvají směrem k přísavce. Křížovým experimentálním přenosem bylo zjištěno, že rybí babesiosma není hostitelsky specifická.



Obr. 13: Vývojová stádia *Babesiosoma mariae* uvnitř erythrocytů *Serranochromis angusticeps*: A – C: Rybí erythrocyty s jednotlivými nebo párovými trofozoity; D: Meronti na začátku dělení; E: Meronti se čtyřmi merozoity; F: Nezralí gamonti; G - H: Zakřivení zralí gamonti; I – J: Širocí zralí gamonti (Smit a kol. 2003).

Oba rody jsou celosvětově rozšířenými druhy parazitů. Vyskytují se ve vodách Afriky (*B. mariae*) mezi tlamovci (*Serranochromis angusticeps*) (Smith a kol. 2003) a v Indii (*B. batrachi*) infikují keříčkovce (*Clarias batrachus*) (Chaudhuri a Choudhury 1983). Na severní polokouli se vyskytují především v okolí USA (*B. tetragonis*) u pakaprovců (*Catosomus* sp.) a v okolí východní Kanady (*D. salvelini*) u sivenů (*Salvelinus fontinalis*) (Becker a Katz 1965, Lom a Dyková 1992).

Diagnostika probíhá pomocí krevních roztěrů obarvených Giemsou (Shahi a kol. 2013) a pomocí světelného a elektronového mikroskopu (Barta a Desser 1986).

### 1.3.5.2 *Haemogregarina*

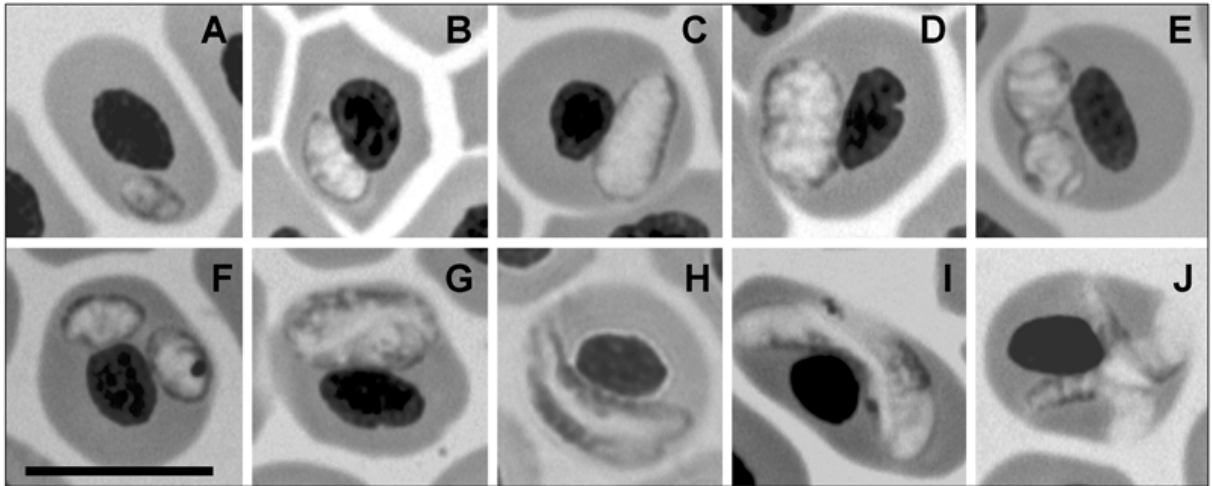
Podle systematického zařazení (Adl et al. 2012) patří rod *Haemogregarina* Danilewsky, 1885 do kmene Apicomplexa Levine, 1980, emend. Adl et al., 2005; třídy

Conoidasida Levine, 1988; podtřídy Coccidia Leuckart 1879; podřádu Adeleorina Léger, 1911 a čeledi Haemogregarinidae Neveu – Lemaire, 1901.

Coccidia jsou jednobuněčné organismy bez pohybových organel, pro něž jsou charakteristické velmi odolné oocysty či sporocysty, díky kterým jsou schopny přecházet stěnami orgánů bez morfologických změn (Teixeira a kol. 2003). Haemogregariny mají malé oocysty s okolo 8 sporozoity, které se formují z jednoho germinálního centra. Nejvíce jsou známy podle svých dlouhých červovitých gamontů uložených v krevních buňkách (Desser 1993).

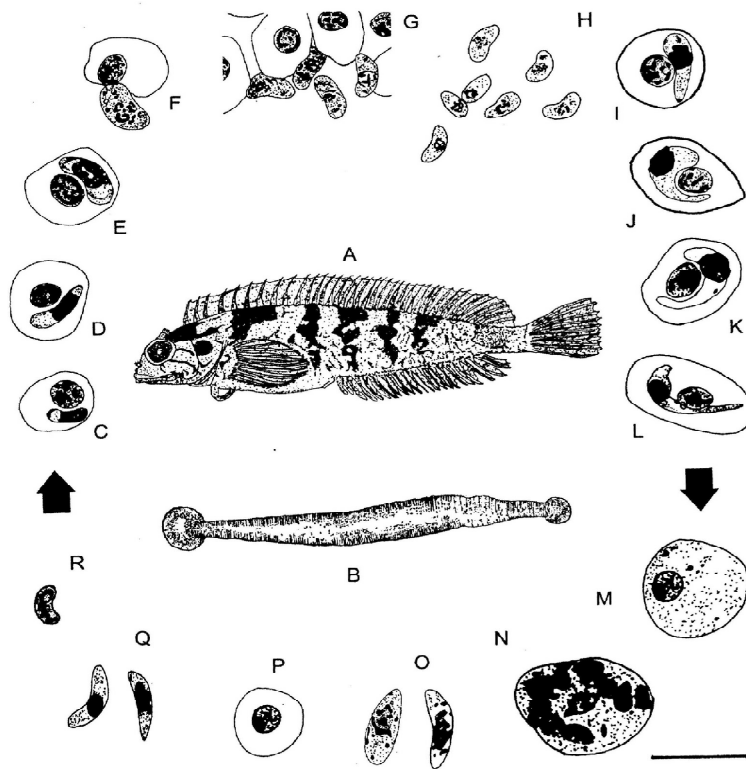
Parazité patřící mezi hemogregariny se nacházejí uvnitř cirkulujících erytrocytů a v buňkách leukocytové řady svých obratlovčích mezihostitelů nebo ve střevních epitelových buňkách bezobratlých vektorů (Davies 1995, Siddall 1995, Siddall a Desser 1992, Wilford 1977). Byly zaznamenány u želv (Acholonu 1974, Paterson a Desser 1976, Siddall a Desser 1992, Wilford 1977), ještěrek (Elwasila 1989), krokodýlů a ryb (Khan a kol. 1980, 1980b). Do jejich krve se dostávají pomocí infikovaných pijavek (Hirudinea) nebo stejnonožců (Isospora) (Davies 1982, Siddall a Desser 1992) v závislosti na geografické poloze. Pijavky slouží jako vektory pro přenos parazitů na severní polokouli, zatímco na jižní nebyly zaznamenány, zde se uplatňují pouze stejnonožci (Fantham 1919, Davies 1995, Davies a kol. 2004, Smith a Davies 1999).

Jedním z druhů přenášených isopodami, v tomto případě *Gnathia maxillaris*, je *Haemogregarina bigemia* (**Obr. 14**), která infikuje slizouny (*Blennius pholis*) (Laveran a Mesnil 1901). Dalším neméně známým parazitem tohoto rodu je *H. sachai*, která byla poprvé identifikována mezi kambaly (*Scophthalmus maximus*) na rybích farmách ve Skotsku (Kirmse 1978). *H. simondi* nalézáme v neutrofilech a lymfocytech ryby (*Solela solela*) známé pod komerčním názvem mořský jazyk (Laveran a Mesnil 1901). Rejnoky rodu *Raja* infikuje *H. delagei*, jež nevytlačuje jádro erytrocytů, jak je tomu u jiných zástupců tohoto rodu (Laveran a Mesnil 1901). *H. curvata* (**Obr. 15**) infikuje paslizouny (*Clinus cottoides*) žijící v tropických vodách (Hayes a kol. 2001). Mezi hadí hemogregariny patří *H. sauritus* nebo *H. guttata* nalézané nejčastěji u užovek (*Pantherophis obsoletus*) na Floridě (Teleford a kol. 2002, Teleford a kol. 2004). V krevních buňkách krokodýlů můžeme vidět *H. crocodilorum*, jejímž vektorem je pijavka *Placobdella multilineata* (Hirudinoidea: Glossiphoniidae) (Khan 1980). Stejný vektor přenáší *H. balistapi* a *H. triatomae* na ještěrky v Kostarice (Smit a kol. 2006, Osimani 1942).



Obr. 14: Erythrocyty *Lipophrys pholis* a vývojová stádia *H. bigemia*: A: Trofozoity; B – C: Vyvíjející se meronti; D – F: Meronti procházející příčným binárním dělením; G – I: Podélné binární dělení merontů; J: Dozrávající pároví gamonti (Davies a kol. 2004).

Životní cyklus hemogregarin zahrnuje proliferativní stádia (merogonie) v buňkách cirkulujícího systému obratlovčích hostitelů. V krev sajícím vektoru probíhá gamogonie a sporogonie (**Obr. 14**). Gamogonie je charakterizována spojením 2 gametocytů, které spolu dozrávají v jednu samičí makrogametou a čtyři nebičkaté samčí mikrogamety, z nichž jedna kopuluje s makrogametou. Vzniklá zygota produkuje mezi několika až mnoha volnými sporozoity uvnitř tenké obálky oocysty. V obratlovčím hostiteli se vývojová stádia schizogonie vyvíjejí zpravidla v bílých krevních buňkách (lymfocytech, monocytech nebo neutrofilech) a binárním dělením nebo pravou merogonií produkují 2 – 8 merozoitů na jednu hostitelskou buňku. Po schizogonii merozoiti (většinou červovitého tvaru) unikají z buněk bílé řady a vstupují do erytroblastů nebo erytrocytů. V červených krevních buňkách se dále rozvíjejí a dělí se binárním dělením nebo merogonií do 2 (*H. bigemia*) (Davies 1982), 4 (*H. quadrigemina*) (Brumpt a Lebailly 1904), 8 (*H. simodi*) (Kirmse 1978) nebo 16 (*H. polypartita*) (Neumann 1909) zavalitých nebo podlouhlých červovitých merozoitů. Později se tato stádia diferencují do mikro a makrogametocytů, které se mohou objevit i volně v krevní plazmě (platí pro druhy „bigemia“). U ostatních druhů se intraerytrocytická stádia nerozdělují, ale přímo se přeměňují do gametocytů (Laidr 1952).



Obr. 15: Životní cyklus *Haemogregarina curvata* v rybím hostiteli (kapr) a pijavčím hostiteli (*Piscicola*): A: *Clinus cottoides*; B: Dospělý *Zeylanicobdella arugamensis*; C – L: Stádia v periferní krvi ryby. M – R: Stádia v pijavkách; C – Intraerythrocytiční trofozoiti; D: Větší trofozoiti; E: Intraerythrocytiční meronti; F: Extracelulární meronti; G – H: Extracelulární merozoiti; I: Stádia intraerythrocytických pregamontů; J: Nezralí gamonti; K: Gamonti mezihostitele; L: Dozrávající intraerythrocytiční gamonti; M: Nezralá oocysta; N: Vyuvíjející se oocysta; O: Volné trofozoity; P: Meronti; Q: První generace merozoitů; R: Druhá generace merozoitů (Hayes a kol. 2011).

Způsobují závažná onemocnění, jako jsou například anémie a vyhublost ryb (*H. acipenseris*) (Nawrotzky 1914). U infikovaných ryb se objevují také velké nádorové nekrózy jícnu, somatických svalů, žaludku, pohlavních orgánů a žaber způsobených *H. sachai*; dále je v krvi detekovatelná leukocytóza a erytrocypenie. Vzniká ascites břicha spojený se zvětšováním orgánů (Kirmse 1978).

Zástupci rodu *Haemogregarina* mají široké zastoupení po celém světě, vyskytují se od nejnižnějších částí po nejsevernější části Země. V mořích Antarktidy se nacházejí ryby z čeledi Nototheniidae (ledovkovití), v jejichž mononukleárních leukocytech srdce lze detekovat *H. notothenidae* (Barber a kol. 1987). V erythrocytech novozélandských ryb *Hoplichthys coelorhynchis* se vyskytuje *H. hoplichthys* (Laird 1952). *H. rubimarensis* infikuje ryby rodů *Scarus* a *Chlororus* v Rudém moři (Saunders 1960). U jeseterů (*Acipenser ruthenus*) z řeky Volhy nalézáme infekce způsobené *H. acipenseris* (Nawrotzky 1914). Ve vodách České republiky jsou okouni (*Perca fluviatilis*) nakaženi *H. vltavensis* (Lom a Dyková 1989). Mezi sladkovodními kaprovitými rybami (*Cyprinus carpio*) Francie je nejrozšířenější

hemogregarina *H. carpionsis* (Franchini a Saini 1923). V severních částech Země nalézáme *H. platessae*, jež infikuje platýze (*Trinectes maculatus*) v Severní Americe (Lebailly 1904).

Diagnostika probíhá pomocí krevních roztěrů obarvených Giemsou (Smit 2003). Dále jsou preparáty studovány elektronovým mikroskopem (Siddal a Dessler 1992).

### 1.3.5.2. *Desseria*

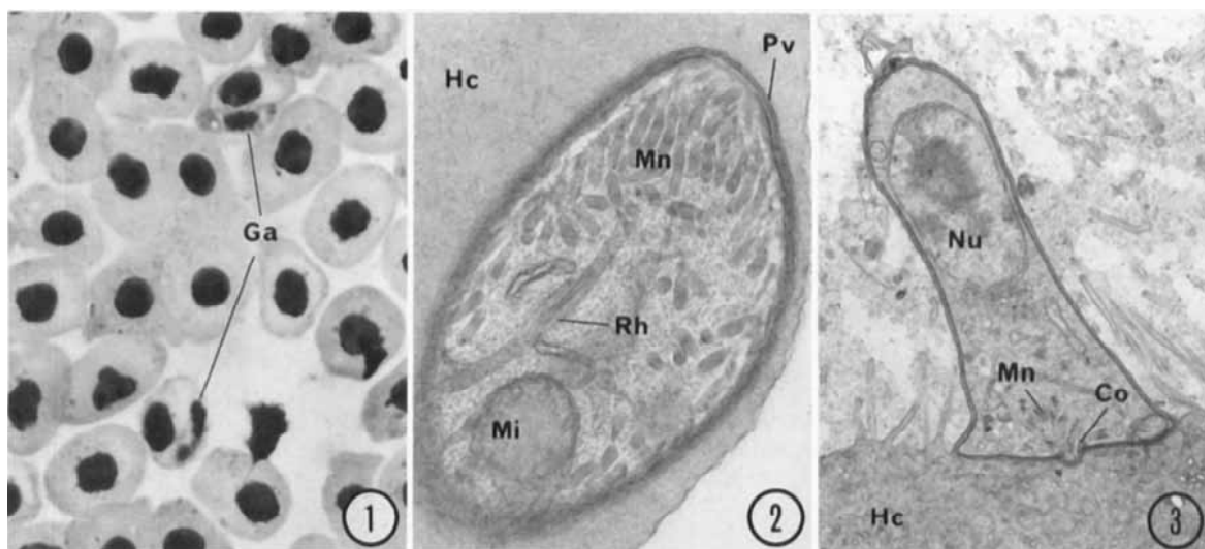
Rod *Desseria* Siddall, 1995 řadíme podle systematického zařazení (Adl a kol. 2012) do kmene Apicomplexa Levine, 1980, emend. Adl et al., 2005; třídy Conoidasida Levine, 1988; podtřídy Coccidia Leuckart, 1879; podřádu Adeleorina, Léger, 1911 a čeledi Haemogregarinidae Neveu – Lemaire, 1901.

Paraziti jsou zakřivení, dlouzí a širocí. Největší šířky dosahují na konci, který leží směrem k jádru. Stejně jako jim příbuzné haemogregariny jsou charakteristické gamonty lokalizovanými kolem jádra v normocytech, kde se objevují buď jednotlivě, nebo v párech při vysoké parazitémii (Smith a Davies 2006). Siddall (1995) zařadil 41 druhů haemogregarin do rodu *Desseria* na základě odlišností v morfologii a především na základě odlišností v životních cyklech. Smith (1996) později přidal další druhy (Siddall 1995, Smith 1996). Ovšem některé z desserií nebyly dosud uznány nebo byly vráceny k původnímu rodu (Davies a kol. 2012).

