

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Lokalizace a kvantifikace rybomorky *Sphaerospora molnari*
(Myxozoa) u kapa obecného

Diplomová práce

Bc. Martina Jedličková

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

Konzultant: MSc. Astrid Holzer, Ph.D.

České Budějovice 2017

Jedličková, M., 2017: Lokalizace a kvantifikace rybomorky *Sphaerospora molnari* (Myxozoa) u kapra obecného. [Localization and quantification of *Sphaerospora molnari* (Myxozoa) in common carp. Mgr. Thesis, in Czech.] – 72 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The thesis deals with localization and quantification of *Sphaerospora molnari* (Myxozoa) in common carp (*Cyprinus carpio*). *Sphaerospora molnari* is microscopic endoparasite which attacks various tissues and organs, preferentially parasitizing intracellularly (histozoic type) in a carp fry. In this work, we studied the course of parasite infection in the various tissues and organs of the host (blood, gills, skin, kidney, liver, and muscle) in laboratory conditions. The course of infection was detected using qPCR.

Prohlášení

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

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

V Českých Budějovicích dne 18. 4. 2017

Martina Jedličková

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli RNDr. Ivanu Fialovi, Ph.D. a své konzultantce MSc. Astrid Holzer, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, věcné připomínky, přátelský přístup a celkové vedení této diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat všem členům Laboratoře rybí protistologie Parazitologického ústavu, BC AV ČR za vlídné prostředí, přátelský přístup, cenné rady a pomoc při zvládnání jednotlivých molekulárních metod.

Další poděkování patří Aleši Lisnerovi za celkovou podporu; a taktéž mé rodině za umožnění studia a podporu při studiu a vzniku této diplomové práce.

OBSAH

1 Cíle práce.....	1
2 Úvod.....	2
2.1 Zařazení skupiny Myxozoa v rámci eukaryotických organismů	3
2.2 Klasifikace v rámci skupiny Myxozoa	4
2.3 Morfologie	5
2.4 Životní cyklus a hostitelé	6
2.5 Ekonomický a hospodářský význam myxozoí	9
2.6 Imunita	10
2.7 <i>Sphaerospora molnari</i>	10
2.7.1 <i>Morfologie a životní cyklus Sphaerospora molnari</i>	13
2.7.2 <i>Lokalizace stádií Sphaerospora molnari u kapra obecného</i>	14
2.8 Hostitelský druh – <i>Cyprinus carpio</i>	16
3 Materiál a Metody	18
3.1 Infekční pokus.....	18
3.2 Izolace DNA	19
3.3 Semi-kvantitativní analýza / prescreening	19
3.4 Kvantitativní analýza pomocí qPCR.....	21
3.5 Zpracování získaných hodnot	25
4 Výsledky	27
4.1 Lokalizace	27
4.2 Semi-kvantitativní stanovení množství parazitů / prescreening	27
4.3 Kvantitativní stanovení množství parazitů	29
4.4 Porovnání hostitelských jedinců	30
4.5 Porovnání záchytnosti metod.....	31
5 Diskuze.....	33
5.1 Průběh infekce parazitem <i>Sphaerospora molnari</i>	33
5.2 Porovnání metod detekce parazita <i>Sphaerospora molnari</i>	35
5.3 Porovnání jedinců	37
5.3.1 <i>Hostitel</i>	38
5.3.2 <i>Parazit</i>	39
5.3.3 <i>Přístroj a metodika</i>	39
6 Závěr	41
7 Seznam použitých zkratk	42
8 Reference	43
9 Přílohy	51

1 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo:

- provést experimentální infekci kapra obecného (*Cyprinus carpio*) v kontrolovaných podmínkách intraperitoneální injekcí krevních stádií *Sphaerospora molnari*.
- po intraperitoneální infekci krevními stádii odebrat příslušné tkáně, sledovat a detekovat pomocí kvantitativní PCR míru infekce ve vybraných orgánech (kůže, krev, žábry, játra, ledviny, svalovina) u 5 ryb ve 12 časových intervalech.
- zjistit relativní počet parazitů v jednotlivých orgánech, průběh proliferačních cyklů.

2 Úvod

Myxozoa Grassé, 1970 jsou skupinou mikroskopických mnohobuněčných organismů žijících parazitickým způsobem života, zejména jako cizopasnici tkání, orgánových dutin, ale i intercelulárně. Spektrum hostitelů je velmi široké, mezi typické mezihostitele patří ryby, mezi definitivní hostitele pak kroužkovci či mechovky (Fiala *et al.* 2015a). Většina myxozoi nepůsobí výrazné patologické změny, s výjimkou několika druhů, které mohou způsobovat závažná onemocnění a znatelné úhyny ryb (např. u lososovitých ryb *Myxobolus cerebralis* způsobuje tzv. vrtohlavost pstruhů či *Tetracapsuloides bryosalmonae* působí zánětlivé onemocnění ledvin), proto je význam myxozoi také hospodářský a ekonomický (např. Hedrick *et al.* 1998).

Myxozoa zahrnují dvě skupiny: Myxosporidia, která žijí v mořských a sladkovodních rybách, výjimečně v plazech, obojživelnících, ptácích a savcích, a Malacosporidia, která jsou popsána ze sladkovodních mechovek a ryb. V současné době je známo více než 2200 druhů myxozoi (Lom & Dyková 2006; Okamura *et al.* 2015), které se s 18 % výrazně podílí na celkové diverzitě žahavců (Okamura *et al.* 2015).

Tělo myxozoi je dobře adaptováno k parazitickému způsobu života. V průběhu evoluce bylo redukováno do formy vegetativních plasmodií a pro Myxozoa typických myxospor či aktinospor o velikosti zpravidla 10–20 μm . Kvůli této skutečnosti se zástupci ryboborek do nedávné doby považovali za jednobuněčná Protista. Dnes jsou řazeni mezi mnohobuněčné živočichy, konkrétně mezi žahavce Cnidaria (např. Siddall *et al.* 1995; Holland *et al.* 2010).

Myxozoa jsou v dnešní době populárním tématem. Kromě vývojových cyklů, fylogenetických vztahů a evolučních otázek je velkou neznámou také problematika celkové biodiverzity, širší hostitelského spektra jednotlivých druhů i celé skupiny. Výzkum této skupiny se také zabývá imunitní reakcí hostitele a úniky parazitů před touto imunitní odpovědí.

Tato diplomová práce je zaměřena na ekonomicky významný druh *Sphaerospora molnari* Lom, Dyková, Pavlásková et Grupcheva, 1983, který napadá plůdek kaprovitých ryb ve střední Evropě. Tato ryboborka je druhem histozoickým, infikuje zejména tkáň a mezibuněčné prostory (kůže, žábry) a má patogenní projevy. V rámci této studie jsem

se zabývala lokalizací a kvantifikací jednotlivých stádií rybomorky druhu *Sphaerospora molnari* u kapra obecného (*Cyprinus carpio* L.) v průběhu devítitýdenního infekčního pokusu. Pro kvantifikaci byla využívána metoda kvantitativní PCR (qPCR). Míra infekce byla sledována u vybraných orgánů – kůže, krev, žábry, játra, ledviny a svalovina. Pomocí statistických metod byl vyhodnocen průběh infekce v jednotlivých orgánech.

2.1 Zařazení skupiny Myxozoa v rámci eukaryotických organismů

Představy o zařazení skupiny Myxozoa mají za sebou dlouhou historii, během které došlo k významným přesunům v rámci eukaryotních organismů. Zpočátku se Myxozoa řadila na základě morfologických znaků i ultrastruktury mezi jednobuněčná Protista. Prokázat původ těchto parazitů se podařilo až po zavedení metod molekulární biologie.

První infekci parazitickými rybomorkami u síha písčinného (*Coregonus fera* – dnes již vyhynulý) popsal Jurine v roce 1825. Následně Bütschli v roce 1882 vytvořil skupinu Cnidosporidia, kam zařadil, kromě známých zástupců myxozoí, také mikrosporidie, a to na základě tvorby pólového točitého vlákna. Skupinu Cnidosporidia začlenil mezi jednobuněčné prvky tvořící spory v této době známé jako Sporozoa (např. spolu s druhem rodu *Plasmodium*). Společným znakem této skupiny byla tvorba spor a mikroskopická velikost (Okamura & Gruhl 2015). Ultrastrukturní znaky jako absence centriol či tubulární krysty v mitochondriích u některých taxonů také nasvědčovaly zařazení k protistům (Lom & Dyková 2006), ale tyto vlastnosti mohou být i v rámci příbuzných taxonů velmi variabilní.

Hypotéza o tom, že by se mohlo jednat o mnohobuněčné organismy, byla poprvé vyslovena již na konci 19. století (Štolc 1899). Tato hypotéza byla vznesena v historii ještě několikrát (např. Ikeda 1912). V roce 1938 byly spory myxozoí připodobňovány k žahavým buňkám žahavců (Weill 1938). Definitivně podpořit a prokázat mnohobuněčnost se povedlo až o mnoho let později na základě fylogenetické analýzy prvních získaných sekvencí 18S rDNA (genu pro RNA malé ribozomální podjednotky) (Smothers *et al.* 1994). První fylogenetická analýza zařadila Myxozoa na bázi skupiny Bilateria (Smothers *et al.* 1994), což bylo na základě další analýzy 18S rDNA potvrzeno (Schlegel *et al.* 1996). Naopak příbuznost myxozoí k žahavcům naznačila 18S rDNA analýza, do které byl zařazen parazitický žahavec *Polypodium hydriforme* (Siddall *et al.* 1995).

Definitivní představu o postavení Myxozoa v rámci Metazoa pomohlo také vyřešit „znovuobjevení“ druhu *Buddenbrockia plumatellae* Schröder, 1910 (syn. *Tetracapsula bryozoides*), který byl po dlouhou dobu považován za tajemný organismus. Nejprve byl přiřazován do různých skupin mnohobuněčných organismů z trojlistých (např. mezi červy ze skupiny Nematoda), avšak 18S rDNA analýza ho přiřadila nečekaně k myxozoím (Monteiro *et al.* 2002). Posléze bylo prokázáno, že pohybový aparát se skládá ze 4 bloků svalové hmoty, které jsou uspořádány tetradíálně, tedy stejně jako je tomu u žahavců (Jiménez-Guri *et al.* 2007). Toto zjištění, stejně jako objev minikolagenů, které jsou specifickými proteiny žahavců související s tvorbou žahavých buněk, pomohlo definitivně zařadit Myxozoa k žahavcům (Holland *et al.* 2010).

2.2 Klasifikace v rámci skupiny Myxozoa

Klasifikace skupiny Myxozoa je v posledních dekáдах velmi studovanou problematikou. V systému se odráží historické nepřesnosti zejména v neznalostech životních cyklů a nemožnosti aplikovat molekulární metody. Skupina Myxozoa obsahuje v současné době přes 2200 druhů zhruba v 60 rodech (Lom & Dyková 2006; Okamura *et al.* 2015). Většina sekvenčně známých rodů je polyfyletických či parafyletických. Díky přibývajícím poznatkům z molekulárně taxonomických studií je klasifikace této skupiny poměrně nestálá a v současné době probíhají revize zejména na úrovni rodů.

Dnes existují dvě uznávané třídy myxozoí, Malacosporea a Myxosporea. První ze jmenovaných skupin je druhově málo početná, zahrnuje jen dva druhy rodu *Tetracapsuloides*, a tři druhy rodu *Buddenbrockia*. Níže je uvedena jedna z posledních vytvořených klasifikací skupiny Myxozoa (Fiala *et al.* 2015b).

Phylum **Cnidaria**

Unranked subphylum **Myxozoa**

Class **Malacosporea**

Order **Malacovalvulida**

Family **Saccosporidae**: *Buddenbrockia*, *Tetracapsuloides*

Class **Myxosporea**

Order **Bivalvulida**

Suborder **Variisporina**

Family **Sphaeromyxidae**: *Sphaeromyxa*

Family **Myxidiidae**: *Myxidium*, *Zschokkella*, *Enteromyxum*, *Soricimyxum*, *Cystodiscus*

Family **Ortholineidae**: *Ortholinea*, *Neomyxobolus*, *Cardimyxobolus*, *Triangula*, *Kentmoseria*

Family **Sinuolineidae**: *Sinuolinea*, *Myxodavisia*, *Myxoproteus*, *Bipteria*, *Paramyxoproteus*, *Neobipteria*, *Schulmania*, *Noblea*, *Latyspora*

Family **Fabesporidae**: *Fabespora*

Family **Ceratomyxidae**: *Ceratomyxa*, *Meglitschia*, *Ellipsomyxa*, *Ceratonova*

Family **Sphaerosporidae**: *Sphaerospora*, *Wardia*, *Palliatum*

Family **Myxobilatidae**: *Myxobilatus*, *Acauda*, *Hoferellus* (*nomen conservandum*)

Family **Chloromyxidae**: *Chloromyxum*, *Caudomyxum*, *Agarella*

Family **Coccomyxidae**: *Coccomyxa*, *Auerbachia*, *Globospora*

Family **Alatosporidae**: *Alatospora*, *Pseudoalatospora*, *Renispora*

Family **Parvicapsulidae**: *Parvicapsula*, *Neoparvicapsula*, *Gadimyxa*

Suborder **Platysporina**

Family **Myxobolidae**: *Myxobolus*, *Spirosuturia*, *Unicauda*, *Dicauda*, *Phlogospora*

Laterocaudata, *Henneguya*, *Hennegoides*, *Tetrauronema*, *Thelohanellus*, *Neothelohanellus*, *Neohenneguya*, *Trigonosporus*

Incertae sedis in Bivalvulida: *Sigmomyxa*

Order **Multivalvulida**

Family **Trilosporidae**: *Trilospora*, *Unicapsula*

Family **Kudoidae**: *Kudoa*

Family **Spinavaculidae**: *Octospina*

Incertae sedis in Multivalvulida: *Trilosporoides*

2.3 Morfologie

Myxozoa jsou mikroskopičtí mnohobuněční parazité s velmi redukováným tělem. V současnosti existuje mnoho důkazů o tom, že zástupci skupiny Myxozoa se vyvinuli z volně žijících žahavců. Při přechodu na parazitický způsob života své tělo velmi redukovali a z tohoto důvodu byli považováni za jednobuněčné organismy (Okamura & Gruhl 2015). Ale rybomorky mají charakteristické synapomorfie společné s mnohobuněčnými organismy (diferenciace buněk, desmozomu podobné buněčné spoje) (Canning & Okamura 2003).

Jedním ze stádií, které se objevuje u myxozoi, je vegetativní stádium, tzv. plasmodium. Plasmodium je mnohobuněčný, velmi často makroskopický útvar, který je tvořen z více vegetativních jader a generativních buněk. Další diferenciací vznikají spory. Plasmodia mohou být dvou typů: 1. plasmodium, které je vícejaderné a vnitřní buňky produkují větší množství spor poměrně velké velikosti (> 2 µm); 2. pseudoplasmodium, které je naopak jednojaderné a vnitřní buňky produkují jednu až dvě spory. Plasmodium není

pouze sporogonickou fází, ale také aktivní formou, která přijímá potravu pomocí pinocytózy (Feist *et al.* 2015).

Charakteristické morfologické znaky pro skupinu Myxozoa využívané v taxonomii se nachází na spoře. U myxozoi lze nalézt více druhů spor. Spory jsou většinou mikroskopických rozměrů a obsahují vysoce komplexní aparát, tzv. pólové vlákno, které neslouží k přenosu sporoplasmy, ale jedná se o uchycovací zařízení, kterým se parazit přichycuje ke svému hostiteli. Pólový váček, ve kterém je stočeno pólové vlákno, a nematocysta jsou znaky společné pro Myxozoa a volně žijící žahavce (Canning & Okamura 2003).

Pro ultrastrukturu jednotlivých buněk myxozoi jsou charakteristické volně ložené ribozomy, mitochondrie s různými typy krist (tubulární, diskovité nebo ploché) a chybějící bičík a centrioly. Tato absence je vysvětlována jako sekundární ztráta během redukce těla po dobu evolučního vývoje (Lom & Dyková 2006).

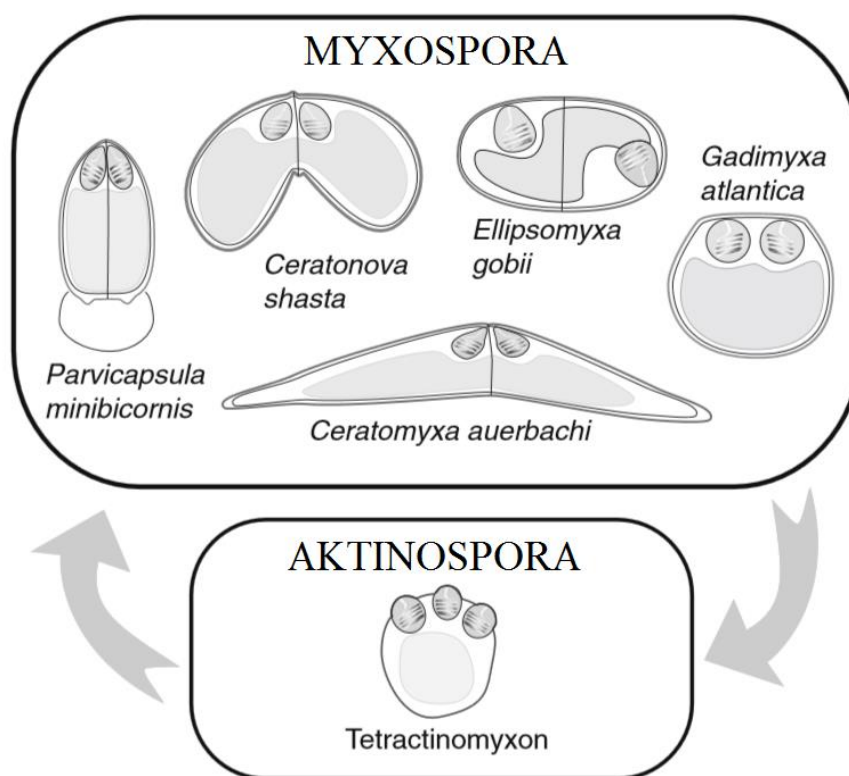
2.4 Životní cyklus a hostitelé

Ve dvouhostitelském životním cyklu zástupců myxozoi se střídají jako mezihostitelé obratlovci a bezobratlí jako definitivní hostitelé. Typické jsou spory složené z několika buněk. V životním cyklu skupiny Myxosporea dochází ke střídání vývoje dvou odlišných typů spor, myxospory u mezihostitelů a aktinospory u definitivních hostitelů. U druhé skupiny, malakosporeí, nalezneme spory malakosporeového typu (Fiala *et al.* 2015a).

Myxosporeová infekce obratlovčích hostitelů (nejčastěji ryby) začíná průnikem infekčního améboidního zárodku z aktinosporeové spory, který je do těla vpraven přes kůži či žábry. Sporoplasma se dostává do intercelulárního prostředí, začíná se utvářet pro Myxozoa typický útvar „buňka v buňce“, kdy se sekundární buňky (vzniklé endogenně) nachází uvnitř primární buňky (Hausmann & Hülsmann 2003). Kolem generativních jader se tvoří generativní buňky. Množením, obalováním a následnou diferenciací těchto buněk vznikají spory. Tyto spory se uvolňují během života močí či žlučí, případně po smrti mezihostitele, a napadají hostitele definitivního, ve kterém se vyvíjí odlišným způsobem než v mezihostiteli. Spory myxosporeového typu uvolněné z obratlovčího mezihostitele se dostávají do střeva nebo coelomové dutiny bezobratlého definitivního hostitele. Sporoplasma obsažená ve spoře se uvolňuje a počiná aktinosporeová fáze, která zahrnuje

sexuální množení a diferenciaci na aktinospory (El-Matbouli & Hoffmann 1998).

- **Myxosporeová spora (Obr. 1):** Myxosporeová spora se vyskytuje u mezihostitele. Má mikroskopické rozměry a je mnohobuněčná. Typicky se objevuje tvorba buněk v již vzniklé buňce, následně se jádra diferencují na vegetativní a generativní. Buňky generativní obklopují buňky vegetativní. Vznikají spory tvořící se spoluprací několika buněk s typickými hladkými či strukturovanými chlopněmi a pólými váčky, které vznikají přeměnou kapsulogenních buněk se sporoplasmou a vlastním patogenním agens.
- **Aktinosporeová spora (Obr. 1):** Mnohobuněčná spora s triradiální symetrií, třemi pólými váčky a třemi chlopněmi. Toto stádium vzniká v kroužkovicích a je infekční pro mezihostitele, který se nakazí při kontaktu s volně plovoucími sporami.



