Zdravotně sociální fakulta
Faculty of Health and Social Sciences
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
University of South Bohemia in České Budějovice

Jihoęeská univerzita v Ęeských BudĎjovicích

ZdravotnĎsociální fakulta

Bakaláśská práce

Krevní paraziti rejnokŢ na Svalbardu

Vypracovala: Aneġka Jakeġová

Vedoucí práce: doc. RNDr. Oleg Ditrich, CSc.

Ġkolitel specialista: RNDr. Tomáġ Tyml

Ęeské BudĎjovice 2017

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské 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 touto 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.

V Českých Budějovicích dne 1. 5. 2017

Anežka Jakešová

Touto cestou bych ráda podĚkovala svému vedoucímu práce doc. RNDr. Olegu Ditrichovi, CSc. za zadání tohoto tématu bakalářské práce, za odborné vedení po celou dobu, uţitečné rady a informace. Dále bych chtěla podĚkovat RNDr. Tomáši Tymlovi za asistenci při praktické části, za pomoc s fylogenetickou analýzou a za obrovskou trpělivost. V neposlední řadě bych ráda obĚma podĚkovala za poskytnutý materiál. Mé díky patří také Mgr. Martinovi Kostkovi, PhD. za novĚnavrţené primery, které jsem mohla pouţít v této práci.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá poznatky krevních parazitů ryb a paryb. V tomto případě zejména rejnoka *Amblyraja radiata*. Krevní nátěry ryb a paryb pro tuto studii byly získány ze Svalbardu, kterým se zabývám v úvodu. V teoretické části popisuji rozdělení paryb, dále popisuji obecně parasitismus. V dalším popisu zmiňuji krevní parazity, motolice a hlístice které se také mohou objevovat v krvi obratlovců. Mezi krevní parazity patří i *Haemogregarina delagei,* který je jediným parazitem nalezeným na krevních roztěrech rejnoka *A. radiata*, a *Desseria myoxocephali* u vranky *Myoxocephalus scorpius.* Na Svalbardu jsou *A. radiata* infikovány *H. delagei* s vysokou prevalencí (90 %).

V praktické části jsem se zabývala všemi kroky vedoucími k získání části sekvence genu pro 18S rRNA. Vyizolovanou DNA z krve rejnoků jsem přidala do několika různých směsí PCR, které se lišily použitou polymerázou, pufrem nebo primery. Velikost získaných PCR produktů jsem posoudila pomocí agarózové elektorofézy, izolovala je pomocí komerčního typu (Expin Combo, GeneAll) a zaslala na přímé sekvenování firmě Seqme nebo použila pro molekulární klonování. Úspěšně zaklonované úseky DNA jsem izolovala z kompetentních buněk pomocí kitu (Hybrid-Q Plasmid, GeneAll) a nechala opět sekvenovat v servisní firmě Seqme. Sekvence toho parazita jsou nejblíže k *Desseria myoxocephali* a nasvědčují hypotéze, že *Haemogregarina* není monofyletickým rodem.

Klíčová slova:
Krevní paraziti; Rybí paraziti; Svalbard; *Amblyraja radiata; Haemogregarina delagei*;

Abstract

This Bachelorôs thesis is about blood parasites of fish and chondrichthyes. In this case especially thorny skate *Amblyraja radiata.* Blood smears of fish and chondrichthyes for this thesis were obtained from Svalbard, which I deal with at the beginning. In the theoretical part, the division of the chondrichthyes as well as parasitism in general are descibed. In the followinf description I mentioned blood parasites, trematodes and nematodes, which can also appear in the blood of the vertebrates. The blood parasites aslo includes *Haemogregarina delagei*, which is the only parasite found on blood smears of thorny skate *Amblyraja radiata* and *Desseria myoxocephali* on fish *Myoxocephalus scorpius*. *A. radiata* are infected by *H.delagei* in high prevalence (90 %) on Svalbard.

In the practical part, I have dealt with all the steps to gain part of the gene 18S rRNA. Isolated DNA from ray blood was added in several different mixtures PCR products, which were different by polymerase buffer or primers. I obtained the size of the PCR products by agarose electrophoresis, isolated by commercial type (Expin Combo, GeneAll) and sent to the Seqme company for a direct sequencing, or I used it for molecular cloning. I isolated well-cloned DNA segments from competent cells by using a kit (Hybrid-Q Plasmid, GeneAll) and sequenced in the Seqme service company again.Obtained sequencies are similar *to Desseria myoxocephali,* and it reflects the hypothesis, that *Haemogregarina* is not monophyletic genus.

Key words:
Blood parasites; Fish parasites; Svalbard; *Amblyraja radiata; Haemogregarina delagei*;

Obsah

1. Úvod 7
1.1. Svalbard 7
2. Paryby - Chondrichthyes 9
2.1. Elasmobranchii 9
2.2. Chiméry - Holocephali 10
2.3. Paryby v Arktidě 11
2.4. *Somniosus microcephalus* - žralok grónský 11
2.5. *Amblyraja radiata* - rejnok hvězdnatý 13
3. Parazitismus 15
4. Krevní paraziti 15
5. Trematoda 15
5.1. Sanguinicolidae 15
5.2. Schistosomatidae 16
6. Nematoda 17
6.1. Fillaridae 17
7. Kinetoplastida 17
7.1. *Leishmania* 17
7.2. *Trypanosoma* 18
8. Apicomplexa 19
8.1. Malarie 21
8.2. *Haemogregarina* 22
9. Materiál a metody 28
9.1. Materiál 28
9.2. Metody 28
9.2.1. Mikroskopická diagnostika 28
9.2.2. Molekulární diagnostika 29
10. Výsledky 36
11. Diskuse 41
12. Závěry 43
13. Literatura 44
14. Seznam zkratek 53

1. Úvod

1.1. Svalbard

Svalbard je souostroví, které se nachází v Severním ledovém oceánu rozprostírající se mezi 74° a 81° severní šířky a mezi 10° a 34° východní délky. Skupina ostrovů se skládá z největšího Špicberky, Nordausthandet, Barentsøya, Edgeøya, Prins Karls Forland, Bjørnoda, Kvitøa, Kongsøa, Svenskøya a Wihelmøya (Hisdal, 1998). Celková rozloha ostrovů je 62 050 km^2 (Adam Grydehøj, 2012). Ze 60 % jsou Špicberky pokryty sněžnými plánĕmi nebo ledovci, které pozvolna ustupují. 30 % je pokryto neplodnou půdou (skálami, sutinami, šĺ kami. (Land et al., 2009). Méně než 10 % tvoří vegetace. Stálá populace na Svalbardu je asi okolo 3000 obyvatel, kteří žijí na západním pobřeží Špicberk (Grydehøj, 2012). Hlavním městem je Longyearbyen (Land et al., 2009).

Obr. 1 Mapa Svalbardu (převzato z wikipedie: URL 1)

Podnebí je ovlivňováno Severním Atlantikem, Golfským proudem se západní pobřežní oteplueje. V letních měsících se teplota pohybuje kolem 5 °C s výskytem mlhy, v zimním období teplota klesá k -12 °C, převládá tma a silný vítr (Hagen, 1993).

Je zde několik hlavních zdrojů odtoku sladké vody do moře. Tání ledovců, tání sněhu a vodopády v létě. Tento přítok sladké vody je nejvyšší v letních měsících. Svalbard je 8-9 měsíců v roce pokryt ledem. Ke změnám dochází v závislosti na letním tání (Hisdal, 1998).

Fjordy se tvoří zaplavením ledovcových údolí. Výška vody ve fjordech se pohybuje v závislosti na roční období (Prominska, 2013).

Lidé zde jsou zaměřeny hlavně na lov, rybaření, vědecký průzkum, průmyslovou těžbu uhlí a turismus. Speciálně potápění je velmi fascinující kvůli široké škále druhů podmořské živočišné říše. Souostroví Svalbard je pravděpodobně nejlépe chráněná přírodní rezervace na světě. Našli bychom zde i několik národních parků, kam je v určitých období přísný zákaz vstupu (Hisdal, 1998).

Život rostlin a živočichů musí být přizpůsobený k extrémním životním podmínkám jako jsou nízké teploty a neobvyklé světelné podmínky. Dalšími důležitými ekologickými faktory jsou sněhové podmínky na pevnině, rozsah a variace mořského ledu (Hisdal, 1998). I přes drsné přírodní podmínky zde žijí různé druhy rostlin. Kořeny pronikají do země, kde absorbují vodu a živiny. Významnou plochu tvoří mechy a lišejníky. Na horských svazích, které jsou pokryty sněhem roste mnoho druhů bylin, pryskyřníky, dryádka, vrba polární a jiné (Rønning, 1996).

Mezi savci bychom zde mohli vidět soba špicberského, lišku a introdukovaného hraboše v lidských sídlech (Hisdal, 1998). Ve Špicberkách se jich vyskytuje asi 36 druhů ptáků. V létě dochází k migraci mnoha mořských ptáků. Mořští ptáci přilétají do Arktidy pouze na letní období od června do září. Většina arktických ptáků se živí hmyzem nebo polární treskou (Weslawski, 2013). Významným zdrojem živin i pro suchozemské organismy jsou mořští živočichové, zejména ryby. Žije zde něco přes 150 druhů ryb. Z mořských savců zde žijí velryby, delfíni, tuleni, mrože nebo lední medvědi, kvůli kterým je třeba dodržovat určitá bezpečnostní opatření. Největší arktickou parybou je žralok grónský (Weslawski, 2013). Ve vodách se vyskytují tresky, např. - *Gadus morhua, Boreogadus saida* a žraloci, rejnoci, jejichž kostry jsou chrupavčité. Rejnoci jsou přizpůsobeni životu na dně. Ve svalbarských vodách bylo zaznamenáno 4-5 druhů rejnoků, kam patří i velmi běžný druh *Amblyraja radiata* (Dolgov, 2002).

2. Paryby - Chondrichthyes

Paryby (Chondrichthyes) jsou převážně mořští živočichové, jejichž skupina je tvořena Elasmobranchii (žraloky a rejnoky) a Holocephali (chimérami). Elasmobranchii jsou dominantní žijící skupinou z paryb, tvoří asi 96 %, zbylé 4 % vyplňují Holocephali (Hamlett, 1999). Celkově je známo 1193 druhů paryb z čehož 48,7 % jsou považovány za hlubinné. Většinovou část tvoří žraloci (278 druhů), rejnoci (258 druhů) a chiméry (46 druhů) (Yopak, 2007). Skupina jako celek nemá kosti, ale jejich kostra se skládá z měkkých, pružných chrupavek lemovaných tvrdou tkání (Dean et al. 2005).

Žijící paryby zaujímají rozmanitost od pobřežní vody, útesů, otevřených oceánů, hluboké a vyskytují se ve vodách od tropů až po Arktidu a Antarktidu. Většinu života tráví 200 m hluboko pod vodou (Yopak et al., 2007).

Všechny paryby mají pár hrudních a břišních ploutví na obou částech těla, 4-7 párů žaberních štěrbin na bocích nebo ze spoda hlavy. Paryby jsou ale také schopné dýchat skrz nozdry, které se nacházejí v horní části všech rejnoků a některých žralok. Tyto otvory jim umožňují odpočívat na dně oceánu a čerpat okysličenou vodu. Nemají ovšem plíce ani plynový měchýř. Na základě specializovaných smyslových orgánů na hlavě dokáží paryby rozpoznat změny elektrických proudů (Hamlett, 1999). Velikosti mozku u paryb jsou rozdílné (Yopak et al., 2007). Mají mnoho smyslových senzorů a jejich chování je přizpůsobené k životu v hlubokých prostředních k přežití (Merrett and Haedrich, 1997). Ve srovnání s ostatními parybami mají hlubinné typy žralok a Chiméry průměrně nižší velikost mozku vhledem k velikosti jejich těla (Kotrschal et al., 1998).

Reprodukce je u všech druhů podobná. Na rozdíl od ryb, mají všechny paryby vnitřní oplodnění (fertilizaci). K oplodnění dochází přes samčí párové orgány – klaspery. Potomci se líhnou z vaječných kapsulí (Hamlett, 1999). Oproti rybám mají paryby malou plodnost a dopívají pozdě. Reprodukce mezi žraloky a rejnoky může být odlišná (Garcia, Lucifora and Myers, 2008).

Až na pár výjimek sladkovodních rejnoků a žralok je drtivá většina paryb mořského původu (Heinicke, 2009).

2.1. Elasmobranchii

Žraloci a rejnoci mají odlišnou kostru těla, ovšem mají několik běžných společných vlastností. Tělo žraloka může být rozděleno na hlavu (od čenichu po žábry), trup (od pletence

ramenního k otvoru) a ocas. U rejnokŧ se trup a ocas funkčně doplňují a k pohybu slouží prsní ploutve, které sjednocují prsní část s hlavou a trupem (Hamlett, 1999).

Vnější povrch většiny žralokŧ a rejnokŧ je pokryt vroubkovanou kŧží (vroubky nejsou větší než 2 mm) nebo šupinami, ačkoliv některé žraloci a rejnoci mají hladký běžný povrch. Všichni žraloci mají ocasní ploutev, zatímco rejnokŧm tato ploutev chybí. Většina žralokŧ ma dvě hřbetní ploutve (některé žraloci mají jen jednu hřbetní ploutev). Rejnoci mohou mít dvě hřbetní ploutve, jednu, nebo vŧbec žádnou. Na hlavě se nacházejí oči, nozdry, prŧduchy, žábry a endolymfatické póry (na zadní části hlavy za očima, které komunikují s vnitřním uchem). Oči jsou velké a dobře vyvinuté u většiny žralokŧ a rejnokŧ a jsou chráněny víčky. Stejně jako mnoho dalších nočních savcŧ mají vnitřek oka pokryt membránou, který odráží světlo zpět do oka pro lepší vidění v šeru. Nozdry jsou velmi dobře vyvinuty, dokáží díky nim detekovat malé koncentrace látek (například krev) z velké vzdálenosti (to platí i pro rejnoky). Voda se pohybuje přes nosní dutinu, čímž se mohou žraloci a rejnoci pohybovat. Některé rejnoci a žraloci se pohybují také zpŧsobem pumpování vody do úst skrz žábry, což jim také napomáhá čerpat vodu skrz nozdry (Hamlett, 1999).

Jejich zuby tvoří několik řad. Zuby Elasmobranchii jsou zakotvené v pojivové tkáni pokrývající chrupavky čelistí (James 1953).

Endoskeleton Elasmobranchii se skládá z hyalinu (sklovitá bezbarví hmota) a vápencové chrupavky. Chrupavčitá kostra embrya Elasmobranchií vytrvává do dospělosti a není přeměněna v kosti jako je tomu u obratlovcŧ (Hamlett, 1999). Ačkoliv většina žralokŧ a chimér mají obecně válcovitý tvar těla, některé žraloci a zbytek Elasmobranchii jsou dorsoventrálně zploštělé (Heinicke, 2009).

2.2. Chiméry - Holocephali

Chiméry jsou charakteristický dlouhým úzkým tělem a velkou hlavou. Délka dospělého jedince se v prŧměru pohybuje mezi 60 cm až 1 m (v závislosti na druhu). Jejich povrch je v dospělosti zcela šupinatý (Didier et al., 2012).

