

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Kristýna Vrbová

Kultivace motolic

Cultivation of Trematodes

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Martin Kašný, Ph.D.

Praha, 2014

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 05. 2014

Podpis

Ráda bych poděkovala hlavně svému školiteli RNDr. Martinu Kašnému, Ph.D. za cenné rady a trpělivost. Díky jeho odborné pomoci má tato práce svou současnou podobu.

Za grafické úpravy děkuji Vojtovi a Lukášovi.

Dále jsem vděčná celé rodině a přátelům, jejichž podpora pro mě znamená hodně.

Abstrakt

Mnoho druhů motolic představuje významné patogeny lidí a zvířat, a proto jsou předmětem intenzivního výzkumu. Úspěšná kultivace motolic je často nezbytným výchozím bodem pro navazující experimenty zaměřené na odhalení významných biologických procesů, uplatňujících se v různých fázích života těchto organismů, či pro experimenty testující léčiva určená k eliminaci motolic. Tato bakalářská práce shrnuje dosud známé dostupné informace týkající se *in vitro* kultivací motolic a v určitých případech prokazuje, že byla této problematice v rámci třídy Trematoda dosud věnována nedostatečná pozornost. Na rozdíl od doby cca před 100 lety, kdy kultivační experimenty teprve začínaly, jsou dnes dostupné technologie, umožňující pracovat v naprosto sterilních podmínkách a dokonce *in vitro* kultivovat buněčné linie získané z motolic. Některá kultivační média původně určená pro buněčné kultury jsou dnes již běžně dostupná a postupně se ukázalo, že jsou vhodná rovněž i pro kultivaci celých motolic. Navzdory těmto možnostem se prozatím nepodařilo souvisle kultivovat žádného ze zástupců motolic od stádia vajíčka po plně vyvinutého dospělého produkujícího vajíčka, na druhou stranu však bylo dosaženo dílčích úspěchů v podobě úspěšného vývoje jednotlivých stádií z některých fází životního cyklu různých motolic.

Klíčová slova: kultivace, motolice, *in vitro*, Fasciolidae, Schistosomatidae

Abstract

Many of Trematode species are serious pathogens of human and animals; therefore they are the subjects of intensive investigation. The successful *in vitro* cultivation of these organisms could represent the first step for further sophisticated experiments focused on characterization of crucial biological processes related to the particular phases of fluke life cycle or for the studies focused on testing the anthelmintic effect of various compounds. This thesis reviews majority of information published in relation to *in vitro* cultivation of Trematodes. It shows that for many Trematode families is our knowledge of culturing methods very limited. In contrast to the first attempts to cultivate some species of Trematodes about 100 years ago, nowadays we dispose of technologies enabling to cultivate particular live cells isolated from different tissues of flukes. Some of the cultivation media originally used for cell cultures are now commercially available and they were successfully used for cultivation of whole worms. Nevertheless, we still haven't been able to continuously cultivate a Trematode species by using an egg at the beginning and finish with fully developed adult producing eggs. However, there are some partially successful experiments in which development of particular life stages of some flukes has been achieved.

Key words: cultivation, Trematoda, *in vitro*, Fasciolidae, Schistosomatidae

Obsah

Abstrakt	i
Obsah.....	ii
Seznam zkratk.....	iii
1. Úvod.....	1
2. Čeleď Fasciolidae	2
2.1 Životní cyklus fasciolidních motolic.....	2
2.2 Kultivace motolic čeledi Fasciolidae.....	4
2.2.1 Kultivace larválních stádií fasciolidních motolic.....	4
2.2.2 Kultivace juvenilních a adultních stádií fasciolidních motolic.....	7
3. Čeleď Schistosomatidae.....	12
3.1 Životní cyklus čeledi Schistosomatidae	13
3.2 Kultivace motolic čeledi Schistosomatidae	14
3.2.1 Kultivace larválních stádií z mezihostitelských plžů	14
3.2.2 Kultivace stádií z definitivních hostitelů.....	18
3.3 Kultivace buněk izolovaných z různých životních stádií schistosom	25
4. Kultivace zástupců dalších čeledí motolic	26
podtřída Digenea.....	26
řád Diplostomida.....	26
řád Plagiorchiida	28
podtřída Aspidogastrea	32
5. Závěr	32
Návrh postupu kultivace <i>F. magna</i>	34
Seznam použité literatury	35