Obr. 1: Spory myxozoí skupiny Myxosporae (převzato z Fiala *et al.* 2015a).

Zástupci menší skupiny Malacosporae jsou parazité žijící v tělní dutině mechovky (Bryozoa). Jedná se o červovité „vaky“, ve kterých se utváří jednotlivé spory označované jako malakosporeové spory. Malacosporae byla detekována minimálně z 21 druhů rybích

hostitelů (Bartošová-Sojková *et al.* 2014). V rybím hostiteli vytváří morfologicky uniformní stádia kulovitěho tvaru se dvěma buňkami, které obsahují pólové váčky (Kodádková 2014).

- **Malakosporeová spora:** Tento typ spory má měkké stěny a je tvořen 2 či více pólovými váčky a sporoplasmami.

Jak už bylo řečeno výše, než dojde k samotné sporogonii, probíhá u zástupců *Myxosporea* složitý presporogonický vývoj. Presporogonická stádia se vyvíjí z aktinosporeové sporoplasmy. U mnoha druhů myxozoí není tato část životního cyklu objasněna. Vývoj neprobíhá v jedné konkrétní tkáni, ale dochází k migracím a přesunům v těle hostitele. Např. u rybomorky *Myxobolus cerebralis* lze nalézt presporogonická stádia obratlovčího hostitele v epidermis a v centrálním i periferním nervovém systému. Tato stádia migrují do obratlů a lebeční chrupavky, kde následně dochází k první sporogonické fázi (El-Matbouli & Hoffmann 1998).

U námi studovaného rodu je zdokumentovaným příkladem *Sphaerospora truttae*, kdy dochází k migraci ze vstupních míst přes krev do vnitřních orgánů; zde putuje pravděpodobně necíleně do ledvin, jater a sleziny. Kromě ledvin, kde dochází k proliferaci a sporogonii, vymizí ze všech orgánů (aktivace makrofágů) (Holzer *et al.* 2003). Presporogonická stádia v krvi mezhohostitele jsou známa i u dalších sférospor. Studovaný druh *Sphaerospora molnari* má též potvrzená krevní presporogonická stádia (Eszterbauer *et al.* 2013; Holzer *et al.* 2014; Hartigan *et al.* 2016).

U zástupců malakosporeí jsou známa presporogonická stádia v mechovkách, a to u dvou druhů *Buddenbrockia* spp. a taktéž u *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Canning *et al.* 2002; McGurk *et al.* 2005; Canning *et al.* 2008). Tato stádia jsou améboidního typu, buňky jsou jednojaderné, dělí se a migrují hostitelem. Případně dokáží tvořit vakovitá či červovitá stádia. Více o presporogonických stádiích je toho známo pouze u druhu *T. bryosalmonae*. Presporogonické stádium je v tomto případě totožné se sporoplasmou, která se nachází v malakosporeové spoře. Skládá se z primární buňky, ve které je obsažena sekundární buňka. Během této fáze dochází k masivnímu dělení (Grabner & El-Matbouli 2008).

Rybomorky mají v mnoha případech úzkou, občas naopak velmi širokou specificitu. Některé druhy jsou schopné napadat pouze určitý nebo blízce příbuzný hostitelský druh.

Cech *et al.* (2012) zjistili, že rybomorka *Myxobolus alvarezae* je schopná parazitovat pouze u rodu *Leuciscus*. Striktní hostitelská specifita se také ukazuje u námi studovaného hostitele *Cyprinus carpio*, na kterém parazitují např. rybomorky *Myxobolus dispar*, *M. basillamellaris*, *M. cyprinicola*, *Thelohanellus nikolskii*, či *Sphaerospora dykovae* a námi studovaný druh *S. molnari* (Dyková & Lom 1988; Feist *et al.* 2015). Naopak některé druhy mají velmi širokou hostitelskou specifitu, např. *Kudoa thyrssites* dokáže infikovat ryby dokonce z různých řádů (Moran *et al.* 1999).

U rybomerek se neobjevuje pouze hostitelská, ale také tkáňová či orgánová specifita, tím je myšleno místo, kde se vyvinou zralé spory, nikoli lokace, které jsou součástí migrační trasy parazitů. Jak ukazují některé studie, vývoj mnoha rybomerek úzce souvisí se specifickou tkání. Mnoho druhů rybomerek je úzce spjato s žábami, kůží, ledvinami, močovým měchýřem, krví a podobně (Feist *et al.* 2015).

2.5 Ekonomický a hospodářský význam myxozoi

Myxozoa jsou řazena mezi hospodářsky významné patogeny ryb v chovech i ve volné přírodě. Všechny druhy této skupiny jsou parazitické, ale pouze některé organismy mohou mít významný dopad na život rybích hostitelů a způsobovat masové úhyny i ekonomicky významných ryb. V současné době je velkým problémem neúplná znalost např. životních cyklů, imunitních odpovědí a vztahů parazit-hostitel. Všechny tyto nejasnosti také ovlivňují ekonomické ztráty v chovech ryb.

Myxozoa jsou původci velmi závažných onemocnění, např. zánětlivého onemocnění ledvin (PKD) způsobované *Tetracapsuloides bryosalmonae*. V mořích dokáží druhy rodu *Kudoa* ovlivnit svalovinu ekonomicky významných druhů ryb, snížit produkci masa či maso znehodnotit. Ve sladkých vodách se vyskytuje druh *Myxobolus cerebralis* způsobující tzv. vrtohlavost pstruhů. Tento druh může mít vliv na pokles populace volně žijících pstruhů (Feist & Longshaw 2006).

V současné době se ukazuje, že ne všechny nakažené ryby vykazují známky onemocnění, to znamená, že každý hostitelský jedinec má odlišnou náchylnost k infekci daným parazitem. Různá míra onemocnění může být způsobena mnoha faktory, jak z pozice hostitele (např. specifická, protektivní imunita; genetické faktory), parazita (virulence, míra specifity; složitost vývojových cyklů), tak z environmentálního prostředí (teplota, pH vody),

ve kterém se hostitel a parazit vyskytují (např. Fontes *et al.* 2015).

2.6 Imunita

U ryb lze nalézt podobné imunitní mechanismy jaké jsou známy u jiných tříd obratlovců (Corbel 1975). Byly objeveny jak nespecifické, tak adaptivní mechanismy imunitní odpovědi v reakci na myxozoární infekci. U adaptivní imunity hrají největší roli zejména specifické protilátky, u vrozené je imunita řízena pomocí lymfocytů, granulocytů, fagocytů, NK buněk (natural killer cells) nebo komplementu. Specifické protilátky tvořené hostitelem byly prokázány u infekcí mnoha druhů rybmork, např. *Myxobolus cerebralis* (Griffin & Davies 1978), *M. artus* (Furuta *et al.* 1993) (přímo u námi studovaného hostitelského druhu *Cyprinus carpio*) či *Enteromyxum scophthalmi* (Sitjà-Bobadilla *et al.* 2004). V některých případech se dokonce může objevovat částečná či úplná protektivní imunita (Alvarez-Pellitero 2008). Pokud hostitel již jednou prodělal infekci rybmorkou *Tetracapsuloides bryosalmonae*, při další nákaze se zotavuje rychleji (Ferguson & Ball 1979; Gorgoglione *et al.* 2013). Stejně tak byla nalezena protektivní imunita proti *Enteromyxum scophthalmi* (Sitjà-Bobadilla *et al.* 2007).

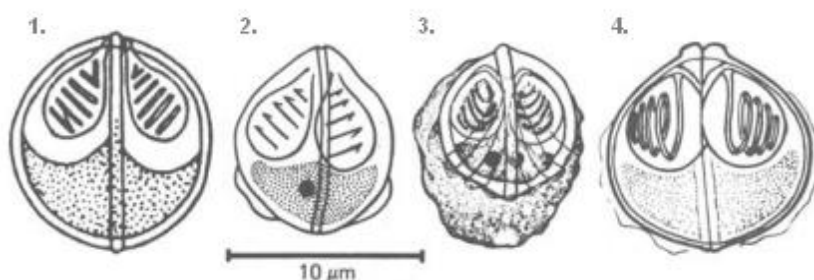
Velmi zkoumaným odvětvím parazitologie je také vývoj únikových mechanismů parazita proti imunitní odpovědi. U zástupců skupiny Myxozoa se objevují různé mechanismy úniku proti imunitním reakcím hostitelského organismu. Myxozoa mohou upřednostňovat části těla hostitele s menším množstvím imunitních buněk nebo s nižší imunitní odpovědí, ale také se schovávat do buněk svého hostitele. Jsou známy případy imunosuprese a imunomodulace (Okamura *et al.* 2015). Krevní stádia studovaného druhu *Sphaerospora molnari* unikají buněčné imunitě tak, že se vyhýbají kontaktu s imunogenními buňkami v krvi pomocí buněčného pohybu (Hartigan *et al.* 2016).

2.7 *Sphaerospora molnari*

Sphaerospora molnari je taxonomicky řazena do skupiny Variisporinae, která má typicky 1–2 pólové váčky (zřídka 4), a velmi často se jedná o coelozoické druhy. Na nižší taxonomické úrovni patří *Sphaerospora molnari* do čeledi Sphaerosporidae s typickými sférickými až oválnými sporami s pólovými váčky ležícími v rovině kolmé na rovinu švu (Lom & Dyková 2006). Rod *Sphaerospora* Thélohan, 1892 zahrnuje některé rybmorky, které mají výrazné patogenní projevy a významný hospodářský i ekonomický

dopad na chov ryb. Nejvíce druhů rodu *Sphaerospora* jsou parazité kaprovitých ryb (např. Baska & Molnár 1988).

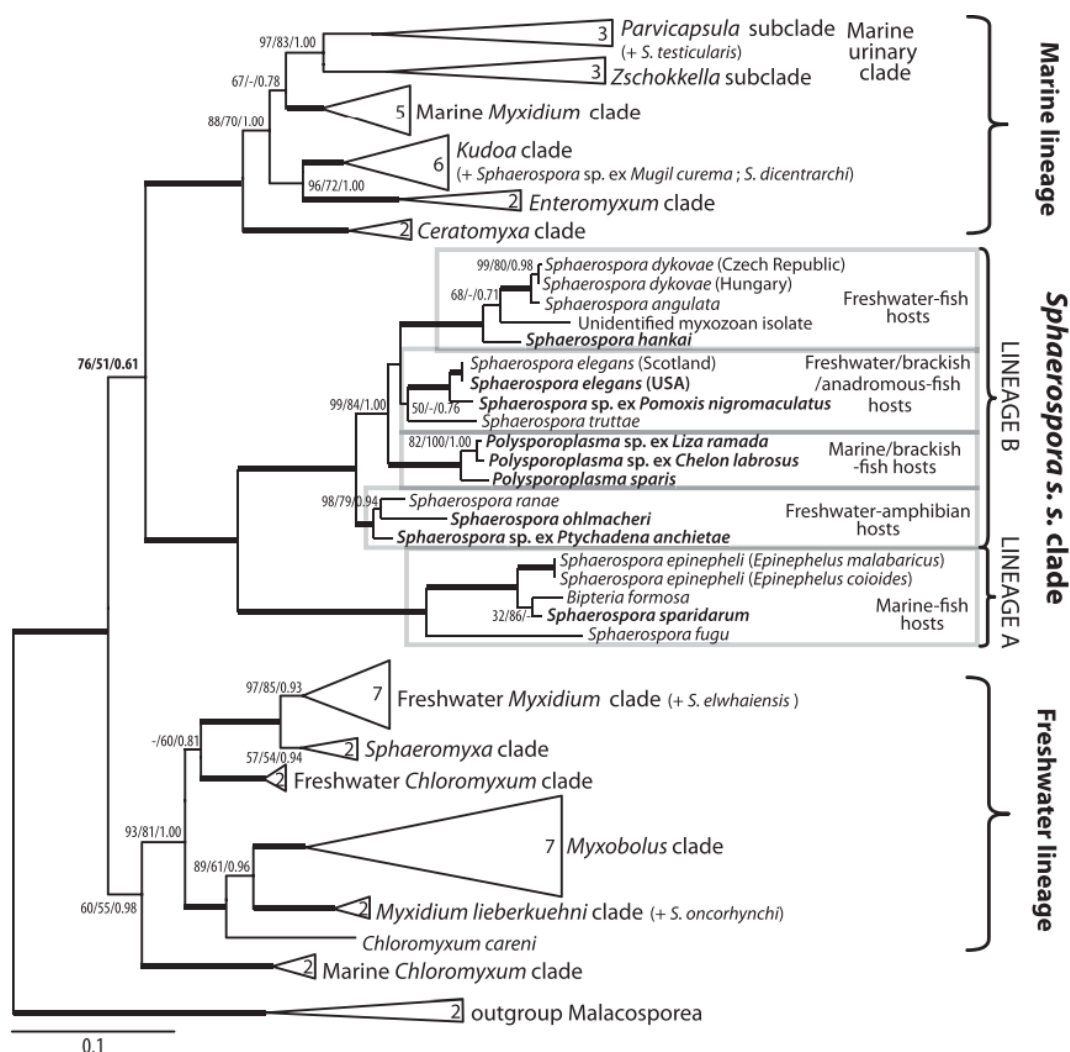
Pro rod *Sphaerospora* je typická polokulovitá až kulovitá spora se dvěma chlupněmi (Obr. 2). Povrch spory je buď hladký, nebo strukturovaný s postero-laterálními výběžky. Plasmodia jsou monosporická či disporická (Jirků *et al.* 2007). Rod zahrnuje zhruba 80 nominálních druhů. Dnes je do něj ještě přiřazováno dalších 18 druhů, které dříve patřily do rodu *Leptotheca* (Gunter & Adlard 2010). Většina z nich je coelozoických a postihují zejména močové cesty ryb a obojživelníků (Lom & Dyková 2006). Typovým druhem rodu *Sphaerospora* je druh *S. elegans* Thélohan, 1892, který byl popsán z ledvinových kanálků koljušky tříostné (*Gasterosteus aculeatus*). Podrobně studovaným druhem je např. *S. dykova* Dyková & Lom, 1982, který napadá ledvinové kanálky kaprovitých ryb. *Sphaerospora* je typickým polyfyletickým rodem, který odráží taxonomicko-fylogenetické problémy skupiny Myxozoa, u které se vyskytuje velké množství poly/parafyletických taxonů (např. Jirků *et al.* 2007).



Obr. 2: Spory rodu *Sphaerospora* (Převzato z Lom *et al.* 1983). 1. *Sphaerospora carassii*; 2. *S. branchialis*; 3. *S. chinensis*; 4. *S. molnari*.

Přes přibývající počty sekvenovaných druhů jsou fylogenetické vztahy v rámci rodu *Sphaerospora* stále nejasné. V roce 2007 byla ustanovena fylogenetická skupina *Sphaerospora* sensu stricto (Jirků *et al.* 2007), která zahrnuje sférospory klastrující spolu s typovým druhem *S. elegans* a tvořící samostatnou linii ve fylogenetickém stromě myxozoi. Základní linie skupiny jsou znázorněny na obrázku (Obr. 3), přičemž linie A zahrnuje mořské druhy a linie B mořské i sladkovodní druhy (Bartošová *et al.* 2013). Do linie B spadají 4 druhy sférosporidních rybomerek, které parazitují u kaprovitých ryb (Eszterbauer *et al.* 2013). *Sphaerospora* sensu stricto také obsahuje druhy, které původně byly zařazeny do zcela jiných rodů (např. *S. formosa* syn. *Bipteria formosa*, *S. fugu* syn. *Leptotheca fugu*

nebo *S. sparis* syn. *Polysporoplasma sparis*) a jejich přesun do rodu *Sphaerospora* byl iniciován zjištěním jejich fylogenetické pozice uvnitř skupiny *Sphaerospora* sensu stricto.



Obr. 3: Fylogenetický strom založený na 18S rDNA ukazující *Sphaerospora* sensu stricto jako sesterskou skupinu k mořským zástupcům Myxozoa s vyznačenou linií A linií B (Převzato z Bartošová *et al.* 2013).

Charakter 18S rDNA u zástupců skupiny *Sphaerospora* sensu stricto je velmi zajímavý. Sférospory mají nejdelší sekvence 18S rDNA ze všech eukaryotních organismů, a to více než 3,7 kbp (Jirků *et al.* 2007). Podobně je pozoruhodná délka zaznamenána i u LSU rRNA genů (genu pro RNA velké ribozomální podjednotky), u které je dokonce známa délka více než 6,3 kbp (Bartošová *et al.* 2013).

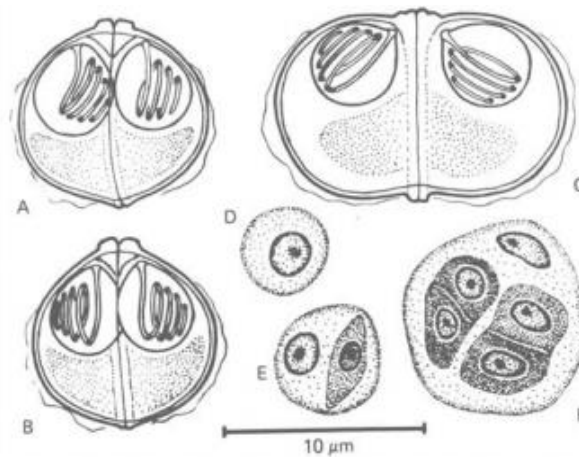
Sphaerospora molnari je poměrně běžný endoparazitický druh myxozoi, který parazituje na žábách a kůži (tvoří spory), ale dokáže migrovat do dalších tkání a orgánů

u plůdku kapra obecného (Lom *et al.* 1983; Novakov *et al.* 2015). *S. molnari* je druh histozoický na rozdíl od většiny sladkovodních druhů rodu *Sphaerospora*, kteří jsou coelozoičtí, což znamená, že obývají tělní dutinu (např. žlučový váček, žlučovody či močové cesty) a bývají přichyceny k jednotlivým stěnám orgánů, či plují ve volné tekutině. *S. molnari* parazituje intercelulárně zejména v epitelových buňkách kůže a žáber (Lom *et al.* 1983; Eszterbauer *et al.* 2013).

2.7.1 Morfologie a životní cyklus *Sphaerospora molnari*

Tento druh byl poprvé popsán v roce 1983 u kaprů obecných z rybníků Jihočeského kraje a z Dunaje. Spory mají polokulovitý tvar velikosti 10,3–10,5 μm . Subsférické pólové váčky jsou stejné velikosti, přibližně 4–5 x 4–4,5 μm . Vlákno mají stočené nejčastěji do 4 (vzácněji do 3 či 5) volných otáček rovnoběžně či lehce šikmo ložené (ve vztahu k podélné ose). Otáčka na volném konci mívá menší průměr než otáčka v místě připojení. Dvě sporoplasmy zabírají jen malou část celé spory (Lom *et al.* 1983). Kromě zralých spor byly nalezeny spory o něco širší, pólové váčky byly ve značné vzdálenosti, místo aby ležely vedle sebe. Předpokládá se, že jsou to nezralá stádia spor (Lom *et al.* 1983). Zralé spory známe z kůže a z žáber, kde napadají rozvrstvený epitel a způsobují léze. Presporogonická stádia jsou obsažena v krvi a v kapilárách ledvin (Lom *et al.* 1983; Eszterbauer *et al.* 2013; Hartigan *et al.* 2016).

Stejně jako u všech popsaných sférospor ani u *S. molnari* neznáme definitivního hostitele, mezihostitelem je kapr obecný. Presporogonickou fází životního cyklu jsou krevní stádia, která jsou charakteristická svým rychlým vrtivým pohybem a slouží k pomnožení parazita. V rámci sporogonické fáze se v tkáni vyskytují tzv. pseudoplasmodia, kdy se jednojaderná matečná buňka obsahující 1–6 sporogenních buněk vyvíjí v jednu sporu. Byly pozorovány také jednojaderné buňky, které mají v průměru okolo 3 μm , ty by mohly být považovány za časnou proliferační fázi (Obr. 4). Jakmile je vytvořen sporoblast, není možné detekovat hranice pseudoplasmodia (Lom *et al.* 1983). Ve sporoblastu se v konečné fázi vyvíjí spora, která se uvolňuje do vodního prostředí a vývoj pokračuje v neznámém definitivním hostiteli.