Jejich vývojová stádia jsou lokalizována v krevních buňkách, volném krevním řečišti (obratlovčí hostitelé) nebo v zažívacím ústrojí (bezobratlý vektor). Bývají přenášeny krev sajícími pijavkami (Hirudinea, Piscicolidae) (Davies a Smith 2001).

Vyskytují se u ryb v téměř všech oblastech světa. Na jižním a jihozápadním pobřeží jižní Afriky se vyskytuje *Desseria zeii* u pilobříchů (*Zeus capensis*) (Smith a Davies 2006). V řekách severní Afriky jsou cípalové (*Mugil cephalus*) infikováni *Desseria mugili* (Fantham 1919, Saunders 1955, Paperna 1996). U říčních úhořů (*Anguilla anguilla*) v Portugalsku nalézáme *Desseria bettencourti* (Cruz a Davies 1998). V centrálních částech Evropy jsou okouni (*Perca fluviatilis*) infikováni *Desseria vltavensis* (Lom a Dyková 1989, Davies a kol. 2012). I v severnějších částech Země mají tyto paraziti hojné zastoupení, v Severovýchodním Atlantiku (v okolí Irska) nalézáme v erythrocytech pachymér (*Harriotta releighana*) *Desseria hariottae* (Siddall 1995, Davies a kol. 2012). Siveni (*Salvelinus* spp.) v Kanadě bývají často infikováni *Desseria irkalukpiki* (Laird 1961, Davies a kol. 2012). Tresky a vranky (*Gadus morhua*, *Myoxocephalus octodecernspinosus*) v mořích a bentických oblastech severního

Norska mívají v krvi a erythrocytech *Desseria myoxocephali* (Obr. 16), jejímž vektorem je *Malmiana scorpii* (Siddall a Desser 1992, Siddall 1995).



Obr. 16: Gamonti *D. myoxocephali*: 1. Intraerythrocytiční gamonti v krvi *M. octodecernspinosus*; 2. Ultrastruktura intraerythrocytických gamontů: Mn – mikronem, Rh – roptrie, Pv – parazitofrní vakuola; 3. Raná stádia gamontů v epiteliálních buňkách střeva *M. scorpii*: Co – konoid, Mn – mikronem, Nu – jádro (Siddall a Desser 1992).

Životní cyklus probíhá v rybách i v pijavkách a je velmi podobný životnímu cyklu rodu *Haemogregarina* s tím rozdílem, že u rodu *Desseria* chybí intaerythrocytická merogonie (Davies a Smith 2001). V pijavce je postupována sporogonie, během které je produkováno 16 sporozoitů, po ní následuje primární merogonie ve stejné pijavce (Siddal 1995).

V krvi ryb byla během pokusů nalézána stádia pregamontů, což jsou malá intraerythrocytická vzácně extracelulární stádia. Jsou rovná nebo mírně zakřivená. Jednotlivé jádro je centrálně umístěno v těle parazita. V buňkách jsou stádia uložena jednotlivě (Davies a kol. 2012). Dalším stádiem vyskytujícím se jednotlivě v erythrocytech jsou gamonti, kteří jsou mírně zakřivení nebo mají klubkovitý tvar. Přední část jejich těla je zaoblená a posteriorní část se zužuje. Mají jemně granulovanou cytoplasmu a jádro není vždy viditelné (Davies a kol. 2012).

Vzhledem k blízkému vztahu rodů *Desseria* a *Haemogregarina* je pravděpodobné, že tyto parazité způsobují podobná onemocnění. Jedná se především o anémii a kachexii (Pazooki a Masoumian 2004).

Diagnostika probíhá stejným způsobem jako u hemogregarin. Krevní roztěry jsou barveny roztokem Giemsa – Romanowski a prohlíženy světelným mikroskopem (Smith a Davies 2005). K detekci stádií rodu *Desseria* v bezobratlých vektorech mohou být užity techniky 3D vizualizace pomocí světelného či konfokálního mikroskopu (Hayes a kol. 2011).

## **2. Cíle práce**

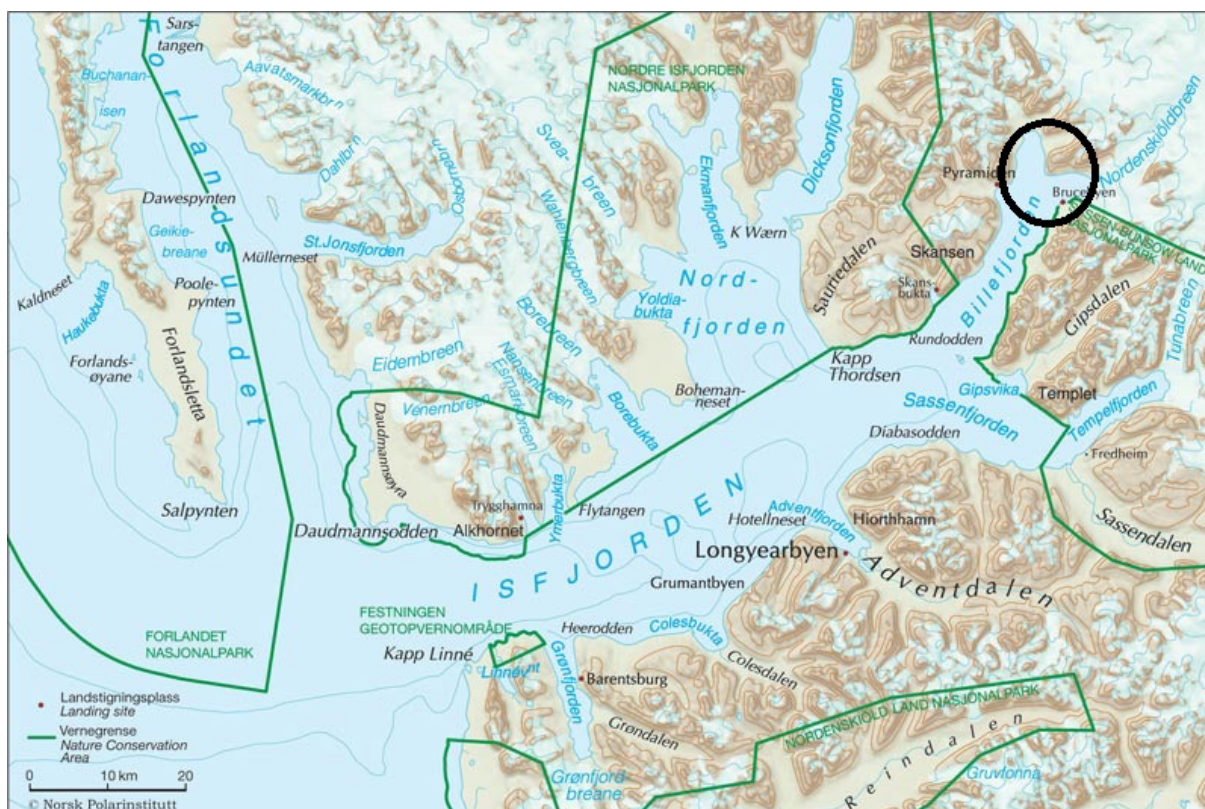
1. Zpracovat literární rešerši o krevních parazitech ryb.
2. Obarvit a mikroskopicky vyšetřit krevní roztěry ryb z litorálních vod Svalbardu (zejména *Myoxocephalus scorpius*), nalezené parazity charakterizovat morfologicky.
3. Získat sekvenci vhodného genu (např. 18S rDNA) pro fylogenetické studie nalezeného parazita.



### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Materiál

Vzorky rybí krve byly získány během dvou expedic (sezóny 2012, 2013) Centra polární ekologie pod záštitou Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity (URL 4, URL 5). Veškeré vzorky pocházejí z centrální části souostroví Svalbard, z nejzazšího konce Billefjordenu (Obr. 17).



Obr. 17: Pozice Billefjordenu v centrální části Svalbardu (převzato z Norský polární institut: URL 6).

Ryby byly odchytávány do tenatových sítí pokládáných do příbřežních zón (maximálně do hloubky 40 m). Po té byly ryby přemístěny do polní laboratoře, kde jim byla odebrána krev pomocí Pasteurovy skleněné pipety nebo skleněné kapiláry metodou krevního náběru vnější punkcí srdce (Svobodová a kol. 1986). Vždy byly zhotoveny 2 roztěry od každé ryby (Tab. 1.) Při odběru krve nebyl používán heparin, krevní roztěry byly připraveny ihned po odběru krve. Po zaschnutí krve byly roztěry fixovány 100 % methanolem. Pro pozdější extrakci DNA byla část odebrané krve uložena do 400  $\mu$ l TNES pufru (Asahida a kol. 1996), v ideálním případě ve stejném objemu jako pro přípravu jednoho krevního roztěru.

Konání expedic a výzkumná činnost na Svalbardu byla povolena místním úřadem Sysselmann, oddělením ochrany přírody (povolení č.2009/00596-11, 2013/00722-2).

Tab. 1: Přehled ryb, z nichž byla odebrána a vyšetřena krev

	Počet vyšetřených jedinců za jednotlivé roky	
	2012	2013
<i>Myoxocephalus scorpius</i>	32	21
<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	0	5
<i>Boreogadus saida</i>	0	10
<i>Clupea harengus</i>	0	2
<i>Gadus morhua</i>	2	2

## 3.2. Metody

### 3.2.1 Mikroskopická diagnostika

Nafixované krevní roztěry byly barveny pomocí 10× ředěného (vodovodní vodou) roztoku Giemsa - Romanowski (Penta, 14460 - 11000) po dobu 30 min. Po uplynutí doby barvení byla sklíčka oplachována přibližně 30 s pod tekoucí vodovodní vodou a po té ponechána zaschnout při laboratorní teplotě. Takto obarvené vzorky byly prohlíženy meandrovitým postupem (Svobodová a kol. 2012) pod imerzním objektivem (při 100× zvětšení) mikroskopu Olympus BX53. Nálezy byly dokumentovány pomocí kamery DP72 (Olympus). U jednotlivých gamontů byla jako délka měřena jejich podélná osa, tj. nabyla měřena lineární spojnice anteriorního a posteriorního konce buňky, ale spojnice procházející středem zahnuté buňky. Pro měření byl použit program ImageJ ([imagej.nih.gov](http://imagej.nih.gov)).

### 3.2.2. Molekulární diagnostika

DNA byla extrahována pomocí zrychlené fenol - chloroformové extrakce (Holzer a kol. 2004). Krev uchovaná v 400 µl TNES pufru (10 mM Tris – HCl, 125 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5 % sodium dodecyl sulfát, 4 M močovina) byla přes noc lyzována ve 100 µg.ml<sup>-1</sup> proteinázy K při 55 °C. Následující den bylo ke každému vzorku přidáno 400 µl fenolu a později 400 µl chloroformu, směs byla v tomto kroku promíchána razantním protřepáním zkumavky v ruce. Jednotlivé fáze byly odděleny stáčením při 15 000 g po dobu 5 min. Vodní fáze (330 µl) byla přenesena do nové zkumavky a DNA vysrážena přidáním trojnásobného množství 92 % vychlazeného (- 20 °C) etanolu. Následovalo stáčení (15 000g/20 min) a poté slítí etanolu. DNA byla promyta 1 ml 70 % vychlazeného etanolu (- 20°C) a opět stočena (15 000g/5min). Přebytný etanol byl odstraněn pipetou a zkumavka byla umístěna do suché lázně (37 °C), kde se zbytkový etanol odpařil. Vysrážená DNA byla

rozpuštěna ve 100 µl sterilní deionizované vody (PCR vody). Mikrozkumavky s izolovanou DNA byly ponechány přes noc v ledničce (4 °C), aby došlo k dokonalému rozpuštění DNA a následné uloženy do - 20 °C.

U mikroskopicky vyšetřených a zároveň pozitivních vzorků byla provedena polymerázová řetězová reakce (PCR). Jako negativní kontrola sloužil vzorek E407 (*Boreogadus saida*), u kterého nebyl mikroskopicky prokázán žádný krevní parazit.

Reakce byla provedena v celkovém objemu 12,50 µl. Reakční směs obsahovala 1,25 µl 10× Taq buffer complete (15 mM MgCl<sub>2</sub>, Top-Bio); 1,00 µl dNTP (2 mM každé báze, Invitek); 0,50 µl forward primer a 0,50 µl revers primer (25 pmol/µl, Generi Biotech); 0,50 µl Taq Purple polymerázy (Top-Bio, 1 U/µl); 8,25 µl PCR vody a 0,50 µl templátové DNA. Amplifikační program se měnil podle kombinace primerů a typu reakce (**Tab. 3**).

Tab. 2: Použité primery.

Primer	Směr	Sekvence	Zdroj/citace
Hemo 1	Forward	TATTGGTTTTAAGAACTAATTTTATGATTG	Perkins a Keller 2001
Hemo 2	Revers	CTTCTCCTTCCTTTAAGTGATAAGGTTTAC	Perkins a Keller 2001
Erib 1	Forward	ACCTGGTTGATCCTGCCAG	Barta a kol. 1997
Erib 10	Revers	CTTCCGCAGGTTACCTACGG	Barta a kol. 1997
Medlin A	Forward	CCGAATTCGTCGACAACCTGGTTGATCCTGCCAGT	Medlin a kol. 1988
Medlin B	Revers	CCCGGATCCAAGCTTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC	Medlin a kol. 1988
Des233F	Forward	GCTCATTAAHAACAGTTATAGTTTR	Nově navržený primer
Des1151F	Forward	TTGAATACTBCAGCATG	Nově navržený primer
Des1408R	Revers	AATACRAATGCCCCAA	Nově navržený primer
Des1416F	Forward	TCAGAGGTGAAATTCTTAGATTT	Nově navržený primer
Des1416R	Revers	AAATCTAAGAATTTACCTCTGA	Nově navržený primer

Tab. 2 pokračování.

Des1750R	Revers	GAACCCAAAGACTTTGATTTC	Nově navržený primer
Des2200R	Revers	CACAGACCTGTTATTGCCT	Nově navržený primer
M13F	Forward	GTAAAACGACGGCCAGT	Univerzální sekvenační primer
M13R-pUC	Revers	CAGGAAACAGCTATGAC	Univerzální sekvenační primer

PCR reakcí bylo provedeno několik s různými kombinacemi primerů a různými vzorky.

Tab. 3: Provedené amplifikační reakce.

Forward primer	Revers primer	Modifikace PCR*	Amplifikační program (v závorce cyklicky opakující se kroky)	Počet cyklů
Hemo1	Hemo2	Bez modifikace	95 °C / 5 min (94 °C/1 min, 48 °C/ 1 min, 72°C/110 sek) 72 °C/ 10 min, 4 °C/ nekonečno	25
Erib1	Erib10	Nested PCR – 1.	95°C / 3 min (95°C / 50 sek, 48 °C / 50 sek, 72°C/110 sek) 72°C / 10 min, 4°C / nekonečno	30
MedlinA	MedlinB	Bez modifikace	95 °C / 5 min (94 °C / 1 min, 48°C/ 1 min, 72°C/110 sekund) 72°C/ 10 min, 4°C / nekonečno	25
Erib1	Hemo2	Bez modifikace	95 °C / 5 min (94 °C/1 min, 48 °C/ 1 min, 72°C/110 sek) 72 °C/ 10 min, 4 °C/ nekonečno	25
Hemo1	Erib10	Bez modifikace	95 °C / 5 min (94 °C/1 min, 48 °C/ 1 min, 72°C/110 sek) 72 °C/ 10 min, 4 °C/ nekonečno	25
MedlinA	Hemo2	Bez modifikace	95 °C / 5 min (94 °C/1 min, 48 °C/ 1 min, 72°C/110 sek) 72 °C/ 10 min, 4 °C/ nekonečno	25
Hemo1	MedlinB	Bez modifikace	95 °C / 5 min (94 °C/1 min, 48 °C/ 1 min, 72°C/110 sek) 72 °C/ 10 min, 4 °C/ nekonečno	25
Des233F	Des2200R	Nested PCR – 2.	95°C/ 3 min (95°C / 40 sek, 52°C/ 40 sek, 72°C/80 sekund) 72°C / 10 min, 4°C / nekonečno	30
Des233F	Des1750R	Nested PCR – 2.	95°C/ 3 min (95°C / 40 sek, 52°C/ 40 sek, 72°C/80 sekund) 72°C / 10 min, 4°C / nekonečno	30
Des233F	Des1416R	Nested PCR – 2.	95°C/ 3 min (95°C / 40 sek, 52°C/ 40 sek, 72°C/80 sekund) 72°C / 10 min, 4°C / nekonečno	30
Des1151F	Des2200R	Nested PCR – 2.	95°C/ 3 min (95°C / 40 sek, 52°C/ 40 sek, 72°C/80 sekund) 72°C / 10 min, 4°C / nekonečno	30
Erib1	Des2200R	Nested PCR – 2.	95°C/ 3 min (95°C / 40 sek, 52°C/ 40 sek, 72°C/80 sekund) 72°C / 10 min, 4°C / nekonečno	30

Tab. 3 pokračování.

