

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Mikrosporidiální infekce akvarijských ryb se zaměřením na
*Pleistophora hyphessobryconis***

Bakalářská práce

Karolína Koláčná

Vedoucí práce: RNDr. Ivan Fiala, Ph.D.

České Budějovice, 2020

Koláčná K., (2020): Mikrosporidiální infekce akvarijských ryb se zaměřením na *Pleistophora hypheobryconis* [Microsporidial infection of aquaristic fish focused on *Pleistophora hypheobryconis*, Bc. Thesis, in Czech] - 46 pp., Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

One of the most common microsporidial species infecting fishes is *Pleistophora hypheobryconis* . The prevalence of microsporidial infection was screened. The infection in organs was detected by using microscopy and molecular methods. The results of PCR were sent to the synthesis and were checked in gene bank. All results were scribed to my bachelor thesis.

Prohlášení

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 – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 a 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

.....

Karolína Koláčná

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli Ivanu Fialovi za odborné vedení a pomoc, bez které by tato práce nemohla vzniknout. Děkuji mu, že si vždy našel čas na případné otázky a měl se mnou trpělivost. Velký dík patří také celému kolektivu laboratoře rybí protistologie parazitologického ústavu za cenné rady, zejména Haně Peckové a Martině Lisnerové.

Mnohokrát také děkuji svému externímu školiteli Peterovi Podhorcovi za pomoc s dodáváním rybiček. Také chci poděkovat své rodině, že vždy stáli při mně, i přesto, že jsem dle jejich názoru největší vrah na Světě, vzhledem k počtu zabitých rybiček v laboratoři. Stejně tak chci poděkovat svému partnerovi, že byl vždy nápomocný při tvoření této práce. Velký dík pochopitelně patří všem jedincům, kteří mi posloužili jako biologický materiál při pitvě.

Všem děkuji za trpělivost a podporu.

Obsah

1.	Úvod	7
1.1.	Mikrosporidie	7
1.1.1.	Taxonomie	7
1.1.2.	Fylogeneze.....	8
1.2.	Hostitelé mikrosporidií	12
1.2.1.	Mikrosporidie u ryb	12
1.2.2.	Mikrosporidie u savců	15
1.2.3.	Mikrosporidie u člověka	15
1.2.4.	Mikrosporidie u bezobratlých.....	16
2.	Cíle práce	17
3.	Materiál a metody	18
3.1.	Materiál.....	18
3.2.	Metody.....	18
3.2.1.	Světelná mikroskopie	18
3.2.2.	Izolace DNA	19
3.2.3.	PCR.....	21
3.2.4.	Gelová elektroforéza.....	23
3.2.5.	Extrakce gelu	24
3.2.6.	Příprava vzorků pro sekvenaci	25
3.2.7.	Sekvenace a fylogenetická analýza výsledků	25
4.	Výsledky	26
4.1.	Světelná mikroskopie	26
4.2.	Histologické vyšetření	29
4.3.	PCR diagnostika	30
4.4.	Sekvenace a fylogenetická analýza	33
5.	Diskuze	35
6.	Závěry	37
7.	Literatura	38

1. Úvod

1.1. Mikrosporidie

Mikrosporidie jsou eukaryotní intracelulární parazitické mikroorganismy, které bývaly považovány za Protista a řadily se do samostatného kmene Microspora (např. Weber et al. 1994). Jejich příbuznost k houbám byla prokázána molekulárně fylogenetickými studiemi na počátku 21. století (Peer et al. 2000, Keeling 2003). Tito obligátní vnitrobuněční paraziti postrádají mitochondrie a také peroxisomy. Dále u spor a intracelulárních stádií nenalezneme pravý Golgiho aparát, bičík nebo další mikrotubulární struktury. První mikrosporidie *Nosema bombycis* (Nägeli 1857) byla identifikována a popsána u housenky bource morušového v roce 1857. Jejich hostitelské spektrum je velmi pestré. Zahrnuje většinu skupin bezobratlých a všechny třídy obratlovců (Canning et Lom 1986). Dodnes bylo identifikováno téměř 1200 druhů mikrosporidií řazených do více než 150 rodů (Horák et Volf 2007).

Mikrosporidie jsou původce mnoha onemocnění ekonomicky významných druhů živočichů a působí i zdravotní komplikace u lidí. První případ onemocnění mikrosporidiozou u člověka byl zaznamenán v roce 1959 (Matsubayashi et al. 1959). Od devadesátých let se začala šířit pandemie syndromu získané imunitní nedostatečnosti, spojená s nemocí AIDS a stoupl tak počet lidí, kteří byli nakaženi mikrosporidiozou. Později byly mikrosporidie zařazeny mezi oportunní patogeny infikující jedince se sníženou imunitou, zvláště jedince HIV-pozitivní nebo pacienty po transplantaci nebo protinádorové terapii (Canning et Hollister 1992).

1.1.1. Taxonomie

Současný systém podle Adl a kol. (2019) řadí mikrosporidie do kmene Opisthosporidia, Karpov, Aleoshin a Mikhailov, 2014, který zahrnuje opisthokontní intracelulární parazity s améboidním vegetativním stádiem s infekčním stádiem ve formě spory. Kromě mikrosporidií zde patří dále skupina Aphelidea (vnitrobuněční parazitoidi řas) a Rozellida (syn. Cryptomycota, vnitrobuněční paraziti např. chytridiomykot nebo basidiomykot). Opisthosporidia je jedním z kmenů skupiny (říše) Fungi. Skupina Microsporidia Balbiani, 1882 se podle Adl a kol. (2019) může považovat za řád kmene Opithosporidia. Cesta k snad již správnému taxonomickému zařazení mikrosporidií byla velmi spletitá. Byly zpočátku řazeny k prvokům (dnešním protistům).

Díky podobnosti stočené pólóvé trubice s pólóvým vlákem myxozóí (rybomerek) byly v roce 1882 Bütschlim zařazeny do společného taxonu Cnidosporidia Bütschli, 1882. Tuto skupinu začlenil mezi jednobuněčné prvky tvořící spory. Tato skupina se nazývala Sporozoa a řadil se zde například i prvek rodu *Plasmodium* působící malárii. Přestože mají mikrosporidie i některé rysy prokaryot – ribozomy, chybějící mitochondrie, peroxysomy a Golgiho aparát (Vossbrinck et al. 1987), jsou ovšem považovány za eukaryota, neboť mají jádro s jaderným obalem, intracytoplasmatický systém membrán a separaci chromosomů pomocí dělicího vřeténka (Canning et Lom 1986). Právě tato jednoduchá struktura mikrosporidií vedla k názoru, že se jedná o primitivní eukaryota (Cavalier-Smith 1983). Až pomocí molekulární fylogenetické analýzy bylo prokázáno, že tyto paraziti jsou blízce příbuzní houbám (Fungi) (Hirt et al. 1999). Další důležité zjištění se týkalo jaderného genomu, obsahující geny pro proteiny, které jsou mitochondriálního původu. Tyto geny jsou blízce příbuzné genům mitochondrií jiných eukaryotních organismů, což byl důkaz, že mikrosporidie nejsou primitivní organismy (Keeling et McFadden 1998). Mikrosporidie vykazují některé strukturní znaky, které je řadí k houbám jako je přítomnost chitinu ve stěně spor nebo nepřítomnost bičíku. Jsou tu ale také znaky, kterými se mikrosporidie od hub odlišují a jsou tak pro ně unikátní. Je to extrémní redukce genomu, způsob infekce u hostitele, nepřítomnost mitochondrií a peroxisomů nebo velikost ribozomů. To bylo důvodem, proč se o umístění mikrosporidií v taxonomii dlouze diskutovalo (Voigt et Kirk 2011).

Řád Microsporidia se dělí na dvě skupiny Haplophasea (například rody *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Pleistophora*, *Trachipleistophora*) a Diplophasea (například rody *Brachiola*, *Nosema*, *Vittaforma*) podle počtu utvořených jader. Haplophasea obsahují jedno jádro a Diplophasea mají v průběhu vývojového cyklu jádra dvě, tzv. diplokaryon (Sprague et al. 1992).

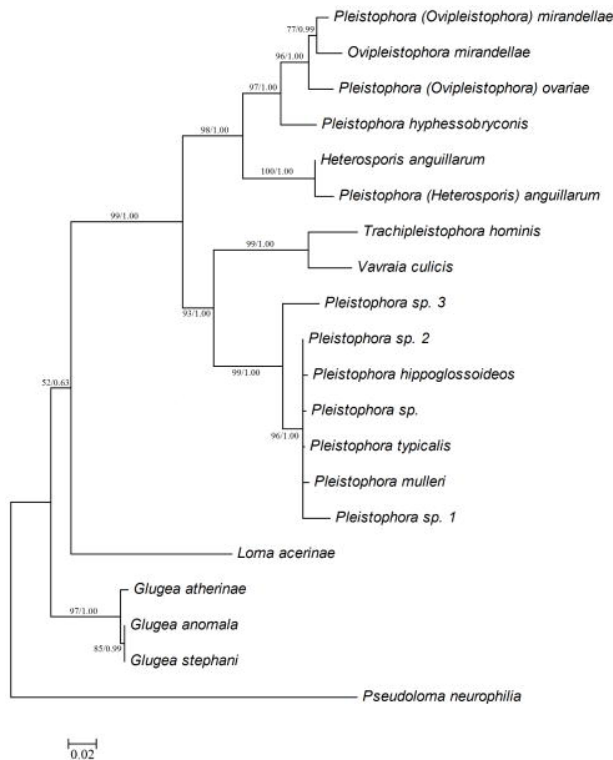
1.1.2. Fylogeneze

Poté, co byla získána sekvence genu malé podjednotky rRNA u mikrosporidie *Variamorphia necatrix*, bylo navrženo, že mikrosporidie jsou příbuznější prokaryotickým organismům více než eukaryotickým (Pelikanová 2009). Nepřítomnost pravého Golgiho aparátu a mitochondrií tuto teorii potvrzovala. Až multigenové analýzy α - a β -tubulinu, podjednotky RNA polymerázy II, vazebného proteinu TATA-box, translačních elongačních

faktorů EF-1 α a EF-2, glutamylové syntézy tRNA a mitochondriálního HSP70 potvrdila bližší vztah mezi mikrosporidii a houbami (Keeling et al. 2002). Toto zjištění podporují i výsledky molekulární sekvenace a analýzy genomu *Encephalitozoon cuniculi* (Keeling et al. 2000). Sekundární ztráta mitochondrií byla potvrzena objevem mitochondriálního genu HSP70 v genomu mikrosporidie (Vivarés et al. 2002). Na základě fylogenetické analýzy tubulínu se předpokládalo, že se mikrosporidie vyvinuly z hub po divergenci kmene Chytridiomycetes (Keeling et al. 2000) nebo se vyvinuli v rámci skupiny Zygomycetes (Keeling 2003). Jiná studie založená na kombinované analýze osmi protein kódujících genů naznačila příbuznost ke skupině Dikarya (skupina obsahující Ascomycetes a Basidiomycetes) (Gill et al. 2006). Nejednotnost výsledků je dána problematickou analýzou mikrosporidiálních sekvencí, které mají 8 až 10 krát větší evoluční rychlost než ostatní houbovitě organismy (Cavalier-Smith 2001). Díky tomu dochází k artefaktu fylogenetické analýzy, který je označován jako přitahování dlouhých větví (mikrosporidie ve stromu vytváří dlouhé větve, právě díky zrychlené evoluci). Fylogenetické postavení mikrosporidií je proto stále ne zcela vyjasněné.

Vzhledem k nemalému množství druhů mikrosporidií a jejich hostitelů dochází k různým směrům fylogeneze mikrosporidií. Vznikají tak četné evoluční větve. Ty obsahují druhy, které byly na základě morfologie zařazeny do odlišných rodů, a tedy vytváří parafyletické nebo polyfyletické skupiny, (Vávra et al. 2013). Tento typ fylogenetických vztahů je pro mikrosporidie charakteristický a je dán tím, že jejich taxonomie je založena na morfologii, která se díky parazitickému způsobu života mikrosporidií velmi zjednodušila. Vytvořit systém mikrosporidií, který by odrážel fylogenezi je velmi nesnadné, a hlavně jeho základy byly vytvořeny před poznatky na úrovni molekulární taxonomie. Jako příklad může sloužit strom vytvořený na základě Bayesovské analýzy (Obr.1). Druh *P. hypheobryconis* patří do stejné parafyletické skupiny s druhy rodu *Ovipleistophora*, *Heterosporis*, *Vavraia* a *Trachipleistophora* (Sanders et al. 2010).