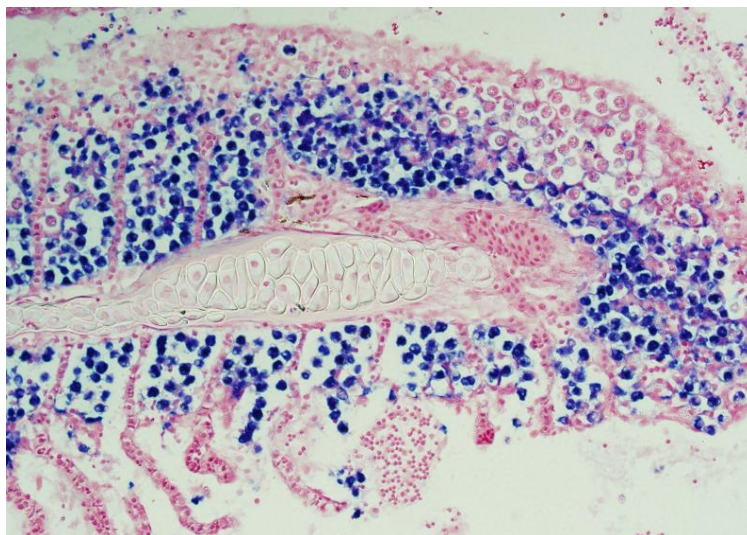


Obr. 4: Různá vývojová stádia *S. molnari*. A, B – zralá spora; C – nezralá spora; D – jednojaderná buňka – pravděpodobně nejjednodušší stádium; E – buňka s jednou sporogonickou buňkou; F – raná fáze sporogonie – 4 sporogonické buňky (Převzato z Lom *et al.* 1983).

2.7.2 Lokalizace stádií *Sphaerospora molnari* u kapra obecného

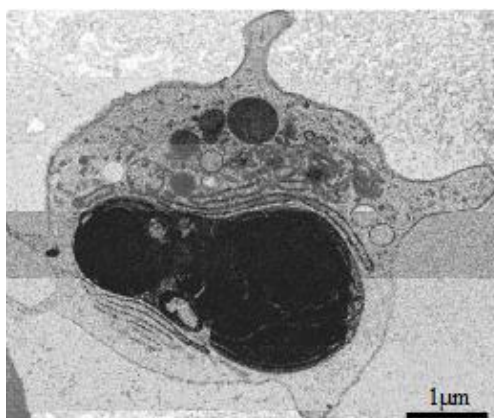
Již v dřívějších studiích bylo poukázáno na infekci kapra obecného rybamorkou *Sphaerospora molnari*. Např. Lom *et al.* (1983) popsali 11 kaprů přibližně stejného stáří, u kterých se rozvíjela různá míra infekce. V jednom případě došlo k mírné infekci kůže, v ostatních případech se jednalo o infekci žaber a žaberních jam. Tato žaberní infekce byla v 84 % doprovázena infekcí kůže. U tří zvířat byla zjištěna rybamorka v cirkulující krvi.

Kůže je podle dostupné literatury (Lom *et al.* 1983; Eszterbauer *et al.* 2013; Novakov *et al.* 2015) nejčastěji infikována v okolí hlavy, případně v přední části těla. Druh *S. molnari* také prokazatelně napadá žábry (Lom *et al.* 1983; Eszterbauer *et al.* 2013, Novakov *et al.* 2015). Vyvíjející se stádia a zralé spory jsou na žábrách a kůži lokalizována v epitelu těchto tkání (Obr. 5). Stádia *S. molnari* rozptýleně prostupují žábry, případně dokáží tvořit velké shluky. Při masivní infekci může parazit kompletně nahradit interlaminární buněčné vrstvy. Shluky parazitů byly také nalezeny v epitelu lemujícím žaberní dutinu. Na parazitovaném epitelu byly prokázány dystrofické a dyskomfortní změny, které mohou vést až k nekróze tkáně. Nekrotický rozpad tkáně má za následek uvolnění parazita do prostředí a jeho další šíření (Lom *et al.* 1983). Rybě, která má napadené žábry druhem *S. molnari*, může tento parazit nepřímo způsobit toxické nekrózy žaber, bakteriální nekrózy a také nekrózu, která je způsobená přímo parazitární invazí *S. molnari*.



Obr. 5: Žábry kapra infikované rybomorkou *Sphaerospora molnari* (© Dr. Astrid Holzer).

Stádia tohoto parazita mohou být nalezena v cirkulující krvi, kromě zralých spor (spíše výjimečná lokalizace, např. když jsou zralé spory vytlačeny z infikovaných buněk na žábrách, a tím pádem vstupují do krevního řečiště) mohou být v krvi obsažena také různá vývojová stádia, např. pseudoplasmodia s jednou sporogonickou buňkou (Lom *et al.* 1983). Krevní stádia se také podařilo vyizolovat a molekulárně potvrdit, i když nebyla prokázána mikroskopicky (Eszterbauer *et al.* 2013). Krevní stádia (Obr. 6) jsou charakteristická svým vrtivým pohybem, který je vyvolán bez buněk asociovaných s tubulinem (jako např. bičík či cílie). Tento typ pohybu je naprosto výjimečný mezi všemi pohybujícími se buňkami a využívá aktinomyosinové „mašinérie“ s aktiny, které jsou velmi odlišné od ostatních popsaných cytoplasmatických aktinů (Hartigan *et al.* 2016).



Obr. 6: Krevní stádium *S. molnari*: primární buňka se dvěma sekundárními buňkami (Převzato z Hartigan *et al.* 2016).

Pojmanska *et al.* (1998) uvádějí, že druh *S. molnari* také dokáže napadat ledviny a působit velmi závažné zánětlivé onemocnění ledvin u rybiho hostitele. Eszterbauer *et al.* (2013) publikovali fotografie, kde jsou viditelná vývojová (proliferační) stádia v kapilárách ledvin a také v parenchymu.

2.8 Hostitelský druh – *Cyprinus carpio*

Cyprinus carpio je nejčastěji se vyskytující ryba z čeledi Cyprinidae. Tento druh pochází z mírně tekoucích vod Evropy a Asie, v současné době je introdukovaný na všechny zbývající kontinenty, kromě Antarktidy. Původní volně žijící forma se vyskytuje zejména v povodí Dunaje. V některých částech světa je kapr velmi ceněnou rybou sloužící jako potrava, v jiných částech světa (např. Austrálie) pak velkým škůdcem, a to z důvodů ničení původních ekosystémů (Kottelat & Freyhof 2007).

Většina dnes chovaných kaprů je vyšlechtěných, původní forma divoce žijícího kapra se vyskytuje velmi vzácně. Žije zejména v tekoucích vodách (oproti šlechtěným kaprům, kteří žijí ve stojatých vodách). Má nízké tělo, velké zlaté šupiny a připomíná spíše amura. Šlechtěné formy jsou různé v mnoha ohledech: proporce těla, šupiny, rychlost růstu a podobně. Šlechtění má pro lidskou populaci velký význam, protože šlechtěné linie rychleji rostou, jsou odolnější vůči nemocem a jejich chov je mnohem ekonomičtější. Délka jeho těla se běžně pohybuje okolo 30 centimetrů, ale jsou k vidění i kapři s délkou okolo jednoho metru (Kottelat & Freyhof 2007).

Dospělci divoce žijícího kapra obývají hluboké, pomalu tekoucí i stojaté vody, jako jsou nížinné řeky a velká jezera, kde se živí bentickými organismy a rostlinným materiálem. Nejaktivnější jsou za soumraku a za svítání. Dospělci často migrují kvůli tření, vyhledávají vhodná slepá ramena a zaplavované louky. Kapr je polygammním organismem, samice vždy následuje několik samců. Samice kladou více než jeden milión vajíček v jedné sezóně. Vajíčka jsou často přilepena na vegetaci a celý vývojový cyklus je ovlivňován sezónními záplavami. Z oplodněných vajíček se líhne plůdek zhruba za 4 dny, ale přežívá jen ve velmi teplé a mělké vodě zarostlé vegetací. Regulace řek, ale také vznik nových kříženců, způsobují soustavné snižování volně žijících populací (Kottelat & Freyhof 2007).

Kapr obecný je častým hostitelem parazitů, ale také virových, houbových a bakteriálních infekcí. *Piscicola geometra* (Anellida: Hirudinee) parazituje zejména na kůži a žábrách různých kaprovitých ryb, přísává se svojí velkou přísavkou a saje krev (Pellegrini

et al. 1980). Z dalších parazitů nelze opomenout kapřivce *Argulus foliaceus* (Crustacea: Branchiura), *Ichthyophthirius multifiliis* (Ciliophora) (Hines & Spira 1974), *Trypanoplasma borreli* (Euglenozoa: Kinetoplastida) (Jones *et al.* 1993) a mnohé další. Velmi problematické pro kapry jsou i rybomorky. Kromě druhu *Sphaerospora molnari* parazituje na kaprovi asi dalších 14 druhů rybomorek, např. *Sphaerospora dykova* (Eszterbauer & Székely 2004), *Thelohanellus nikolskii* (Desser *et al.* 1983), *Myxobolus artus* (Ogawa *et al.* 1992) či *Myxobolus balatonicus* (Székely *et al.* 2015).

3 Materiál a Metody

3.1 Infekční pokus

Infekční pokus je součástí širšího projektu. Vzorky byly získávány z kapra obecného *Cyprinus carpio*, který byl nakažen rybomorkou *Sphaerospora molnari*. Byl zkoumán průběh celé infekce včetně lokalizace parazita v různých tkáních. Součástí projektu bylo také měření množství bílých i červených krevních buněk a různé reakce imunity hostitele. Pro lokalizaci a kvantifikaci parazita bylo zvoleno 6 druhů hostitelské tkáně: krev, žábry, ledviny, játra, svalovina a kůže (od 28. dne pokusu).

Plůdek kaprů (specific pathogen-free – SPF) byl získán z Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity ve Vodňanech. Oplodněná vajíčka sexuálně dospělých kaprů byla odebrána během reprodukčního období v dubnu roku 2015. Tato vajíčka pocházela z několika dospělců. Vajíčka byla inkubována týden před začátkem líhnutí. Do 24 hodin po vylíhnutí byli kapři posbíráni a převezeni do akvárií Parazitologického Ústavu, BC AV ČR. 93 kaprů putovalo do recirkulačního systému, ve kterém byli krmeni komerční stravou. Voda byla udržována při 21 ± 1 °C. V 1 roce věku byly tyto ryby využity při infekčních nákazách krevními stádii *S. molnari*.

Tato krevní stádia (infekční dávka) pocházela z jednoletých kaprů z rybníku Malá Outrata (Vodňany). Kapři byli usmrceni pomocí hřebíčkového oleje a celé množství krve bylo odebráno punkcí z ocasní žíly pomocí heparinizované injekční stříkačky. Krev 13 ryb byla dána do tyčinek na hemokrin a ty následně centrifugovány při 5000 g po dobu 3 minut. Vrstva obsahující krevní stádia *S. molnari* byla oddělena a zředěna plasmou. Krevní stádia byla počítána v Bürkerově komůrce. Objem 40 μ l, který se rovnal 14 800 parazitů, byl peritoneálně injikován do kaprů, kteří byli určeni k infekčnímu pokusu.

Infekční pokus probíhal celkově na 93 rybách druhu *Cyprinus carpio* stejného stáří. 57 z nich bylo nakaženo druhem *Sphaerospora molnari*. Náказа proběhla injekčně do peritoneální dutiny, každý jedinec byl nakažen 14 800 parazity. Kontrolní jedinci byli injikováni PBS (Phosphate Buffered Saline). V každém čase (den 1, den 2, den 4, den 7, den 14, den 21, den 28, den 35, den 42, den 49, den 56, den 63) bylo vypitváno 5 infikovaných (v čase 56. den 3 a v čase 63. den 4 infikované ryby) a 3 kontrolní ryby. Odběry zahrnovaly celkovou hematologii (diferenciaci krvinek, koncentraci hemoglobinu, odběr vzorků DNA a několika orgánů pro kvantifikaci parazitů a genovou expresi imunitní odpovědi).

V tomto určeném čase pro moji diplomovou práci byla odebrána z každého jedince krev, žábry, ledviny, játra, svalovina a kůže (od 28. dne po infekci). Všechny získané vzorky byly podrobeny nejprve „prescreeningu“ a následně kvantitativní analýze, která popisuje průběh infekce v různých tkáních. Seznam vzorků je shrnut přílohách (Příloha 1).

3.2 Izolace DNA

Izolace DNA probíhala pomocí klasické fenol-chloroformové metody popsané v roce 1956, která je založena na účincích fenolu, který je schopen denaturovat a precipitovat proteiny v daném vzorku vodného roztoku (Kirby 1957). DNA a RNA jsou odděleny od roztoku fenolu, chloroformu a vodné fáze, proteiny vytvářejí prsteneček mezi těmito fázemi.

Kousek tkáně byl vložen do 400 μ l Buffer TNES urea (pH= 8; 10mM Tris-HCl, 125mM NaCl, 10mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0,5% sodium dodecyl sulphate (SDS), 4M urea). Do každého vzorku byly přidány 4 μ l proteinázy K (100 μ g/ml) a tato směs byla inkubována při 55 °C přes noc. Následně bylo přidáno 400 μ l fenolu. Směsný roztok se míchal otáčením zkumavek po dobu 5 minut a následně byl centrifugován (9000 g) po dalších 10 minut. Došlo k oddělení dvou fází a jedné interfáze. Nejsvrchnější fáze obsahující DNA (přibližně 330 μ l) byla oddělena do nových zkumavek a bylo dodáno 400 μ l chloroformu. V dalším kroku byly vzorky opět otáčením 5 minut míhány a následně 10 minut centrifugovány. Opět se vytvořily dvě fáze a jedna interfáze. Vrchní vrstva obsahující DNA (přibližně 330 μ l) byla přepipetována do nových zkumavek. Do každé zkumavky byly přidány 2 μ l RNázy A (50 μ l/ml) a následně probíhala inkubace po 1 hodinu při 37 °C. Po proběhnutí inkubace byl přidán do každé zkumavky 1 ml vychlazeného 92% ethanolu (-20 °C). A následně proběhla další centrifugace při 14 000 g po dobu 10 minut. Na spodu zkumavky vznikl pelet obsahující DNA. Ethanol ze zkumavek byl odstraněn vylitím, a následně vysušením v termobloku při 55 °C. DNA byla rozsuspendována ve 300 μ l deionizované vody.

3.3 Semi-kvantitativní analýza / prescreening

Prescreening byl proveden pomocí klasické PCR. Polymerázová řetězová reakce (PCR) slouží k amplifikaci neboli namnožení daného úseku DNA do velkého množství kopií (Alberts *et al.* 2013).

Reakční směs (MasterMix) pro amplifikaci příslušného genu byla připravována z dílčích chemikálií: deionizované vody, reakčního pufru, nukleotidů, primerů a příslušné polymerázy (Tab. 1). Tato reakční směs byla rozplněna do jednotlivých mikrozkušavek po 9 μl a následně byl přidán 1 μl extrahované DNA (do mikrozkušavek s negativní kontrolou byl přidáván místo DNA 1 μl deionizované vody).

Tab. 1: Složení PCR reakční směsi.

	Koncentrace zásoby	Finální koncentrace	Jedna reakce PCR
Deionizovaná voda			7,35 μl
Pufr	10x	1x	1 μl
dNTP	10 mM	0,2 mM	0,2 μl
Primer forward	25 mM	0,5 μM	0,2 μl
Primer reverse	25 mM	0,5 μM	0,2 μl
Titanium polymeráza	5 U/ μl	0,25 μU	0,05 μl
DNA templát			1 μl
Celkové množství			10 μl

Dle studovaného genu pro 18S rDNA u *S. molnari* byly zvoleny specifické primery Smol930 a Smol1363 (Tab. 2) (navrhla Dr. Astrid Holzer).

Tab. 2: Sekvence použitých primerů.

Primer	Cílový gen	sekvence 5' → 3'
F primer Smol930	18S rDNA	AAAACAGCCCGGCACCAGCATCTC
R primer Smol1363	18S rDNA	CCAGCGGCGACATATCATCATTCT

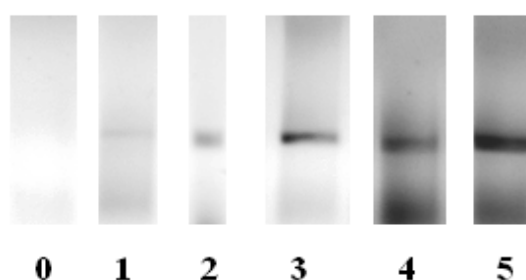
Dle daných parametrů byl vytvořen a následně optimalizován program pomocí gradientové PCR (Tab. 3) v cykleru (Bioer). Pro nasedání primerů byla zvolena optimální teplota 65 °C.

Tab. 3: Optimalizovaný program pro amplifikaci.

Denaturace		95 °C po 3 min
	30 cyklů amplifikace	94 °C po 50 s 65 °C po 50 s 72 °C po 30 s
Finální extenze		72 °C po 4 min

PCR produkty byly rozděleny pomocí gelové elektroforézy. V první řadě byl připraven 1% roztok agarózy, který se skládá z agarózy a 0,5% TAE pufru (TRIS-acetátový pufr). Roztok agarózy a pufru musel být zahřát v mikrovlnné troubě, aby se agaróza rozpustila. Po nalití do vaničky byly přidány cca 3 μ l Ethidium bromidu. Po utužení byl gel vložen do elektroforézové vaničky, do jamek byl napipetován PCR produkt v celkovém objemu 10 μ l. Do jedné z jamek bylo přidáno 5 μ l 100 bp žebříčku. Zdroj pro elektroforézu byl nastaven na 100 V.

Výsledné proužky byly podrobeny semi-kvantitativní analýze všech vzorků, která spočívala v rozdělení získaných hodnot do tabulky podle intenzity (0- žádný proužek, 5 – velmi silný proužek) (Obr. 7) a tyto výsledky byly následně statisticky zpracovány pomocí programu Statistica v. 12.0 software (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA).



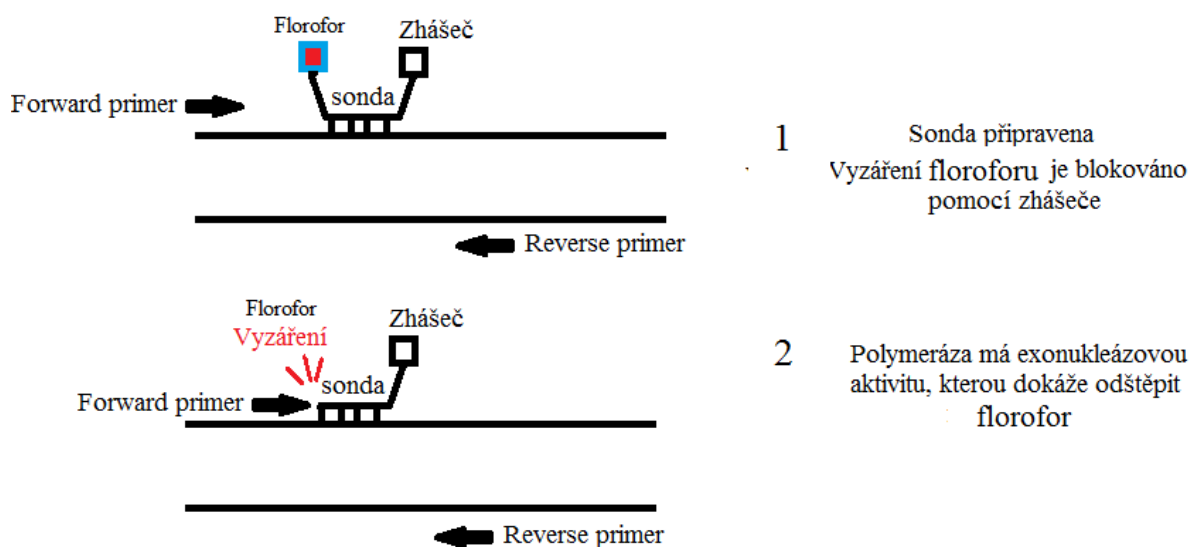
Obr. 7: Vyhodnocení proužků dle intenzity.

3.4 Kvantitativní analýza pomocí qPCR

Pro kvantitativní stanovení intenzity infekce v jednotlivých rybích hostitelích byla použita qPCR (kvantitativní PCR) a program navržený specificky pro parazita *Sphaerospora molnari* a jeho hostitele kapra obecného. qPCR je metoda založená na klasické PCR, ale v průběhu této reakce je umožněno sledovat kvantifikaci dané části genu (DNA)

v reálném čase. Detekce množství je založena na fluorescenčních sondách, které se váží na přítomné úseky DNA, fluorescence je vyzařována až po navázání na příslušnou DNA. Množství (hladina) fluorescence odráží množství DNA přítomné v daném vzorku (LabGuide 2014).