Všichni Chiméry mají 2 hřbetní ploutve a jednu ocasní, prsní a pánevní ploutve jsou v páru. Žábry jsou koncertované pod neurokraniem a ukryty pod překlopkou. Od žralokŧ a rejnokŧ se liší v počtu žaber (mají 4 páry žaberních štěrbin). Voda prochází přes dutinu ústní přes několik interbraniálních prostorŧ do malé společné pabranchiální komory, které jsou ohraničeny překlopkou. Chiméry mají 6 zubních desek ve třech párech. Jeden pár se nachází v horní čelisti a zbylé dva v dolní čelisti. Nemají žádný žaludek. Jsou sexuálně dimorfní, což znamená,

ge rozdíl není pouze v pohlavních orgánech, ale také ve velikosti tla, zbarvení, tvaru a jiném (Didier et al., 2012).

2.3. Paryby v Arktid

Paryby úsp*n* kolonizují jak v arktickém, tak mimo arktickém mo*ském prost*edí (Nelson, 2006). Rejnoci jsou nejpo*etn*j*í skupinou z paryb v Arktid* *ele* Rajidae je dominantou ve studených vodách v arktickém prost*edí. Celosv*tov* existuje n*co okolo 150-220 druh* (Stehmann and Burkel et al.1990). Výskyt rejnok* je kosmopolitní, ov*em nejv*t*í zastoupení mají v m*lko hlubokých vodách, v polárních a mírných oblastech.

raloci se v Arktid nacházejí velmi z*dka (Yopak et al., 2007). Norské mo*e, Barentsovo mo*e a Beringovo mo*e jsou nejvíce bohaté regiony na druhy paryb. Jsou sou*ástí Arktidy, která se vyzna*uje atlantickými a pacifickými vodami (Mecklenburg et al., 2002). Paryby jsou dob*e p*izp*sobené k *ivotu v arktickém oceánu a p*ilehlých vodách, a*koliv mnoho druh* se zde objevilo pouze z*dka nebo zde byly nalezeny pouze jednou (Garcia et al., 2008).

*2.4. Somniosus microcephalus - *ralok grónský*

*ralok grónský má mohutné tlo válcovitého tvaru, které se zu*uje sm*rem k ocasu a *irokou hlavu se zaobleným rypcem. Nozdry se nachází bl*e ke *pi*ce *enichu. O*i jsou malé (Yano et al., 2004). Prsní ploutve jsou malé a zakulacené p*ed nimi se nachází 5 *aberních otvor*. *ralok má dv* malé h*betní ploutve. První le*í p*ibli*n* v polovin* tla, druhá je vzadu za b*ní ploutví. Ocasní ploutev má v zadní hran* mnoho zá*ez*, je veliká a *iroká (MacNeil, 2012).

Obr. 2 Žralok grónský (převzato z OTlibrary: URL2)

Zuby jsou v horní i dolní čelisti, v horní jsou zuby útlé a kuželovité, ve spodní jsou zuby široké a jejich špičky jsou nakloněmo dopředu. Barva těla může být buď tmavě šedá, tmavohnědá téměř až černá mramorovaná nebo olivově zelená s kovovým odleskem. Tmavé až černé zbarvení můžeme spatřit podél okrajů prsních a ocasních ploutví (MacNeil, 2012).

Nachází se zejména ve velkých hloubkách 200-600 m, maximálně v hloubce 1 200 m, tudíž je přizpůsoben životu ve velmi chladném prostředí, nejčastěji nad bahnitým dnem. Jeho čich je velmi dobře vyvinutý, který ho rychle navádí ke kořisti, naproti tomu zrak jen slabě, protože ve velkých hloubkách je málo světla (Nielsen, 2013).

Maximální délka žraloka grónského může přesahovat více než 7 m (Compagno, 1984). Vzhledem k jejich délce může jejich váha dosahovat až 6000 kg (Compgano, 2001). Tím se řadí mezi největší dravé žraloky (Leclers, 2012).

Žralok grónský je vejcoživorodý. Samička rodí potomky v zimě a její mláďata jsou při porodu dlouhá kolem 40-70 cm (Hussey, 2014).

Jejich potrava je velmi pestrá, živí se rybami například lososem, a dokonce i rejnokem *Amblyraja radiata* (Donovan 1808), bezobratlými (korýši a měkkýši) a mnoha dalšími živočichy (MacNeil, 2012). Potrava žraloků, kteří žijí na Svalbardu se skládá z 82 % z ryb (Leclers, 2012).

Žralok grónský se zdržuje spíše v chladnějších místech na severu Atlantiku od Bílého moře Islandu a východního pobřeží Grónska na jih až po severní část Severního moře (Gallant, 2006).

Teplota vody, ve které se pohybuje má 12 °C až - 1,5 °C (Skomal and Benz, 2004).

Podle vědeckých odhadů se úralok grónský může dožívá nejméně 272, mnohdy až 400 let (Nielsen, 2016).

2.5. Amblyraja radiata – rejnok hvězdnatý

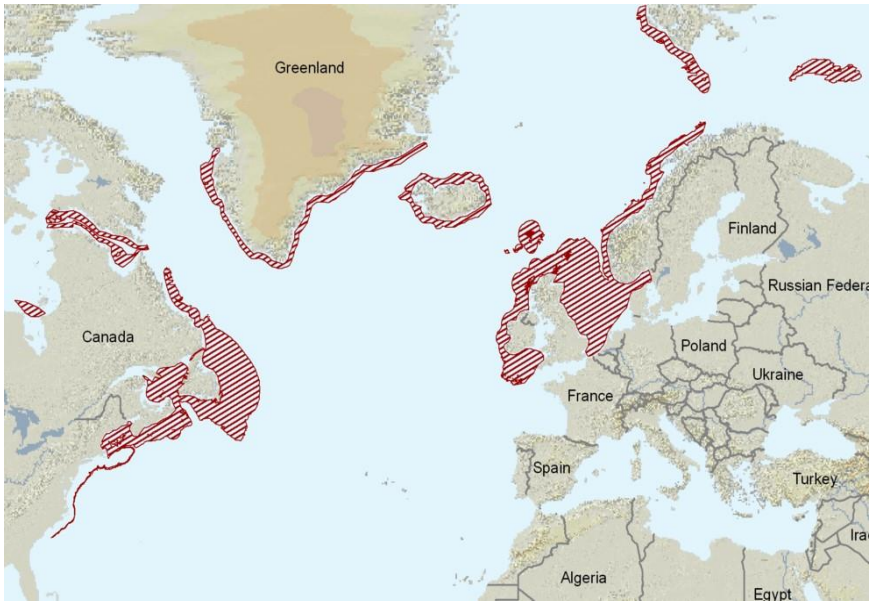
Amblyraja radiata patří do třídy Chondrichtyes, čeledi Rajidae a rodu *Amblyraja (*Smith, 2011).

Obr. 3 (převzato z Elasmodiver: URL 3)

Rod *Amblyraja* se vyznačuje zploštělým tělem. Počet zubů se mírně liší podle dané oblasti, ale pohybuje se mezi 36-46 v horní i dolní řadě. Jednou z nejvýznamnějších charakteristik je řada velkých nápadných trnů podél střední osy na hřbetní ploutvi a ocasu. Ve středové řadě se jich nachází od 1-19. Někdy lze trny nalézt i nad oči ima. (Lynghammar, 2014). Dorsální povrch je zbarven do hnědé barvy, příležitostně mohou být zde objevit tmavě hnědé skvrny. Ventrální povrch je bílý příležitostně s lehce nahnědlými skvrnami. Bílé skvrny jsou také někdy prezentovány vedle každého oka nebo v zadních stranách těla (Smith, 2011).

Velikost je rozdílná podle místa výskytu. Mladí jedinci dosahují délky přibližně 10 cm. Největší byly nalezeny v zálivu Maine, kde dosahuje více než 100 cm. Zde se také dožívají věku až 16 let. V jiných oblastech, kde dosahují délky kolem 88 cm se dožívají 10 let samečci, 11 let samičky (Sulkowski, 2005).

Amblyraja radiata se vyskytuje jak ve východním, tak i západním Atlantském oceánu. Ve východním Atlantiku se vyskytuje na Svalbardu, v Grónsku, Islandu, Lamanšském průlivu v severní části Severního moře a západní části Baltského moře. V západním Atlantiku od Grónska ke Kanadě, jižní Karolíně a USA. (Smith, 2011).



Obr. 4 Výskyt rejnoka *Amblyraja radiata* ve světě (převzato ze iucnredlist: URL 4)

Zdržují se v mělkých pobřežních vodách při teplotě 1,4-14 °C a hloubkách 18-1400 m. Nejhojnější se vyskytují v hloubkách pod 110 m s teplotami 2-10 °C (Chevolot, 2007).

Rozmanitost potravy se liší v závislosti na stáří a velikosti. U jednotlivců kolem 40 cm se potrava skládá převážně z mnohoštětinatců, jedinci, kteří přesahují 70 cm se živí hlavně rybami, a to treskami nebo sledi. Další potravu tvoří korýši, krevety, sasanky (Ebert, 2007).

Jejich schopnost reprodukce trvá téměř celý rok (na rozdíl od jiných chrupavčitých). Jediná studie byla provedena v zálivu Maine. Na vrcholu rozmnožování jsou buňky v květnu nebo v říjnu. Velikost vaječných pouzder závisí na velikosti rejnoka. K líhnutí dochází, když embryo dosahuje přibližně 10 cm. Počet vyvinutých vajíček se pohybuje v rozmezí od 2-88. Jakmile jsou vajíčka vyzrálá, začnou se uvolňovat z vaječníku. Dostanou se do horní části vejcovodu a uzavřou se se žloutkem a bílkem do pouzdra. Pouzdra jsou světle hnědá a mají charakteristické rohy. Typicky se nachází 1 oplodněné vajíčko v 1 pouzdře. Samice často ukrývá svá vajíčka do písečných nebo bahnitých míst. Když se mláďata líhnou z pouzder, jsou plně vyvinuta a podobná vzhledem dospělým jedincům (Sulkowski, 2005). Dospělými se stávají až po 5-6 letech (Chevolot, 2007). Vaječná pouzdra jsou někdy potravou dravých plžů nebo žraloků (Sulikowski, 2005).

3. Parazitismus

Parazitismus je jednou z nejvíce rozšířených životních strategií a v evoluci hraje velmi důležitou roli. Paraziti jsou původci sedmi z celkového počtu deseti nejvýznamnějších infekčních onemocnění. Parazit je organismus, který získává živiny z jednoho či více hostitelů, kterým obvykle nějak škodí, ale zabít je nemusí. Parazitickému způsobu života se přizpůsobily viry, bakterie, jednobuněčná eukaryota a mnohobuněčné organismy. Ovšem parazitologie se zabývá zejména parazity eukaryotického typu: prvoky, červy a členovci. U životního cyklu rozdělujeme parazity na jedno hostitelské a více hostitelské. U mezihostitelů k žádnému množení nedochází nebo je nepohlavní a u definitivní hostitele je množení pohlavní. Podle výskytu parazita v hostiteli jej můžeme dělit na endoparazity (parazitující uvnitř těla hostitele) nebo ektoparazita (žijící na povrchu těla hostitele) (Volf, Horák a kol. 2007).

4. Krevní paraziti

Trypanosomatida je řád, do kterého patří paraziti bičíkovci s jedním bičíkem, patřící do třídy Kinetoplastea a kmene Euglenozoa. Pod tento řád spadají dva důležité rody *Leishmania* a *Trypanosoma*. Jedná se o parazity v krevním řečišti, které mají některé společné znaky (aerobní prostředí, nadbytek živin a kontakt s imunitními buňkami hostitele) (Ryšavý et al., 1988).

5. Trematoda

Kromě jednobuněčných parazitů probíhají v krvi obratlovců i části vývojových cyklů některých helmitů. Jsou to motolice čeledi Sanguinicolidae a Schostosomatidae (Ryšavý, 1988).

5.1. Sanguinicolidae

Sanguinicola je motolice, který napadá krevní oběh ryb (jejich tepny, cévy, žábryé), posléze i orgány. Je známo několik druhů i *S. davis, S. klamathensis, S. idahoensis.* Dospělý jedinec *S. davis* je 8,5mm dlouhý a 0,21mm široký. *S. kalathensis* je dlouhý asi 2,6 mm a široký 0,91 mm. Tělo je vřetenovitého tvaru, mírně zploštělé. Podél každé strany se nacházejí ostny (Wales, 1958).

V životním cyklu larvy po penetraci migrují do krevního oběhového systému ryb a vyzrávají zde v dospělé, které poté uvolňují svá vajíčka do krve 30 dní po projevení (Kirk et al., 1993). V krevních oběhu vajíčka způsobují ucpání cév, tím zhoršují proudění krve. Pokud jsou vajíčka ve velkém množství, mohou se tvořit krevní sraženiny, přivodit trombózu a náhlou smrt. Vajíčka se dále usazují v cévách ledvin, kde mohou narušovat jejich funkci (Davies et al., 1953). Miracidium se líhne ve vodě a proniká do měkkýše pomocí penetračních žláz. Během průniku a krátce po něm se přeměňují ve sporocystu. Cerkárie se vyvíjejí ze dvou generací sporocyst a během 1dne přímo infikují hostitele (Kirk et al., 1993).

Jednotlivá žaberní vlákna ryb jsou poškozena, bledá nebo se vyskytují světlé skvrny na mnoha místech a ledviny bývají oteklé (Davis et al., 1953).

5.2. Schistosomatidae

Schistosomóza je tropické onemocnění způsobeno motolicemi rodu *Schistosoma*. Plži jsou mezihostiteli. Vajíčka, která jsou ve tkáních mohou vést k zánětlivým a obstrukčním chorobám močového ústrojí (Gryssels et al., 2006).

Dospělé schistosomy jsou bílí nebo načervenalí červi o velikosti 7-20 mm s válcovitým tělem (Gryssels et al., 2006).

Samice produkují stovky až tisíce vajíček denně. V každém vajíčku je larva, která vylučuje proteolytické enzymy, které pomáhají vajíčka přenést do močového měchýře. Larva si vyhledává plže, penetrují do těla a dochází k asexuálnímu množení. Přes dvě generace sporocyst se vyvinou konečná stádia cerkárie, která opouštějí mezihostitele. Cerkárie začínají opouštět plže po 4-6 týdnech. Infekční cerkárie se ve vodě zdržuje maximálně 72 hodin a hledá definitivního hostitele. Když naleznou hostitele, cerkárie migrují v krvi přes plíce a játra a přeměňují se v mladé červy. Červi se dostávají z mezenteria do stolice anebo z pletence močového měchýře do moče. (Gryssels et al., 2006).

Životnost dospělé schistosomy je 3-5 let, někdy se může dožívat až 30 let (Gryssels et al., 2006).

Vyskytují se v Africe, na Arabském poloostrově a v Jižní Americe.*Schistosoma japoncium* je rozšířena v jihovýchodní a východní Asii Toky (mírně tekoucí), rybníky a jezera jsou přirozeným zdrojem infekce (Gryssels et al., 2006).

6. Nematoda

V krvi obratlovcŢ probíhají i ļásti vývojových cyklŢ helmitŢ Fillaridae (Ryġavý, 1988).