Obr.1: Fylogeneze rybích mikrosporidií včetně druhu *P. hyphessobryconis* (Sanders et al. 2010).



Morfologie a životní cyklus

Infekční stádium mikrosporidií je spora (Obr.2). Má tvar oválný, hruškovitý i kulovitý a je odolná vůči podmínkám vnějšího prostředí. Stěna spory je třívrstevná. Skládá se z vnější elektrodenzní exospory z glykoproteinů, elektronlucentní endospory z chitinu a vnitřní plazmatické membrány. Spora také obsahuje zárodečnou buňku - sporoplasmu s jedním (monokaryon) nebo dvěma jádry (diplokaryon), volnými ribozomy, hrubým endoplazmatickým retikulem, váčky podobnými Golgimu aparátu (polaroplast) a vakuolou, která se nachází v posteriorní části spory. Mikrosporidiím chybí peroxisomy a stejně tak mitochondrie. Spory mají běžnou velikost 1 – 3 μm .

Důležitá součást spory je vystřelovací aparát se spirálně svinutou pólovou trubicí, složenou z bílkovinných vrstev, která je v anteriorní části spory ukotvená kotevním diskem a je určena k infekci hostitelské buňky.

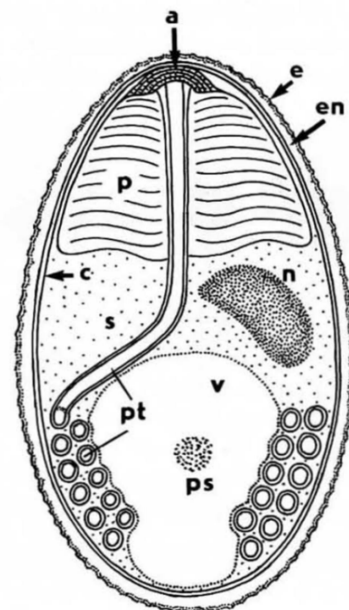
Další část, typická pro mikrosporidie, je polaroplast, který je tvořen navrstvením k sobě těsně přiložených membránových lamel a vezikul (Larsson 1999).

Mechanismus infekce je založen na vzrůstajícím osmotickém tlaku během germinace, kdy v zadní vakuole dochází ke štěpení molekul disacharidu trehalózy na glukózu a postupné oxidaci dlouhých řetězců mastných kyselin. Dochází tak k zvětšování vakuoly, až stěna spory praskne v jejím nejtenčím místě na apikálním vrcholu (Undeen et Van der Meer 1999). Stejně tak dojde k vystřelení pólové trubice prasklinou. Poté je trubicí protlačen obsah spory a vytvoří se vnější membrána infekčního agens z polaroplastu mateřské spory. Tímto způsobem se paraziti injikují do cytoplasmy hostitelské buňky (Keohane et Weiss 1999). V hostitelské buňce se začne sporoplasma měnit v meront. Meronty jsou kulaté útvary, které se uvnitř hostitelské buňky dokážou množit binárním nebo několikanásobným dělením zvaným merogonie. Meronty se poté vyvíjí ve sporonty, které jsou charakteristické elektrodensní povrchovou vrstvou, která se později stává exosporou. Ze sporontů, které se množí jednou nebo několika binárními sporogoniemi, vzniknou sporoblasty, ze kterých se nakonec vyvinou zralé diferencované spory. Po vyplnění hostitelské buňky sporami dochází k prasknutí cytoplasmatické membrány a uvolněné spory tak mohou zahájit nový cyklus. (Canning 1993).

Některé mikrosporidie vyžadují mezihostitele ve svém životním cyklu. Jsou to např. druhy rodu *Amblyospora*, *Parathelohania* nebo *Dubosquia*. Tyto mikrosporidie napadají kromě svého definitivního hostitele komára ještě kopepoda jako mezihostitele (Micieli et al. 2000).

Obr. 2: Schéma spóry mikrosporidií.

- en – chitinový obal
- e – proteinový obal
- c – plazmatická membránu
- s – cytoplazma s ribozomy
- n – jádro
- p – polaroplast
- pt – dlouhé a částečně svinuté vlákno
- ps – posterosom
- a – vlákno je upevněno ve špičce spory hřibovitou koncovkou
- v – vakuolární prostor v zadní části spory



Upraveno podle: J. Lom a I. Dyková (1992)

1.2. Hostitelé mikrosporidií

Mikrosporidie patří mezi skupinu, která se postupem času dokázala natolik diverzifikovat, že se jí podařilo adaptovat na velké množství hostitelů. Přibližně 10 procent druhů jsou paraziti obratlovců včetně lidí. Stejně tak byla mikrosporidioza popsána u primátů (Fayer et Santin-Duran 2014). Hlavními hostiteli mikrosporidií jsou korýši a hmyz, odtud pochází i český název hmyzomorky. Mikrosporidie jsou původci řady nemocí jak obratlovců (i člověka) tak i bezobratlých. Typickým příkladem je hmyzomorka muší (*Entomophthora muscae*) (Obr. 3) nebo hmyzomorka včelí (*Nosema apis*). Mikrosporidie také mohou napadat různé druhy korýšů. Mikrosporidie jsou většinou hostitelsky specifické, nebo napadají blízké příbuzné hostitele. Některé druhy dokonce mohou infikovat i člověka, pokud má pacient oslabený imunitní systém (imunodeficience vyvolaná např. virem HIV nebo imunosuprese po transplantacích).

Obr.3: Nákaza hmyzomorkou muší (*Entomophthora muscae*).



Upraveno podle: J. Švábík, Postřehy z Přírody, (2012)

1.2.1. Mikrosporidie u ryb

Rybích mikrosporidií bylo popsáno přes 150 druhů řazených do 14 rodů (Lom et Nilsen 2003). Většina rybích mikrosporidií po vstupu do buňky působí tvorbu xenomů, hypertrofovaných hostitelských buněk s dezintegrovaným jádrem hostitelské buňky. V xenomech dochází k pomnožování merontů. Tyto útvary mohou dosahovat makroskopických rozměrů a jsou často viditelné pouhým okem. Existují ovšem rybí mikrosporidie, které xenomy nevyvolávají, např. druhy rodu *Kabatana* nebo *Pleistophora*. U druhu *P.*

hyphesobryconis jsou časní meronti obklopeni přímo amorfní dezintegrovanou sarkoplasmou hostitelské svalové buňky. Mezi nejprostudovanější patří např. rody *Glugea*, *Loma*, *Heterosporis*, *Nucleospora* a *Pleistophora*.

Mezi hostitele druhů rodu *Glugea* patří např. koljuška tříostná (*Gasterosteus aculeatus*), koljuška devítiostná (*Pungitius pungitius*) nebo halančík rodu *Nothobranchius*. Mezi nejznámější zástupce r. *Glugea* můžeme označit druhy *Glugea plecoglossi*, *Glugea hertwigi* a *Glugea stephani*. Dalším častými mikrosporidii u ryb jsou zástupci rodu *Loma*, který zahrnuje více než 17 popsaných druhů mikrosporidií. Často cizopasí na žábrech lososovitých ryb. K onemocnění může dojít ve sladké i slané vodě. Jako hostitelé se uvádí především druhy pstruhů rodu *Oncorhynchus* nebo siven americký (*Salvelinus fontinalis*). Z rodu *Heterosporis* jsou známy především druhy *Heterosporis finki*, *Heterosporis schuberti* nebo *Heterosporis cichlidarum*. Parazité mohou cizopasit u druhů *Pterophyllum scalare*, *Ancistrus cirrhosus*, *Betta splendens* nebo *Pseudocrenilabrus multicolor*. Jedná se tedy často o akvarijní druhy ryb, u kterých může mortalita dosáhnout až 95 %. Rod *Nucleospora* patří mezi mikrosporidie, které se vyvíjí, je v jádrech hostitelských buněk. Mezi významné druhy patří *Nucleospora salmonis* u lososovitých ryb, *Nucleospora secunda*, která cizopasí v zažívacím traktu akvarijní ryby halančíka pestroploutvého (*Nothobranchius rubripinis*). Dále např. *Nucleospora cyclopteri* byla popsána z hranáče šedého (*Cyclopterus lumpus*).

K mikrosporidii, které se vyvíjejí v jádrech hostitelských buněk, patří i druh *Enterospora nucleophila*, který se může vyskytovat u pražmy královské, neboli mořana zlatého (*Sparus aurata*).

Do rodu *Pseudoloma* patří především druh *Pseudoloma neurophilia*. Je vážným původcem infekcí u dania pruhovaného (*Danio rerio*), který je dnes velmi oblíbeným druhem akvarijních ryb a stejně tak je uznávaný jako modelový organismus ve vývojové genetice (Obr.4). Tento druh může napadat centrální nervovou soustavu a stejně tak svaly ryb (Vávra 2017).

V rámci rodu *Pleistophora* bylo popsáno více než 30 druhů. Některé druhy mohou způsobovat mikrosporidiiózu u komerčně významných mořských a sladkovodních druhů ryb. Společným znakem je difúzní postižení svaloviny, ovarii a dalších orgánů. Dobře známým, celosvětově rozšířeným druhem je *Pleistophora hyphesobryconis*. Mezi vnímavé druhy ryb patří především neonka obecná (*Paracheirodon inessi*), ale také řada dalších akvarijních ryb několika různých čeledí.

Obr.4: Deformace těla u dania pruhovaného (*Danio rerio*) napadeného druhem *Pseudoloma neurophilia*.



Upraveno podle: M. Kent, Oregon State University, (2010)

1.2.1.1. *Hmyzomorka rybí (Pleistophora hyphessobryconis)*

Tento vnitrobuněčný parazit napadá především hřbetní svalovinu ryb, často se vyskytuje u neónovitých ryb a drobných kaprovitých druhů ryb. Parazit se do ryby dostane pozřením spor např. s potravou. Krevním řečištěm se dostává do svaloviny, typického místa infekce.

V pokročilém stadiu parazit proniká do celého těla. Spory se dostanou opět do vody z uhynulých ryb. Při infekcích *Pleistophora hyphessobryconis* dochází k neobvyklému chování nakažených jedinců, ztrátě barvy. Choroba se projevuje zblednutím velkých míst na těle a ztrátou pigmentu (Obr.5). Napadená ryba hubne, má propadlé břicho, tělo se prohýbá a deformuje. Průběh nemoci může trvat až několik měsíců a končí vždy smrtí ryby. Nákaza je nebezpečná hlavně pro plůdek a mladé rybky neónek. U jiných druhů ryb je výjimkou, kdy se projevuje především v přeplněných a neudržovaných nádržích. Choroba snáze propuká u ryb chovaných ve velmi měkké a kyselé vodě, často se zvýšeným obsahem dusitanů, kdy může nastat až 90% úhyn všech ryb. Vůči onemocnění zatím žádná léčba neexistuje. Prevence spočívá v důkladné čistotě, postupném mírném zvyšování hodnoty pH a jeho udržováním mezi 7,2-7,5 pomocí jedlé sody.

Obr.5: Infekce neonky obecné (*Paracheirodon innesi*).



Upraveno podle: D. Untergasser, Krankheiten der Aquarienfische,(1989)

1.2.2. Mikrosporidie u savců

Ryby jsou nejčastějším obratlovčím hostitelem mikrosporidií. Ze 14 popsaných druhů napadající savce jsou pouze čtyři druhy mikrosporidií specifické pro savce (Canning et Lom 1986). Jsou to druhy *E. cuniculi*, *E. hellem*, *E. intestinalis* and *E. bienersi*. Některé další druhy, jako je například *Vittaforma corneae*, jsou oportunními parazity. Nákaza u savců je možná i vertikálně. Přenos mikrosporidiozy přes placentu byl popsán dosud u hlodavců, králíků, masožravců a primátů (Snowden et al. 1998). Často se jedná o nákazu savců v oblasti ledvin a mozku druhem *Encephalitozoon cuniculi*, který byl také prvním druhem mikrosporidie převeden ze savce do buněčné kultury. To umožnilo vývoj nových metod ve studiu mikrosporidií a také přispěl ke studiu infekcí u laboratorních zvířat (Shadduck et al. 1979).