V tomto případě byly jako sondy (proby) využity tzv. TaqMan, což jsou hydrolizační duálně značené sondy založené na základě 5'→3' exonukleázové aktivity Taq DNA polymerázy. Na 5' konci nesou reportérový fluorofor, na 3' konci molekulu zhášeče. Sonda se specificky váže mezi reverse a forward primery. Sonda se rozkládá pomocí exonukleázové aktivity Taq polymerázy. Fluorofor je separován a dochází k emisi fluorescence (Obr. 8) (LabGuide 2014).



Obr. 8: Funkce TaqMan sondy během qPCR (Zpracováno dle LabGuide 2014).

Vyizolovaná DNA obsahovala směsnou DNA z kapra a z parazita. Vzhledem k typu vzorků a možnosti získání dat, které jsme se snažili kvantifikovat, bylo využito metody relativní kvantifikace. U relativní kvantifikace se používá tzv. vnitřní kontrola. Jako vnitřní kontrola jsou nejčastěji používány geny, jejichž počet kopií v příslušném genomu je totožný u všech testovaných vzorků. V případě vzorku *S. molnari* bylo využito specifických primerů pro 18S rDNA, u vzorku pro *C. carpio* byly použity specifické primery pro beta-aktinový gen. Právě beta-aktin sloužil jako vnitřní kontrola.

DNA musela být nejprve připravena pro qPCR. Bylo třeba, aby koncentrace byla stejná, a to 100 ng/μl. Vzorky s vyšší koncentrací byly ve správném poměru zředěny. Pokud

byla koncentrace nižší než 100 ng/μl, vzorek nebyl nijak ředěn a byla využita celková možná koncentrace. Vyhovujících výsledků je možno docílit při koncentraci nad 20 ng/μl, tato koncentrace byla naměřena u všech vyizolovaných vzorků (viz Příloha 2).

Pro PCR reakci byla vytvořena reakční směs podle tabulky (Tab. 4) s využitím LightCycler® TaqMan® Master od firmy Roche (obsahuje FastStart Taq DNA polymerázu).

Tab. 4: Složení reakce qPCR, hodnoty uvedeny pro jednu reakci.

	Koncentrace zásoby	Finální ředění	18S rDNA (μl) a beta-aktin (μl)
LC probe Master	-	-	12,5
F primer	20 nM	10 μM	1
R primer	20 nM	10 μM	1
FAM-BHQ1 probe (sonda)	0,1 mM	5 μM	1
Deionizovaná voda	-	-	4,5
DNA		100 ng/ μl	5

Primery specifické pro 18S rDNA *S. molnari* a pro beta-aktin *C. carpio* byly navrženy pomocí programu Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) (Tab. 5).

Tab. 5: Sekvence příslušných primerů.

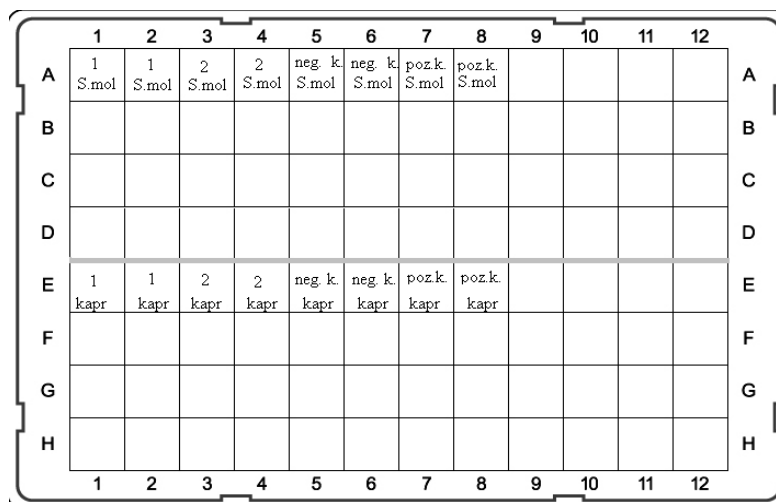
Primer	Cílový gen	sekvence 5'→3'
qPCR 18S Smolnari F	18S rDNA	TGCTGTGTGACGTGTGTCC
qPCR 18S Smolnari R	18S rDNA	ATGCATGTGTGAGCGTGATT
qPCR beta-actin carp F	beta-aktin	GATTCGCTGGAGATGATGCT
qPCR beta-actin carp R	beta-aktin	AATTATTGGGCAGCCTGAAA

Dále byly navrženy specifické sondy s modifikací FAM-BHQ1 na principu TaqMan sond (Tab. 6), taktéž pomocí programu Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>).

Tab. 6: Sekvence příslušných sond.

Sonda	Sekvence 5' → 3'
qPCR sonda <i>S. molnari</i> s FAM-BHQ1	GCCTGTGCTCAATGTAGCAC
qPCR sonda <i>C. carpio</i> s FAM-BHQ1	CCCCAGACATCAGGTGAGAA

Reakční směs byla rozplněna do jamek na 96-ti jamkových bílých destičkách po 20 µl a následně bylo přidáno 5 µl DNA. Pro větší přesnost a správné zjištění *Ct* hodnot a následné kvantitativní stanovení byl každý vzorek analyzován v duplikacích jak pro 18S rDNA, tedy prokázání *S. molnari*, tak v duplikacích pro beta-aktin (vnitřní kontrola). Dále v každém běhu byly v duplikacích přidány pozitivní a negativní kontroly (Obr. 9). Jako negativní kontrola byla zvolena reakční směs, do které byla místo DNA přidána deionizovaná voda. Jako pozitivní kontrola byla používána vyizolovaná DNA spor *S. molnari* z dřívějších studií. Pokud byl rozdíl naměřených hodnot *Ct* vyšší než 1, qPCR pro daný vzorek byla opakována.

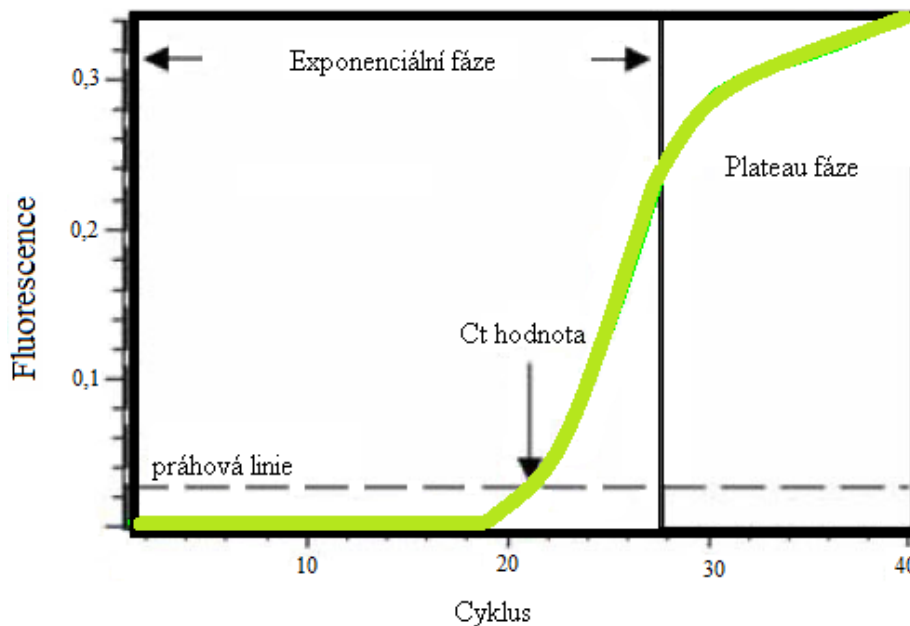


Obr. 9: Ilustrace přípravy 2 vzorků.

Optimalizovaný program pro kvantifikaci se skládal ze dvou částí: 1. denaturace při 95 °C po dobu 10 minut, 2. 50 cyklů amplifikace, která zahrnovala denuraci při 95 °C po dobu 15 sekund a annealing 60 °C po dobu 1 minuty. Reakce probíhala na přístroji Light cycler 480 (Roche), monitorována a vyhodnocena byla pomocí programu Light cycler 480 Software Release 1.5.0 SP4 (Roche).

3.5 Zpracování získaných hodnot

Při získávání hodnot při kvantitativní PCR je nejdůležitější C_t hodnota, která vychází z prahové hodnoty cyklu (Obr. 10), tedy hodnoty, kdy začíná docházet k nárůstu fluorescence vzhledem k danému pozadí. Tato hodnota je číslem cyklu, ve kterém dochází k nárůstu fluorescence. Čím je C_t hodnota nižší, tím více bylo do reakce dodáno templátové DNA.



Obr. 10: Průběh qPCR (Zpracováno dle Labguide 2014).

Již předem bylo známo, že množství DNA ryby a parazita ve vzorku není shodné. Jinými slovy, byla snaha zjistit relativní počet parazitů ve vztahu ke stejnému počtu hostitelských buněk v každém vzorku. Získané C_t hodnoty byly přepočteny na normalizovaný expresní poměr (NEP, v našem případě R), který je vypočten jako poměr mocnin, kde mocnitelem jsou hodnoty cílové a referenční efektivity (E) a mocněncem získané průměrné C_t hodnoty. V každém „běhu“ PCR byl použit referenční vzorek jako kontrola. Tato referenční kontrola byla použita jako srovnávací hodnota mezi jednotlivými „běhy“ qPCR.

$$R = \frac{(E_{\text{referenční}})^{C_t(C. \text{carpio})}}{(E_{\text{cílové}})^{C_t(S. \text{molnari})}}$$

Ze získané hodnoty R bylo vypočítáno Rn nebo také normalizovaná zaznamenaná hodnota. Rn je vypočítáno z nejvyšší dosažené hodnoty R pro daný soubor dat.

$$Rn = \frac{R \text{ (daný vzorek)}}{\text{nejvyšší dosažené } R}$$

Z důvodu lepší přehlednosti relativní kvantifikace bylo toto číslo (Rn) vynásobeno 100. Výslednou míru relativní kvantifikace tedy představují procenta.

Získaná data byla statisticky zpracována v programu Statistica v. 12.0 software (Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA). U grafů závislosti relativní míry parazitace na čase s průběhem infekce byly zvoleny jako chybové úsečky $\pm 1SE$ (standard error of the mean = střední chyba průměru), která se v tomto případě zdála jako nejvhodnější a nejčastěji užívanou charakteristikou přesnosti odhadu průměru. Jedná se o směrodatnou odchylku výběrového průměru jako náhodné veličiny, tzn. SE označuje, jak moc se získaný průměr výběru může lišit od získané střední hodnoty daného základního souboru a vypočte se jako:

$$SE = \frac{Sx}{\sqrt{n}}$$

kde Sx je směrodatná odchylka vzorku a n je velikost výběru. Zvýšení přesnosti SE lze dosáhnout zvětšením výběru n (Lepš & Šmilauer 2016).

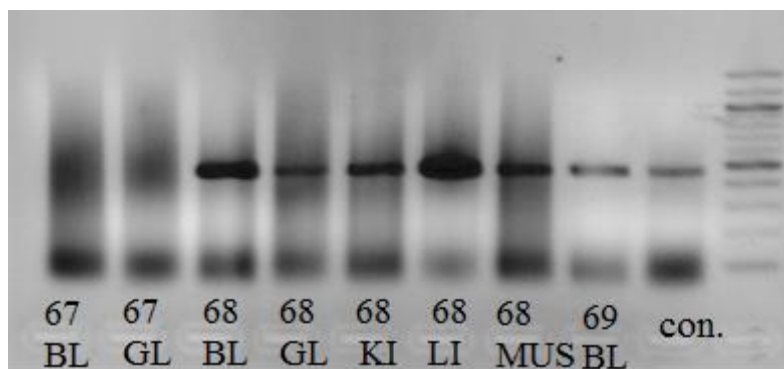
4 Výsledky

4.1 Lokalizace

K průkazu přítomnosti parazita *Sphaerospora molnari* byla použita světelná mikroskopie a molekulární metody (klasická PCR, kvantitativní PCR).

Mikroskopicky byla krevní stádia *S. molnari* poprvé zaznamenána 21. den po nakažení, od 28. dne po nakažení se vyskytovala pravidelně. Krevní stádia jsou mikroskopickým vyšetřením velmi snadno detekovatelná z důvodu jejich extrémní pohyblivosti. Mikroskopicky byla vyšetřována pouze krev. Důvodem je velmi obtížný a nespolehlivý mikroskopický záchyt vývojových stádií v jiných tkáních.

Molekulárně byla *Sphaerospora molnari* detekována ve všech studovaných orgánech, tzn. na kůži, na žábkách, v krvi, v ledvinách, v játrech a také ve svalovině (Obr. 11). Pomocí klasické PCR byla infekce potvrzena od 14. dne, a to ze všech studovaných orgánů. Podle výsledků qPCR byla infekce prokazatelná již od 7. dne nákazy, a to v krvi a svalovině, v ostatních tkáních pak od 14. dne nákazy.



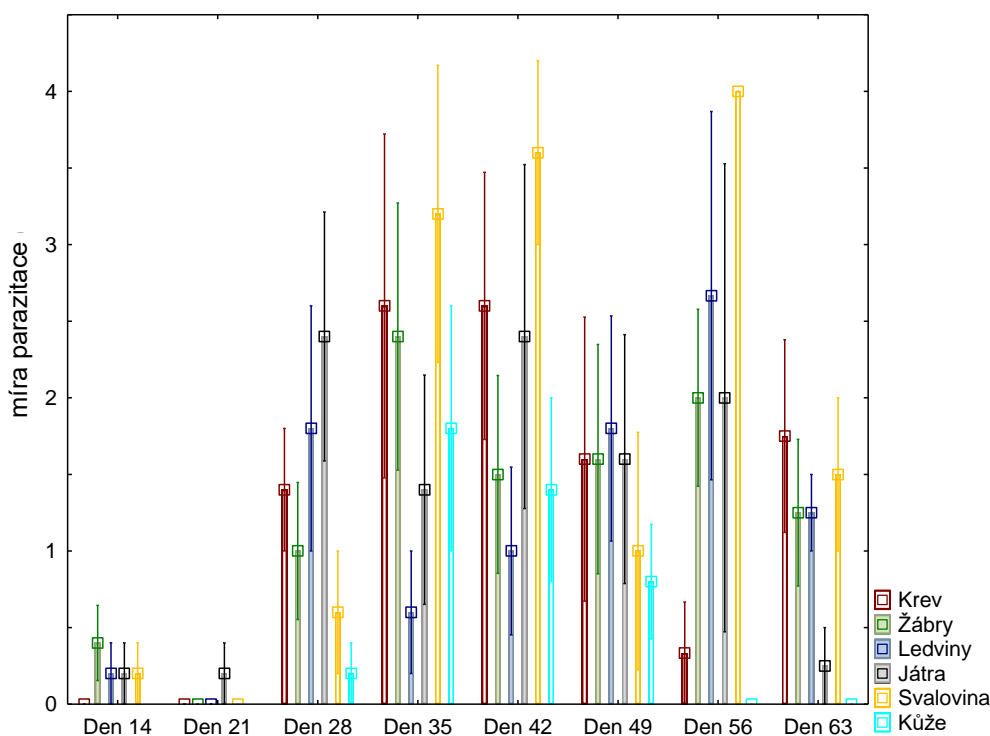
Obr. 11: Ukázka výsledné vizualizace s pozitivními i negativními vzorky: BL = krev, GL = žábry, KI = ledviny, LI = játra, MUS = svalovina, con. = pozitivní kontrola. Vzorky 67 BL, GL = negativní kontrola, neinfikované ryby.

4.2 Semi-kvantitativní stanovení množství parazitů / prescreening

Nejdříve byly jednotlivé fragmenty DNA amplifikovány pomocí PCR a následně proběhla jejich vizualizace pomocí agarózové elektroforézy. Výsledný produkt měl 457 bp, viz výše pozitivní kontrola na přiložené vizualizaci (Obr. 11 v kapitole 4.2).

Podrobné výsledky prescreeningu pomocí klasické PCR jsou shrnuty v přílohách (Příloha 2).

Z výsledků byl vytvořen graf závislosti odhadované míry parazitace na čase (Obr. 12), který ukazuje možný průběh infekce v čase v jednotlivých orgánech. Negativní kontrolní ryby do grafů nebyly zahrnuty, sloužily pouze jako kontrola. Všechny tyto kontroly byly prokazatelně negativní. Stejně tak nejsou zahrnuty hodnoty před 14. dnem, které byly také negativní.



Obr. 12: Orientační průběh infekce parazita *S. molnari* v závislosti na čase v krvi, žábřácích, ledvinách, játrech, svalovině a kůži hostitele kapra obecného s vyznačením chybových úseček $\pm 1SE$.

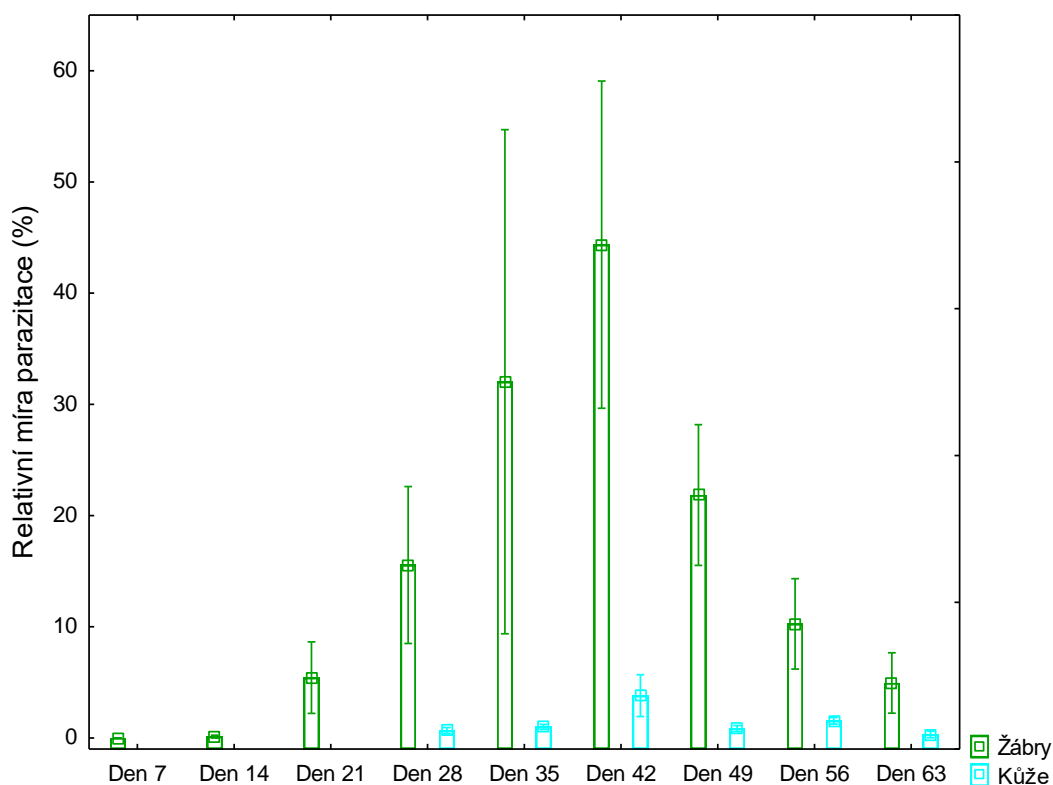
Průběh infekce v různých orgánech se projevoval odlišně. Parazit se ukazoval od 28. dne po infekci v krvi se dvěma vrcholy, až do konce testování. Oproti tomu se *S. molnari* vyskytovala na žábřácích již od 14. dne. Vyšší míra nákazy byla pozorována od 35. dne a na konci pokusu infekce klesala. Infekce byla prokázána i v dalších studovaných orgánech. V ledvinách se parazit objevuje již od 14. dne. Vyšší míra infekce byla pozorována od 28. dne, nejvyšší pak 56. den po infekci. Vyšší míra parazitémie v játrech byla objevena 28. den, nejvyšší pak 42. den po infekci, poté klesala. Ve svalovině se studovaná sféropora vyskytovala od 14. dne. Vyšší množství parazitů bylo pozorováno od 35. dne, nejvyšší pak 56. den po infekci. V 63. den, kdy končilo sledování ryb, byla míra infekce stále poměrně vysoká.

Infekce parazitem *S. molnari* je prokazatelná pomocí semi-kvantitativní analýzy nejdříve v játrech, ledvinách, žábřích a svalovině a to od 14. dne po infekci. Nejvyšší míra infekce byla prokázána ve svalovině a v játrech, naopak nejnižší na kůži, žábřích a v ledvinách. Ve svalovině se parazit udržuje až do konce pokusu. Klasická PCR byla zavedena pouze jako prescreening.