Erib1	Des1750R	Nested PCR – 2.	95°C/ 3 min (95°C /40 sek, 52°C/ 40 sek, 72°C/80 sekund) 72°C /10 min, 4°C /nekonečno	30
Erib1	Des1416R	Nested PCR – 2.	95°C/ 3 min (95°C /40 sek, 52°C/ 40 sek, 72°C/80 sekund) 72°C /10 min, 4°C /nekonečno	30
Erib1	Des1408R	Nested PCR – 2.	95°C/ 3 min (95°C /40 sek, 52°C/ 40 sek, 72°C/80 sekund) 72°C /10 min, 4°C /nekonečno	30
Des233F	Erib10	Nested PCR – 2.	95°C/ 3 min (95°C /40 sek, 52°C/ 40 sek, 72°C/80 sekund) 72°C /10 min, 4°C /nekonečno	30
Des233F	Des1408R	Nested PCR – 2.	95°C/ 3 min (95°C /40 sek, 52°C/ 40 sek, 72°C/80 sekund) 72°C /10 min, 4°C /nekonečno	30
Des1151F	Erib10	Nested PCR – 2.	95°C/ 3 min (95°C /40 sek, 52°C/ 40 sek, 72°C/80 sekund) 72°C /10 min, 4°C /nekonečno	30
Des1151F	Des1750R	Nested PCR – 2.	95°C/ 3 min (95°C /40 sek, 52°C/ 40 sek, 72°C/80 sekund) 72°C /10 min, 4°C /nekonečno	30

\* Nested PCR = odstupňovaná PCR, kde v první reakci (Nested PCR – 1.) bylo využito vnějších a univerzálních primerů, v následující reakci (Nested PCR – 2.) byly použity vnitřní primery, kde byl vždy alespoň jednou zastoupen primer navržený pro rod *Desseria*.

Po dokončení amplifikační reakce následovala agarózová elektroforéza (ELFO) na 1 % agarózovém gelu rozpuštěném v 1× TAE pufru (40 mM Tris, 20 mM kyselina octová a 1 mM EDTA). DNA byla obarvena pomocí ethidium bromidu (PCR Ethidium bromid, Top - Bio) v koncentraci 0,5 µg.ml<sup>-1</sup>. Výsledky elektroforézy byly kontrolovány pomocí UV transiluminátoru a dokumentovány kamerou (Scion Corporation). Pomocí skalpulu byl vyříznut potřebný produkt pro další krok a přenesen do mikrozkušavky. Z vyříznutého bločku gelu byl extrahován PCR produkt pomocí kitu (Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit, Genaid nebo QIA quick PCR Purification Kit, Qiagen) a podle postupu dodaném výrobcem.

Ve snaze získat sekvence 18S rDNA nalezeného krevního parazita pomocí univerzálních eukaryotických primerů (Erib1 + Erib10) a vyhnout se sekvencím hostitele byly získané PCR produkty zaklonovány (vzorky D201, D202, D212). Nejprve byla provedena ligace do vektoru pDrive Cloning Vector (Qiagen) podle návodu výrobce. Ligace probíhala při 14 °C po dobu 2 hod v cycleru, poté byl vzorek uložen do ledničky. Tímto rekombinantním plasmidovým vektorem byly transformovány kompetentní bakterie *Escherichia coli* (DH5α, Invitrogen<sup>TM</sup>). Bakterie (50 µl) byly napipetovány pomocí špičky s ustřiženým koncem k ligační směsi, jež byla promíchána a inkubována 10 min na ledu. Po té byla směs s buňkami ponořena na 30 s do předem připravené vodní lázně (42 °C), která jim

způsobila teplotní šok. Buňky byly ihned vráceny na led po dobu 2 min. Do směsi s buňkami bylo přidáno 200 µl SOC média (Invitrogen) zahřátého na pokojovou teplotu. Zkumavka byla umístěna ve vodorovné poloze do inkubované třepačky na 30 min při 37 °C.

Na LB agaru (5 g NaCl; 5 g trypton; 2,5 g kvasničný extrakt; 7,5 g agar, 500 ml dH<sub>2</sub>O/ 90 mm Petriho miska) bylo důkladně rozetřeno 40 µl X-galu sterilní hokejkou. Následně byly na misku vylity transformované buňky a opět rozetřeny. Miska byla uložena do termostatu (37 °C) přes noc. Ráno byla zkontrolována přítomnost bílých kolonií, které obsahují cizorodou DNA. Přítomnost ligovaného fragmentu DNA byla zkontrolována ještě také pomocí (screening) PCR.

Nejprve bylo napipetováno 30 µl vody do 1,5 ml zkumavky. Špičkou z pipety byly vypíchnuty bílé kolonie buněk, které byly následně přeneseny do předem připravené zkumavky s vodou. Zkumavka byla umístěna do třepačky na 10 min při teplotě 37 °C. PCR směs byla rozpipetována po 11 µl do zkumavek a 10 min inkubována. Po té byly k PCR směsi přidány 2 µl buněčné suspenze a vše důkladně promícháno. Zbylá buněčná suspenze byla uložena v lednici k pozdějšímu použití.

Reakční směs pro PCR screening probíhala v celkovém objemu 11 µl. Reakční směs obsahovala 1,25 µl 10× Taq Buffer complete (Top-Bio, 15 mM MgCl<sub>2</sub>); 1,00 µl dNTP; 0,50 µl M13 Forward primeru; 0,50 µl M13 Revers primeru; 0,50 µl Taq polymerázy A a 7,25 µl PCR vody (sterilní deionizovaná voda). Nastavený amplifikační program je popsán v **Tab. 3**.

Po provedení PCR screeningu byl u klonů s očekávanou velikostí vloženého fragmentu namnožen plasmid. Směs pro namnožení plasmidu obsahovala 3 ml LB média (10 g NaCl; 10 g trypton; 5 g kvasničný extrakt); 12 µl ampicilinu (BIOTIKA, konečná koncentrace 50 mg/ml); zbylou bakteriální suspenzi *E. coli*. Takto připravená směs byla umístěna do třepačky přes noc při 37 °C.

Dalším krokem k získání sekvence DNA byla izolace plasmidu. Plasmid byl izolován pomocí High Pure Plasmid Isolation kitu (Roche) podle protokolu výrobce.

Izolovaný plasmid byl rozpuštěn v 70 µl PCR H<sub>2</sub>O, z celkového objemu bylo 5 µl použito na změření koncentrace DNA pomocí spektrofotometru a 20 µl bylo odesláno na osekvenování pomocí primeru M13F-pUC do Macrogene (Nizozemsko, Amsterdam). Zbylá část plasmidu byla uložena do - 20°C.

Byla také navržena sada nových primerů. Sekvence vhodných primerů byly hledány v alignmentu 18S rDNA sekvencí zástupci patřící téměř do všech tříd eukaryotických organismů – Excavata, Rhizaria, Chromalveolata, Amebozoa a Opisthokonta (**Tab. 4**).

Sekvence FJ710886, 18S rDNA lososa *Salmo salar*, zastupovala hostitelskou sekvenci, protože ani z jedné vranky (*M. scorpius* nebo *G. tricuspis*) nebyla sekvence k dispozici. Nově navržené primery jsou zaznamenány v **Tab. 7** (kapitola 4. Výsledky).

Tab. 4: Taxony a jejich 18S rDNA sekvence použité při navrhování nových primerů.

<b>Taxon</b>	<b>Přístupové číslo sekvence (databáze NCBI)</b>	<b>Systematické zařazení</b>
<i>Gymnodinium fuscum</i>	AF022194	Alveolata, Dinoflagellata
<i>Theileria parva</i>	AF013418	Alveolata, Apicomplexa
<i>Toxoplasma gondii</i>	M97703	Alveolata, Apicomplexa
<i>Eimeria tenella</i>	U67121	Alveolata, Apicomplexa
<i>Hepatozoon catesbiana</i>	AF130361	Alveolata, Apicomplexa
<i>Adelina bambarooniae</i>	AF494059	Alveolata, Apicomplexa
<i>Rhytidocystis polygordiae</i>	DQ273988	Alveolata, Apicomplexa
<i>Cryptosporidium parvum</i>	AF093489	Alveolata, Apicomplexa
<i>Paraschneideria metamorphosa</i>	FJ459755	Alveolata, Apicomplexa
<i>Monocystis agilis</i>	AF457127	Alveolata, Apicomplexa
<i>Mattesia geminata</i>	AY334568	Alveolata, Apicomplexa
<i>Gregarina blattarum</i>	FJ459741	Alveolata, Apicomplexa
<i>Lankesteria chelyosomae</i>	EU670240	Alveolata, Apicomplexa
<i>Difficilina tubulani</i>	FJ832160	Alveolata, Apicomplexa
<i>Thiriotia pugettiae</i>	HQ876006	Alveolata, Apicomplexa
<i>Ganymedes</i>	FJ976721	Alveolata, Apicomplexa
<i>Lecudina polymorpha</i>	AY196707	Alveolata, Apicomplexa
<i>Selenidium terebellae</i>	AY196709	Alveolata, Apicomplexa
<i>Euplotidium</i>	HE775112	Alveolata, Ciliophora
<i>Cercomonadida</i>	EF024163	SAR, Cercozoa
<i>Amoeba proteus</i>	AJ314604	Amoebozoa, Tubulinea
<i>Naegleria</i>	DQ768720	Excavata, Discoba
<i>Trypanosoma rotatorium</i>	AJ009161	Excavata, Discoba
<i>Dermocystidium percae</i>	AF533944	Opisthokonta, Ichthyosporea
<i>Salmo salar</i>	FJ710886	Opisthokonta, Pisces
<i>Aggregata octopiana</i>	DQ096837	Alveolata, Apicomplexa

PCR produkty o očekávaných velikostech, které se povedlo získat v PCR amplifikacích s nově navrženými primery, byly izolovány a odeslány na osekvenování. Kombinace primerů Des233F + Des1750R a Des1151F + Des2200R přinesla pozitivní výsledek. Dvě získané sekvence (pocházejí pouze z hostitele *M. scorpius* E396) byly složeny dohromady v programu Geneious Pro R7 (Biomatters, Nový Zéland) a výsledná sekvence porovnána pomocí algoritmu BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se sekvencemi uloženými v databázi NCBI (National Center for Biotechnology Information). Ze stejné databáze byly staženy další sekvence 18S rDNA vybraných zástupců říše Apicomplexa (*Adelina bambarooniae* AF494059, *Adelina grylli* DQ096836, *Dactylosoma ranarum* HQ224957, *Dactylosoma ranarum* HQ224958, *Babesiosoma stableri* HQ224961, *Haemogregarina balli* HQ224959, *Haemogregarina stepanowi* KF257929, *Hepatozoon ayorgbor* EF157822, *Hepatozoon* sp. Hep.BiCM001 AY600626, *Hepatozoon* sp. BV1 AY600625, *Hepatozoon* sp. BV2 AB181504, *Hepatozoon* sp. Boiga AF297085, *Hepatozoon catesbiana* HQ224954, *Hepatozoon* cf. *catesbiana* HQ224962, *Hepatozoon* cf. *clamatae* B2 HQ224963, *Hepatozoon catesbiana* AF130361, *Hepatozoon* sp. JRB – 2011 HQ224960, *Hepatozoon canis* DQ439543, *Hepatozoon canis* DQ439540, *Hepatozoon* sp. AY461377, *Hepatozoon felis* AY620232, *Hepatozoon felis* AY628681, *Adelina dimidiata* DQ096835, *Klossina helicana* HQ224955) a také Dinoflagellata (*Colpodella tetrahymenae* AF330214, *Colpodella pontica* AY078092 a *Voromonas pontica* AF280076), kteří posloužili v následujících analýzách jako outgroup. Připravený dataset z celkem 60 sekvencí byl alignován pomocí programu MAFFT 7 (Kato 2013) a v programu Geneious Pro R7 byl alignment vizuálně zkontrolován a zkrácen o nejednoznačně srovnané nebo neinformativní úseky. Pro úpravu alignmentu byly použity dva různé přístupy: razantnější (alignment zkrácen na 1016 bp) a mírnější (alignment zkrácen na 1202 bp). Oba alignmenty byly analyzovány metodou maximum likelihood provedenou v programu RAxML 7.0.3 (Stamatakis 2006) a s modelem GTR gamma a bootstrapová podpora byla vypočtená z 1000 opakování. Výsledky obou analýz byly porovnány a další analýza byla provedena pouze na delším alignmentu (1202 bp). Dataset byl analyzován ještě metodou Bayes interference pomocí programu MrBayes 3.1.2 (Ronquist a Huelsenbeck 2003) s modelem GTR gamma a nastavením na 1 milion generací a eliminací první desetiny uložených kladogramů jako burn-in. Výsledný kladogram byl graficky upraven ve vektorovém editoru Illustrator CS6 (Adobe Systems, San José).



#### 4. Výsledky

Krevní paraziti byli nalezeni na celkem 9 krevních roztěrech a pouze u vranek druhů *M. scorpius* a *G. tricuspis*. Celkem bylo na krevních roztěrech zaznamenáno 75 jedinců parazita (Tab. 5). Ve všech případech se jednalo o vnitrobuněčné parazity, kteří byli nalezeni pouze uvnitř erytrocytů (Obr. 18). Na základě morfologie, tj. dlouhí červovité gamonti uložení v cytoplasmě krevních buněk (Desser 1993) a lokalizace, tj. gamogonie lokalizovaná v erytrocytech studenokrevných obratlovců (Lom a Dyková 1992) byli určeni jako zástupci čeledi Haemogregarinidae.

Z celkového počtu 53 vyšetřených roztěrů krve *Myoxocephalus scorpius* bylo pozitivních pouze 7 jedinců ryb. Na každém z roztěrů bylo nalezeno 3 - 17 jedinců parazita (průměr = 7,9; medián = 6).

Krevních roztěrů pocházejících z krve *Gymnocanthus tricuspis* bylo pozitivních 40 % jedinců ryb (n = 5). V jednom z krevních roztěrů bylo identifikováno 6 jedinců parazita a ve druhém 14 jedinců parazita (průměr = 10; medián = 8).

Tab. 5: Mikroskopické nálezy parazitů v krevních roztěrech.

Kód hostitele	Druh hostitele	Datum odběru krve /pitvy	Mikroskopický nález <sup>1</sup>	Počet jedinců parazita <sup>2</sup>
D1	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D2	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D4	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D5	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D6	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D7	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D111	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D112	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D114	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D115	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D116	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D118	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D119	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D135	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D174	<i>Gadus morhua</i>	Červenec 2012	-	0
D196	<i>Gadus morhua</i>	Červenec 2012	-	0
D197	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D198	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D200	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D201	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	+	6
D202	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	+	5
D 203	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	+	8

Tab. 5 pokračování.

