

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie



Andrea Pačesová

Infekce ryb způsobené melanizovanými houbami
Infection of fishes caused by melanized fungi

Typ závěrečné práce:

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Vít Hubka

Praha, 2017

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Infekce ryb způsobené melanizovanými houbami vypracovala pod vedením vedoucího bakalářské práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato bakalářská práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

15. 5. 2017

.....
Podpis

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování Vítu Hubkovi za jeho cenné rady a trpělivost při vedení mé bakalářské práce.

Abstrakt

V této rešerši jsem se zaměřila na představení melanizovaných hub, které jsou schopny způsobit infekce převážně u komerčně chovaných ryb. Ryby ve velkochovech jsou velmi často chovány ve špatných životních podmínkách a jsou tudíž mnohem náchylnější ke vzniku infekcí. Melanin v buněčné stěně těchto hub je důležitým faktorem virulence a podílí se na schopnosti hub působit infekce, a to ochranou buněk před hydrolytickými enzymy a volnými radikály produkovanými imunitním systémem hostitele a pohlčováním těžkých kovů, které jsou základem některých fungicidů. Problémem těchto infekcí je i to, že jsou způsobeny velmi heterogenní skupinou organismů a pro jejich spolehlivou identifikaci neexistuje jednoduchá a rychlá metodika.

Klíčová slova: Chaetothyriales, houbové infekce ryb, mykotoxiny, taxonomie, klinický obraz

Abstract

In this thesis, I have focused on the presentation of melanised fungi, the so-called black yeast, which can cause infection mainly in commercially bred fish. These fish in aquacultures are very often kept in a bad environment and are therefore more prone to infection. Melanin in the cell wall is a very important virulence factor and it takes part in the ability of fungi to cause infections by protecting the fungi cells against hydrolytic enzymes and free radicals which are produced by the immune system of the host, and by absorbing heavy metals which are the base of some fungicides. The problem of these infections is also the fact that they are caused by a very heterogenic group of organisms and there is no sure and fast method for their reliable identification.

Key words: Chaetothyriales, fungal infection of fishes, mycotoxins, taxonomy, clinical picture

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Imunitní systém	2
3	Melaniny	3
3.1	Syntéza melaninu	4
3.1.1	DHN melanin	5
3.1.2	DOPA melanin.....	5
3.2	Melaniny jako virulentní faktor	6
4	Taxonomie.....	7
4.1	rod <i>Exophiala</i> (Herpotrichiellaceae, Chaetothyriales)	8
4.1.1	<i>Exophiala salmonis</i>	9
4.1.2	<i>Exophiala psychrophila</i>	11
4.1.3	<i>Exophiala aquamarina</i>	11
4.1.4	<i>Exophiala pisciphila</i>	12
4.1.5	<i>Exophiala angulospora</i>	14
4.1.6	<i>Exophiala jeanselmei</i>	15
4.1.7	<i>Exophiala xenobiotica</i>	16
4.2	rod <i>Cephalotheca</i> (Cephalothecaceae, Sordariales).....	16
4.2.1	<i>Cephalotheca sulfurea</i>	16
4.3	rod <i>Bradomyces</i> (Trichomeriaceae, Chaetothyriales)	17
4.3.1	<i>Bradomyces oncorhynchi</i>	17
4.4	rod <i>Phoma</i> (Didymellaceae, Pleosporales)	17
4.4.1	<i>Phoma herbarum</i>	18
4.5	rod <i>Ochroconis</i> (Symptoventuriaceae, Venturiales)	20
4.5.1	<i>Ochroconis humicola</i>	21
4.6	rod <i>Cladosporium</i> (Davidiellaceae, Capnodiales)	23
4.6.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	24
4.6.2	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	24
4.7	rod <i>Phialophora</i> (Herpotrichiellaceae, Chaetothyriales).....	25
5	Závěr	25
6	Seznam literatury	26

1 Úvod

Stále častěji dochází k chovu ryb v umělých akvakulturách a líhních, kde žije velké množství ryb na malém prostoru. Hrubá manipulace s rybami, špatné skladování nebo málo potravy, nevhodný chov zvyšuje u ryb stres, který se negativně podepisuje na imunitě ryb. Navíc špatným skladováním a zpracováním krmiv a současným trendem zvyšovat rostlinou složku v krmivech, např. podíl pšenice v krmivech dravých pstruhů duhových je pohybuje mezi 15 a 27 %, u kaprovitých ryb 20–70 %, se zvyšuje riziko kontaminace krmiva vláknitými houbami a mykotoxiny. Tyto toxiny u ryb vyvolávají poruchy trávení a úbytek na váze, poruchy reprodukce, oslabení imunitního systému. Mezi nejnebezpečnější mykotoxiny patří aflatoxiny (produkované např. *Aspergillus flavus* a *A. parasiticus*), ochratoxiny (*Aspergillus* a *Penicillium*), trichotheceny (*Fusarium*), zearalenon (zejména *Fusarium graminearum* a *F. culmorum*). Takto chované a krmené ryby jsou oslabené a náchylnější k infekcím, které se mezi rybami rychle šíří a mohou způsobit velké ztráty (Tolarová 2014, Vakula 2015).

Mezi nejčastější a nejznámější infekce způsobené zástupci rodu *Saprolegnia*, patří mezi oomycety, které se liší od infekcí způsobené melanizovanými houbami. *Saprolegnia* způsobuje povrchové onemocnění s mírnou imunitní odpovědí. Počáteční léze mohou být malé, ale dokáží se rozšířit po celém povrchu těla a jsou většinou chronického charakteru. Zatímco melanizované houby způsobují akutní i chronické infekce, které zasahují ve většině případů do několika orgánů a jsou provázeny silnými zánětlivými reakcemi a nekrózami (Yanong 2003).

Mezi nejvýznamnější melanizované houby patří *Exophiala*, *Ochroconis*, *Cladosporium*, *Phoma*. Tyto melanizované houby mají ve svých buněčných stěnách melanin, který jim poskytuje ochranu před imunitním systémem ryb. Imunitní systém ryb se spoléhá především na nespecifickou imunitu. Ta je založena především na nespecifické imunitě, která se opírá o přirozené bariéry (kůže a sliznice), fagocytózu, zánětlivé reakce. Tyto jednoduché mechanismy dokáží melanizované houby obejít (Langfelder 2003, Slottá 2007).

Význam těchto infekcí v posledních 20 letech velmi roste. A proto jsem se rozhodla tento problém shrnout v bakalářské práci.

Cílem této práce je obsáhnout infekce u ryb způsobené melanizovanými houbami po stránce taxonomické a klinické, ale také shrnout specifika těchto hub, které je předurčují k roli patogenů u studenokrevných živočichů.

2 Imunitní systém

První formy imunitního systému se objevily již před asi 1 miliardou let a dnes je jím vybavený každý eukaryotní organismus na naší planetě. Imunita a další mechanismy (např. nervový a endokrinní systém se podílejí na zajištění buněčné integrity a udržení homeostázy a přežití jedince (Tolarová (2014), Buchmann (2015))).

Ryby patří mezi studenokrevné organismy, udržení homeostázy je více problematické, ale jinak se jejich imunitní systém moc neliší od imunitních systémů ostatních obratlovců, včetně teplokrevných. U vyšších obratlovců má imunita 2 složky: nespecifickou (přirozenou) a specifickou (adaptivní). Adaptivní imunita, která je evolučně mladší, se objevila před zhruba 450 mil lety u čelistnatých ryb. Kombinace adaptivní a přirozené imunity vede k zánětlivé reakci. Zánět často vede k tvorbě granulomů, ve kterých je parazit a jeho produkty zapouzdřeny (Alvarez-Pellitero 2008).

Evolučně starší nespecifická imunita zajišťuje, spolu s mechanickými bariérami v těle (šupiny, mukózní povrchy kůže žaber, trávicího traktu), první vlnu imunitní reakce. Buňky nespecifické imunity mají chudší receptorovou výbavu (Silnicová, Vojtek et al. 2013) a reaguje na všechny cizí molekuly v těle, aniž by rozpoznaly její strukturu, a nepodílí se tak na vytváření imunologické paměti. Do nespecifické imunitní odpovědi patří tyto mechanismy: bariérové vlastnosti kůže a sliznic, fagocytóza, baktericidní látky tělních tekutin (např. lysozym) a antivirové látky a zánětlivé reakce (Slottá 2007), apoptóza (Alvarez-Pellitero 2008). Nespecifická imunita se podílí i na antifungální obraně, a to v podobě rozeznávání PAMP's (pathogen-associated molecular patterns, molekulární struktury typické pro povrch buněk patogenů) struktur na povrchu hub. Buňky přirozené imunity jsou koregulovány stejnými signály, nejčastěji cytokiny (Alvarez-Pellitero 2008).

Fagocytóza je evolučně velmi starý mechanismus, který ovládají i jednobuněční (Tolarová 2014) a primitivní mnohobuněční živočichové, např. živočišné houby (Porifera) a žahavci (Cnidaria) (Buchmann 2015). Při fagocytóze dochází k pohlcení cizorodé částice, nebo organismu specifickými buňkami – fagocyty, po pohlcení vzniká po splynutí s lysozomem fagolysozom, kde je částice zničena. Fagocyty likvidují také vlastní mrtvé nebo poškozené buňky (Slottá 2007). U kostnatých ryb tuto schopnost ovládají monocyty, makrofágy a neutrofilové. U ryb tyto typy buněk produkují ledviny, slezina a některé části jater, na rozdíl od savců, u nichž jsou produkovány v kostní dřeni (Tolarová 2014).

Specifická imunita nastupuje po nespecifické imunitě a je spojena s imunitní pamětí (Silnicová, Vojtek et al. 2013). Pro spuštění specifické imunitní reakce je nutný přímý kontakt

s antigenem (Ag) (Slottá 2007). Specifická imunita je založena na protilátkách (imunoglobulinech), které jsou vázány na povrch T – a B – lymfocytů, a rozpoznávání antigenů na povrchu patogenních buněk (proteiny, polysacharidy, nukleové kyseliny apod., které jsou pro každý patogen specifické). Imunoglobuliny jsou kódovány rekombinantní aktivací genů (RAG's) a tím přispívá k přesnější a efektivní reakci proti infekcím (Alvarez-Pellitero 2008). Savci mají 5 tříd imunoglobulinů (IgG, IgM, IgA, IgE, IgD), kdežto u ryb takové rozlišení není. Vyskytuje se u nich imunoglobulin IgM, který má na rozdíl od savců jiné prostorové uspořádání. Některé ryby mohou nést 3 třídy imunoglobulinů (IgM, IgT, IgD). Imunoglobuliny mají 2 základní funkce – rozpoznat antigen a navázat se na něj specifickou vazbou, a tím zajistit jeho pozdější odstranění fagocytárními buňkami. Ig molekuly jsou produkovány B - lymfocyty (Tolarová 2014). U B - lymfocytů pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) bylo dokázáno, že sám lymfocyt fagocytuje, což ukazuje, že hranice mezi buňkami imunitního systému ryb nejsou tak ostré (Buchmann 2015). Ig molekuly také neutralizují toxiny, znesnadňují adhezi virům a bakterií nebo ochraňují sliznice před infekcí.

Specifická imunita je u ryb částečně závislá na vnějším prostředí, při náhlé změně teploty vody je částečně utlumena a potřebuje čas na adaptaci. Po dobu útlumu je plně zastoupena zvýšenou aktivitou nespecifické imunity (Tolarová 2014). Počet buněk specifické imunity (lymfocyty) při onemocnění klesá a zvyšuje se počet granulocytů (Agius and Roberts 2003).

I přes pokroky v charakterizaci imunitních systémů ryb, stále existují významné mezery ve znalostech imunitních mechanismů u řady druhů ryb. Rostoucí význam některých fungálních a parazitárních infekcí na zdraví hospodářsky významných ryb si urgentně žádá tyto znalosti doplnit (Alvarez-Pellitero 2008).

3 Melaniny

Melaniny jsou velká skupina tmavých pigmentů s vysokou molekulovou hmotností, vznikající oxidativní polymerizací z fenolických nebo indolických sloučenin. Jejich převážně tmavá barva je způsobena absorpcí všech vlnových délek viditelného spektra, jejichž energii mění na teplo. Melaniny jsou produkovány celou řadou mikroorganismů, včetně řady patogenních bakterií, hub a helmintů. Přestože jsou všeobecně velmi rozšířené pigmenty a k dispozici jsou velmi účinné metody, jako je elektronová paramagnetická (spinová) rezonance, rentgenová difrakční analýza, IR (infračervená), UV (ultrafialová) a hmotnostní spektroskopie, stále není objasněna jejich kompletní struktura. Problém je, že melaniny jsou velké, amorfní molekuly a nerozpustné ve vodných a organických rozpouštědlech (aceton, chloroform, ethanol) (Riley

1997, Jacobson 2000, Langfelder, Streibel et al 2003, Nosanchuk and Casadevall 2003, Gonçalves, Lisboa et al. 2012, Scharf et al. 2014).