4.3 Kvantitativní stanovení množství parazitů

Kvantitativní stanovení množství parazitů bylo provedeno pomocí qPCR. Výsledné *Ct* hodnoty 18S rDNA parazita byly vztaženy k *Ct* hodnotách beta-aktinu kapra a přepočítány na relativní míry parazitace v procentech (stažené k hodnotám ve výsledných grafech).

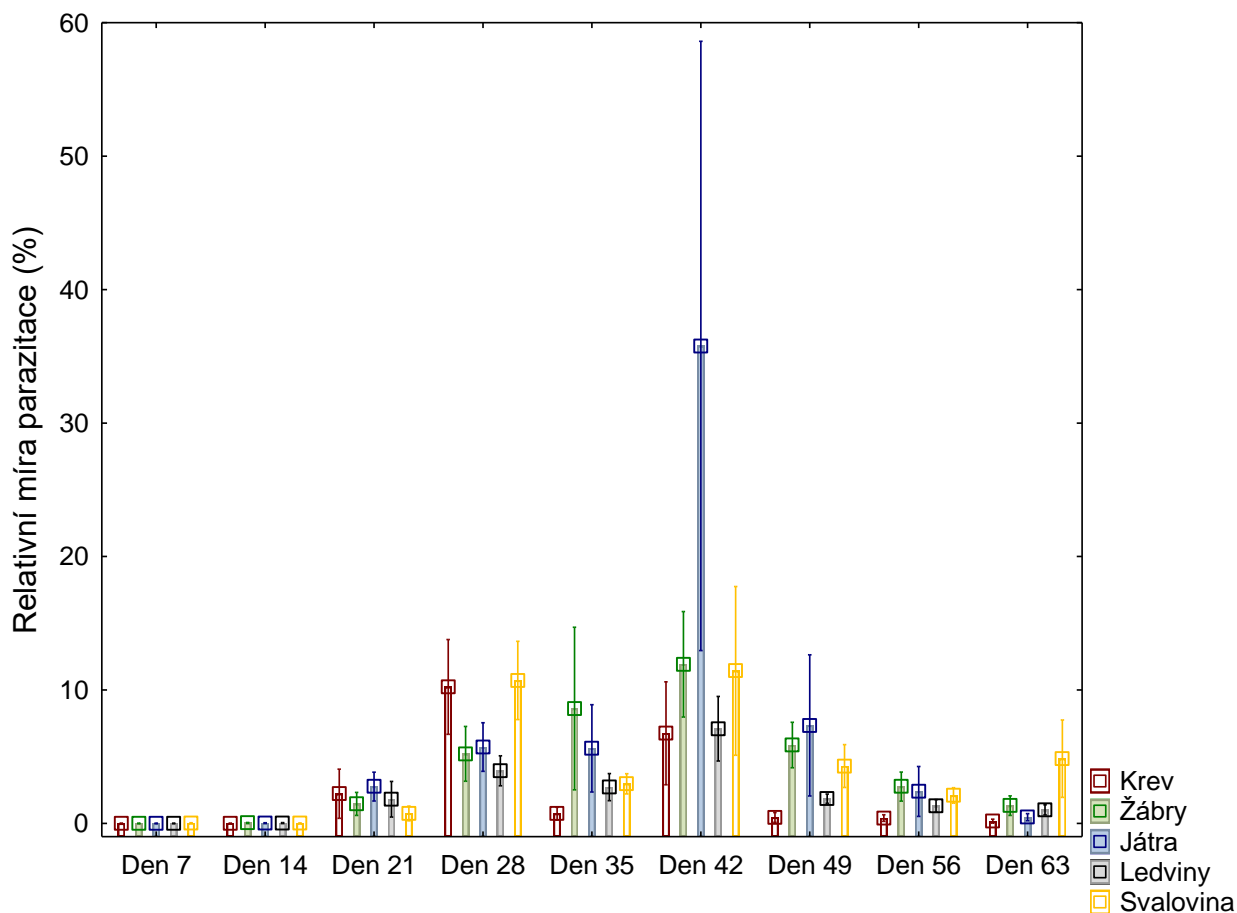
Ze získaných hodnot (Příloha 2) byly vytvořeny 2 grafy. První z grafů (Obr. 13) ukazuje pouze dvě ze studovaných tkání – žábry a kůži. V těchto orgánech za běžných enviromentálních podmínek probíhá sporogonie.



Obr. 13: Závislost relativní míry parazitace na žábřích a kůži (%) a na čase s vyznačením $\pm 1SE$.

Z grafu (Obr. 13) lze vyčíst, že vyšší relativní míra parazitace byla detekována na žábřách. Infekce začala vzrůstat a to od 14. dne po infekci. Nejvyšší relativní míra infekce se objevuje ve 42. den (stejně jako u ostatních orgánů – viz graf (Obr. 14)).

Druhý graf, který byl vytvořen, je grafem souhrnným. Lze vidět závislost relativní míry parazitace na časech ve všech studovaných orgánech (Obr. 14). Nejsou zahrnuty vzorky kůže a hodnoty vzorků před 7. dnem, jelikož byly negativní.



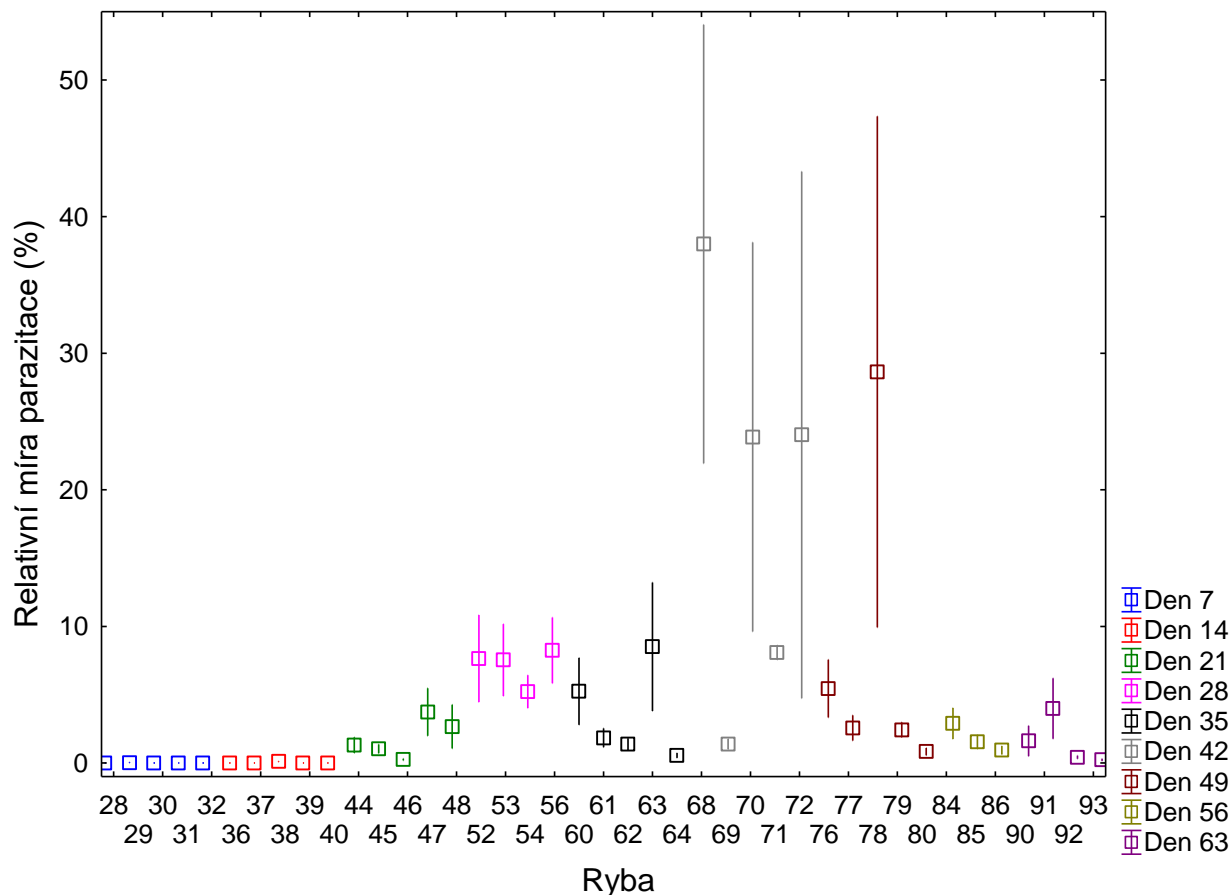
Obr. 14: Závislost relativní míry parazitace krve, žaber, ledvin, jater a svaloviny v % na čase s vyznačením chybových úseček $\pm 1SE$.

Na začátku se nejvyšší míra parazitace objevuje v krvi a průběh tvoří dva vrcholy (28. a 42. den), poté ve svalovině a dalších studovaných tkáních a orgánech (Obr. 14). Nejvyšší míra parazitace byla detekována v játrech. Nejdéle se paraziti udržují ve svalovině.

4.4 Porovnání hostitelských jedinců

Každý hostitel je individuální jedinec s individuálními vlastnostmi a infekční nákazy se u něj vyvíjí odlišným způsobem. Na základě získaných dat (qPCR) byl vytvořen graf

(Obr. 15), který porovnává hostitelské jedince mezi sebou, ale také rozdíly v samotném jedinci. Jedinci byli porovnáváni od 7. dne. V dřívějších případech byly získané hodnoty negativní.



Obr. 15: Relativní míra parazitace všech orgánů v jedincích s vyznačením $\pm 1SE$. Jedna chybová úsečka = jeden hostitel. Barevně odlišeni jedinci, kteří byli zkoumáni v jeden časový úsek.

Výše uvedený graf (Obr. 15) byl vytvořen z výsledků qPCR. Ve 35., 42., 49. den od nákazy jsou vidět patrné rozdíly mezi jedinci. Někteří hostitelští jedinci nereagují na podání parazitů a infekce se u nich rozvíjí ve velmi malé míře, ale rozvíjí.

4.5 Porovnání záchytnosti metod

V tomto pokusu bylo využito plně optimalizovaných programů pro qPCR a taktéž pro klasickou PCR. Záchytnost vyplývající z výsledků (kapitola 4.2 a 4.3) je shrnuta v tabulce níže (Tab. 7). Do celkové záchytnosti nejsou zahrnuty kontrolní neinfikované vzorky tkání.

Tab. 7: Shrnutí výsledků detekce parazita *Sphaerospora molnari* v porovnání s celkovým počtem validních vzorků. Procenta zaokrouhlena na dvě desetinná místa.

	Klasická PCR	qPCR
Celkově	34,62 % (108/312)	57,33 % (172/300)
Krev	29,83 % (17/57)	54,72 % (29/53)
Žábry	36,84 % (21/57)	54,55 % (30/55)
Ledviny	35,09 % (20/57)	57,14 % (32/56)
Játra	33,33 % (19/57)	55,56 % (30/54)
Svalovina	36,84 % (21/57)	51,79 % (29/56)
Kůže	37,04 % (10/27)	84,62 % (22/26)

Z počtů pozitivně detekovaných vzorků vyplývá, že qPCR byla schopna detekovat větší množství pozitivních vzorků (57,33 %) oproti klasické PCR (34,62 %), tyto výsledky jsou srovnatelné ve všech studovaných tkáních. Nejvyšší rozdíl v zachytnosti je vidět u vzorků kůže, kde se míra parazitace pohybovala na velmi nízkých hodnotách (viz kapitola 4.3 nebo Příloha 2).

qPCR byla schopna detekovat parazity již od 7. dne po nákaze. Klasická PCR zaznamenala parazity až od 14. dne po infekci. 21. den po infekci PCR vyhodnotila všechny studované vzorky jako negativní (kromě jednoho). Oproti tomu, qPCR detekovala parazity u všech ryb; to poukazuje na daleko vyšší citlivost qPCR (v tomto případě).

5 Diskuze

5.1 Průběh infekce parazitem *Sphaerospora molnari*

V předložené magisterské práci byl zmapován průběh infekce rybmorky *Sphaerospora molnari*. Jedná se o jednu z prvních studií, ve které byl studován průběh infekce (zvláště presporogonický vývoj) parazitickou rybmorkou. Získaná data nelze tedy přímo porovnávat se studii podobného charakteru. Hostitelský druh *Cyprinus carpio* byl experimentálně nakažen druhem *S. molnari* a následně udržován v laboratorních podmínkách. Pro všechny hostitelské jedince byly nastaveny naprosto stejné podmínky pro rozvoj a následný průběh infekce. V jednotlivých časech byly zkoumány různé tkáně hostitele a dokumentován průběh infekce. Průběh infekce v různých tkáních nebyl v čase stejný.

Jako způsob infekce byla zvolena injekce parazita do peritoneální dutiny ryby. Od 21. dne (3. týden) po nakažení až do ukončení experimentu byla dosažena 100% prevalence u rybiho hostitele, tzn. alespoň jeden ze studovaných orgánů určité ryby byl pozitivní (u kapra č. 55 nebyly naměřeny žádné hodnoty). Injekce krevních stádií do peritoneální dutiny se tedy zdá být velmi účinným způsobem nakažení s detekovatelným rozvojem infekce. Parazit musel aktivně vstupovat z coelomové dutiny (případně orgánů v dutině), kam byl injikován, do cévní soustavy a cévní soustavou následně do celého těla. Krevní stádia druhu *Sphaerospora molnari* byla hlášena z intersticiální tkáně ledvin (Eszterbauer *et al.* 2013) a taktéž z jiných tkání (Holzer *et al.* 2014), což potvrzuje, že jsou schopna migrovat mezi hostitelskými buňkami.

Pro zjištění průběhu infekce jsou brány v potaz hodnoty, které byly získány pomocí qPCR (vysvětlení a porovnání metod viz kapitola 4.2). qPCR se v tomto případě zdá jako přesnější a více senzitivní metoda (není zatížena subjektivní chybou) pro určení relativní míry parazitace ve studovaných orgánech, jedná se o metodu kvantitativní.

Nejprve se parazit objevuje v krvi, a poté také ve všech dalších studovaných orgánech. Ve 28. den po infekci výsledky qPCR ukazují téměř stejné relativní míry parazitace v krvi jako v jiných orgánech. Tato relativní míra parazitace je pravděpodobně odrazem přítomnosti krevních stádií ve studovaných orgánech. Již dříve byla nalezena stádia parazita v kapilárách v ledvinách (Eszterbauer *et al.* 2013). Proces napadání tkání pomocí

krve může mít za následek ucpávání kapilár a následné nekrotické stavy daných orgánů, které byly u *S. molnari* pozorovány v ledvinách (Pojmanska *et al.* 1998). První detekovatelné množství parazitů se začalo objevovat od 7. dne po injikování krevních parazitických stádií (velmi nízká úroveň parazitace), a to tedy nejprve v krvi, kam se po injikování s největší pravděpodobností dostal parazit nejdříve a následně se namnožil do detekovatelného množství nejrychleji (a ve svalovině). Zde je souvislost s presporogonickými stádii jako začátek životního cyklu (vývoje), která se v krvi nejčastěji vyskytují (Hartigan *et al.* 2016). Do dalších orgánů a tkání se parazit dostává krevním řečištěm. Prvopočátek infekce v krevním řečišti je znám i od jiných myxozoí: v krvi byla myxozoární stádia nalezena před vstupem do dalších částí těla hostitele např. u *Ceratonova shasta*, kdy se podařilo potvrdit, že studovaný druh se krví šíří do dalších orgánů (Bjork & Bartholomew, 2010) obdobně jako nová data pro *S. molnari*. Některé orgány mohou být daným druhem preferované z důvodu preferenčního místa pro sporogonii; případně se krevní stádia mohou dostávat do zcela náhodných tkání, ve kterých proběhne sporogonie (Bjork & Bartholomew, 2010). U studovaného druhu *S. molnari* byla vždy nalezena sporogonická stádia pouze v kůži a na žábách.

Podle qPCR se nejvyšší relativní míra infekce parazitem objevovala v játrech a to ve 42. den po infekci. V tomto časovém bodě krev vykazuje 4x nižší zjišťovanou úroveň parazitace oproti játrům, což nasvědčuje invazi jater studovaným parazitem, zatímco krevní stádia se v tomto čase objevují naposledy před postupným vymizením. Játra u ryb mají obdobnou funkci jako játra jiných živočichů (včetně lidí) a jsou vysoce prokrveným orgánem, který se mimo jiné odstraňuje odpad z krve a recykluje staré krvinky, ale jsou také orgánem metabolismu cukrů, tuků a právě vhodným „útočištěm“ parazitů (energeticky bohaté); na druhé straně právě játra obsahují makrofágy, které se snaží odstranit cizí buňky a jejich DNA.

V ledvinách byla detekována střední míra infekce. Jedná se o krevní stádia, která jsou akumulovaná v krevních kapilárách, i právě z tohoto důvodu měřená relativní míra parazitace ledvin kopíruje průběh infekce v krvi. Právě ledviny jsou u ryb považovány za velmi důležitý orgán imunitního systému. Lymfatická tkáň, která se v ledvinách vyskytuje, slouží k vylučování a následnému zpracování a prezentaci antigenu.

Vůbec nejnižší relativní míra parazitace byla detekována na kůži, a to i přesto, že právě kůže spolu s žábami jsou cílovým orgánem vývoje druhu *S. molnari*, kde dochází

v pozdější fázi vývoje ke sporogonii (Lom *et al.* 1983; Eszterbauer *et al.* 2013; Novakov *et al.* 2015). Pozorovaná nízká relativní míra parazitace může souviset s injikováním parazitů přímo do hostitele, odkud je pravděpodobně složitější se dostat na vnější povrch. V kůži se tvoří pravá histozoická stádia, nejedná se o stádia v krvi (krevní stádia tedy nejsou zahrnuta), z tohoto důvodu může být relativní míra parazitace nižší. V našem případě z důvodu jednak udržování stálé teploty, ale také krátkého trvání infekčního pokusu, zřejmě nedocházelo k dokončení vývoje a tvorbě spor. Pro tvorbu spor by bylo pravděpodobně zapotřebí změnit teplotu, případně metabolické změny v hostiteli.

V den ukončení experimentu se relativní míra parazitace pohybovala na velmi nízkých hodnotách, pouze ve svalovině se udržela vyšší. To může mít mnoho různých důvodů – např. „přezimování“ parazita, čekání na vhodnější teplotní podmínky, případně je možné, že by se mohlo jednat o chronickou nákazu. Svalovina je často parazitovanou tkání napříč různými hostiteli i parazity, kde se paraziti připravují na přechod do dalšího hostitele, případně přečkávají momentální nepříznivé podmínky. Toto je známo např. u druhu *Trichinella spiralis* (Arriaga *et al.* 1995) či u *Toxoplasma gondii* (Mehlhorn & Frenkel 1980). V případě myxozoí se často jedná o zapouzdřená stádia způsobující změkčenou strukturu svalů po smrti ryb, ale i o aktivní plasmodia, která obsahují zralé spory jako např. u *Kudoa* sp. (Stehr & Whitaker 1986) či nedokonale zapouzdřené pseudocysty u druhu *Myxobolus artus* (Ogawa *et al.* 1992). V této studii nebyly žádné cysty, spory, ani presporogonická či extrasporogonická stádia pozorována. Jejich přítomnost byla detekována pouze molekulárně. 9. týden *Sphaerospora molnari* stále perzistovala ve svalovině v poměrně velkém množství. Tento zajímavý jev může být vyvolán za účelem přečkávání nepříznivých fyzikálních i chemických podmínek (např. teploty), chronické infekce, či jednoduše krátkým sledováním průběhu infekce. Pro vyvozování obecnějších závěrů je bezesporu potřeba další déletrvající studie.

5.2 Porovnání metod detekce parazita *Sphaerospora molnari*

Světelná mikroskopie je nejjednodušší a vůbec nejstarší z používaných metod, která má i v dnešní době velké využití v detekci parazitů. V našem případě byla využita pouze u vzorků krve. V tomto pokuse se mikroskopická detekce neosvědčila, byla pozorovaná pouze krevní stádia, a to od 28. dne po infekci (výjimečně od 21. dne). V orgánech, kde se neformují pohyblivá a sporogonická stádia, se vizuální detekce nezdaří. Tento výsledek také koresponduje s dřívějšími studiemi (Lom *et al.* 1983; Hartigan *et al.* 2016).

Pomocí qPCR a klasické PCR se podařilo detekovat parazita ve všech studovaných tkáních. Citlivější detekce pomocí molekulárních metod oproti mikroskopii byla pozorována již dříve, např. v diagnostice malárie (Rantala *et al.* 2010), *Giardia intestinalis* nebo *Cryptosporidium* sp. (Stensvold *et al.* 2012).