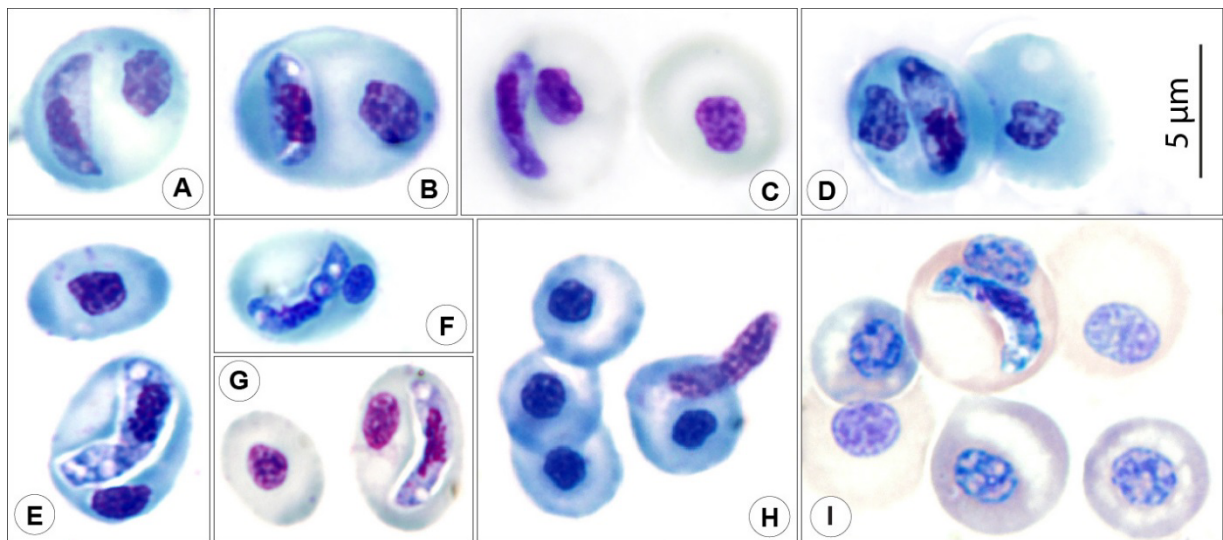
D204	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D205	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D206	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D207	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D208	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D209	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D210	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D212	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	+	6
D213	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D215	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D216	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
D217	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Červenec 2012	-	0
E48	<i>Boreogadus saida</i>	Srpen 2013	-	0
E51	<i>Boreogadus saida</i>	Srpen 2013	-	0
E53	<i>Boreogadus saida</i>	Srpen 2013	-	0
E206	<i>Clupea harengus</i>	Srpen 2013	-	0
E207	<i>Clupea harengus</i>	Srpen 2013	-	0
E220	<i>Gadus morhua</i>	Srpen 2013	-	0
E221	<i>Boreogadus saida</i>	Srpen 2013	-	0
E230	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
E231	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
E232	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
E233	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
E234	<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	Srpen 2013	-	0
E302	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
E386	<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	Srpen 2013	-	0
E387	<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	Srpen 2013	-	0
E389	<i>Boreogadus saida</i>	Srpen 2013	-	0
E393	<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	Srpen 2013	+	14
E395	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
E396	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	+	10
E397	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
E398	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	+	17
E399	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
E400	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
E401	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
E402	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
E403	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	+	3
E404	<i>Boreogadus saida</i>	Srpen 2013	-	0
E405	<i>Boreogadus saida</i>	Srpen 2013	-	0
E406	<i>Boreogadus saida</i>	Srpen 2013	-	0
E407	<i>Boreogadus saida</i>	Srpen 2013	-	0
E408	<i>Boreogadus saida</i>	Srpen 2013	-	0
E409	<i>Gadus morhua</i>	Srpen 2013	-	0
E410	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
E411	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
E412	<i>Gymnocanthus tricuspis</i>	Srpen 2013	+	6

Tab. 5 pokračování.

<b>E413</b>	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
<b>E414</b>	<i>Myoxocephalus scorpiu</i>	Srpen 2013	-	0
<b>E415</b>	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
<b>E416</b>	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0
<b>E417</b>	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Srpen 2013	-	0

mikroskopický nález (+) = přítomnost parazita na krevním roztěru; mikroskopický nález (-) = přítomnost parazita mikroskopicky nepotvrzena.

<sup>2</sup> počet jedinců parazita se vztahuje vždy pouze k jednomu obarvenému a prohlíženému krevnímu roztěru.



**Obr. 18:** A - I. Gamonti *Desseria myoxocephali* nalezení na krevních roztěrech vraneč *M. scorpius* a *G. tricuspis*, Giemsa. A - D. Gamonti nalezení na krevních roztěrech *M. scorpius* (D201, E396, E403) v různých konformacích vzhledem k jádru. C. Mírně zvětšený infikovaný erytrocyt. E - G. Gamonti nalezení na krevních roztěrech *G. tricuspis* (E393). E, G. Zvětšené infikované erytrocyty. H. Uvolněný gamont z infikovaného erytrocytu (*M. scorpius*, E403). I. Gamont uvnitř infikovaného erytrocytu, jehož jádro téměř vytlačuje mimo buňku a patrná variabilita ve velikostech erytrocytů (*M. scorpius*, D201). Měřítka (5 µm) je pro 18 A - I totožné.

Paraziti nalezení v krevních roztěrech *Myoxocephalus scorpius* a *Gymnocypris tricuspis* vykazovali stejné znaky. Jedná se konkrétně o polohu gamontů vůči jádru. V erytrocytech infikovaných ryb byli jednotlivě uloženi červovití gamonti v parazitoformní vakuolou. Jeden konec byl vždy zavalitější a zaoblený, zatímco druhý se na konci nepatrně zužoval. Gamonti byli v erytrocytu nalézáni v blízkosti jádra, které bylo často vytlačeno na okraj buňky. Oba konce gamonta směřovaly buď k jádru erytrocytu, nebo naopak se odkláněly od jádra (pouze v 6 případech ze 75 nalezených gamontů). Chromatin gamontů u obou hostitelů byl velmi dobře barvitelný a tedy viditelný, nejčastěji se nacházel uprostřed gamonta a blíže k jeho širšímu konci. Infikované erytrocyty *M. scorpius* si zachovávaly svou velikost i po infikování parazitem, některé infikované erytrocyty u vranky *G. tricuspis* byly buď zvětšené, nebo si svou velikost zachovaly (Obr. 18 E, F, I).

Rozměry nalezených gamontů nebyly ve všech případech stejné. Jejich délka se pohybovala od 7,5 – 11,6  $\mu\text{m}$ . Šířka gamontů se pohybovala od 1,8 – 4,3  $\mu\text{m}$ . U vranek *Myoxocephalus scorpius* se délky nalezených vývojových stádií parazita pohybovaly od 7,5 – 11,6  $\mu\text{m}$  (průměr = 9,6  $\mu\text{m}$ , medián = 9,7, směrodatná odchylka = 1), zatímco u vranky *Gymnocanthus tricuspis* byly délky od 9,9 – 11,2  $\mu\text{m}$  (průměr = 10,4  $\mu\text{m}$ ; medián = 10,4; směrodatná odchylka = 0,5). Pouze v jednom případě, u *M. scorpius* (D201) délky nalezených vývojových stádií parazita nedosáhly hodnot pod 10,4  $\mu\text{m}$ , u ostatních zástupců ryb (D202, D203, E396, E398, E403) byly délky variabilní a pohybovaly se i pod hodnoty 8,0  $\mu\text{m}$ . Šířky nalezených parazitů se také značně lišily. U *M. scorpius* se hodnota šířek pohybovala od 1,8 – 4,3  $\mu\text{m}$  (průměr = 2,8; medián = 2,8; směrodatná odchylka = 0,5). U *G. tricuspis* se hodnoty šířek pohybovaly od 2,2 – 3,1  $\mu\text{m}$  (průměr = 2,7; medián = 3, směrodatná odchylka = 0,4). Poměry v délce a šířce gamontů byly 2,7 – 5,2 (n = 32) u *M. scorpius* a 3,2 – 4,5 (n = 5) v případě nálezů u *G. tricuspis*. Největší šířka (4,3  $\mu\text{m}$ ) byla naměřena u *M. scorpius* (D201), jehož vývojová stádía dosahovaly délky i nad 11,5  $\mu\text{m}$ .

Na základě morfologických znaků (**Obr. 18**), naměřené délky a šířky gamontů a hostitele (*Myoxocephalus scorpius*) byli paraziti identifikováni jako *Desseria myoxocephali*, která byla popsána Fanthamem a kol. (1942) a později pozorována a do detailu charakterizována Siddallem a Desserem (1992).

U ryb, kde byla mikroskopicky diagnostikována *Desseria*, byla provedena PCR amplifikační reakce. Protože není známa jediná sekvence 18S rDNA ani žádná jiná, bylo postupně vyzkoušeno několik kombinací univerzálních primerů a primerů s vyšší mírou specifčnosti (**Tab. 2**). Přes veliké úsilí a opakované zkoušení různých kombinací nepřinesly amplifikační reakce žádné pozitivní výsledky. Stejně dopadly pokusy s odstupňovanou PCR, zaklonováním PCR produktů do kompetentních buněk a následným hledáním mezi klony transformovaných bakterií. Výsledek sekvenace vyloučil úspěšné zaklonování úseku 18S rDNA nalezeného parazita. Získané sekvence úspěšně zaklonovaných úseků patřily buď hostiteli, nebo bakteriím *Vibrio alginolyticus*.

Po několika neúspěšných pokusech byly navrženy nové primery (**Tab. 2, Tab. 6**). Nově navržené primery jsou univerzální pro apikomplexa a zahrnují i bazální skupiny, zároveň však neamplifikují hostitelskou (rybí) 18S rDNA.

Tab. 6: Nově navržené primery.

Nový primer	Směr	Sekvence	Počet bází (bp)	Teplota
Des233F	Forward	GCTCATTAHAACAGTTATAGTTTR	24	55 – 58
Des1151F	Forward	TTGAATACTBCAGCATG	17	45 - 47
Des1416F	Forward	TCAGAGGTGAAATTCTTAGATTT	23	55
Des1408R	Revers	AATACRAATGCCCCCAA	17	47 – 50
Des1416R	Revers	AAATCTAAGAATTCACCTCTGA	23	55
Des1750R	Revers	GAACCCAAAGACTTTGATTTCT	22	56
Des2200R	Revers	CACAGACCTGTTATTGCCT	19	55

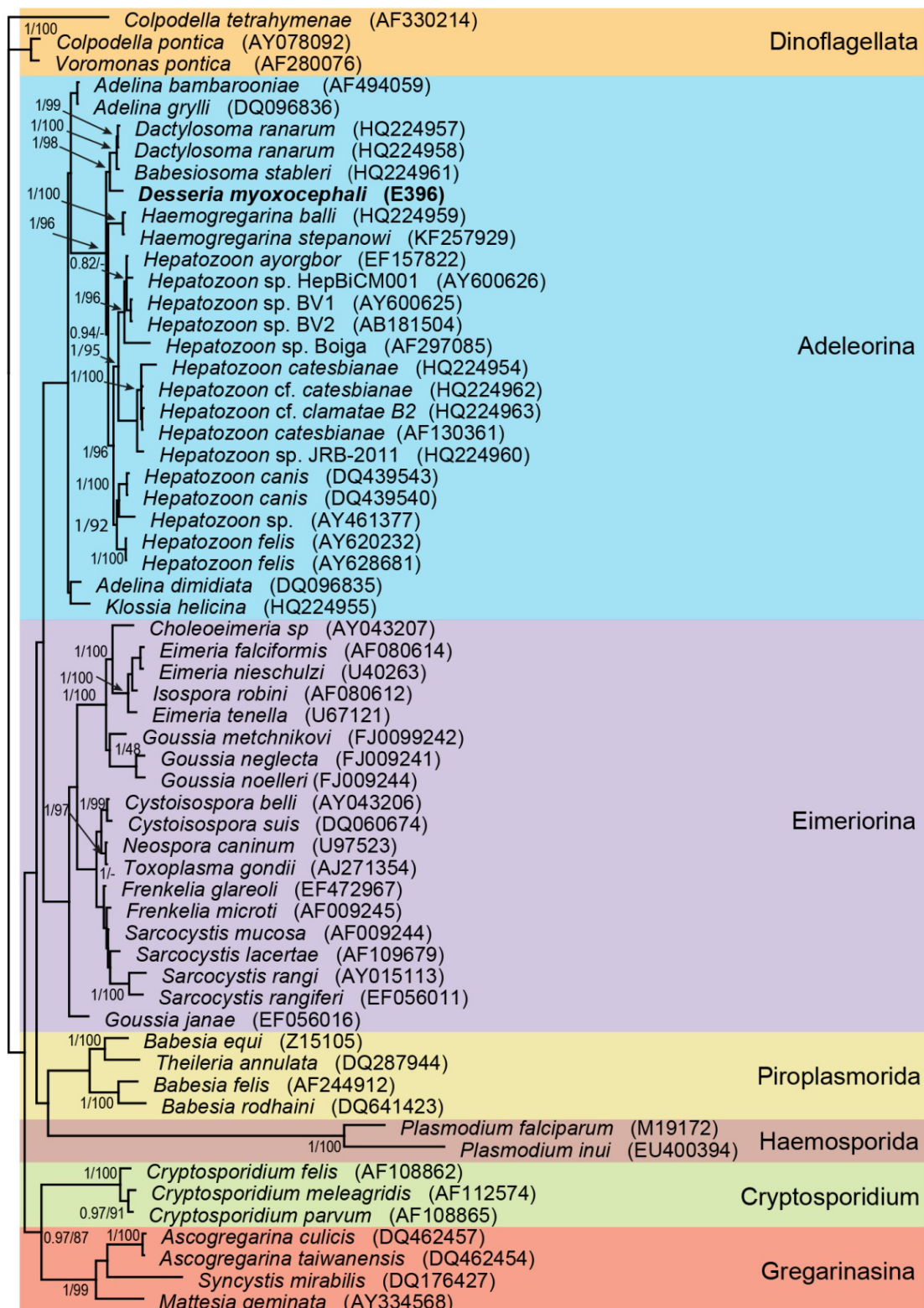
S novými primery byla následně provedena odstupňovaná PCR, s mikroskopicky pozitivními vzorky E393, E396, E398, E403, E412 (**Tab. 5**). Jako kontrola byl použit mikroskopicky negativní vzorek z *Boreogadus saida* (E407), u kterého nebyl nalezen žádný krevní parazit. Amplifikační reakce a použité primery jsou zaznamenány v **Tab. 3**. Elektroforetické ověření prokázalo namnožení úseků o očekávané velikosti a kombinace primerů Des233F + Des1750R a Des1151F + Des2200R přinesla pozitivní výsledek. Jediná 18S rDNA sekvence pochází z hostitele *M. scorpius* a z jedince E396.

Tab. 7: Srovnání získané sekvence s nejpodobnějšími sekvencemi v databázi NCBI.

<i>Desseria myoxocephali</i> (E396)	E396	HQ224957	HQ224958
<i>Dactylosoma ranarum</i> (HQ224957)	95,43 %		
<i>Dactylosoma ranarum</i> (HQ224958)	95,47 %	99,80 %	
<i>Babesiosoma stableri</i> (HQ224961)	95,43 %	99,51 %	99,55 %

Srovnání získané sekvence pomocí algoritmu Blast s databází NCBI potvrdilo příslušnost nalezeného parazita mezi Adeleorina (Apicomplexa), do blízkosti rodů *Dactylosoma*, *Hemolivia*, *Hepatozoon* a *Haemogregarina*. Sekvenční identita s *Dactylosoma ranarum* a *Babesiosoma stableri* je zaznamenána v **Tab. 7**. Příbuznost s druhy *D. ranarum* a *Babesiosoma stableri* byla potvrzena všemi fylogenetickými analýzami. Ačkoliv byl pro obě fylogenetické metody (kromě Bayes interference také Maximum likelihood) vybrán pouze jeden z upravených alignmentů (s délkou 1202 bp), výsledek jediné analýzy (Bayes

interference) kratšího alignmentu (1016 bp) nebyl nijak v rozporu. Pouze podpory (posterior probabilities) byly pro některé uzly nižší (např. 0,98 pro linii *Dactylosoma ranarum*, *Babeiosoma stableri* a *Desseria myoxocephali* oproti 1 v případě delšího alignmentu).



0.2

**Obr. 19:** Kladogram fylogenetické analýzy sekvencí 18S rDNA metodou Bayes interference. Hodnoty uvedené u uzlů jsou posterior probabilities (vyšší než 0,8) / bootstraps (vyšší než 80 %). Kódy v závorce jsou přístupová čísla sekvencí, v případě *Desseria myoxocephali* označuje kód konkrétního jedince hostitele. Nově získaná sekvence je zvýrazněna tučným písmem. Dinoflagellata slouží jako outgroup.

## 5. Diskuse

Krevní paraziti jsou celosvětově rozšířenou a úspěšnou skupinou, která je převážně závislá na přenosu pomocí nejrůznějších krevsajících vektorů. Mezi jejich hostitele patří také ryby žijící v severských oblastech světa. Překvapivě se nám ve vyšetřovaných vzorcích krve ryb nepodařilo objevit žádné zástupce rodu *Trypanosoma*, neboť právě ve vodách kolem severního Norska jsou často zaznamenány infekce u *Gadus morhua* a *Myoxocephalus scorpius* vyvolané *Trypanosoma murmanensis* (Khan 1980, Nikitin 1927). V tomto případě je ale vysvětlení zřejmé – pijavka *Johanssonia arctica* (Khan 1976), jediný známý vektor *T. murmanensis*, není ze Svalbardu známá (Prestrud a kol. 2004). V krevních roztěrech nebyli nalezeni ani zástupci rodu *Trypanoplasma*, kteří jsou svou morfologií podobní trypanosomám (Khan 1976). Trypanoplasmy jsou ve východním a západním Atlantiku přenášeny pijavkami *Cystobranchus virginus* a *Calliobdella vivida*, které se na Svalbardu také nevyskytují (Prestrud a kol. 2004), není znám ani žádný jiný zástupce rodu *Trypanoplasma*, který by zde mohl infikovat ryby (Becker a Katz 1965, Bureson 1982, Putz 1962).