1.2.3. Mikrosporidie u člověka

Jedním z mnoha hostitelů mikrosporidií je také člověk. Mikrosporidie nejčastěji napadají jedince s oslabeným imunitním systémem. Průběh infekcí způsobených mikrosporidii závisí na imunitním stavu hostitele. Mikrosporidioza se může kromě osob s infekcí HIV vyskytovat i u malých dětí, pacientů po transplantaci orgánů a u starších osob (Didier, 2006). Nejčastějším druhem mikrosporidií, který můžeme nalézt u člověka je *Enterocytozoon bienersi* (Shadduck, 1993).

Vertikální přenos mikrosporidiozy z matky na potomka u člověka nebyl dosud stále zaznamenán. (Pelikánová, 2009). Přítomnost mikrosporidií v dýchacím a zažívacím traktu infikovaných jedinců a vylučování spor stolicí a močí indikuje, že horizontální přenos je

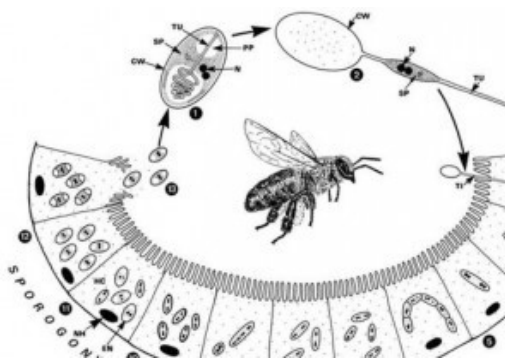
možný cestou fekálně-orálního přenosu, orálně-orálního přenosu, inhalací kontaminovaného aerosolu a pozřením kontaminované potravy nebo vody (Bryan et Schwartz 1999).

1.2.4. Mikrosporidie u bezobratlých

K hlavním hostitelům mikrosporidií patří hmyz, z čehož vychází české starší jméno hmyzomorky. Nejznámější je hmyzomorka muší nebo hmyzomorka včelí, kde dochází u včel k nose móze (Obr.6). Mikrosporidie jsou také původci pébriny bource morušového. Mnoho mikrosporidií ale parazituje i v korýších, kdy může docházet k tzv. porcelánové nemoci raků, a stejně tak v mnoha dalších bezobratlých. Zástupci několika rodů parazitují i v buňkách jiných protist (Jelínková 2015).

Nose móza je nemoc, která způsobuje značné zdravotní problémy u včel. Toto onemocnění je udáváno jako hned druhý největší problém po varroáze. Nose mózu sice není nutné hlásit veterinární správě, ale přesto způsobuje značné ztráty u včel. Toto střevní onemocnění způsobuje snížení imunity dospělých včel, kdy může dojít až k úplné likvidaci včelstva (Matela et al. 2011).

Obr.6: Životní cyklus hmyzomorky včelí (*Nosema apis*) napadající včelu medonosnou.



Upraveno podle: D. Kashyap et al., Springer Nature, (2019)

2. Cíle práce

Cílem mé bakalářské práce bude detekovat nákazu mikrosporidii u vybraných akvariálních ryb. Budu se zabývat zjištěním hostitelské specifity druhu *Pleistophora hyphessobryconis*, který je nejčastějším parazitem akvariálních ryb. Bude provedena morfologická dokumentace nálezů světelnou mikroskopií a zjištění lokalizace parazita v jednotlivých tkáních pomocí histologickému vyšetření.

Pomocí nově navržených specifických primerů bude metodou PCR zjišťována prevalence u jednotlivých druhů hostitelů a bude posouzena možnost využití PCR metody pro diagnostické účely. Analýza sekvencí SSU rDNA genu umožní zjistit druhovou identitu a příbuzenské vztahy nalezených mikrosporidií.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

Biologický materiál byl získán převážně od soukromých chovatelů v Českých Budějovicích, někteří jedinci byli z mého vlastního chovu. Celkem bylo vyšetřeno 175 jedinců 16 druhů akvarijských ryb (Tab. 1). Při pitvě se pro světelnou mikroskopii a fixaci pro molekulárně taxonomickou analýzu odebíral stěr z pokožky, svalovina a žábry. Protože vyšetřované ryby byly velmi malých rozměrů, byli fixováni pro histologické vyšetření téměř celý jedinci. Pro molekulárně taxonomickou analýzu byly vzorky uchovávány v TNES. Pro histologii se vzorky fixovaly ve fixáži dle Davidsona a dále byly uchovávány v jeho zásobním roztoku. Materiál byl zpracován klasickou parafínovou metodou na Parazitologickém ústavu v laboratoři rybí protistologie.

Tab.1: Seznam vyšetřených ryb.

druh	latinský název	počet vyšetřených ryb
Neonka obecná	<i>Paracheiroduon innesi</i>	65
Neonka červenohlavá	<i>Hemigramus rhodostomus</i>	8
Neonka červená	<i>Paracheiroduon axelrodi</i>	10
Neonka černá	<i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>	6
Tetra císařská	<i>Heterandria formosa</i>	3
Tetra královská	<i>Inpaichthys kerri</i>	22
Razbora klínoskvrnná	<i>Trigonostigma heteromorpha</i>	10
Parmička čtyřpruhá	<i>Puntius tetrazona</i>	6
Parmička duhová	<i>Puntius titteya</i>	4
Živorodka duhová	<i>Poecilia reticulata</i>	6
Drobnoústka trpasličí	<i>Nannostomus marginatus</i>	8
Krunýřovec skvrnitý	<i>Ancistrus sp.</i>	6
Pestřenec zlatový	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	6
Cichlidka papouščí	<i>Apistogramma cacatuoides</i>	5
Piraňa Nattererova	<i>Pygocentrus nattereri</i>	5
Danio leopardí	<i>Danio frankei</i>	5
		Celkem 175

3.2. Metody

3.2.1. Světelná mikroskopie

Vyšetřované akvarijské ryby byly většinou velmi malé, proto jsem používala k odběru vzorků binokulární lupou. Tkáň jsem nejdříve prohlédla lupou, abych zjistila případné makroskopické změny. Z tkáňových vzorků jsem připravila roztlakové preparáty.

K prohlížení preparátů jsem používala světelný mikroskop Olympus BX53 při zvětšení mikroskopu 200-1000x. Mikroskop byl vybaven i zařízením pro diferenciální interferenční kontrast podle Nomarského (Nomarského DIC). Ke zhotovení mikrofotografií byla použita digitální kamera Olympus DP72. Při fotografování spor mikrosporidií jsem v některých případech použila metodu agarových preparátů. Na podložní sklíčko jsem nanesla 1-1,5 mm silnou vrstvu rozehrátého agaru (1,5%). Na krycí sklíčko jsem kápala malý objem vzorku spor a opatrně překlopila na podložní sklíčko kryté ztuhlým agarem. Spory se mírně zanořily do pružné vrstvy agaru a vytvořily jednu rovinu pro zaostření.

3.2.2. Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena jak klasickou fenol-chloroformovou metodou, tak pomocí komerčních kitů. Podrobný pracovní postup fenol-chloroformové extrakce:

(před extrakcí byla část vzorků homogenizována pomocí bead beateru po přidání zirkonových kuliček)

1. Ke vzorkům s TNES pufrem (400 μ l) jsem přidala 4 μ l proteinázy K, promíchala a nechala inkubovat nejméně 4 hodiny (nebo přes noc) v 55°C.
2. Ke vzorku přidáme stejný objem fenolu (400 μ l) a vzorek 5 min promícháváme.
3. Centrifugujeme (9000 rpm, 10 min, 20°C).
4. Do čistých nových zkumavek odebereme horní vrstvu vzorku
5. Ke vzorku přidáme chloroform (300-400 μ l) a promícháme (alespoň 2 min).
7. Centrifugujeme (9000 rpm, 10min, 20°C).
8. Odebereme horní fázi do nové zkumavky a přidáme vychlazený 92% etanol (900 μ l).
9. Centrifugujeme při maximálních otáčkách 20 min, 4°C.
10. Odstraníme etanol
11. Do zkumavky přidáme 70% etanol (900 μ l).
12. Opět použijeme centrifugu (5000, 4min, 4°C).
13. Důkladně odstraníme etanol a následně vložíme vzorky do inkubátoru a sušíme při teplotě 50°C po dobu 10 min, dosušíme při pokojové teplotě.
14. Nakonec přidáme deionizovanou vodu (30-100 μ l) a vzorky uschováme v chladícím zařízení.

Izolace komerčním kitem (FastDNA™ Spin Kit for Soil DNA Extraction, MP Biomedicals)

Princip izolace kitem je ve využití kolonek s filtrem, které umožňují pročištění vzorku a zachycení DNA, která je v posledním kroku eluována do finální zkumavky.

Podrobný pracovní postup:

1. Odebereme opatrně z mikrozkušavek veškerý obsah etanolu, který fixoval tkáň.
2. Zbylý obsah dáme do čisté mikrozkušavky.
3. Následně vložíme vzorky do inkubátoru při teplotě 37°C na 20 minut pro dokonalé odstranění etanolu.
4. Následně vložíme vzorky do fialových zkumavek s kuličkami.
5. Přidáme 978 µl SODIUM PHOSPHATE BUFFER
6. Homogenizujeme v bead beater přibližně 40 sekund.
7. Centrifugujte (14000 rpm, 5-10 min.) a přeneseme vrchní vrstvu do čisté zkumavky.
8. Do čistých mikrozkušavek přidáme zbylý obsah vzorku.
9. Přidáme 250 µl PPS a promícháme v ruce.
10. Opět použijeme centrifugu (14000, 5 min.) a poté přeneseme vrchní vrstvu do čisté zkumavky (15 ml).
11. Resuspendujeme BINDING MATRIX SUSPENSION (BMS).
12. Přidáme µl BMS do horní vrstvy zkumavky (15 ml).
13. Promícháme 2 min. a 3 min. necháváme vzorek usadit.
14. Odebereme 500 µl horní vrstvy a vyhodíme do odpadu.
15. Spodní část resuspendujte.
16. Do zkumavky (Spin-TM filter) přidáme 600 µl vzorku z původní zkumavky (15 ml).
17. Centrifugujte (14000 rpm, 1 min.) a kolonku vložíme do nové záchytné zkumavky.
18. Opakování od 11. bodu.
19. Přidáme 500 µl SEWS-M a resuspendujte.

20. Opět centrifugujte (14000 rpm, 1 min.) a kolonku vložíme do nové záchytné zkumavky.
21. Centrifugujeme (14000 rpm, 2min.) a kolonku vložíme do nové záchytné zkumavky.
22. Necháme sušit 5 min. - otevřené zkumavky (Spin-TM filter).
24. Přidáme 50-100 μ l DES k filtru v kolonce.
25. Centrifugujte (14000 rpm, 1 min.).
26. Zkumavka obsahuje DNA, kterou vložíme do chladičího zařízení.

Stejný kit byl použit i v případě izolace genomické DNA z environmentálních vzorků. Kit jsem použila pro izolaci vzorků z vodních sedimentů ze dna akvárií. Vzorky se získaly filtrací pomocí vakuové pumpy. Před izolací byl filtr na jemno roztrhán a vložen do zkumavky se zirkonovými kuličkami. Následná izolace byla provedena podle výše uvedeného postupu izolace komerčním kitem.

3.2.3. PCR

PCR neboli polymerázová řetězová reakce je metoda využívající schopnosti polymeráz amplifikovat nukleové kyseliny za účelem rychlého a poměrně jednoduchého zmnožení požadovaného úseku DNA.

Při přípravě PCR jsem nejdříve připravila master mix, tj. smíchala jsem složky PCR společně pro všechny vzorky (Tab.2). Celkový objem reakční směsi činil pro každý vzorek PCR 24 μ l master mixu plus 1 μ l DNA. Seznam použitých primerů je uveden v tabulce 3. Primery byly navrženy školitelem na základě alignmentu publikované sekvence *Pleistophora hypheobryconis* a příbuzných sekvencí získaných z genové banky.

