

SZENT ISTVÁN EGYETEM  
ÁLLATORVOS-TUDOMÁNYI KAR  
Biológiai Intézet, Ökológiai Tanszék

**Patogén és apatogén nyálkaspórák (Myxozoa) fajok  
halon belüli fejlődésének összehasonlító vizsgálata**

Szakedolgozat

Készítette: Bali Krisztina

Témavezetők: Dr. Eszterbauer Edit, tudományos főmunkatárs

Forró Barbara, tudományos segédmunkatárs

Magyar Tudományos Akadémia, Agrártudományi Kutatóközpont  
Állatorvos-tudományi Intézet

Budapest

2015

# Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék .....	2
Rövidítések jegyzéke .....	3
1. Bevezetés .....	4
2. Irodalmi áttekintés .....	6
2.1 Nyálkaspórások .....	6
2.2 <i>Myxobolus cerebralis</i> (Hofer, 1903) .....	9
2.3 <i>Myxobolus pseudodispar</i> (Gorbunova, 1936) .....	11
2.4 A halak védekezési mechanizmusai nyálkaspórás paraziták ellen .....	13
3. Anyagok és módszerek .....	15
3.1 Fertőzési kísérletek: .....	15
3.2 Molekuláris módszerek .....	16
3.2.1 DNS kivonás .....	16
3.2.2 Nested PCR .....	17
3.3 Statisztikai elemzés .....	19
4. Eredmények .....	20
5. Megbeszélés .....	28
6. Összefoglalás .....	32
7. Summary .....	34
8. Köszönetnyilvánítás .....	36
9. Hivatkozások .....	37

## Rövidítések jegyzéke

16S rDNS	16S mitokondriális RNS gén
18S rDNS	18S riboszomális RNS gén
bp	bázispár
mp	másodperc
PBS	foszfát-pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
PCR	polimeráz láncreakció
PKD	proliferatív vesebetegség
SPF	specifikus parazitamentes
TAM	triactinomyxon

# 1. Bevezetés

A nyálkaspórások (Myxozoa) az állatvilág egy különleges, kevésbé ismert, mikroszkopikus méretű csoportja. Leginkább a gazdasági szempontból fontos halfajokban okozott betegségek kapcsán ismert. A magyarországi vizekben gyakori parazita például a pontyok rosszindulatú vérfogyottságát okozó *Myxobolus cyprini*, az úszóhólyag-gyulladást kiváltó *Sphaerospora dykova* (syn. *S. renicola*) és a kopoltyú-sphaerosporosist előidéző *Sphaerospora molnari* (Molnár, 1979, 1980; Molnár. and Kovács-Gayer, 1985). A *Ceratonova shasta* (korábban *Ceratomyxa shasta*) a lazacfélék ceratomyxosis nevű betegségéért felelős (Bartholomew et al., 1997). Ezen kívül jelentős állománybeli veszteségek írhatók a lazacfélék proliferatív vesebetegségét (PKD) okozó *Tetracapsuloides bryosalmonae* és a pisztrángok kergekórját kiváltó *Myxobolus cerebralis* paraziták számlájára is (Hedrick et al., 1998; Canning et al., 1999).

A nyálkaspórás halparaziták kutatása már régóta folyik a Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi Kutatóközpont Állatorvos-tudományi Intézetében. A Halparazitológia kutatócsoport tagjai molekuláris, taxonómiai és morfológiai kutatások mellett fertőzési kísérleteket is végeznek a gazda-fajlagosság vizsgálatára. Ezen kívül a paraziták fejlődési ciklusát és a fertőzés módját is vizsgálják. Számos *Myxobolus*, *Henneya*, *Sphaerospora* és *Thelohanellus* nemzetségbe tartozó faj genetikai jellemzését végezték el. Emellett a nyálkaspórás fajok 18S rDNS szekvenciájának filogenetikai elemzésével is foglalkoznak (Eszterbauer, 2004). Hazai és külföldi pisztrángos gazdaságokkal együttműködve vizsgálták a sebes pisztráng tenyészállományok beltenyésztettségének a *M. cerebralis* iránti fogékonyságára gyakorolt hatását (Eszterbauer et al., 2015b). Ezzel párhuzamosan a *Myxobolus pseudodispar* kevéssertéjű férgekben (Annelida, Clitellate, Oligochaeta) zajló fejlődésmenetének kutatása is folyik. A parazita *Oligochaeta* gazdaspektruma mellett a feregpopulációk fajösszetételének a fertőzés kimenetelére való befolyásoló hatását is tanulmányozták. Ezen kívül a parazita gazdába való bejutásának módját és helyét, illetve a fejlődés útvonalát is vizsgálták (Marton and Eszterbauer, 2012).

Szakdolgozati munkám során a nyálkaspórások gazdafajlagosságának különböző aspektusait vizsgáló kutatómunkába kapcsolódtam be. Vizsgálatunk célja a patogén és apatogén nyálkaspórás modellfajok vérben való jelenlétének vizsgálata, melyhez fertőzési

kísérleteket végeztünk különböző halfajokkal. Az általunk kiválasztott patogén faj a pisztrángfélék kergekórját okozó *Myxobolus cerebralis*, apatogén fajként pedig a pontyféléket fertőző *Myxobolus pseudodispar*-t használtuk kísérleteinkhez. Többek között választ kerestünk arra a kérdésre, hogy különbözik-e a patogén és apatogén fajok halon belüli fejlődésének kezdeti, migrációs szakasza, illetve, hogy van-e szerepe a vérnek az eltérő patogenitású parazita fajok halon belüli terjedésében.

## 2. Irodalmi áttekintés

### 2.1 Nyálkaspórások

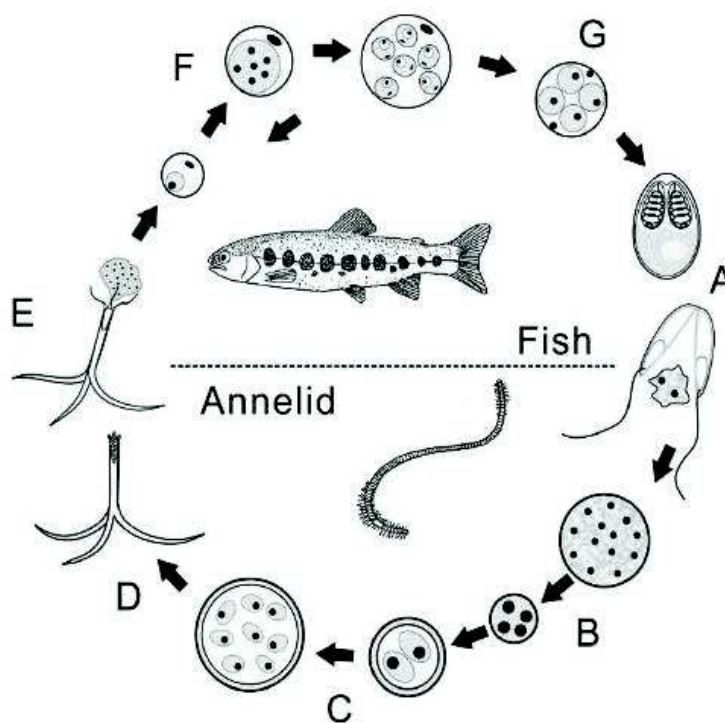
A nyálkaspórás paraziták elsősorban a patogén fajok által okozott súlyos halbetegségekről ismertek. A máig leírt több mint 2200 faj nagy része azonban nem patogén (Lom and Dyková, 2006). Ennek oka valószínűleg az, hogy a gazda-parazita együttélés hosszú időre tekint vissza a legtöbb nyálkaspórás faj esetében, így az evolúció során a gazdák és parazitáik alkalmazkodni tudtak egymáshoz. (Nesnidal et al., 2013)

Rendszertani helyzetük sokáig vitatott volt, jelenlegi tudásunk szerint molekuláris és morfológiai vizsgálatok alapján legközelebbi rokonaik a csalánozók (Cnidaria). Ezt a rokonsági kapcsolatot a nyálkaspórások sarki tokjának és a csalánozók csalánsejtjének hasonlósága is alátámasztja (Siddall et al., 1995). Filogenetikai eredmények alapján a nyálkaspórások csoportjának jelenlegi osztályozása a következő, ami azonban változtatásra szorul számos taxon (többek között a Myxozoa) bizonytalan rendszertani besorolása miatt (Kodádková, 2014) :

- Törzs: Cnidaria
  - Myxozoa
    - Osztály: Myxosporea
      - tengeri klád (Polychaeta gazda)
        - Ceratomyxa
        - Myxidum
        - Kudoa
        - Euteromyxum
        - Ceratonova
        - Bipteria
      - édesvízi klád (Oligochaeta gazda)
        - Myxidum
        - Myxobolus
        - Chloromyxum
        - Urinary bladder
        - Chloromyxum careni
      - Sphaerospora klád

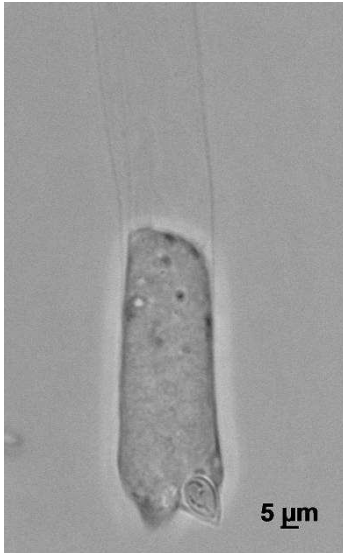
- Osztály: Malacosporea
  - Rend: Malacovalvulida
    - Nem: Buddenbrockia
    - Nem: Tetracapsuloides

A nyálkaspórások a parazita életmódjukból eredően leegyszerűsödött, ám többsejtű szervezetek. Bonyolult, kétgazdás fejlődésmenettel rendelkeznek, melyhez egy gerinctelen és egy gerinces gazda is szükséges. A gerinctelen gazda általában kevéssejtű gyűrűsféreg (Oligochaeta), ritkábban soksejtű gyűrűsféreg (Polychaeta), mohaállat (Bryozoa), vagy fecskendőféreg (Sipunculida). Legtöbbször alacsonyabb rendű



**1. ábra:** A nyálkaspórások fejlődési ciklusának sematikus ábrája. A: a myxospóra poláris filamentumainak kilökődése a spóra Oligochaeta gazda bélhámjához való rögzülésére. B: gametogónia (ivaros szaporodás). C: aktinospóra stádium képződése. D: érett aktinospóra kifejlődése a pánsporociszta belsejében, majd külvilágba ürülés. E: a poláris filamentumok kilökődése a hallal való találkozáskor. F: osztódási folyamatok. G: a myxospóra stádium képződése. (Yokoyama et al., 2012)

gerinceseket fertőznek, leggyakrabban halakat. De ezen kívül előfordulnak kétéltűekben, hüllőkben, vízimadarokban és kisemlősökben is. Vakondok (*Talpa europea*) agyában is találtak már nyálkaspórászerű élősködőket, erdei cickányból pedig több fajt is leírtak (*Soricimyxum* spp.) (Friedrich et al., 2000; Lom and Dyková, 2006). Eddig megközelítőleg 50 faj fejlődésmenetéről vannak ismereteink, de csak 5 faj (*Myxobolus cerebralis*, *M. pseudodispar*, *M. parviformis*, *Ceratonova shasta* és *Tetracapsuloides bryosalmonae*) fejlődési ciklusát sikerült eddig laboratóriumi körülmények között reprodukálni mind a gerinctelen, mind a gerinces gazda fertőzésével (Eszterbauer et al., 2015a). A halélősködő nyálkaspórások általános fejlődési ciklusát az 1. ábra szemlélteti (Yokoyama et al., 2012). Kétféle, morfológiailag nagyon különböző, spóraalakjuk van. Elsőként Wolf és Markiw



**2. ábra:** *Myxobolus cerebralis* aktinospóra poláris kapszula fénymikroszkóp alatt

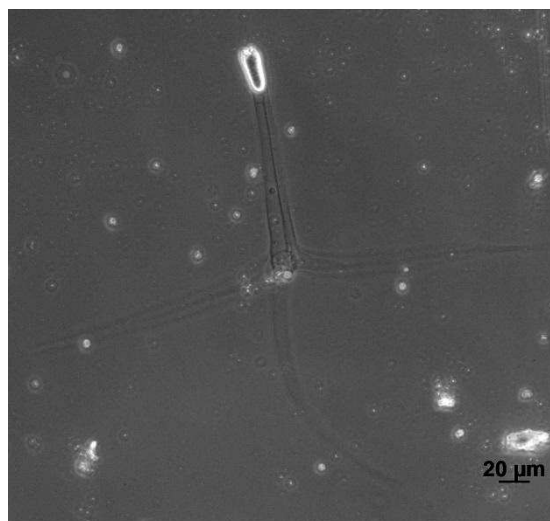
(1984) írta le a *Myxobolus cerebralis* fejlődésmenetét. Ők bizonyították be, hogy a gerinctelen gazdából kiszabaduló aktinospóra stádium képes fertőzni a halat, amelyben az úgynevezett myxospóra alakul ki és gyűrűsférgeket fertőz (Wolf and Markiw, 1984). A halakból kiszabaduló alak nagyon ellenálló a különféle kémiai és mechanikai hatásoknak, míg az aktinospóra stádium sokkal törékenyebb képződmény (El-Matbouli et al., 1992; Markiw, 1992). Legalább 30féle aktinospóra típus ismert már, melyek között igen nagy morfológiai különbségek is lehetnek. A három

nyúlvánnyal és nyéllel rendelkező triradiális szimmetriájú aktinospóra típust triactinomyxonnak (TAM-nak) nevezzük (Lom and Dyková, 2006) (2. és 3. ábra). A nyálkaspórások fejlődésének ivaros szakasza a gerinctelen gazdában megy végbe (El-Matbouli et al., 1995). A halakból kiszabaduló myxospórák az oligochaeták bélcsatornáján keresztül a bélhámba jutnak és különböző osztódási és fejlődési folyamatokon mennek keresztül (Marton and Eszterbauer, 2012). Ennek eredményeként a fertőzést követő 2-4 hónap elteltével a bélcsatornán át ürülnek és a vízbe jutnak az aktinospórák, amik szabadon lebegnek a hallal való találkozásig. Bizonyított, hogy a gazdafelismerés folyamata nem gazdaspecifikus reakció, ezt azonban a nagy mennyiségű spórával és a gyors reakcióidővel ellensúlyozzák a nyálkaspórások (Kallert et al., 2009, 2015). Az aktinospórák kémiai és mechanikai ingerek hatására ismerik fel a lehetséges gazdát. Kémiai jelként szolgálnak a halak testfelületét borító nyálka különböző kis molekulású cukorvegyületei, ezek közül is elsősorban az inozin (Kallert et al., 2011). Az aktinospórák kilövellik a poláris kapszulákban/sarki tokokban spirálisan feltekeredett poláris filamentumaikat, melyek a hámsejtekbe fúródva kihorgonyozzák őket és lehetővé teszik az amöboid csírarsejteket tartalmazó sporoplazmák epidermiszbe jutását. Ez leggyakrabban az epitheliumon, a kopoltyún vagy a szájüregben keresztül történik és kevesebb, mint 10 percet vesz igénybe (Markiw, 1989; El-Matbouli et al., 1995). A halon belüli fejlődésük általában bizonyos halfajhoz, szervhez vagy szövethez kötött (Molnár et al., 2002; Eszterbauer, 2004; Molnár and Eszterbauer, 2015).