Melanogeneze se vyvinula paralelně u různých skupin organismů, pravděpodobně aby poskytovala ochranu před stresovými podmínkami okolního prostředí. Funkce melaninů je široká napříč Eukaryoty a na různých úrovních buňky. Fungují jako ochrana před UV zářením, enzymatickou hydrolýzou, oxidativním stresem, extrémními výkyvy teplot, mohou vázat různé (potenciálně) toxické látky (např. těžké kovy), vychytávají nepárové elektrony, ovlivňují buněčnou integritu, uchovávají vodu v buňce a tím předchází vysychání, jsou využívány pro maskování a při pohlavním výběru. U hub poskytují větší pevnost buněčné stěně. Suspenze melaninových částic tvoří inkoust sépií, tvoří černé a hnědé zbarvení chlupů a peří některých ptáků. Melanocyty člověku poskytují ochranu proti slunečnímu záření a přispívají k odolnosti vůči melanomu, mohou inhibovat tvorbu syncytií a další cytopatologické účinky virů. U hmyzu poskytují melaniny ochranu proti bakteriím, prvokům a houbovým patogenům. V některých případech je jeho funkce nejasná, např. funkce melaninu v neuronech substantia nigra v lidském mozku. Melaniny nejsou životně nezbytné, ale poskytují adaptivní výhodu v prostředí (Riley 1997, Langfelder, Streibel et al. 2003, Nosanchuk and Casadevall 2003, Plonka and Grabacka 2006, Scharf et al. 2014).

Mikrobiální melaniny jsou extra- i intracelulární, vyskytují se ve formě granulí na povrchu buněčné stěny, jako součást buněčné stěny nebo se může hromadit na cytoplazmatických organelách. Melaniny u hub jsou uloženy v buněčné stěně, podpořeno 3 důkazy: 1) odstraněním buněčné stěny melanizované houby, se ztratí většina tmavého zbarvení, 2) v elektronovém mikroskopu se buněčná stěna kmenů albínů (testováno na *Exophiala dermatitidis*, *Cryptococcus neoformans*) objeví jako hyalinní, ale melanizované formy s hustým elektronovým obalem, po přidání scytalonu ke kmenům albínské kolonie, se tato kolonie následně melanizuje a v elektronovém mikroskopu tyto kmeny mají hustý elektronový obal, 3) melanizované buňky jsou odolnější hydrolýze než kmeny s přerušenu syntézou melaninu (Jacobson 2000, Nosanchuk and Casadevall 2003).

3.1 Syntéza melaninu

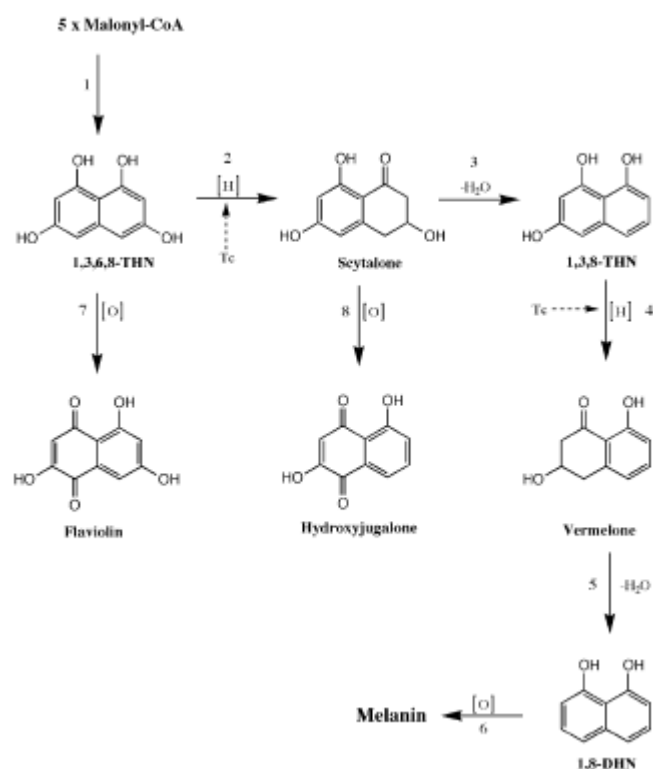
Existují dva hlavní typy melaninu – 1,8-dihydroxynaftalen (DHN) melanin a dihydroxyfenylalanin (DOPA) melanin. Oba typy jsou produkovány u hub a mohou se podílet na patogenezi.

Při syntéze melaninu mohou vznikat meziprodukty, které mohou být pro buňku potenciálně toxické, proto melanogeneze probíhá v buněčné stěně, kde je cytoplazma buňky chráněna. U savců je tento problém řešen melanogenezí ve speciálních organelách –

melanosomech. Melanizované houby jsou odolnější vůči UV záření, hydrolytickým enzymům, antimykotikům (Plonka and Grabacka 2006, Gonçalves, Lisboa et al. 2012, Scharf et al. 2014).

3.1.1 DHN melanin

DHN melaniny jsou produkovány většinou zástupců Ascomycetes (Gonçalves, Lisboa et al. 2012) a někdy jsou označovány jako allomelaniny (Plonka and Grabacka 2006).



obr. 1 schematická syntéza DHN melaninu, O=oxidace, H=redukce, -H₂O=dehydratace, krok 1 je katalyzován PKS, kroky 2 4 reduktázou, kroky 3 a 5 dehydratázou, polymerizace 1,8-DHN je katalyzován lakázou, reakce 7 a 8 produkují vedlejší produkty, pokud je syntéza inhibována (např. tricyklazolem) (Langfelder 2003)

Syntéza probíhá přes polyketidovou dráhu syntézy. Polyketid syntáza (PKS) převádí malonyl - koenzym A na první detekovatelný meziprodukt 1,3,6,8-tetrahydroxynaftalen (1,3,6,8-THN), ten se redukuje enzymaticky na scytalon. Scytalon je enzymaticky dehydratován na 1,3,8-trihydroxynaftalen (1,3,8-THN), který je redukován na vermelon, tyto dva kroky může inhibovat tricyklazol. Další dehydratace vede k 1,8-dihydroxynaftalen (1,8-DHN). Další kroky vedou před dimerizací molekul k polymerizaci DHN melaninu. DHN melanogeneze je pro houby velmi

důležitá (Bell and Wheeler 1986, Langfelder, Streiibel et al. 2003).

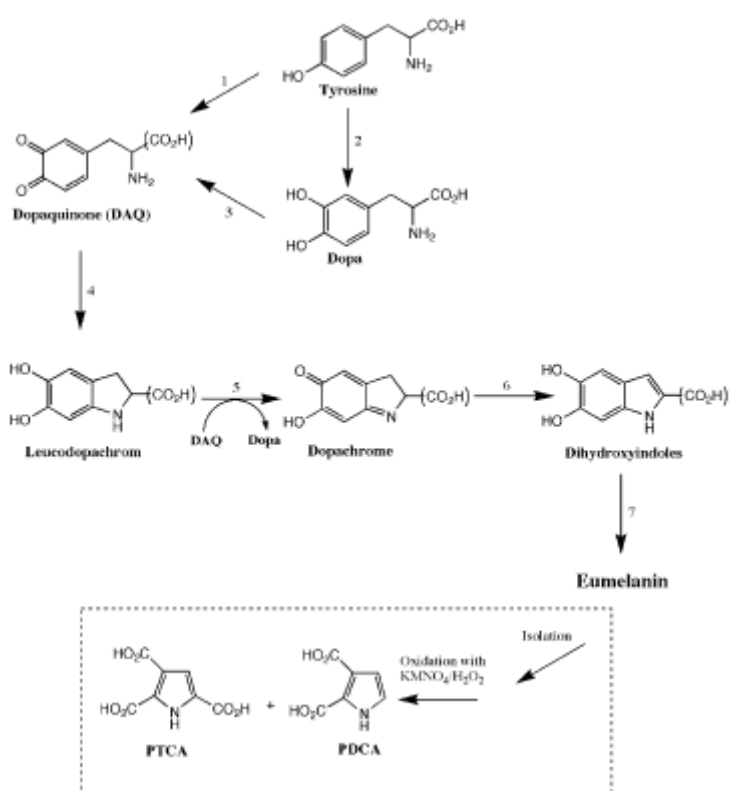
DHN melanin produkuje většina patogenních hub, např. *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Exophiala*, *Fonsecaea*, *Phialophora* (Jacobson 2000).

Tato schéma jsou základní a mnoho hub provádí syntézu složitěji, přes více vedlejších produktů a meziproduktů (Langfelder, Streibel et al. 2003).

3.1.2 DOPA melanin

DOPA melaniny produkují zástupci Basidiomycetes např. *C. neoformans*, někteří zástupci Ascomycetes, např. *Aspergillus nidulans*, nebo savci (Jacobson 2000, Langfelder, Streibel et

al. 2003, Gonçalves, Lisboa et al. 2012). Jsou označovány jako eumelaniny, černé nebo hnědé



obr. 2 Schematická syntéza DOPA melaninu, reakce 1-3 jsou katalyzovány tyrozinázami (Langfelder 2003)

pigmenty, nebo phaeomelaniny, žluté až červené pigmenty (Plonka and Grabacka 2006).

Syntéza je velmi podobná jako u savců. Prvním meziproduktem je dopachuinon (DAQ), jehož syntéza může probíhat dvěma způsoby. Hydroxylací (katalyzátor tyrozináza) L-tyrosinu nebo oxidací L-DOPA. DAQ v nepřítomnosti thiolů (pokud jsou přítomny, vzniká přímo melanin) vytváří leukodopachrom, který je oxidován na dopachrom.

Hydroxylací a dekarboxylací vznikají dihydroxyindoly, které polymerují za vzniku DOPA melaninu (Langfelder, Streibel et al. 2003).

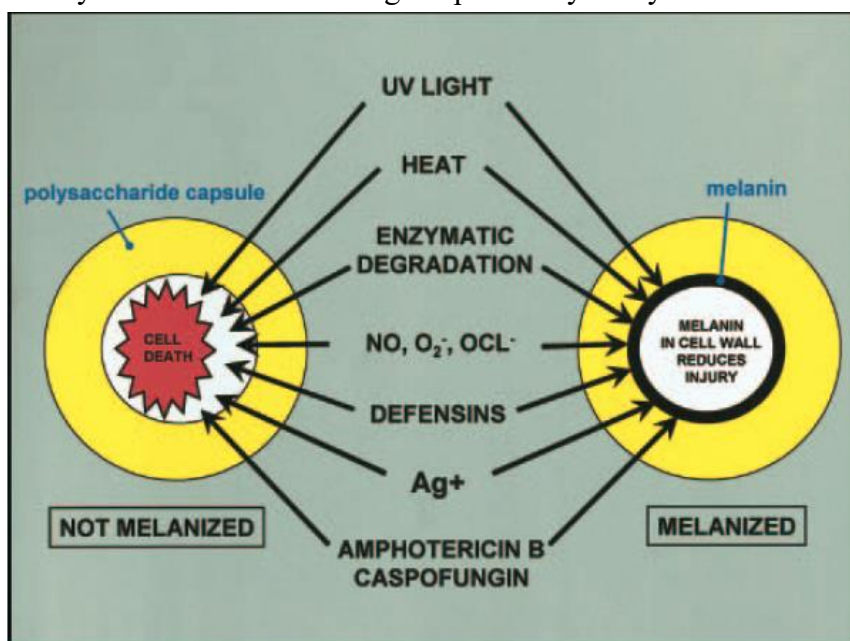
3.2 Melaniny jako virulentní faktor

Černé kvasinky sdílí řadu vlastností a mechanismů, které podmiňují jejich patogenitu: přítomnost melaninu a karotenu, tvorba silných buněčných stěn, vysoká fenoplastičita (vláknitá, kvasinková fáze, meristemický růst), schopnost asimilace aromatických uhlovodíků, produkce extracelulárních polysacharidů. Melaniny chrání konidie a hyfy před imunitním systémem hostitele a váží se na hydrolytické enzymy, čímž se zabrání jejich vlivu na plazmatickou membránu. DHN melaniny částečně chrání před fagocytózou makrofágů, princip pravděpodobně souvisí se záporným nábojem melaninů. Uvnitř fagosomu neutrofilů melaniny neutralizují kyslíkové a dusíkové volné radikály, které se uvolňují během oxidativního vzplanutí. Houby jsou chráněné před manganistany, chlornany, peroxidem vodíku, což jsou také důležité složky hostitelské imunitní reakce. Melaniny jsou schopné vyvazovat těžké kovy, a tvořit bariéru proti některým antimykotikům, která jsou založena na toxicitě kovů (např. dusičnan stříbrný). Pro patogenitu u člověka je velmi důležitá vlastnost

schopnost růstu při 37 °C. (Langfelder et al. 2003, Plonka and Grabacka 2006, Revenkar 2007).