6.1. Fillaridae

Filárie jsou malý aġ stŚednŊvelký ļervi, kteŚí se vyskytují v podkoġí rŢzných savcŢ (Volf, Horák, 2007). Jejich tvar tŊla je dlouhý a niŠovitý, s rudimentální ústní kapsulou (Ryġavý, 1988). Lákají mezihostitelský dvoukŚídlý hmyz, který se nakazí vajíļky nebo larvami parazita. Jsou schopny vyvolat koġní léze (Volf, Horák, 2007). Mezi hostitele se Śadí savci, ptáci, plazi a obojġivelníci (Ryġavý, 1988).

Parafilaria bovicola je parazit, který osidluje podkoġí rŢzných savcŢ v EvropŊa v Africe. Po expozici sluneļnými paprsky se koġní léze v místŊlokalizace dospŊlcŢ otevírají a krvácejí. S krví jsou vyplavovány vajíļka, kterými se nakazí mouchy rodu *Musca* bŊhem sání (Volf, Horák, 2007). *Loa Loa* neboli vlasovec oļní je tenká vláskovitá hlístice. Dosahuje délky 3-5 cm. PatŚí k parazitŢm, kteŚí napadají ļlovŊka, u nichġ cizopasí v podkoġním pojivu, v nŊkterých orgánech anebo ļasto pod oļní spojivkou. Ovádi rodu *Chrysops* jsou mezihostiteli, ve kterých dochází k vývoji infekļní larev. Dalġím pŚíkladem je vlasovec mízní *Wuchereria bancrofti*. Hlístice dosahuje délky 4-10 cm (samiļky vŊtġí neġ sameļci). V dospŊlém stádiu jsou stoļeny v klubíļka a cizopasí v mízním systému ļlovŊka (mízní uzliny, mízní ganglia). OnemocnŊní se projevuje chylurii nebo hematochylurií, coġ je nález kapiļek mízy nebo krvi v moļi. Mezihostiteli jsou komáŚi z rodu *Aedes, Anopheles, Culex* a *Mansonia* (Ryġavý, 1988).

7. Kinetoplastida

7.1. Leishmania

Leishmania je rod, který vyvolává celou ġkálu parazitárního onemocnŊní. VŊtġina biļíkovcŢ jsou extracelulární paraziti, tito vġak tvoŚí výjimku a jsou intracelulární paraziti. Paraziti zpŢsobují nemoc zvanou leishmaniósa a jsou pŚenáġeni krevsajícím hmyzem. (Milon, 2009).

Leishmanie jsou paraziti neutrofilŢ, dendritických bunŊk a makrofágŢ. Jsou schopny infikovat i fibroblasty, ve kterých se ale dále uġ nemnoġí (Murray, 2005). Leishmanióza je onemocnŊní vyvolané leishmaniemi. Toto onemocnŊní je známé témŊŚ u vġech savcŢ. (Volf,

Horák et al., 2007). U lidí leishmánie zpŢsobují onemocnŊní koǵní (*Leischmania tropica, L. mexicana*), nebo postupuje do sliznic ï mukokutánní (*L. brasiliensis*), aǵ po orgánovŊ ï viscerální (*L. donovani*), kde napadají mízní uzliny, játra, slezinu a kostní dŚeŔ (Ryġavý et al., 1988). Lokalizace parazita je dána jeho vlastnostmi a imunitním systémem a genetickou výbavou hostitele. (Volf, Horák et al., 2007).

Mezi koǵní formy onemocnŊní se Śadí Ăsuchý vŚedñ (*L. tropica*), Ăvlhký vŚedñ (*L. major*) a *L. mexica*. K mikokutánní patŚí onemocnŊní zpŢsobené *L. brasiliensis*, které zaļíná jako koǵní vŚed, pokraļuje do sliznic nosohltanových a ústních. ř adí se k nejtŊǵǵí formŊ mikokutánnímu onemocnŊní. PŢvodcem nejznámŊǵí nákazy vnitŚních orgánŢ je onemocŊní zvané Ăkala-azarñ (ļerná nemoc) zpŢsobené *L. donovani* (Volf, Horák et al., 2007).

Ģivotní cyklus leishmanií má dvŊstádia v ǵivotním cyklu. První stadium je promastigotní, které je charakteristické velmi krátkým biļíkem a je infekļní pro ļlovŊka. K jeho vývoji dochází v pŚenaġeļi. Druhé stádium je amastigotní, které je dŢleǵitŊǵí z hlediska patogenity. V tomto pŚípadŊ je bezbiļíkaté a intracelulární. Vlastní pŚenos je uskuteļŔován díky krevsajícímu hmyzu ï *Phlebotomus a Lutzomyia* (Gossage, 2003).

Leishmanie se vyskytují asi v 88 zemích. RoļnŊ se touto smrtelnou nemocí nakazí nŊco kolem 2 miliónŢ lidí. 90 % koǵní leishmaniózy se vyskytuje v Afghánistánu, Pákistánu, Sýrii, Saúdské Arábii, Alǵírsku, Íránu, Brazílii a Peru. 90 % viscerální leishmaniózi se vyskytuje v Indii, Bangladéġi, Nepálu, Sudanu a Brazílii (Murray, 2005).

7.2. Trypanosoma

Druhy rodu *Trypanosoma* parazituje u vġech obratlovcŢ (Ryġavý et al., 1988). Ģivotní cyklus je obvykle mezi krevsajícím hmyzem (Diptera a Heteroptera) a obratlovcem. Hlavní ļást vývoje parazita probíhá v pŚenaġeļi (Volf, Horák et al., 2007). Rozmnoǵují se binárním dŊlením (Ryġavý et al., 1988), dochází zde také k diferenciaci parazita (Volf, Horák et al., 2007). Trypanosomy jsou rozdŊleny do dvou skupin ï Stercoraria a Salivaria (Ryġavý et al., 1988).

Stercoraria

Vývojové stádium u pŚenaġeļi je ukonļeno v zadní ļásti trávicího traktu. K pŚenosu dochází výkaly. Jejich kinetoplast je relativnŊ veliký (Ryġavý et al., 1988). NejvýznamnŊǵí trypanosoma je *T. cruzi*, která mimo ļlovŊka napadá také stovky druhŢ domácích i divokých savcŢ. Její výskyt je zejména v subtropickém a tropickém pásmu Jiǵní a StŚední Ameriky (Volf,

Horák et al., 2007). U lidí *T. cruzi* zpŧsobuje onemocnění, které se nazývá Chagasova choroba. Nejzávaţnější formou tohoto onemocnění je srdeční selhání (v případě, ţe se parazit vyvíjí v srdeční svalovině) anebo ztráta nervové kontroly zaţívací trubice (v případě, ţe parazit napadne nervový systém). Přenašečem je ploštice čeledi Reduviidae (Ryţavý et al., 1988). Parazit se v jejich střevě mnoţí do epigmastigotŧ, dále jsou přeměněny v rektu na infekční trypomastigoty. Trypomastigoti, kteří jsou v krevním řečišti se dále nedělí, ale zahajují nákazu ostatních buněk (Volf, Horák et al., 2007).

Salivaria

Rozdíl oproti Stercoraria je vývoj v přenašeči, který je ukončen v přední části trávicího traktu. Přenos je vţdy ginou uskutečňován bodáním a sáním krve. Kinetoplast je poměrně malý Nebezpečnými druhy pro člověka jsou dva druhy trypanosom ï *T. gambiense a T. rhodesiense.* Patří mezi původce tzv. africké spavé nemoci. Toto onemocnění se projevuje prŧjmy, anémií, horečkami, úpadkem sil a jinými příznaky. Nejdříve se trypanosómy zdrţují v lymfatickém systému, později vniknou do krve a tkání. Ve druhém měsíci onemocnění se objevují psychické poruchy a nervové příznaky. Prŧběh nákazy *T. rhodesiense* je rychlý (2-4 měsíce), v neléčitelných případech končí smrtí. Nákaza *T. gambiense* trvá i několik let. Zvířata jsou napadány druhem *T. brucei*. Přenašeči jsou africké bodalky rodu *Glossina*. K vývoji trypanosóm tohoto přenašeče dochází ve střední části střeva, které pronikají ze slinných ţláz při sání (Ryţavý et al., 1988).

Rybí trypanosomy

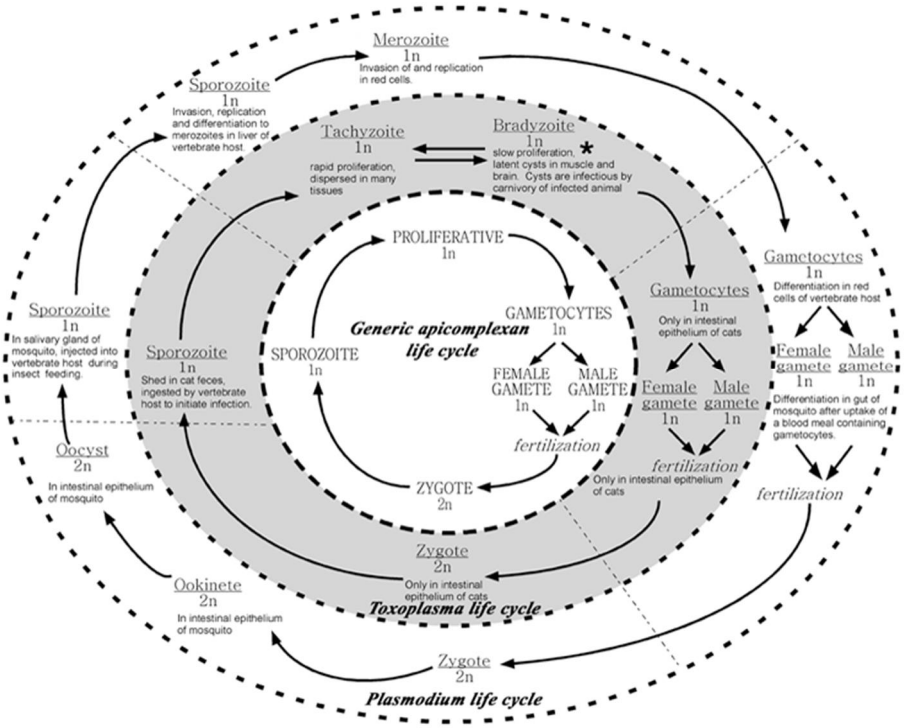
Rybí trypanosomy jsou rozšířeny ve sladkovodních rybách a přenášeny pijavkami (vektor). Trypanosomy se vyskytují u rŧzných druhŧ ryb a v rŧzných lokalitách. Výskyt trypanosom u ryb je běţný a nepatogenní (Overath, 1999).

8. Apicomplexa

Kmen Apicomplexa, (známý také pod názvem Sporozoa) tvoří velkou a rŧznorodou skupinu jednobuněčných prvokŧ (Morrison, 2009). Vţichni výtrusovi jsou adaptováni na ţivot uvnitř buněk hostitelŧ, na povrch málokdy. Název kmene se odvíjí od apikálního komplexu, coţ je soubor organel-polární kruh, mikronemy, roptrie, subpelikulární fibrily (tubuly) a konoid (Ryţavý et al., 1988), která vnikají do buněk hostitele částečně či úplně (sporozoiti, merozoiti). K opakované tvorbě apikálního komplexu dochází při rŧstu a rozmnoţování parazita (Volf,

Horák et al., 2007). Mnoho druhů je patogenních jak pro člověka, tak i pro domácí zvířata (Morrison, 2009).

Apikální komplex je tvořen skeletárními útvary-konoidem a polárním prstencem a dvěma typy sekrečních váz-kyjovitými rhoptriemi a vláskovitými mikronémy. V buňce také můžeme vidět volně rozptýlené kulovitá denzní granula. Kromě běžných buněčných organel buňka jejich obsahuje apikoplast, jehož přítomnost je pro život organismu nezbytná. Zoiti apikomplex se pohybují pomocí klouzavého pohybu prostřednictvím aktin-myozinovým komplexem, který je navázaný na substrát. Klouzající zoiti jsou schopni aktivního vyhledávání cílové buňky hostitele, což vede k částečnému zavrtání se zoitu do hostitelské buňky (u většiny gregagin) nebo k úplnému uzavření (Volf, Horák et al., 2007).



Obr. 5 (Životní cyklus kmene Apicomplexa a jeho rodů Plasmodium a Toxoplasma (Morrissette and Sibley, 2002).

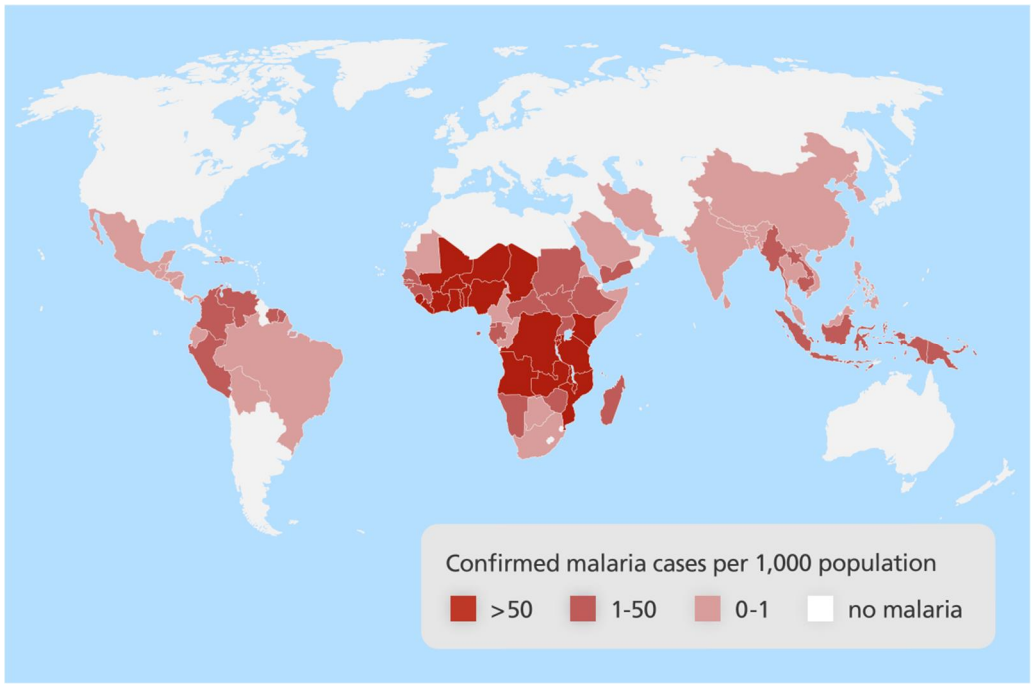
Z hlediska životního cyklu dělíme rozmnožování do 3 fází: merogonie, gamogonie, sporogonie. Typickým příkladem je sporozoit, který vnikne do hostitelské buňky, roste a stane se merontem, dále dochází k dělení jádra. Během merogonie dochází k nepohlavnímu rozmnožování a mnohojaderný meront se rozdělí na jednojaderné merozoity, kteří vniknou do dalších hostitelských buněk. Během gamogonie se vzniklá vnitrobuněčná stádia nejdříve mění v nezralá sexuální stádia (samčí a samičí gametocyty) a následně ve zralá sexuální stádia, samčí mikrgamety a samičí makrogamety. Mikrogamety vějicinou mají 1-3 bičíky. Zygota se obaluje silným obalem a tím se promění v oocystu. Uvnitř oocysty se někdy může tvořit další obal či sporocysta. Také tam dochází k meióze a buněčnému dělení. Produktem dělení jsou

sporozoiti (Volf, Horák et al., 2007). Kmen Apikomplexa je tvoŠen ļtyŠmi velkými skupinami organismŢ: gregariny, hemosporídiemi, kryptosporídiemi a kokcídiemi (Morrison, 2009).