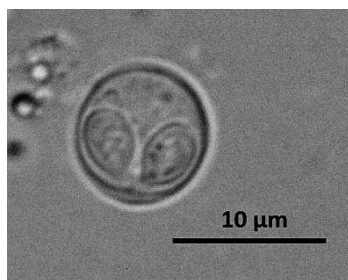
## 2.2 *Myxobolus cerebralis* (Hofer, 1903)

Súlyos patogenitásának köszönhetően a legismertebb és legtöbbet tanulmányozott faj a nyálkaspórák közül (Lom and Dykova, 1992). A koponyaporcban és a gerincoszlop porcos elemeiben fejlődik és képez spórát (4. ábra). Az általa előidézett kergekór komoly gazdasági és ökológiai károkat okoz a lazacfélék (*Salmonidae*) családjában (Lom and Dykova, 1992; El-Matbouli and Hoffmann, 1998; Granath et al., 2007). Számos pisztrángfélében előfordul, többek között a



3. ábra: *Myxobolus cerebralis* triactinomyxon (TAM) típusú aktinospóra alakja fénymikroszkóp alatt

szivárványos (*Onchorhynchus mykiss*), a sebes (*Salmo trutta* m. *fario*), a gyilkos (*Onchorhynchus clarkii*), a bika (*Salvelinus confluentus*) és az arany pisztrángban (*Onchorhynchus aguabonita*), a lazacban (*Salmo salar*), a király lazacban (*Oncorhynchus tshawytscha*) és a vörös lazacban (*Onchorhynchus nerka*), és a pataki szajblingban (*Salvelinus fontinalis*) is (Hedrick et al., 1999b; Thompson, 1999). Ismert gerinctelen gazdája az oligochaeta *Tubifex tubifex*, mely a mitokondriális 16S rDNS szekvenciák alapján 6 leszármazási vonalra tagolódik. Jelenlegi ismereteink szerint *M. cerebralis*-ra csak az I-es, a III-as és a VI-es leszármazási vonalai fogékonyak (Beauchamp et al., 2002). Eredetileg Európából és Közép-Ázsiából származik, 1903-ban írta le Dr. Bruno Höfer a németországi sebes pisztrángokból (Hofer, 1903). A betegséget akkor fedezték fel, amikor a fogékonyabb szivárványos pisztráng Észak-Amerikából bekerült Európába (Hoffman, 1970; Halliday, 1976). Észak-Amerikában csak 1958-ban jelent meg, azonban máig súlyos károkat okoz a keltetőkben és a természetes vizekben élő halállományokban is (Hoffman et



4. ábra: *Myxobolus cerebralis* myxospóra fénymikroszkóp alatt

al., 1962). A parazita széles gazdaspektrummal rendelkezik, de a gazdafajok és a különböző törzsek között jelentős a fogékonyágbeli különbség. A legfogékonyabb a szivárványos pisztráng (*Onchorhynchus mykiss*). Az ivadékok megbetegedése súlyos esetekben akár 80-90%-os elhulláshoz is vezet (O'Grodnick, 1979; Markiw, 1992). Míg a sebes pisztráng (*Salmo trutta*) megfertőződik ugyan, de klinikai

tüneteket nem, vagy csak kis mértékben mutat és a mortalitási arány is nagyon alacsony. Ezt a fajt tartják a *Myxobolus cerebralis* eredeti gazdájának (Hoffman, 1970). Azonban mivel gyakran tünetmentes, jó eséllyel hordozza a parazitát, így a fertőzés vektoraként funkcionálhat (Hoffman, 1970; Steinbach et al., 2009). Hedrick és mtsai. (2003) különböző szivárványos pisztráng törzsek fogékonyságának összehasonlításakor azt az eredményt kapták, hogy az amerikai TroutLodge törzs sokkal fogékonyabb a német Hofer törzs egyedeinél (Hedrick et al., 2003). A fogékonyságbeli különbség a beltenyésztett és a genetikailag heterogénebb, nem beltenyésztett sebes pisztráng vonalak között is kimutatható. Kísérletesen igazolták, hogy a sebes pisztráng tenyészállomány genetikai heterogenitása hatással van az ivadékállomány kergekór iránti fogékonyságára. Éppen ezért a betegség elleni védekezés egyik hatásos eszköze lehet a tenyészállományok rendszeres, ellenőrzött genetikai frissítése (Eszterbauer et al., 2015b).

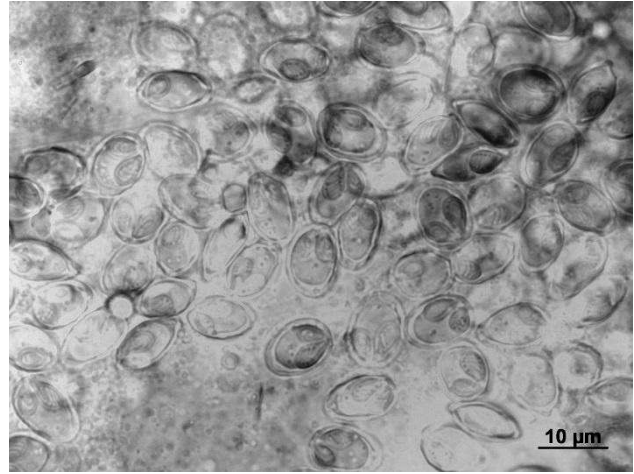
A kergekór, az egyensúlyukat elvesztett, rendellenesen körkörös módon („kergén”) úszó halakról kapta a nevét. További tünetei még, a fekete farokúszó (5. ábra), melyet a pigmentációt befolyásoló idegekre gyakorolt nyomás okoz (Halliday, 1976). Jellemző a rövid orr, a fej, a gerincoszlop és a kopolyúfedő deformitása, amit valószínűleg a normál csontképződés gátlása eredményez (Wolf et al., 1986). Fiala egyedeknél pedig igen magas a mortalitás (akár 90%), mivel a beteg halak nehézkesen táplálkoznak a felszínen forgó mozgásukkal pedig ki vannak téve a ragadozók támadásának (Hoffman, 1974). De az ellenállóképesség bizonyítottan nő a kor előrehaladtával, azonban ez meglepő módon nem a csontosodás mértékétől, hanem inkább a központi idegrendszer fejlettségétől függ (Halliday, 1976; Ryce et al., 2005). Érdekes, hogy amíg a szivárványos pisztrángban a koponyában, az agy környékén fejlődik a parazita, addig a sebes pisztráng esetében az úszósugarakra és a kopolyúívekre koncentrálódik a spóráképzés (Hedrick et al., 1999a; Baldwin et al., 2000; MacConnell and Vincent, 2002). Valószínűleg ez is közrejátszik a két halfaj *M. cerebralis* elleni eltérő fogékonyságában. Jelenleg sajnos nem áll rendelkezésünkre hatékony védekezési mód a parazita ellen, azonban egy esetleges kezelés kifejlesztéséhez elengedhetetlen a gazdába való bejutás és a spóráképzés további vizsgálata.



5. ábra: *Myxobolus cerebralis*-szal fertőzött, kergekóros szivárványos pisztráng ivadékok

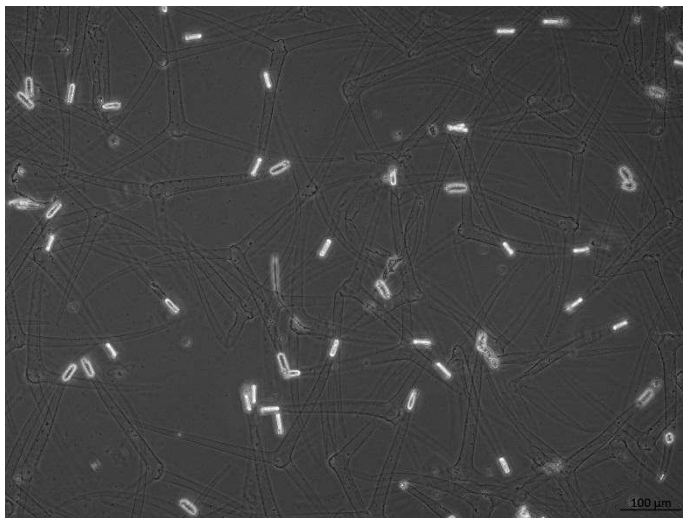
## 2.3 *Myxobolus pseudodispar* (Gorbunova, 1936)

Az egyik leggyakoribb és legismertebb izomparazita Közép-Európában. Hazánkban a balatoni pontyfélékben különösen magas a természetes fertőzöttség prevalenciája. A nyálkaspórák fajok többségével ellentétben széles gazdaspektrummal rendelkezik, a pontyféléket fertőzi (Cyprinidae). Ismert gerinces gazdái:



6. ábra: *Myxobolus pseudodispar* myxospórák bodorka izomszövetben

bodorka (*Rutilus rutilus*), karika keszeg (*Blicca bjoerkna*), dévérkeszeg (*Abramis brama*), vörösszárný keszeg (*Scardinius erythrophthalmus*) és szélhajtó kűsz (*Alburnus alburnus*) (Molnár et al., 2002). Gerinctelen gazdaként több Oligochaeta faj is ismert, többek között a *Tubifex tubifex* I, II és III leszármazási vonalai és a *Limnodrilus hoffmeisteri* (Székely et al., 1999; Marton and Eszterbauer, 2012). A legújabb eredmények alapján a parazita gerinctelen gazdaspektruma a gerinceshez hasonlóan széles. A fogékony fajok közé tartozik a *Psammoryctides barbatus* és a *P. moravicus* is (Marton and Eszterbauer, 2012). A parazita jelenléte egyik ismert gazdafajban sem mutat klinikai tüneteket. Valószínűleg a keringési rendszer segítségével jut el a spóráképzés helyére, így feltételezhetően találkozik a gazda immunrendszerének sejtes elemeivel. Kísérleti bizonyítékok azonban ezidáig nem állnak

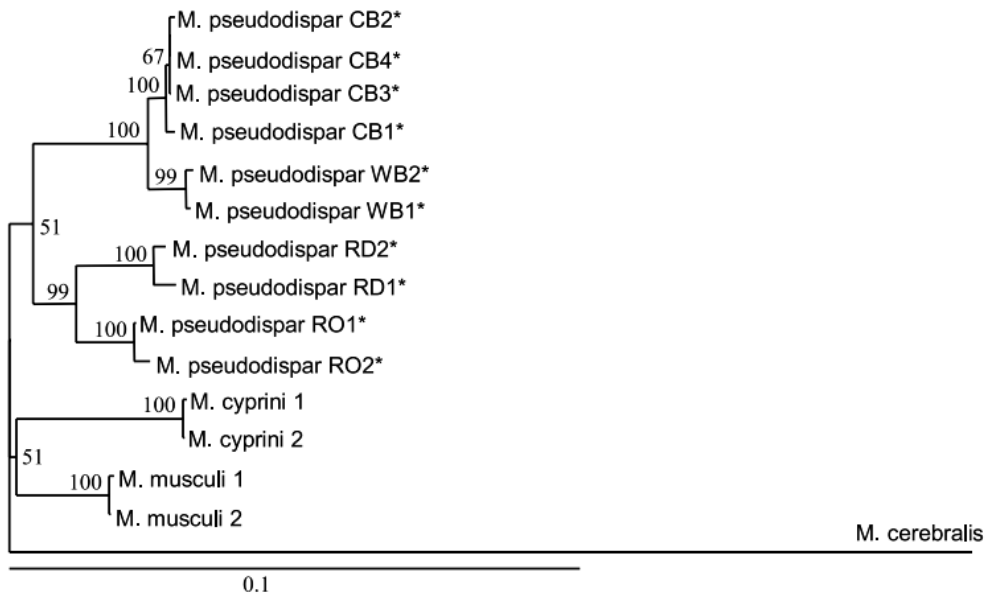


7. ábra: *M. pseudodispar* triactinomyxonok fáziskontraszt mikroszkópos képe

rendelkezésre ennek megerősítéséhez. A vázizomzatban intracellulárisan képez cisztát (plazmódiumot), amiben jellegzetesen aszimmetrikus spórák fejlődnek (6. ábra) (Baska, 1987). A *Myxobolus cerebralis*-hoz hasonlóan ismert a teljes fejlődési ciklusa, amit laboratóriumi körülmények között sikeresen reprodukáltak és vizsgáltak is

(Székely et al., 1999, 2001; Marton and Eszterbauer, 2012).