Melanin byl považován za obecný determinant virulence. Avšak tento přístup nelze vztáhnout na všechny houby obecně. Ztráta melanizace automaticky neznamená ztrátu virulence (Langfelder, Streibel et al. 2003). Tsai et al. (1999) u *Aspergillus fumigatus* ukázali, že sice DHN melanin je důležitá ochrana před oxidativním vzplanutím a hydrolytickými enzymy, ale není to jediný a rozhodující faktor virulence. U kmenů s mutací v genu pro PKS se virulence se snižuje a patogen je náchylný k usmrcení H₂O₂, chlornany a k poškození makrofágy. Ale u nemelanizovaných mutantů s mutací v genu pro katalyzátory 2. nebo 4.

kroku syntézy (viz obr. 1) se virulence nesnižuje. PKS se pravděpodobně zapojuje i do dalších syntéz vedlejších produktů a meziproductů, které jsou schopny dostatečně inhibovat imunitní reakce hostitele a virulence kmenu není ovlivněna. Ukazuje se, že samotná PKS se významně podílí na



obr. 3 schéma melanizované buněčné stěny *C. neoformans*, kde tvoří fyzickou bariéru mezi vnějším okolím a plazmatickou membránou (Nosanchuk 2003)

virulenci. Tato možnost byla zkoumána u *E. dermatitidis* a ukázalo se, že meziproducty syntézy DHN melaninu imunitní systém hostitele neovlivňují. Pro *Exophiala* je DHN melanin jediným důležitým faktorem virulence (Langfelder, Streibel et al. 2003).

4 Taxonomie

Oportunně patogenní melanizované houby jsou heterogenní skupina půdních hub v rámci oddělení Ascomycota s celosvětovým rozšířením (zejména řady Pleosporales, Ochroconiales, Chaetothyriales). Vyskytují se jako vláknité houby i jako kvasinky. Rozmnožují se především asexuálně, pučením a dělením, u některých druhů jsou známá i pohlavní stádia. Mají charakteristické tmavé zbarvení hyf a spor, což je důsledek přítomnosti melaninu v buněčné stěně. Melanizované houby způsobují celou škálu infekcí u rostlin i živočichů, převážně

studenokrevných, a způsobují povrchové i systémové (Ajello 1978, Revankar 2007, Seyedmousavi 2013).

Význam těchto hub jako patogenů v posledních letech roste. Černé kvasinky byly poprvé rozpoznány jako původci chorob již v 70. letech, kdy se do předmětu zájmu lékařů dostaly pro svůj potenciál působit infekce u člověka (Ajello 1978). Celkem je známo více než 100 klinicky významných druhů patřících do 60 rodů (Revankar 2007). Během posledních desetiletí se pozornost soustředí také na infekce u ryb, zejména v chovech, způsobené černými kvasinkami. Tyto infekce jsou známy i u obojživelníků, akvariálních zvířat (zejména líhně lososů a pstruhů) a dalších studenokrevných obratlovců a bezobratlých. U těchto živočichů pravděpodobně v rozvoji infekce hraje roli i absence pokročilých imunitních reakcí. Infekce mohou probíhat jako jednotlivé sporadické infekce u zdravých jedinců, zoonózy nebo tzv. „pseudepidemie“, kdy v důsledku společného zdroje nákazy dochází k infekci u velké hostitelské populace. K pseudoepidemiím dochází u stresovaných zvířat v důsledku např. špatného chovu, stresem ze zajetí, špatné kvality vody, traumatem (nešetrné zacházení nebo agresivita způsobená chovem velkého počtu jedinců stejného druhu). Systémové infekce také mohou být sekundárními infekcemi (superinfekcemi) spojenými s bakteriálním nebo parazitárním onemocněním. Na druhou stranu i primární mykotická infekce může být překryta sekundární bakteriální infekcí, a proto nemusí být mykóza diagnostikována (Seyedmousavi 2013). Symptomy onemocnění jsou velmi variabilní, což dále komplikuje správnou diagnostiku (Uijthof 1997).

V současné době stále neexistují jednoduché laboratorní testy pro spolehlivou identifikaci druhu. Spolehlivá identifikace druhu stále vyžaduje kultivaci patogena, využití mikroskopie a většinou i molekulární analýzy. Při histopatologii může být využito několik typů zviditelnění hyf, např. hematoxylin a eosin (H & E, je viditelná pigmentace hyf, melanizace), Fontana – Masson (pouze lehká pigmentace), PAS reakce (Periodic Acid Schiff, často dávaná přednost před H & E vzhledem k výraznějším barvám) nebo GMS (Gomori Methamine Silver). Mezi nejúčinnější látky v léčbě patří itrakonazol, vorikonazol a amfotericin B (Revankar 2007). Ve vývoji antimykotik byl v současnosti zaznamenán významný pokrok, od roku 2000 se počet antimykotik zvýšil o 30 % (Seyedmousavi 2013).

Jsou zapotřebí další studie pro lepší pochopení patogeneze a následnou optimální terapii bude možno vyvodit z úspěšných a neúspěšných klinických studií (Revankar 2007).

4.1 rod *Exophiala* (*Herpotrichiellaceae*, *Chaetothyriales*)

Exophiala je patogen patřící mezi černé kvasinky (Gjessing, Davey et al. 2011). Představuje nepohlavní stádium z řádu Chaetothyriales, typový druh rodu je *Exophiala salmonis*, pohlavní

stádium se řadí do rodu *Capronia* s typovým druhem *C. sexdecimspora* (De Hoog, Vicente et al. 2011). Většinou se šíří vodou, ale jsou známé izoláty i z půdy, sedimentů, cyst hlístic, dřeva, lidských vlasů a nehtů nebo vody (Gjessing, Davey et al. 2011). Většina druhů je mezofilní nebo psychrofilní.

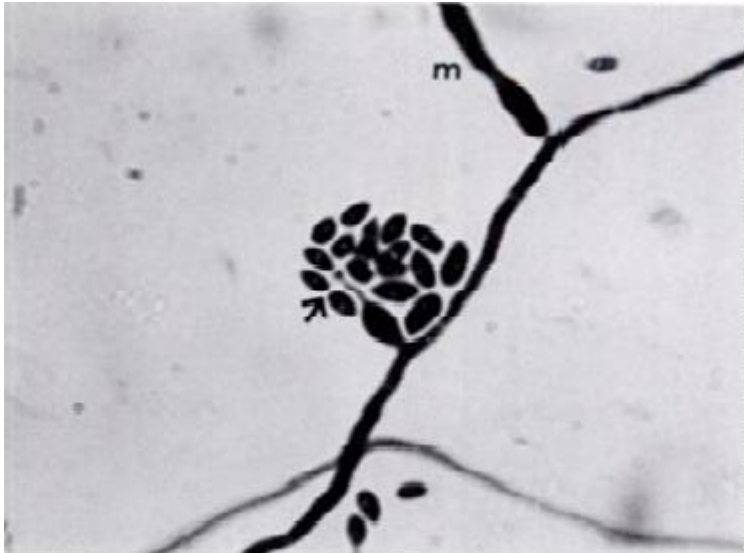
Zástupci rodu *Exophiala* působí infekce u širokého spektra teplokrevných i studenokrevných živočichů. Infekce u studenokrevných obratlovců byly popsány zejména u ryb a obojživelníků. Zřídka jsou popisovány nákazy bezobratlých živočichů. Jsou známy i oportunní infekce člověka způsobené např. *E. dermatitidis*, *E. spinifera* nebo *E. oligosperma*. *Exophiala* nenapadá plazy a ptáky, důvodem je pravděpodobně tlustá, suchá kůže bez potních žláz a suchozemský způsob života. Vzácné jsou i nákazy u srstnatých savců, kde většina infekcí je popsána právě u člověka, který má holou kůži a spoustu potních žláz (De Hoog, Vicente et al. 2011).

Exophiala je nejčastěji hlášený agens systémových mykóz v akvakulturách a rybolovném průmyslu, kde způsobuje masivní úhyny. Jsou hlášeny případy z USA, Austrálie, Skandinávie, Velké Británie i ČR. Druhová identifikace podle morfologie není spolehlivá kvůli vysoké vnitrodruhové variabilitě a překrývajícím se znakům. Proto je pro spolehlivou identifikaci doporučeno používat molekulárně genetické metody (De Hoog, Vicente et al. 2011).

4.1.1 *Exophiala salmonis*

E. salmonis je charakteristická tím, že téměř netvoří kvasinkové buňky, optimální teplota pro růst je mezi 18 a 24 °C, při 37 °C neroste. V minulosti byly často hlášeny nákazy přisuzované *E. salmonis*, ale jen málo případů bylo potvrzeno (De Hoog, Vicente et al. 2011). Tuto houbu poprvé identifikoval a popsal Carmichael (1967) z kanadské Alaberty. Poprvé byla izolována v roce 1948 ze pstruha žlutohrdlého (*Oncorhynchus clarkii*), kdy během pěti měsíců uhynulo 40 % ryb (úhyn 320 000 z 800 000 ryb) v akvakultuře. Infikované ryby vykazovaly ztrátu rovnováhy, whirling“ (vířivé plavání) a letargii. Při pitvě byly nalezeny mycetomy v mozku. Druhá epidemie proběhla v roce 1956 také u lososa žlutohrdlého a ke třetí v listopadu 1960 u sivena obrovského (*Salvelinus namaycush*). Ve všech případech šlo o stejného patogena a stejné příznaky. Vždy byly nalezeny léze pouze v mozku.

První hlášené ohnisko infekce *E. salmonis* u lososa obecného (*Salmo salar*) proběhlo



obr. 4 *Exophiala salmonis* (Otis et al. 1985)

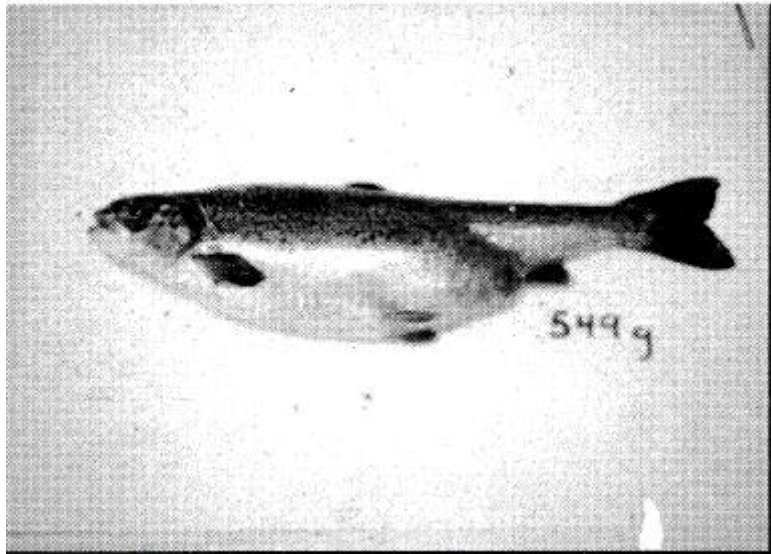
na pobřežní farmě ve Skotsku v roce 1976. Infekce proběhla při přechodu ryb (o váhovém průměru 55 g) z líhni do mořských klecí, klece byly zásobovány po 1000 kusech. Infekcí byla zasažena pouze jedna klec, ostatní klece nebyly ovlivněny. Na začátku října 1976 bylo nalezeno 250 g ryb s otokem břicha, který jak se po pitvě

prokázalo byl způsoben rozšířením ledvin. Následně bylo nalezeno 24 mrtvých ryb s podobnými symptomy. Při podrobné prohlídce klece bylo pozorováno velké množství živých ryb s otoky břicha a problémy s plaváním. Postižené ryby byly usmrceny a odvezeny k laboratornímu vyšetření. Po odvezení infikovaných ryb se chov stabilizoval a nedošlo k žádným úmrtím spojeného s infekcí. Při pitvě se prokázaly hlavně tvorby granulomů, 75 % granulomů v ledvinových, a lézí v játrech, slezině, srdci, slinivce a svalu. Jejich velikost byla ovlivněna množstvím hyf v tkáni. U všech ryb byly ledviny postiženy uzlinami. Okolo hyf se nacházely převážně makrofágy, v menší míře neutrofily a lymfocyty. Často byla pozorována tvorba nových cév. V srdci proběhlo velké množství patologických změn, tvorba granulomů v epikardu a komoře kde probíhala masivní reakce makrofágů a neutrofilů. Mozek, plynový měchýř a střevo nebylo zasaženo. Klece byly ukotveny od sebe jen několik metrů, takže přenos vodou byl nepravděpodobný, a tudíž se infekce dostala do klece pravděpodobně skrze kontaminované pelety. Náhodou byla tato klec krmena pouze z jednoho pytle. V tomto pytli byl detekován houbový materiál. Úmrtnost dosáhla 10 % (Richards, Holliman et al. 1978).