V arktických oblastech byli zaznamenáni také paraziti patřící do třídy Myxosporidia (Kodádková a kol. 2014). Na Svalbardu byla identifikována *Ceratomyxa porrecta* (Ceratomyxidae) u *Myoxocephalus scorpius* (Kodádková a kol. 2014). Paraziti čeledi Ceratomyxidae jsou v Arktických oblastech přenášeni prostřednictvím mnohoštětinatců (Polychaeta), kteří patří do čeledi Sabellidae (Koie a kol. 2008, Kodádková a kol. 2014). U *Gymnocanthus tricuspis* vyskytujícím se na Svalbardu byla popsána *Parvicapsula petuniae* (Parvicapsulidae) (Kodádková a kol. 2014). V ledvinách ryb *Boreogadus saida* žijících také na Svalbardu byla nalezena *Zschokkella siegfriedi* (Myxidiidae). U *Clupea harengus* byla identifikována *Latyspora* sp. (Sinuolineidae), tyto parazity byli opět lokalizováni v ledvinách (Kodádková a kol. 2014). V našich krevních roztěrech nebyla přítomnost myxosporid potvrzena. V krvi ryb se vyskytují pouze presporogonická nebo extrasporogonická stádia myxosporid (Holzer a kol. 2013, Molnár 1988). Je nepravděpodobné, že by se v krvi studovaných ryb tato krevní stádia vůbec nevyskytovala, ale přítomnost určitých druhů myxosporid je závislá na sezóně. Například u *Ceratomyxa* spp. je intenzita infekce zvýšena během zimy a snížena během léta (Foot a Hedrick 1987, Molnár a Kovács-Gayer 1986). Je tedy možné, že v době sběru materiálu se u ryb infekce vůbec nevyskytovala. Nelze také vyloučit možnost, že byla krevní stádia myxosporid přehlédnuta vzhledem k jejich podobnosti s buňkami leukocytové řady (Molnár 1988).



Ve vaskulárním systému ryb mohou být často nalezena trematoda čeledi Sanguinicolidae (Bullar a Overstreet 2002). Mezihostiteli jsou plži (Gastropoda) nebo mnohoštětinatci (Polychaeta) (Cribb a kol. 2011, Koie 1982). Na Svalbardu se vyskytuje mnohoštětinatcec *Artacama proboscidae*, lze tedy předpokládat, že ryby mohou být infikované krevní motolicí *Aporocotyle simplex*, která je tímto vektorem přenášena (Koie 1982, Prestrud a kol. 2004). V krevních roztěrech, které byly k dispozici, nebyl žádný z parazitů této čeledi nalezen. Jednou z příčin by mohl být výskyt parazita v cévách a ne přímo v komoře a síni srdce odkud je rybám krev odebírána.

Jediným doposud nalezeným krevním parazitem v rybách ze Svalbardu tak zůstává *Desseria myoxocephali*. Druhové určení je založené na naměřené délce a šířce gamontů a rybím hostiteli (*Myoxocephalus scorpius*). Rozměry uváděné Fanthamem a kol. (1942) pro *D. myoxocephali* byly 5,5 – 9,2  $\mu\text{m}$  na délku a 2,2 – 2,9  $\mu\text{m}$  na šířku. Později tyto údaje upřesnili Siddall a Desser (1992), kteří ve své podrobnější charakteristice tohoto parazita uvádějí, že délka se pohybuje mezi 5,4 – 10,5  $\mu\text{m}$  a šířka mezi 1,8 – 3,1  $\mu\text{m}$ . Námi naměřené rozměry gamontů z *M. scorpius* mírně překračovaly horní hranici rozpětí délky i šířky. Fantham a kol. (1942) ani Siddall a Desser (1992) ale nepopisují, jakým způsobem gamonty *D. myoxocephali* měřili. Vzhledem k jejich charakteristickému tvaru je takový údaj podstatný. Nižší hodnoty v dosavadních publikacích v naměřené délce a šířce mohly vzniknout právě jednoduchým změřením vzdálenosti mezi anteriorním a posteriorním koncem. Řešením by bylo vrátit se k typovému mikroskopickému preparátu, případně archivním krevním roztěrům zhotovených v průběhu práce Siddalla a Dessera (1992). K *D. myoxocephali* typový materiál ale velmi pravděpodobně neexistuje.

Popsaným vektorem rodu *Desseria* ve vodách Severního ledového oceánu je pijavka *Heptacyclus scorpii* (dříve uváděna jako *Malmiana scorpii*), která parazituje na vrankách rodu *Myoxocephalus*. V jejím sacím ústrojí byl prokázán výskyt sporogonických stádií *Desseria myoxocephali* (Khan 1980), později Siddall a Desser (1992) výrazně rozšířili znalosti o této části vývojového cyklu *D. myoxocephali*. Rod *Desseria* byl vytvořen Siddallem (1995) vyčleněním 41 zástupců rodu *Haemogregarina*, které odlišovalo několik společných morfologických charakteristik a znaků ve vývojovém cyklu. Právě druh *D. myoxocephali* je podle mezinárodních pravidel zoologické nomenklatury typovým druhem pro rod *Desseria*.

Vranky rodu *Myoxocephalus* jsou kromě pijavky *Heptacyclus scorpii* dalším typovým hostitelem *D. myoxocephali*. Typovou lokalitou parazita *D. myoxocephali* jsou oblasti St. Andrews a Halifax (Nové Skotsko), kde byli gamonti *D. myoxocephali* popsáni z vranek *Myoxocephalus octodecemspinus* (Fantham a kol. 1942). Dále je potvrzená ve stejných

hostitelích žijících v pobřežních oblastech jižního Labradoru (Khan 1980). *M. octodecemspinus* má poměrně malý areál v severozápadním Atlantiku (Robins a Ray 1986), zatímco pijavka *Heptacyclus scorpii* zasahuje svým rozšířením až na Svalbard a jejím typickým hostitelem jsou právě vranky rodu *Myoxocephalus* (Utevsky a Khakiv 2011). Právě rozšíření definitivního hostitele může být často určující a mezihostitel může být na nové lokalitě nahrazen jiným, příbuzným druhem. Takové případy jsou známy pro některé druhy myxozoí, např. *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Henderson a Okamura 2004) nebo *Myxobolus cerebralis* (Bartholomew a Reno 2002).

Fylogenetická pozice rodu *Desseria* odpovídá dosavadním představám o systematice adeleorin a dosavadním znalostem o jeho biologii. V naší fylogenetické analýze vytvořily samostatnou linii druhy *Dactylosoma ranarum* a *Babesiosoma stableri*, které jsou přenášeny pijavkami čeledi Glossiphonidae (*Desserobdella picta*) (Barta 1991, Lom a Dyková 1992) společně s nově osekvenovanou *D. myoxocephali*. Pijavky čeledi Glossiphonidae slouží také jako vektory pro přenos *Haemogregarina balli* a *Haemogregarina stepanowi* (Mihalca a kol. 2002, Paterson a Desser 1976), které utvořily samostatnou větev, která je ovšem na bázi Hepatozoon spp. Zástupci rodu Hepatozoon jsou přenášeni prostřednictvím klíšťat (např. *Hyalomma* spp., *Rhipicephalus* spp.), v některých případech jim jako vektory přenosu slouží i komáři (*Culex* spp.) (Wozniak a Telefod 1991).

Otázkou stále zůstává druhové určení nálezu z *Gymnocanthus tricuspis*. Nově navržené primery amplifikovaly úsek 18S rDNA pouze u jednoho vzorku z *M. scorpius*. Vzorky z *G. tricuspis* žádné výsledky nepřinesly, i když při mikroskopické diagnostice roztěrů bylo na jednom z roztěrů nalezeno 14 jedinců parazita, což byl jeden z nejvyšších počtů parazita nalezených u ryb. Lze předpokládat, že vzorek, ze kterého byla provedena izolace DNA, neobsahoval žádnou DNA parazita (např. z důvodu chybné izolace DNA). Další možností je, že paraziti nalezení v *G. tricuspis* nebyli stejní jako ti v *M. scorpius* a nově navržené primery nebyly pro ně použitelné. Toto poslední tvrzení ovšem nepodporují morfologické podobnosti mezi nalezenými parazity u obou vranek. Navíc ani z ostatní vzorků DNA z *M. scorpius* (vyjma vzorku E396) se nepodařilo získat sekvenci desserie.

Mezi zástupci adeleorin parazitujících v rybách chybí stále molekulární charakterizace některých zástupců. Patří mezi ně např. rod *Dactylosoma*, kde lze jmenovat např. *D. salvelini* (Lom a Dyková 1992); rod *Babesiosoma* např. *B. batrachi* (Chaudhuri a Choudhury 1983) nebo *B. tetragonis* (Becker a Katz 1965); rod *Haemogregarina* např. *H. hoplichthys* (Laird 1952) nebo *H. vltavensis* (Lom a kol. 1989) a mnoho dalších druhů z rodu *Desseria* (nejaktuálnější souhrn v Davies a kol. 2012). Kromě zpřesnění znalostí o jejich fylogenezi

jsou další molekulární data důležitá také pro zavedení molekulární diagnostiky. V hostitelích totiž bývají zjišťovány v poměrně nízkých parazitémích (alespoň v případě druhů parazitujících v rybách) a mohou velmi snadno uniknout pozornosti.

## 6. Souhrn

Na krevní parazity bylo vyšetřeno celkem 74 jedinců ryb získaných v centrální části souostroví Svalbard, v Billefjordenu. Materiál byl odebrán v letních sezónách 2012 a 2013. Konkrétně byly vyšetřeny druhy *Myoxocephalus scorpius*, *Gymnocanthus tricuspis*, *Boreogadus saida*, *Gadus morhua* a *Clupea harengus*. Výsledkem je:

- Celkem 9 pozitivních krevních roztěrů pouze u vranek druhů *Myoxocephalus scorpius* a *Gymnocanthus tricuspis*.
- V krevních roztěrech z *Myoxocephalus scorpius* bylo nalezeno 3 – 17 jedinců parazita, u *Gymnocanthus tricuspis* bylo nalezeno 6 a 14 jedinců parazita.
- Ve všech případech se jednalo o jednobuněčné a intracelulární zástupce skupiny Adeleorina (Apikomplexa) a konkrétně druhu *Desseria myoxocephali*, který je typovým druhem rodu.
- Byla navržena sada nových primerů pro úsek 18S rDNA, které byly následně úspěšně použity.
- Byla získána první molekulární data pro rod *Desseria*, navíc pro jeho typový druh *D. myoxocephali*.
- Získána sekvence se nejvíce shodovala s *Dactylosoma ranarum* (95,47 %) a *Babesiosoma stableri* (95,43 %), s kterými ve fylogenetických analýzách (Maximum likelihood a Bayes interference) vytvořila společnou linii.

## 7. Seznam použité literatury

- Acton RT, Weinheimer PF, Hall SJ, Niedermeier W, Shelton E, Bennett JC (1971) Tetrameric immune macroglobulins in three orders of bony fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68: 107 – 111.
- Adams ER, Hamilton PB, Gibson WC (2010) African trypanosomes: celebrating diversity. *Trends in Parasitology* 26: 324–328.
- Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW (2012) The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 59: 429 – 493.
- Acholonu AD (1974) *Haemogregarina pseudemydis* n. sp. (Apicomplexa: Haemogregarinidae) and *Pirhemocytion chelonarum* n. sp. in turtles from Louisiana. *Journal of Protozoology* 21: 659 - 664.
- Aikawa M (1967) Ultrastructure of the pellicular complex of *Plasmodium fallax*. *J Cell Biol* 35: 103 – 113.
- Aikawa M (1988) Fine structure of malaria parasites in the various stages of development. In: Wernsdorf WH, McGregor I (Ed.) *Malaria: principles and practice of malariology*. Churchill Livingstone, Edinburgh, United Kingdom pp. 97 – 129.
- Andriyashev AP (1964) *Fishes of the northern seas of the U.S.S.R.* Israel Program for Scientific Translation, Jerusalem p. 617.
- Anthony VC (1972) Population dynamics of the Atlantic herring in the Gulf of Maine. Ph.D. dissertation, Univer. of Washington, Seattle, WA pp. 266.
- Arkoosh MR, Kaattari SL (1991) Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Developmental and Comparative Immunology* 15: 279 – 293.
- Asahida T, Kobayashi T, Saitoh K, Nakayama I (1996) Tissue preservation and total DNA extraction from fish stored at ambient temperature using buffers containing high concentration of urea. *Fish Sci* 62: 727 – 730.
- Auditore PJ, Lough RG, Broughton EA (1994) A Review of the Comparative Development of Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.) and Haddock (*Melanogrammus aeglefinus* L.) Based on an Illustrated Series of Larvae and Juveniles from Georges Bank. *NAFO Sci Coun Studies* 20: 7 – 18.

- Bailly N (2014) *Boreogadus saida* (Lepechin, 1774). In: Froese R, Pauly D (Ed) (2014) FishBase. Accessed through: World Register of Marine Species.
- Bailly N (2014). *Clupea harengus*. In: Froese R, Pauly D (Ed) (2014) FishBase. Accessed through: World Register of Marine Species.
- Bailly N (2014). *Gadus morhua* Linnaeus, 1758. In: Froese R, Pauly D (Ed) (2014) FishBase. Accessed through: World Register of Marine Species.
- Bailly N (2014) *Gymnocanthus tricuspis* (Reinhardt, 1830). In: Froese R, Pauly D (Ed) (2014) FishBase. Accessed through: World Register of Marine.
- Bailly N (2014). *Myoxocephalus scorpius* (Linnaeus, 1758). In: Froese, R. and D. Pauly (Ed.) (2014) FishBase. Accessed through: World Register of Marine Species.
- Bain H, Sekerak AD (1978) Aspect of the biology of Arctic cod *Boreogadus saida* in the central Canadian Arctic. Report by LGL Ltd., Toronto. For Polar Gas Project, Toronto pp. 104.
- Barber DL, Mills Westermann JE, Staroz P (1987) *Haemogregarina nothothenidae* n. sp., from the blood of Antarctic nototheniids. Syst Parasitol 10: 135 - 147.
- Barta JR (1991) The Dactylosomatidae. Advances in Parasitology 30: 1 – 37.
- Barta JR, Desser SS (1984) Blood parasites of amphibians from Algonquin Park, Ontario. J Wild Dis 20: 180 – 189.
- Barta JR, Desser SS (1986) Light and electron microscopical observations on the intraerythrocytic development of *Babesiosoma stableri* (Apicomplexa, Dactylosomatidae) in frogs from Algonquin Park, Ontario J Protozool 33: 359 - 368.
- Barta JR, Desser SS (1989) Development of *Babesiosoma stableri* (Dactylosomatidae; Adeleida; Apicomplexa) in its leech vector (*Batrachobdella picta*) and the relationship of the Dactylosomatids to the piroplasm of higher vertebrates. J Protozool 36: 241 - 253.
- Barta JR, Baulard Y, Desser SS (1987) Ultrastructural observations on secondary merogony and gametogony of *Dactylosoma ranarum* Labbe, 1894. J Parasitol 73: 1019 - 1029.
- Barta JR, Bulard Y, Desser SS (1989) Blood Parasites of *Rana esculenta* from Corsica: Comparison of Its Parasites with Those of Eastern North American Ranids in the Context of Host Phylogeny. Wiley 108: 6 – 20.
- Barta JR, Ogedengbe JD, Martin DS, Smith TG (2012) Phylogenetic Position of the Adeleorinid Coccidia (Myxozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) Inferred Using 18S rDNA Sequences. J Eukaryot Microbiol 59: 171 – 180.