Tab.2: Příprava master mixu pro 10 vzorků

Pufr	25 µl
dNTPS	5 µl
primer forward (0,1 mM)	10 µl
primer reverse (0,1 mM)	10 µl
Taq polymeráza (1u/µl)	10 µl
Destilovaná H ₂ O	180 µl

Tab.3: Seznam primerů:

PH-401F	5'-GCT ATT TGT TGT AAT AGC GCG G-3'
PH-996F	5'-CGT GGT GCG ATT TGA GTT CGC-3'
PH-1297R	5'-GTC ACG GCT TGC CGT AAC AG -3'
PH-1269F	5'-CTG TTA CGG CAA GCC GTG AC -3'
PH-1988R	5'-CGG TTG TCA ACT GCT CAC CG -3'
PH-1017R	5'-GCG AAC TCA AAT CGC ACC ACG-3'

Ve své práci jsem použila tři níže uvedené kombinace primerů pro amplifikaci rDNA mikrosporidií:

- A. PH-401F + PH-1017R (600 bp.)
- B. PH-996F + PH-1297 R (280 bp.)
- C. PH-1269F + PH-1988R (700 bp.)

PCR se prováděla v termocykleru T100 Thermal Cycler (BIO RAD). PCR trvala přibližně 2 hodiny a 11 minut. Teplota nasedání primerů probíhala při 58°C. Při optimalizaci PCR byla pomocí gradientové PCR testována teplota nasedání primerů v rozmezí 53 až 61,6°C.

Program zahrnoval následující kroky:

1. Denaturace při 94°C/ 5 minut
2. Denaturace při 94°C/1 minuta
3. Nasedání primerů při 58°C/1 minuta

4. Syntéza nového řetězce při 72°C/45 sekund (alternativně 68°C /45 sekund u Titanium polymerázy)

5. Dokončení syntézy řetězce při 72°C/8 minut (alternativně 68°C /8 minut)

Cyklus zahrnující krok 2. - 4. probíhal 30x.

3.2.4. Gelová elektroforéza

Pomocí gelové elektroforézy byla ověřována délka DNA fragmentů. Gelová elektroforéza je metoda, při níž dochází k rozdělení DNA fragmentů v agaróze podle molekulových hmotností působením elektrického pole. Gelová elektroforéza byla provedena při napětí 100 V po dobu nutnou pro separaci fragmentů DNA, tedy přibližně 15 minut s použitím následujících látek (Tab.4).

Tab.4: Použité chemikálie:

Agaróza	0,50 g
TAE pufr	50 ml
Ethidium bromide (EtBr)	4 μ l
100 bp DNA ladder	5 μ l

Pracovní postup:

1. Do baňky přidáme směs agarózy a TAE pufru a zahřejte v mikrovlnné troubě k varu.
2. Baňku s agarem zchladíme pod tekoucí studenou vodou.
3. Pipetou přidáme 4 μ l EtBr a krouživými pohyby promícháme.
4. Směs nalijeme do připravené vaničky s hřebenem tak, aby se netvořily bubliny.
5. Gel necháme přibližně 15 minut ztuhnout.
6. Gel vložíme do elektroforetické vany starty vlevo u záporné elektrody.
7. Vyndáme hřeben a do vzniklých jamek pipetujeme vzorky v následujícím pořadí:
 - a) ladder
 - b) vzorky

c) pozitivní kontrola

d) negativní kontrola

8. Elektroforézu provedeme při 100V přibližně 15 minut.

3.2.5. Extrakce gelu

Po elektroforéze následovalo vyříznutí pozitivních vzorků DNA z gelu a extrakce. Tabulka č. 5 znázorňuje použité chemikálie.

Tab.5: Použité chemikálie.

QG pufr
PE pufr
PCR voda

Pracovní postup dle návodu komerčního kitu:

1. Čistým skalpelem vyřízneme pozitivní fragment DNA z gelu a přemístíme do připravené mikrozkušavky.
2. Připipetujeme 500 μ l DG pufru.
3. Inkubujeme v termobloku 15 minut při 55°C a každé 2 minuty promícháváme.
4. Uchopíme vnitřní kolonku s filtrem (DF Column) a vložíme ji do vnější mikrozkušavky (Collection tube).
5. Veškerý objem (800 μ l) z mikrozkušavky přepipetujeme do kolonky a centrifugujeme 30 sekund /13 400 rpm/.
6. Odpad ze sběrné zkumavky vylijeme a kolonku nasadíme zpět.
7. Připipetujeme 600 μ l Wash Buffer a opět centrifugujeme 30 sekund/13 400 rpm.
8. Opět vylijeme odpad ze sběrné zkumavky a kolonku opět nasadíme.
9. Přidáme 600 μ l Wash Buffer, necháme stát na 1 minutu a poté centrifugujeme 30 sekund/13 400 rpm/.
10. Odpad ze sběrné zkumavky vylijeme .

11. Suchou kolonku dáme do nové mikrozkušavky a napipetujeme 30 µl PCR vody.

12. Inkubujeme 2 minuty a poté centrifugujeme 2 minuty/13 400 rpm/.

Vyextrahovanou DNA uchovááme v mrazících prostorech.

3.2.6. Příprava vzorků pro sekvenaci

Sekvence probíhala přímo z PCR produktů:

Příprava vzorků:

9 µl PCR produktů + 1 µl primeru

Vzorek byl odeslán do komerční firmy SEQme s.r.o. (Dobříš, ČR).

3.2.7. Sekvence a fylogenetická analýza výsledků

Sekvenční data pro jednotlivé vzorky získaná pomocí forward a reverse primeru byla složena v programu Geneious 11.0.5 metodou „De novo assembly“. Tyto konsenzuální sekvence byly alignovány se sekvencemi získanými z genové banky. Výběr sekvencí z GenBank byl proveden na základě BLASTn vyhledávání, kdy jsem hledala nejbližší shodu se mnou získanými sekvencemi. Dataset byl doplněn o další méně příbuzné sekvence a outgroup, který byl zvolen na základě dostupné literatury s již publikovanými analýzami (Lom et Nielsen 2003, Li et al. 2012). Sekvence byly uspořádány v programu MAFFT verze 7.450 (Katoh et Standley 2013) metodou L-INS-i.

Fylogenetická analýza byla provedena metodou maximální pravděpodobnosti (ML - maximum likelihood) a Bayesovskou inferencí. K těmto analýzám byly používány programy RAxML 7.0.3. (Stamatakis 2014) model GTR GAMMA a MrBayes (Huelsenbeck et Ronquist 2001) s modelem GTR. Bootstrapová analýza v rámci ML byla provedena s pěti sty opakováními. Fylogenetické stromy byly zobrazeny v programu TreeView 32 (Page 1996) a na úpravu byl použit program Adobe Illustrator 10 CE.

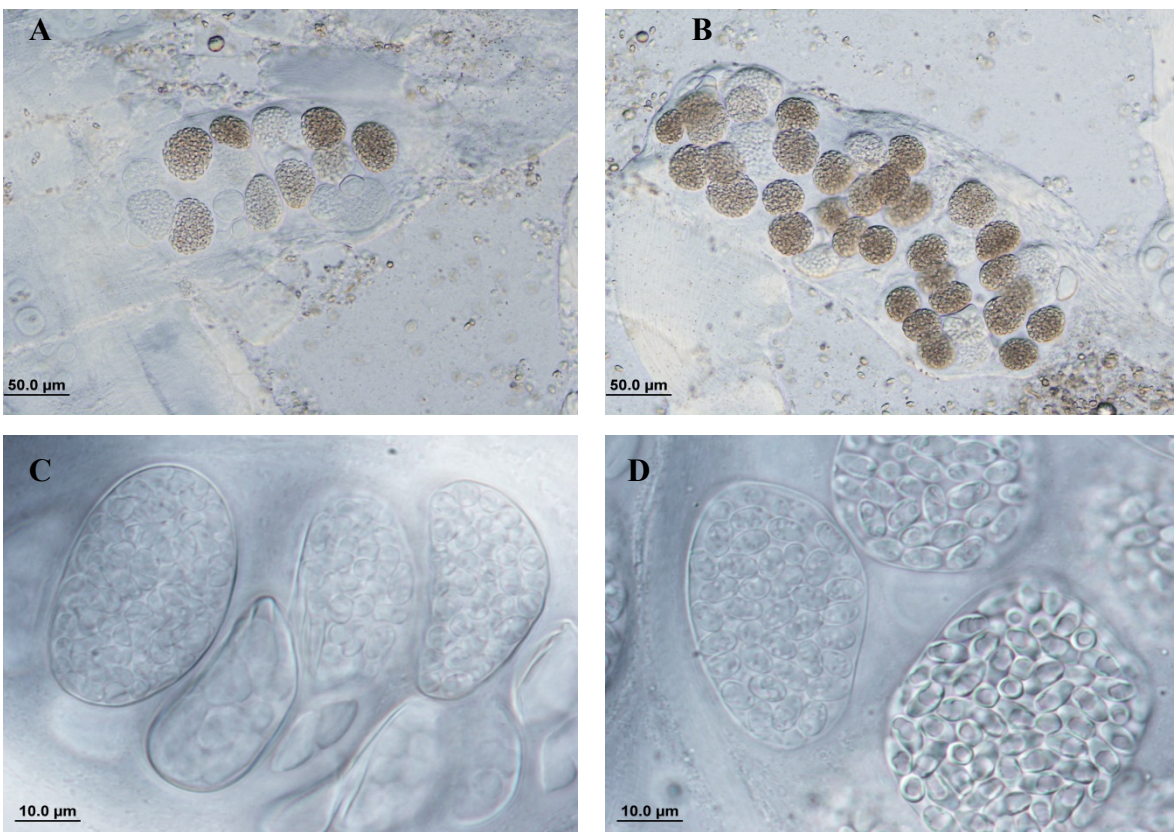
4. Výsledky

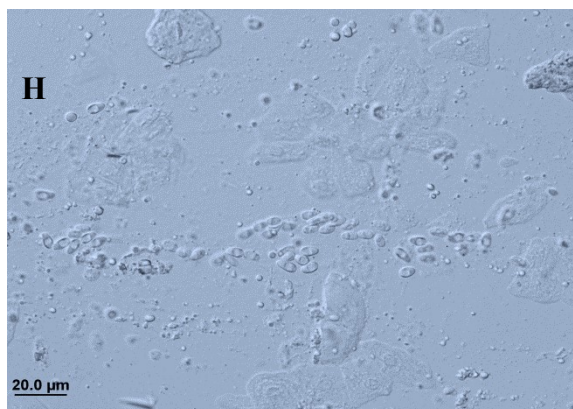
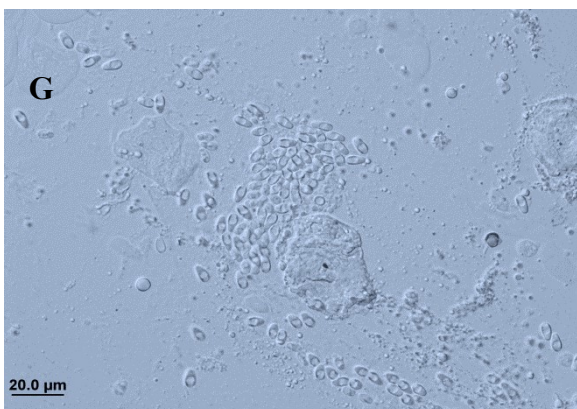
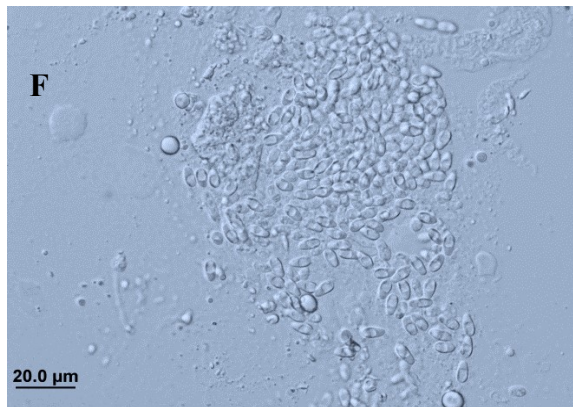
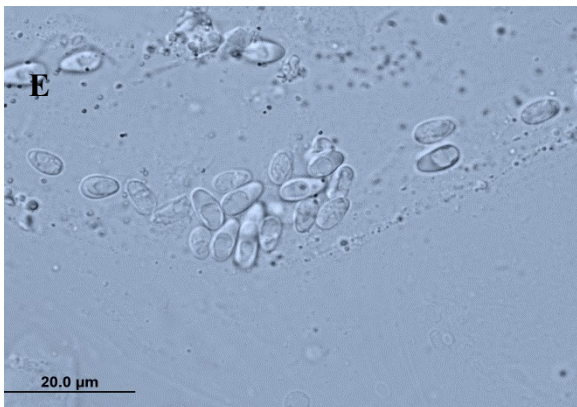
Mezi nejvíce napadené akvarijní ryby patřily jedinci druhu neonka obecná (*Paracheiroidon innesi*) a neonka červená (*Paracheiroidon axelrodi*). A to na základě světelné mikroskopie i PCR. Výsledky PCR byly pozitivní i v případech, kdy byl mikroskopický nález negativní (viz tabulka č. 6).