8.1. Malarie

Malárie je jedním z nejzávaģnĎjģích parazitárních onemocnĎní ve svĚtĚ (Cowman, 2006). PŢvodcem malárie jsou prvoci rodu *Plasmodium* (Cowman, 2006).

Mezihostitelem plasmodií jsou plazi, ptáci nebo savci, definitivním hostitelem je potom komár Anopheles. U lidí nejzávaģnĎjģí formu malárie zpŢsobuje Plasmodium falciparum. Malárií se roļnĎ nakazí 300 milionu lidí a 1-2 miliony lidí mu podlehnou. Výskyt tohoto onemocnĎní je zejména v tropickém pásmu (Asie, Afrika).



Obr. 6 Mapa zobrazující rozģíŠení malárie po svĚtĚ (pŠevzato z WHO World Malaria Report, Abarca: URL 5).

PŠenaģeļem je komár Anopheles (je známo asi 60 druhŢ) a pŠenáģejí jen samice (Cowman, 2006). KomáŠi jsou nejvíc aktivní po setmĎní, bĚhem noci anebo za svítání (Mølle, 2000).

Onemocnění komára je vyvolané plasmodiem, který se množí a pŠeģívá ve slinných ģlázách komára. Parazit komára se musí nejprve rozmnoģit, coģ trvá kolem 1 týdne. Po sání komárem se *Plasmodium* dostává do krve (sporozoity se dostávají do tĚla), pozdĚji do jater (Cowman, 2006). Zde zaļíná exoerytrocytární merogonie (Volf, Horák et al.,2007), kde napadá buŇky a dále se množí (Cowman, 2006). Sporozoit se promĎní v meront. Merozoiti zŢstávají v jaterních buŇkách, kde se množí a pak napadají ļervené krvinky (Volf, Horák et al.,2007), nebo hned po pomnoģení opustí játra a napadají ļervené krvinky (Cowman, 2006). Po

proniknutí do erytrocytŧ se merozoiti mění na meronty. Meront se dále vyvíjí a roste, dochází k dělení jeho jádra. Z merontu se stávají merozoiti (Volf, Horák et al.,2007), ţímţ dochází ke zvětšení krvinek a k jejich prasknutí. Za příznaky malárie jsou zodpovědné toxiny, které jsou uvolňovány do krve během prasknutí krvinek (Cowman, 2006). Uvolněním merozoitŧ je spuštěn malarický záchvat Po určité době od zaţátku infekce nikdy nedochází k rozmnoţení merontŧ, ale k proměně merontŧ na gametocyty (Volf, Horák et al.,2007). Sáním krve od nakaţeného dochází dále k nakaţení dalších komárŧ malárií (Cowman, 2006).

Onemocnění se projevuje mezi 10-28 dny od nákazy. Mezi příznaky malárie patří horeţka, zimnice, kříţe, pocení, únava, bolest hlavy a bolesti kloubŧ, zvracení, nevolnost. Typické je, ţe se kaţdých 40-60 hodin parazit uvolňuje do krve, coţ vyvolává malarický záchvat (prudké zhoršení stavu, silná anemie anebo rozpad ţervených krvinek). Stav se většinou po několika hodinách zlepší, ale poté se po pár dnech zase opakuje (Cowman, 2006).

Trombocytopénie (sníţené mnoţství trombocytŧ v krvi) je nejţastější laboratorní abnormalita (60 %), následuje hyperbilirubinémie (zvýšení bilirubinu) 40 % a anemie (sníţení koncentrace hemoglobinu v krvi) 30 % (Trampus, 2003).

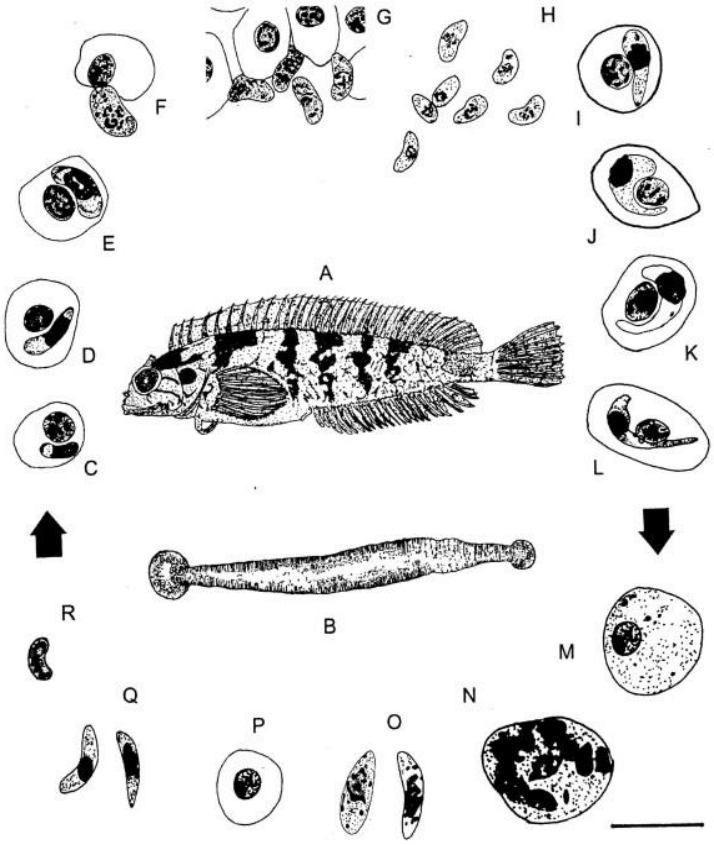
Proti malárii se lze chránit bud chemoprofylaxí (uţívání antimalarik) anebo profylaxí (ochrana před sáním). Léky se poţívají před vstupem do malarické oblasti, během pobytu, a i po vrácení. U těchto lékŧ je velmi dŧleţité dodrţet přesnou hodinu podání. Uţívá se artemisin, nebo chlorochin/promachin nebo samostatný chlorochin.

8.2. Haemogregarina

Rod *Haemogregarina* byl popsán v roce 1885, kdy byl nalezen druh *Haemogregarina stepanowi* parazitující v krvi vodní ţelvy *Emys orbicularis*. Od roku 1885 bylo popsáno více neţ 300 druhŧ rodu *Haemogregarina* a téměř 100 druhŧ ze těch dalších rodŧ haemogregarin. (Desser et al., 1993).

H. curvata byla pozorována u *Clinus cottoides* (viz. obr. ţ. 7) a *Parrablenius cornutus*, ţijící v tropických vodách. Vyznaţuje se zejména tím, ţe má výrazně zakřivené gamonty, poznamenal Hayes et al., (2006).

Ţivotní cykly *Haemogregarin* ï parazitŧ ryb je heteroxenní (=vyţadující více neţ jednoho hostitele pro dokonţení ţivotního cyklu) i kdyţ v některých případech dochází k přímému přenosu (Khan, 1972).



Obr. 7 Životní cyklus *Haemogregarina curvata*-rybí hostitel (A-*Clinus cottoides*), pijavlí hostitel (B – dospělý *Zeylanicobdella arugamensis*); C – L: Jednotlivá stádia v periferní krvi ryby. M-R: Jednotlivá stádia u pijavek; C – malý intraerytrocytární trofozoity; D – velký trofozoity; E – Intraerytrocytární meronty; F – Extracelulární meronty; G-H – Extracelulární merozoity; I – Stádia intraerytrocyárních pregamont; J – Nezralé gamonty; K – meronty mezihostitele; L – Stargí intraerytrocytární gamonty; M – Nezralá oocysta; N – rozvýjející se oocysta; O – Volné sporozoity; P – Meronty; Q – První generace merozoitů; R – druhá generace merozoitů (Hayes et al., 2011)

V těchto cyklech je infekce v rybách pravděpodobně zahájena buň sporozoity, (případně merozoity uvolněnými ze sporozoitů), které jsou inukolovány přímo do krevního řečiště od kousnutím infikovaným bezobratlým hostitelem nebo požením bezobratlého infikovaného hostitele s potravou. Není známo jak se sporozoiti nebo merozoiti, které nejsou přímo injekčně vpraveny, dostávají do krevního oběhu (Khan, 1972).

V rybách se sporozoiti a merozoiti následně uvnitř cytoplazmy dělí merogonií (schizogonií). Meronty se vyskytují v leukocytech a erytrocytech v periferní krvi a v dalších buňkách hostitelů v některých orgánech jako jsou například slezina a ledviny, popřípadě v endotelových buňkách (Khan, 1972).

U některých druhů makromeronty mohou produkovat malé množství velkých merozoitů, zatímco mikromeronty vytvářejí velké množství malých merozoitů. Některé merozoity nakonec napadnout erytroblasty nebo erytrocyty a stanou se gamonty (Khan, 1972).

Haemogregariny mohou být rozděleny do dvou typů podle toho, zda podstoupí dělení v červených krvinkách bezprostředně před vytvořením gamont. Ti, kteří takovémuto dělení podstoupí, jsou označovány jako "schizo-haemogregariny" (Henry, 1912). Gamonty vzniklé z takového dělení jsou obvykle spárované nebo se vyskytují v násobcích dvou uvnitř hostitelských buněk a jsou často nediferencované. Gamonty, které se samostatně vyskytují v buňkách červených krvinek hostitele mohou být relativně nediferencované (monomorfní) nebo mohou vykazovat výrazný pohlavní dimorfismus. Některé monomorfní a dimorfní gamonty mají skrvnitý povrch a byly popsány jako "rovignensis group" (Laird, 1952).

Gamonty jsou infekční pro bezobratlé (definitivní) hostitele. Vstupují do bezobratlých (například pijavic), když se živí rybí krví. Uvnitř lumen střeva bezobratlých, na střevním povrchu, nebo ve střevním epitelu tohoto hostitele, mohou gamonty projevovat pohlavní dimorfismus, který nemusel být zaznamenaný v obratlovci nebo tato diferenciace může být nápadnější (Khan, 1972).

Při samotném sexuálním množení se v samčím mikrogamontu tvoří obvykle 4 bičíkaté mikrogamety, zatímco samičím makrogamonty se vyvine jedinou makrogametu. Poté následuje oplodnění, což vede k tvorbě zygoty, ze které se stává oocysta. Oocysta je obklopena pružnou membránou a produkuje 8 nebo více sporozoitů, které se mohou dále množit merogonií. Sporozoity nebo merozoity, které jsou vzniklé ze sporozoitů jsou považovány za infekční pro ryby (Davies, 1995). Siddall and Desser (1993) rozeznávali 2 vývoje sporogonií produkující 16-32 malých sporozoitů v *Haemogregrina myoxocephali* a merogonie produkující 4 větší merozoity ve slepém střevě *Myoxocephalus scorpius*.

Mezi nejznámější druhy haemogregin patří například *Haemogregarina bigemina*, která je přenášena stejnonožci a infikuje slizouny. Vývoj parazita je podobný jako u ostatních druhů. Průběh trvá 28 dní a obsahuje fáze nezralých a zralých oocyst, sporozoitů a merozoitů. (Laveran and Mesnil, 1901).

Dalším známým druhem je *h. koppiensis*, který infikoval v Jižní Africe v roce 2003 *Amblyrhynchotes honckenii*. Vektorem je v tomto případě opět stejnonožec. Z krevních nátěrů byly odhaleny neobvyklé etapy merigonií, které zahrnovali malé, zaoblené pravděpodobně intraerytrocytární merozoiti v kruzích obklopující jádro hostitele. Buňky hostitelů byly větší ve srovnání s normálními erytrocyty (Smit and Davies, 2005). K hadím haemogregarinám na Floridě patří *H. sauritus* a *H. guttata* (Teleford et al.,2002; Teleford et al.,2004). *H. crocodilinorum* byla popsána z krve amerických aligátorů (*Aligator mississippiensis*). Jejich gametocyty se vyskytují v erytrocytech a erytrocytární schystozonty obsahují kolem 8 merozoitů. Gametogony a sporogony byly objeveny ve střevu pijavky (*Placobdella*

multineata) (Khan, 1980). Curtis et al., tvrdil, že tento vektor také přenáší na 2 druhy *H. triatomae a H. balistapi* jejich hostitelek z Kostariky (2012). Dvě želvy *Emys orbicularis* a *Mauremys caspica,* zkoumány v Íránu, byly nakaženy druhem H. *stepanowi.* Prevalence u těchto želv tímto druhem v této lokalitě byla 75 % až 100 %. Předpokládá se, že merozoity jsou přenášeny na želvy pijavkami (Javanbakht, Shafiri, 2014). První identifikace *H. sachai* byla na farmách ve Skotsku. Ryby měly zvýšený počet erytroblastů, neutrofilů a monocytů a snížený počet trombocytů a lymfocytů (Kirmse, 1978). Nejméně známým druhem je *H. simondi*, kterou můžeme nalézt jak v neutrofilech, tak i lymfocytech ryby (*Solena solena*), která je známá také pod názvem mořský jazyk (Laveran and Mesnil, 1901).

Haemogregariny jsou paraziti červovitého tvaru uvnitř cirkulujících erytrocytů nebo leukocytů. V životním cyklu mají dva hostitele. Zatímco merogonie a gamogonie probíhají v mezihostitelích obratlovců, sexuální stádia, sporogonie a dále merogonie probíhají v pijavicích nebo jiných bezobratlých, kteří jsou tedy definitivními hostiteli (Davies, 1995).

Haemogregariny často infikují rejnoky. Prevalence *Haemogregarina delagei* u rejnoků se různě liší podle sezónny dosahuje 77 % až 91 %. Prevalence infekce *H. delagei* u rejnoků v Passamaquoddy Bay byla vyšší než u rejnoků v severním Atlantiku, což autoři vysvětlují různými hostitelskými druhy. (Siddall, Desser, 2001).

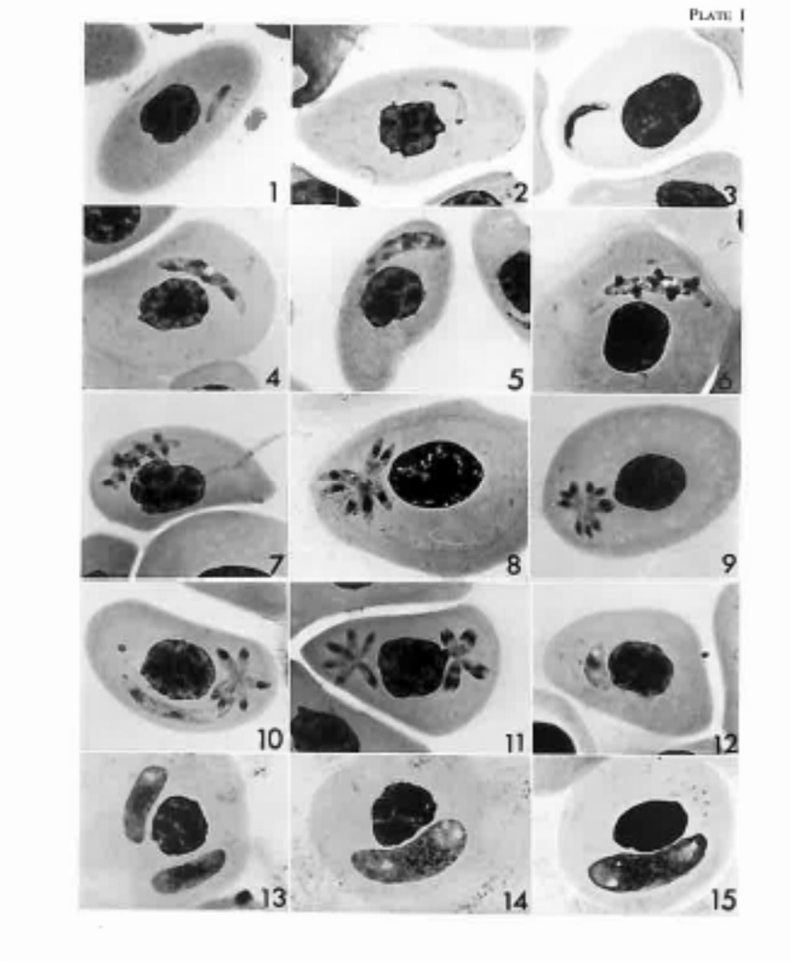
Prevalence ze 75 % tohoto parazita byla zjištěna v Newfoundlandských vodách převážně u rejnoků hvězdnatých. Geografické rozdíly ve výskytu *H. delagei* popisují i jiní autoři (Khan et al. 1980).