Molekulární detekce byla prováděna pomocí klasické PCR a taktéž pomocí qPCR, která je všeobecně považována za citlivější. qPCR je propracovanější klasická PCR, která má také stejná omezení i stejné mezilaboratorní odchylky. Velké množství studií (např. Dagher *et al.* 2004) se přiklání k názoru, že klasická PCR je méně senzitivní než kvantitativní PCR. Podle některých zdrojů je ale nutno zdůraznit, že qPCR nemusí být nutně citlivější. Záleží na fyzikálně-chemických podmínkách reakce, koncentraci a povaze cílové DNA a samozřejmě také na vybraných primerech, sondách a dalších chemikáliích, a hlavně na celkové optimalizaci PCR, až poté lze posuzovat, která metoda je citlivější (Bastien *et al.* 2008). V našem případě klasická PCR dokázala detekovat parazitární infekci ve 34,62 %, oproti tomu qPCR pak v 57,33 %, tyto výsledky jsou srovnatelné ve všech studovaných tkáních (kromě kůže). Kvantitativní PCR byla schopna detekovat parazity již od 7. dne po nákaze, klasická PCR od 14. dne po nákaze.

PCR a qPCR detekovala rozdílné množství pozitivních vzorků. Tato míra positivity mohla být způsobena zejména tím, že v některých vzorcích bylo obsaženo malé množství DNA parazita a PCR nedokázala detekovat infekci. Ukázkou citlivosti detekce PCR a qPCR jsou tyto příklady: 1) qPCR byla schopna detekovat u určitých vzorků parazity již od 7. dne po nákaze. Klasická PCR zaznamenala parazity až od 14. dne po infekci; 2) 21. den po infekci PCR vyhodnotila studované vzorky zahrnující všechny tkáně jako negativní (kromě jednoho). Oproti tomu, qPCR určila každého jedince pozitivního (ne ve všech tkáních), což poukazuje na daleko vyšší citlivost qPCR. Obě metody byly schopné detekovat vyšší míry parazitace v játrech a ve svalovině; naopak nejnižší na kůži. Průběh infekce se neshoduje ve svalovině a v krvi. U obou metod byli detekováni paraziti ve svalovině i na konci pokusu. Klasická PCR byla provedena pouze jako prescreening, aby se vědělo, co lze od vzorků očekávat, ale nebyla primárně dělána pro kvantifikaci.

U qPCR byl použit referenční gen, jakási vnitřní kontrola (v mém případě beta-aktin). Z tohoto důvodu jsem byla schopna říci, které vzorky pracují správně a které ne. Pokud se mi podařilo získat hodnoty pro beta-aktin, ale pro 18S rDNA ne, znamenalo to, že vzorek obsahuje rybí tkáň a pracuje správně, nicméně je negativní. Takové to porovnání

u klasické PCR neexistuje. Pokud ve vzorku nezačne amplifikace DNA, je prohlášen za negativní. Nelze však rozlišit vzorek negativní od nefungujícího.

V tomto případě se zdá metoda qPCR lepší a citlivější pro detekci studovaného parazita; stejně jako v mnoha dalších pracích, kde se snažili detekovat nejen parazity, ale také další mikroorganismy (např. Dagher *et al.* 2004; Dworkin *et al.* 2002). Klasická PCR udává poměrně dobré výsledky a je finančně i přístrojově méně náročná a interpretace výsledků je jednodušší, ale na druhé straně zde není možnost rozlišit množství přítomné DNA a taktéž jednotlivé vzorky, které jsou degradované, nefunkční oproti vzorkům negativním.

5.3 Porovnání jedinců

Všechny ryby měly během infekčního pokusu naprosto stejné životní podmínky, byly „čisté“, tzn. bez koinfekcí (SPF), které by mohly rybího hostitele oslabit a přesměrovávat imunitní odpověď jiným směrem. Když byli porovnáni jedinci, kteří byli nakaženi ve stejném čase a infekce probíhala stejný časový úsek, bylo obecně zjištěno, že se mezi jedinci nachází malé rozdíly. V některých případech ovšem i větší rozdíly. Rozdíly mezi jedinci v průběhu infekce je třeba řešit nejen na úrovni hostitele, ale také na úrovni parazita, tzn. rozlišovat faktory, které mohou být dány hostitelem (např. imunita, momentální fyzická zdatnost, genetika) či parazitem (např. virulence / v našem případě nehrála roli; migrace parazita v těle hostitele) a v neposlední řadě vnějším prostředím (v našem případě – laboratorní podmínky). Během tohoto infekčního pokusu mohly hrát významnější roli tyto faktory: rozdíly v imunitě hostitele, místo vpichu, infekční dávka či laboratorní odchylky. Celá myšlenka připravit infekční pokus v laboratorních podmínkách eliminuje potenciální variace.

Všechny ryby v tomto pokusu měly naprosto stejné počáteční podmínky, teplotu vody a stejné prostředí pro život. Množství různých látek v akváriích, pH, konduktivita, teplota, strava a další vlivy prostředí by v tomto pokusu neměly mít významný vliv na průběh celé parazitární infekce.

5.3.1 Hostitel

Na začátku porovnávání jedinců hostitele je třeba poznamenat, že každý hostitelský jedinec je (i když má pro život stejné podmínky) odlišný. Odlišnost je dána např. momentální kondicí a celkovou zdatností organismu. Dále průběh infekce v daném jedinci mohou ovlivnit genetické predispozice, mutace a další genetické faktory, a v neposlední řadě samozřejmě specifická imunita.

Ryby si v některých případech dokáží na myxozoární infekci vytvořit částečnou či úplnou protektivní imunitu. Bylo prokázáno, že u nákazy druhem *Tetracapsuloides bryosalmonae*, se ryba zotavuje rychleji, pokud již byla nakažená dříve (Ferguson & Ball 1979). Stejně tak byla nalezena protektivní imunita proti druhu *Enteromyxum scophthalmi* (Sitjà-Bobadilla *et al.* 2007). Pokud by byla hostitelská ryba *Cyprinus carpio* nakažená rybomorkou (i ve velmi malém množství) a vytvořila si vůči ní paměťové buňky, může to velmi ovlivnit průběh infekce a nakažená ryba může být rychleji vyléčena. Bylo prokázáno, že např. u PKD hrají velmi důležitou roli exprimované cytokiny např. IL-6 (interleucin 6) IL-11, TNF- α 2 (tumor necrosis factor α 2), či TGF- β 1 (transforming growth factor β 1) (Holland *et al.* 2003; Gorgoglione *et al.* 2013). V našem případě jsme se pokusili zabránit tomu, aby se použité ryby setkaly s podobnou infekcí již dříve, jelikož se jednalo o SPF ryby, které byly vychovávány od prvního dne po vylíhnutí.

Kromě imunity jsou zde další velmi důležité faktory, které mohou ovlivnit reakci jedince na parazitární infekci druhem *Sphaerospora molnari*. Bylo již mnohokrát prokázáno, že některé genetické mutace a faktory dokáží ovlivnit nákazu, ale stejně tak rozvoj infekce (např. srpkovitá anémie a malárie, či ztráta Duffy Blood group antigenů a znemožnění nákazy krvinkovkou *Plasmodium vivax*), jedná se o tzv. rezistenční faktory (Miller 1976). V současné době nejsou u druhu *S. molnari* žádné takové faktory známy a popsány, ale to neznamená, že neexistují, doposud nebyly zkoumány.

Průběh parazitární infekce je dán také celkovou zdatností organismu. Je známo, že zdatnost ryby je ovlivněna mnoha faktory, zejména pak zraněními a stresem (Chopin & Arimoto 1995). Studované ryby byly infikovány injekčně pomocí krevních stádií. Během procesu injikování myxozoí mohlo dojít k lehkým poraněním a různým mikrozaněním a zejména k vystavení stresové situaci.

5.3.2 Parazit

Kromě hostitele může celkový průběh infekce také ovlivnit samotný parazit, který byl do hostitele injikován. Ačkoli se jedná o totožný druh parazita, může mít každá infekční dávka svá specifika, která nelze příliš ovlivnit. V našem případě mohla být ovlivněna míra a průběh infekce jednak místem vpichu (nemuselo být ve všech případech stejné), ale také infekční dávkou, která byla podávána v objemu 40 μ l, což je velmi malé množství, a i když byly použity nejmenší dostupné injekční stříkačky (1 ml), ne vždy muselo být nutně docíleno stejné infekce.

Paraziti mají velmi úspěšnou strategii přežívání, a to také z důvodu migrace po celém těle hostitele za účelem úniku před imunitou. Jedná se tedy o náhodný proces, kam a jak rychle se daná infekce dokáže rozšířit. Pokud se infekce hned na počátku setká s primárními orgány imunitního systému, nerozšíří se, případně se rozšíří v nižší míře.

5.3.3 Přístroj a metodika

Velikosti odchylek mezi jednotlivými hostiteli mohou být způsobeny také na straně přístroje či samotnou prací v laboratoři. Samozřejmě záleží i na optimalizaci použitých programů.

Přesnost qPCR je dána řadou faktorů, které mohou být součástí přípravy PCR reakce či samotné přípravy vzorků jako např. izolace DNA z tkání. Pro zajištění co největší přesnosti qPCR jsem každý vzorek opakovala v duplikacích. Právě porovnání *Ct* hodnot v duplikacích by mělo poskytnout představu o tom, jak přesná daná reakce je, zda je nutno ji opakovat. Je žádoucí a velmi důležité, aby byl rozptyl co nejmenší (Labguide 2014). Tento povolený rozptyl byl v našem případě stanoven na velikost 1. Optimálně by se *Ct* hodnoty měly pohybovat mezi 20–25, pokud jsou *Ct* hodnoty výrazně vyšší, např. > 35, zvyšuje se riziko nepřesnosti reakce. U některých vzorků, zvláště při počáteční infekci byly opakovaně naměřeny hodnoty vyšší než > 35. Míra parazitace v těchto vzorcích je velmi nízká, tudíž je pravděpodobné, že zde bude nějaká nepřesnost. Oproti tomu většina získaných *Ct* hodnot se pohybovala v rozmezí 20–35.

Pro qPCR bylo nezbytné připravit vzorky o koncentraci 100 ng/ μ l. DNA izolace probíhala ve všech případech stejně, a to pomocí klasické fenol-chloroformové metody. Přesto bylo zjištěno, že vzorky mají odlišnou koncentraci DNA. Koncentrace vzorků

se pohybovala mezi 20–3500 ng/μl. Tento rozdíl mohlo ovlivnit zejména to, že se nejednalo o stejné tkáně. Každá tkáň se izoluje s různou mírou výtěžku DNA. Nejhůře probíhala izolace krve a svaloviny (velmi často nízké koncentrace, velký rozdíl mezi qPCR a PCR), naopak nejlépe izolace žaber a ledvin. Navíc je třeba podotknout, že celá izolace neprobíhala v rámci jednoho dne, jelikož se jednalo o velké množství vzorků a vzorky byly odebírány postupně. Izolaci mohla ovlivnit řada faktorů, např. změna teploty v místnosti, pH používaných chemikálií a podobně. Právě problémy s izolací a následně s koncentrací DNA zejména u svaloviny a krve mohly do jisté míry ovlivnit celý průběh qPCR.

6 Závěr

- Vůbec poprvé byl proveden experimentální pokus, ve kterém byl sledován presporogonický vývoj rybomork v průběhu času v různých orgánech hostitele pomocí citlivé detekce qPCR.
- Experimentální infekce rybomorkou *S. molnari* injekčně do peritoneální dutiny hostitele byla úspěšná. Prevalence dosáhla 100 % již 21. den od nákazy (detekce pomocí qPCR).
- Úroveň infekce se u jednotlivců lišila, ale obecný trend průběhu infekce byl jasně rozlišitelný.
- *S. molnari* byla nejprve zjištěna v krvi, kdy průběh infekce vytváří dva rozdílné vrcholy, 28. den a 42. den infekce.
- 28. den po nákaze je míra infekce ve všech studovaných tkáních velmi podobná, což ukazuje na distribuci parazita po celé cévní soustavě.
- 42. den po infekci je míra parazitace ve všech vnitřních orgánech vyšší než v krvi, přičemž významný podíl se vyskytuje v játrech (4x vyšší množství než v krvi), což naznačuje, že dochází k invazi orgánů parazitem z krve.
- Po 9. týdnech vývoje infekce paraziti z většiny studovaných tkání a orgánů mizí, ale velmi pravděpodobně perzistuje ve svalovině.

7 Seznam použitých zkratk

18S rDNA	gen pro RNA malé ribozomální podjednotky
BC AV ČR	Biologické centrum Akademie věd České republiky
Bp	base pair – pár bází
DNA	deoxyribonucleid acid – deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate – deoxyribonukleotid trifosfát
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid – thylendiamintetraoctová kyselina
IL	interleukin
LSU	gen pro RNA velké ribozomální podjednotky
NK buňky	Naturall killer cells – přirození zabíječi
PBS	Phosphate Buffered Saline – fosfátový pufr
PCR	polymerase chain reaction – polymerázová řetězová reakce
PKD	prolifere kidney disease – zánětlivé onemocnění ledvin
qPCR	quantitative polymerase chain reaction – kvantitativní polymerázová řetězová reakce
SDS	sodium dodecyl sulphate – dodecylsírán sodný
SE	standard error of the mean – střední chyba průměru
SPF kapr	specific patogen free – zbavený pro kapra specifických patogenů
TGF	transforming growth factor – transformující růstový faktor
TNF	tumor necrosis factor faktor – způsobující nekrózu nádorů

8 Reference

- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M. Walter, P. & kolektiv (2013). *Essential Cell Biology*. New York: Garland Science.
- Alvarez-Pellitero, P. (2008). Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *126*, 171–198.
- Arriaga, C., Yépez-Mulia, L., Viveros, N., Adame, L. A., Zarlenga, D. S., Lichtenfels, J. R., Benitez, E., & Ortega-Pierres, M. G. (1995). Detection of *Trichinella spiralis* muscle larvae in naturally infected horses. *The Journal of Parasitology*, *81*, 781–783.
- Bastien, P., Procop, G. W., & Reischl, U. (2008). Quantitative real-time PCR is not more sensitive than “conventional” PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*, 1897–1900.
- Bartošová, P., Fiala, I., Jirků, M., Cinková, M., Caffara, M., Fioravanti, M. L., Atkinson, S. D., Bartholomew, J. L., & Holzer, A. S. (2013). *Sphaerospora* sensu stricto: taxonomy, diversity and evolution of a unique lineage of myxosporeans (Myxozoa). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *68*, 93–105.
- Bartošová-Sojková, P., Hrabcová, M., Pecková, H., Patra, S., Kodádková, A., Jurajda, P., Tynl, T., & Holzer, A. S. (2014). Hidden diversity and evolutionary trends in malacosporean parasites (Cnidaria: Myxozoa) identified using molecular phylogenetics. *International Journal for Parasitology*, *44*, 565–577.
- Baska, F., & Molnár, K. (1988). Blood stages of *Sphaerospora* spp. (Myxosporea) in cyprinid fishes. *Diseases of Aquatic Organisms*, *5*, 23–28.
- Bjork, S. J., & Bartholomew, J. L. (2010). Invasion of *Ceratomyxa shasta* (Myxozoa) and comparison of migration to the intestine between susceptible and resistant fish hosts. *International Journal for Parasitology*, *40*, 1087–1095.
- Canning, E. U., Tops, S., Curry, A., Wood, T. S., & Okamura, B. (2002). Ecology, development and pathogenicity of *Buddenbrockia plumatellae* Schröder, 1910 (Myxozoa, Malacosporea)(syn. *Tetracapsula bryozoides*) and establishment of *Tetracapsuloides* n. gen.

for *Tetracapsula bryosalmonae*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 49, 280–295.

Canning, E. U., Curry, A., & Okamura, B. (2008). Early development of the myxozoan *Buddenbrockia plumatellae* in the bryozoans *Hyalinella punctata* and *Plumatella fungosa*, with comments on taxonomy and systematics of the Myxozoa. *Folia Parasitologica*, 55, 241–255.

Canning, E. U., & Okamura, B. (2003). Biodiversity and evolution of the Myxozoa. *Advances in Parasitology*, 56, 43–131.

Cech, G., Molnár, K., & Székely, C. (2012). Molecular genetic studies on morphologically indistinguishable *Myxobolus* spp. infecting cyprinid fishes, with the description of three new species, *M. alvarezae* sp. nov., *M. sitjae* sp. nov. and *M. eirasianus* sp. nov. *Acta Parasitologica*, 57, 354–366.

Corbel, M. J. (1975). The immune response in fish: a review. *Journal of Fish Biology*, 7, 539–563.

Chopin, F. S., & Arimoto, T. (1995). The condition of fish escaping from fishing gears—a review. *Fisheries Research*, 21, 315–327.

Dagher, H., Donniger, H., Hutchinson, P., Ghildyal, R., & Bardin, P. (2004). Rhinovirus detection: comparison of real-time and conventional PCR. *Journal of Virological Methods*, 117, 113–121.

Desser, S. S., Molnar, K., & Weller, I. (1983). Ultrastructure of sporogenesis of *Thelohanellus nikolskii* Akhmerov, 1955 (Myxozoa: Myxosporidia) from the common carp, *Cyprinus carpio*. *The Journal of Parasitology*, 69, 504–518.

Dworkin, L. L., Gibler, T. M., & Van Gelder, R. N. (2002). Real-time quantitative polymerase chain reaction diagnosis of infectious posterior uveitis. *Archives of Ophthalmology*, 120, 1534–1539.

Dyková, I., & Lom, J. (1988). Review of pathogenic myxosporeans in intensive culture of carp (*Cyprinus carpio*) in Europe. *Folia Parasitologica*, 35, 289–307.

El-Matbouli, M., & Hoffmann, R. W. (1998). Light and electron microscopic studies on the

chronological development of *Myxobolus cerebralis* to the actinosporean stage in *Tubifex tubifex*. *International Journal for Parasitology*, 28, 195–217.

Eszterbauer, E., Sipos, D., Forró, B., & Holzer, A. S. (2013). Molecular characterization of *Sphaerospora molnari* (Myxozoa), the agent of gill sphaerosporosis in common carp *Cyprinus carpio carpio*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 104, 59–67.

Eszterbauer, E., & Székely, C. (2004). Molecular phylogeny of the kidney-parasitic *Sphaerospora renicola* from common carp (*Cyprinus carpio*) and *Sphaerospora* sp. from goldfish (*Carassius auratus auratus*). *Acta Veterinaria Hungarica*, 52, 469–478.

Feist, S. W., & Longshaw, M. (2006). Phylum Myxozoa. *Fish Diseases and Disorders*, 1, 230–296.

Feist, S. W., Morris, D. J., Alama-Bermejo, G., & Holzer, A. S. (2015). Cellular processes in myxozoans. In *Myxozoan Evolution, Ecology and Development* (pp. 139–154). Cham: Springer International Publishing.

Ferguson, H. W., & Ball, H. J. (1979). Epidemiological aspects of proliferative kidney disease amongst rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson in Northern Ireland. *Journal of Fish Diseases*, 2, 219–225.

Fiala, I., Bartošová-Sojtková, P., Okamura, B., & Hartikainen, H. (2015a). Adaptive radiation and evolution within the Myxozoa. In *Myxozoan Evolution, Ecology and Development* (pp. 69–84). Cham: Springer International Publishing.

Fiala, I., Bartošová-Sojtková, P., & Whipps, C. M. (2015b). Classification and phylogenetics of Myxozoa. In *Myxozoan evolution, ecology and development* (pp. 85–110). Cham: Springer International Publishing.

Fontes, I., Hallett, S. L., & Mo, T. A. (2015). Comparative epidemiology of myxozoan diseases. In *Myxozoan Evolution, Ecology and Development* (pp. 317–341). Cham: Springer International Publishing.

Furuta, T., Ogawa, K., & Wakabayashi, H. (1993). Humoral immune response of carp *Cyprinus carpio* to *Myxobolus artus* (Myxozoa: Myxobolidae) infection. *Journal of Fish Biology*, 43, 441–150.