4.1. Světelná mikroskopie

Celkem bylo mikroskopicky vyšetřeno 175 jedinců akvarijních ryb z 16 druhů. Nejvíce zastoupenou rybou při vyšetřování byl druh *Paracheiroidon innesi* – celkem 65 vyšetřených jedinců. Ostatní druhy byly zastoupeny méně často, a to v rozmezí 4 až 11 jedinců (Tab. 1). Mikroskopicky jsem prokázala nákazu mikrosporidii u tří neonovitých druhů ryb: neony obecné (*Paracheiroidon innesi*), neony červenohlavé (*Hemigramus rhodostomus*) a neony červené (*P. axelrodi*). Neonka obecná byla infikována mikrosporidii s prevalencí 81,5% (53/65), neonka červenohlavá s prevalencí 100% (8/8) a neonka červená s prevalencí 40% (4/10) (Tab. 6). Na obrázku 7 je zachycena nákaza mikrosporidii ve svalovině neony obecné.

Obr.7 (A-H): Mikroskopické snímky Mikrosporidií.





A-D: Mikrosporidie ve sporoforních váčcích ve svalovině neonky obecné.
 E-H: Uvolněné zralé mikrosporidie v žábřácích hostitele.

Tabulka č. 6: Celkové počty nálezů mikroskopicky vyšetřených ryb.

druh	latinský název	nález mikrosporidií
Neonka obecná	<i>Paracheirodon innesi</i>	53 /65
Neonka červenohlavá	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	8/8
Neonka červená	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	4/10
Neonka černá	<i>Hyphessobrycon herbertaxelrodi</i>	0/6
Tetra císařská	<i>Heterandria formosa</i>	0/3
Tetra královská	<i>Inpaichthys kerri</i>	0/20
Razbora klínoskvrnná	<i>Trigonostigma heteromorpha</i>	0/10
Parmička čtyřpruhá	<i>Puntius tetrazona</i>	0/6
Parmička duhová	<i>Puntius titteya</i>	0/4
Živorodka duhová	<i>Poecilia reticulata</i>	0/6
Drobnouštka trpasličí	<i>Nannostomus marginatus</i>	0/8
Krunýřovec skvrnitý	<i>Ancistrus sp.</i>	0/6
Pestřenec zlatový	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	0/6
Cichlidka papouščí	<i>Apistogramma cacatuoides</i>	0/5
Piraña Nattererova	<i>Pygocentrus Nattereri</i>	0/5
Danio leopardí	<i>Danio frankei</i>	0/5

Během mikroskopického vyšetření jsem zaznamenala výskyt jednobuněčného eukaryota z rodu *Oodinium*. Tabulka č. 7 shrnuje výskyt mikrosporidií a stejně tak oodinií. Zajímavým výsledkem je, že často při pozitivním nálezů mikrosporidií se nevyskytovalo u ryb *Oodinium* a naopak, při výskytu *Oodinium* nebyla zaznamenána infekce mikrosporidiemi.

Tabulka č. 7: Výskyt mikrosporidií a oodinií.

(PTN = *Pelvicachromis taeniatus nigeria*, PA = *Paracheirodon axelrodi*, HR= *Hemigramus Rhodostomus*, PI= *Paracheirodon innesi*, PR= *Poecilia reticulata*, HH= *Hyphessobrycon herbertaxelrodi*, AN= *Ancistrus sp.*, A= *Heterandria formosa*, B= *Puntius tetrazona*, C= *Inpaichthys kerri*, D= *Inpaichthys kerri*, E= *Trigonostigma heteromorpha*, F= *Paracheirodon innesi*, G= *Nannostomus marginatus*, H= *Apistogramma cacatuoides*, I= *Pygocentrus Nattereri*, J= *Danio frankei*, K= *Puntius tetrazona*, L= *Puntius titteya*)

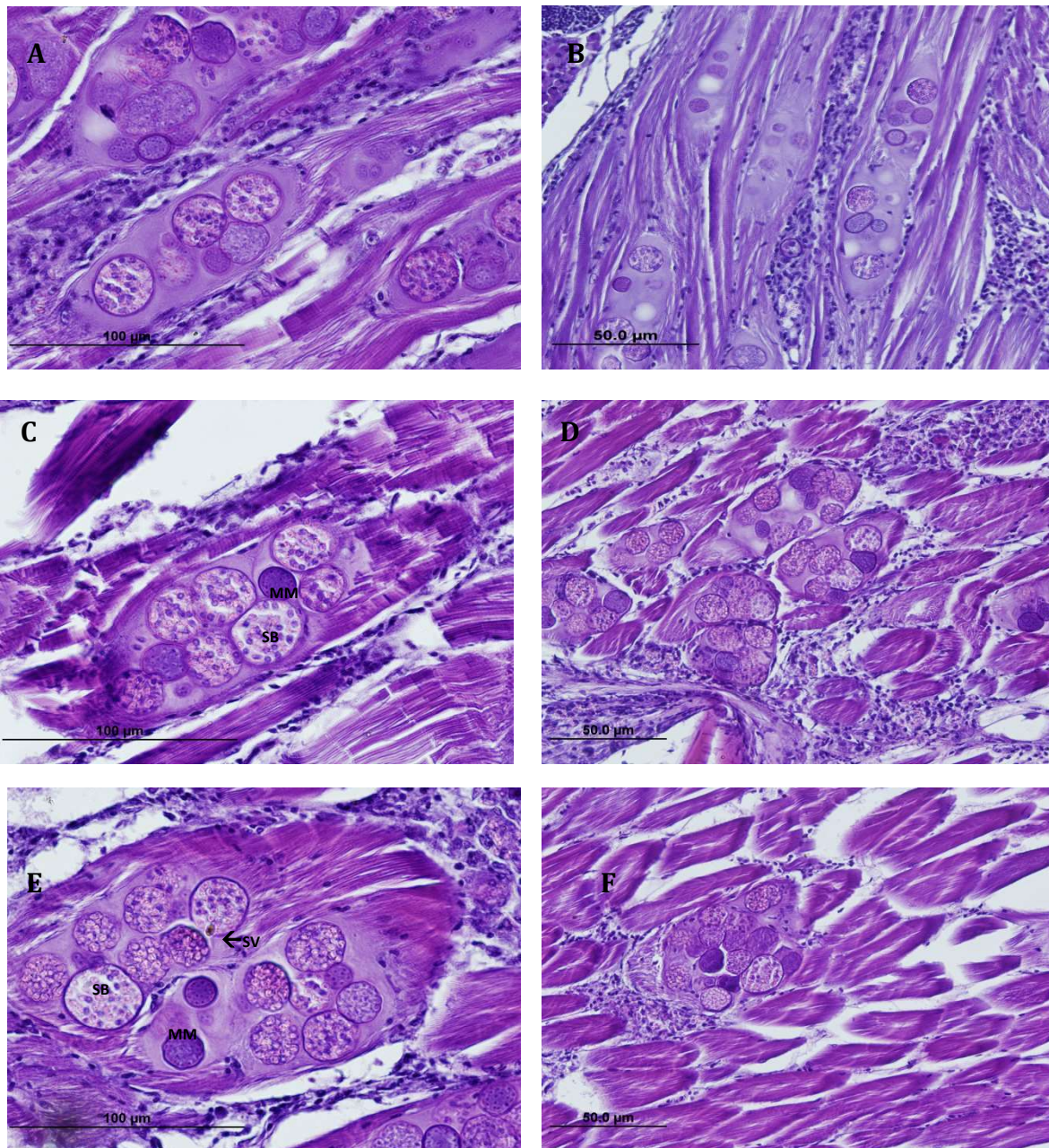
Tabulka č. 7: Výskyt Mikrosporidií a Oodinií.

sada vzorků	mikrosp.nález PH	Mikrosporidie (PCR)	Oodinium
AC 01-02	ne	ne	ano
AN 01-03	ne	ne	ano
DF 01-02	ne	ne	ne
HF01-03	ne	ano	ne
HH01-06	ne	ne	ano
HR01-05	ano	ano	ne
IK01-22	ne	ne	ano
NM01-02	ne	ne	ne
PA01-04	ano	ano	ano
PA05-09	ne	ne	ano
PI01-06	ne	ne	ano
PI07-31	ano	ano	ne
PI39-53	ano	ne	ne
PI 53-65	ano	ne	ano
PN1-02	ne	ne	ano
PR 01-06	ne	ne	ano
PT01-12	ne	ne	ne
PTi01-02	ne	ne	ne
PTN01-09	ne	ne	ano
PTN 10	ne	ano	ano
TH01-08	ne	ne	ano

4.2. Histologické vyšetření

Histologické vyšetření prokázalo v mnoha případech silnou infekci mikrosporidii. Obrázek 8 znázorňuje výskyt různých stádií vývoje mikrosporidií – jednojaderné meronty, mnohobuněčné meronty a sporoblasty obsažené ve sporoforním váčku. Zaznamenala jsem také zkapalnění svalové tkáně působením parazita.

Obr.8 (A-F): Mikroskopické snímky Mikrosporidií z histologického vyšetření.



A-B: Mikrosporidie v různých vývojových stádiích (hostitel - *Hemigranus rhodostomus* (HR01)).

C-D: Mikrosporidie ve svalovině hostitele. (hostitel - *Paracheirodon innesi* (PI40)).

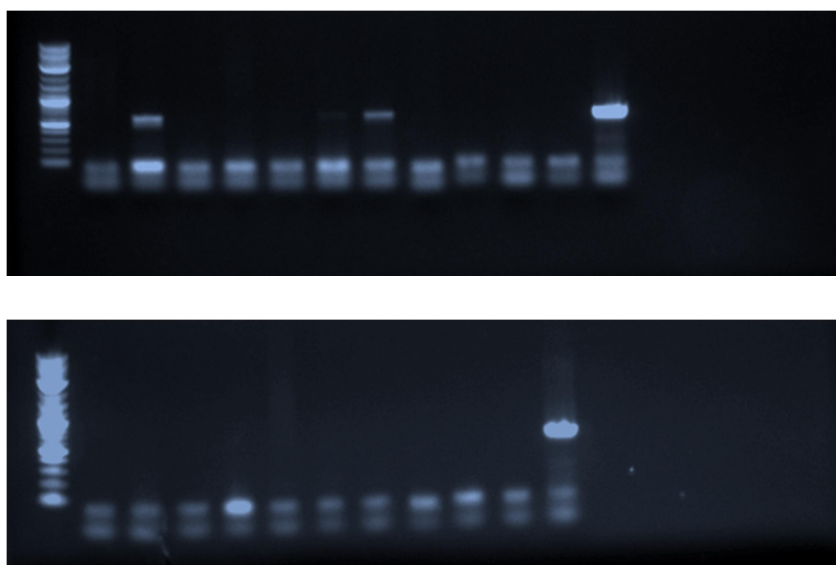
E-F: Mikrosporidie v cytoplasmě ve svalovině hostitele. (hostitel - *Paracheirodon innesi* (PI42)).

MM – mnohobuněčný meront, SB – sporoblast, SV – sporoforní vakuola.

4.3. PCR diagnostika

Pro PCR diagnostiku byly školitelem navrženy tři sady primerů, které by umožnily amplifikaci třech různých úseků DNA zahrnující SSU rDNA, ITS a LSU rDNA. Před samotnou optimalizací PCR byly vybrané vzorky rozděleny na dvě části a vyizolovány pomocí klasické fenol-chloroformové metody a to pro jednu sadu s krokem homogenizace tkáně pomocí zirkonových kuliček v bead beateru a druhá sada byla izolována bez tohoto kroku. Výsledek naznačil nutnost kroku homogenizace tkáně pomocí bead beateru – bez použití homogenizace nevyšel ani jeden pozitivní vzorek (Obr. 9).