Merogonie byla pozorována v krvi rejnoků výhradně v listopadu (Khan, 1972). Během pozorování bylo zjištěno, že k přenosu *H. delagei* dochází na konci rozmnožování rejnoků *Amblyraja radiata* a to na podzim. Takže prevalence gamontů je maximální v zimních měsících (Khan, 1972).

Haemogregariny různých druhů jsou přenášeny infikovanými stejnonožci nebo pijavkami v závisloti na geografické poloze. Zatímco pijavky byly zaznamenány na severní části polokoule, na jihu jsou vektorem stejnonožci (Davies 1995). Různá vývojová stádia *H. delagei* se nachla ve tkáních pijavic *Oxytonostoma typica* (Siddall and Desser, 1993), dále je také možné je najít v jejich slinných žlázách (Khan et al. 1980).

Haemogregariny velmi často napadají ryby v mořském prostředí, zahrnující přímořské okraje, útesy a otevřený oceán v Evropě, Severní Americe, Austrálii a Novém Zélandu. Avšak často se také objevují v rybách z poloslané vody nebo ve sladkovodních řekách a v jezerech (Davies, 1995). Mimo to, haemogregariny byly ještě dále objeveny v krvi ryb z extrémních

vodních prostředích jako je Antarktida a Severní ledový oceán a v hlubinách v Severním Atlantiku (Khan et al., 1992; Davies and Merrett, 2000).



Obr. 8 Vývojová stádia *Haemogregarina delagei* (2000x): 1-2: Trofozoity nacházející se směrem k polárnímu konci hostitelské buňky; 3-5: Dělící se parazit s odlišným polem chromatinu; 6-7: Řupenyň objevující se na povrchu schizontů; 8: Schizont se 7 merozoity; 9: Schizont s 10 merozoity; 10-11: Buňky dvojnásobně infikované schizonty; 12-13: Prekurzory gametocytů; 14-15: Gametocyty (Khan, 1972).

V hematologických postupech, speciálně u krevních nátěrů z ryb, byly objeveny všechny druhy apikomplex v buňkách červené řady. Zdálo se, že některé hemogregariny byly vyvinuty v leukocytech nebo buňkách červené řady. Ostatní hemogregariny a hematozoa napadaly orgány jako jsou játra, ledviny, slezina nebo v retikuloendoteliální systém (Davies and Johnston, 2000). V krevních nátěrech se hemogregariny objevovaly hlavně v zaoblených nebo červíkovitých tvarech intracelulárních organismů a zejména v erytrocytech mohly být některé rozděleny binárním dělením (Davies, 1995).

Tito paraziti jsou sledováni pomocí krevních nátěrů. Krevní preparáty jsou barveny metodou Giemsa Romanovsky, May Grunwald Giemsa a Leischman. Nynější digitální fotoaparáty připevněné k moderním mikroskopům mohou nahrát přesné obrazy malých

organismţ a detekce je mnohem jednoduģģí neģ dŚíve. Krevní nátĐry jsou sledovány pod objektivem 100x (Davies, 1995).

9. Materiál a metody

9.1. Materiál

Vzorky rybí krve, které jsem vyšetřovala, byly získány z Centra polární ekologie Přírodovědecké fakulty Jihočeské Univerzity. Všechny vzorky byly odebrány na Svalbardu v roce 2015. Vzorky jsem dostala již vyizolované z rejnoka *Ambylara radiata*. Byly zhotoveny 2 a více krevních roztěrů od každé ryby a paryby. Postupně byly vzorky zpracované pomocí molekulárních metod.

Tab. 1 Seznam paryb a ryb, které byly vyšetřovány

Ryby a paryby	**Počet odebraných vzorků**
Amblyraja radiata	27
Boreogadus saida	3
Gadus morhua	19
Pollachius virens	3
Gymnocanthus tricuspis	27
Myoxocephalus scorpius	69
Melanogrammus aeglefinus	1
Anarhichas minor	1
Hippoglossoides platessoides	2
Sebastes mentella	1
Lumpenus lampetaeformis	2
Triglops sp.	1
Mallotus villosus	1

9.2. Metody

9.2.1. Mikroskopická diagnostika

Všechny roztěry byly nafixovány 100 % methanolem a poté obarveny pomocí zředěného roztoku Giemsa ï Romanowski (Penta) v poměru 1:5 30 minut. Giemsovo barvivo je roztok, u kterého dochází ke zbarvení buněk do modra. Fixovaná sklíčka byla po obarvení opláchnuta pod tekoucí vlažnou vodou po dobu 30 sekund. Následně se sklíčka nechala zaschnout při

pokojové teplotě. Obarvené vzorky byly prohlíženy mikroskopem Olympus CX21LED, imerzním objektivem při zvětšení 100x.

9.2.2. Molekulární diagnostika

DNA byla vyextrahována pomocí fenolu chloroformu. Jiţ takto vyizolovanou DNA jsem získala od školitele specialisty. Vzorky byly zakonzervovány v TNES pufru (10 mM Tris, 125 mM NaCl, 10mM EDTA-2Na, 0,5 % SDS tj. sodium dodecyl sulfát, 4 M močoviny, Asahida et. al., 1996).

U mikroskopicky vyšetřených rejnoků (*Amblyraja radiata*), kteří vyšli pozitivně, byla provedena polymerázová řetězová reakce (PCR).

Reakčních směsí PCR bylo namícháno několik různě kombinovaných druhů. První byla pro 28 vzorků (27 + negativní kontrola H_2O) a obsahovala 2,5 µl 10x Taq Buffer complete (15mM $MgCl_2$, Top-Bio), jiţ předem zředěného 2 µl dNTP (10mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP, Top-Bio); 120 µlPCR H_2O + 20 µl roztoku dNTP,1 µl 5' primeru Des233F a 1 µl 3' primeru Des2200R (60 µl PCR H_2O + 20 µl roztoku), 1µl Taq-Purple DNA polymerázy (1 U/ µl, Top-Bio); 16,5 µl PCR H_2O a 1 µl templátové DNA. Objem pro 1 vzorek činil 24 µl. Celkový objem pro tuto reakci byl 720 µl (28 vzorků + rezerva).

Další směsi byly připravovány pro 6 vzorků (Tab. č. 2) z nichţ jeden sloužil i jako pozitivní kontrola a negativní kontrola byla opět H_2O. Pro výběr vhodné kombinace reakční směsi byly vybrány nejvíce pozitivní vzorky rejnoka *A. radiata*. Reakce měly několik proměnných tj. pufry, polymerázy a kombinace primerů. Ve směsích docházelo ke střídání primerů a polymeráz, k zjištění nejvhodnější kombinace.

Tab. 2 Výběr vhodné kombinace reakční směsi

Pořadí vzorku a kontroly	**Číslo vyšetřovaného vzorku**
1	C315
2	C272
3	C232
4	C177
5	C183
6	C291
Negativní kontrola (KO-)	H_2O
Pozitivní kontrola (KO+)	C183

1. směs

První reakční směs obsahovala 2,5 µl Taq Buffer complete, 2 µl namíchaného dNTP, 1 µl zředěného 5' primeru Erib1 a 3' primeru Erib10, 1 µl Taq-Purple DNA polymerázy, 16,5 µl H_2O a 1 µl templátové DNA.

2. směs

Druhá reakční směs obsahovala 2,5 µl Taq Buffer complete, 2 µl namíchaného dNTP, 1 µl zředěného 5' primeru Des233F a 3' primeru Des2200R, 1 µl Taq-Purple DNA polymerázy, 16,5 µl H_2O a 1 µl templátové DNA.

3. směs

Třetí reakní směs obsahovala 2,5 µl Blue Taq Buffer (25 mM $MgCl_2$, Top-Bio), 2 µl namíchaného dNTP, 1 µl zředěného 5' primeru Erib1 a 3' primeru Erib10, 1 µl Blood Taq pomerázy (1 U/ µl, Top-Bio); 16,5 µl H_2O a 1 µl templátové DNA.

4. směs

Čtvrtá reakční směs obsahovala 2,5 µl Blue Taq Buffer, 2 µl namíchaného dNTP, 1 µl zředěného 5' primeru Des233F a 3' primeru Des2200R, 1 µl Blood Taq polymerázy, 16,5 µl H_2O a 1 µl templátové DNA.

Celkový objem pro každou z těchto reakcí činil 192 µl.

Další příprava vzorků pro PCR byla s využitím Plain PP Master Mixu ($MgCl_2$ v koncentraci vhodnou pro většinu PCR reakcí, Top-Bio). Opět byla tato směs připravována pro 6 stejných vzorků jako pro předchozí PCR (s negativní i pozitivní kontrolou). Obsahem této směsi bylo 12,5 µl Plain PP Master Mix, 1 µl 5' primeru EimF, 1 µl 3' primeru EimR 9,5 µl PCR H_2O a nakonec 1 µl templátové DNA. Celkový objem pro 8 vzorků byl 200 µl.

Tab. 3 Pouţité primery

Primer	**Směr**	**Sekvence**	**Zdroj/citace**
Des233F	5'	GCTCATTAHAACAGTTATAGTTTR	poskytnuty Martinem Kostkou
Dess2200R	3'	CACAGACCTGTTATTGCCT	Poskytnuty Martinem Kostkou
Erib1	5'	ACCTGGTTGATCCTGCCAG	Barta et al. (1997)
Erib10	3'	CTTCCGCAGGTTCACCTACGG	Barta et al. (1997)
EimF	5'	GAA ACT GCG AAT GGC TCA TT	Kviļerová et al. (2008)
EimR	3'	CTT GCG CCT ACT AGG CAT TC	Kviļerová et al. (2008)
M13F	5'	GTAAAACGACGGCCAGT	Univerzální sekvenaļní primer
M13R	3'	CAGGAAACAGCTATGAC	Univerzální sekvenaļní primer

Tab. 4 Protokol amplifikace

5ó primer	**3ó primer**	**Modifikace PCR**	**Amplifikaļní program (v závorce opakující se cykly)**	**Poļet cyklŢ**
Des233F	Des2200R		94 °C/10 min (94 °C/1 min, 54 °C/1 min, 72 °C/2 min) 72 °C/15 min, 4 °C/Đ	35
Reakce pro směsi				
Des233F	Des2200R	Postupná PCR ï 2	95 °C/3 min (95 °C/40 sek, 52 °C/40 sek, 72 °C/80 sek) 72 °C/10 min, 4 °C/Đ	30
Erib1	Erib10	Postupná PCR ï 1	95 °C/3 min (95 °C/50sek, 48 °C/50 sek, 72 °C/110 sek) 72 °C/10 min, 4 °C/Đ	30
Dalģí reakce				
EimF	EimR		94 °C/1 min (94 °C/15 sek, 55-68 °C/15 sek, 72 °C/1 min), 72 °C/15 min, 4 °C/Đ	25-35

V dalģím kroku jsem si znovu pŚipravila směsi 2. a 4. bez templátové DNA a pŚidala jsem je ke směsím 1. a 3., které byly po amplifikaci (pro primery Erib1 a Erib10) a obsahovaly templátovou DNA. Tuto směs jsem dala do cycleru (Bio RAD T 100 Therma) a pouģila stejný program jako pro primery 5' Des233F a 3' Des2200R. Veģkerá pŚíprava byla provádĎna na ledu.

Elektroforéza

V dalším kroku byla použita separační metoda agarózová elektroforéza (ELFO). Nejprve byl připraven 1 % agarózový gel a to smícháním 1g agaróza Serva a 50ml 1x TBE (Tris-borát-EDTA) pufru dále byla tato směs zahřívána v mikrovlné troubě, dokud se agaróza zcela nerozpustila (roztok musí být čirý). Po zchladnutí pod tekoucí vodou následovalo přidání barviva GoodView (Beijing SBS Genetech, Čína) v koncentraci 0,04 %.

pro vizualizaci DNA v gelu v objemu 4 µl. Agarózový gel byl připravován i v menším objemu (0,5 g a 0,25 g agaru). Namíchaný gel byl rozlit do vaničky, do nichž se vložil hřeben. Díky hřebenu zůstaly v gelu komůrky, do kterých se pipetovaly vzorky PCR. Po ztuhnutí gelu (asi po 20 minutách) byly naneseny jednotlivé vzorky do jamek. Na první pozici byl vložen ladder 100bp DNA nebo 1k ladderu na posouzení délky PCR produktů. Při pipetování vzorku s Blood Tag polymerázou musel být vzorek smíchán s barvičkou Purple Loading Dye 6x koncentrovaným (Dye 1- pink/red, Dye 2 blue, Neb), kvůli zvýšení hustoty a viditelnosti vzorku. Vzorky byly pipetovány v různém množství. Poté mohla být elektroforéza spuštěna. Na začátku byl zdroj spuštěn na 110 V (5 minut), poté snížen na 90 V (30 minut). Výsledky elektroforézy byly kontrolovány prostřednictvím UV transiluminátoru a dokumentovány v zařízení Gel Logic 112 (Carestream Health, USA). Vzorky, které vyšly pozitivně, byly vyříznuty skalpelem a přeneseny do zkumavky.

Izolace produktu

Z vyříznutého gelu následovala izolace PCR produktu pomocí kitu GeneAll Expin Combo. Po přidání 300 µl pufru GB do agarozového bločku byly jednotlivé vzorky zahřáty v termostatu (AccuBlock, Labnet) na 50 °C po dobu 10 minut, aby došlo k úplnému rozpuštění. Poté bylo přidáno 100 µl isopropanolu ke vzorku a zvortexováno. Vzorky byly přendány do kolonek a zcentrifugovány (centrifuge 5424) po dobu 1 minuty/12 000 otáček. Dále byl k vzorkům přidán Buffer NW v množství 700 µl a centrifugován po dobu 30 sekund. Kvůli velkému množství, bylo odstřeďováno 2x, aby došlo k úplnému odstranění bufferu. Kolonky byly následně přendány do 1,5 ml zkumavek. Na membránu kolonek bylo aplikováno 30 µl H_2O a opět zcentrifugováno na 1 minutu.