Az eltérő gazdafajokból származó különböző izolátumok morfológiája, szöveti lokációja azonos, azonban a 18S rDNS gén szekvenciájában akár 5%-os eltérés is megfigyelhető. Molnár et al., 2002 filogenetikai eredményei azt mutatták, hogy a különböző halfajokból származó *M. pseudodispar* izolátumok a gazdafajok rokonsági kapcsolatai szerint csoportosulnak (8. ábra).



**8. ábra:** Pontyfélékből izolált izomparazita nyálkaspórák fajok rokonsági viszonyait ábrázoló törzsfa, a 18S riboszomális RNS gén (18S rDNS) alapján, *Myxobolus cerebralis* külcsoporttal. \*CB: dévérkeszeg, WB: karika keszeg, RO: bodorka, RD: vörösszárnyú keszeg (Molnár et al., 2002).

## 2.4 A halak védekezési mechanizmusai nyálkaspórással szemben

A csontos halak (Teleostei) immunrendszere hatékony védelmi vonal, amely arra specializálódott, hogy a különféle mikroorganizmusokkal teli vízi környezetben túlélést biztosítson számukra (Sunyer et al., 1998). Mégis, sok nyálkaspórással szemben nem vált ki heves immunválaszt a gazdaszervezetből. Ennek oka valószínűleg az immunrendszertől elzárt szövetekben, szervekben (központi idegrendszer, szem, ivarszervek) való fejlődés, például a *Myxobolus cerebralis* esetében (Sitjà-Bobadilla, 2008). Ezzel szemben vannak olyan fajok, amelyek kifejezetten heves, gyulladással együtt járó immunreakciót váltanak ki, mint például a lazacfélék proliferatív vesebetegségét okozó *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Chilmonczyk et al., 2002). Noha a halak testét borító nyálka is számos immunkomponenst tartalmaz, nem nyújt elegendő védelmet a nyálkaspórással szemben, mivel nem gátolja a sporoplazma mozgást (Kallert et al., 2012). Gyakran tapasztalható, hogy egyes nyálkaspórással szemben különböző fejlődési stádiumai körül kötőszöveti tok alakul ki. Ennek feltételezett célja a parazita további terjedésének megakadályozása a gazdaszervezeten belül (Davies and Sienkowski, 1988).

A nyálkaspórással szembeni természetes immunreakciók már régóta ismertek, a jelentősebb sejtes immunválasz mellett a humorális immunválasz szerepe sem elhanyagolható, mint például a peroxidáz, a lizozim és a komplement rendszer működése. Ugyanakkor az aktivált fagociták légzési aktivitása is fontos szerepet játszik a parazita elleni védekező reakciókban. *In vitro* kísérletek alapján igazolták, hogy nyálkaspórással szemben fertőzöttség esetén fokozódik a fagociták működése, a reaktív oxigén és nitrogén gyökök termelődése (Muñoz et al., 2000; Alvarez-Pellitero et al., 2008). A komplement rendszer fontos szerepet játszik a hal szervezetébe jutó kórokozók felismerésében és elpusztításában, és hozzájárul a szerzett immunitás kialakulásához (Boshra et al., 2006). A halak egyes komplement rendszer komponenseinek több izotípusa van, melyeket különböző gének kódolnak. Ez a tulajdonság nagyobb működésbeli és szerkezeti változatosságot eredményez, így a halak immunrendszere hatékonyabb a kórokozók azonosításában (Sunyer et al., 1996; Nakao et al., 2000). A halak komplement rendszere az emlősökével ellentétben alacsony hőmérsékleten (15-25 °C -on) a leghatékonyabb (Sunyer and Tort, 1995; Sunyer and Lambris, 1998). A természetes és adaptív immunfolyamatok közötti kapcsolat megteremtése is a komplement rendszer feladata.

Korábban úgy gondolták, hogy a halak szervezete nem képes a nyálkaspórások ellen adaptív immunválaszra, mert az elvégzett kísérletek során nem találtak speciális antitesteket (Halliday, 1976). Azonban Hedrick 1998-ban végzett vizsgálatával igazolta a specifikus antitestek jelenlétét a *Myxobolus cerebralis*-sal fertőzött halakban (Hedrick et al., 1998). Ezt több kutató is alátámasztotta, más fajok esetében. 1996-ban *Tetracapsuloides bryosalmonae*, 2001-ben pedig *Ceratonova shasta* parazita fertőzöttség esetén írták le antitestek jelenlétét (Saulnier and Kinkelin, 1996; Kent et al., 2001). A nyálkaspórások fajspecifikussága valószínűleg több, egyelőre még nem tisztázott körülmény függvénye. Ennek oka lehet a parazita korlátozott képessége a hal immunrendszerének kikerülésére. Azonban a parazita gátolt fejlődését okozhatja a gazdaszervezet fejlett immunrendszere, vagy éppen a teljes immunitás hiánya is (Kallert et al., 2012). Általánosan elmondható, hogy a fogékony fajokkal ellentétben, a nem, vagy kevésbé fogékonyak fertőződése esetén nem tapasztalhatóak klinikai tünetek és nem találhatóak osztódó fejlődési stádiumok és érett myxospórák sem (Kallert et al., 2012). A védelem első vonalát jelentő természetes immunitás folyamatai mind a fogékony, mind a rezisztens pisztráng fajok esetében beindulnak a *M. cerebralis* fertőzés korai stádiumában (Baerwald, 2013). De a szerzett immunitás csak a már korábban fertőzéssel átesett egyedek esetében alakul ki (Hedrick et al., 1998). Az utóbbi években sikerült már különböző betegségekre (pl. virális vérzéses szeptikémia), sőt nyálkaspórás parazitákra nézve is ellenálló szivárványos pisztráng törzseket kitenyészteni (Slierendrecht et al., 2001). A *Ceratonova shasta* volt az első nyálkaspórás faj, amelyre rezisztens szivárványos pisztráng törzsek ismertek, de létezik egy Németországból származó, *Myxobolus cerebralis* fertőzésnek igen ellenálló, a fentebb említett „Hofer” szivárványos pisztráng törzs (Ibarra et al., 1994; Nichols et al., 2003; Hedrick et al., 2003). Kimutatták, hogy a *Ceratonova shasta* parazitának ellenálló szivárványos pisztráng törzsek nem rezisztensek a *Myxobolus cerebralis* ellen. Ez arra utal, hogy a nyálkaspórás paraziták elleni rezisztencia több, különböző tényezőtől függ, de bizonyítottan öröklődik (Hedrick et al., 2001; Schisler et al., 2006).

## 3. Anyagok és módszerek

### 3.1 Fertőzési kísérletek

Szakdolgozati munkám során két fertőzési kísérletet végeztünk az MTA ATK ÁOTI Halparazitológia kutatócsoport laboratóriumában fenntartott nyálkaspórák parazitákkal. Az első kísérletben szivárványos pisztráng (*Onchorhynchus mykiss*), sebes pisztráng (*Salmo trutta*), és ezüstkárász (*Carassius gibelio*) fertőzését végeztük *Myxobolus cerebralis* parazitával. A második vizsgálat során bodorka (*Rutilus rutilus*), vörösszárnyú keszeg (*Scardinius erythrophthalmus*), és ezüstkárász (*Carassius gibelio*) fajokat fertőztünk *Myxobolus pseudodispar*-ral. Mindkét parazita esetében a fertőzést követően három időpontban 1 nap, 1 hét és 1 hónap elteltével történt a mintavétel. A fertőzéshez laboratóriumban nevelt, parazitamentes (SPF) halakat használtunk. Minden kísérleti csoportban 10-10 egyedet fertőztünk fajonként, az egy hónapos csoportban két hal ráhagyással. A szakdolgozat keretében végzett kísérletek megfelelnek az állatkísérletek végzésére szóló állategészségügyi hatósági szabályzatnak. Az engedélyek száma szivárványos és sebes pisztrángokon végzett kísérletekre: 22.1/10165-4/2010, pontyfélékkel végzett kísérletekre: XIV-I-001/1326-4/2012.

A halak fertőzése egyedileg történt 20°C-os klórmentes csapvízben, melyhez 5000 darab aktinospórát használtunk halanként. A spórák laboratóriumban fenntartott parazitával fertőzött kevéssertéjű féreg (Annelida: Clitellata: Oligochaeta) tenyészetből származtak. A körülbelül 3 órás inkubációs idő eltelte után a halakat a vérvétel időpontjáig kísérleti csoportonként közös akváriumban tartottuk. A fertőzéshez használt szivárványos pisztráng és sebes pisztráng egyedek 3 hónaposak, a bodorka, vörösszárnyú keszeg és ezüstkárász egyedek 2-3 évesek voltak. A halak testhossza 4-7 cm között volt. A



9. ábra: Vérvétel a farokvénából

*Myxobolus cerebralis*-sal fertőzött fajokat 15°C-on, a *Myxobolus pseudodispar*-ral fertőzötteket pedig 20°C-on tartottuk.

A halak altatása egyedileg, szivárványos és sebes pisztráng egyedek esetében 100mg/l, bodorka, vörösszárnyú keszeg és ezüstkárász esetében 200 mg/l koncentrációjú MS-222 altatószerrel történt. Ez után heparinizált fecskendővel vért vettünk a farokvénából (9.ábra), majd a gerincoszlopot a cervicalis régióban átmetszettük és feljegyeztük a halak hosszát. Ahol a halak kis mérete miatt nem sikerült elegendő mennyiségű vért kinyerni, ott véralvadék, szív, vagy vérképző szerv (lép) begyűjtése is történt. A *M. pseudodispar*-ral fertőzött halak esetében a parazita jelenlétének ellenőrzésére kopolyú, bőr-, és izommintát is gyűjtöttünk. A halak még alaposabb vizsgálata érdekében minden egyedből 2-2 kopolyúívet is kivettünk. A bőrmintákat folyékony nitrogénnel való kezelés után dörzsmozsárban eldörzsöltük, majd a szövethomogenizátumra előírt DNS kivonási protokollt alkalmaztuk. Az egyedi azonosítóval ellátott vér- és szövetmintákat 1,5 ml-es csövekben, a leölt halakat pedig tasakokban tároltuk -20°C-on felhasználásig.

## **3.2 Molekuláris módszerek**

### **3.2.1 DNS kivonás**

A genomiális DNS kivonásához a DNeasy Blood&Tissue Kit-et (Qiagen) használtuk, és minden esetben a gyártó által mellékelte protokoll szerint jártunk el. A módszer főbb lépései:

Szövet esetén, a szövethomogenizátumra 180 µl ATL puffert és 20 µl 20 mg/ml koncentrációjú proteináz K általános fehérjebontó enzimet pipettáztunk rá. Ezt alaposan összekevertük, majd 56°C-on enyhén rázatva thermomixerben (Eppendorf) inkubáltuk körülbelül 1-3 órán át. Ezután 15 másodpercig vortexeltük a lizátumot, majd 200 µl AL puffer és 200 µl 96%-os etanol előre kikevert elegyét adtuk hozzá és összeráztuk. Az így kapott oldatot pipettával a mellékelte, előzetesen egy 2 ml-es gyűjtőcsőbe helyezett oszlopra mértük és 6010 × g fordulaton 1 percig centrifugáltuk Eppendorf 5424R típusú asztali centrifugával. A gyűjtőcsőben összegyűlt folyadékot kiöntöttük és a gyűjtőcsövet tisztára cseréltük. Majd 500 µl AW1 puffert mértünk rá és ismét 6010 × g fordulaton 1 percig centrifugáltuk. A gyűjtőcső cseréje után 500 µl AW2 puffert adtunk hozzá és 3 percig 18407 × g fordulaton centrifugáltuk, majd az oszlopot egy tiszta 1,5 ml-es csőbe helyeztük.



Az oszlophoz kötődött DNS-t 100 µl AE pufferrel oldottuk le, 1 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk majd 6010 ×g fordulaton 1 percig centrifugáltuk.

Vér esetében 10 µl alvadásban gátolt vérré 20 µl proteináz K enzimet és 190 µl PBS puffert pipettáztunk. Majd 200 µl AL puffer hozzáadása után alaposan összekevertük és 10 percig 56°C-on enyhén rázatva inkubáltuk. Ez után 200 µl 96%-os etanollal elkevertük, majd a mellékelt gyűjtőcsőbe helyezett oszlopra mértük. A következő lépésekben a fent ismertetett módon AW és AW2 pufferek hozzáadásával több lépésben mostuk az oszlopot, majd 100 µl AE puffer hozzáadása után 6010 × g fordulaton 1 percig tartó centrifugálással oldottuk le a feltárt DNS-t. A kivont DNS-t mindkét esetben 1,5 ml-es csövekben -20°C-on tároltuk felhasználásig.

A kivont DNS mennyiségét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. 1%-os agaróz gélben (Ultra Pure, Invitrogen) 100V-on. A DNS koncentráció pontos meghatározása NanoDrop 2000c spektrofotométer (Thermo Scientific) segítségével történt. A gépet 1 µl MilliQ ultratiszta vízzel kalibráltuk. A víz eltávolítása után a mérés helyére 1 µl DNS mintát pipettáztunk és mértük annak koncentrációját.