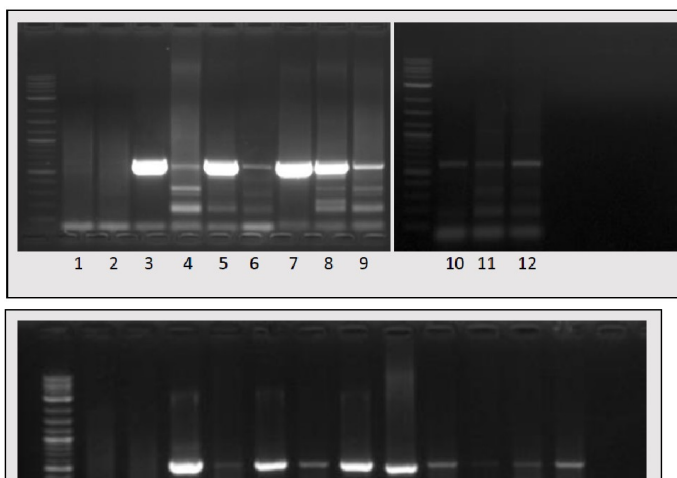
Obr. 9 **Horní snímek gelu** znázorňuje PCR vzorků, které byly izolovány po homogenizaci bead beaterem. **Spodní snímek gelu** bez použití homogenizace. Vzorek zcela vpravo je pozitivní kontrola. Velikost produktu je přibližně 600bp.



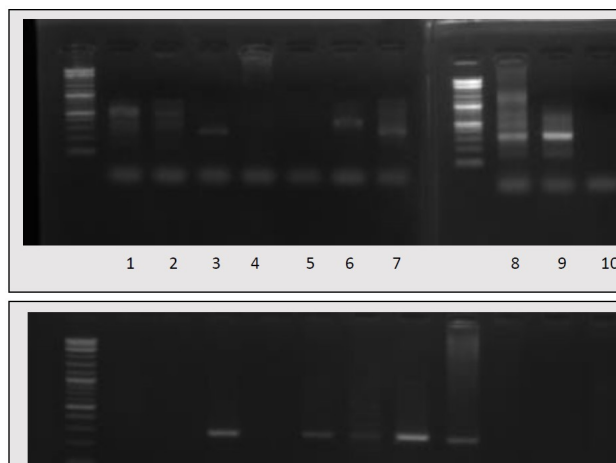
K testování nejvhodnější kombinace primerů byly vybrány tři druhy polymerázy, aby se předešlo ovlivnění PCR vybranou polymerázou. Testovali se tři kombinace primerů A až C (viz metodika). Nejlepší kombinace primerů byla stanovena kombinace s označením A, která umožňovala amplifikaci úseku na SSU rDNA o délce přibližně 600bp. Primery amplifikovaly všechny mikroskopicky pozitivní vzorky při použití polymerázy RedTaq a AccuPower. Titanium polymeráza neamplifikovala žádný produkt. Kombinace primerů označená B amplifikovala slabě přibližně polovinu vzorků pomocí polymerázy RedTaq a AccuPower. Titanium polymeráza neamplifikovala žádný produkt. Kombinace primerů označená C

neamplifikovala žádný produkt za použití všech tří polymeráz (negativní gely nejsou zobrazeny).

Obr. 10 PCR s použitím primerové kombinace A (600bp produkt). **Horní snímek gelu** znázorňuje PCR vzorků, které byly amplifikovány polymerázou AccuPower. **Spodní snímek gelu** znázorňuje PCR vzorků, které byly amplifikovány polymerázou RedTaq. Jamky 1 a 2 obsahují vzorek s negativním mikroskopickým nálezem mikrosporidií. Jamky 3-12 obsahují vzorek s pozitivním mikroskopickým nálezem mikrosporidií.

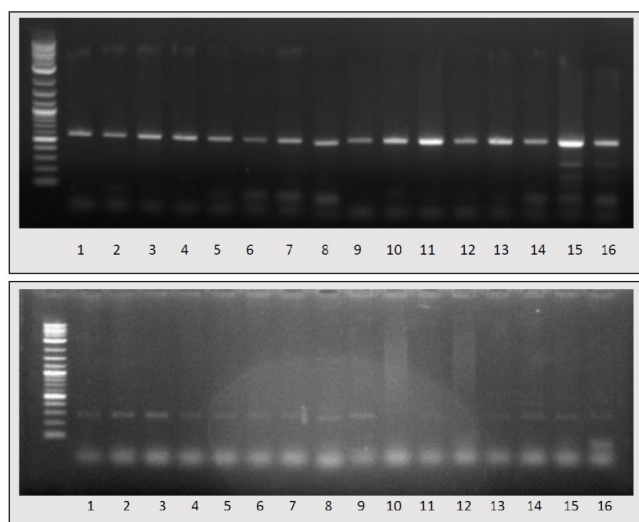


Obr. 11 PCR s použitím primerové kombinace B (300bp produkt). **Horní snímek gelu** znázorňuje PCR vzorků, které byly amplifikovány polymerázou AccuPower. **Spodní snímek gelu** znázorňuje PCR vzorků, které byly amplifikovány polymerázou RedTaq. Jamky 1 a 2 obsahují vzorek s negativním mikroskopickým nálezem mikrosporidií. Jamky 3-12 obsahují vzorek s pozitivním mikroskopickým nálezem mikrosporidií.



Dále jsem testovala nejvhodnější nasedací teplotu primerů pro průběh PCR. Zjistila jsem, že různá nasedací teplota neměla vliv na výsledný zisk PCR produktu (Obr. 12).

Obr. 12 Gradientová PCR na vybraných dvou vzorcích. Jamka 1-8 a 9-16 jsou rozmezí teplot od 53°C po 64°C pro dva vzorky. **Horní snímek** znázorňuje gel při použití primer kombinace A (600bp produkt) a **dolní snímek** při použití primer kombinace B (300bp produkt).



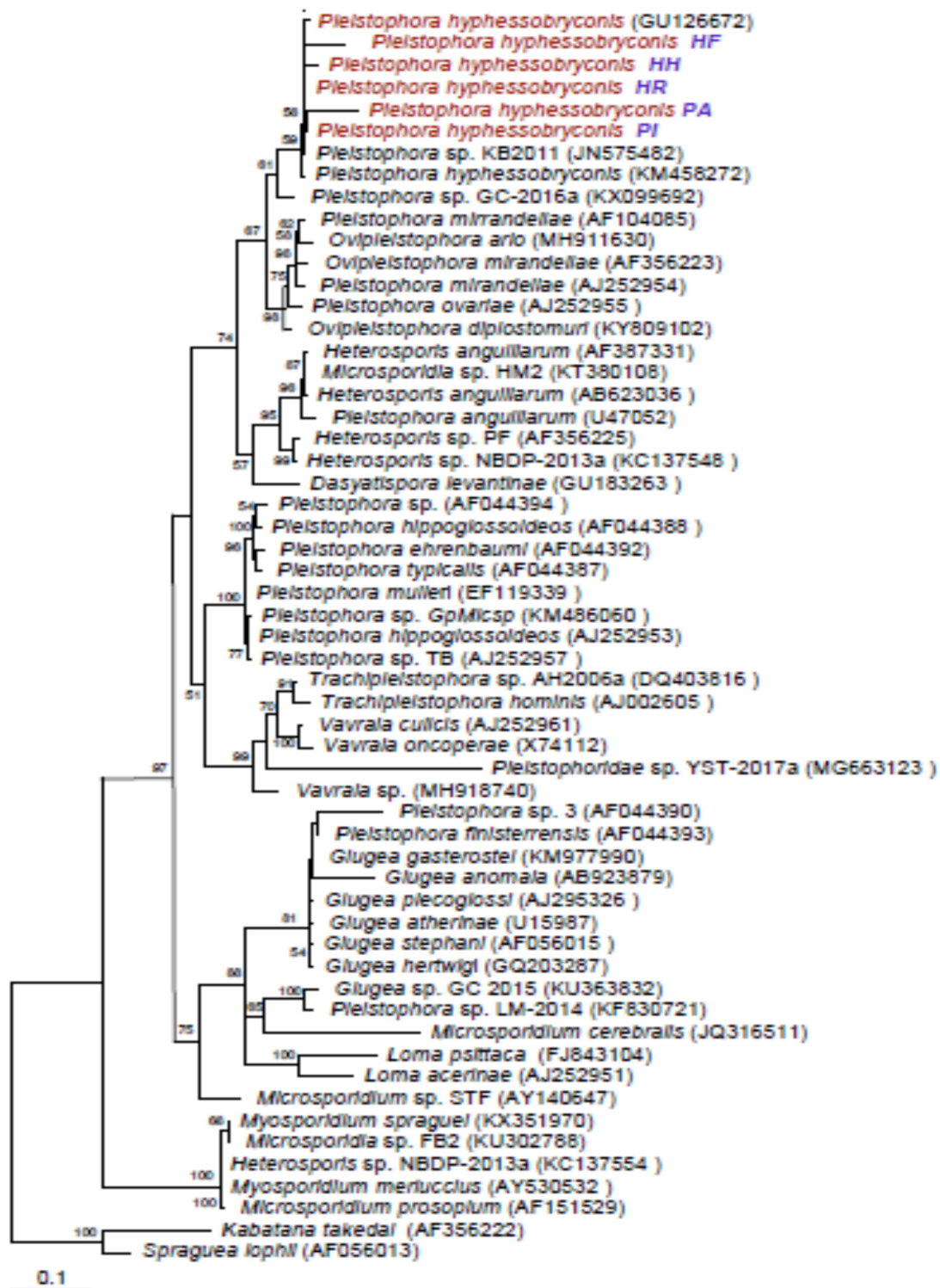
PCR diagnostika s využitím primer kombinace A (600bp produkt) pomohla odhalit infekci u mikroskopicky negativních ryb druhu *Pelvicachromis taeniatus nigeria* (jeden pozitivní vzorek z 14 testovaných), *Hyphessobrycon herbertaxelrodi* (jeden pozitivní vzorek

z 18 testovaných), a *Heterandria formosa* (tři pozitivní vzorky ze šesti testovaných). Pozitivní PCR byla potvrzena u *Paracheirodon innesi* a *Hemigramus rhodostomus*, u kterých byla mikrosporidie prokázána i mikroskopicky. Zajímavé je, že *P. axelrodi* byl PCR negativní, přestože u něj byl prokázán pozitivní mikroskopický nález.

4.4. Sekvence a fylogenetická analýza

Celkem se podařilo získat SSU rDNA sekvence mikrosporidií z pěti hostitelů. Ostatních 11 skrínovaných hostitelů bylo PCR negativních. Fylogenetická analýza odhalila, že všech pět sekvencí se větví s dvěma sekvencema *Pleistophora hyphessobryconis* (GU126672 a KM458272) a se sekvencí nepojmenovaného druhu *Pleistophora* sp. (JN575482). Všechny vyšetřované pozitivní ryby tedy byly infikovány jedním druhem mikrosporidie *P. hyphessobryconis*. Podpora uzlu spojující sekvence *P. hyphessobryconis* byla velmi nízká – 59% bootstrapů (ML analýza) a 0,67 posteriorní pravděpodobnosti (Obr. 13). Dvě sekvence *P. hyphessobryconis* HF a PA mají ve stromu poměrně delší větve naznačující určitou odlišnost od ostatních sekvencí.

Fylogeneticky nejbližší sekvence k *P. hyphessobryconis* je sekvence druhu *Pleistophora beebei* (KX099692), která parazituje ve svalovině tropické ryby Jižní Ameriky *Brachyhypopomus beebei*. Tato skupina vytváří sesterskou větev k druhům rodu *Ovipleistophora* a *Pleistophora*, které byly popsány z oocytů sladkovodních ryb v Evropě. *P. hyphessobryconis* není blízce příbuzná se skupinou osmi sekvencí, které všechny náležejí k druhům rodu *Pleistophora* včetně typového druhu *P. typicalis* Gurley, 1893 (Obr.13).