Klonování

Po izolaci následovalo klonování s kompetentními buňkami *Escherichia coli* (kmen TOP10), u kterých po styku s koncentrovaným roztokem chloridu vápenatého dojde k narušení buňky. *E. coli* byly napipetovány zastřihnutou špičkou (čím je prostor pro buňku užší, tím více se ničí). Klonování probíhalo za pomocí TOPO TA Cloning kitu. Do zkumavky se 4 µl PCR produktu byl přidán 1 µl roztoku Salt a 1 µl TOPO vektoru, vše promícháme špičkou. Reakce je opět míchána na ledu. Poté jsme nechaly 5 minut inkubovat při pokojové teplotě (22-23 °C). Ke kompetentním buňkám bylo přimíchány 2 µl směsi, čímž se buňky stávají geneticky modifikovanými. Musí do sebe zakomponovat vektor, pokud k tomu nedojde, nepřežijí. Poté byly buňky inkubované na ledu po dobu 10 minut a přesunuty do předem připravené vodní lázně se 42 °C na 30 sekund. To buňkám způsobilo teplotní šok. Po zahřátí začnou buňky opravovat díry v buněčné stěně, přivedou buňku k životu a vrátí jí do normálu. Po vodní lázni buňky ihned vrátíme na led. Po přidání 250 µl SOC (Super Optimal broth with Catabolite repression) media se daly zkumavky třepat na 1 hodinu.

Kontrolní PCR

Byl namíchán produkt PCR mastermix. Zkumavky byly řádně popsány a následně do nich bylo napipetováno 1,25 µl 10x Taq Bufferu complete, 1 µl dNTP, 0,5 µl M13F 5' primeru, 0,5 µl M13R 3' primeru, 0,5 µl polymerázy a 7,25 µl H2O.

Izolace plasmidu

Izolace plasmidu se prováděla pomocí kitu (GeneAll Hybrid ï Q Plasmid 200 p). Po odebrání 750 µl kultury, která byla zcentrifugována na 5 min na 10 000 otáček. Roztok byl vylit nejvíce jak byl možné a na spodu zůstaly usazené buňky. Mikrozkumavky byly znovu naplněny stejným množstvím a stočeny stejným způsobem, pak bylo médium opět vylito. Poté bylo přidáno dobře promíchaného 150 µl Bufferu S1, 250 µl Bufferu S2 se kterým se musí pracovat rychle (je to zásada, která dokáže snadno poleptat), maximálně 5 minut (pracujeme maximálně s 5 vzorky, aby nebyla velká časová prodleva). Následně bylo přidáno 350 µl Bufferu G3, promícháno a stočeno na 10 minut při stejných otáčkách. Poté byl zbytek přelit do kolonek s filtrem (zbytek nesklepáváme), stočen na 30 sekund a přebytek byl vylit. Pak bylo přidáno 500 µl Buffru AW, který byl přidán na kolonky s filtrem a stočen na 30 sekund, přebytek byl vylit a bylo přidáno 700 µl Bufferu PW, opět stočeno na 30 sekund (2x kvůli většímu množství), přebytek vylit a pak bylo opatrně napipetováno 50 µl H2O na membránu. Po posledním kroku následovala centrifugace po dobu 1 minuty. Výtěžek byl v sedimentu zkumavky.

Oļkování na Petriho misky

Pro kaģdý vzorek byly pŚipraveny 2 misky s LB agarem. Na 1. misku bylo naneseno 50 µl vzorku, na 2. misku 250 µl vzorku (kvŢli velkému mnoģství vzorku, které se nevsakovalo do agaru byl pomĎr upraven na 100 µl a 200 µl). Vzorek byl opatrnĎ rozetŚen sterilní hokejkou, aby doģlo k úplnému vsáknutí do agaru. Misky byly uloģeny do termostatu pŚes noc, ve kterém byla teplota 37 °C.

Dalģí den byly misky prohlídnuty a zkontrolovány kvŢli nárŢstu kolonií a následnĎ zakrouģkovány podle uváģení pro vhodný výbĎr. Do kaģdé 1,5 µl zkumavky bylo rozpipetováno 30 µl H_2O. Následovalo vypíchnutí zakrouģkovaných kolonií pomocí ģpiļky z plotny, které byly spolu se ģpiļkou pŚeneseny do zkumavky s H_2O. Zkumavky se daly tŚepat po dobu 10 minut pŚi teplotĎ 37 °C.

Mezitím byl namíchán produkt PCR mastermix. Do kaģdého stripu bylo rozdĎleno 11 µl PCR produktu a 2 µl bunĎļné suspenze z tŚepaļky (v tomto kroku byla pouģita ta ģpiļka, která zŢstala ve zkumavce a byla vytŚepána. Pro tyto vzorky byl na cycleru nastaven program SCREEN pro celkové mnoģství 13 µl. PŚebyteļná suspenze byla uloģena do lednilļky pro pozdĎjģí pouģití.

Po provedení PCR screeningu byl namnoģen plasmid. Plasmid byl izolován prostŚednictvím. 750 µl bylo promícháno pipetou a pŚevedeno do eppendorfky. Poté se dalo stoļit na 5 minut pŚi 10 000/otáļkách. Roztok byl vylit. Zkumavky byly znovu naplnĎny 750 µl, stoļeny stejným zpŢsobem a opĎt vylity. Následovala izolace.

Spektofotometrie

Posledním krokem bylo mĚŚení koncentrace DNA spektrofotometrem. V kaģdé mikrozkumavce bylo 95µl H_2O, 5 µl vzorku (+ 1 blanc ï kontrola). Vzorek byl promíchán a mĚŚen ve spektofotometru na program Photometic o ∂ 260 nm.

Tab. 5 Vzorky mČřené spektrofotometrem

Kód hostitele	Číslo vzorku	ABS	Vzorky na osekvenování
C 315	1I	368	A 9 A 10
	1 J	380	A 11 A 12
	1 K	398	A 13 A 14
	3 H	425	A 15 A 16
C 232	3 CH	381	A 17 A 18
	3 I	362	A 19 A 20

Vzorky s primery byly dále poslány na sekvenaci firmČ Seqme. Kaťdá eppendorfka obsahovala mnoťství 3,5 µl H_2O a 1,5 µl vzorku.

Zpracování sekvencí, fylogenetická analýza

Po amplifikační reakci s novČ navrťenými primery (Des 223F + Des 2200R), zaklonování PCR produktŢ do kompetentních bunČk, byly získány 2 sekvence. ObČ sekvence pocházejí z jednoho jedince (C186), na kterém bylo mikroskopicky zjiťtČno 26 jedincŢ parazita. Jedná se o rejnoka *Amblyraja radiata* s kódem F644. Výsledné sekvence byly porovnány s databází GenBank pomocí BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) se sekvencemi z databáze NCBI (National Center of Biotechnology Information).

10. Výsledky

Pozitivita krevních parazitů byla identifikována na krevních roztěrech 30 vzorků z celkového počtu 157. V tabulce č.1 je možné vyhledat přehled vyšetřovaných ryb/paryb a počet vyšetřovaných vzorků mikroskopem. Paraziti se vyskytovali zejména u rejnoka *Amblyraja radiata*. Pozitivita byla také nalezena u *Myoxocephalus scorpius*, ale v mnohem menší míře. Výhradně se jednalo o parazity vnitrobuněčné, které se nacházejí uvnitř erytrocytárních buněk.

Z celkového počtu vyšetřených 21 rejnoků *Amblyraja radiata* jich bylo 19 pozitivních. Na každém z roztěrů se nacházelo od 1 až po 79 parazitů (průměr 24). Procentuální zastoupení vyskytujících se parazitů dosahuje na 90 %.

Dále byly pozitivní vzorky ryb *Myoxocephalus scorpius*, a to konkrétně u 11 ryb (průměr 3,6) z celkového počtu 68 krevních roztěrů. Procentuální zastoupení u vyskytujících se parazitů dosahuje na 16 %.

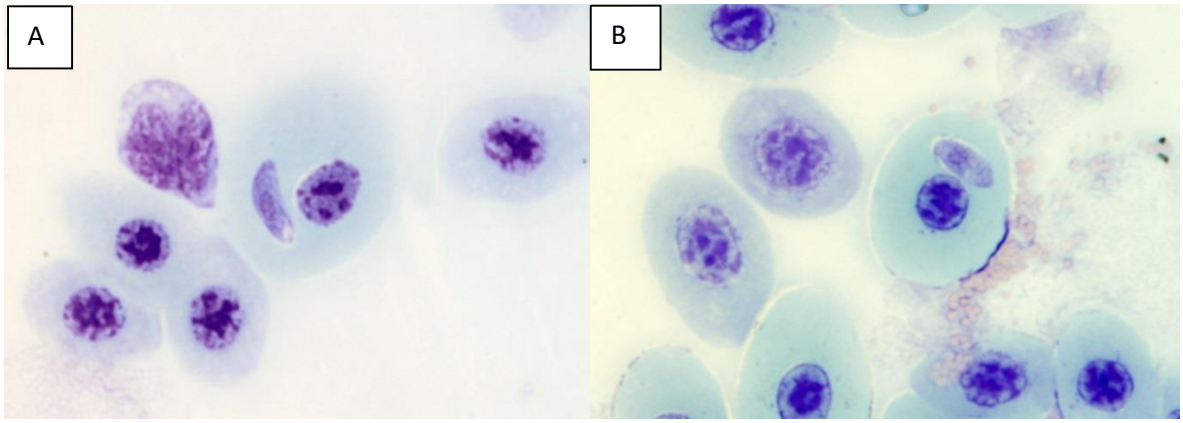
Vždy se počet parazitů vztahuje k jednomu jedinci obarvenému a následně prohlíženému na krevnímu roztěru.

U ostatních roztěrů nebyl žádný parazit prokázán.

Tab. 6 Intenzita infekce u vzorků

Kód hostitele	Název hostitele	Počet nalezených parazitů
F 456	*Amblyraja radiata*	12
F 524	*A. radiata*	15
F 525	*A. radiata*	33
F 526	*A. radiata*	1
F 537	*A. radiata*	37
F 538	*A. radiata*	2
F 559	*A. radiata*	17
F 596	*A. radiata*	23
F 607	*A. radiata*	32
F 608	*A. radiata*	23
F 609	*A. radiata*	39
F 637	*A. radiata*	35
F 642	*A. radiata*	50
F 643	*A. radiata*	79

F 644	*A. radiata*	26
F 647	*A. radiata*	14
F 649	*A. radiata*	4
F 652	*A. radiata*	1
F654	*A. radiata*	13
F 80	*Myoxocephalus scorpius*	13
F 82	*M. scorpius*	2
F 101	*M. scorpius*	3
F 117	*M. scorpius*	1
F 118	*M. scorpius*	2
F 183	*M. scorpius*	1
F 185	*M. scorpius*	1
F 374	*M. scorpius*	6
F 599	*M. scorpius*	1
F 602	*M. scorpius*	2
F 623	*M. scorpius*	7



Obr. 9 A a Bmikroskopický nález gamontŢ haemogregarin na krevním nátČru *Amblyraja radiata*

V erytrocytárních buŘkách infikovaných ryb/paryb se nacházely gamonty zaobleny do ļervovitého tvaru. NČkdy se tvary gamontŢ nepatrnČ liğily (nČkteré byly na konci více zaoblené, jiné zase na konci tvoŚily ģpiļku, nebo byly gamonty více kulaté, jindy se tŚeba více zuģovaly uprostŚed ļi na koncích). VČtšinou byly gamonty nalezeny blíže k jádru, v jiných pŚípadech byly zase vytlaļovány ven z buŘky. BuĻ obepínaly jádro, nebo se odklánČly smČrem od jádra erytrocytu. Erytrocytární buŘky infikované parazitem nijak nezmČnily svŢj tvar a zachovaly si stejnou velikost jako erytrocyty neinfikované.

Naměřené rozměry gamontů hemogregarin z jedince F560 *Amblyraja radiata*. Rozměry gamontů se liší délkou, a to od nejmenších 4,9 µm do největších 7,5 µm (průměr = 6,9; medián: 7,3), dále také mělo gamonty rozlišnou šířku, a to od nejmenších 16,1 µm k největším 21,9 µm (průměr = 18,6; medián: 18).

19,8 x 7,3 µm

16,1 x 7,5 µm

20,3 x 4,9 µm

21,9 x 7,2 µm

17,9 x 7,4 µm

18,2 x 6,9 µm

16,8 x 6,6 µm

17,8 x 7,5 µm

17,2 x 7,4 µm

20,4 x 6,4 µm

Na základě morfologie a rozměrů parazita v napadené buňce byl parazit identifikován jako *Haemogregarina delagei*.

Izolace DNA produktu

Nejdříve byla provedena amplifikační reakce PCR s použitím několika různých kombinací primerů (Des233F, Des2200R, Erib1, Erib 10, EimF, EimR). Při snaze získat sekvenci pozitivních výsledků různými kombinacemi primerů, amplifikačními reakcemi, zaklonováním PCR produktů do kompetentních buněk, byly získány dvě sekvence (pomocí klonování, kdy pro tuto reakci byly použity primery Des233F + Des2200R).

Obě sekvence pocházejí ze vzorku DNA C186, což je jedinec F644 rejnoka *Amblyraja radiata*. Osekvenovány byly 2 klony, výsledné sekvence (bez primerů) mají délku 1360 a 1361 bp.

Tab. 7 Výsledek porovnání sekvencí s databází GenBank pomocí BLASTu (uvedená procenta platí pro Pairwise Identity)

HQ224957	*Dactylosoma ranarum*	91,1 %
HQ224958	*Dactylosoma ranarum*	91,1 %
HQ224961	*Babesiosoma stableri*	90,9 %
KF992714	*Hemolivia* sp. ex *Rhinochlemmys pulcherrima*	90,2 %

Došlo k porovnání získané sekvence s databází GenBank pomocí BLASTu a následně byla potvrzena přítomnost parazita.