### 3.2.2 Nested PCR

Munkánk során a vizsgált nyálkaspórák mintákban lévő parazita 18S rDNS szakaszait erősítettük fel PCR technika segítségével. Minden esetben két körös, nested PCR-eket végeztünk az adott parazitára specifikus primerpárokkal. A vizsgálat során használt primerek listája az 1. táblázatban található.

1. táblázat: *Myxobolus cerebralis* és *Myxobolus pseudodispar* paraziták detektálására használt primerek listája

Primer elnevezése	Szekvencia (5' - 3')	Hivatkozás
<b>Mc224F</b>	CTGATGTAGCGAGTAAGGTG	jelen szakdolgozat
<b>Mc1072R</b>	TGCCTTCGCATTCGTTAGTC	jelen szakdolgozat
<b>Tr317</b>	GGCACACTACTCCAACACTGAATTTG	Andree et al., 1998
<b>Tr517</b>	GCCCTATTAAGTAGTTGGTAGTATAGAAGC	Andree et al., 1998
<b>MpF1</b>	TGTGCTTCTGGTGCCTCTGC	Marton and Eszterbauer, 2012
<b>PseudoR</b>	AAGCACCGAAGCACAGTCAA	Marton and Eszterbauer, 2012
<b>MpFnested</b>	TCACCCGCCAAAGTACGATTGT	jelen szakdolgozat
<b>MpRnested</b>	CGAAACCTGCTTTGCCTCTTA	jelen szakdolgozat

A PCR-t 25 µl végtérfogóban végeztük Biometra T1 Thermocycler típusú PCR gép segítségével.

A reakció komponensei:

19,25 µl steril MilliQ ultratiszta víz  
2,5 µl 10x Taq polimeráz puffer (Fermentas)  
1,5 µl 25 µM-os MgCl<sub>2</sub> (Fermentas)  
0,5 µl 10 mM-os dNTP (Sigma)  
0,25-0,25 µl 25 µM-os primer  
0,5 µl feltárt DNS

A PCR-hez negatív és pozitív kontrollokat is használtunk mindkét lépésben.

*Myxobolus cerebralis* esetében az alábbi 35 ciklusból álló PCR programot használtuk:

Kezdeti denaturáció:	94°C	300 mp
Denaturáció:	94°C	30 mp
Primer tapadás (annealing):	56°C	30 mp
Szálképzés (elongation):	72°C	50 mp
Befejező lépés:	72°C	300 mp

*Myxobolus pseudodispar* parazita kimutatására pedig az alábbi 35 ciklusból álló PCR programokat alkalmaztuk:

1. körben:

Kezdeti denaturáció:	95°C	300 mp
Denaturáció:	95°C	30 mp
Primer tapadás (annealing):	60°C	30 mp
Szálképzés (elongation):	72°C	60 mp
Befejező lépés:	72°C	420 mp

2. körben:

Kezdeti denaturáció:	95°C	300 mp
Denaturáció:	95°C	30 mp
Primer tapadás (annealing):	59°C	30 mp
Szálképzés (elongation):	72°C	30 mp
Befejező lépés:	72°C	300 mp

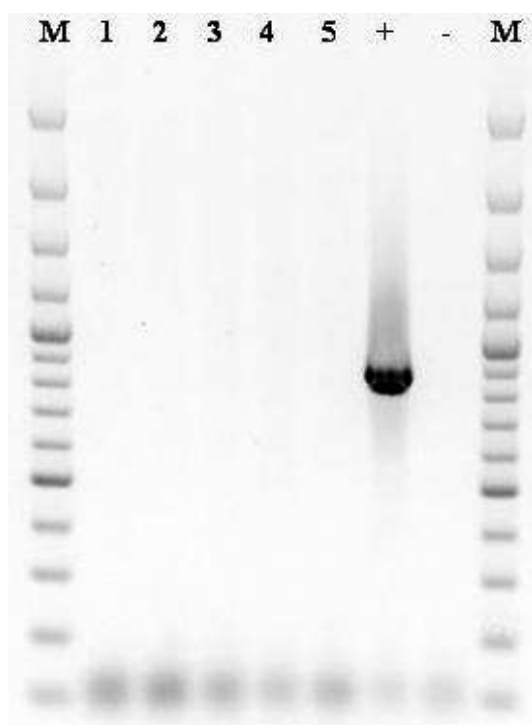
A PCR termékek detektálása agaróz gélelektroforézis segítségével történt. 5 µl PCR terméket 2 µl futtatófestékkel (Loading Dye, Fementas) összekeverve az 1. körben kapott termék esetében 1%-os, a második körben pedig 1,5%-os agaróz gélen TAE pufferben (20mM Tris, 10 mM ecetsav, 0,5 EDTA pH 8,0) 90V-on választottuk el. A keletkezett termékek méretének meghatározásához GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder markert (Fermentas) használtunk. Az UV fényel átvilágított gélről a KODAK Gel Logic 212 Imaging System rendszer segítségével készítettünk felvételt.

### **3.3 Statisztikai elemzés**

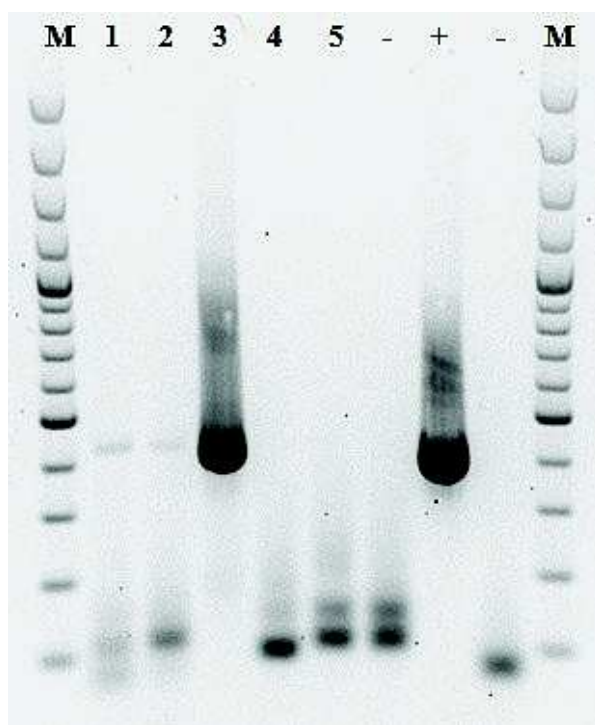
Az R programcsomag segítségével leíró statisztikát készítettünk, és az eredményeket grafikonok segítségével ábrázoltuk. Az egyes halfajokban megfigyelt *Myxobolus pseudodispar* fertőzöttség prevalenciájának függetlenségvizsgálatát Kхи-négyzet próba segítségével végeztük.

## 4. Eredmények

Minden vizsgált nyálkaspórási minta esetében, a használt primerpártól függően sikerült felszaporoznunk a 18S rDNS különböző méretű szakaszát két körös (nested) PCR segítségével. A *Myxobolus cerebralis*-ra specifikus PCR rendszer első körben egy 800 bp, második körben egy kb. 420 bp hosszú PCR terméket adott (10. és 11. ábra). A *Myxobolus pseudodispar*-specifikus PCR első körben 610 bp, második körben egy kb. 450 bp hosszú terméket sokszorozott fel (12. és 13. ábra).

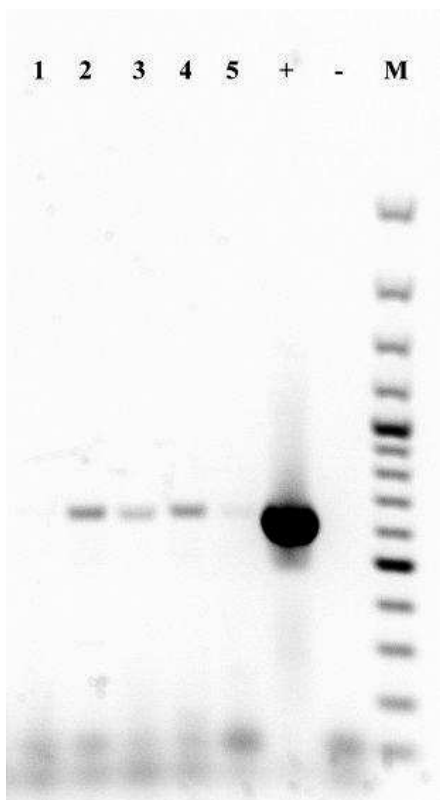


10. ábra: *Myxobolus cerebralis* nested PCR első kör 224F – 1072R primer párral (~800 bp termék)

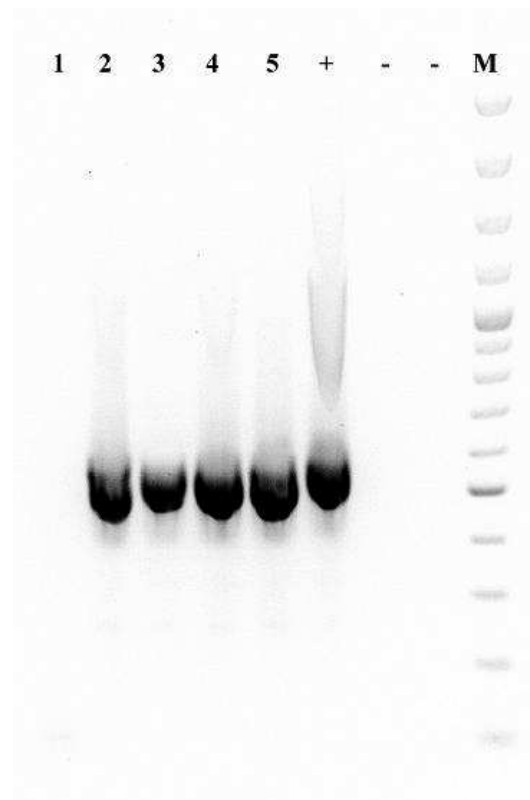


11. ábra: *Myxobolus cerebralis* nested PCR második kör Tr5-17 – Tr3-17 primer párral (~400 bp termék)

A vörösszárnyú keszegből származó mintákban a PCR néhány esetben a *Myxobolus pseudodispar* mellett a hal DNS-ét is felerősítette. Ez azonban eltért a várt termék méretétől és a szekvenálás eredménye is igazolta, hogy vörösszárnyú keszeg DNS-ről van szó, így elkülöníthetőek a nyálkaspórási minták. Az aspecifikus termékek mennyiségének csökkentése céljából növeltük a PCR specificitását, és frissítettük az oligonukleotid készletet.



12. ábra: *Myxobolus pseudodispar* nested PCR első kör MpF1 - PseudoR primer párral (612 bp)



4. ábra: *Myxobolus pseudodispar* nested PCR második kör MPFnested – MPRnested primer párral (458 bp)

2. táblázat: A kísérleti *Myxobolus cerebralis* fertőzöttség prevalenciája (%-ban) a vizsgált halfajok vérmintáin végzett kétkörös nested PCR eredménye alapján. Zárójelben a fertőzött egyedek száma látható az összes vizsgált egyed közül. n.a.: nincs adat

Szivárványos pisztráng	1 nap	1 hét	1 hónap
vér	37,5% (3/8)	70% (7/10)	17% (2/12)
Sebes pisztráng	1 nap	1 hét	1 hónap
véralvadék	33% (2/6)	44% (4/9)	14% (1/7)
vér	n.a.	n.a.	0% (0/6)
összesen	33%	44%	8%
Ezüstkárász	1 nap	1 hét	1 hónap
vér	50% (5/10)	40% (4/10)	40% (4/10)

A *Myxobolus cerebralis* fertőzöttség prevalenciája szivárványos pisztrángban az 1 napos mintákban tapasztalt 38%-ról 1 hét után 70%-ra nőtt, 1 hónap után pedig 17%-ra csökkent. Hasonló tendencia mutatkozott a sebes pisztráng esetében. A véralvadék és

vérmintákban összesen 1 nap után 33%, 1 hét után 44%, 1 hónap után pedig 8% volt a prevalencia. Ezüstkárászban 1 nap után 50%, 1 hét és 1 hónap után 40-40% volt a mért *M. cerebralis* fertőzöttség (2. táblázat). Sajnos az alacsony mintaszám miatt az adatokra nem lehetett statisztikai próbát végezni. De az elkészített diagram (14. ábra) jól szemlélteti az egyes halfajok esetében előforduló fertőzöttségbeli különbségeket.

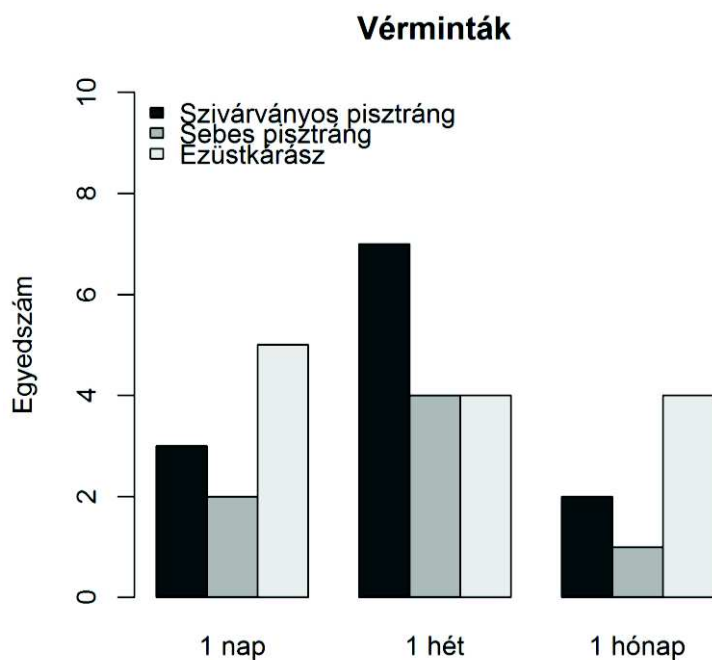
**3. táblázat:** A kísérleti *Myxobolus pseudodispar* fertőzöttség prevalenciája (%-ban) a vizsgált halfajok vérmintáin végzett kétkörös nested PCR eredménye alapján. Zárójelben a fertőzött egyedek száma látható az összes vizsgált egyed közül.