Otis et al. (1985) publikoval první případ *E. salmonis* u lososa obecného (*Salmo salar*) v USA. Testované ryby pocházely z umělé líhne a byly chovány v akvakultuře. Při pitvě vykazovaly ryby mnoho příznaků nákazy – zarudnutí povrchu jater, krvácení do vnitřních orgánů, kachexie (fyzická slabost, ztráta hmotnosti a svalové hmoty v důsledku nemoci), vředy a krvácení mezi prsními ploutvemi, narušení střevní sliznice, abscesy v ledvinách. V tomto případě houba byla pravděpodobně zanesena do chovného systému s kamennou solí používanou k udržení salinity akvakultur. Kamenná sůl byla skladovaná ve venkovním prostředí v kontaktu s půdou, ze které byla *Exophiala* izolovaná.

4.1.2 *Exophiala psychrophila*

Tato houba tvoří jak kvasinkové, tak i vláknité kolonie, konidie vznikají pučením kvasinkových buněk, ale jsou produkovány i redukovanými konidiofory. Nejlépe roste při teplotách 17 – 21°C, maximálně při 23 °C (De Hoog, Vicente et al. 2011). Poprvé byl tento druh izolován ze strdlic lososa obecného na farmách v západním Norsku (Pedersen and Langvad 1989). Zatím neexistuje žádná účinná léčba, běžné fungicidy (např.



obr. 5 břišní otok lososa obecného způsobený *Exophiala* spp. (Langvad and Engjom 1991)

malachitová zeleň) fungují jen při velmi vysokých dávkách.

Klinické příznaky popsané na nakažených lososech obecných z USA zahrnovaly ataxii, „whirling“, Exoftalmus (vystoupení oka z očnice), vředy rohovky nebo břišní otoky (obr. 5). Při pitvě byly nalezeny granulomy v ledvinách, slezině, játrech, srdci, břišní a oční dutině. U dospělců byly hyfy prokázány také ve svalovině. Největší úhyny ryb byly popisovány při přechodu strdlic z řek do moře (Langvad and Engjom 1991).

4.1.3 *Exophiala aquamarina*

Tento druh produkuje kvasinkové buňky velmi zřídka, hyfy jsou spirálovitě zkroucené, optimální teplota pro růst je mezi 24–30 °C, maximum 33–36 °C, neroste při 37 °C. Název je odvozen od mořského způsobu života hostitelů. Tento druh je jako patogen prozatím omezen na ryby, ale nemá specifického hostitele (De Hoog, Vicente et al. 2011).

V akváriích v Bostonu a Camdenu (USA) způsobila *E. aquamarina* 5 let trvající



obr. 6 *Exophiala aquamarina*, konidie (de Hoog 2011)

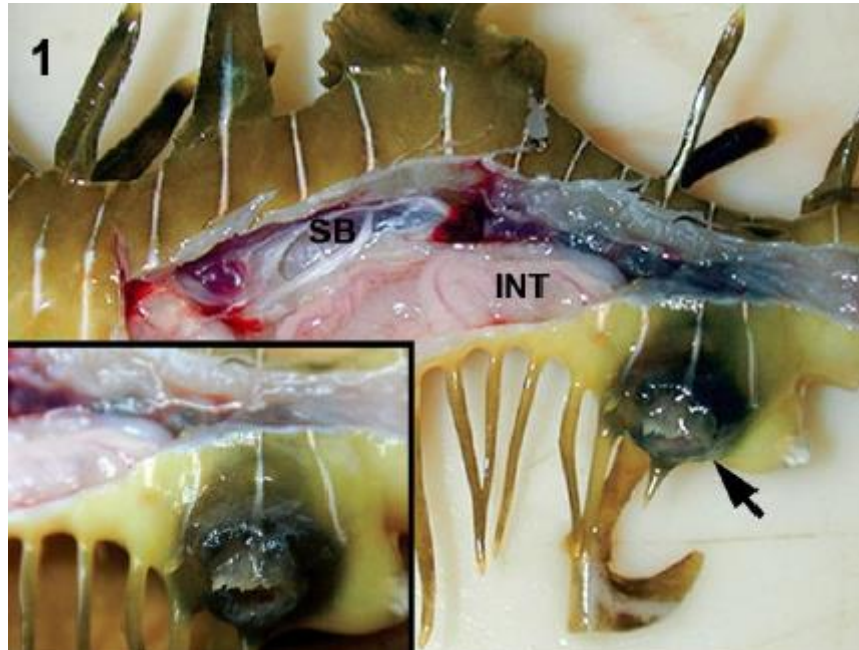
opakované infekce tuňáka malého (*Euthynnus alletteratus*), platýse amerického (*Pseudopleuronectes americanus*) a dvou druhů mořských koníků, řasovníka rozedraného (*Phycodurus eques*) (obr. 7) a řasovníka protáhlého (*Phyllopteryx taeniolatus*). Všechny ryby vykazovaly stejnou patologii, a sice nekrotické kožní

léze s invazí do cév, infekce lebečních a jiných kostí, ale bez zasažení mozku (Nyaoke, Weber et al. 2009).

4.1.4 *Exophiala pisciphila*

Exophiala pisciphila netvoří kvasinkové buňky, její optimální růst je při 24 až 30 °C, neroste při 37°C (De Hoog, Vicente et al. 2011). Houba napadá hostitele ze slaných i sladkých vod a lze ji snadno zaměnit s *E. salmonis* nebo druhy rodu *Phialophora* (Langdon and McDonald 1987).

V roce 1969 byla popsána infekce sumečka tečkovaného (*Ictalurus punctatus*) organismem velmi podobným *E. salmonis*. V dubnu 1969 si majitel soukromé nádrže všiml kožních lézí u ryb. Na přezkoumání



obr. 7 kožní léze řasovníka rozedraného způsobené *E. aquamarina*, SB=plynový měchýř, INT= střevo (Nyaoke 2009)

bylo vzato 5 ryb o váze 800–1000 g. Majitel nádrže byl vyzván k usmrcení populace a dezinfekce nádrže. U 4 z 5 ryb byly nalezeny vředy o velikosti 2–15 mm a hloubce až 5 mm, na okraji vředů byla exponována svalová tkáň. Zánět nebyl nalezen. Při pitvě se ve vnitřních orgánech



obr. 8 *Exophiala pisciphila* (McGinnis and Ajello, 1974)

objevily uzlíky různých velikostí a masivní srůsty orgánů. U ryby bez vnějších vředů nebyly vnitřní patologické změny tak rozsáhlé – uzlíky v ledvinách, játrech, stěně střeva a tukové tkáni, v játrech se našly malé srůsty. Z jater byly kultivovány aeromonády a enterobakterie. Patogenita byla zpětně testována na 3 druzích: sumeček tečkovaný, sumeček namodralý (*Ameiurus catus*) a slunečnice velkoploutvá (*Lepomis macrochirus*). Suspenze byla injikována do 5 ryb od každého druhu a ryby byly chovány při teplotě 18 °C. První sumečci uhynuli po 13 dnech a první slunečnice po 19 dnech. Do měsíce uhynuly všechny ryby. Při pitvě se u všech prokázal zánět pobřišnice a

abscesy ve vnitřních orgánech, u některých byla perforována břišní stěna a zanícený řitní otvor (Fijan 1969). McGinnis and Ajello (1974) izolát přehodnotili a identifikovali patogena jako *E. pisciphilus* (syn. *E. pisciphila*).

V Austrálii bylo během 5 - ti měsíců objeveno 15 případů mykózy v experimentální populaci (85 ks) 1letého lososa obecného (*Salmo salar*). Lososi pocházeli z karanténní líhně, jikry byly ošetřeny jódem. 5 ryb bylo nalezených již mrtvých, 10 umírajících bylo utraceno. Mezi klinické příznaky patřil útlum ryb, ztmavnutí, v některých případech plavání ve spirále a „whirling“. Prvotní vyšetření ukázalo píštěle (jakékoliv nepřirozené kanálkovité propojení mezi orgány, cévami, nebo i ven na kůži, obecně od epitelové tkáně opět k epitelové tkáni) o průměru 1 mm na kaudo-laterální straně hlavy, v okolí píštěl prohlubně podobné velikosti, v některých případech byl objeven exophthalmus a eroze skřelí. Jiné makroskopické příznaky nebyly nalezeny. Pitva ukázala, že lebeční chrupavka byla nekrotická a obklopena červeno-hnědým gelovým materiálem, píštěle zasahují hluboko do pojivové tkáně mozku a invazi polokružných chodeb, což by vysvětlovalo „whirling“. Žádný patogen nebyl izolován z ledvin, jater nebo sleziny. Při kultivaci byla objevena přítomnost oportunistických bakterií, m. j. *Klebsiella oxytoca* a *Serratia fonticola*. Patogen byl identifikován jako *E. pisciphila*, tj. onemocnění s nízkou nemocností a výskytem, ale vysokou mortalitou. K invazi a rozšíření infekce pravděpodobně došlo skrze kanály a sensorické póry postranní čáry. Patogen nebyl izolován z potravy a do chovu se pravděpodobně dostal se zásobovací vodou (Langdon and McDonald 1987).

Tento druh byl popsán jako průvodce infekce sumečka tečkovaného (*Ictalurus punctatus*) v soukromém jezírku v Alabamě (USA). Ryby měly kožní vředy o průměru 2–5 mm zasahující do hloubky až 5 mm. Byly nalezeny uzliny na vnitřnostech, hematogenní šíření může vést k zánětům pobřišnice a hnisavým vředům. Při laboratorně indukované infekci ryby hynou do 13 dnů po inokulaci (De Hoog, Vicente et al. 2011).

Tato houba byla původně označena jako původce onemocnění žraloka *Mustelus canis* a platýsa velkého (*Pleuronectes platessa*) v akváriu v New Yorku, které se projevovalo kožními lézemi (Gaskins and Cheung 1986). Později byla publikována jako možná nákaza *Hormoconis resinae*, ale v roce 2009 byla *Exophiala pisciphila* potvrzena (De Hoog, Vicente et al. 2011).

V Austrálii byla *E. pisciphila* zjištěna u mladých lososů obecných (*Salmo salar*). Příznaky byly zjevné už před pitvou a zahrnovaly „whirling“, exophthalmus, píštěle na hlavě a rozpad skřelí. Při pitvě bylo nalezeno značné poškození mozku: píštěle zasáhly hluboké pojivové tkáně mozku, byla narušená lebeční chrupavka, která byla obklopená tmavě červeno

– hnědým gelovým materiálem. Podobný materiál byl nalezen v oblasti exoftalmu. Hlavové léze zasáhly hlavové kanály postranní čáry, někdy byly rozšířeny až do mozku a polokružných chodeb. Invazí v polokružných chodbách se vysvětluje „whirling“. Patogen nebyl izolován z ledvin, jater ani sleziny. Převládajícím typem buněk v infekčních ložiscích byly makrofágy. Infekce *E. salmonis* mozek nezasahuje, ale při napadení *E. pisciphila* se jeví mozek jako primární místo infekce. Není znám původ této infekce v Austrálii, kde lososi pocházeli z umělé líhně a vylíhli se v karanténě z jódem ošetřených jiker. Je možné, že se houba do ryb dostala s potravou, ale nebyla z potravy kultivována. Další možností nákazy je skrze zásobovací vodu (Langdon and McDonald 1987).

4.1.5 *Exophiala angulospora*

Tato houba potřebuje pro svůj optimální růst teplotu mezi 24 a 27 °C. Poprvé byla izolována z chladné, na živiny chudé pitné vody. U tohoto druhu je známé i pohlavní stádium, *Capronia coronata*, vyskytující se na dřevě. Izoláty pocházejí ze sladké i slané vody (De Hoog, Vicente et al. 2011).