Obr. 13 Fylogenetický strom konstruovaný metodou maximální pravděpodobnosti. Čísła u nodů značí hodnoty bootstrapové podpory. Nově získané sekvence jsou označeny červeně. (HH = *Hyphessobrycon herbertaxelrodi*, HF = *Heterandria formosa*, PA = *Paracheirodon axelrodi*, HR = *Hemigramus Rhodostomus*, PI = *Paracheirodon innesi*). Přístupové kódy do genové banky jsou uvedeny za jednotlivými taxony v závorkách.

5. Diskuze

Mikrosporidióza je v chovech neonovitých ryb velký problém a má za následek velké ztráty pro chovatele. Onemocnění je způsobeno druhem *Pleistophora hyphessobryconis*, která byla popsána z širokého spektra akvarijních ryb různých čeledí (Characidae, Cyprinidae, Cyprinodontidae, Poeciliidae, Cichlidae), včetně modelových organismů *Danio rerio* a *D. nigrofasciatus* (Steffens 1962). Toto široké spektrum hostitelů naznačuje, že by některé druhy ryb mohly být napadeny nějakou jinou příbuznou mikrosporidií (Sanders a kol. 2010). Dosud se toto ovšem nepodařilo vyjasnit, protože chybí sekvenční data mikrosporidií napadající tyto hostitele. Ve své práci jsem se proto zaměřila na druh *P. hyphessobryconis* a pokusila jsem se ho detekovat u co nejširšího spektra hostitelů, morfologicky ho dokumentovat a sekvenčně prokázat příslušnost k jednomu druhu či více druhům.

Neonka obecná je typovým hostitelem *P. hyphessobryconis* (Sanders a kol. 2010) a v mé bakalářské práci jsem potvrdila, že je i nejčastějším hostitelem tohoto parazita. Prevalence infekce byla velmi vysoká, nicméně to neodráží skutečnou prevalenci mikrosporidie v chovech akvaristů, ale skutečnost, že chovatelé nám dodávali ryby, které vykazovaly určité známky infekce.

Jako přesnější metodu pro důkaz mikrosporidií jsem použila PCR a následnou sekvenaci vybraných vzorků, abychom lépe určili, o jaký konkrétní druh mikrosporidie se jedná. Metoda PCR umožňuje větší záchytnost než mikroskopické vyšetření při pitvách (Fayer et al. 2003). Toto zjištění se částečně potvrdilo i při mé práci, neboť se často stávalo, že mikroskopický nález byl negativní, ale přesto byl pozitivní výsledek PCR. Například ze šesti vyšetřených teter císařských nebyla ani u jedné prokázána mikroskopicky nákaza mikrosporidiemi, ale přesto PCR zjistila 50% prevalenci. To může být dáno tím, že infekce mikrosporidiemi byla ve velmi časném stádiu a objevit časně meronty ve světelném mikroskopu není snadné. Nebo mohla být infekce velmi malá a při vyšetřování jsem ji nezachytila.

Nicméně řada vzorků mikroskopicky pozitivní mi vyšla PCR negativní. Příčinou negativního výsledku může být kromě chyby pipetování nízký výtěžek DNA mikrosporidií, kdy spory jsou velmi rezistentní a musí se důkladně rozbít v beadbeateru. Dále negativní výsledek mohla způsobit nějaká inhibice v konkrétním vzorku, např. vysoká koncentrace inhibitorů obsažených v hostitelské tkáni nebo i vysoká koncentrace samotné hostitelské DNA může působit inhibičně na průběh PCR (Lacroix et al 2016). V neposlední řadě mohly selhat primery, kdy nákaza mohla být způsobena nějakým fylogeneticky vzdáleným druhem

mikrosporidie. Pro ověření by bylo třeba se pokusit o amplifikaci genu pomocí jiných primerů.

Na základě výsledků PCR a sekvenace byl zjištěn pouze druh *Pleistophora hyphessobryconis* u všech pozitivních hostitelů. Zjistila jsem, že převážná část hostitelů jsou neonovité druhy ryb. Celkem byla nákaza zjištěna u pěti druhů hostitelů. Byla zde snaha najít i jiné druhy mikrosporidií, ale jiné druhy se nenašly. I přesto, že jsem pitvala i např. druh *Ancistrus cirrhosus*, u kterého se mohou vyskytovat druhy mikrosporidií, patřící do rodu *Heterosporis*. Stejný případ jsme zaznamenali u hostitelského druhu *Apistogramma cacatuoides*. Obecně u cichlidovitých ryb se mohou ve vodních nádržích objevit druhy mikrosporidií, jako např. *Heterosporis cichlidarum*, avšak k jeho nálezu, dle výsledků PCR nedošlo. PCR negativní výsledky mohou být způsobeny i tím, že jsme se nezaměřili na tyto mikrosporidie, tedy že v rámci bakalářské práce nebyly vyvinuty primery, které by specificky amplifikovali tyto druhy nebo jim blízkce příbuzné.

U dvou sekvencí mikrosporidií *P. hyphessobryconis* (označených HF, PA) a částečně i u *P. hyphessobryconis* HH byla pozorována poměrně dlouhá větev značící unikátní změny v sekvenci a její odlišnost od ostatních. Toto bylo dáno tím, že v chromatogramu se vyskytovaly nejednoznačně určené báze. Ty pravděpodobně vznikly tak, že při sekvenaci přímo z PCR produktu mohlo dojít k sekvenování i několika odlišných kopií genu pro SSU rDNA. Takováto vnitrodruhová variabilita v SSU rDNA byla již u mikrosporidií dokázána (Mathis a kol. 1999).

Co se týče způsobů izolace DNA vzorků, jako nejúčinnější je izolace DNA s předchozím krokem homogenizace vzorku pomocí zirkonových kuliček. Stejně tak jsme vyzkoušeli tři různé typy polymerázy. Ukázalo se, že AccuPower polymeráza se zdá být účinnější při amplifikaci vzorků než RedTaq (Obr. 11). AccuPower je hot-startový typ polymerázy a je možné, že tato vlastnost hraje roli. Zajímavé je, že citlivá Titanium polymeráza, která je v laboratoři běžně používána na problematické vzorky, nepřinesla žádný výsledek. Velmi zajímavým zjištěním také bylo, že při mikroskopickém zkoumání, se kromě mikrosporidií vyskytovaly nálezy oodinií. Oodinia se vyskytovala velmi často na jedincích, u kterých jsme nezaznamenali nákazu mikrosporidiemi. Na tento fakt poukazuje tabulka č. 7. K upřesnění této teorie, že mikrosporidie se častěji vyskytují v hostitelích, kteří nejsou již napadeni jiným druhem parazita, nebo z jiného pohledu – oodinia napadají častěji ty ryby, které nejsou parazitovány mikrosporidiemi, je nutné tuto zajímavost ještě více prověřit, jestli se jedná pouze o náhodu.

6. Závěry

1. Podařilo se detekovat nákazu mikrosporidií *Pleistophora hypnessobryconis* u akvarijských ryb pomocí mikroskopického vyšetření.
2. Největší výskyt druhu *P. hypnessobryconis* se prokázal u neonovitých ryb, přičemž typový hostitel, *Paracheiroidon innesi*, byl rybou s největší prevalencí.
3. Pomocí metody PCR byla zjištěna celková prevalence a detekována infekce i u tří druhů hostitelů mikroskopicky negativních.
4. Na základě fylogenetické analýzy byl u pěti druhů hostitelů potvrzen druh mikrosporidie *Pleistophora hypnessobryconis*.

7. Literatura

- Bryan R. T., Schwartz D. A., (1999):** Epidemiology of microsporidiosis. In: Wittner M., Weiss L. (Eds.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC, pages 502-516
- Canning E. U., Lom J., (1986):** *The Microsporidia of Vertebrates*. Academic Press, London, 286-289
- Canning E. U., Hollister W. S., (1992):** Human infections with microsporidia. *Reviews in Medical Microbiology* 3, 35-42
- Canning E. U., (1993):** Microsporidia. In Kreier JP and Baker JR (eds.) *Parasitic protozoa*, 2nd ed., vol. 6. Academic Press, Inc., New York, pages 299-385
- Cavalier-Smith, (1983):** 6-kingdom classification and a unified phylogeny. In Schenk HEA and Schwemmler WS (eds.), *Endocytobiology*, vol. 2. Walter de Gruyter & Co., Berlin, Germany, pages 1027-1034
- Didier, E. S., Weiss L. M., (2006):** Microsporidiosis: Current status. *Current Opinion in Infectious Diseases* 19; pages 485-492
- Encephalitozoon*-like body infection in man. *Arch. Pathol.* 67, pages 181-187
- Hirt R. P., Logsdon Jr. J. M., Healy B., Dorey M. W., Doolittle W. F., Embley T. M.,(1999):** Microsporidia are related to Fungi: Evidence from the largest subunit of RNA polymerase II and other proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(2), 580–585
- Horák, P., Volf, P., (2007):** *Paraziti a jejich biologie*, Praha, 314-318
- Huelsenbeck J. P., Ronquist F., (2001):** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees, *Bioinformatics*, 17(8): 754-755
- Kashyap D., Pandey H., Jaiswal K., Mishra S., (2019):** Fungal Diseases of Honey Bees: Current Status and Future Perspective, 7-27
- Katoh K., Standley M., (2013):** Multiple Sequence Alignment Software, Version 7: Improvements in Performance and Usability Author Notes. *Molecular Biology and Evolution*, Volume 30, Issue 4, 772–780

Keeling P. J., (2003): Congruent Evidence From Alpha-Tubulin and Beta-Tubulin Gene Phylogenies for a Zygomycete Origin of Microsporidia, 38(3):298-309

Keeling P. J., McFadden G. I., (1998): Origins of Microsporidia, 6(1):19-23

Keeling P. J., Luker M. A., Palmer J.D., (2000): Evidence From Beta-Tubulin Phylogeny That Microsporidia Evolved From Within the Fungi, Mol. Biol. Evol., 17(1):23-31

Keohane E., Weiss L., (1999): The Structure, Function, and Composition of the Microsporidian Polar Tube, 196-224

Lacroix Ch., Renner K., Cole E., Seabloom E. W., Borer E., Malmstrom C. M., (2016): Methodological Guidelines for Accurate Detection of Viruses in Wild Plant Species. Applied and Environmental Microbiology. Volume 82, 4-6

Larsson J. I. R. (1999): Identification of microsporidia. Acta Protozool 38:161-197

Li K., Chang O., Wang F., Liu CH., (2012): Ultrastructure, development, and molecular phylogeny of *Pleistophora hyphessobryconis*, a broad host microsporidian parasite of *Puntius tetrazona*, Parasitology Research volume 111, 1715–1724

Lom J., Dyková I., (1992): Protozoan Parasites of Fishes, Elsevier, Amsterdam, 315

Lom J., Nilsen F., 2003: Fish Microsporidia: Fine Structural Diversity and Phylogeny, Int J Parasitol. 33(2):107-27

Mathis A., Tanner I., Weber R., Deplazes P., (1999): Genetic and Phenotypic Intraspecific Variation in the Microsporidian *Encephalitozoon hellem*, Int J Parasitol. 29(5):767-70

Matsubayashi H., Koike T., Mikata T., Hagiwara S., (1959): A case of Encephalitozoon-like body infection in man. Arch. Pathol., 67: 181-187

Nägeli C., (1857): Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. Bot. Zeitung 15, 60–761

Peer Y., Ali A. B., Meyer A., (2000): Microsporidia: Accumulating Molecular Evidence That a Group of Amitochondriate and Suspectedly Primitive Eukaryotes Are Just Curious Fungi, Gene. 246(1-2):1-8

Pelikánová M. (2009): Mikrosporidiové infekce lidí. *Bakalářská práce*. Prf JU, 13-14

Sanders J. L., Lawrence C., Nichols D. K., Brubaker J. F., Peterson T. S., Murray K.N., Kent M.L., (2010): *Pleistophora hyphessobryconis*, (Microsporidia) infecting zebrafish (*Danio rerio*) in research facilities, *Dis Aquat Organ.*, 91(1), 47–56

Shadduck J. A., Orenstein J. M., (1993): Comparative pathology of microsporidiosis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 117; 1215-1219

Shadduck J. A., Watson W. T., Pakes S. P., Cali A., (1979): Animal infectivity of *Encephalitozoon cuniculi*. *J Parasitol* 65: 123-129