<b>Bodorka</b>	<b>1 nap</b>	<b>1 hét</b>	<b>1 hónap</b>
vér	70% (7/10)	20% (2/10)	40% (4/10)
kopolyú	90% (9/10)	100% (10/10)	100% (10/10)
összesen	100%	100%	100%

<b>Vörösszárnyú keszeg</b>	<b>1 nap</b>	<b>1 hét</b>	<b>1 hónap</b>
vér	0% (0/10)	9% (1/11)	30%(4/12)
kopolyú	50% (5/10)	20% (2/10)	40% (4/10)
összesen	50%	30%	60%

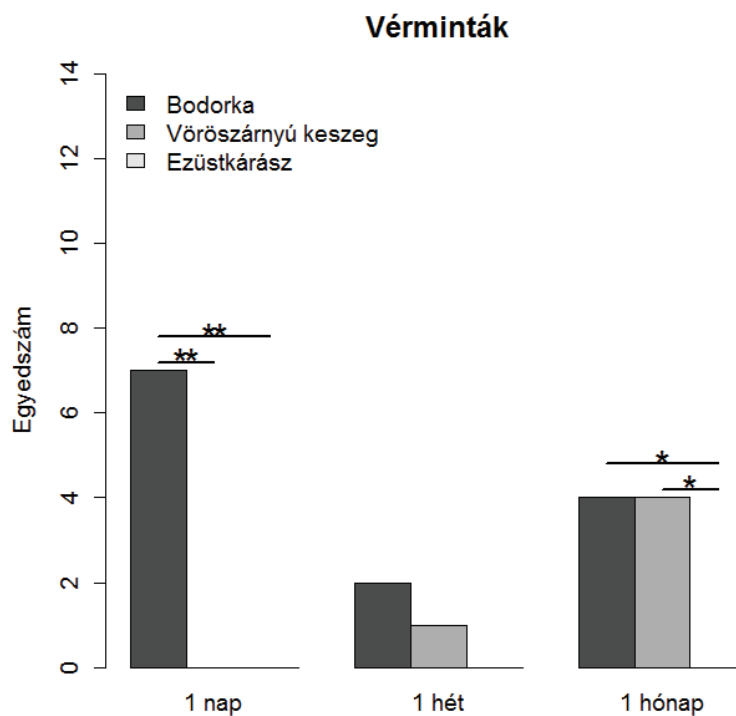
<b>Ezüstkárász</b>	<b>1 nap</b>	<b>1 hét</b>	<b>1 hónap</b>
vér	0% (0/10)	0% (0/11)	0% (0/12)
kopolyú	60% (6/10)	20% (2/10)	20% (2/10)
összesen	60%	20%	20%

A *Myxobolus pseudodispar* fertőzöttség prevalenciáját a 3. táblázat tartalmazza. Bodorka esetében az 1 napos halakból származó vér 70%-ában, és a kopolyú minták 90%-ában találtunk parazita DNS-t. Ez az érték 1 hét után vérben 20%-ra csökkent, míg kopolyúban 100%-ra nőtt. 1 hónap után pedig 40%, illetve 100% volt a két érték. Vörösszárnyú keszegben 1 nap után a vérben 0%, kopolyúban 50%, 1 hét után 8% illetve 30%, 1 hónap után pedig 30% és 40% volt a tapasztalt prevalencia. Ezüstkárász vérmintákban végig 0%, kopolyúban 1 nap után 60%, 1 hét és 1 hónap után 20-20% volt a fertőzöttség prevalenciája. A vér és kopolyú minták összesítése után bodorkában 1 nap, 1 hét és 1 hónap után egyaránt 100%-os volt a fertőzöttség prevalenciája. Vörösszárnyú keszeg esetében ezek az értékek jóval alacsonyabbak, 50, 40 és 60%-osak voltak. Ezüstkárászban 1 nap után 60%, 1 hét, illetve 1 hónap után pedig egyaránt 20-20%-os volt a fertőzöttség (15-17. ábra).

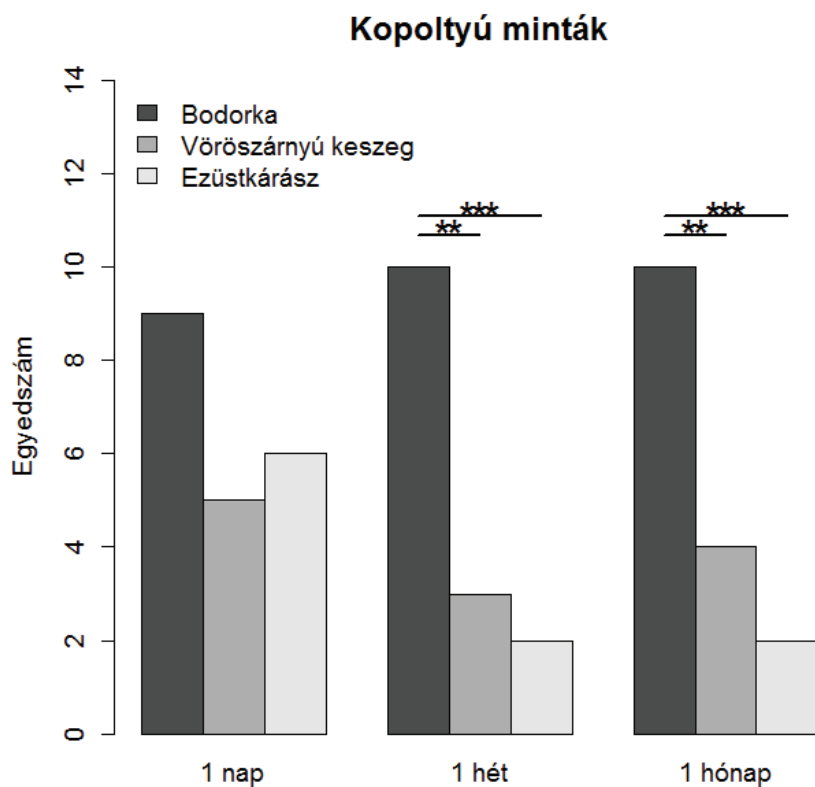


14. ábra: *Myxobolus cerebralis* parazitával fertőzött halak egyedszáma az egyes halfajokban

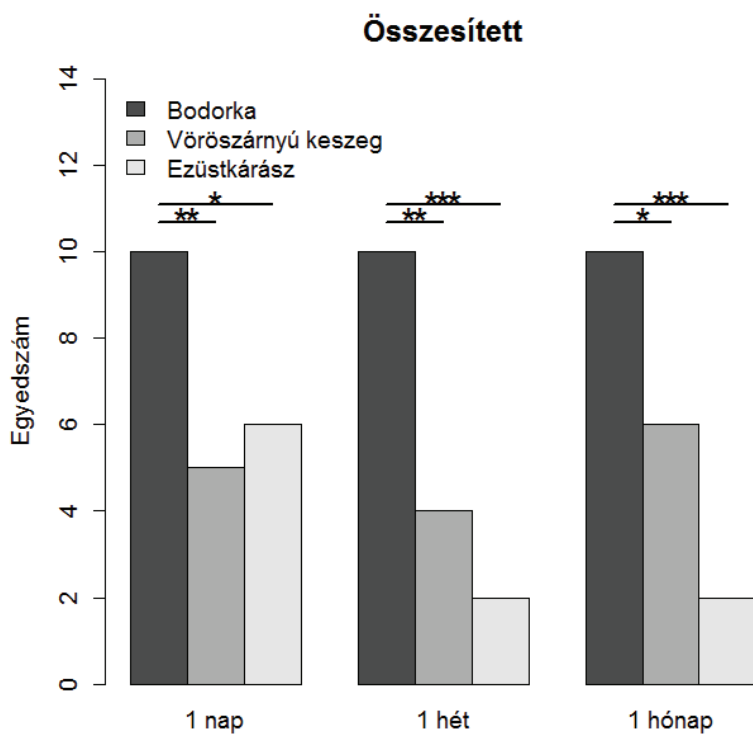
Az egyes halfajokban megfigyelt *Myxobolus pseudodispar* fertőzöttség prevalenciájának függetlenségvizsgálatára végzett Khi-négyzet próba a \*-gal jelölt oszlopokban mutatott ki szignifikáns különbségeket (\*:  $p < 0.05$  \*\*:  $p < 0.005$  \*\*\*:  $p < 0.0005$ ) (15., 16., és 17. ábra).



15. ábra: *Myxobolus pseudodispar* fertőzöttség prevalenciája a parazitára pozitív halak egyedszáma alapján, bodorka, vöröszárnyú keszeg és ezüstkárász vérében.



16. ábra: *Myxobolus pseudodispar* fertőzöttség prevalenciája a parazitára pozitív halak egyedszáma alapján, bodorka, vörösszárnyú keszeg és ezüstkárász kopolyújában.



17. ábra: *Myxobolus pseudodispar* parazitával fertőzött halak egyedszáma bodorka, vörösszárnyú keszeg és ezüstkárászból származó vér és kopolyú minták esetében összesítve.



A keletkezett PCR termékek becsült mennyisége alapján a fertőzöttség intenzitásának elkülönítésére három intenzitási csoportot alakítottunk ki: 1: (+) a PCR első körében negatív, második körben halványan pozitív minta, 2: (++) első körben gyengén, második körben erősen pozitív, 3: (+++) már az első körben is erősen pozitív minta a parazita DNS-re. Ez látható a 10. és 11. ábrákon, az 1. és 2. minta az 1. (+) intenzitású csoportba, a 3. minta a 2. (++) csoportba volt sorolható. A 12. és 13. ábrákon a 2., 3. és 4. minták a (+++) csoportba, az 5. minta pedig a (++) csoportba volt sorolható. A *Myxobolus cerebralis*-sal kísérletesen megfertőzött halak között a legnagyobb intenzitású fertőzöttséget a szivárványos pisztrángban figyeltük meg. A PCR termékek becsült mennyisége alapján a fertőzöttség intenzitása szivárványos és sebes pisztrángokban meghaladta az ezüstkárászban tapasztaltat. Mindkét halfajban egy hét után volt a legnagyobb, közel azonos fertőzöttségbeli intenzitás (++) (4. táblázat). A *Myxobolus pseudodispar*-ral végzett kísérlet esetében a keletkezett PCR termék mennyisége alapján a legnagyobb intenzitás végig bodorkában volt megfigyelhető (+++). Bodorkához viszonyítva vörösszárnyú keszeg esetében a fertőzöttség intenzitása jóval alacsonyabb, ezüstkárász esetében pedig gyenge volt (5. táblázat).

4. táblázat: a *Myxobolus cerebralis*-sal végzett fertőzési kísérlet eredménye, a pozitív minták színes háttérrel vannak kiemelve. Jelmagyarázat: (-): a PCR eredménye negatív (+): a PCR első körében negatív, második körben halványan pozitív minta, (++): első körben gyengén, második körben erősen pozitív, (+++): már az első körben is erősen pozitív minta a parazita DNSre. A \*-gal jelölt minták véralvadékból származtak.

Szivárványos pisztráng			Sebes pisztráng			Ezüstkárász		
1 napos minták	minta		1 napos minták	minta		1 napos minták	minta	
	R+/1/1	(++)			B+/1/2*		(-)	
R+/1/2	(-)		B+/1/5*	(-)		G+/1/2	(-)	
R+/1/3	(-)		B+/1/6*	(++)		G+/1/3	(+)	
R+/1/4	(++)		B+/1/7*	(-)		G+/1/4	(++)	
R+/1/5	(+)		B+/1/9*	(++)		G+/1/5	(+)	
R+/1/6	(+)		B+/1/10*	(-)		G+/1/7	(+)	
R+/1/7	(+)		B+/2/2*	(-)		G+/1/8	(-)	
R+/1/8	(+)		B+/2/3*	(-)		G+/1/9	(-)	
1 hetes minták	R+/2/1	(++)	1 hetes minták	B+/2/4*	(++)	1 hetes minták	G+/1/10	(+)
	R+/2/2	(-)		B+/2/5*	(-)		G+/1/6*	(-)
	R+/2/3	(++)		B+/2/6*	(+)		G+/2/1	(-)
	R+/2/4	(++)		B+/2/7*	(++)		G+/2/2	(-)
	R+/2/5	(-)		B+/2/8*	(++)		G+/2/3	(+)
	R+/2/6	(+)		B+/2/9*	(-)		G+/2/4	(-)
	R+/2/7	(+)		B+/2/10*	(-)		G+/2/5	(+)
	R+/2/8	(+)		B+/3/1	(-)		G+/2/6	(+)
	R+/2/9	(++)		B+/3/2	(-)		G+/2/7	(-)
	R+/2/10	(-)		B+/3/3	(-)		G+/2/8	(+)
1 hónapos minták	R+/3/2	(-)	1 hónapos minták	B+/3/4	(-)	1 hónapos minták	G+/2/9	(-)
	R+/3/3	(-)		B+/3/6	(-)		G+/2/10	(-)
	R+/3/4	(+)		B+/3/10	(-)		G+/3/1	(++)
	R+/3/10	(-)		B+/3/5*	(-)		G+/3/2	(+)
	R+/3/12	(+)		B+/3/7*	(-)		G+/3/5	(-)
	R+/3/1*	(-)		B+/3/8*	(-)		G+/3/6	(+)
	R+/3/5*	(-)		B+/3/9*	(+)		G+/3/8	(-)
	R+/3/6*	(-)		B+/3/11*	(-)		G+/3/9	(-)
	R+/3/7*	(-)		B+/3/12*	(-)		G+/3/10	(-)
	R+/3/8*	(-)		B+/3/13*	(-)		G+/3/11	(+)
	R+/3/9*	(-)					G+/3/4*	(-)
	R+/3/11*	(-)					G+/3/7*	(-)

5. táblázat: a *Myxobolus pseudodispar*-ral végzett fertőzési kísérletek eredménye, a pozitív minták színes háttérrel vannak kiemelve. Jelmagyarázat: (-): a PCR eredménye negatív (+): a PCR első körében negatív, második körben halványan pozitív minta, (++): első körben gyengén, második körben erősen pozitív, (+++): már az első körben is erősen pozitív minta a parazita DNSre.