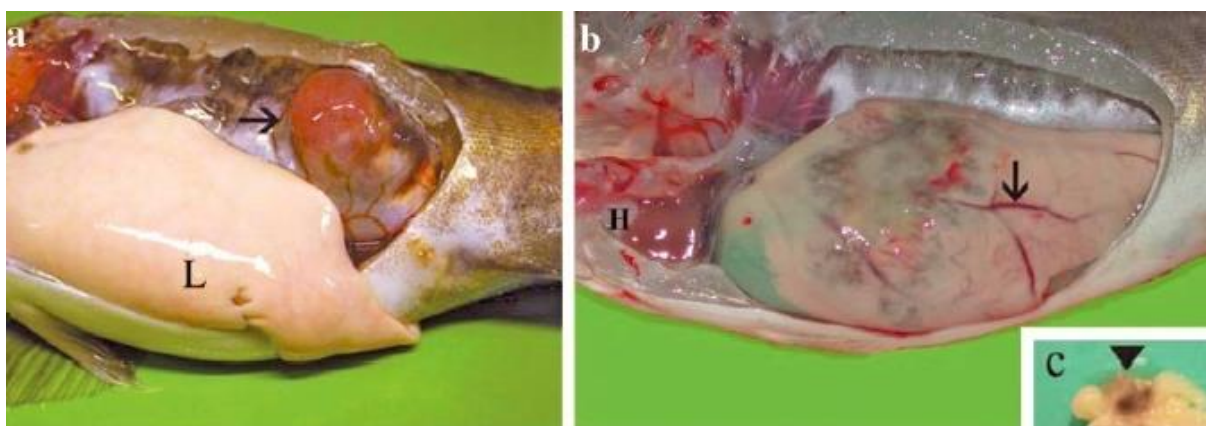


obr. 9 *Exophiala angulospora* (Kanchan 2014)

V Norsku byly zkoumány napadené tresky obecné (*Gadus morhua*), chované ve vnitřních nádržích. Nakažené ryby vykazovaly příznaky jako “whirling” a tmavé zabarvení kůže na ocasu (ostře ohraničené skvrny).

Po 8 měsících po nasazení infikovaných ryb do umělé nádrže 50 % ryb vykazovalo příznaky. Na ledvinách, játrech a slezině se objevují ložiska o velikostech až 2 cm. Ložiska neměla ostrý okraj. U ryb s vykazujících “whirling” byla nalezena malá našedlá oblast ve středním mozku, kde se nachází zrakové centrum. Na obrázku 10 je patrný rozdíl ve vnitřní patologii v rámci populace zasažené jednou infekcí. Testovali, zda se *E. angulospora* nedostala do akvárií s potravou nebo vodou. Tyto testy vyšly negativně, *Exophiala* kultivována nebyla. Ve vzorcích krmiva převládaly rody *Penicillium* a *Cladosporium*. Jejich přítomnost ve vodě v kombinaci se stresem z uzavřeného prostoru zřejmě přispěla k oportunní infekci způsobené *E.*

angulospora, přesný zdroj infekce ale zůstal neobjasněný (Gjessing, Davey et al. 2011).



obr. 10 *E. angulospora* u tresky obecné, a) zvětšená kaudální část ledviny, b) nazelenalá a překrvená játra, c) naředlé ohnisko zrakového centra ve středním mozku, L=játra, H=srdce (Gjessing et al. 2011)

Exophiala angulospora u platýse *Paralichthys olivaceus* (není český název) je první případ této infekce u chovaných mořských ryb v Japonsku. Infekce byla zaznamenána v květnu 2005 na rybí farmě v prefektuře Ehime. Ryby měly podobné příznaky, jako popsali Fijan (1969), Blazer (1978), Otis et al. (1985), a to otok břicha a distenze (roztážení) ledvin. Mikroskopické vyšetření odhalily přítomnost hyf a bílé uzliny v tkáni ledvin. Experimentální infekce proběhla na 90 zdravých *Paralichthys olivaceus* rozdělených do tří skupin, první skupina s vysokým obsahem konidií v inokulu (1×10^6 konidií/ml), druhá skupina s nízkým obsahem konidií v inokulu (1×10^4 konidií/ml) a třetí kontrolní skupina. V první skupině byl počet infikovaných ryb 61,5 % a úmrtnost dosahovala 6,7 %, při pitvě se ukázaly léze v ledvinách, játrech a slezině. Ve druhé skupině byl počet infikovaných ryb 46,4 %, úmrtnost 3,3 %, při pitvě nebyly léze tak rozsáhlé jako u první skupiny. První úhyn zaznamenán 28 dní po podání inokula. *E. angulospora* byla potvrzena molekulární analýzou rRNA (Kanchan, Muraosa et al. 2014).

4.1.6 *Exophiala jeanselmei*

Dříve řazena do rodu *Phialophora* (McGinnis and Padhye 1977). *E. jeanselmei* je saprofytická houba celosvětového rozšíření, je častý laboratorní kontaminant. Dle okolního prostředí je schopná tvořit dvě formy: eumykotické černé granule, při traumatickém vstupu do těla hostitele (např. píchnutí trnem), nebo dematiaceousní mycelium, při vdechnutí a pomalý růst v plicích a dalších vnitřních orgánech. Granulová forma byl řazena do druhu *Phialophora jeanselmei*, myceliární forma identifikována jako *Phialophora gougerotii* nebo *Sporotrichum gougerotii* (Ajello 1978).

Alderman and Feist (1985) publikovali zprávu o infekci pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Během rutinního vyšetření bylo kontrolováno 100 zotavujících se ryb

po infekci ledvin způsobené prvokem (není publikováno, o jakého prvoka se jedná). Na ledvinách se našly bílé léze způsobené hyfami, hyfy nebyly nalezeny v žádných jiných orgánech.

4.1.7 *Exophiala xenobiotica*

Často se vyskytuje na stanovištích bohatých na monoaromatické uhlovodíky a alkany (Munchan, Kurata et al. 2009).

Munchan (2009) popisuje první infekci této houby u mořských ryb, která proběhla v dubnu 2005 v Japonsku u chovaných kranasů zubatých (*Pseudocaranx dentex*). Infekce proběhla v populaci čítající 35 000 ryb a během 1 měsíce uhynulo denně 100 ryb, mortalita dosahovala 8,6 %. Infekce se objevila po vyšetření 5 náhodných uhynulých ryb. Mezi klinické příznaky patřil otok břicha a zvětšení ledvin. Při histopatologickém vyšetření byly objeveny na žábrech, v srdci a ledvinách léze. Houbové hyfy byly doprovázeny nekrózou tkání a byl zvýšený podíl zánětlivých buněk. *E. xenobiotica* byla určena na základě 2 lokusů rDNA. Není znám zdroj infekce, avšak přítomnost hyf v žábrech ukazuje na vstup infekční fáze skrze žábry do oběhového systému.

4.2 rod *Cephalotheca* (*Cephalothecaceae*, *Sordariales*)

Většina infekcí na rybách je způsobena houbami z řádu Chaetothyriales, např. *Exophiala*, *Phialophora* nebo *Bradomyces* a řádu Venturiales, např. *Ochroconis*. V nedávné době publikovaná studie (Řehulka, Kubátová et al. 2016) rozšiřuje seznam mykóz lososovitých i o tento rod z řádu Sordariales.

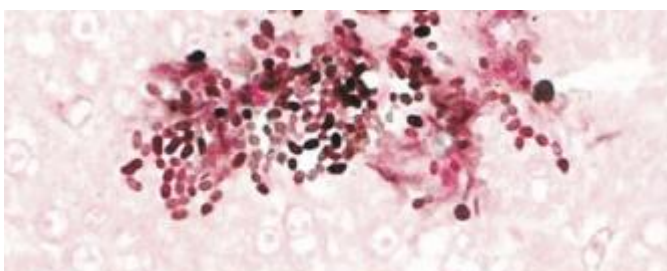
4.2.1 *Cephalotheca sulfurea*

Tato houba se přirozeně vyskytuje na tlejícím dřevě.

První infekce této houby u živočichů byla u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) z povodí Odry v České republice. Nákaza byla zjištěna při rutinní preventivní prohlídce chovu a vyskytla se u jednoho z deseti pstruhů podrobených pitvě, která prokázala překrvené oblasti v játrech (obr. 11) a četná ložiska hyf bez doprovodných zánětlivých reakcí (obr. 12). To znamená buď infekci v počátečním stádiu, nebo schopnost houby potlačit imunitní reakci (Řehulka, Kubátová et al. 2016).



obr. 11 překrvená oblast jater pstruha duhového způsobená *Cephalotheca sulfurea* (Řehulka 2016)



obr. 12 histopatologický řez jater v ložisku nákazy *Cephalotheca sulfurea* (GMS) (Řehulka 2016)

4.3 rod *Bradomyces* (*Trichomeriaceae*, *Chaetothyriales*)

Bradomyces je nedávno zavedený rod se dvěma druhy. *B. alpinus* byl popsán z povrchu kamene v italských Alpách 3

200 m. n. m, *B. oncorhynchi* byl izolován ze pstruha duhového. Tyto houby nejsou schopné růst při teplotě 28 °C (Hubka, Réblová et al. 2014).

4.3.1 *Bradomyces oncorhynchi*

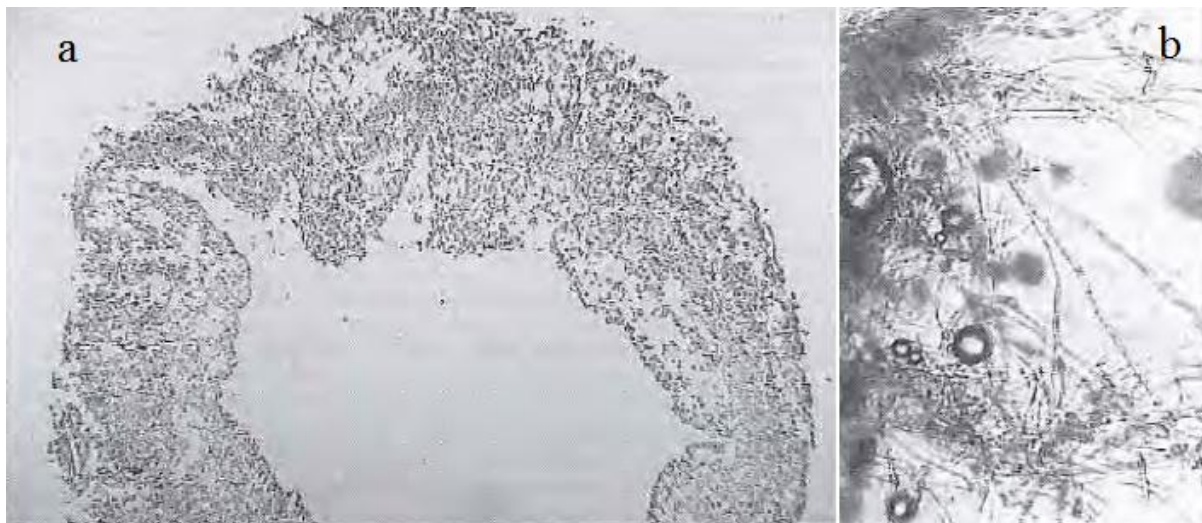
Tato houba byla izolována pouze jednou, a to z infekčního ložiska v blízkosti sleziny pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) v Kružberku v České republice. Je předběžně dokázáno, že tato houba může způsobit akutní i chronické infekce pstruha (Hubka, Réblová et al. 2014).

4.4 rod *Phoma* (*Didymellaceae*, *Pleosporales*)

Phoma je široce rozšířený rod. Nejčastěji se vyskytuje jako saprotrof v půdě, má vysokou ekologickou plasticitu a jsou známy výskyty ze vzduchu, vody, obdělávané půdy po celém světě. Patří sem někteří patogeny rostlin, např. vinné révy, rajčat, brambor nebo jabloní. Po Evropě se rychle šíří, např. *P. glomerata* skrze invazního raka červeného (*Procambarus clarkii*). *P. glomerata* není schopná růst při teplotě 37 °C (Dörr, Rodolfi et al. 2011).

V roce 1983 proběhla v japonské prefektuře Tokušima u aju východního (*Plecoglossus altivelis*) nákaza patogenem podobný *P. herbarum*, kdy během 3 měsíců uhynulo 200 000 z 300 000 ryb. Při pitvě byly hyfy nalezeny v plynovém měchýři, ledvinách, střevech, játrech, slinivce, a v tkáni obklopující boční svalstvo. Plynový měchýř byl nejvíce postižen, byla nalezena nekrotizovaná tkáň a buňky odlupující se z vnitřní stěny měchýře a odtud se hyfy rozšířily po těle (Hatai, Fujimaki et al. 1986).

Pravděpodobně rodem *Phoma* se nakazily mladé ryby (5 – 6 cm) lososa obecného (*Salmo salar*) v Severním Porýní – Vestfálsku (Německo). Ryby vykazovaly závažné



obr. 13 plynový měchýř lososa obecného napadený *Phoma* spp., a) histologický řez plynového měchýře, viditelná ztlustlá stěna, b) živý preparát hyf z plynového měchýře (Lehmann et al. 1999)

příznaky, avšak úmrtnost byla velmi malá v rámci populace. Jediným příznakem byla patologická změna plynového měchýře, z jehož stěny byla houba izolována. Lumen plynového měchýře byl plný bělavé hmoty a jeho stěna byla ztlustlá (obr. 13). Houba nebyla pozorována v jiných orgánech. Morfologické znaky hyf a konídií ukazovaly na infekci *Paecilomyces farinosus*, ale na základě klinického obrazu onemocnění a nízká úmrtnost populace se Lehmann et al. (1999) přiklonili k rodu *Phoma*.