Tab. 8 Identita shody mezi sekvencemi vyjádřená v procentech

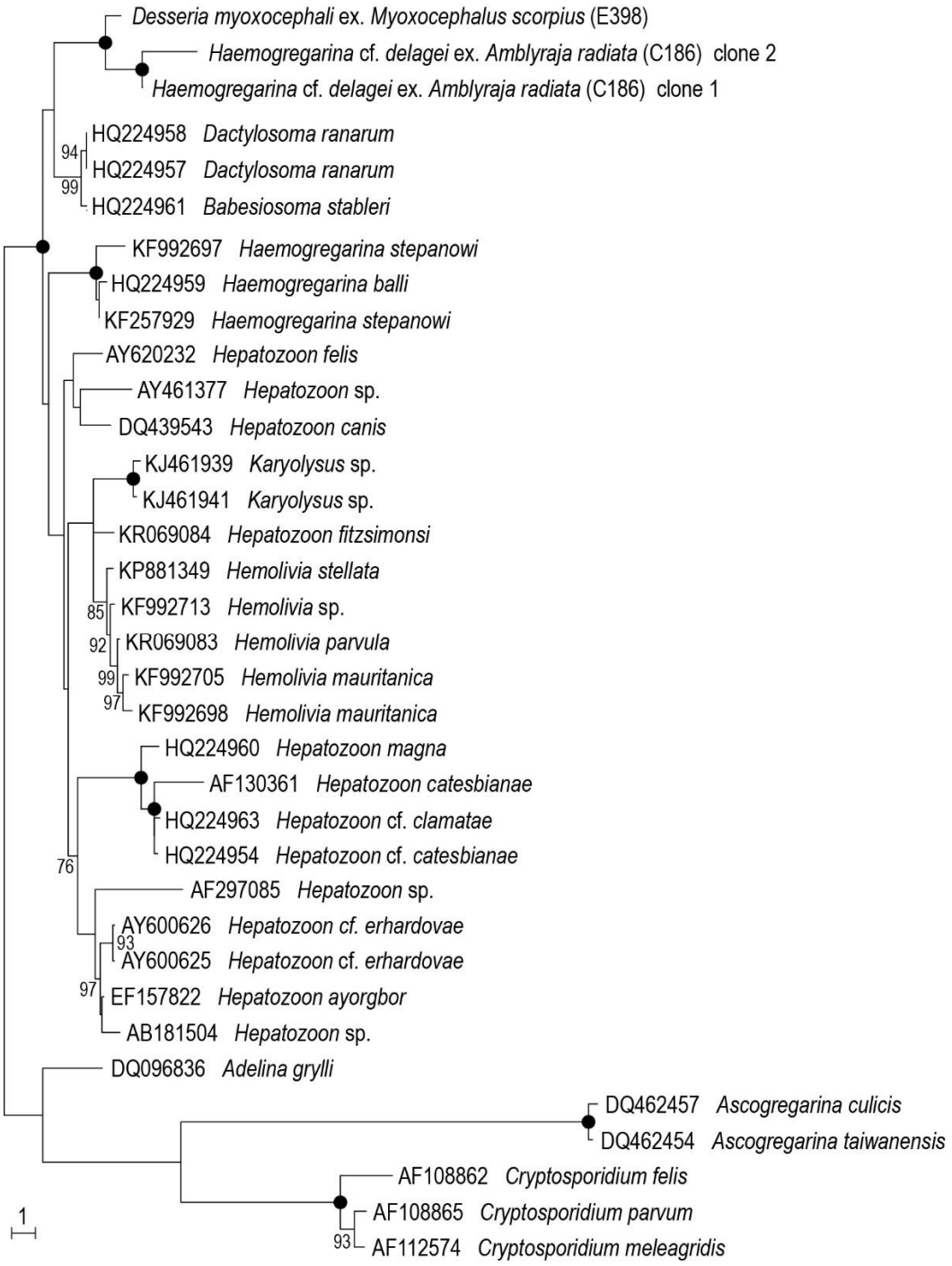
	C186 Amblyr...	C186 Amblyr...	E398 Myoxo...	HQ224957	HQ224958	HQ224961 2
C186 Amblyraja radiata clo...		97.553%	96.234%	94.021%	94.064%	93.928%
C186 Amblyraja radiata clo...	97.553%		97.872%	95.404%	95.447%	95.333%
E398 Myoxocephalus scorp...	96.234%	97.872%		96.000%	96.043%	95.938%
HQ224957	94.021%	95.404%	96.000%		99.787%	99.480%
HQ224958	94.064%	95.447%	96.043%	99.787%		99.523%
HQ224961 2	93.928%	95.333%	95.938%	99.480%	99.523%	

Tab. 9 Identita vyjádřená v počtu odlišných bází

	C186 Amblyr...	C186 Amblyr...	E398 Myoxo...	HQ224957	HQ224958	HQ224961 2
C186 Amblyraja radiata clo...		29	45	71	73	71
C186 Amblyraja radiata clo...	29		26	55	57	55
E398 Myoxocephalus scorp...	45	26		47	49	47
HQ224957	71	55	47		5	6
HQ224958	73	57	49	5		8
HQ224961 2	71	55	47	6	8	

2 klony Haemogregarina delagei z rejnoka *Amblyraja radiata* je na společné větvi s *Desseria myoxocephali* z vranky *Myoxocephalus scorpius*, dále s HQ224957 *Dactylosoma ranarum*, HQ224958 *Dactylosoma ranarum* a s HQ224961 *Babesiosoma stebleri*. Protože ostatní haemogregariny (*H. stepanowi a H. balli*) vyšly na jiné větvi, je otázkou, zda je haemogregarina monofyletický rod.

Fylogenetická analýza



Obr. 10 Fylogenetická rekonstrukce na základě srovnávání sekvencí 18S rDNA metodou maximální věrohodnosti. Přístupová čísla sekvencí (NCBI databáze) jsou uvedena před názvy taxonů. Sekvence *Desseria myoxocephali* pochází z Pospíšilová (2015). *Ascogregarina* spp. a Cryptosporidium spp. slouží jako outgroup. Bootstrapové podpory jsou zobrazeny u jednotlivých uzlů, pokud byly vyšší než 70 %. Uzel zvýrazněný černým bodem dosahoval 100 %.

11.Diskuse

Prevalence *Haemogregarina delagei* mŢġe být ovlivnŊna geografickým výskytem a hostitelskými druhy tŊchto parazitŢ. VŊtġí výskyt se prokázal v Passamaquoddy Bay, menġí pak u rejnokŢ v severním Atlantiku, coġ ale autoŚi vysvŊtlují rŢznými hostitelskými druhy (Khan et al., 1980). NejvŊtġí prevalence (75 %) *H. delagei* byl zaznamenán v Newfoundlandských vodách, pŚeváġnŊ u rejnokŢ *Amblyraja radiata* (Khan et al., 1980). Mimo to ale byli tito paraziti objeveni i v extrémních vodních prostŚedích jako je Antarktida, Jiġní oceán a Severní ledový oceán, tudíġ výskyt na Svalbardu není vylouļen (Khan et al., 1992; Davies and Merrett, 2000).

Ve vzorcích krve byly nalezeny haemogregariny, které rejnoky ļasto infikují. Prevalence *Haemogregarina delagei* u rejnokŢ se rŢznŊ liġí podle sezóny a dosahuje aġ 90 %. PŚevaha infekce *H. delagei* u rejnokŢ se liġí podle rŢzných hostitelských druhŢ. (Siddall, Desser, 2001). Prevalence *H. delagei* u tŊchto zkoumaných rejnokŢ *A. radiata* ze Svalbardu, které jsem vyġetŚovala, je 90, 48 % a shoduje se s výsledkem prevalence u Siddalla a Dessera (2001).

Rod *Haemogregarina* je charakterizován intraerytrocytární merogonií v rybím/parybím hostiteli (Barta, 2000; Davies and Smit, 2001). Merogonie a gamogonie probíhají v mezihostitelích obratlovcŢ a sporogonie a merogonie probíhají v bezobratlých (napŚíklad v pijavce) definitivním hostiteli (Davies, 1995). Vzhledem k tomu, ġe jsem merogonii nepozorovala, je moġné, ġe se objevuje v krvi rejnokŢ jen výhradnŊ v nŊkterých mŊsících. NapŚíklad Khan (1972) pozoroval merogonii v krvi rejnokŢ výhradnŊ jen v listopadu. BŊhem pozorování merogonie bylo zjiġtŊno, ġe k pŚenosu *H. delagei* dochází na konci rozmnoġování rejnokŢ, coġ je na podzim (Khan, 1972). To by vysvŊtlovalo absenci merogonie u zkoumaných vzorkŢ, jelikoġ vzorky krve byly odebírány na Svalbardu v letních mŊsících.

PŚi mikroskopické diagnostice roztŊrŢ bylo na jednom z nich nalezeno 79 jedincŢ parazita, coġ byl vzorek s nejvŊtġím poļtem parazita nalezených u *A. radiata*. Otázkou je, zda se v tŊchto výsledcích opravdu jedná o parazita *H. delagei*, protoġe v buŔkách byly nalezeny pouze gamonty (chybí merogonie). Podle obrázku ļ. 8, kde jsou znázornŊná vývojová stádia *Haemogregarina delagei* pod mikroskopem, mŢġeme porovnat obrázek ļ. 9, kde jsou znázornŊni pozorovaní paraziti mikroskopem. Zatímco u obrázku ļ. 8 mŢġeme sledovat schizonty, merozoity a gametocyty (Khan, 1971), v pŚípadŊ obrázku ļ. 9 vidíme pouze gamonty uvnitŚerytrocytŢ. V obou pŚípadech se na krevních nátŊrech objevují zaoblené nebo ļervíkovité tvary intracelulárních organismŢ stejnŊ tak, jak popisoval *Haemogregarine delagei* i Daviess (1995).

Rodové zařazení parazita *Haemogregarina bigemina* bylo v některých případech taktéž zpochybňováno (Laveran and Mesnil, 1901). Ve svém typovém hostiteli a jiných rybách *H. bigemina* podstoupil intraerytrocytárním binárnímu dělení, a nakonec se vytvořily zralé spárované gamonty (Davies et al., 1995). Intraleukocytární fáze je sice také vykazována, ale ne u těchto typů hostitelů (Davies et al., 2004). Některé haemogregariny jsou přenášeny pijavkami (Davies et al., 2004). Ovšem tam, kde byla studována rybí populace nakažená parazitem *H. bigemina*, tam kroužkovci nalezeni nebyli. Krevsající larvy stejnonožců čeledi Gnathiidae se vyskytovaly na těchto rybách, a tudíž mohly být snadno infikovány (Davies, 2004). Je známo, že infekci lze detekovat i u velmi mladých příbřežních ryb měřící pod 4 cm (Laird et al., 1953). Podle Daviese a Johnstona (1987) vertikální nebo fekálně-orální přenos byl u takto malých ryb vyloučen (Davies et al., 2004). Vektorem jsou tedy pijavky nebo larvy stejnonožce, které se chovají stejně jako klíšťata (Smit, 2003).

Nalezené haemogregariny v rejnocích byly molekulárně charakterizovány. Byly vyzkoušeny různé kombinace primerů, protože žádné specifické primery pro rybí/parybí haemogregariy neexistují. Jedním z problémů mohlo být to, že použité primery byly navržené pro plazí či ptačí haemogregariny, proto nikdy neseděly na parybí. Primery Des233F a Des2200R se osvědčily pro PCR nejvíce a pomocí molekulárního klonování se podařilo získat dvě sekvence. Lze je tedy doporučit pro další práci s tímto materiálem.

Z fylogenetické analýzy vyplývá, že *Haemogergarina delagei* je nejvíce příbuzná k *Desseria myoxocephali* (hostitelem vranka *Myoxocephalus scorpius*, jelikož k ní vyšla jako sestreská skupina. Dále také k *Dactylosoma ranarum (*hostitelem žába) a *Babesiosoma stableri* (hostitelem pijavka *Batracobdella picta*). Ostatní haemogregariny (*H. stepanowi* hostitelem pijavka, *H. balli* hostitelem pijavka) jsou na jiné větvi. Podle naší analýzy je roh haemogregarina polyletický. Důvodem příbuznosti může být také vektor, kterým je v těchto případech pijavka. Jinde haemogregarina podporuje dříve vyslovenou hypotézu, že haemogregariny jsou polyfyletické. Tento úkaz by měl být zrevidovaný.

Budoucím cílem by mělo být molekulárně-fylogenetické srovnání *H. delagei* z různých lokalit a hostitelů, zda jsou všichni zástupci stejného druhu. Dále je také důležité se zaměřit v oblasti výzkumu na přenašeče těchto parazitů. Bylo by dobré potvrdit přenos pijavkami jak molekulárně, tak i mikroskopicky. Podobně jako haemogregariny i popis ostatních rodů z této skupiny je založen na podrobnostech jejich životního cyklu a morfologii. Protože přibývají údaje o jejich genetické struktuře, lze čeká tuto skupinu výrazná revize, která by zahrnovala data.

12. Závěry

Celkem bylo vyšetřeno na krevních parazitech 157 jedinců z ryb a paryb. Materiál byl odebrán v roce 2015 na souostroví Svalbard.

- Celkem bylo pouze 30 pozitivních krevních nátěrů, a to u rejnoka *Amblyraja radiata* a ryby *Myoxocephalus scorpius*.
- U krevních nátěrů z rejnoka *Amblyraja radiata* bylo nalezeno 19 pozitivních jedinců, prevalance 90 %. U vranky *Myoxocephalus scorpius* bylo nalezeno 11 pozitivních jedinců parazita, prevalence 16 %.
- Ve všech případech se jednalo o intracelulární zástupce skupiny Apicomplexa, konkrétně druhu *Haemogregarina delagei* (Adeleorina).
- Vhodnými a úspěšnými primery pro tuto metodu, se kterými jsem pracovala byly Des233F, Des2200R v kombinace s Erib1 a Erib10.
- Částečná shoda byla nalezena s parazity skupiny Adeleorina.

13.Literatura

BARTA J.R., MARTIN D.S., LIBERATOR P.A., DASHKEVICZ M., ANDERSON J.W., FEIGHNER S.D., ELBRECHT A., PERKINSON-BARROW A., JENKINS M.C., DANFORTH H.H., RUFF M.D., PROFOUS-JUCHELKA H., 1997. Phylogenetic relationship among eight *Eimeria* species infecting domestic fowl inferred using complete small subunit risobomal DNA sequences. *Journal of Parasitology*. 83, 262-271.

BARTA J.R., 2000. Suborder Adeleorina Léger. 1911. In: LEE J.J., LEESDALE G.F., BRADBURY P. (Eds.), Kansas: *The Illustrated Guide to the Protozoa*. Vol. I, Second Edition. Allen Press, Lawrence, pp. 305-318

COMPAGNO L.J.V., 1984. An annotated and ilustrated catalogue of sharks species known to date, pt. 1: Haxanchiformes to Lamniformes. In: *FAO species Catalogue of the world*. Vol 4. *Sharks of the world FAO Fish Synop*. 1-249 pp.COMPAGNO L.J.V., 2001. *Sharks of the World*. 2. vydání. Italy. Spec. Catalogue for Fishery Purposes. 249 p. ISBN 92-5-1045-43-7.

COWMAN, A.F., CRABB, B.S., 2006. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Science direct.* 124, 755-766, doi: 10.1016/j.cell.2006.02.006

DAVIS H.S., HOFFMAN G.L., SURBER E.W., 1961. Notes on *Sanguinicola Davisi* (Trematoda: Sanguinicolidae) In the Gills of Trout. *The Journal of parasitology.* 47, 512-514.

DAVIES A.J., EIRAS J.C., AUSTIN R.T.E., 1994. Investigations into the transmission of Haemogregarina bigemina Laveran and Mesnil, 1901 (Apicomplexa: Adeleorina) between intertidal fishes in Portugal. *Journal Fish Diseases*. 17, 283-289.

DAVIES A.J., 1995. The biology of fish haemogregarines. *Advances i Parasitology*. 36, 117-203, doi: 10.1016/S0065-308X(O8)60491-1

DAVIES A.J., SMIT N.J., 2001. The life cycle of *Haemogregarina bigemina* (Adeleina:Haemogregarinidae) in South African hosts. *Folia Parasitologica.* 48, 169-177

DEAN M.N., SUMMERS A.P., 2006. Mineralized cartilage in the skeleton of chondrichthyan fishes. *Zoology*. 109, 164-168.

DIDIER D.A., KEMPER J.M., EBERT D.A., 2012. Phylogeny, biology and Classification of Extant Holocephalans. *Biology of sharks and their relatives*. 4, 97-122

DOLGOV A.V., DREVETNYAK K.V., GUSEV E.V., 2005. Status of Skate Stocks in the Barents Sea. *Journal North. Atl. Fish. Sci*, 35, 249-260. doi:10.2960/J.v35.m522

EBERT D.E., BIZZARO J.J., 2007, Standardized diet compositions and trophic levels of skates (Chondrichthyes: Rajiformes: Rajoidei). *Environmental Biology fish*. 80, 22-237, doi: 0.1007/s10641-007-9227-4

EIRAS J.C., SEGNER H., WAHLI T., KAPPOR G.B., 2009. Fish diseases. *BioMed Central*. 2, 46. doi: 10.1186/1756-3305-2-46.