Bodorka				Vörösszárnyú keszeg				Ezüstkárász			
	minta	vér	kopoltyú		minta	vér	kopoltyú		minta	vér	kopoltyú
1 napos minták	B+1/1	(++)	(-)	1 napos minták	V+1/1	(-)	(-)	1 napos minták	K+1/1	(-)	(+)
	B+1/2	(++)	(+++)		V+1/2	(-)	(+)		K+1/2	(-)	(-)
	B+1/3	(++)	(+++)		V+1/3	(-)	(+++)		K+1/3	(-)	(+)
	B+1/4	(++)	(+++)		V+1/4	(-)	(+++)		K+1/4	(-)	(-)
	B+1/5	(-)	(+++)		V+1/5	(-)	(-)		K+1/5	(-)	(++)
	B+1/6	(-)	(+++)		V+1/6	(-)	(-)		K+1/6	(-)	(+)
	B+1/7	(++)	(+++)		V+1/7	(-)	(-)		K+1/7	(-)	(-)
	B+1/8	(++)	(+++)		V+1/8	(-)	(+)		K+1/8	(-)	(+)
	B+1/9	(++)	(+++)		V+1/9	(-)	(-)		K+1/9	(-)	(-)
	B+1/10	(-)	(+++)		V+1/10	(-)	(++)		K+1/10	(-)	(+)
1 hetes minták	B+2/1	(-)	(++)	1 hetes minták	V+2/1	(-)	(-)	1 hetes minták	K+2/1	(-)	(-)
	B+2/2	(-)	(++)		V+2/2	(-)	(-)		K+2/2	(-)	(-)
	B+2/3	(-)	(+++)		V+2/3	(++)	(-)		K+2/3	(-)	(-)
	B+2/4	(-)	(+++)		V+2/4	(-)	(+++)		K+2/4	(-)	(-)
	B+2/5	(++)	(++)		V+2/5	(-)	(-)		K+2/5	(-)	(-)
	B+2/6	(-)	(+++)		V+2/6	(-)	(-)		K+2/6	(-)	(++)
	B+2/7	(-)	(+++)		V+2/7	(-)	(-)		K+2/7	(-)	(-)
	B+2/8	(-)	(++)		V+2/8	(-)	(+++)		K+2/8	(-)	(++)
	B+2/9	(++)	(++)		V+2/9	(-)	(-)		K+2/9	(-)	(-)
	B+2/10	(-)	(+++)		V+2/11	(-)	(++)		K+2/11	(-)	(-)
1 hónapos minták	B+3/1	(-)	(+++)	1 hónapos minták	V+3/1	(+)	(+)	1 hónapos minták	K+3/1	(-)	(-)
	B+3/2	(++)	(+++)		V+3/2	(+)	(++)		K+3/2	(-)	(-)
	B+3/3	(-)	(+++)		V+3/3	(-)	(++)		K+3/3	(-)	(-)
	B+3/4	(-)	(+++)		V+3/4	(-)	(-)		K+3/4	(-)	(-)
	B+3/5	(-)	(+++)		V+3/5	(-)	(-)		K+3/5	(-)	(-)
	B+3/6	(++)	(++)		V+3/6	(-)	(-)		K+3/6	(-)	(++)
	B+3/7	(-)	(+)		V+3/7	(+)	(-)		K+3/7	(-)	(++)
	B+3/8	(+)	(++)		V+3/8	(-)	(+)		K+3/8	(-)	(-)
	B+3/9	(+++)	(+)		V+3/9	(+)	(-)		K+3/9	(-)	(-)
	B+3/10	(-)	(++)		V+3/10	(-)	(-)		K+3/12	(-)	(-)

## 5. Megbeszélés

Diplomamunkám során az általunk *Myxobolus cerebralis*-sal és *Myxobolus pseudodispar*-ral különböző halfajokban végzett fertőzési kísérletekből származó vér-, és szövetmintákban vizsgáltam a parazita fejlődési alakok jelenlétét. A kutatás megtervezéséhez a Kallert és mtsai. által 2012-ben publikált munka szolgált alapul, amelyben bodorkából, pontyból illetve szivárványos és sebes pisztrángból származó vérszérum és halnyálka immunológiai hatását vizsgálták nyálkaspórák paraziták invazív stádiumaira *in vitro* kísérleti rendszerben. Eredményeik azt mutatták, hogy a vérszérumban található immunkomponensek különböző mértékben reagálnak a parazita jelenlétére, ami fontos tényező lehet a nyálkaspóráknál közismert gazdaspecifitás szempontjából. Vizsgálataik eredménye azt mutatta, hogy a *M. cerebralis* fejlődési stádiumok száma mind az ellenálló, mind a fogékony gazda vérszérumában szignifikánsan csökkent, feltételezhetően az immunrendszer működésének eredményeként. Ezzel ellentétben a *M. pseudodispar* fejlődési alakok túlélési aránya a fogékony gazda vérszérumának hozzáadása után is magas volt, és a parazitát csak a nem fogékony gazda vérszéruma tudta elpusztítani (Kallert et al., 2012).

A szakdolgozat keretében végzett *in vivo* fertőzési kísérletek során a két parazita korai fejlődési stádiumainak vérben való jelenlétét és a tapasztalt fertőzés intenzitását egyaránt vizsgáltuk fogékony és nem fogékony halfajokban. Kallert és mtsai. (2012) vizsgálatainak eredményeit figyelembe véve nem várt eredmény volt, hogy a *M. cerebralis* fejlődési alakok a kísérlet teljes időtartama alatt detektálhatóak voltak mind a fogékony, mind az ellenálló fajok vérében. A fogékony szivárványos pisztrángok esetében 1 hét után láthatóan megnőtt a parazita prevalenciája, miközben a fertőzés intenzitása nem változott jelentősen a fertőzött halakban. A fertőzést követően 1 hónappal a fertőzés prevalenciája a fogékony gazdáknál lecsökkent, valószínűleg azért mert a *M. cerebralis* fejlődési alakok ekkorra már tovább migráltak a spóráképzés helyére, a koponya és a gerincoszlop porcszövetébe. Ez korábbi, El-Matbouli és mtsai. (1995) által végzett vizsgálatok eredménye alapján is feltételezhető. A főleg szövettani technikával nyomkövetett halon belüli fejlődés vizsgálatakor a kutatók azt találták, hogy a parazita a halba való bejutását követő 6-14. nap után legnagyobb valószínűséggel a gerincvelőben, a 16-24. nap után pedig már az agyat körülvevő porcos szövetekben található meg (El-Matbouli et al., 1995). A kevésbé fogékony sebes pisztrángok között kevesebb fertőzött egyedet detektáltunk mint

a szivárványos pisztrángok esetében, bár szignifikáns különbség nem volt kimutatható. Ennek oka lehet az, hogy a sebes pisztráng, eredeti gazdaként jobban alkalmazkodott a parazitához, és a sikeres fertőződéshez nagyobb mennyiségű parazitára lehet szükség (Hofer, 1903; Hedrick et al., 1999a). Eredményeinkkel egybevágnak a Hedrick és mtsai. (1999a) által végzett kísérlet is, melynek során szivárványos és sebes pisztrángok *M. cerebralis*-ra való fogékonyágát hasonlították össze. A vizsgálatok alapján a szivárványos pisztrángot találták fogékonyabbnak, bár a sebes pisztráng is megfertőződött. Vizsgálatainkban a fertőzés prevalenciája és az egyedekben kifejlődő spórák mennyisége (a fertőzés intenzitása) is magasabb volt a szivárványos pisztrángokban. Ennél a fajnál súlyosabb károsodásokat találtak a mikroszkópos vizsgálatok során és már kevesebb spóramennyiség is kiváltotta a fertőzést (Hedrick et al., 1999a).

Vizsgálataink érdekes eredménye, hogy a nem fogékony ezüstkárászokban a fertőzöttség prevalenciájának értéke végig 40-50% között mozgott. Korábbi kísérletek eredményei alapján tudjuk, hogy a parazita gazdafelismerése nem fajspecifikus és a nem fogékony pontyfélékbe is hasonló módon jutnak be a paraziták (Kallert et al., 2009). Azonban az *in vitro* kísérletek alapján azt feltételeztük, hogy a nem fogékony halak vérében kisebb mértékben lesz jelen a parazita a fertőzést követő 1 nap után. Azt a számos felmérő vizsgálatból és fogékonyági vizsgálatból tudjuk, hogy a pontyfélékben nem alakul ki fertőzőképes myxospóra, de ezek után felmerül a kérdés, hogy mikor áll le a fejlődés, ha 1 hónappal a fertőződés után még a nem fogékony hal vérében van a parazita. Az is elképzelhető, hogy a parazita egyszerűen csak képtelen eljutni a spóráképzés helyére, és a véralakok a fejlődés zsákutcáját jelentve keringenek tovább a vérben. Ezzel egybevágnak Holzer és mtsai. (2014), a ponty (*Cyprinus carpio*) úszóhólyaggyulladását okozó *Sphaerospora dykova*e faj vizsgálatakor kapott eredménye. A felmérő vizsgálat során a vizsgált halak vérében nagy számban találtak más, nem pontyféléket fertőző nyálkaspórák fajokat is, mint például a lazacfélék proliferatív vesebetegségét okozó *Tetracapsuloides bryosalmonae*-t és több *Buddenbrockia* fajt is (Holzer et al., 2014).

A *M. pseudodispar* esetében az általunk tapasztalt fertőzöttség hasonló eredményt hozott, mint azt a korábbi Kallert és mtsai. (2012) által végzett *in vitro* kísérletek alapján vártuk. A fertőzés prevalenciája a kísérlet teljes időtartama alatt a fogékony bodorkában volt a legnagyobb, 1 hét után azonban szignifikánsan csökkent, miközben a fertőzés intenzitása minimális csökkentést mutatott. Ehhez képest a parazita alakok a bodorkák kopoltyújával végzett kísérlet végéig igen nagy arányban (90-100%-os prevalenciával)

voltak jelen. Mivel e nyálkaspórák faj halon belüli fejlődéséről nagyon keveset tudunk (még a parazita halba való bejutásának pontos helye is kérdéses), ennek pontos magyarázata nem ismert. Feltételezhető azonban, hogy a kopoltyú kapillárisokban megrekednek a parazita véralakok, és miközben a véráram többi részéből eljut a parazita a spóráképzés helyére, a vázizomzatba, addig a kapillárisokban elakadt paraziták további fejlődése leáll. Ennek igazolására, és a parazita helyének pontos meghatározására a kopoltyún belül *in situ* hibridizációs vizsgálatokat tervezünk a jövőben. A jelenség nem ismeretlen a nyálkaspóráknál; *Sphaerospora* fajok véralakjainál például gyakran előfordul, hogy elakadnak a kisebb vérerekben. A *S. dykova*e parazita véralakok időnként nagy mennyiségben kimutathatóak, a szemben a rete mirabile kapillárisálózatában (Molnár, 1993). A kopoltyú mintákban tapasztalt magasabb prevalencia magyarázataként szolgálhat még az is, hogy korábbi vizsgálatok azt mutatták, hogy a nyálkaspórák számára a kopoltyúüreg a bőr mellett gyakran a halba való bejutás helyszínéül funkcionál (El-Matbouli et al., 1995).

A korábbi felmérő vizsgálatok alapján fogékony gazdának tekintett vörösszárnyú keszegben csak kis intenzitású és alacsony prevalenciájú fertőzöttséget tapasztaltuk a vérmintákban, noha 1 hónap után kissé megnőtt a fertőzött egyedek száma. Mivel a vérminták alapján csak néhány fertőzött egyedet találtunk, megvizsgáltuk a parazita jelenlétét a bőrben és a kopoltyúban. A bőrben nem találtunk parazitát, viszont a bodorkához hasonlóan a vörösszárnyú keszeg kopoltyújában is jelen voltak a fejlődési alakok, bár 1 héttel és 1 hónappal a fertőzés után szignifikánsan kisebb prevalenciával és jóval alacsonyabb intenzitással. Az eredmények alapján valószínűsíthető, hogy a vörösszárnyú keszeg a bodorkából származó *M. pseudodispar* vonalnak nem valódi gazdája. Ezt az eredményt tűnik megerősíteni Forró és mtsai. (2013) eredménye is, miszerint vörösszárnyú keszegben nem fejlődött ki fertőzőképes myxospóra bodorkából származó parazitával történt kísérletes fertőzéskor (Forró et al., 2013). Korábbi molekuláris biológiai vizsgálatok is erősítik azt az elképzelést, hogy a *M. pseudodispar* faj inkább fajcsoport, mivel más nyálkaspórák fajokhoz képest igen széles a gazdaspektruma, és nagy a fajon belüli genetikai diverzitás is (Molnár et al., 2002). Bár a legfrissebb eredmények alapján ez a genetikai elhatárolódás kevésbé éles (Eszterbauer and Forró, 2015). A *M. pseudodispar* faj egységessége (és ezáltal széles gazdaspektuma) a molekuláris vizsgálatok alapján is megkérdőjeleződik, amit fogékonysági kísérleteink eredményei tovább erősítenek.