4.4.1 *Phoma herbarum*

Přestože je *P. herbarum* je známá především jako rostlinný patogen, ojediněle byly popsány i mykózy u zvířat i lidí (Faisal, Elsayed et al. 2007).

V 10 národních líhních v Oregonu a Washingtonu (USA) byly infikovány *P.*



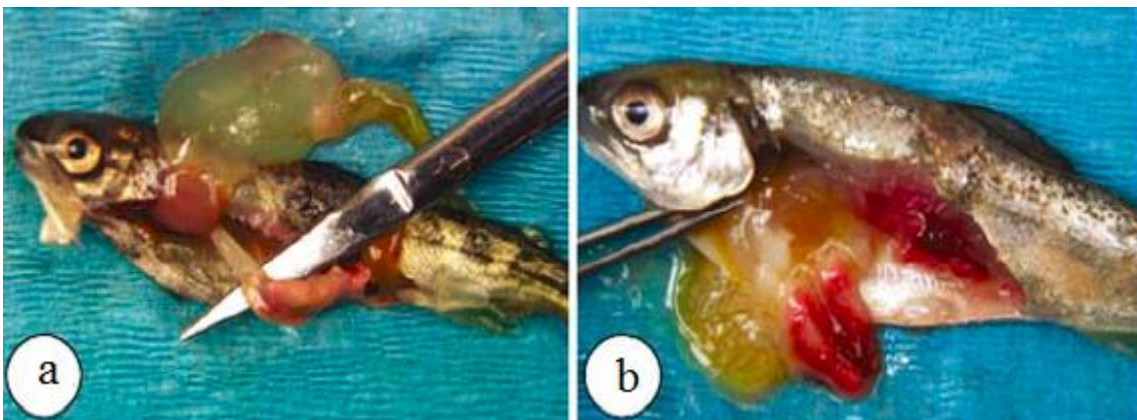
obr. 14 *Phoma herbarum* (Faisal et al. 2007)

herbarum plůdky lososa kisuč (*Oncorhynchus kisutch*) (líhně Eagle Creek, Quilcene, Quinault a Willard), lososa čavyča (*Oncorhynchus tshawytscha*) (líhně Eagle Creek, Quinault, Willard, Big White Rearing Ponds, Little White Salmon, Spring Creek, Abernathy Washington a Carson) a pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (líheň Entiat). Plavání na boku nebo ve svislé poloze, ocasem dolů, patří mezi prvotní

příznaky infekce. Při pitvě byla nalezena degenerovaná a nekrotická tkáň plynového měchýře, ledvin, žaludeční stěny a pohlavních žláz. V příčně pruhovaném svalstvu byly viděny

hyperemické (překrvené) oblasti, hyfy byly přítomny také v hřbetní aortě. Nejvíce byl postižen plynový měchýř, ale nebylo prokázáno, zda je to primární místo infekce. V postižených tkáních byly přítomny zánětlivé buňky, složené především z lymfocytů a makrofágů, infekce má spíše chronickou povahu. V líhni Carson dosahovala úmrtnost 0,5 %, v Little White Salmon 2,6 %, pro další líhne nejsou čísla k dispozici. Zdroj infekce není znám. Experimentální infekce probíhala ve dvou fázích. První fáze znamenala krmení 24 lososů čavyča granulami ve směsi se suspenzí konidií, infekce propukla jen u jedné ryby (výskyt infekce 0,5 %), tato ryba uhynula 18 dní od prvního krmení. Cílem druhé fáze bylo dostat konidie přímo do plynového měchýře, kde je předpoklad vzniku infekce. 100 ryb bylo umístěno do nádrže s čerstvou vodou, ryby byly nuceny se vracet k hladině pro vzduch, ten byl obohacen konidiami. Celkově byly infikovány 4 ryby (výskyt infekce 4 %). Všechny uhynulé ryby měly záněty a otoky v anální oblasti, pouze jedna měla infikovaný plynový měchýř. Takto nízký výskyt experimentálních infekcí prokazuje, že je nemoc jen slabě nakažlivá (Ross, Yasutake et al. 1975).

V oblasti Velkých jezer je rybolov závislý na dodávky ryb z líhni. Mezi úspěšně introdukované ryby patří losos čavyča (*Oncorhynchus tshawytscha*), např. v Michiganu (USA) je ročně do jezer vypuštěno přes milion strdlíc. V březnu 2003 a únoru 2005 byly hlášeny masivní úhyny lososů čavyča v kanále Wolf Lake State Fish Hatchery (Michigan). K úhynům docházelo dva týdny od třídění pstruhů dle velikosti, což je silná stresová situace. Ryby byly 70 dní staré a nejmasivnější úhyny byly zhruba za 2 měsíce od pozorovaných zvýšených úhynů. Postižené ryby byly letargické, plavaly na boku nebo v semivertikální



obr. 15 losos čavyča infikovaný *Phoma herbarum*, a) plynový měchýř naplněný bílou kaseózní hmotou, b) zánět šířící se z plynového měchýře do okolních orgánů a svalstva (Faisal et al. 2007)

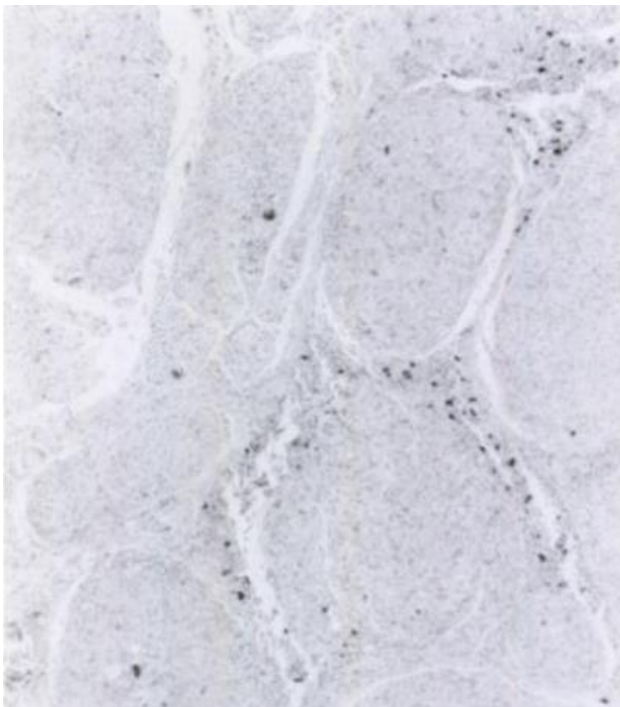
poloze, smrt nastala velmi rychle. Při pitvě byly nalezeny známky zánětu v plynovém měchýři a trávicím traktu. Plynový měchýř byl naplněný bílou kaseózní (=sýrovitou) hmotou, byly pozorovány srůsty plynového měchýře a trávicí trubice a krvácení v oblasti ledvin.

V pokročilých případech se hyfy našly ve stěně aorty, střev a někdy zasahovaly do sousední

svaloviny. Primárním místem infekce byl plynový měchýř, kde byly nalezeny záněty i u méně zasažených ryb. Do měchýře se patogen dostal přes gastrointestinální trakt. Příčinou úmrtí byla pravděpodobně selhání ledvin a dalších orgánů. V těchto případech se infekce týkala pouze jednoho druhu, přestože v líhni se vyskytovala i jiná lososovitá ryba (Faisal, Elsayed et al. 2007).

4.5 rod *Ochroconis* (Sympoventuriaceae, Venturiales)

Rod *Ochroconis* byl původně popsán jako rod *Scolecobasidium*, s typovým druhem *S. terreum* (Abbott 1927), později byla provedena nová analýza a byl zaveden nový druh *Ochroconis* (De Hoog and von Arx 1973). Je častým patogenem studeno i teplokrevných živočichů. Příležitostně napadá ryby, želvy, savce i ptáky. Jsou známy i případy napadení člověka, nejčastěji postiženými orgány jsou plíce a mozek, k infekci dochází např. u imunosuprimovaných pacientů po transplantaci, pacientů s leukémií, diabetes melitus a autoimunitními onemocněními. Druhy morfologicky podobné *O. humicola* byly izolovány z vlhkých stanovišť v domácnostech, např. z koupelen. Některé druhy jsou termofilní a byly izolovány z horkých pramenů nebo teplé odpadní vody z jaderné elektrárny (Samerpitak, Van der Linde et al. 2014).



obr. 16 řez ledvinou lososa masu infikovaného rodem *Ochroconis* s viditelnými granulomy (Hatai and Kubota 1989)

V roce 1984 byla v Japonsku zaznamenána mykóza u kultivovaných lososů masu (*Oncorhynchus masou*). Onemocnění ryb se projevovalo jako chronické a vyskytovalo se zejména u 2letých ryb, uhynulo přibližně 2000 z 5000 ryb. Nakažené ryby vykazovaly příznaky jako zčervenání anální oblasti, otok břicha v důsledku nahromadění volné tekutiny v břišní dutině a rozsáhlý otok ledvin. Při histologickém vyšetření byly nalezeny hyfy v ledvinách, ojediněle ve slezině a játrech. Izolát patogena vykazoval blízkou podobnost s *Ochroconis tshawytscha*, ale

lišil se v některých biologických vlastnostech, a proto byl považován za nový druh. Další informace nebyly publikovány (Hatai and Kubota 1989).

4.5.1 *Ochroconis humicola*

O. humicola roste v rozmezí 15–30 °C, s optimem 25–30 °C. Tento druh napadá studenokrevné obratlovce i člověka, jsou známy případy kožních mykóz, včetně onychomykóz. Další izoláty pochází z rašeliny, opadaných listů, mravenišť nebo koupelen (Samerpitak, Van der Linde et al. 2014), časté jsou nálezy z půd bohatých na organické látky (Ajello, McGinnis et al. 1977). První infekce u ryb byla zaznamenána z ledvin juvenilních lososů kisuč (*Oncorhynchus kisutch*) v Seattlu (USA). Experimentální infekce byla prokázána krmením peletami obsahující *O. humicola* (Ross and Yasutake 1973).



obr. 17 *Ochroconis humicola*, B) kolonie na MEA, J) hyfy s konidii (Samerpitak 2014)

Mezi lety 1969–1973 byly v Tennessee (USA) opakované epidemie *O. humicola* u 1letých pstruhů duhových (*Oncorhynchus mykiss*). Je to první případ této infekce u pstruha duhového. 1. nákaza se objevila v září 1969, s vrcholem úmrtnosti v říjnu a listopadu 1969. Jako prvotní symptomy se objevily povrchové léze, puchýře, abscesy na kůži a anémie žaber. Během pitvy se ukázaly malé až středně velké krvácivé vředy po celém těle, hemoragická játra a slezina, ledviny byly oteklé, obalené krvavou tekutinou a obsahovaly masivní zánětlivé léze. Bylo prokázáno krvácení do dutiny střeva a žaludku. Byla pozorována granulomatózní reakce charakterizovaná infiltrací lymfocytů a mononukleárních buněk. Při experimentální infekci byli pstruzi naočkováni suspenzí, k napadení tkání došlo během 3 dnů. Napadené ryby vykazovaly abnormality v podobě např. bizarního plavání. Smrt nastala během 7–10 dnů od naočkování. Znovu infikované ryby vykazovaly stejné symptomy a histopatologii jako přirozeně infikované ryby. Na konci roku 1973 byl použit nový zdroj vody pro líheň, poté už nedocházelo k žádným novým infekcím. Původní zdroj vody byl infikován průsaky ze septiku (Ajello, McGinnis et al. 1977).

Schaumann and Priebe (1994) publikoval nález z rutinní kontroly veterinární a potravinové hygieny v Bremerhavenu (Německo), čerstvé a vykuchané ryby byly distribuovány z Norska. Zvenčí ryby nevykazovaly žádné příznaky. Při filetování byly objeveny černé skvrny, o průměru 5–30 mm, ve svalovině. Při podrobnějším prozkoumání byla zjištěna nekróza postižené svaloviny a svalové buňky postrádaly pruhování. Vzorek pro kultivaci byl izolován z vybledlé oblasti svaloviny. Určení patogenu bylo problematické. Bylo jasné, že se houba vyskytuje v komplexu *Ochroconis* – *Scolecobasidium* – *Dactylaria*, ale v době vzniku článku byl rod *Ochroconis* relativně nový a nebyl ještě úplně mykology jednomyslně přijat. A na základě morfologie a teploty růstu byl patogen určen jako *O. humicola*.