- Gorgoglione, B., Wang, T., Secombes, C. J., & Holland, J. W. (2013). Immune gene expression profiling of proliferative kidney disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals a dominance of anti-inflammatory, antibody and T helper cell-like activities. *Veterinary Research*, *44*, 55.
- Grabner, D. S., & El-Matbouli, M. (2008). Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) to *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata) by various fish species. *Diseases of Aquatic Organisms*, *79*, 133–139.
- Griffin, B. R., & Davis, E. M. (1978). *Myxosoma cerebralis*: detection of circulating antibodies in infected rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Board of Canada*, *35*, 1186–1190.
- Gunter, N., & Adlard, R. (2010). The demise of *Leptotheca* Thélohan, 1895 (Myxozoa: Myxosporea: Ceratomyxidae) and assignment of its species to *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Ellipsomyxa* Køie, 2003 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Myxobolus* Bütschli, 1882 and *Sphaerospora* Thélohan, 1892 (Myxosporea: Sphaerosporidae). *Systematic Parasitology*, *75*, 81–104.
- Hartigan, A., Estensoro, I., Vancová, M., Bílý, T., Patra, S., Eszterbauer, E., & Holzer, A. S. (2016). New cell motility model observed in parasitic cnidarian *Sphaerospora molnari* (Myxozoa: Myxosporea) blood stages in fish. *Scientific Reports*, *6*.
- Hausmann, K., & Hülsmann, N. (2003). *Protozoologie*, Praha: Academia.
- Hedrick, R. P., Adkison, M. A., El-Matbouli, M., & MacConnell, E. (1998). Whirling disease: re-emergence among wild trout. *Immunological Reviews*, *166*, 365–376.
- Hines, R. S., & Spira, D. T. (1974). Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* (L.) V. Acquired immunity. *Journal of Fish Biology*, *6*, 373–378.
- Holland, J. W., Gould, C. R. W., Jones, C. S., Noble, L. R., & Secombes, C. J. (2003). The expression of immune-regulatory genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during a natural outbreak of proliferative kidney disease (PKD). *Parasitology*, *126*, 95–102.

- Holland, J. W., Okamura, B., Hartikainen, H., & Secombes, C. J. (2010). A novel minicollagen gene links cnidarians and myxozoans. *Proceedings of the Royal Society of London*, 278, 546–553.
- Holzer, A. S., Hartigan, A., Patra, S., Pecková, H., & Eszterbauer, E. (2014). Molecular fingerprinting of the myxozoan community in common carp suffering Swim Bladder Inflammation (SBI) identifies multiple etiological agents. *Parasites & vectors*, 7, 398.
- Holzer, A. S., Sommerville, C., & Wootten, R. (2003). Tracing the route of *Sphaerospora truttae* from the entry locus to the target organ of the host, *Salmo salar* L., using an optimized and specific in situ hybridization technique. *Journal of Fish Diseases*, 26, 647–655.
- Ikeda, I. (1912). Studies on some sporozoan parasites of sipunculoids. I. The life history of a new actinomyxidian *Tetractinomyxon intermedium* g. et sp. nov. *Archiv für Protistenkunde* 25, 240–272.
- Jiménez-Guri, E., Philippe, H., Okamura, B., & Holland, P. W. (2007). *Buddenbrockia* is a cnidarian worm. *Science*, 317, 116–118.
- Jirků, M., Fiala, I., & Modrý, D. (2007). Tracing the genus *Sphaerospora*: rediscovery, redescription and phylogeny of the *Sphaerospora ranae* (Morelle, 1929) n. comb. (Myxosporidia, Sphaerosporidae), with emendation of the genus *Sphaerospora*. *Parasitology*, 134, 1727–1739.
- Jones, S. R., Palmén, M., & van Muiswinkel, W. B. (1993). Effects of inoculum route and dose on the immune response of common carp, *Cyprinus carpio* to the blood parasite, *Trypanoplasma borreli*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 36, 369–378.
- Kirby, K. S. (1957). A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. *Biochemical Journal*, 66, 495–504.
- Kodádková, A. (2014). Myxosporean phylogeny and evolution of myxospore morphotypes. Ph.D. Thesis. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

- Kottelat, M., & Freyhof, J. (2007). *Handbook of European Freshwater Fishes*. Switzerland: Steven Simpson Books.
- Lepš, J., & Šmilauer, P. (2016). *Biostatistika*. České Budějovice: EPISTEME, nakladatelství Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.
- Lom, J., & Dyková, I. (2006). Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitologica*, 53, 1.
- Lom, J., Dyková, I., Pavlásková, M., & Grupcheva, G. (1983). *Sphaerospora molnari* sp. nov. (Myxozoa: Myxosporea), an agent of gill, skin and blood sphaerosporosis of common carp in Europe. *Parasitology*, 86, 529–535.
- McGurk, C., Morris, D. J., Bron, J. E., & Adams, A. (2005). The morphology of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) spores released from *Fredericella sultana* (Bryozoa: Phylactolaemata). *Journal of Fish Diseases*, 28, 307–312.
- Mehlhorn, H., & Frenkel, J. K. (1980). Ultrastructural comparison of cysts and zoites of *Toxoplasma gondii*, *Sarcocystis muris*, and *Hammondia hammondi* in skeletal muscle of mice. *The Journal of Parasitology*, 59–67.
- Miller, L. H., Mason, S. J., Clyde, D. F., & McGinniss, M. H. (1976). The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks: the Duffy-blood-group genotype, FyFy. *New England Journal of Medicine*, 295, 302–304.
- Monteiro, A. S., Okamura, B., & Holland, P. W. (2002). Orphan worm finds a home: *Buddenbrockia* is a myxozoan. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 968–971.
- Moran, J. D. W., Margolis, L., Webster, J. M., & Kent, M. L. (1999). Development of *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea) in netpen-reared Atlantic salmon determined by light microscopy and a polymerase chain reaction test. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37, 185–193.
- Novakov, N., Ćirković, M., Ljubojević, D., Adzic, B., Pelić, M., Bozic, B., Babić, J., & Todorović, D. (2015). *Sphaerospora molnari* (Myxozoa) in common carp fingerlings. Poster session presented at 7th international conference “WATER & FISH”, Faculty of Agriculture, Belgrade-Zemun, Serbia.

- Ogawa, K., Delgahapitiya, K. P., Furuta, T., & Wakabayashi, H. (1992). Histological studies on the host response to *Myxobolus artus* Akhmerov, 1960 (Myxozoa: Myxobolidae) infection in the skeletal muscle of carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Biology*, *41*, 363–371.
- Okamura, B., & Gruhl, A. (2015). Myxozoan affinities and route to endoparasitism. In *Myxozoan Evolution, Ecology and Development* (pp. 23–44). Cham: Springer International Publishing.
- Okamura, B., Gruhl, A., & Bartholomew, J. L. (2015). An Introduction to Myxozoan Evolution, Ecology and Development. In *Myxozoan Evolution, Ecology and Development* (pp. 1–20). Cham: Springer International Publishing.
- Pellegrini, N., Gioli, G., Taccini, E., Renzoni, G., Filippi Balestra, G., & D'Amico, M. L. (1980). Infection with *Piscicola geometra* associated with a mycosis in *Cyprinus carpio* and *Leuciscus cephalus*. *Annali della Facolta'di Medicina Veterinaria di Pisa*, *33*, 249–261.
- Pojmanska, T., Wlasow, T., & Gomulka, P. (1998). *Sphaerospora renicola* and *S. molnari* in Poland and spring sphaerosporosis of carp. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, *28*, 25–31.
- Rantala, A. M., Taylor, S. M., Trottman, P. A., Luntamo, M., Mbewe, B., Maleta, K., Kulmala, T., Ashorn, P., & Meshnick, S. R. (2010). Comparison of real-time PCR and microscopy for malaria parasite detection in Malawian pregnant women. *Malaria journal*, *9*, 269.
- Schlegel, M., Lom, J., Stechmann, A., Bernhard, D., Leipe, D., Dyková, I., & Sogin, M. L. (1996). Phylogenetic analysis of complete small subunit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: evidence that Myxozoa are Metazoa and related to the Bilateria. *Archiv für Protistenkunde*, *147*, 1–9.
- Siddall, M. E., Martin, D. S., Bridge, D., Dessler, S. S., & Cone, D. K. (1995). The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic Cnidaria. *The Journal of Parasitology*, 961–967.
- Sitjà-Bobadilla, A., Palenzuela, O., Riaza, A., Macias, M. A., & Alvarez-Pellitero, P. (2007). Protective acquired immunity to *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) is related to specific

antibodies in *Psetta maxima* (L.)(Teleostei). *Scandinavian Journal of Immunology*, 66, 26–34.

Sitjà-Bobadilla, A., Redondo, M. J., Macias, M. A., Ferreiro, I., Riaza, A., & Alvarez-Pellitero, P. (2004). Development of immunohistochemistry and enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of circulating antibodies against *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 17, 335–345.

Smothers, J. F., van Dohlen, C. D., Smith, L. H. Jr., & Spall, R. D. (1994). Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. *Science*, 265, 1719–1721.

Stehr, C., & Whitaker, D. J. (1986). Host-parasite interaction of the myxosporeans *Kudoa paniformis* Kabata & Whitaker, 1981 and *Kudoa thyrsites* (Gilchrist, 1924) in the muscle of Pacific whiting, *Merluccius productus* (Ayres): an ultrastructural study. *Journal of Fish Diseases*, 9, 505–517.

Stensvold, C. R., & Nielsen, H. V. (2012). Comparison of microscopy and PCR for detection of intestinal parasites in Danish patients supports an incentive for molecular screening platforms. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 540–541.

Székely, C., Molnár, K., & Cech, G. (2015). Description of *Myxobolus balatonicus* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) from the common carp *Cyprinus carpio* L. in Lake Balaton. *Systematic Parasitology*, 91, 71–79.

Štolc, A. (1899). Actinomyxidia, eine neue Gruppe der Mesozoa, der Myxosporidien verwandt. *Abhandlungen der Böhmischen Gesellschaft der Wissenschaften*, 8, 1–12.

Weill, R. (1938). L'interprétation des Cnidosporidies et la valeur taxonomique de leur cnidome. Leur cycle comparé à la phase larvaire des Narcomeduses Culinides. *Travaux de la Station Zoologique de Wimereaux*, 13, 727–744.

Internetové zdroje:

Labguide. [online]. Česká republika, 2014 [cit. 2017-01-20]. Dostupné z: <http://labguide.cz/>.

9 Přílohy

Příloha 1: Seznam vzorků získaných z infekčního pokusu. Červeně označené vzorky = kontrolní, neinfikovaní jedinci.

Ryba č.	Krev	Žábry	Ledviny	Játra	Kůže	Svalovina	Den
1	BL1	GL1	KI1	LI1		MUS1	Den 1
2	BL2	GL2					Den 1
3	BL3	GL3					Den 1
4	BL4	GL4	KI4	LI4		MUS4	Den 1
5	BL5	GL5	KI5	LI5		MUS5	Den 1
6	BL6	GL6	KI6	LI6		MUS6	Den 1
7	BL7	GL7	KI7	LI7		MUS7	Den 1
8	BL8	GL8	KI8	LI8		MUS8	Den 1
9	BL9	GL9	KI9	LI9		MUS9	Den 2
10	BL10	GL10					Den 2
11	BL11	GL11					Den 2
12	BL12	GL12	KI12	LI12		MUS12	Den 2
13	BL13	GL13	KI13	LI13		MUS13	Den 2
14	BL14	GL14	KI14	LI14		MUS14	Den 2
15	BL15	GL15	KI15	LI15		MUS15	Den 2
16	BL16	GL16	KI16	LI16		MUS16	Den 2
17	BL17	GL17	KI17	LI17		MUS17	Den 4
18	BL18	GL18					Den 4
19	BL19	GL19					Den 4
20	BL20	GL20	KI20	LI20		MUS20	Den 4
21	BL21	GL21	KI21	LI21		MUS21	Den 4
22	BL22	GL22	KI22	LI22		MUS22	Den 4
23	BL23	GL23	KI23	LI23		MUS23	Den 4
24	BL24	GL24	KI24	LI24		MUS24	Den 4
25	BL25	GL25	KI25	LI25		MUS25	Den 7
26	BL26	GL26					Den 7
27	BL27	GL27					Den 7
28	BL28	GL28	KI28	LI28		MUS28	Den 7
29	BL29	GL29	KI29	LI29		MUS29	Den 7

30	BL30	GL30	KI30	LI30		MUS30	Den 7
31	BL31	GL31	KI31	LI31		MUS31	Den 7
32	BL32	GL32	KI32	LI32		MUS32	Den 7
33	BL33	GL33	KI33	LI33		MUS33	Den 14
34	BL34	GL34	KI34	LI34		MUS34	Den 14
35	BL35	GL35	KI35	LI35		MUS35	Den 14
36	BL36	GL36	KI36	LI36		MUS36	Den 14
37	BL37	GL37	KI37	LI37		MUS37	Den 14
38	BL38	GL38	KI38	LI38		MUS38	Den 14
39	BL39	GL39	KI39	LI39		MUS39	Den 14
40	BL40	GL40	KI40	LI40		MUS40	Den 14
41	BL41	GL41	KI41	LI41		MUS41	Den 21
42	BL42	GL42					Den 21
43	BL43	GL43					Den 21
44	BL44	GL44	KI44	LI44		MUS44	Den 21
45	BL45	GL45	KI45	LI45		MUS45	Den 21
46	BL46	GL46	KI46	LI46		MUS46	Den 21
47	BL47	GL47	KI47	LI47		MUS47	Den 21
48	BL48	GL48	KI48	LI48		MUS48	Den 21
49	BL49	GL49	KI49	LI49		MUS49	Den 28
50	BL50	GL50	KI50	LI50		MUS50	Den 28
51	BL51	GL51	KI51	LI51		MUS51	Den 28
52	BL52	GL52	KI52	LI52	SK52	MUS52	Den 28
53	BL53	GL53	KI53	LI53	SK53	MUS53	Den 28
54	BL54	GL54	KI54	LI54	SK54	MUS54	Den 28
55	BL55	GL55	KI55	LI55	SK55	MUS55	Den 28
56	BL56	GL56	KI56	LI56	SK56	MUS56	Den 28
57	BL57	GL57	KI57	LI57	SK57	MUS57	Den 35
58	BL58	GL58					Den 35
59	BL59	GL59	KI59	LI59		MUS59	Den 35
60	BL60	GL60	KI60	LI60	SK60	MUS60	Den 35
61	BL61	GL61	KI61	LI61	SK61	MUS61	Den 35
62	BL62	GL62	KI62	LI62	SK62	MUS62	Den 35
63	BL63	GL63	KI63	LI63	SK63	MUS63	Den 35
64	BL64	GL64	KI64	LI64	SK64	MUS64	Den 35

65	BL65	GL65	KI65	LI65	SK65	MUS65	Den 42
66	BL66	GL66					Den 42
67	BL67	GL67					Den 42
68	BL68	GL68	KI68	LI68	SK68	MUS68	Den 42
69	BL69	GL69	KI69	LI69	SK69	MUS69	Den 42
70	BL70	GL70	KI70	LI70	SK70	MUS70	Den 42
71	BL71	GL71	KI71	LI71	SK71	MUS71	Den 42
72	BL72	GL72	KI72	LI72	SK72	MUS72	Den 42
73	BL73	GL73	KI73	LI73	SK73	MUS73	Den 49
74	BL74	GL74					Den 49
75	BL75	GL75					Den 49
76	BL76	GL76	KI76	LI76	SK76	MUS76	Den 49
77	BL77	GL77	KI77	LI77	SK77	MUS77	Den 49
78	BL78	GL78	KI78	LI78	SK78	MUS78	Den 49
79	BL79	GL79	KI79	LI79	SK79	MUS79	Den 49
80	BL80	GL80	KI80	LI80	SK80	MUS80	Den 49
81	BL81	GL81	KI81	LI81	SK81	MUS81	Den 56
82	BL82		KI82				Den 56
83	BL83	GL83	KI83				Den 56
84	BL84	GL84	KI84	LI84	SK84	MUS84	Den 56
85	BL85	GL85	KI85	LI85	SK85	MUS85	Den 56
86	BL86	GL86	KI86	LI86	SK86	MUS86	Den 56
87	BL87	GL87	KI87	LI87	SK87	MUS87	Den 63
88	BL88	GL88					Den 63
89	BL89	GL89					Den 63
90	BL90	GL90	KI90	LI90	SK90	MUS90	Den 63
91	BL91	GL91	KI91	LI91	SK91	MUS91	Den 63
92	BL92	GL92	KI92	LI92	SK92	MUS92	Den 63
93	BL93	GL93	KI93	LI93	SK93	MUS93	Den 63

Příloha 2: Souhr získaných hodnot. Hodnoty *R*, *Rn* zaokrouhlené na čtyři desetinná místa; relativní kvantifikace na tři desetinná místa. Světle šedá pole = negativní vzorky; tmavě šedé řádky = vzorky vyhodnocené podle qPCR jako nefunkční.

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 7	28BL	Krev	216,90	0,46	0	39,95	26,02	0,0001	0,0000	0,004
Den 7	28GL	Žábry	289,50	0,35	0	-	27,63	-	-	0
Den 7	28KI	Ledviny	276,60	0,36	0	-	25,72	-	-	0
Den 7	28LI	Játra	243,70	0,41	0	-	26,85	-	-	0
Den 7	28MUS	Svalovina	78,80	1,00	0	-	27,62	-	-	0
Den 7	29BL	Krev	115,90	0,86	0	-	27,18	-	-	0
Den 7	29GL	Žábry	59,40	1,00	0	-	29,40	-	-	0
Den 7	29KI	Ledviny	179,20	0,56	0	-	24,90	-	-	0
Den 7	29LI	Játra	192,60	0,52	0	-	26,63	-	-	0
Den 7	29MUS	Svalovina	50,20	1,00	0	35,69	26,55	0,0018	0,0012	0,124
Den 7	30BL	Krev	64,60	1,00	0	-	28,32	-	-	0

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 7	30GL	Žábry	73,10	1,00	0	-	27,91	-	-	0
Den 7	30KI	Ledviny	77,60	1,00	0	-	28,72	-	-	0
Den 7	30LI	Játra	314,40	0,32	0	-	25,83	-	-	0
Den 7	30MUS	Svalovina	58,50	1,00	0	-	26,61	-	-	0
Den 7	31BL	Krev	81,30	1,00	0	-	26,82	-	-	0
Den 7	31GL	Žábry	273,80	0,37	0	-	27,59	-	-	0
Den 7	31KI	Ledviny	361,70	0,28	0	-	24,69	-	-	0
Den 7	31LI	Játra	100,00	1,00	0	-	27,36	-	-	0
Den 7	31MUS	Svalovina	231,60	0,43	0	-	29,19	-	-	0
Den 7	32BL	Krev	260,60	0,38	0	-	27,24	-	-	0
Den 7	32GL	Žábry	88,40	1,00	0	-	27,82	-	-	0
Den 7	32KI	Ledviny	123,60	0,81	0	-	25,97	-	-	0
Den 7	32LI	Játra	288,60	0,35	0	-	27,19	-	-	0

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 7	32MUS	Svalovina	31,40	1,00	0	-	29,02	-	-	0
Den 14	36 BL	Krev	195,20	0,51	0	-	27,00	-	-	0
Den 14	36 GL	Žábry	137,70	0,73	0	-	27,08	-	-	0
Den 14	36KI	Ledviny	208,90	0,48	1	-	25,56	-	-	0
Den 14	36 LI	Játra	90,80	1,00	1	-	26,40	-	-	0
Den 14	36 MUS	Svalovina	41,70	1,00	1	-	29,08	-	-	0
Den 14	37BL	Krev	133,90	0,75	0	-	26,21	-	-	0
Den 14	37GL	Žábry	255,40	0,39	1	-	25,78	-	-	0
Den 14	37KI	Ledviny	530,00	0,19	0	-	25,21	-	-	0
Den 14	37LI	Játra	96,60	1,00	0	-	27,18	-	-	0
Den 14	37MUS	Svalovina	119,90	0,83	0	-	27,92	-	-	0
Den 14	38BL	Krev	35,90	1,00	0	-	25,41	-	-	0
Den 14	38GL	Žábry	84,90	1,00	1	35,61	26,93	0,0024	0,0017	0,171

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 14	38KI	Ledviny	767,80	0,13	0	36,67	27,64	0,0019	0,0013	0,133
Den 14	38LI	Játra	238,40	0,42	0	34,35	25,15	0,0017	0,0012	0,119
Den 14	38MUS	Svalovina	31,60	1,00	0	39,16	29,30	0,0011	0,0008	0,075
Den 14	39BL	Krev	86,50	1,00	0	41,30	29,26	0,0002	0,0002	0,017
Den 14	39GL	Žábry	251,10	0,40	0	-	26,97	-	-	0
Den 14	39KI	Ledviny	1643,00	0,06	0	-	30,15	-	-	0
Den 14	39LI	Játra	71,60	1,00	0	-	25,91	-	-	0
Den 14	39MUS	Svalovina	30,70	1,00	0	-	28,92	-	-	0
Den 14	40BL	Krev	108,80	0,92	0	-	27,63	-	-	0
Den 14	40GL	Žábry	391,80	0,26	0	-	30,12	-	-	0
Den 14	40KI	Ledviny	886,60	0,11	0	-	28,20	-	-	0
Den 14	40LI	Játra	102,80	0,97	0	-	29,50	-	-	0
Den 14	40MUS	Svalovina	35,80	1,00	0	-	28,90	-	-	0