A köztudottam nem fogékony ezüstkárászban a kísérlet teljes időtartama alatt nem volt detektálható parazita a vérben, azonban a kopoltyúmintákban, ha kis százalékban és mennyiségben is, de megtaláltuk a parazitát minden mintavételi időpontban. Mivel a vérben egyáltalán nem volt jelen parazita, nehezen feltételezhető, hogy a kapillárisokban rekedtek meg a fejlődési alakok. Nem kizárt, hogy nem fogékony gazdánál módosul a fejlődés útvonala, és a parazita el sem jut a véráramba, hanem például megreked a kopoltyúhám alatti kötőszövetekben. A választ azonban itt is *in situ* hibridizációs vizsgálatok tudják megadni.

A két vizsgált modell faj vérben való jelenlétének vizsgálata jelentős különbségeket mutatott ki. Eltérés mutatkozott a fertőzés prevalenciájában, intenzitásában, és a különböző fogékonyságú halfajok érintettségében is. Míg a *M. cerebralis* esetében a prevalencia minden vizsgált halfajban kezdeti alacsony prevalencia szintről 1 hét után emelkedést, majd 1 hónap után csökkenést mutatott, a *M. pseudodispar* fertőzésnél ezzel ellentétes tendencia volt kimutatható. Az ezüstkárász egyik parazitára sem tekinthető fogékornak, ennek ellenére a *M. cerebralis* fejlődési alakjai végig jelen voltak a kárász vérében. A *M. pseudodispar* fejlődési alakok viszont megrekedtek a kopoltyú szöveteiben és egyáltalán nem voltak kimutathatók vérben. Vizsgálataink fontos, új eredményeket hoztak a különböző patogenitású nyálkasprórás fajok halon belüli fejlődésének megismerésében. Egyes részletek tisztázásához azonban további vizsgálatok szükségesek.

## 6. Összefoglalás

Szakdolgozati munkám során a *Myxobolus cerebralis* és a *Myxobolus pseudodispar* nyálkaspórák (Myxozoa) halparazita fajok fejlődési alakjainak jelenlétét vizsgáltam eltérő fogékonyságú halfajokban, *in vivo* fertőzési rendszerben. Munkám célja annak összehasonlítása volt, hogy az erősen patogén *M. cerebralis* és az apatogénnek tekinthető *M. pseudodispar* halon belüli fejlődésében mutatkozik-e különbség a vér és a véráram szerepét tekintve. A két nyálkaspórák faj halon belüli, elsősorban vérben való jelenlétét a 18S riboszomális RNS gén (18S rDNS) egyes szakaszainak nested PCR segítségével történő felszaporításával vizsgáltuk. A paraziták detektálásához faj-specifikus, két körös PCR rendszert dolgoztunk ki. A szakdolgozat keretében végzett *in vivo* fertőzési kísérletek során a két parazita fertőzés prevalenciája és a keletkezett PCR termék mennyisége alapján egy háromkategóriás rendszert felállítva a fertőzés intenzitását vizsgáltuk fogékony és nem fogékony halfajokban.

Vizsgálataink igazolták a sebes és szivárványos pisztrángok *M. cerebralis*-ra való fogékonyságára vonatkozó korábbi ismereteinket, mivel a kevésbé fogékony sebes pisztrángok (*Salmo trutta* m. *fario*) között kevesebb fertőzött egyeddet detektáltunk, mint a szivárványos pisztrángok (*Onchorhynchus mykiss*) között. Szignifikáns különbség azonban nem volt kimutatható a kis mintaelemszám miatt. A *M. cerebralis* DNS-e a kísérlet teljes időtartama alatt detektálható volt mind a fogékony, mind az ellenálló fajok vérében. Ez cáfolni látszik a korábbi, vérszérummal végzett *in vitro* kísérletek eredményét, miszerint a fogékony halfajok vérszéruma rövid időn belül elpusztítja a parazita invazív stádiumait. Eredményünk abból a szempontból is érdekes, hogy megkérdőjelezi a szövettani vizsgálatokon alapuló korábbi vizsgálatok eredményét, mely alapján eddig azt feltételezték, hogy a *M. cerebralis* a halon belüli migrációja során a véráramot kikerülve a perifériás idegrendszer mentén jut el a spóráképzés helyére.

A pontyféléket fertőző, apatogén *M. pseudodispar*-ral végzett vizsgálatok is fontos eredményekre vezettek. A korábbi felmérő vizsgálatok alapján fogékony gazdának tekintett vörösszárnyú keszegben (*Scardinius erythrophthalmus*) csupán kis intenzitású és alacsony prevalenciájú fertőzöttséget tapasztaltunk a vérben. Fertőzési kísérletünk eredményei újabb bizonyítékai annak, hogy *M. pseudodispar* egy gyűjtőfaj és a vörösszárnyú keszeg a bodorkából (*Rutilus rutilus*) származó *M. pseudodispar* genetikai



vonálnak nem valódi gazdája. Igen érdekes eredmény volt, hogy míg a parazitára nem fogékony ezüstkárász (*Carassius gibelio*) vérében egyáltalán nem találtunk parazitát, addig annak kopoltyújában 30-60%-os prevalencia volt kimutatható. Ez valószínűsíti, hogy a parazita bejutásának helye a kopoltyúban van, és a parazita fejlődése a bejutás után megkezdődött a kopoltyú szöveteiben. Munkánk eredményeként újabb ismereteket szereztünk a *M. cerebralis* és a *M. pseudodispar* halon belüli fejlődésnek kezdeti szakaszáról, illetve a vér eltérő szerepéről a fogékony és a nem fogékony halfajokban. Eredményeink azonban újabb kérdéseket vetnek fel, többek között, hogy vajon mi történik a *M. cerebralis* véralakokkal a fejlődés későbbi szakaszában a nem fogékony gazdafajokban, eliminálja-e őket a hal immunrendszere, és ha igen, mikor. Illetve, hogy a nem fogékony ezüstkárász kopoltyújában megkezdett *M. pseudodispar* fejlődési alakok pontosan melyik szövetben találhatóak meg, ha nem a vérben. Erre a kérdésre a választ azonban csak a kopoltyúban végzett *in situ* hibridizációval kaphatjuk meg.

## 7. Summary

The topic of my thesis was the detection of developmental stages of *Myxobolus cerebralis* and *Myxobolus pseudodispar*, two myxosporean fish parasites (Myxozoa) in fish species with differing susceptibility using *in vivo* infections. The aim of my study was to examine the possible developmental differences of the pathogenic *M. cerebralis* and the nonpathogenic *M. pseudodispar* regarding the role of blood and blood stream in fish hosts. In the course of the *in vivo* infection studies, we examined the prevalence of infection and the infection intensity in the susceptible and non-susceptible fish species. The infection intensity was estimated using a three-category system based on the amount of amplified PCR product.

As fewer infected individuals were found among the less-susceptible brown trout (*Salmo trutta m. fario*) specimens than among the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) specimens, our results support the previous findings regarding the susceptibility of rainbow trout and brown trout to *Myxobolus cerebralis*, although there were no significant differences because of the low number of samples. *M. cerebralis* DNA could be detected in the blood of both susceptible and non-susceptible species during the whole experiment. It seems to be in contrast with the results of previous *in vitro* studies stating that the sera of non-host fish eliminates the parasites' infective stages within a short period of time. Our findings question the previous results based on histological studies that *M. cerebralis* avoids blood stream and migrates via the peripheral nervous system during its migration in fish host to the site of sporogony.

The other experiment with the nonpathogenic cyprinid parasite *M. pseudodispar* also led to important results. According to previous studies rudd (*Scardinius erythrophthalmus*) was considered to be susceptible to *M. pseudodispar*. In contrast we found low infection intensity and prevalence in the blood of rudd. The results of our infection trial provide further evidence for *M. pseudodispar* being a cryptic species, and they suggest that rudd is not a real host for *M. pseudodispar* originating from roach (*Rutilus rutilus*). Another interesting result is that, there were no parasites in the blood of non-susceptible gibel carp (*Carassius gibelio*), however we detected a 30-60% prevalence in gills. These facts suggest that the portal of entry is the gill and the parasite's development stops within the gill tissues after the invasion.

Our study contributed to the better knowledge of the early stage of development of *M. cerebralis* and *M. pseudodispar* in fishes, and the different role of blood in host and non-host fish species. Our findings rise a number of questions too. For example, what happens with the blood stages of *M. cerebralis* in the later period of its development in non-host species. Can the immune system of the fish eliminate them, and if so, when. Furthermore, *M. pseudodispar* stagnates in non-host gibel carp gills, in this case, which tissue are exactly the place of development if there is no detectable parasite in the blood. However we can only answer these questions by using *in situ* hybridisation on gill samples.

## **8. Köszönetnyilvánítás**

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Eszterbauer Editnek és Forró Barbarának a szakdolgozatban szereplő képekért, a sok tanácsért, segítségért és magyarázatért, mellyel munkámat segítették és hozzájárultak a szakdolgozatom elkészüléséhez. Köszönöm Rigler Eszternek a statisztikai elemzések elkészítésében nyújtott segítségét és a Halparazitológia témacsoport minden tagjának, hogy segítségül fordulhattam hozzájuk. Köszönöm mindenkinek, aki a témabeszámolóok során hasznos kérdéssel, tanáccsal vagy építő jellegű kritikával látott el.

## 9. Hivatkozások

- Alvarez-Pellitero, P., Palenzuela, O., Sitjà-Bobadilla, A., 2008. Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). *Parasitol. Int.* 57, 110–120. doi:10.1016/j.parint.2007.09.004
- Andree, K.B., MacConnell, E., Hedrick, R.P., 1998. A nested polymerase chain reaction for the detection of genomic DNA of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis. Aquat. Organ.* 34, 145–154. doi:10.3354/dao034145
- Baerwald, M.R., 2013. Temporal expression patterns of rainbow trout immune-related genes in response to *Myxobolus cerebralis* exposure. *Fish Amp Shellfish Immunol.* doi:10.1016/j.fsi.2013.07.008
- Baldwin, T.J., Vincent, E.R., Silflow, R.M., Stanek, D., 2000. *Myxobolus cerebralis* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*) exposed under natural stream conditions. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12, 312–321. doi:10.1177/104063870001200403
- Bartholomew, J.L., Whipple, M.J., Stevens, D.G., Fryer, J.L., 1997. The life cycle of *Ceratomyxa shasta*, a myxosporean parasite of salmonids, requires a freshwater polychaete as an alternate host. *J. Parasitol.* 83, 859–868.
- Baska, F., 1987. Histological studies on the development of *Myxobolus pseudodispar* Gorbunova, 1936 in the roach (*Rutilus rutilus*). *Acta Vet. Hung.* 35, 251–257.
- Beauchamp, K.A., Gay, M., Kelley, G.O., El-Matbouli, M., Kathman, R.D., Nehring, R.B., Hedrick, R.P., 2002. Prevalence and susceptibility of infection to *Myxobolus cerebralis*, and genetic differences among populations of *Tubifex tubifex*. *Dis. Aquat. Organ.* 51, 113–121. doi:10.3354/dao051113
- Boshra, H., Li, J., Sunyer, J.O., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 239–262. doi:10.1016/j.fsi.2005.04.004
- Canning, E.U., Curry, A., Feist, S.W., Longshaw, M., Okamura, B., 1999. *Tetracapsula bryosalmonae* n.sp. for PKX organism, the cause of PKD in salmonid fish. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 19, 203–206.
- Davies, A.J., Sienkowski, I.K., 1988. Further studies on *Zschokkella russelli* (Myxozoa: Myxosporea) from *Ciliata mustela* L. (Teleostei; Gadidae), with emphasis on ultrastructural pathology and sporogenesis. *J. Fish Dis.* 11, 325–336. doi:10.1111/j.1365-2761.1988.tb01228.x
- El-Matbouli, M., Fischer-Scherl, T., Hoffmann, R.W., 1992. Present knowledge on the life cycle, taxonomy, pathology, and therapy of some Myxosporea spp. important for freshwater fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 367–402. doi:10.1016/0959-8030(92)90071-5
- 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*. *Int. J. Parasitol.*, 10th International Congress of Protozoology 28, 195–217. doi:10.1016/S0020-7519(97)00176-8
- El-Matbouli, M., Hoffmann, R.W., Mandok, C., 1995. Light and electron microscopic observations on the route of the triactinomyxon-sporoplasm of *Myxobolus cerebralis* from epidermis into rainbow trout cartilage. *J. Fish Biol.* 46, 919–935. doi:10.1111/j.1095-8649.1995.tb01397.x
- Eszterbauer E., Forró B., 2015. A *Myxobolus pseudodispar* nyálkaspórási halparazita gazdafajlagosságának kísérletes vizsgálata. Állatorvos-tudományi Akadémiai Beszámoló, Budapest.