- Barta JR, Martin DS, Liberator PA, Dashkewitz M, Anderson JW, Deighner SD, Elbrecht A, Perkins – Barrow A, Jenkins MC, Danforth HD, Ruff MD, Profous – Juchelka H (1997) Phylogenetic relationship among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit ribosomal DNA sequences. *J Parasitol* 83: 262 – 282.
- Bartholomew JL, Reno PW (2002) The history and dissemination of whirling disease. In: Bartholomew JL, Wilson JC (Eds) *Whirling disease: Reviews and current topics*, Symposium 29, Maryland, USA pp. 3 – 24.
- Becker CD, Katz M (1965) Transmission of the haemoflagellate *Cryptobia salmositica* Katz 1951, by a rhynchobdellid leech vector. *Journal of Parasitology* 51: 95 – 99.
- Becker CD, Katz M (1965) *Babesiosoma tetragonis* n. sp. (Sporozoa: Dactylosomidae) from a California teleost. *J Protozool* 12: 189 - 193.
- Becker CD, Overstreet RM (1979) Hematozoan of marine fishes from the northern Gulf of Mexico. *J. Fish Dis* 2: 464 - 479.
- Belova LM, Krylov MV (2000) Specificity of coccidian of fishes (Sporozoa, Coccidia). *Trudy Zoologicheskovo Instituta Rossiyskoi Akademii Nauk* 286: 11 – 16.
- Benoit D, Simar, Y, Fortier L (2008) Hydro-acoustic detection of large winter aggregations of Arctic cod (*Boreogadus saida*) at depth in ice-covered Franklin Bay (Beaufort Sea), *J Geophys Res*. Vol. 113.
- Benoit D, Simard Y, Fortier L (2014) Pre-winter distribution and habitat characteristics of polar cod (*Boreogadus saida*) in southeastern Beaufort Sea, *Polar Biology* 37: 149 - 163.
- Benoit D, Simard Y, Gagne´ J, Geoffroy M, Fortier L (2010) From polar night to midnight sun: photoperiod, seal predation, and the diel vertical migrations of polar cod (*Boreogadus saida*) under landfast ice in the Arctic Ocean *Polar Biol* 33: 1505 – 1520.
- Berenbeim DY, Sigaev IK (1978) On the correlation between water temperature and the spawning times for Georges Bank herring. *Int Comm Northwest Atl Fish (ICNAF) Res Doc* 42: 6.
- Berman JJ (2012) Platyhelminthes (flatworms). In: Berman JJ (Ed) *Taxonomic Guide to Infectious Diseases: Understanding the Biologic Classes*. Elsevier Inc pp. 135 – 146.
- Bigelow H, Schroeder W (1953) *Fishes of the Gulf of Maine*. Fishery bulletin of the fish and wildlife service 74: 88 - 99.
- Billar – Takahashi JD, Urbinati EC (2014) Fish immunology. The modification and manipulation of the ikate imine system: Brazilian studies. *An Acad Cienc* 86: 1483 – 1495.

- Blazer VS (1991) Piscine macrophage function and nutritional influences: A review. *Journal of Aquatic Animal Health* 3: 77 – 86.
- Boekelheide RJ (1980) Arctic terns: Breeding ecology and sea-ice relationships on an Arctic barrier island. MSc thesis, University of California, Davis.
- Boots M, Best A, Miller MR, White A (2009) The role of ecological feedbacks in the evolution of host defence: what does theory tell us? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364: 27 – 36.
- Bower SM, Margolis L (1984) Detection of infection and susceptibility of different Pacific salmon stocks (*Oncorhynchus* spp.) to the haemoflagellate *Cryptobia salmositica*. *Journal of Parasitology* 70: 273 - 278.
- Bradstreet MSW, Finley KJ, Sekerak AD, Griffiths WB, Evans CR, Fabijan MF, Stallard HE (1986) Aspects of the biology of arctic cod (*Boreogadus saida*) and its importance in arctic marine food chains. *Can Tech Rep Fish Aquat Sci* 14: 91.
- Brumpt E, Lebailly C (1904) Description de quelques nouvelles especes de trypanosomes et d'hémogregarines parasites des tcleosteens marins. *C R Acad Sei (Paris)* 139: 613 - 618.
- Bullard SA, Goldstein RJ, Goodwin RH, Overstreet RM (2004) *Cardicola forsteri* (Digenea: Sanguinicolidae) from the heart of a northern bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (Scombridae), in the northwest Atlantic Ocean *Comp Parasitol* 71: 245 – 246.
- Bullard SA, Overstreet RM (2002) Potential pathological effects of blood flukes (Digenea: Sanguinicolidae) on pen – reared marine fishes. *Proceedings of the 53rd Gulf and Caribbean Fisheries Institute* pp. 10 – 25.
- Burreson EM (1982) The life cycle of *Trypanoplasma bullocki* (Zoomastigophorea, Kinetoplastida). *Journal of Protozoology* 29: 72 – 77.
- Carruthers V B, Sibley LD (1997) Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 73:114 – 123.
- Carruthers VB, Giddings OK, Sibley LD (1999) Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of hosts cells. *Cell Microbio* 1: 225 – 235.
- Coad BW, Reist JD (2004) Annotated list of the arctic marine fishes of Canada, *Can MS Rep Fish Aquat Sci* pp. 112.
- Cohen DM, Inada T, Iwamoto T, Scialabba N (1990) An annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date. *FAQ species catalogue. Vol. 10. Gadiform fishes of the world (Order Gadiformes). FAQ Fish Synop* pp. 442.



- Cohen DM, Inada T, Iwamoto T, Scialabba N (1990) Gadiform fishes of the world (Order Gadiformes). In: FAO species catalogue. Vol. 10. An annotated and illustrated catalogue of cods, hakes, grenadiers and other gadiform fishes known to date. FAO Fish Synop.
- Cook MT, Hayball PJ, Birdseye L, Bagley C, Nowak BF, Hayball JD (2003) Isolation and partial characterization of a pentraxin-like protein with complement-fixing activity from snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae) serum. *Developmental and Comparative Immunology* 27: 579 – 588.
- Cornell SJ, Desdevises Y, Rigby M (1999) Evolutionary biology of host – parasite relationships: reality meets models. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 423 – 425.
- Craig PC, Griffiths WB, Haldorson L, McElderry H (1982) Ecological studies of Arctic cod (*Boreogadus saida*) in Beaufort Sea coastal waters, Alaska. *Can J Fish Aquat Sci* 39: 395 – 406.
- Cribb TH, Adlard RD, Hayward CJ, Bott NJ, Ellis D, Evans D, Nowak BF (2011) The life cycle *Cardicola fosteri* (Trematoda: Aporocotylidae), a pathogen of ranched southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyi*. *Int J Parasitol* 41: 861 – 870.
- Cruz C, Davies AJ (1998) Some observations on *Babesiosoma bettencourti* (Franca, 1908) n. comb. (syns. *Haemogregarina bettencourti* Franca, 1908; *Desseria bettencourti* Siddall, 1995) from eels, *Anguilla anguilla* L., in Portugal. *J Fish Dis* 21: 443 – 448.
- Davies AJ (1982) Further Studies on *Haemogregarina bigemina* Laveran & Mesnil, the Marine Fish *Blennius pholis* L., and the Isopod *Gnathia maxillaris* Montagu. *Journal of Protozool* 29: 576 – 583.
- Davies AJ (1995) The biology of fish haemogregarines. *Advances in Parasitology* 36: 118 - 203.
- Davies AJ, Hosein S, Marrett NR (2012) Hematozoans from deep eater fishes trawler off the Cape Verde Islands and over the Porcupine Seabight, with a revision of species within the genus *Desseria* (Adeleorina: Haemogregarinidae). *Folia Parasitol* 59: 1 – 11.
- Davies AJ, Johnston MRL (2000) The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibia and reptiles. *Advances in Parasitology* 45: 2 – 89.
- Davies AJ, Smith NJ (2001) The life cycle of *Haemogregarina bigemina* (Adeleina: Haemogregarinidae) in South African hosts. *Folia Parasitol* 48: 169 – 177.
- Davies AJ, Smit NJ, Hayes PM, Seddon AM, Wertheim DF (2004) *Haemogregarina bigemina* (Protozoa: Apicomplexa: Adeleorina) - past, present and future. *Folia Parasitol* 51: 99 - 108.
- De Meeus T, Renaud F (2002) Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. *Trends in Parasitology* 18: 247 – 251.

- Desser SS (1993) The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. In: Kreier JP (Ed.) Parasitic protozoa, Vol. 4. New York, New York, Academic Press Incorporated pp. 247 – 272.
- Dubremetz JF, Torpier G (1978) Freeze fracture study of the pellicle of an eimerian sporozoite (Protozoa, Coccidia). J Ultrastruct Res 62: 94 – 109.
- Dubremetz J F, Achbarou A, Bermudes D, Joiner KA (1993) Kinetics and pattern of organelle exocytosis during *Toxoplasma gondii* host/cell interaction. Parasitol Res 79: 402 – 408.
- Dyková I, Lom J (1979) Histopathological changes in *Trypanosoma danilewskyi* Laveran and Mesnil, 1904 and *Trypanoplasma borreli* Laveran and Mesnil, 1902 infections of goldfish, *Carassius auratus* (L.). J Fish Dis 2: 381 – 390.
- Dyková I, Lom J (1982): *Sphaerospora renicola* n. sp., a myxosporean from carp kidney, and its pathogenicity. Z Parasitenkd 68: 259 – 268.
- Elliott KH, Gaston AJ (2008) Mass - length relationships and energy content of fishes and invertebrates delivered to nestling Thick-billed Murres *Uria lomvia* in the Canadian Arctic, 1981 – 2007. Marine Ornithology 36: 25 – 34.
- Elliott JM, Mann KH (1979) A Key to the British Freshwater Leeches with Notes on their Life Cycle and Ecology. Scientific Publication No. 40, Freshwater Biological Association, Cumbria, UK pp. 72.
- Elwasila M (1989) *Haemogregarina* sp. (Apicomplexa: Adeleorina) from the gecko *Tarentola nnularis* in the Sudan: fine structure and life-cycles trials. Parasitology Research 75: 444 - 448.
- Ennis GP (1970) Reproduction and associated behaviour in the shorthorn sculpin, *Myoxocephalus scorpius* in Newfoundland waters. J Fish Res Bd Can 27: 2037 – 2045.
- Epshtein VM (1968) Revision of the genera *Oxytonostoma* and *Johanssonia* (Hirudinea, Piscicolidae) (in Russian). Zool Zh 42: 1011 – 1021.
- Esteban MA (2012) An overview of the immunological defenses in fish skin. ISRN Immunology 2012: 1 - 29.
- Evans D, Jaso-Friedmann L (1992) Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. Annual Review of Fish Disease 2: 109.
- Fantham HB (1919) Some parasitic protozoa found in South Africa. S Afr J Sci 16: 195 – 191.
- Fantham HB, Porter A, Richardson LB (1942) Some haematozoa observed in vertebrates in eastern Canada. Parasitology 34: 199 - 226.

- Fedorov VV (1986) Cottidae. In Whitehead PJP, Bauchot ML, Hureau JC, Nielsen J, Tortonese E (Eds.) Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean, Vol. 3. UNESCO, Paris pp. 1243 - 1260.
- Fischer U, Utke K, Somamoto T, Kollner B, Ototake M, Nakanishi T (2006) Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology* 20: 209 – 226.
- Foott JS, Hedrick RP (1987) Seasonal occurrence of the infections of stage of proliferative kidney disease (PKD) and resistance of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to reinfection. *J Fish Biol* 30: 477 - 484.
- Franchini G, Saini M (1923) Sur la presence d'Hemogregarines chez les poissons d'eau de France. *Bull Soc Pathol Exol* 16: 353 - 360.
- Freeman MA, Shinn AP (2011) Myxosporean hyperparasites of gill monogeneans are basal to the Multivalvulida. *Parasites & Vectors* 4: 220.
- Gandon S, Capowiez Y, Dubois Y, Michalakis Y, Olivieri I (1996) Local adaptation and gene-for-gene coevolution in a metapopulation model. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 263: 1003 – 1009.
- Grinde B, Lie O, Poppe T, Salte R (1988) Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. *Aquaculture* 68: 299 – 304.
- Grupcheva G, Dykova I, Lom J (1985) Seasonal fluctuation in the prevalence of *Sphaerospora renicola* and myxosporean blood-stream stages in carp fingerlings in Bulgaria. *Fol Paras (Praha)* 32: 193 - 203.
- Gulliksen B, Palerud R, Brattegrad T, Sneli J (1999) Distribution of marine benthic microorganisms at Svalbard (including Bear Island) and Jan Mayen. Research report for DN No. 4.
- Haegle CW, Schweigert JF (1985) Distribution and characteristics of herring spawning grounds and description of spawning behavior. *Can J Fish Aquat Sci* 42: 39 - 55.
- Hagen J, Liestal O, Roland E, Jorgensen T (1993) Glacier atlas of Svalbard and Jan Mayen. *Norsk Polarinstitutt Meddelelser* 129: 141.
- Harms CA (1996) Treatments for Parasitic Diseases of Aquarium and Ornamental Fish. *Avian and Exotic Parasitology* 5: 54 – 63.
- Hatten F, Fredriksen A, Hordvik I, Endresen C (2001) Presence of IgM in cutaneous mucus, but not in gut mucus of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Serum IgM is rapidly degraded when added to gut mucus. *Fish and Shellfish Immunology* 11: 257 – 268.

- Hayes PM, Wertheim DF, Smith NJ, Seddon AM, Davies AJ (2011) Three – dimensional visualisation of developmental stages of an apicomplexan fish blood parasites in its invertebrate host. *Parasites & Vectors* 4: 219.
- Henderson M, Okamura B (2011) The phylogeography of salmonid proliferative kidney disease in Europe and North America. *Proc R Soc Lon B* 271: 1729 – 1736.
- Herbert BW, Shaharom FM, Anderson IG (1995) Histopathology of cultured sea bass (*Lates calcarifer*) (Centropomidae) infected with *Cruoricola lates* (Trematoda: Sanguinicolidae) from Pulau Ketam, Malaysia. *Int J Parasitol* 25: 313.
- Hoffman GL, Fried B, Harvey JE (1985) *Sanguinicola fontinalis* sp. nov. (Digenea: Sanguinicolidae): a blood parasite of brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), and longnose dace, *Rhinichthys cataractae* (Valenciennes). *J Fish Dis* 8: 529 – 538.
- Hofte BB, Korting W, Lehmann J (1984) 'C und K Protozoen', Endoparasiten unsicherer systematischer Zuordnung bei jungen Karpfen (*Cyprinus carpio* L.). *Derzeitiger Wissensstand und bildliche Dokumentation* 3: 89 - 99.
- Hognestad PT (1968) Observations on Polar cod in the Barents sea. *Rapp. P.V. RCun. Cons. Int Explor MerI* 58: 126 - 130.
- Hochberg ME, Michalakis Y, De Meeus T (1992) Parasitism as a constant on the rate of life - history evolution. *Journal of Evolutionary Biology* 5: 491 – 504.
- Holland MC, Lambris JD (2002) The complement system of teleosts. *Fish and Shellfish Immunology* 12: 399 – 420.
- Holland JW, Okamura B, Hartikainen H, Secombes CJ (2011) A novel minicollagen gene links cnidarians and myxozoans. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences* 278: 546 - 553.
- Holst JC, Roettingen I, Melle W (2004) The herring. In *The Norwegian Sea Ecosystem* pp. 203 - 226.
- Holzer AS, Sommerville C, Wootten R (2004) Molecular relationships and phylogeny in a community of myxosporeans and actinosporeans based on their 18S rDNA sequences. *Int J Parasitol* 34: 1099 – 1111.
- Holzer AS, Bartošová P, Pecková H, Týmł T, Atkinson S, Bartholomew J, Sipos D, Eszterbauer E, Dyková I (2013) 'Who's who' in renal sphaerosporids (Bivalvulida: Myxozoa) from common carp, Prussian carp and goldfish – molecular identification of cryptic species, blood stages and new members of *Sphaerospora* sensu stricto. *Parasitology* 140: 46 – 60.
- Horák P, Kolářová L, Mikeš L (2014) Schistosomatoides and Diplostomoidea. In: Toledo R, Fried B (Eds) *Digenetic Trematodes*. Springer pp. 331 – 364.

- Chaudhuri SR, Choudhury A (1983) *Babesiosoma batrachi* n. sp. from *Clarias batrachus* (L.) with a Note on the genus *Babesiosoma* (Apicomplexa: Sporozoa). *Arch Protistenk* 127: 335 – 341.
- Chen SC, Kou RJ, Wu CT, Wang PC, Su FZ (2001) Mass mortality associated with Sphaerospora – like myxosporidiean infestation in juvenile cobia, *Rachycentron canadum* (L.), marine cage cultured in Taiwan. *Journal of Fish Diseases* 24: 189 – 195.
- Chobotar W, Scholtyseck E (1982) Ultrastructure. In: Long PL (Ed.) *The biology of the coccidia*. University Park Press, Baltimore, Md pp. 101 – 165.
- Jenkins PG, Wrathmell AB, Harris JE, Pulsford AL (1994) Systemic and mucosal immune response to enterically delivered antigen in *Oreochromis mossambicus*. *Fish and Shellfish Immunology* 4: 255 – 271.
- Jiménez – Guri E, Philippe H, Okamura B, Holland PWH (2007) *Buddenbrockia* is a Cnidarian worm. *Science* 317: 116 – 118.
- Karlsbakk E (2004) Prevalence of trypanosome infections in marine fishes from western Norway. *Sarsia* 89: 459 – 466.
- Khan RA (1976) The life cycle of *Trypanosoma murmanensis* Nikitin. *Can J Zool* 54: 1840 – 1849.
- Khan RA (1980) The leech as a vector of a fish piroplasm. *Canadian Journal of Zoology* 58: 1631 – 1637.
- Khan RA (2011) Chronic Exposure and Decontamination of a Marine sculpin (*Myoxocephalus scorpius*) to Polychlorinated Biphenyls Using Selected Body Indices, Blood Values, Histopathology, and Parasites as Bioindicators. *Arch Environ Contam Toxicol* 60: 479 – 485.
- Khan RA, Barrett M, Murphy J (1980) Blood parasites of fish from the Northwestern Atlantic Ocean. *Canadian Journal of Zoology* 58: 770 - 781.
- Khan RA, Forrester DJ, Goodwin TM, Ross CA (1980) A haemogregarine from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Parasitol* 66: 324 - 332.
- Khan RA, Murphy J, Taylor D (1980) Prevalence of a trypanosome in Atlantic cod (*Gadus morhua*) especially in relation to stocks in the Newfoundland area. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37: 1467 – 1475.
- Kirk RS, Lewis JW (1992) The laboratory maintenance of *Sanguinicola inermis* Plehn, 1905 (Digenea: Sanguinicolidae). *Parasitology* 104: 121 - 127.
- Kirk RS, Lewis JW (1993) The life-cycle and morphology of *Sanguinicola inermis* Plehn, 1905 (Digenea: Sanguinicolidae). *Syst Parasitol* 25: 125 – 133.