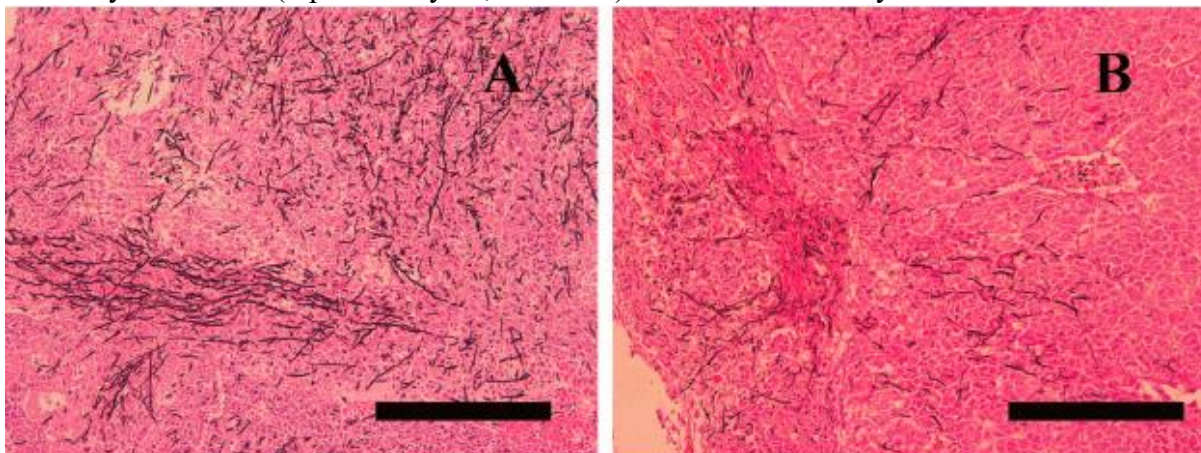
Na konci ledna 1994 v prefektuře Kagošima byla u ropušníčka japonského (*Inimicus japonicus*) první infekce *O. humicola* u mořských ryb v Japonsku. Bylo vyšetřeno 5 ryb, které vykazovaly malou chuť k jídlu. 4 z 5 vyšetřených ryb měly otevřené vředy na hřbetní části těla. Ve středu lézí se nacházela nekróza takového rozsahu, že bylo obnaženo svalstvo. Hyfy byly nalezeny i v hlubších vrstvách kosterního svalstva, vnitřní orgány nebyly zasaženy. V povrchové vrstvě lézí byly nalezeny bakteriální kolonie, neupřesněna taxonomie kolonií. *O. humicola* určena na základě morfologie teploty růstu. Během této infekce nebyl zaznamenán žádný úhyn v souvislosti s touto infekcí (Wada, Nakamura et al. 1995).

V Austrálii se objevila systémová infekce u kanice tečkovaného (*Cromileptes altivelis*), kteří byli odchyceni na korálovém útesu v Queenslandu, ale poté byli 7 měsíců drženi v umělé nádrži. Infikované ryby odmítaly potravu. Při pitvě bylo nalezeno značné poškození plynového měchýře, tkáň měchýře byla nahrazena nekrotickou granulomatózní hmotou. V játrech a slezině byly nalezeny abscesy o velikosti 5 – 10 mm a zánět pobřišnice (Bowater, Thomas et al. 2003).

V dubnu 2004 se v Japonsku na rybí farmě v prefektuře Ehime objevila infekce u mladých jedinců kranase zubatého (*Pseudocaranx dentex*). Měsíc od rozpoznání nemoci úmrtnost dosáhla až 25 % (62 500 z 250 000 chovaných ryb). Postižené ryby měly abnormální otok břicha a nafouklé ledviny. Patogen *O. humicola* byl identifikován na základě morfologických znaků. Hyfy byly nalezeny ve svalech, slezině a ledvinách. Toto byl vůbec první popsáný případ tak masivních úhynů v Japonsku (Munchan 2006).

Munchan et al. (2009) provedli experimentální infekci kranasů zubatých (*Pseudocaranx dentex*) houbou *Ochroconis humicola* (izolát NJM0472 dle Munchan 2006). Ryby o průměrné váze 13,7 g a délce 8,8 cm by rozděleny do 3 skupin po 30 kusech. Každá ryba byla injikována 0,1 ml konidiové suspenze. V první skupině suspenze obsahovala 5×10^5

konidií/ml, ve druhé skupině 5×10^3 konidií/ml, třetí skupina byla kontrolní. Skupiny byly pozorovány v nádržích (teplota vody 21,3 – 24 °C) 43 dní. Úmrtnost byla kontrolována denně



obr. 18 Histopatologie čerstvě zabitých kranasů zubatých infikovaných *Ochoconis humicola*, v inokulu 5×10^5 konidií/ml, A) pronikání hyf tkáni ledviny bez granulomatózních zánětů 14 dní po inokulaci, B) záněty ve vzorku tkáně ledviny 32 dní po inokulaci (Munchan 2009)

a uhynulé ryby byly podrobeny analýze. V první skupině byl pozorován první úhyn po 13 dnech po injokulaci a mrtvé ryby byly kontinuálně loveny 4 dny. Celková úmrtnost v této skupině dosáhla 80 %. Ve druhé skupině byl první úhyn po 23 dnech a úmrtnost 3,3 %. Do konce experimentu uhynulo 25 ryb (24 ryb z první skupiny a 1 z druhé skupiny). V kontrolní skupině nebyl zaznamenán žádný úhyn. U každé z uhynulých ryb se našly hyfy v ledvinách. Histopatologickému vyšetření byly podrobeny játra, ledviny a slezina. Na konci experimentu byly i živé ryby utraceny a byla provedena re-izolace houby z přeživších ryb. Ve první skupině bylo 40 % a ve druhé skupině 6,8 % ryb pozitivní na infekci podané *Ochoconis*. Hyfy byly nalezeny v játrech, ledvinách a slezině. Histopatologie byla shodná, jak popsal Munchan (2006) z masivních úhynů kranasů zubatých v Japonsku. Na rozdíl od uhynulých ryb měli infikované přešívší ryby natolik silné zánětlivé reakce, že dokázaly potlačit růst hyf, a to jejich zapouzdřením pomocí granulomů. Uhynulé ryby nedokázaly růst kontrolovat a hyfy a úplně je zapouzdřit a mnoho hyf pronikaly do vnitřních orgánů. Ryby hynuly v důsledku masivní houbové infekce v břišní dutině. Avšak granulom může být tak velký, že tlak vyvinutý na vnitřní orgány může způsobit poruchy jejich funkcí a může vést k multiorgánovému selhání a smrti. Tato a studie Ross and Yasutake (1973) a Ajello et al. (1977) ukazují, že intraperitoneální infekce (IP) je praktická metoda pro studium histopatologických změn u ryb způsobené houbovými infekcemi.

4.6 rod *Cladosporium* (Davidiellaceae, Capnodiales)

Schubert and Braun (2005) po přehodnocení morfologických vlastností a molekulárních dat převedli některé druhy z rodu *Heterosporidium* do 5 nových rodů – *Fusicladium*,

Parastenella, *Passalora*, *Pseudocercospora* a *Stenella*. *Cladosporium* je synonymum pro rod *Heterosporidium*.

Cladosporium spp. byl izolován z klauna uzdičkatého (*Amphiprion frenatus*) v umělé nádrži v Severní Karolíně (USA). Při pitvě uhynulých ryb byly objeveny černé léze se zánětlivými buňkami v levé části operkula (skřelové víčko), hyfy byly objeveny i v pokožce a v žábrech a léze podél lebky. Byly přítomné i gram negativní bakterie. Potlačení imunity a následná infekce může mít mnoho příčin, stres z dopravy a zadržení, chronické vystavení mědi z volného síranu měďnatého pro kontrolu ektoparazitů, nebo se do těla mohl dostat přes drobná poranění z vnitrodruhových bojů, kdy klauni jsou v nádržích vůči sobě agresivní (Silphaduang, Hatai et al. 2000).

4.6.1 *Cladosporium cladosporioides*

Cladosporium cladosporioides je půdní saprofyt s celosvětovým rozšířením, konidie se šíří vzdušným prouděním.

První případ této infekce byla zaznamenána v Austrálii u kanice tečkovaného (*Cromileptes altivelis*) chovaného v zajetí. Infikované ryby vykazovaly letargii, anorexii, abnormální držení těla, neschopnost plavat u hladiny. Při pitvě byl nalezen nafouklý plynový měchýř, ten byl naplněn granulomatózní hmotou. Jiné tkáně nebo orgány nebyly napadeny. Kanicové jsou chytáni na korálových útesech místními rybáři, následně jsou prodávány do umělých nádrží, kde se vytírají a jsou studovány. Infekce v případě *C. cladosporioides* i *O. humicola* byla do těl ryb přenesena místními rybáři pomocí nesterilizované injekční jehly, kterou propichují a naplňují plynový měchýř vzduchem, aby ryby nemohly plavat u hladiny (Bowater, Thomas et al. 2003).

4.6.2 *Cladosporium sphaerospermum*

Cladosporium sphaerospermum je považován za půdní organismus, vyskytuje se v mírném pásmu, je schopná dostat se do vodního prostředí a najít si zvířecího hostitele (Blaylock, Overstreet et al. 2001).

Blaylock (2001) publikoval současnou infekci *Cladosporium sphaerospermum* a *Penicillium corylophilum* u chňapalů červených (*Lutjanus campechanus*) chovaných v nádržích u Mexického zálivu. Ryby byly ulovené u pobřeží Horn Island, v různých časech. Infekce byla objevena při rutinní kontrole. Postižené ryby měli problémy s udržení rovnováhy u hladiny, napaden byl plynový měchýř a ledviny. Infekce pravděpodobně není systémová a je pravděpodobné, že infekce *Penicillium* a *Cladosporium* není primární, ale je zřejmé, že způsobila patologické změny tkání ryb. Infekce byla pravděpodobně způsobena

injekční stříkačkou, kterou byl propíchnut plynový měchýř, přestože vyfukování plynového měchýře má za následek vyšší hladinu nemocnosti a úmrtnosti ryb. Proto je deflace plynového měchýře doporučována jen v krajních případech a je nutné dodržovat základy sterilizace.

4.7 rod *Phialophora* (*Herpotrichiellaceae*, *Chaetothyriales*)

První infekce u ryb houbou rodu *Phialophora* byla zaznamenána v lednu 1982 v plůdku lososa obecného (*Salmo salar*) na rybí farmě ve Skotsku, kde se zvedla úmrtnost. Houbová infekce proběhla současně s bakteriální infekcí *Pseudomonas fluorescens*. Ryby klesaly ke dnu a rychle umíraly. Uhynulé ryby vykazovaly krvácení u břišních ploutví, přebytek hlenu na kůži. Některé ryby byly vyhublé a měli otoky v pánevní oblasti. Histopatologické vyšetření ukázalo zánět střeva a proniknutí hyf do lumen střeva, ledviny byly postiženy těžkou nekrózou, i když obsahovaly jen málo hyf, velké množství hyf byly nalezeny na pouzdru sleziny s občasnými ohnisky proniknutí hyf do orgánu. Plynový měchýř byl těžce infikován, konidie byly přítomny i v lumen měchýře, měchýř byl „vypuštěn“ a obsahoval bělavý mukoidní materiál, stěna byla neprůhledná. Část měchýře byla přilnuta ke stěně žaludku. Většina vnitřních orgánů byla obalena pevnou hmotou tvořenou hustými shluky mycelia. Srdce, žábry a játra nebyly zasaženy. Odezva imunitního systému byla velmi nízká, byla přítomno pouze několik málo lymfocytů a makrofágů. Houba byla určena jako rod *Phialophora*, pravděpodobně *P. malorum* nebo *P. fastigiata*. Není znám zdroj infekce. Tato infekce pravděpodobně proběhla i ve dvou dalších líhních ve Skotsku, v lednu 1980 a říjnu 1981 (Ellis, Waddell et al. 1983).

5 Závěr

Infekce melanizovanými houbami mohou být velkým problémem, protože neexistují jasná doporučení ohledně léčby. Vyskytují se převážně na severní polokouli, kde postihují hlavně lososovité ryby. Houby dovedou napadnout téměř jakýkoliv orgán v těle, včetně svaloviny a kostí, ale nezasahují do rozmnožovacích orgánů.

Ve většině případů se způsob infekce nepodaří objasnit. Do nádrží se houba pravděpodobně dostává se zásobovací vodou nebo infikovanými krmnými peletami. V dobře dokumentovaných případech je hostitel infikován požitím konidií a infekce začíná v trávicím traktu, nebo houba pronikne do těla povrchovým zraněním kůže, nebo žaber do oběhového systému. V některých případech je infekce patrná na první pohled doprovázena velkými otoky břicha, kožními lézemi nebo „whirling“. Mezi nejčastěji a nejvíce zasažené orgány patří játra, ledviny, slezina a plynový měchýř. V játrech, ledvinách a slezině se tvoří buňky imunitního

systemu, pravděpodobně proto je zde zaznamenávána nejsilnější imunitní odpověď, na které se nejvíce podílí převážně makrofágy a neutrofilů. Postižení plynového měchýře souvisí s jeho propojením s trávicí dutinou. Infekce plynového měchýře jsou nejčastěji vyvolané druhy rodu *Phoma*, který není se neprojevuje invazivně v ostatních orgánech. V postižených tkáních se tvoří granulomatózní záněty (granulomy), abscesy, léze, tkáň je často nekrotizovaná, v mozku jsou často píštěle. Do svaloviny se mohou hyfy dostat dvěma způsoby: prorůst z kožních lézí nebo se rozšířit z vnitřních orgánů. Ve svalovině se tvoří granulomy nebo je nekrotizována. Nejsou známy případy přenosu infekcí působených melanizovanými houbami mezi rybami. Pro zvládnutí infekce je důležitý celkový stav ryby. Ryby bez oslabeného imunitního systému jsou schopny hyfy zapouzdřit tvorbou granulomu. Rozhodující je také množství houbových propagulí (infekční nálož), se kterým se ryba potká.