- Eszterbauer, E., 2004. Genetic relationship among gill-infecting *Myxobolus species* (Myxosporaea) of cyprinids: molecular evidence of importance of tissue-specificity. *Dis. Aquat. Organ.* 58, 35–40. doi:10.3354/dao058035
- Eszterbauer, E., Atkinson, S., Diamant, A., Morris, D., El-Matbouli, M., Hartikainen, H., 2015a. Myxozoan life cycles: Practical approaches and insights, in: Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J.L. (Eds.), *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Springer International Publishing, pp. 175–198.
- Eszterbauer, E., Forró, B., Tolnai, Z., Guti, C.F., Zsigmond, G., Hoitsy, G., Kallert, D.M., 2015b. Parental genetic diversity of brown trout (*Salmo trutta m. fario*) brood stock affects offspring susceptibility to whirling disease. *Parasit. Vectors* 8. doi:10.1186/s13071-015-0744-2
- Forró, Guti, Cs.F., Eszterbauer, E., 2013. Genetic diversity of *Myxobolus pseudodispar* (Myxozoa) isolates: an example of cryptic species complex? 16th EAFP International Conference on Diseases of Fish and Shellfish. 2-6th September 2013, Tampere, Finland. Abstract No. P-147
- Friedrich, C., Ingolic, E., Freitag, B., Kastberger, G., Hohmann, V., Skofitsch, G., Neumeister, U., Kepka, O., 2000. A myxozoan-like parasite causing xenomas in the brain of the mole, *Talpa europaea* L., 1758 (Vertebrata, Mammalia). *Parasitology* 121, 483–492. doi:null
- Granath, W.O., Gilbert, M.A., Wyatt-Pescador, E.J., Vincent, E.R., 2007. Epizootiology of *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of salmonid whirling disease in the Rock Creek drainage of west-central Montana. *J. Parasitol.* 93, 104–119. doi:10.1645/GE-948R.1
- Halliday, M.M., 1976. The biology of *Myxosoma cerebralis*: the causative organism of whirling disease of salmonids. *J. Fish Biol.* 9, 339–357. doi:10.1111/j.1095-8649.1976.tb04683.x
- Hedrick, R.P., Adkison, M.A., El-Matbouli, M., MacConnell, E., 1998. Whirling disease: re-emergence among wild trout. *Immunol. Rev.* 166, 365–376. doi:10.1111/j.1600-065X.1998.tb01276.x
- Hedrick, R.P., McDowell, T.S., Gay, M., Marty, G.D., Georgiadis, M.P., MacConnell, E., 1999a. Comparative susceptibility of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brown trout (*Salmo trutta*) to *Myxobolus cerebralis*, the cause of salmonid whirling disease. *Dis. Aquat. Organ.* 37, 173–183. doi:10.3354/dao037173
- Hedrick, R.P., McDowell, T.S., Marty, G.D., Fosgate, G.T., Mukkatira, K., Myklebust, K., El-Matbouli, M., 2003. Susceptibility of two strains of rainbow trout (one with suspected resistance to whirling disease) to *Myxobolus cerebralis* infection. *Dis. Aquat. Organ.* 55, 37–44.
- Hedrick, R.P., McDowell, T.S., Mukkatira, K., Georgiadis, M.P., MacConnell, E., 2001. Salmonids resistant to *Ceratomyxa shasta* are susceptible to experimentally induced infections with *Myxobolus cerebralis*. *J. Aquat. Anim. Health* 13, 35–42. doi:10.1577/1548-8667 (2001) 013<0035:SRTCESA>2.0.CO;2
- Hedrick, R.P., McDowell, T.S., Mukkatira, K., Georgiadis, M.P., MacConnell, E., 1999b. Susceptibility of selected inland salmonids to experimentally induced infections with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. *J. Aquat. Anim. Health* 11, 330–339. doi:10.1577/1548-8667 (1999) 011<0330:SOSIST>2.0.CO;2
- Hofer B., 1903. Über die Drehkrankheit der Regenbogenforelle. *Allgemeine Fischereizeitung* 28, 7–8.
- Hoffman, C.J.B., 1974. Fish age as related to susceptibility to *Myxosoma cerebralis*, cause of whirling disease. *Progress. Fish-Cult.* 36, 151–151. doi:10.1577/1548-8659 (1974) 36[151:FAARTS]2.0.CO;2

- Hoffman, G.L., 1970. Intercontinental and transcontinental dissemination and transfaunation of fish parasites, with emphasis on whirling disease (*Myxosoma cerebralis*). 69–81 pp.
- Hoffman, G.L., Dunbar, C.E., Bradford, A., 1962. Whirling disease of trouts caused by *Myxosoma cerebralis* in the United States (Federal Government Series No. 427), Special Scientific Report- Fisheries. U.S. Fish and Wildlife Service.
- 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. *Parasit. & Vectors* 7, 398.
- Ibarra, A.M., Hedrick, R.P., Gall, G.A.E., 1994. Genetic analysis of rainbow trout susceptibility to the myxosporean *Ceratomyxa shasta*. *Aquaculture* 120, 239–262. doi:10.1016/0044-8486(94)90082-5
- Kallert, D.M., Bauer, W., Haas, W., El-Matbouli, M., 2011. No shot in the dark: Myxozoans chemically detect fresh fish. *Int. J. Parasitol.* 41, 271–276. doi:10.1016/j.ijpara.2010.09.012
- Kallert, D.M., Borrelli, J., Haas, W., 2012. Biostatic activity of piscine serum and mucus on myxozoan fish infective stages. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 969–976. doi:10.1016/j.fsi.2012.08.012
- Kallert, D.M., Eszterbauer, E., Grabner, D., ElMatbouli, M., 2009. In vivo exposure of susceptible and non-susceptible fish species to *Myxobolus cerebralis* actinospores reveals non-specific invasion behaviour. *Dis. Aquat. Organ.* 84, 123–130. doi:10.3354/dao02034
- Kallert, D.M., Grabner, D.S., Yokoyama, H., El-Matbouli, M., Eszterbauer, E., 2015. Transmission of myxozoans to vertebrate hosts, in: Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J.L. (Eds.), *Myxozoan Evolution, Ecology and Development*. Springer International Publishing, pp. 235–251.
- Kent, M.L., Andree, K.B., Bartholomew, J.L., El-Matbouli, M., Desser, S.S., Devlin, R.H., Feist, S.W., Hedrick, R.P., Hoffmann, R.W., Khattra, J., Hallett, S.L., Lester, R.J.G., Longshaw, M., Palenzeula, O., Siddall, M.E., Xiao, C., 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48, 395–413. doi:10.1111/j.1550-7408.2001.tb00173.x
- Kevin G. Thompson, R.B.N., 1999. Field exposure of seven species or subspecies of salmonids to *Myxobolus cerebralis* in the Colorado River, Middle Park, Colorado. *J. Aquat. Anim. Health - J AQUAT ANIM Health* 11, 312–329.
- Kodádková A, 2014. Myxosporean phylogeny and evolution of myxospore morphotypes. Ph.D. Thesis Series, No. 15.
- Lom, J., Dyková, I., 2006. Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol. (Praha)* 53, 1–36.
- Lom, J., Dykova, I., 1992. Fine structure of triactinomyxon early stages and sporogony: myxosporean and actinosporean features compared. *J. Protozool.* 39, 16–27. doi:10.1111/j.1550-7408.1992.tb01279.x
- MacConnell and Vincent, 2002. Review: the effects of *Myxobolus cerebralis* on the salmonid host.
- Markiw, M.E., 1992. Salmonid Whirling Disease (Federal Government Series No. 17), Fish and Wildlife Leaflet. U.S. Fish and Wildlife Service.
- Markiw, M.E., 1989. Portals of entry for salmonid whirling disease in the rainbow trout. *Dis. Aquat. Organ.* 6, 7–10. doi:10.3354/dao006007

- Marton, S., Eszterbauer, E., 2012. The susceptibility of diverse species of cultured oligochaetes to the fish parasite *Myxobolus pseudodispar* Gorbunova (Myxozoa). J. Fish Dis. 35, 303–314. doi:10.1111/j.1365-2761.2012.01347.x
- Molnár, K., 1980. Renal sphaerosporosis in the common carp (*Cyprinus carpio*) L. J. Fish Dis. 489–498.
- Molnár, K., 1979. Gill sphaerosporosis in the common carp and grasscarp. Acta Vet. Sci. Hung. 99–133.
- Molnár K., 1993. The occurrence of *Sphaerospora renicola* K-stages in the choroidal rete mirabile in the common carp. Folia Parasitol. 175–180.
- Molnár, K., Eszterbauer, E., 2015. Specificity of infection sites in vertebrate hosts, in: Okamura, B., Gruhl, A., Bartholomew, J.L. (Eds.), Myxozoan Evolution, Ecology and Development. Springer International Publishing, pp. 295–313.
- Molnár, K., Eszterbauer, E., Székely, C., Dán, Á., Harrach, B., 2002. Morphological and molecular biological studies on intramuscular *Myxobolus* spp. of cyprinid fish. J. Fish Dis. 25, 643–652.
- Molnár, K., Kovács-Gayer, É., 1985. The pathogenicity and development within the host fish of *Myxobolus cyprini* Doflein, 1898. Parasitology 549–555.
- Muñoz, P., Álvarez-Pellitero, P., Sitjà-Bobadilla, A., 2000. Modulation of the in vitro activity of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) phagocytes by the myxosporean parasite *Sphaerospora dicentrarchi* (Myxosporea: Bivalvulida). Fish Shellfish Immunol. 10, 567–581. doi:10.1006/fsim.2000.0272
- Nakao, M., Mutsuro, J., Obo, R., Fujiki, K., Nonaka, M., Yano, T., 2000. Molecular cloning and protein analysis of divergent forms of the complement component C3 from a bony fish, the common carp (*Cyprinus carpio*): presence of variants lacking the catalytic histidine. Eur. J. Immunol. 30, 858–866. doi:10.1002/1521-4141(200003)30:3<858::AID-IMMU858>3.0.CO;2-M
- Nesnidal, M.P., Helmkampf, M., Bruchhaus, I., El-Matbouli, M., Hausdorf, B., 2013. Agent of whirling disease meets orphan worm: phylogenomic analyses firmly place Myxozoa in Cnidaria. PLoS ONE 8, e54576. doi:10.1371/journal.pone.0054576
- Nichols, K., Bartholomew, J., Thorgaard, G., 2003. Mapping multiple genetic loci associated with *Ceratomyxa shasta* resistance in *Oncorhynchus mykiss*. Dis. Aquat. Organ. 56, 145–154. doi:10.3354/dao056145
- O’Grodnick, J.J., 1979. Susceptibility of various salmonids to whirling disease (*Myxosoma cerebralis*). Trans. Am. Fish. Soc. 108, 187–190. doi:10.1577/1548-8659(1979)108<187:SOVSTW>2.0.CO;2
- Oriol Sunyer, J., Tort, L., 1995. Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream (*Sparus aurata*) serum are effected by the alternative complement pathway. Vet. Immunol. Immunopathol. 45, 333–345. doi:10.1016/0165-2427(94)05430-Z
- Oriol Sunyer, J., Zarkadis, I.K., Lambris, J.D., 1998. Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? Immunol. Today 19, 519–523. doi:10.1016/S0167-5699(98)01341-3
- Ryce, E.K.N., Zale, A.V., MacConnell, E., Nelson, M., 2005. Effects of fish age versus size on the development of whirling disease in rainbow trout. Dis. Aquat. Organ. 63, 69–76. doi:10.3354/dao063069
- Saulnier, D., Kinkelin, P. de, 1996. Antigenic and biochemical study of PKX, the myxosporean causative agent of proliferative kidney disease of salmonid fish. Dis. Aquat. Organ. 27, 103–114. doi:10.3354/dao027103
- Schisler, G.J., Myklebust, K.A., Hedrick, R.P., 2006. Inheritance of *Myxobolus cerebralis* resistance among F1-generation crosses of whirling disease resistant and



- susceptible rainbow trout strains. *J. Aquat. Anim. Health* 18, 109–115. doi:10.1577/H05-047.1
- Siddall, M.E., Martin, D.S., Bridge, D., Desser, S.S., Cone, D.K., 1995. The demise of a phylum of protists: phylogeny of Myxozoa and other parasitic cnidaria. *J. Parasitol.* 81, 961–967.
- Sitjà-Bobadilla, A., 2008. Fish immune response to Myxozoan parasites. *Parasite* 15, 420–425. doi:10.1051/parasite/2008153420
- Slierendrecht, W.J., Olesen, N.J., Juul-Madsen, H.R., Lorenzen, N., Henryon, M., Berg, P., Søndergaard, J., Koch, C., 2001. Rainbow trout offspring with different resistance to viral haemorrhagic septicaemia. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 155–167. doi:10.1006/fsim.2000.0302
- Steinbach et al., L.C., 2009. Whirling disease in the United States. A summary of progress in research and management.
- Sunyer, J.O., Lambris, J.D., 1998. Evolution and diversity of the complement system of poikilothermic vertebrates. *Immunol. Rev.* 166, 39–57. doi:10.1111/j.1600-065X.1998.tb01251.x
- Sunyer, J.O., Zarkadis, I.K., Sahu, A., Lambris, J.D., 1996. Multiple forms of complement C3 in trout that differ in binding to complement activators. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 8546–8551.
- Székely, C., Molnár, K., Eszterbauer, E., Baska, F., 1999. Experimental detection of the actinospores of *Myxobolus pseudodispar* (Myxosporea: Myxobolidae) in oligochaete alternate hosts. *Dis. Aquat. Organ.* 38, 219–224.
- Székely, C., Molnár, K., Rácz, O., 2001. Complete developmental cycle of *Myxobolus pseudodispar* (Gorbunova)(Myxosporea: Myxobolidae). *J. Fish Dis.* 24, 461–468.
- Wolf, K., Markiw, M.E., 1984. Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: New discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science* 225, 1449–1452. doi:10.1126/science.225.4669.1449
- Wolf, K., Markiw, M. e., Hiltunen, J.K., 1986. Salmonid whirling disease: *Tubifex tubifex* (Müller) identified as the essential oligochaete in the protozoan life cycle. *J. Fish Dis.* 9, 83–85. doi:10.1111/j.1365-2761.1986.tb00984.x
- Yokoyama, H., Grabner, D., Shirakashi, S., 2012. Transmission biology of the Myxozoa. INTECH Open Access Publisher.