- Kirk RS, Lewis JW (1994) The distribution and host range of species of the blood fluke *Sanguinicola* in British freshwater fish. *Journal of Helminthology* 68: 315 - 318.
- Kirmse P (1978) *Haemogregarina sachai* n.sp. from cultured turbot *Scophthalmus maximus* (L.). *Scotland Journal of Fish Dis* 1: 337 - 342.
- Kjesbu O (1989) The spawning activity of cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Biology* 34: 195 - 206.
- Kodádková A, Dyková I, Tyml T, Ditrich O, Fiala I (2014) Myxozoa in high Arctic: Survey on the central part of Svalbard archipelago. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 3: 41 – 56.
- Kohler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ, Palmer JD, Roos DS (1997) A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* 275: 1485 – 1489.
- Køie M (1982) The redia, cercaria and early stages of *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900 (Sanguinicolidae) a digenetic trematode which has a polychaete annelid as the only intermediate host. *Ophelia* 21: 115 - 145.
- Koie M, Karlsbakk E, Nylund A (2008) The marine herring myxozoan *Ceratomyxa auerbachii* (myxozoa: Ceratomyxidae) uses *Chone infundibuliformis* (Annelida: Polychaeta: sabellidae) as invertebrae host. *Folia Parasitol* 55: 100 – 104.
- Koie M, Petersen ME (1988) A new annelid intermediate host (*Lanassa nordenskiöldi* Malmgren, 1866) (Polychaeta: Terebellidae) for *Aporocotyle* sp. and a new final host family (Pisces: Bothidae) for *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900 (Digenea: Sanguinicolidae). *J Parasitol* 74: 499 – 502.
- Komendová K (2014) Histologické vyšetření parazitární zátěže na modelu *Myoxocephalus scorpius* a *Gymnocanthus tricuspis* – *Trichodina* spp. Bc Thesis, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zdravotně sociální fakulta, České Budějovice pp. 26 – 45.
- Krotoski WA (1985) Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse. *Roy Soc Trop Med Hyg* 79: 1 - 11.
- Kubo A (2011) Dynamic cooperation between epidermal barriers and Langerhans cells. *Japanese Journal of Clinical Immunology* 34: 76 – 84.
- Laird M (1952) New haemogregarines from New Zealand marine fishes. *Trans R Soc N. Z* 79: 589 - 600.
- Laird M (1961) Parasites from northern Canada. II. Haematozoa of fishes. *Canadian Journal Zool* 39: 541 - 548.

- Lambert TC (1987) Duration and intensity of spawning in herring *Clupea harengus* as related to the age structure of the mature population. *Mar Ecol Prog Ser* 39: 209 – 220.
- Lamp F (1966) Beitrage zur Biologie der Seeskorpione *Myoxocephalus scorpius* (L.) und *Taurulus bubalis* (Euphr.) in der Kieler Forde. *Kieler Meeresforsch (Sonderh.)* 22: 98 – 120.
- Lange S, Magnadottir B (2003) Spontaneous haemolytic activity of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) serum. *Comparative Biochemistry and Physiology, Molecular Biology* 136: 99 – 106.
- Laveran A, Mesnil F (1901) Deux hemogregarines nouvelles des poissons. *CR Acad Sci (Paris)* 133: 572.
- Laveran A, Mesnil F (1904) Trypanosomes and Trypanosomiasis (translated by D. Nabarro). Keener WT, Chicago, Illinois pp. 538.
- Lee JJ, Leedale GF, Bradbury, P (Eds.) 2000. An illustrated guide to the Protozoa, Kansas: Society of Protozoologists.
- Lebailly C (1904) Sur quelques hemonagelles des teleosteens marins. *CR Acad Sci (Paris)* 139: 576 - 577.
- Levine ND (1973) The Apicomplexa and the coccidia proper. In: Levine ND (Ed) *Protozoan parasites of domestic animals and man*. 2nd ed. Burgess Publishing, Minneapolis pp. 229.
- Li S, Woo PTK (1996) A species specific *Cryptobia salmositica* (Kinetoplastida) DNA probe and its uses in salmonid cryptobiosis. *Diseases of Aquatic Organisms* 25: 11 - 16.
- Lie O, Evensen O, Sorensen A, Froysadal E (1989) Study on lysozyme activity in some fish species. *Disease of Aquatic Organism* 6: 1 – 5.
- Lom J (1973) Experimental infection of goldfish with blood flagellates. In: *Progress in Protozoology. 4th International Congress in Protozoology, Clermont-Ferrand, France* pp. 255.
- Lom J (1979) Biology of the trypanosomes and trypanoplasms of fish. In: Lumsden WHR, Evans DA (Eds.) *Biology of the kinetoplastida*. Academic Press, New York pp. 269 - 337.
- Lom J, Dyková I (1992) Protozoan parasites of fish. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Vol. 26*, Elsevier, Amsterdam pp. 32 – 35.
- Lom J, Desser SS, Dyková I (1989) Some little-known and new protozoan parasites of fish from Lake Sasajewun, Algonquin Park, Ontario. *Can J Zool* 67: 1372 - 1379.
- Lom J, Kepr T, Dyková I (1989) *Haemogregarina vltavensis* n. sp. from perch (*Perca fluviatilis*) in Czechoslovakia. *Syst Parasitol* 13: 193 – 196.

- Lønne OJ, Gulliksen B (1989) Size, age and diet of polar cod, *Boreogadus saida* (Lepechin 1773), in ice covered waters. *Polar Biol* 9: 187 – 191.
- Lopes RA, Ribeiro RD, Satake T, Nuti Sobrinho A, Garci TAR (1990) Trypanosomes of brazilian fishes II *Trypanosoma barrettoi* new species from *Hypostomus paulinus* (*siluriformes loricariidae*) *Angewandte Parasitologie*. 31: 11 - 14.
- Lowry LF, Frost KJ (1981) Distribution, growth, and foods of Arctic cod (*Boreogadus saida*) in the Bering, Chukchi, and Beaufort seas. *Can Field Nat* 95: 186 – 191.
- Luksenburg JA, Pedersen T (2002) Sexual and geographical variation in life history parameters of the shorthorn sculpin. *J Fish Biol* 61: 1453 – 1464.
- Lumsden JS, Ostland VE, Byrne PJ, Ferguson HW (1993) Detection of a distinct gill-surface antibody response following horizontal infection and bath challenge of brook trout *Salvelinus fontinalis* with *Flavobacterium branchiophilum*, the causative agent of bacterial gill disease. *Disease of Aquatic Organism* 16: 21 – 27.
- Magnadottir B (2006) Innate immunity of fish. *Fish and Shellfish Immunology* 20: 137 – 151.
- Magnadottir B (2010) Immunological control of fish diseases. *Journal of Marine Biotechnology* 12: 361 – 379.
- Magnadottir B, Jonsdottir H, Helgason S, Bjornsson B, Jorgensen TO, Pilstrom L (1999) Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). II. The effects of size and gender under different environmental conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology* 122B: 181 – 188.
- Magnadottir B, Lange S, Gudmundsdottir S, Bogwald J, Dalmo RA (2005) Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish and Shellfish Immunology* 19: 429 – 439.
- Malecha J (1984) Cycle biologique de l'hirudinée rhynchodelle *Piscicola geometra* L. *Hydrobiologia* 118: 237 – 243.
- Mann KH (1961) Leeches (Hirudinea). Their Structure, Physiology, Ecology and Embryology. Pergamon Press, New York.
- Mathew JA, Guo YX, Goh KP, Chan J, Verburg van Kemenade BM, Kwang J (2002) Characterisation of a monoclonal antibody to carp IL-1beta and the development of a sensitive capture ELISA. *Fish and Shellfish Immunology* 13: 85 – 95.
- McFadden GI, Waller RF (1997) Plastids in parasites of humans. *Bioessays* 19: 1033 – 1040.



- McGeorge J, Sommerville C, Wootten R (1994) Light and electron microscope observations on extrasporogonic and sporogonic stages of a myxosporean parasite of the genus *Sphaerospora* Thelohan, 1892 from Atlantic salmon (*Salmo salar* L) in Scotland. *Journal of Fish Diseases* 17: 227 - 238.
- Meade TG, Pratt I (1965) Description and life history of *Cardicola alseae* sp. n. (Trematoda: Sanguinicolidae). *J Parasitol* 51: 575 – 578.
- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogin ML (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16s – like rRNA – coding regions. *Gene* 71: 491 – 499.
- Mehlhorn H (2008) Trypanoplasma. In: Mehlhorn H (Ed.) *Encyclopedia of Parasitology* 3.rd. Springer pp. 1504.
- Mihalca A, Achelaritei D, Popescu P (2002) Haemoparasites of the genus *Haemogregarina* in a population of European pond turtles (*Emys orbicularis*) from Dragasani, Valcea country, Romania. *Scientia Parasitol* 2: 22 – 27.
- Møller AP, Merino S, Brown CR, Robertson RJ (2001) Immune defense and host sociality: a comparative study of swallows and martins. *The American Naturalist* 158: 136 – 145.
- Møller AP, Martin-Vivaldi M, Soler JJ (2004) Parasitism, host immune defence and dispersal. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 603 – 612.
- Molnár K (1980) 'Sphaerosporosis', a new ludney disease of the common carp. In: Ahne W (Ed.) *Fish diseases*. Springer-Verlag, Berlin pp. 157.
- Molnár K (1984) Experimental evidence that protozoa causing swimbladder inflammation in common carp (*Cyprinus carpio*) are stages of *Sphaerospora renicola*. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 4: 14 – 15.
- Molnár K (1988) Evidence that C-blood protozoa of the common carp are stages of *Sphaerospora renicola* Dykova et Lom, 1982. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 8: 3 - 4.
- Molnár K (1988) Blood stages of *Sphaerospora* spp. (Myxosporea) in cyprinid fishes. *Diseases of Aquatic Organisms* 5: 23 - 28.
- Molnár K (1996) Phylum Apicomplexa. In: Woo PTK (Ed.) *Fish Diseases and Disorders* Vol. 1. CAB International, Wallingford, UK pp. 263 – 287.
- Molnár K, El – Mansy A, Székely Cs, Baska F (1999) Experimental identification of the actinosporean stage of *Sphaerospora renicola* Dykova & Lom 1982 (Myxosporea: Sphaerosporidae) in oligochaete alternate hosts. *Journal of Fish Diseases* 22: 143 – 153.

- Molnár K, Kovacs-Gayer E (1986) Experimental induction of *Sphaerospora renicola* (Myxosporea) infection in common carp (*Cyprinus carpio*) by transmission of SB - protozoans. J Appl Ichthyo 2: 86 – 94.
- Morrison DA (2009) Evolution of the Apicomplexa: where are we now? Evol Parasitol 25: 1 – 8.
- Morrisette NS, Sibley LD (2002) Cytoskeleton of Apicomplexan Parasites. Microb Molec Biol Rev 66: 21 – 38.
- Mulero V, Meseguer J (1998) Functional characterisation of a macrophage-activating factor produced by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology 8: 143–156.
- Napier IR (1993) The organic carbon content of gravel bed herring spawning grounds and the impact of herring spawn deposition. J Mar Biol Assoc UK 73: 863 - 870.
- Narberhaus I, Krause J, Bernitt U (2012) Threatened Biodiversity in the German North and Baltic Seas. Natursch Biol Vielf 117: 628.
- Nawrotzky NN (1914) *Haemogregarina acipenseris* Zentralbl. Bakteriol 73: 358 - 362.
- Negm – Eldin MM (1998) Life Cycle, host restriction and longevity of *Babesiosoma mariae* HOARE, 1930 (Apicomplexa: Dactylosomatidae). Dtsch Tierarztl Wochenschr 105: 367 – 374.
- Nesnidal MP, Helmkampf M, Bruchhaus I, El-Matbouli M, Hausdorf B (2013) Agent of Whirling Disease Meets Orphan Worm: Phylogenomic Analyses Firmly Place Myxozoa in Cnidaria. Plos One 8: 554 – 576.
- Neumann RO (1909) Studien über protozoische Parasiten im Blut von Meeresfischen. Z Hyg Infektionskr 64: 1 - 112.
- Nichols BA, Chiappino ML (1987) Cytoskeleton of *Toxoplasma gondii*. J Protozool 34: 217 – 226.
- Nikitin SA (1927) Blood parasites of some northern vertebrates. Russian Journal of Tropical Medicine, Medical and Veterinary Parasitology 6: 350 – 356.
- Nikitina EN (1986) Trematode larvae in snails of Lake Glubokoe. Hydrobiologia 141: 139 – 141.
- O'Brien L, Burnett J, Mayo RK (1993) Maturation of nineteen species of fin fish off the northeast coast of the United States, 1985-1990. NOAA Tech Rep NMFS 113: 66.
- Oosthuizen E, Daan N (1974) Egg fecundity and maturity of North Sea cod, *Gadus morhua*. Netherland Journal of Sea Research 8: 379.
- Osmani JJ (1942) *Haemogregarina triatoma* n. sp. from a South American Lizard. *Tupimambis teguixin*, transmitted by the reduviid *Triatoma rubrovaria*. J Parasit 28: 147 - 54.

- Ottersen G, Hejrmann DO, Stenseth NC (2006) Changes in spawning stock structure strengthen the link between climate and recruitment in a heavily fished cod (*Gadus morhua*) stock. *Fish Ocean* 15: 230 – 243.
- Overrein O (2009) Svalbard's Wildlife. In: Johansen EB (2008) Cruise Handbook for Svalbard. Norwegian Polar Institute.
- Paperna I (1996) Parasites, infections and diseases of fish in Africa. An update. CIFA Technical Paper. No. 31. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Parin NV, Fedorov VV, Sheiko BA (2002) An annotated catalogue of fish-like vertebrates and fishes of the seas of Russia and adjacent countries: Part 2. Order Scorpaeniformes. *J Ichthyol* 42: 60 - 135.
- Paterson WB, Desser SS (1976) Observation on *Haemogregarina balli* sp. n. from the common snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Journal of Protozoology* 23: 294 - 301.
- Paterson S, Vogwill T, Buckling A, Benmayor R, Spiers AJ, Thomson NR, Quail M, Smith F, Walker D, Libberton B, Fenton A, Hall N, Brockhurst MA (2010) Antagonistic coevolution accelerates molecular evolution. *Nature* 464: 275.
- Pavlov DA, Burykin Y, Bublik Y (1992) Embryonic and larval development of the mailed sculpin (*Triglops murrayi*). *J Ichthyol* 32: 62 – 76.
- Pavlovskii EN (1964) Key to Parasites of Freshwater Fish of the USSR. Academy of Sciences of the USSR, Zoological Institute. Translated from Russian by Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, Israel pp. 919.
- Pazooki J, Masoumian M (2004) *Cryptobia acipenseris* and *Haemogregarina acipenseris* infections in *Acipenser guldenstadti* and *A. perseus* in the Southern part of the Caspian Sea. *J Agric Sci Technol* 6: 95 – 101.
- Petrushevski GK, Kogteva EP (1954) Effect of parasitic diseases on condition of fish. *Zool Jour* 33: 395 - 405.
- Perkins SL, Keller AK (2001) Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of *Hemogregarines* amplified with specific primers. *J Parasitol* 87: 870 – 876.
- Prestrud P, Strom H, Goldman HV (2004) A catalogue of the terrestrial and marine animals of Svalbard. Norwegian Polar Institute. Tromsø pp. 5 – 56.
- Putz RE (1972) Biological studies on the hemoflagellates *Cryptobia cataractae* and *Cryptobia salmositica*. Technical Paper Bureau of Sport Fishery and Wildlife 63: 3 – 25.