GALLANT J., CLARK C.H., MYERS R.A., STOKESBURY M.J.W., 2006. Sea Lamprey Attached to a Greenland Shark in the St. Lawrence Estuary, Canada. *Northeastern Naturalist*. 13, 35-38.

GARCÍA V.B., LUCIFORA L.O., MYERS R.A., 2008. The importance of habitant and life history to extinction risk in sharks, skates, rays and chimaeras. *Proc. R. Soc. B.* 275, 83-89. doi: 10.1098/rspb.2007.1295

GOSSAGE S.M., ROGERS M.E., BATES P.A., 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International Journal Parasitology*. 33,1027-1034.

GRYDEHØJ A., GRYDEHØJ A., ACKRÉN M., 2012. The Globalization of the Arctic: Negotiating Sovereignty and Building Communities in Svalbard, Norway. *Island Studies Journal*. 7, 99-118.

GRYSELS B., POLMAN K., CLERINX J., KESTENS L., 2006. Human schistosomiasis. *Lancet*. 368, 1106-1118.

HAGEN J.O., LIESTØL O., ROLAND E., JØRGENSEN T., 1993. *Glacier Atlas of Svalbard and Jan Mayer*. Oslo*:* Meddelelser Nr. *129*., 143 p. ISBN 82-7666-066-5

HAMLETT W.C., 1999. *Sharks, skates and rays*. USA: The biology of Elasmobranch fishes. 491 p. ISBN ï 0-8018-6048-2

HAYES P.M., SMIT N.J., SEDDON A.M., WERTHEIM D.F., DAVIES A.J., 2006. A new fish haemogregarine from South Africa and its suspected dual transmission with trypanosomes by a marine leech. *Folia Parasitologia*. 5, 241-248. doi: 10.14411/fp.2006.031

HAYES P.M., WERTHEIM D.F., SMITH N.J., SEDDON A.M., DAVIES A.J., 2011. Tree ï dimensional vosialisation of developmental stages of an apicomplexan fish blood parasites in its invertebrae host. *Parasites and Vectors*. 4, 21.

HEINICKE M.P., NAYLOR G.J.P., HEDGES S.P., 2009. Cartilaginous fishes (chondrichthyes) in the time of life S. B. Hedges and S. Kumar, Eds. *Oxford Biology*. 320-327.

HISDAL V., 1998. *Svalbard Nature and History*. Oslo: POLARHÅNDBOK 12., 127 p. ISBN 82-7666-152-1

HUSSEY N.E., GODIN A.C., WALTER R.P., HEDGES K.J., TOYNE M.G, BARKLEY A.N., KESSEL S.T., FISK A.T., 2014. Juvenile Greenland sharks *Somniosus microcephalus* (Bloch & Schneider, 1801) in the Canadian Arctic. *Polar Biology*. 1-12. doi: 10.1007/s00300-014-1610-y.

CHEVOLOT M., WOLFS P.H.J., PÁLSSON J., RIJNSDORP A.D., STAM W.T., OLSEN J.T., 2007. Population structure and historical demography of the thorny skate (Amblyraja radiata, Rajidae) in the North Atlantic. *Marine Biology*. 151, 1275-1286. doi: 0.1007/s00227-006-0556-1

JAMES W.W., 1953. The Succesion of teeth in elasmobranchs. Journal of Zoology. 123, 419-474. doi: 10.1111/j.1096-3642.1953.tb00183.x

JAVANBAKHT H., SHARIFI M., 2014. Prevalence and intensity of *Haemogregarina stepanowi* (Apicomplexa: Haemogregarinidae) in two species of freshwater turtles (*Mauremys caspica* and *Emys orbicularis*) in Iran. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 2, 155-158. ISSN: 2320- 7078.

KHAN R.A., 1972. Developmental stages of haemogregarina delagei Laveran and Mesil in an elasmobranch, Raja radiata Donovan. *Canadian Journal of Zoology*. 50, 906-907. doi: 10.1139/z72-122.

KHAN R.A., FORRESTER D.J., GOODWIN T.M., ROSS C.A., 1980. A haemogregarine from the American aligator (*Alligator mississippienis*). *The Journal of Parasitology*. 66, 324-328.

KIRK R.S., LEWIS J.W., 1993. The life-cycle and morphology of *Sanguinicola inermis* Plehn (Digenea: Sanguinicolidae). *Systematic Parasitology*. 25, 125

KIRMSE P., 1980. Observations on the pathogenicity of *Haemogregarina sachai* Kirmse, 1978, in farmed turbot *Scophthalmus maximus* (L.) Journal of fish diseases 3, 125-133. doi: 10.1007/BF00009982

KOTRSCHAL K., STAADEN M.V.J., HUBER R., 1998. Fish Brains: Evolution and Anvironmental relationships. 8, 373-408. doi: 10.1023/A:1008839605380

KVÍĻEROVÁ J., PAKANDL M., HYPĠA V., 2008. Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: Evolutionary significance of biological and morphological features. *Parasitology*. 135, 443-452.

UBREIT A., 2009. *Spitsbergen Svalbard Franz Josef Land and Josef Mayer*. USA: The Bradt Travel Guide. 4, 218 p. ISBN 13:978-1-84162-240-8.

LAIRD M., 1953. The protozoa of New Zeland intertidal zone fishes. *Trans. R. Soc. New Zeland*. 81, 79-143.

LAVERAN A., MESNIL F., 1901. Deux hémogregarines nouvelles des poissons. *C.R. Academy Science Paris.* 133, 572-577.

LECLERS L.M.E., LYDERSEN C., HAUG T., BACHMANN L., FISK A.T., KOVACS K.M., 2012. A missing piece in the Arctic food web puzzle? Stomach contents of Greenland sharks sampled in Svalbard, Norway. *Polar Biology.* 35, 1197-1208. doi: 10.1007/s00300-012-1166-7.

LINGHAMMAR A., 2014. Identification Guide for Skates (Chondrychthies; Rajiformes) in Norwegian waters, for both sexes and all stadiums. Identification Guide for Skates in Norwegian Waters. 8, 3-8.

LONG D.J., 1994. Quaternary colonization of peleogene persistence? Historical biogeography of skates (Chondrychthies Rajidae) in the Antartic Ichthyofauna. *Paleobiology*. 20, 215-228.

LYNHAMMAR A., CHRISTIANSES J.S., MECKLENBURG C.W., KARAMUSHKO O.V., MOLLER P.R., GALLUCCI V.F., 2013. Species richness and distribution of Choyndrychtian fishes in the Arctic ocean and adjecent seas. *Journal Biodiversity*. 14, 57-66. doi: 10.1080/14888386.2012.706198.

MACNEIL M.A., MCMANS B.C., HUSSEY N.E., VESCEI P., SVAVARSOON J., KOVACS K.M., LYDERSEN C., TREBLE M.A., SKOMAL G.B., RYMSEY M., FISK A.T., 2012. Biology of the Greenland shark *Somniosus microcephalus*. *Journal Fish Biology*. 80, 991-1018. doi: 10.1111/j.1095-8649.2012.03257.

MECKLENBURG C.W., MECKLENBURG C.W., THORNSTEINSTON L.K., 2002. *Fishes of Alaska.* American Fisheries Society: Bethesda. ISBN 1-888569-07-7, 1037 p.

MERRETT N.G., HAEDRICH R.L., 1997. *Deep-sea demersal fish and fisheries.* UK: Champan and Hall. 253 p. ISBN 0-412-39410-3.

MILON G., 2009. Perpetuation of *Leishmania*: some novel insight into elegant developmental programs. *Journal of Animal Infection.* 40, 38-48. doi: 10.1051/vetres/2009021

MORRISON D.A., 2009. Evolution of the Apicomplexa: where are we now? *Trends Parasitology*. 25, 82-375. doi: 10.1016/j.pt.2009.05.010.

MORRISSETTE N.S., SIBLEY L.D., 2002. Cytosleketon of Apicomplxa Parasites. *Microb. Molec. Biol. Rev.* 66, 21-38.

MURRAY H.W., BERMAN J.D., DAVIES C.R., SARAVIA N.G., 2005. Advances in leishmaniasis. *The Lancet.* 366, 1561-1577. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67629-5.

MØLLE I., CHRISTENSEN K.L., HANSEN P.S., DRAGSTED U.B., AARUP M., BUHL M.R., 2000. Use of Medical Chemoprophylaxis and Antimosquito Precautions in Danish Malaria Patients and their Traveling Companions. *Journal of Travel Medicine*. 7, 253-258. doi: 10.2310/7060.2000.00074

NIELSEN J., HEDEHOLM R.B., MALENE S., STEFFENSEN J.F., 2014. Distribution and feeding ecology of the Greenland shark (*Somniosus microcephalus*) in Greenland waters, *Polar Biology*. 37, 37-46. doi: 10.1007/s00300-013-1408-3.

NIELSEN J., HEDEHOLM R.B., HEINEMEIER J., BUSHNELL P.G., CHRISTIANSEN J.S., OLSEN J., RAMSEZ C.R., BRILL R.W., SIMON M., STEFFENSEN K.F., STEFFENSEN J.F., 2016. Eye lens radiocarbon reveals centuries of longevity in the Greenland shark (*Somniosus microcephalus*). *Science* Long in the tooth, 400 year-old-shark in Arctic water 353, 702-704.

OVERATH P., HAAG J., MAMEZA M.G., LISCHKE A., 2009. Freshwater fish trypanosomes: definition of two types, host control by antibodies and lack of antigenic variation. *Search Parasitology*. 119, 59-601.

RØNNING O.I., 1996. *The flora of Svalbard*. *POLARHÅNDBOK* 10. Oslo: 5-184. ISBN 82-7666-100-9.

RYĠAVÝ B., ĻERNÁ Ģ., CHALUPSKÝ J., ORSZÁGH I., VOJTEK R., 1988. *Základy Parazitologie*. Praha: 7-204. ISNB 80-04-20864-9.

SIDDALL M.E., 1995. Phylogeny of adeleid blood parasites with a partial systematic reviion of the haemogregarine complex. *Journal Eucaryot. Microbiology.* 42, 116-125.

SIDDALL M.E., DESSER S.S., 1993. Ultrastructure of merogonie development of *Haemogregarina* (sensu lato) Myoxocephali (Apicomplexa: Adeleina) in the marine leech *Malmiana scorpii* and localization of infective stages in salivary glands. *Eur Journal Protistology*. 29, 191-201.

SIDDALL M.E., DESSER S.S., 2001. Developmental stages og *Haemogregarina delagei* in the leech *Oxytonostoma typica*. *Canadian Journal of Zoology*. 79, 1897-1900. doi: 10.1139/z01-136

SMIT N.J., VAN AS J.G., DAVIES A.J., 2003a. Taxonomic re-evaluation of the South African fish haemogregarine, *Desseria fragilis. Journal Parasitology*. 89, 151-153.

SMIT N.J., DAVIES A.J., 2005. Intraerytrocyt merogony in *Haemogregarina koppiensis* (Apicomplexa: Adeleorina: Haemogregarinidae). *Folia Parasitologica*. 52, 277-278.

SMITH T., SANDERS M., 2011. The Northwest Atlantic Distinct Population Segment (DPS) of the Thorny Skate (*Amblyraja radiata*) as an Endangered or Threatened Species or, Alternatively, to List the United States DPS of the Thorny Skate as an Endangered Species UNDER THEU.S. ENDANGERED SPECIES ACT. *Animal Welfare Institute.* 202, 1-20.

SULOWSKI J.A., KNEEBONE J., ELZEY S., JUREK J., DANLEY P.D., HOWELL W.H., TSANG C.W., TSANG P., 2005. Age and growth estimates of the thorny skate (*Amblyraja radiata*) in the western Gulf of Maine. *Biological Sciences Scholarship.* 103, 161-168.

SULOWSKI J.A., KNEEBONE J., ELZEY S., JUREK J., DANLEY P.D., HOWELL W.H., TSANG C.W., TSANG P., 2005. The reproductive cycle of the thorny skate (*Amblyraya radiata*) in the western Gulf of Maine. *Biological Sciences Scholarship.* 103, 536-543.

TELEFORD Jr. S.R., BUTLER J.F., TELEFORF R.S., 2002. HEpatozoon species (Apicomplexa: Hepatozoide) of the corn snake, *Elaphe guttata* (Serpentes: Colubridae) and pigmy rattlesnake, *Sisturus miliarius barbouri* (Serpentes: Viperidae) in south Florida. *Journal of Parasitology*. 88, 772-778.

TELEFORF Jr. S.R., ERNST J.A., CLARK A.M., BUTLER J.F., 2004. Hepatozoon sauritus: a polytopic hemogregarine of three genera and four species of snakes in norhern Florida, with specific identity verified from genome analysis. *Journal of Parasitology*. 90, 352-358.

TRAMPUS A., JEREB M., MUZLOVIC J., PRABHU R.M., 2003. Clinical review: Severe malaria. *BioMed Central, Critical care*. 7, 315-320. doi: 10.1186/cc2183.

VOLF P., HORÁK P., ĻEPIĻKA J., FLEGR J., LUKEĠ J., MIKEĠ L., SVOBODOVÁ M., VÁVRA J., VOTÝPJA J., 2007. *Paraziti a jejich biologie.* Praha 10: TRITON, 291 p. ISBN 978-807387-008-9.

WALES J.H., 1958. Two new blood fluke Parasites of trout. *California Fish and Game*. 44, 125-136.

WESLAWSKI J.M., PROMINSKA A., 2013. *European Arctic ï sea users guide.* Institute of Oceanology Polish Academy Of Sciences. Poland: Sopot.107 p. ISBN 978-83-928355-5-4.

YANO K., STEVENS J.D., COMPAGNO L.J.V., 2004. Review of the systematics of the sleeper shark genus *Somniosus (Somniosus)* with redescreption of *Somniosus (Somniosus) antarcticus* and *Somniosus (Rhinoscimnus) longus* (Sqaliformes, Somniosidae). *Ichthyological Research*. 51, 360-373.

YOPAK K.E., MONTGOMERY J.C., 2008. Brain Organization and Specialization in Deap-sea hondrichthyans. *Brain Behaviour Evolution*. 71, 287-304. doi: 10.1159/000127048.

URL:

URL 1: https://en.wikipedia.org/wiki/Svalbard#/media/File:Topographic_map_of_Svalbard.svg

URL 2: http://otlibrary.com/greenland-shark/

URL 3: http://www.elasmodiver.com/ThornySkate.htm

URL 4: http://maps.iucnredlist.org/map.html

URL 5: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144852/2/9789241564830_eng.pdf

14.Seznam zkratek

BLAST Basic Local Alingment Search Tool

DNA deoxyribonukleová kyselina

dNTP deoxynukleotid

EDTA ethylendiamintetraoctová kyselina a její soli

ELFO Elektoforéza

NCBI National Center of Biotechnology Information

PCR Polymerázová řetězová reakce

RNA Ribonukleová kyselina

SDS sodium dodecyl sulfát

SOC Super Optimal broth with Catabolite repression

TBE tris borát edta