Snowden K. F., Didier E. S., Orenstein J. M., Shadduck J. A., (1998): Animal models of human microsporidial infections. *Lab. Anim. Sci.* 48: 589-592

Sprague V., Becnel J. J., Hazard E. I., (1992): Taxonomy of phylum Microspora. *Crit Rev Microbiol* 18: 285-395

Steffens W. (1962): Der heutige stand der verbreitung von *Pleistophora hyphessobryconis* Schäperclaus 1941 (Sporozoa, Microsporidia) *Parasitol Res.* 21: 535-541

Stamatakis A., (2014): RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 1;30(9): 1312-1313

Undeen A. H., Van der Meer R. K., (1999): Microsporidian intrasporal sugars and their role in germination. *J Invertebr Pathol* 73: 294-302

Vávra J., Lukeš J., (2013): Microsporidia and ‘The Art of Living Together’, In: Rollinson, D. (Ed.), *Advances in Parasitology*, Academic Press, 253–320

Voigt K., Kirk P. M., (2011): Recent developments in the taxonomic affiliation and phylogenetic positioning of fungi: impact in applied microbiology and environmental biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 90: 41-57

Vossbrinck C. R., Maddux J. V., Friedman S., Debrunner-Vossbrinck B. A., Woese C. R., (1987): Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature (London)* 326: 411-414

Vávra J., (2017): Mikrosporidie: houby, co nevypadají jako houby, aneb Sestry říše Fungi?, *Živa*, 260-261

Weber R., Bryan R. T., Schwartz D. A., Owen R. L., (1994): Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev* 7: 426-461

Internetové zdroje:

URL1 [https://www.semanticscholar.org/paper/Pleistophora-hyphessobryconis-\(Microsporidia\)-Danio-Sanders-Lawrence/8ed1dd6af288d9bd9eeba2e0e1f49d5748eee078](https://www.semanticscholar.org/paper/Pleistophora-hyphessobryconis-(Microsporidia)-Danio-Sanders-Lawrence/8ed1dd6af288d9bd9eeba2e0e1f49d5748eee078) **Sanders J. L., Lawrence C., Nichols D. K., Brubaker J. F., Peterson T. S., Murray K. N., Kent M. L., (2010):** *Pleistophora hyphessobryconis*, (Microsporidia) infecting zebrafish (*Danio rerio*) in research facilities, *Dis Aquat Organ*.

URL 2 <https://slideplayer.cz/slide/3958295/> **Lom J., Dyková I. (1992):** Protozoan Parasites of Fishes

URL 3 <https://svabblog.wordpress.com/2012/02/18/souziti-2-hmyzomorka-2/> **Švábík J. (2012):** blog Postřehy z Přírody, Soužití 2, Hmyzomorka

URL 4 <http://blogs.oregonstate.edu/collegeofveterinarymedicine/2010/02/16/research-profile-dr-michael-kent/> **Kent M. L., Sanders J. L., Lawrence C., Nichols D. K., Brubaker J. F., Peterson T. S., Murray K. N., (2010):** *Pleistophora hyphessobryconis*, (Microsporidia) infecting zebrafish (*Danio rerio*) in research facilities, *Dis. Aquat. Organ*.

URL 5 <https://picclick.de/Untergasser-Krankheiten-der-Aquarienfische-Diagnose-Behandlung-123642880140.html> **Untergasser D., (1989):** Krankheiten der Aquarienfische

URL 6 https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-18586-2_2 **Kashyap D., Pandey H., Jaiswal K., Mishra S. (2019):** Fungal Diseases of Honey Bees: Current Status and Future Perspective. In: Gupta A., Singh N. (eds) *Recent Developments in Fungal Diseases of Laboratory Animals*. Fungal Biology. Springer, Cham

Přílohy

Příloha 1: Seznam všech vyšetřených ryb s kódy a nálezy mikrosporidií.

Kód	latinský název	český název	LM-nález mikrosporidií	orgán	PCR-výsledek
PTN01	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	Pestřenec zlatový	ne	gills	NEG
PTN01	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	Pestřenec zlatový	ne	muscle	NEG
PTN01	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	Pestřenec zlatový	ne	skin	NEG
PTN02	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	Pestřenec zlatový	ne	gills	NEG
PTN02	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	Pestřenec zlatový	ne	muscle-fin	NEG
PTN03	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	Pestřenec zlatový	ne	gills	NEG
PTN03	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	Pestřenec zlatový	ne	muscle	NEG
PTN04	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	Pestřenec zlatový	ne	muscle	NEG
PTN05	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	Pestřenec zlatový	ne	muscle	NEG
PTN06	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	Pestřenec zlatový	ne	muscle	NEG
PTN07	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	Pestřenec zlatový	ne	muscle	NEG
PTN08	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	Pestřenec zlatový	ne	muscle	NEG
PTN009	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	Pestřenec zlatový	ne	muscle	NEG
PTN10	<i>Pelvicachromis taeniatus nigeria red</i>	Pestřenec zlatový	ne	muscle	POZ
PA01	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ano	gills	POZ
PA01	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ano	skin	POZ
PA02	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ano	gills	POZ
PA02	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ano	muscle	POZ
PA02	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ano	skin	POZ
PA03	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ano	gills	POZ
PA03	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ano	muscle	POZ
PA03	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ano	skin	POZ
PA04	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ano	skin	POZ
PA05	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ne	muscle	NEG
PA06	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ne	muscle	NEG
PA07	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ne	muscle	NEG
PA07	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ne	skin	NEG
PA08	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ne	muscle	NEG
PA08	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ne	skin	NEG
PA09	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ne	gills	NEG
PA09	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ne	muscle	NEG
PA09	<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Neonka červená	ne	skin	NEG
PI01	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ne	gills	NEG
PI01	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ne	muscle	NEG
PI02	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ne	gills	NEG
PI02	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ne	muscle	NEG
PI03	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ne	gills	NEG
PI03	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ne	muscle	NEG
PI04	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ne	gills	NEG
PI04	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ne	muscle	NEG
PI05	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ne	gills	NEG
PI05	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ne	muscle	NEG
PI06	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ne	gills	NEG
PI06	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ne	muscle	NEG
PI07	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	gills	NEG
PI07	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	muscle	NEG
PI07	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	skin	NEG
PI08	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	gills	NEG
PI08	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	muscle	NEG
PI08	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	skin	NEG
PI09	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	gills	NEG
PI09	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	muscle	NEG
PI09	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	skin	NEG
PI10	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	gills	POZ
PI10	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	muscle	NEG
PI10	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	skin	NEG
PI11	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	gills	NEG
PI11	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	muscle	NEG
PI11	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	skin	NEG
PI12	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	gills	NEG
PI12	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	muscle	NEG
PI12	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	skin	NEG

PR01	<i>Poecilia reticulata</i>	Živorodka duhová	ne	gills	
PR02	<i>Poecilia reticulata</i>	Živorodka duhová	ne	muscle	
PR03	<i>Poecilia reticulata</i>	Živorodka duhová	po	muscle	
PR04	<i>Poecilia reticulata</i>	Živorodka duhová	út	muscle	
PR05	<i>Poecilia reticulata</i>	Živorodka duhová	st	muscle	
PR06	<i>Poecilia reticulata</i>	Živorodka duhová	čt	skin	
HR01	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	gills	
HR01	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	muscle	
HR01	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	skin	
HR02	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	gills	
HR02	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	muscle	
HR02	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	skin	
HR03	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	gills	
HR03	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	muscle	NEG
HR03	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	skin	NEG
HR04	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	gills	NEG
HR04	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	muscle	NEG
HR04	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	skin	NEG
HR05	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	gills	NEG
HR05	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	muscle	POZ
HR05	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	skin	POZ
HR06	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	gills	NEG
HR06	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	muscle	POZ
HR06	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	skin	POZ
HR07	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	gills	NEG
HR07	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	muscle	NEG
HR07	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	skin	POZ
HR08	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	gills	NEG
HR08	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	muscle	NEG
HR08	<i>Hemigramus Rhodostomus</i>	Neonka červenohlavá	ano	skin	NEG
AN01	<i>Ancistrus sp.</i>	Krunýřovec skvrnitý	ne	muscle	NEG
AN01	<i>Ancistrus sp.</i>	Krunýřovec skvrnitý	ne	skin	NEG
AN02	<i>Ancistrus sp.</i>	Krunýřovec skvrnitý	ne	muscle	NEG
AN02	<i>Ancistrus sp.</i>	Krunýřovec skvrnitý	ne	skin	NEG
AN03	<i>Ancistrus sp.</i>	Krunýřovec skvrnitý	ne	muscle	NEG
AN03	<i>Ancistrus sp.</i>	Krunýřovec skvrnitý	ne	skin	NEG
HF01	<i>Heterandria formosa</i>	Tetra císařská	ne	muscle	POZ
HF02	<i>Heterandria formosa</i>	Tetra císařská	ne	muscle	POZ
HF03	<i>Heterandria formosa</i>	Tetra císařská	ne	muscle	POZ
PT01	<i>Puntius tetrazona</i>	Parmička čtyřpruhá (albín)	ne	muscle	NEG
PT02	<i>Puntius tetrazona</i>	Parmička čtyřpruhá (albín)	ne	muscle	NEG
PT03	<i>Puntius tetrazona</i>	Parmička čtyřpruhá (albín)	ne	muscle	NEG
PT04	<i>Puntius tetrazona</i>	Parmička čtyřpruhá (albín)	ne	muscle	NEG
PT05	<i>Puntius tetrazona</i>	Parmička čtyřpruhá (albín)	ne	muscle	NEG
PT06	<i>Puntius tetrazona</i>	Parmička čtyřpruhá (albín)	ne	muscle	
IK01	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	NEG
IK02	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	NEG
IK03	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	NEG
IK04	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	NEG
IK05	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
IK06	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
IK07	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
IK08	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
IK09	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
IK10	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
IK11	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
IK12	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
IK13	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
IK14	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
IK15	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
IK16	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
IK17	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
IK18	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
IK19	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
IK20	<i>Inpaichthys kerri</i>	Tetra královská	ne	muscle	
TH01	<i>Trigonostigma heteromorpha</i>	Razbora klínoskvrnná	ne	muscle	NEG
TH02	<i>Trigonostigma heteromorpha</i>	Razbora klínoskvrnná	ne	muscle	NEG
TH03	<i>Trigonostigma heteromorpha</i>	Razbora klínoskvrnná	ne	muscle	NEG
TH04	<i>Trigonostigma heteromorpha</i>	Razbora klínoskvrnná	ne	muscle	NEG
TH05	<i>Trigonostigma heteromorpha</i>	Razbora klínoskvrnná	ne	muscle	NEG
TH06	<i>Trigonostigma heteromorpha</i>	Razbora klínoskvrnná	ne	muscle	
TH07	<i>Trigonostigma heteromorpha</i>	Razbora klínoskvrnná	ne	muscle	
TH08	<i>Trigonostigma heteromorpha</i>	Razbora klínoskvrnná	ne	muscle	

PI53	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	muscle	NEG
PI54	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	muscle	POZ
PI55	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	muscle	POZ
PI56	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	muscle	POZ
PI57	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	muscle	POZ
PI58	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	muscle	POZ
PI59	<i>Paracheirodon innesi</i>	Neonka obecná	ano	muscle	
NM01	<i>Nannostomus marginatus</i>	Drobnouštka trpasličí	ne	muscle	NEG
NM02	<i>Nannostomus marginatus</i>	Drobnouštka trpasličí	ne	muscle	NEG
AC01	<i>Apistogramma cacatuoides</i>	Cichlidka papouščí	ne	muscle	NEG
AC02	<i>Apistogramma cacatuoides</i>	Cichlidka papouščí	ne	muscle	NEG
PN01	<i>Pygocentrus Nattereri</i>	Piraña Nattererova	ne	muscle	NEG
PN02	<i>Pygocentrus Nattereri</i>	Piraña Nattererova	ne	muscle	NEG
DF01	<i>Danio frankei</i>	Danio leopardí	ne	muscle	NEG
DF02	<i>Danio frankei</i>	Danio leopardí	ne	muscle	NEG
PTi01	<i>Puntius titteya</i>	Parmička duhová	ne	muscle	NEG
PTi2	<i>Puntius titteya</i>	Parmička duhová	ne	muscle	NEG
A(H2O)	filtr				NEG
B(H2O)	filtr				NEG
C(H2O)	filtr				NEG