- Qadri SS (1962) An experimental study of the life cycle of *Trypanosoma danilewskyi* in the leech, *Hemiclepsis marginata*. *Journal of Protozoology* 9: 254 – 258.
- Rachlewicz G (2003) Warunki meteorologiczne w zatoce Petunia (Spitsbergen środkowy) w sezonach letnich 2000 i 2001. *Problemy Klimatologii Polarnej* 13: 127 – 138.
- Rass TS (1968) Spawning and development of polar cod. *Rapp. et proles-oerbaux reunions. Conseil perman inernat explorat mer* pp. 158.
- Reide K (2004) Global register of migratory species – from global to region scales. Final report of the RD p. 389.
- Robertsen B (2006) The interferon system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology* 20: 172 – 191.
- Robins CR, Ray GC (1986) A field guide to Atlantic coast fishes of North America. Houghton Mifflin Company, Boston USA pp. 354.
- Rohde K (2005) The nature of parasitism. In: Rhode K (Ed) *Marine Parasitology*. Wallingford: CAB International pp. 12.
- Rohlenová K, Morand S, Hyršl P, Talarova S, Flajšhans M, Šimková A (2011) Are fish immune systems really affected by parasites? An immunological study of common carp (*Cyprinus carpio*). *Parasites & Vectors* 4: 120.
- Russell DG, Burns RG (1984) The polar ring of coccidian sporozoites: a unique microtubule - organizing centre. *J Cell Sci* 65: 193 – 207.
- Sakai DK (1992) Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Disease* 2: 223 – 247.
- Sam – Yellowe TY (1996) Rhoptry Organelles of the Apicomplexa: Their role in Host Cell Invasion and Intracellular Survival. *Elsevier* 12: 308 – 316.
- Sanchez C, Babin M, Tomillo J, Ubeira FM, Dominguez J (1993) Quantification of low levels of rainbow trout immunoglobulin by enzyme immunoassay using two monoclonal antibodies. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 36: 65 – 74.
- Saunders DC (1955) The occurrence of *Haemogregarina bigemina* Laveran and Mesnil, and *H. dasyatis* n. sp. in marine fish from Bimini, Bahamas, B.W.I. *Transactions of the American Microscopical Society* 77: 404 – 412.
- Saunders DC (1960) A Survey of the Blood Parasites in the Fishes of the Red Sea. *Wiley* 79: 239 – 252.

- Sawyer RT (1986) Leech Biology and Behaviour. In: Feeding Biology, Ecology and Systematics, Vol: 2. Oxford Scientific Publications, Oxford, UK.
- Secombes CJ, Fletcher TC (1992) The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Disease* 2: 53 – 71.
- Sekerek AD (1982) Young of the Year Cod (*Boreogadus*) in Lancaster Sound and Western Baffin Bay. *Arctic* 35: 75 - 87.
- Sendersky IV, Dobrovolsky AA (2004) Morphology and chaetotaxy of *Sanguinicola armata* cercariae (Trematoda: Sanguinicolidae). *Parazitol* 38: 310 – 321.
- Shahi N, Yousuf AR, ether MI, Ahmad F, Yaseen T (2013) First Report of Blood Parasites in Fishes from Kasmir and Their Effect on the Haemopathological Profile. *Open Vet Journal* 3: 89 – 95.
- Shanavas KR, Ramachandran P, Janardanart KP (1989) *Trypanoplasma ompoki* sp. n. from freshwater fishes in Kerala, India, with observations on its vector-phase development and transmission. *Acta Protozoologica* 28: 293 – 302.
- Shlomai J (2004) The structure and replication of kinetoplast DNA. *Curr Mol Med* 4: 623 – 647.
- Scheuring L (1920) Die Lebensgeschichte eines Karpfenparasiten (*Sanguinicola inermis* Plehn). *Allg. FischZeitg.* 45: 225 – 230.
- Schofield CJ, Kabayo JP (2008) Trypanosomiasis vector kontrol in Africa and Latin America. *Parasites and Vectors* 1: 24.
- Šimková A, Lafond T, Ondráčková M, Jurajda P, Ottová E, Morand S (2008) Parasitism, life history traits and immune defence in cyprinid fish from Central Europe. *BMC Evolutionary Biology* 8: 29.
- Scholtyssek E, Melhorn H (1970) Ultrastructural study of characteristic organelles (paired organelles, micronemes, micropores) of sporozoa and related organisms. *Z Parasite* 34: 97 - 127.
- Siddall ME (1995) Phylogeny of Adeleid Blood Parasites with a Partial Systematic Revision of the Haemogregarine Complex. *J Euk Microbiol* 42: 116 – 125.
- Siddall ME, Desser SS (1992) Ultrastructure of Gametogenesis and Sporogony of *Haemogregarina* (sensu lato) *myxocephali* (Apicomplexa: Adeleina) in the Leech *Malmiana scorpii*. *J Protozool* 39: 545 - 554.
- Siddall ME, Desser SS (1992) Prevalence and intensity of *Haemogregarina balli* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in three turtle species from Ontario, with observations on intraerythrocytic development. *Canadian Journal of Zoology* 70: 123 - 128.

- Simon-Martin F, Rojo-Vazquez FA, Simon-Vicente F (1987) *Sanguinicola rutili* n. sp. (Digenea: Sanguinicolidae) parasito del sistema circulatorio de *Rutilus arcasi* (Cyprinidae) en la provincia de Salamanca. Rev Iber Parasitol 47: 253 – 261.
- Sitotaw T, Regassa F, Zeru F, Kahsay AG (2014) Epidemiological significance of major hemoparasites of ruminants in and around Debre – Zeit, Cental Ethiopia. J Parasitol Vector Biol 6: 16 - 22.
- Smith JW (1972) The blood flukes (Digenea: Sanguinicolidae and Spirorchidae) of cold-blooded vertebrates and some comparison with the schistosomes. Helminthol Abst Ser 41: 161 - 204.
- Smith TG (1996) The genus Hepatozoon (Apicomplexa: Adeleina). Journal of Parasitology 82: 565 – 585.
- Smith JW (1997) The blood flukes (Digenea: Sanguinicolidae and Spirorchidae) of cold-blooded vertebrates: Part 1. A review of the published literature since 1971, and bibliography. Helminthol 66: 255 - 294.
- Smith NJ, Davies AJ (1999) New host records for *Haemogregarina bigemina* from the coast of Southern Africa. J Mar Biol Assoc UK 79: 933 – 935.
- Smith NJ, Davies AJ (2005) Intraerythrocytic merogony in *Haemogregarina koppiensis* (Apicomplexa: Adeleorina: Haemogregarinidae). Folia Parasitol 52: 277 - 278.
- Smith NJ, Davies AJ (2006) *Desseria zei* sp. nov. (Adeleorina: Haemogregarinidae) infecting *Zeus capensis* from deep waters off the south and west coasts of South Africa. J Mar Biol 86: 1477 – 1480.
- Smit NJ, Gutter AS, Adlar RD, Davies AJ (2006) Hematozoa of teleosts from Lizard Island, Australia, with some comments on their possible mode of transmission and the description of a new hemogregarine species. J Parasitol 92: 778 – 788.
- Smith NJ, Van As JG, Davies AJ (2003) Observations on *Babesiosoma mariae* (Apicomplexa: Dactylosomatidae) from Okavango Delta, Botswana. Folia Parasitol 50: 85 – 86.
- Striepen B, Crawford MJ, Shaw MK, Tilney LK, Seeber F, Roos DS (2000) The plastid of *Toxoplasma gondii* is divided by association with the centrosomes. J Cell Biol 151: 1423 – 1434.
- Strout RG (1965) A new hemoflagellate (genus *Cryptobia*) from marine fishes of northern New England. J Parasitol 51: 654 - 659.
- Su Y, Feng J, Jiang J, Guo Z, Liu G, Xu L (2014) *Trypanosoma epinepheli* n. sp. (Kinetoplastida) from a farmed marine fish in China, the brown- marbled souper (*Epinephelus fuscoguttatus*). Parasitol Res 113: 11 - 18.

- Subramanian S, Mackinnon SL, Ross NW (2007) A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 148: 256 – 263.
- Subramanian S, Ross NW, Mackinnon SL (2008) Comparison of antimicrobial activity in the epidermal mucus extracts of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 150: 85 – 92.
- Svendsen JI, Mangerud J (1997) Holocene glacial and climatic variations on Spitsbergen, Svalbard. *The Holocene* 7: 45 – 57.
- Svobodová Z, Pravda D, Paláčková J (1986) Jednotné metody hematologického vyšetření ryb. Edice Metodik, VÚHR Vodňany 22: 1 – 36.
- Svobodová Z, Pravda D, Modrá H (2012) Metody hematologického vyšetřování ryb. Fakulta rybářství a ochrany vod, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích pp. 6 – 36.
- Tafalla C, Figueras A, Novoa B (2001) Viral hemorrhagic septicemia virus alters turbot *Scophthalmus maximus* macrophage nitric oxide production. *Disease of Aquatic Organism* 47: 101 – 107.
- Teixeira M, Albuquerque GR, Lopes CWG, Florentins MVN (2003) An Adeleid Coccidia, a Pseudoparasite of *Didelphins aurita* (Marsupialia: Didelephoidea). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 12: 43 – 45.
- Telford Jr. SR, Butler JF, Telford RS (2002) Hepatozoon species (Apicomplexa: Hepatozoidae) of the corn snake, *Elaphe guttata* (Serpentes: Colubridae) and the pigmy rattlesnake, *Sistrurus miliarius barbouri* (Serpentes: Viperidae) in south Florida. *J Parasitol* 88: 778 – 782.
- Telford Jr. SR, Ernst JA, Clark AM, Butler JF (2004) Hepatozoon sauritus: a polytopic hemogregarine of three genera and four species of snakes in northern Florida, with specific identity verified from genome analysis. *J Parasitol* 90: 352 – 358.
- Thomas PT, Woo PTK (1988) *Cryplobia salmositica*: an in vitro and in vivo study on the mechanism of anaemia in infected rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J Fish Dis* 11: 425 - 431.
- Thompson JD (1908) Cultivation of the trypanosome found in the blood of the goldfish. *Journal of Hygiene* 8: 75–82.
- Uma A, Rebecca G, Saravanabava K (2012) Differential expression of toll – like receptors (TLRS) in Gold fish, *Carassius aureus* infested with fresh water lice of *Argulus* sp. *International Journal Of Pharmacology and Bio Sciences* 3: 652 – 658.
- Uribe C, Foleh H, Enriquez R, Moran G (2011) Innate and adaptive immunity in teleost fish a review. *Vererinatrni Medicina* 56: 486 – 503.
- Utevsky SY, Kharkiv VNK (2011) Phylum Annelida, Class Clitellata, Order Hirudinida. In: Buzhinskaja GN (Ed) *Illustrated Keys to Free – Living Invertebrates of Eurasian Arctic Seas*

and Adjacent Deep Waters, Vol. 2 Nemertea, Cephalorhyncha, Oligochaeta, Hirudinida, Pogonophora, Echiura, Sipuncula, Phoronida, and Brachiopoda. Alaska Sea Grant, University Alaska Fairbanks, Fairbanks pp. 75 – 103.

- Vickerman K (1990) Phylum Zoomastigina, class Kinetoplastida. In: Margulis L, Corliss JO, Melkonian M, Chapman DJ (Eds) Handbook of Protozoists, Boston: Jones & Bartlett, pp. 215 – 238.
- Vickerman K (2000) Order Kinetoplastea. In: Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P, Lawrence KS (Eds.) The Illustrated Guide to the Protozoa. Allen Press pp. 1159 – 1185.
- Uzars D, Plikshs M (2000) Cod (*Gadus morhua* L.) cannibalism in the Central Baltic: interannual variability and influence of recruit abundance and distribution. ICES J Mar Sci 57: 324 - 329.
- Votýpka J, Svobodová M (2004) *Trypanosoma avium*: experimental transmission from black flies to canaries. Parasitol Res 92: 147 – 151.
- Wilford OO (1977) *Haemogregarina stepanowi*. Parasitologia Animal pp. 181 - 185.
- Wilson MR, Bengten E, Miller N, Clem LW, Du Pasquier L, Warr GW (1997) A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 4593 – 4597.
- Wilson MR, Warr GW (1992) Fish immunoglobulins and the genes that encode them. Annual Review of Fish Disease 2: 201 – 221.
- Wilson RJ, Williamson DH (1997) Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa. Microbiol Mol Biol Rev 61:1 – 16.
- Whitehead PJP (1984) Clupeidae. In: Whitehead PJP, Bauchot ML, Hureau JC, Nielsen J, Tortonese E (Eds.) Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean. Vol. 1: UNESCO Paris pp. 510.
- Whitehead PJP (1985) Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei). FAO Species Catalogue. Vol. 7: An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. FAO Fish. Synop. 125: 1 - 303.
- Whyte SK (2007) The innate immune response of finfish e A review of current knowledge. Fish and Shellfish Immunology 23: 1127 – 1151.
- Woo PTK (1969) The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. Canadian Journal of Zoology 47: 921 - 923.
- Woo PTK (2003) *Cryptobia (Trypanoplasma) salmositica* and salmonid cryptobiosis. Journal of Fish Diseases 26: 627 - 646.



- Woo PTK (1987) *Cryptobia* and cryptobiosis in fishes. *Adv Parasitol* 26: 199 – 237.
- Woo PTK (2006) Diplomonadida (Phylum Parabasalia) and Kinetoplastea (Phylum Euglenozoa). In: Woo PTK (Ed.) *Fish Diseases and Disorders, Vol. 1: Protozoan and Metazoan Infections*. 2nd ed. CAB International, Wallingford, pp. 46 – 115.
- Woo PTK, Wehnert SD, Rodgers D (1983) The susceptibility of fishes to haemoflagellates at different ambient temperatures. *Parasitology* 87: 385 - 392.
- Wootten R (2012) Parasites of the Vascular System. In: Roberts RJ (Ed) *Fish Pathology, The Parasitology of Teloosts* pp. 323 – 324.
- Wozniak EJ, Telleford SR Jr (1991) The fate of Hepatozoon species naturally infecting Florida black racers and watersnakes in potential mosquito and soft tick vector, and histological evidence of pathogenicity in unnatural host species. *Int J Parasitol* 21: 511 – 516.
- Wright ADG, Li S, Feng S, Martin DS, Lynn DH (1999) Phylogenetic position of the kinetoplastids, *Cryptobia bullocki*, *Cryptobia catostomi*, and *Cryptobia salmositica* and monophyly of the genus *Trypanosoma* inferred from small subunit ribosomal RNA sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* 99: 69 – 76.
- Yano T (1996) The nonspecific immune system: Humoral defence. In: Iwama G, Nakanishi T (Eds.): *The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment*. Academic Press, San Diego pp. 105 – 157.
- Yano T (1997) The nonspecific immune system: Humoral defense. *Fish Physiology* 15: 105 – 157.
- Yin Z, Lam TL, Sin YM (1997) Cytokine-mediated antimicrobial immune response of catfish, *Clarias gariepinus*, as a defence against *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology* 7: 93 – 104.
- Yokoyama H, Grabner D, Shirakashi S (2012) Transmission Biology of the Myxozoa. In: Carvalho E (Ed) *Health and Environment in Aquaculture* pp. 1 – 29.
- Zídková L, Čepička I, Szabová J, Svobodová M (2012) Biodiversity of avian trypanosomes. *Infection, Genetics and Evolution* 12:102 – 112.

**URL:**

URL 1: Earth site, Svalbard: <http://www.earth-site.co.uk/Svalbard.html>.

URL 2: National Geographic, Svalbard: Ebbing Ice: <http://ngm.nationalgeographic.com/2009/04/svalbard/svalbard-map>.

URL 3: Animal Diversity Web: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/>

URL 4: Centrum Polární ekologie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích: Research activities 2012: [http://polar.prf.jcu.cz/data/2012\\_Czech\\_research\\_report.pdf](http://polar.prf.jcu.cz/data/2012_Czech_research_report.pdf).

URL 5: Centrum Polární ekologie, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích: Research activities 2013: [http://polar.prf.jcu.cz/data/Czech\\_research\\_report\\_2013.pdf](http://polar.prf.jcu.cz/data/Czech_research_report_2013.pdf).

URL 6: Norwegian Polar Institute, Cruise Handbook for Svalbard: <http://cruise-handbook.npolar.no/en/isfjorden/index.html>