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 21	44BL	Krev	193,60	0,52	0	32,99	26,59	0,0118	0,0083	0,826
Den 21	44GL	Žábry	372,70	0,27	0	30,44	21,98	0,0028	0,0020	0,198
Den 21	44KI	Ledviny	334,80	0,30	0	31,23	22,22	0,0019	0,0014	0,135
Den 21	44LI	Játra	284,90	0,35	0	32,39	27,59	0,0360	0,0251	2,512
Den 21	44MUS	Svalovina	31,30	1,00	0	32,16	27,55	0,0409	0,0286	2,856
Den 21	45BL	Krev	63,80	1,00	0	35,19	26,80	0,0030	0,0021	0,209
Den 21	45GL	Žábry	361,70	0,28	0	29,41	24,41	0,0312	0,0218	2,179
Den 21	45KI	Ledviny	900,80	0,11	0	33,42	27,53	0,0169	0,0118	1,180
Den 21	45LI	Játra	84,80	1,00	0	29,96	23,43	0,0108	0,0075	0,755
Den 21	45MUS	Svalovina	37,00	1,00	0	32,30	25,98	0,0126	0,0088	0,876
Den 21	46BL	Krev	48,60	1,00	0	34,39	26,56	0,0044	0,0031	0,306
Den 21	46GL	Žábry	82,50	1,00	0	30,48	24,56	0,0165	0,0037	0,369
Den 21	46KI	Ledviny	149,60	0,67	0	31,37	25,16	0,0135	0,0030	0,301

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 21	46LI	Játra	128,40	0,78	0	29,19	22,25	0,0081	0,0028	0,277
Den 21	46MUS	Svalovina	34,00	1,00	0	-	26,29	-	-	0
Den 21	47BL	Krev	100,40	1,00	0	26,64	23,78	0,1373	0,0957	9,572
Den 21	47GL	Žábry	211,20	0,47	0	30,51	26,57	0,0652	0,0454	4,544
Den 21	47KI	Ledviny	185,30	0,54	0	29,90	22,12	0,0046	0,0032	0,318
Den 21	47LI	Játra	71,00	1,00	0	31,94	27,89	0,0604	0,0421	4,210
Den 21	47MUS	Svalovina	48,30	1,00	0	-	30,84	-	-	0
Den 21	48BL	Krev	199,50	0,50	0	33,00	25,48	0,0055	0,0018	0,183
Den 21	48GL	Žábry	192,60	0,52	0	-	33,21	-	-	0
Den 21	48KI	Ledviny	1323,40	0,08	0	28,21	24,91	0,1019	0,0711	7,105
Den 21	48LI	Játra	108,20	0,92	1	30,90	27,37	0,0866	0,0604	6,037
Den 21	48MUS	Svalovina	32,60	1,00	0	-	32,31	-	-	0
Den 28	52BL	Krev	252,20	0,40	2	28,29	26,51	0,2912	0,2031	20,306

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 28	52GL	Žábry	75,00	1,00	2	29,00	26,29	0,1534	0,0513	5,134
Den 28	52KI	Ledviny	1079,00	0,09	3	29,55	26,23	0,1001	0,0335	3,352
Den 28	52LI	Játra	130,80	0,76	3	28,84	25,77	0,1191	0,0399	3,986
Den 28	52MUS	Svalovina	27,30	1,00	0	32,29	29,67	0,1627	0,0545	5,445
Den 28	52SK	Kůže	574,00	0,17	0	-	32,99	-	-	0
Den 28	53BL	Krev	260,10	0,38	1	29,08	26,74	0,1982	0,0719	7,187
Den 28	53GL	Žábry	117,70	0,85	1	31,42	27,17	0,0524	0,0175	1,753
Den 28	53KI	Ledviny	1988,70	0,05	4	29,07	25,12	0,0645	0,0216	2,158
Den 28	53LI	Játra	119,10	0,84	4	24,86	23,27	0,3310	0,1108	11,081
Den 28	53MUS	Svalovina	57,90	1,00	2	28,57	27,46	0,4633	0,1551	15,508
Den 28	53SK	Kůže	65,00	1,00	0	36,01	27,69	0,0031	0,0022	0,217
Den 28	54BL	Krev	187,00	0,53	2	28,28	26,46	0,2842	0,0951	9,513
Den 28	54GL	Žábry	25,10	1,00	0	32,03	28,52	0,0881	0,0295	2,948

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 28	54KI	Ledviny	411,90	0,24	0	28,32	24,85	0,0902	0,0302	3,021
Den 28	54LI	Játra	289,60	0,35	4	28,97	26,16	0,1426	0,0477	4,773
Den 28	54MUS	Svalovina	35,70	1,00	0	28,17	25,65	0,1743	0,0584	5,836
Den 28	54SK	Kůže	342,00	0,29	0	35,20	26,21	0,0020	0,0014	0,137
Den 28	55BL	Krev	3171,10	0,03	0	0,00				NA
Den 28	55GL	Žábry	30,80	1,00	0	0,00				NA
Den 28	55KI	Ledviny	1937,20	0,05	0	0,00				NA
Den 28	55LI	Játra	177,10	0,56	0	0,00				NA
Den 28	55MUS	Svalovina	22,10	1,00	0	0,00				NA
Den 28	55SK	Kůže	180,00	0,56	0	0,00				NA
Den 28	56 BL	Krev	411,60	0,24	2	29,70	27,18	0,1743	0,0389	3,891
Den 28	56 GL	Žábry	410,80	0,24	2	25,65	24,05	0,3287	0,1100	11,004
Den 28	56 KI	Ledviny	191,70	0,52	2	27,93	25,72	0,2161	0,0723	7,235

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 28	56 LI	Játra	300,50	0,33	1	29,29	25,83	0,0906	0,0303	3,031
Den 28	56 MUS	Svalovina	60,20	1,00	1	25,96	24,90	0,4796	0,1606	16,055
Den 28	56SK	Kůže	253,00	0,40	1	34,28	25,08	0,0017	0,0012	0,119
Den 35	60BL	Krev	267,30	0,37	5	29,97	25,21	0,0368	0,0257	2,565
Den 35	60GL	Žábry	68,20	1,00	3	28,22	23,57	0,0398	0,0278	2,778
Den 35	60KI	Ledviny	67,70	1,00	0	29,36	24,05	0,0252	0,0176	1,758
Den 35	60LI	Játra	304,60	0,33	1	29,62	27,40	0,2139	0,1492	14,917
Den 35	60MUS	Svalovina	56,20	1,00	2	30,34	26,29	0,0606	0,0423	4,225
Den 35	60SK	Kůže	180,00	0,56	2	32,96	25,59	0,0060	0,0042	0,422
Den 35	61BL	Krev	66,80	1,00	0	33,76	26,67	0,0073	0,0027	0,266
Den 35	61GL	Žábry	107,20	0,93	1	29,58	24,53	0,0301	0,0210	2,098
Den 35	61KI	Ledviny	108,60	0,92	2	28,54	24,53	0,0619	0,0431	4,313
Den 35	61LI	Játra	276,90	0,36	2	32,24	25,90	0,0123	0,0086	0,861

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 35	61MUS	Svalovina	48,40	1,00	4	32,03	26,65	0,0241	0,0168	1,680
Den 35	61SK	Kůže	346,00	0,29	3	31,22	22,98	0,0033	0,0023	0,230
Den 35	62BL	Krev	25,60	1,00	5	39,67	24,47	0,0000	0,0000	0,001
Den 35	62GL	Žábry	1210,20	0,01	5	26,89	23,25	0,0802	0,0269	2,685
Den 35	62KI	Ledviny	234,50	0,43	1	30,66	26,00	0,0396	0,0132	1,324
Den 35	62LI	Játra	157,30	0,64	4	30,58	25,84	0,0374	0,0125	1,253
Den 35	62MUS	Svalovina	116,10	0,86	5	26,83	22,46	0,0482	0,0161	1,613
Den 35	62SK	Kůže	460,00	0,22	4	31,03	23,60	0,0058	0,0040	0,403
Den 35	63BL	Krev	30,00	1,00	3	33,95	25,06	0,0021	0,0007	0,067
Den 35	63GL	Žábry	52,20	1,00	3	22,12	21,88	0,8467	0,2687	26,868
Den 35	63KI	Ledviny	343,20	0,29	0	35,91	32,33	0,0836	0,0583	5,831
Den 35	63LI	Játra	302,80	0,33	5	29,26	26,72	0,1719	0,0546	5,456
Den 35	63MUS	Svalovina	211,40	0,47	2	28,77	25,90	0,1368	0,0434	4,340

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 35	63SK	Kůže	211,00	0,47	0	32,16	23,06	0,0018	0,0013	0,127
Den 35	64BL	Krev	245,50	0,41	0	30,47	25,03	0,0230	0,0073	0,728
Den 35	64GL	Žábry	162,30	0,62	0					NA
Den 35	64KI	Ledviny	433,50	0,23	0	35,41	28,99	0,0117	0,0037	0,372
Den 35	64LI	Játra	347,10	0,29	0					NA
Den 35	64MUS	Svalovina	395,50	0,25	0					NA
Den 35	64SK	Kůže	450,00	0,22	0	32,08	23,32	0,0023	0,0016	0,161
Den 42	68BL	Krev	404,00	0,25	4	27,28	24,90	0,1914	0,1335	13,351
Den 42	68GL	Žábry	132,80	0,75	3	26,61	25,18	0,3711	0,2588	25,882
Den 42	68KI	Ledviny	269,10	0,37	3	28,82	26,56	0,2080	0,1451	14,509
Den 42	68LI	Játra	351,20	0,28	5	20,91	21,43	1,4340	1,0000	100
Den 42	68MUS	Svalovina	214,30	0,47	3	26,48	25,54	0,5194	0,3622	36,224
Den 42	68SK	Kůže	500,00	0,20	0	34,55	25,90	0,0025	0,0017	0,174

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 42	69BL	Krev	152,80	0,65	3	38,70	21,39	0,0000	0,0000	0,000
Den 42	69GL	Žábry	125,90	0,79	0	29,09	25,21	0,0679	0,0216	2,155
Den 42	69KI	Ledviny	205,70	0,49	0	32,36	27,77	0,0415	0,0132	1,317
Den 42	69LI	Játra	491,00	0,20	2	30,40	25,89	0,0439	0,0139	1,393
Den 42	69MUS	Svalovina	201,60	0,50	5	29,16	25,22	0,0652	0,0207	2,067
Den 42	69SK	Kůže	111,00	0,90	0	30,78	24,07	0,0096	0,0067	0,668
Den 42	70 BL	Krev	212,60	0,47	2	29,73	26,91	0,1416	0,0691	6,913
Den 42	70 GL	Žábry	143,70	0,70	2	26,54	25,34	0,4353	0,1381	13,811
Den 42	70 KI	Ledviny	223,80	0,45	0	28,28	26,61	0,3132	0,0994	9,937
Den 42	70 LI	Játra	269,90	0,37	5	23,72	23,93	1,1567	0,4670	46,70
Den 42	70 MUS	Svalovina	88,70	1,00	5	26,92	24,93	0,2526	0,0802	8,016
Den 42	70SK	Kůže	352,00	0,28	2	31,32	26,76	0,0424	0,0296	2,956
Den 42	71BL	Krev	182,70	0,55	0					NA

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 42	71GL	Žábry	137,50	0,73	1	28,62	25,67	0,1294	0,0902	9,025
Den 42	71KI	Ledviny	188,60	0,53	1	29,46	26,18	0,1029	0,0718	7,179
Den 42	71LI	Játra	556,80	0,18	0					NA
Den 42	71MUS	Svalovina	158,00	0,63	3	28,39	25,79	0,1649	0,0805	8,052
Den 42	71SK	Kůže	499,80	0,20	2	32,85	24,98	0,0043	0,0030	0,298
Den 42	72BL	Krev	141,00	0,71	0					NA
Den 42	72GL	Žábry	87,50	1,00	0	28,84	26,36	0,1786	0,0872	8,720
Den 42	72KI	Ledviny	355,80	0,28	1	27,96	23,68	0,0517	0,0252	2,522
Den 42	72LI	Játra	258,40	0,39	0	29,08	25,80	0,1029	0,0503	5,026
Den 42	72MUS	Svalovina	360,40	0,28	2	29,69	25,57	0,0575	0,0281	2,807
Den 42	72SK	Kůže	799,20	0,13	3	31,91	25,82	0,0146	0,0102	1,020
Den 49	76BL	Krev	60,90	1,00	0	34,45	26,00	0,0029	0,0020	0,199
Den 49	76GL	Žábry	122,60	0,82	0	26,48	23,79	0,1544	0,1077	10,769

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 49	76KI	Ledviny	339,10	0,29	1	26,92	22,34	0,0420	0,0293	2,926
Den 49	76LI	Játra	302,20	0,33	3	30,46	26,02	0,0459	0,0320	3,202
Den 49	76MUS	Svalovina	331,10	0,30	0	29,22	26,44	0,1456	0,1015	10,153
Den 49	76SK	Kůže	445,00	0,22	0	35,94	26,56	0,0015	0,0010	0,104
Den 49	77BL	Krev	183,40	0,55	1	39,31	27,60	0,0003	0,0002	0,021
Den 49	77GL	Žábry	86,80	1,00	0	29,14	25,02	0,0575	0,0401	4,011
Den 49	77KI	Ledviny	191,80	0,52	1	29,70	25,14	0,0422	0,0134	1,341
Den 49	77LI	Játra	250,60	0,40	0	32,02	27,05	0,0319	0,0223	2,225
Den 49	77MUS	Svalovina	334,20	0,30	0	29,51	25,77	0,0751	0,0524	5,237
Den 49	77SK	Kůže	166,70	0,60	0	-	27,42	-	-	0
Den 49	78BL	Krev	194,50	0,51	0					NA
Den 49	78GL	Žábry	144,30	0,69	2	27,61	25,06	0,1702	0,0872	8,722
Den 49	78KI	Ledviny	223,30	0,45	0	30,42	25,96	0,0454	0,0233	2,329

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 49	78LI	Játra	420,00	0,24	0	24,20	23,35	0,5548	0,2844	28,437
Den 49	78MUS	Svalovina	356,90	0,28	0	31,11	26,86	0,0526	0,0269	2,694
Den 49	78SK	Kůže	620,10	0,16	1	32,46	25,24	0,0067	0,0047	0,468
Den 49	79BL	Krev	179,80	0,56	2	29,68	24,68	0,0313	0,0153	1,526
Den 49	79GL	Žábry	67,00	1,00	3	29,81	25,85	0,0643	0,0448	4,481
Den 49	79KI	Ledviny	163,70	0,61	4	30,35	25,42	0,0328	0,0168	1,681
Den 49	79LI	Játra	265,20	0,38	4	28,59	23,76	0,0352	0,0245	2,452
Den 49	79MUS	Svalovina	176,00	0,57	1	29,39	24,71	0,0389	0,0199	1,993
Den 49	79SK	Kůže	401,30	0,25	2	32,50	24,65	0,0043	0,0030	0,302
Den 49	80BL	Krev	160,80	0,62	4	37,15	26,80	0,0008	0,0004	0,037
Den 49	80GL	Žábry	88,90	1,00	4	31,12	25,89	0,0266	0,0136	1,361
Den 49	80KI	Ledviny	316,40	0,32	1	27,30	21,58	0,0189	0,0097	0,969
Den 49	80LI	Játra	286,40	0,35	1	32,72	25,67	0,0076	0,0039	0,388

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 49	80MUS	Svalovina	237,00	0,42	1	32,13	26,49	0,0200	0,0139	1,394
Den 49	80SK	Kůže	384,30	0,26	1	34,56	26,08	0,0028	0,0020	0,195
Den 56	84BL	Krev	105,10	0,95	0	37,78	26,00	0,0003	0,0001	0,008
Den 56	84GL	Žábry	293,00	0,34	2	25,59	22,21	0,0961	0,0492	4,923
Den 56	84KI	Ledviny	380,10	0,26	5	28,13	23,17	0,0321	0,0165	1,647
Den 56	84LI	Játra	560,40	0,18	5	28,65	25,58	0,1195	0,0612	6,125
Den 56	84MUS	Svalovina	349,00	0,29	4	27,97	23,87	0,0585	0,0175	1,755
Den 56	84SK	Kůže	180,10	0,56	0	33,82	23,74	0,0009	0,0006	0,064
Den 56	85BL	Krev	111,00	0,90	0	32,24	25,78	0,0114	0,0034	0,342
Den 56	85GL	Žábry	265,10	0,38	3	29,52	25,13	0,0477	0,0143	1,430
Den 56	85KI	Ledviny	269,50	0,37	2	30,91	26,17	0,0373	0,0191	1,911
Den 56	85LI	Játra	328,10	0,30	0	30,92	25,68	0,0265	0,0079	0,793
Den 56	85MUS	Svalovina	351,20	0,28	4	27,00	23,78	0,1073	0,0322	3,218

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 56	85SK	Kůže	322,60	0,31	0	35,24	28,13	0,0072	0,0050	0,505
Den 56	86BL	Krev	271,90	0,37	1	29,67	24,54	0,0285	0,0085	0,853
Den 56	86GL	Žábry	244,40	0,41	1	29,89	25,93	0,0640	0,0192	1,920
Den 56	86KI	Ledviny	232,80	0,43	1	31,86	25,51	0,0123	0,0037	0,368
Den 56	86LI	Játra	498,40	0,20	1	31,15	23,51	0,0050	0,0026	0,258
Den 56	86MUS	Svalovina	373,10	0,27	4	28,43	23,14	0,0255	0,0131	1,306
Den 56	86SK	Kůže	244,80	0,41	0	33,33	26,17	0,0070	0,0049	0,488
Den 63	90BL	Krev	84,30	1,00	2	33,78	26,69	0,0073	0,0039	0,003
Den 63	90GL	Žábry	179,10	0,56	1	31,31	26,46	0,0347	0,0128	1,282
Den 63	90KI	Ledviny	166,60	0,60	1	31,40	25,87	0,0216	0,0080	0,800
Den 63	90LI	Játra	273,60	0,37	0	32,25	27,03	0,0268	0,0142	0,010
Den 63	90MUS	Svalovina	184,90	0,54	1	28,13	25,50	0,1615	0,0597	5,971
Den 63	90SK	Kůže	500,80	0,20	0	32,92	24,81	0,0036	0,0025	0,252

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 63	91BL	Krev	177,10	0,56	2	33,90	27,97	0,0164	0,0061	0,606
Den 63	91GL	Žábry	166,60	0,60	0	30,31	26,87	0,0918	0,0339	3,394
Den 63	91KI	Ledviny	185,10	0,54	1	30,67	26,54	0,0571	0,0211	2,111
Den 63	91LI	Játra	311,10	0,32	0	32,48	27,54	0,0325	0,0120	1,200
Den 63	91MUS	Svalovina	245,00	0,41	1	27,00	25,45	0,3415	0,1262	12,622
Den 63	91SK	Kůže	350,50	0,29	0	-	24,89	-	-	0
Den 63	92BL	Krev	84,80	1,00	0	40,50	26,51	0,0001	0,0000	0,002
Den 63	92GL	Žábry	73,30	1,00	2	31,76	25,57	0,0137	0,0051	0,508
Den 63	92KI	Ledviny	183,90	0,54	2	31,86	26,15	0,0191	0,0071	0,706
Den 63	92LI	Játra	283,30	0,35	1	32,96	27,01	0,0162	0,0049	0,485
Den 63	92MUS	Svalovina	301,30	0,33	3	31,04	24,77	0,0129	0,0039	0,387
Den 63	92SK	Kůže	457,60	0,12	0	-	24,50	-	-	0
Den 63	93BL	Krev	232,30	0,43	3	32,92	23,60	0,0016	0,0005	0,047

Den	Název vzorku	Tkáň	Koncentrace DNA (ng/μl)	Ředění	PCR	průměrná Ct (18S rDNA)	průměrná Ct (beta-aktin)	R	Rn	relativní kvantifikace (%)
Den 63	93GL	Žábry	240,40	0,42	2	33,53	25,36	0,0035	0,0013	0,128
Den 63	93KI	Ledviny	206,20	0,48	1	32,90	26,43	0,0113	0,0042	0,418
Den 63	93LI	Játra	249,70	0,40	0	33,57	25,68	0,0042	0,0016	0,156
Den 63	93MUS	Svalovina	197,70	0,51	1	32,81	26,32	0,0111	0,0041	0,411
Den 63	93SK	Kůže	690,00	0,14	0	38,48	26,81	0,0003	0,0002	0,021