Mezi nejdůležitější faktory virulence patří tvorba melaninu houbou. Nelze to ovšem zobecnit na všechny případy. Některé mutantní kmeny zůstávají virulentní, přestože v jejich buněčných stěnách není přítomen melanin. V některých případech mutace v dráze syntézy melaninu znamená snížení virulence a patogen je snadno usmrcen imunitním systémem. U některých mutantů, které mají melanogenezi přerušenu v jiné fázi se schopnost virulence naopak nesnižuje, protože vedlejší produkty a meziprodukty dráhy, které se hromadí, mají také antibakteriální a imunosupresivní vlastnosti a dokáží houbu ochránit před imunitními reakcemi.

6 Seznam literatury

- Abbott, E. (1927). "*Scolecobasidium*, a new genus of soil fungi." *Mycologia* **19**(1): 29-31.
- Agius, C. and R. Roberts (2003). "Melano-macrophage centres and their role in fish pathology." *Journal of Fish Diseases* **26**(9): 499-509.
- Ajello, L. (1978). "The black yeasts as disease agents: historical perspective." *Pan Am Health Organ Science Publ* **356**: 9-19.
- Ajello, L., M. McGinnis and J. Camper (1977). "An outbreak of phaeohyphomycosis in rainbow trout caused by *Scolecobasidium humicola*." *Mycopathologia* **62**(1): 15-22.
- Alderman, D. and S. Feist (1985). "*Exophiala* infection of kidney of rainbow trout recovering from proliferative kidney disease." *Transactions of the British Mycological Society* **84**(1): 157-159.
- Alvarez-Pellitero, P. (2008). "Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects." *Veterinary Immunology and Immunopathology* **126**(3): 171-198.
- Bell, A. and M. Wheeler (1986). "Biosynthesis and functions of fungal melanins." *Annual Review of Phytopathology* **24**(1): 411-451.
- Blaylock, R., R. Overstreet and M. Klich (2001). "Mycoses in red snapper (*Lutjanus campechanus*) caused by two deuteromycete fungi (*Penicillium corylophilum* and *Cladosporium sphaerospermum*)." *Hydrobiologia* **460**(1-3): 221-228.

- Blazer, V. and R. Wolke (1978). "An *Exophiala*-like fungus as the cause of a systemic mycosis of marine fish." Journal of Fish Diseases **2**(2): 145-152.
- Bowater, R., A. Thomas, R. Shivas and J. Humphrey (2003). "Deuteromycotic fungi infecting barramundi cod, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes), from Australia." Journal of Fish Diseases **26**(11-12): 681-686.
- Buchmann, K. (2015). "Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals." M1/M2 Macrophages: The Arginine Fork in the Road to Health and Disease **5**: 23.
- Carmichael, J. (1967). "Cerebral mycetoma of trout due to a *Phialophora*-like fungus." Sabouraudia **5**(2): 120-123.
- De Hoog, G., V. Vicente, M. Najafzadeh, M. Harrak, H. Badali and S. Seyedmousavi (2011). "Waterborne *Exophiala* species causing disease in cold-blooded animals." Persoonia **27**(1): 46-72.
- De Hoog, G. and J. von Arx (1973). "Revision of *Scolecobasidium* and *Pleurophragmium*." Kavaka **1**: 55-60.
- Dörr, A. J., M. Rodolfi, M. Scalici, A. Elia, Garzoli and A. Picco (2011). "*Phoma glomerata*, a potential new threat to Italian inland waters." Journal for Nature Conservation **19**(6): 370-373.
- Ellis, A., I. Waddell and D. Minter (1983). "A systemic fungal disease in Atlantic salmon parr, *Salmo salar* L., caused by a species of *Phialophora*." Journal of Fish Diseases **6**(6): 511-523.
- Faisal, M., E. Elsayed, S. Fitzgerald, V. Silva and L. Mendoza (2007). "Outbreaks of phaeohyphomycosis in the chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) caused by *Phoma herbarum*." Mycopathologia **163**(1): 41-48.
- Fijan, N. (1969). "Systemic mycosis in channel catfish." Bulletin of the Wildlife Disease Association **5**(2): 109-110.
- Gaskins, J. and P. Cheung (1986). "*Exophiala pisciphila*. A study of its development." Mycopathologia **93**(3): 173-184.
- Gjessing, M., M. Davey, A. Kvellestad and T. Vrålstad (2011). "*Exophiala angulospora* causes systemic inflammation in Atlantic cod *Gadus morhua*." Diseases of Aquatic Organisms **96**(3): 209.
- Gonçalves, R., H. Lisboa and S. Pombeiro-Sponchiado (2012). "Characterization of melanin pigment produced by *Aspergillus nidulans*." World Journal of Microbiology and Biotechnology **28**(4): 1467-1474.
- Hatai, K., Y. Fujimaki, S. Egusa and Y. Jo (1986). "A visceral mycosis in ayu fry, *Plecoglossus altivelis* Temminck & Schlegel, caused by a species of *Phoma*." Journal of Fish Diseases **9**(2): 111-116.
- Hatai, K. and S. Kubota (1989). "A visceral mycosis in cultured masu salmon (*Oncorhynchus masou*) caused by a species of *Ochroconis*." Journal of Wildlife Diseases **25**(1): 83-88.
- Hubka, V., M. Réblová, J. Řehulka, L. Selbmann, D. Isola, S. de Hoog and M. Kolařík (2014). "*Bradomyces* gen. nov. (Chaetothyriales, Trichomeriaceae), a new ascomycete genus accommodating poorly differentiated melanized fungi." Antonie van Leeuwenhoek **106**(5): 979-992.
- Jacobson, E. (2000). "Pathogenic roles for fungal melanins." Clinical Microbiology Reviews **13**(4): 708-717.
- Kanchan, C., Y. Muraosa and K. Hatai (2014). "*Exophiala angulospora* infection found in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan." Bulletin of the European Association of Fish Pathologists **34**(5): 187.

- Langdon, J. and W. McDonald (1987). "Cranial *Exophiala pisciphila* infection in *Salmo salar* in Australia." Bulletin of the European Association of Fish Pathologists **7**: 35-37.
- Langfelder, K., M. Streibel, B. Jahn, G. Haase and A. A. Brakhage (2003). "Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi." Fungal Genetics and Biology **38**(2): 143-158.
- Langvad, F. and K. Engjom (1991). *Exophiala* spp., a systemic fungal disease of fish. International Council for the Exploration of the Sea. C. Sindermann and C. Maurin. Denmark.
- Lehmann, J., D. Mock and W. Schäfer (1999). "Swim bladder infection of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) by a fungus: a case report." Bulletin of the European Association of Fish Pathologists **19**: 83-84.
- McGinnis, M. and L. Ajello (1974). "A new species of *Exophiala* isolated from channel catfish." Mycologia **66**(3): 518-520.
- McGinnis, M. R. and A. Padhye (1977). "*Exophiala jeanselmei*, a new combination for *Phialophora jeanselmei*." Mycotaxon **5**: 341-352.
- Munchan, C. (2006). "Mass mortality of young striped jack *Pseudocaranx dentex* caused by a fungus *Ochroconis humicola*." 魚病研究 **41**(4): 179-182.
- Munchan, C., O. Kurata, S. Wada, K. Hatai, N. Nakaoka and H. Kawakami (2009). "Histopathology of striped jack *Pseudocaranx dentex* experimentally infected with *Ochroconis humicola*." 魚病研究 **44**(3): 128-132.
- Munchan, C., O. Kurata, S. Wada, K. Hatai, A. Sano, K. Kamei and N. Nakaoka (2009). "*Exophiala xenobiotica* infection in cultured striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider), in Japan." Journal of Fish Diseases **32**(10): 893-900.
- Nosanchuk, J. and A. Casadevall (2003). "The contribution of melanin to microbial pathogenesis." Cellular Microbiology **5**(4): 203-223.
- Nyaoke, A., E. Weber, C. Innis, D. Stremme, C. Dowd, L. Hinckley, T. Gorton, B. Wickes, D. Sutton and S. De Hoog (2009). "Disseminated phaeohyphomycosis in weedy seadragons (*Phyllopteryx taeniolatus*) and leafy seadragons (*Phycodurus eques*) caused by species of *Exophiala*, including a novel species." Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **21**(1): 69-79.
- Otis, E., R. Wolke and V. Blazer (1985). "Infection of *Exophiala salmonis* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)." Journal of Wildlife Diseases **21**(1): 61-64.
- Pedersen, O. and F. Langvad (1989). "*Exophiala psychrophila* sp. nov., a pathogenic species of the black yeasts isolated from farmed Atlantic salmon." Mycological Research **92**(2): 153-156.
- Plonka, P. and M. Grabacka (2006). "Melanin synthesis in microorganisms-biotechnological and medical aspects." Acta Biochimica Polonica **53**(3): 429-443.
- Revankar, S. (2007). "Dematiaceous fungi." Mycoses **50**(2): 91-101.
- Richards, R., A. Holliman and S. Helgason (1978). "*Exophiala salmonis* infection in Atlantic salmon *Salmo salar* L." Journal of Fish Diseases **1**(4): 357-368.
- Riley, P. (1997). "Melanin." The International Journal of Biochemistry & Cell Biology **29**(11): 1235-1239.
- Ross, A. and W. Yasutake (1973). "*Scolecobasidium humicola*, a fungal pathogen of fish." Journal of the Fisheries Board of Canada **30**(7): 994-995.
- Ross, A., W. Yasutake and S. Leek (1975). "*Phoma herbarum*, a fungal plant saprophyte, as a fish pathogen." Journal of the Fisheries Board of Canada **32**(9): 1648-1652.
- Řehulka, J., A. Kubátová and V. Hubka (2016). "*Cephalotheca sulfurea* (Ascomycota, Sordariomycetes), a new fungal pathogen of the farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*." Journal of Fish Diseases.

- Samerpitak, K., E. Van der Linde, H.-J. Choi, A. G. van den Ende, M. Machouart, C. Gueidan and G. De Hoog (2014). "Taxonomy of *Ochroconis*, genus including opportunistic pathogens on humans and animals." Fungal Diversity **65**(1): 89-126.
- Scharf, D., T. Heinekamp and A. Brakhage (2014). "Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites." PLoS Pathogens **10**(1).
- Schaumann, K. and K. Priebe (1994). "*Ochroconis humicola* causing muscular black spot disease of Atlantic salmon (*Salmo salar*)." Canadian Journal of Botany **72**(11): 1629-1634.
- Schubert, K. and U. Braun (2005). "Taxonomic revision of the genus *Cladosporium* s. lat. 1. Species reallocated to *Fusicladium*, *Parastenella*, *Passalora*, *Pseudocercospora* and *Stenella*." Mycological Progress **4**(2): 101-109.
- Silnicová, K., L. Vojtek, P. Hyršl and L. Vetešník (2013). Přirozená imunita ryb, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- Silphaduang, U., K. Hatai, S. Wada and E. Noga (2000). "Cladosporiosis in a tomato clownfish (*Amphiprion frenatus*)." Journal of Zoo and Wildlife Medicine **31**(2): 259-261.
- Slottá, Z. (2007). Výživa a imunita – vztah k jednotlivým živinám, Masarykova univerzita, Lékařská fakulta.
- Tolarová, S. (2014). Nespecifické imunitní mechanismy ryb, Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta.
- Tsai, H., M. Wheeler, Y. Chang and K. Kwon-Chung (1999). "A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*." Journal of Bacteriology **181**(20): 6469-6477.
- Uijthof, J., M. Figge and G. De Hoog (1997). "Molecular and physiological investigations of *Exophiala* species described from fish." Systematic and Applied Microbiology **20**(4): 585-594.
- Vakula, J. (2015). "Problematika výskytu mykotoxinů v krmivech pro ryby z hlediska welfare " Ochrana zvířat a welfare 2015 171.
- Wada, S., K. Nakamura and K. Hatai (1995). "First case of *Ochroconis humicola* infection in marine cultured fish in Japan." Fish Pathology **30**(2): 125-126.
- Yanong, R. (2003). "Fungal diseases of fish." Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice **6**(2): 377-400.