Seznam zkratek

Média:

BGE médium – kultivační roztok obsahující produkty buněčné kultury *Biomphalaria glabrata*
BME – Basal médium Eagle (předchůdce MEM)
C-BGE médium – BGE médium + 10 % FBS
CBSS – Chernin's Balanced Salt Solution
DMEM– Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM/F-12 – Dulbecco's Modified Eagle Medium + Nutrient Mixture F-12
EBSS – Earle's Balanced Salt Solution
HBSS – Hank's Balanced Salt Solution
IMDM – Iscove's Modified Dulbecco's Media
L-15 – Leibovitz's L- J15 Medium
MEM – Minimum Essential médium (Eagle)
MEMSE-J – Minimal Essential Medium for development of *S. japonicum* eggs
MSM – Minimal Salts Medium
PSGtr – kultivační roztok, blízký se složením hemolymfy *G.truncatula*
SCM – serum-free Schistosoma Culture Medium, médium 169 bez přídavku séra
SDM – Schneider's *Drosophila* Médium
SF-900 II SFM – kultivační médium optimalizované pro růst buněk *Spodoptera frugiperda*
SM – Schistosoma Medium
TBSS – Tyrode's Balanced Salt Solution
NCTC-109 – National Cancer Tissue Culture
NCTC-135 – National Cancer Tissue Culture
RPMI-1640 – Roswell Park Memorial Institute

Buňky:

AAL buňky – buňky *Aedes albopictus*
BGE buňky – embryonální linie buněk *Biomphalaria glabrata*
BLR 3A – *Rattus norvegicus* liver, fibroblasty z jater krysy
ED25 – lidské buňky pocházející z jaterního endotelu
SF9 buňky – buňky *Spodoptera frugiperda*

Ostatní:

APW – Artificial Pond Water, laboratorně připravená rybníční voda
BEE – Bovine Emryo Extract, extrakt z bovinních embryí
BSA – Bovine Serum Albumin, bovinní sérový albumin
CAM – Chorioallantoic Membrane, membrána chorioallantois
CDLC – Chemically Defined Lipid Concentrate, komerčně dostupná lipidová emulze
CEE – Chicken Embryo Extract, extrakt z kuřecích embryí
ConA – Concanavalin A z druhu *Canavalia ensiformis*, lektin
FBS – Fetal Bovine Serum, extrakt z bovinního plodového séra
LAH – laktalbumin hydrolyzát
MAGs – Miracidia Attracting Glycoproteins, glykoproteiny vylučované vodními plži
NHS – Normal Human Serum, lidské krevní sérum
SSW – Sterile Sea Water, sterilizovaná mořská voda
WGA – Wheat Germ Agglutinin, z druhu *Triticum vulgare*, lektin

Zkratky objevující se pouze v tabulce (viz internetový odkaz):

AMP, ATP – adenosin monofosfát, adenosin trifosfát
BHI – Brain Heart Infusion
FMN – flavin mononukleotid
HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethansulfonová kyselina
TWEEN 80 – polyoxyethylensorbitan monooleát

Internetový odkaz na tabulku shrnující složení médií uvedených v práci: [tabulka](#)

1. Úvod

S rozvojem moderních biologických vědních disciplín, jako jsou molekulární biologie a bioinformatika, dochází k postupnému zvyšování nároků na standardizaci získání a přípravy výchozího materiálu – biologického vzorku. Problémy spojené se standardizací přípravy by do jisté míry mohly být řešeny optimalizovanými metodami experimentálních infekcí a kultivací jednotlivých modelových organismů či jejich stádií v definovaných živných médiích, tedy *in vitro*, za stanovených podmínek.

Termín *in vitro* kultivace (z latiny, „ve skle“) označuje způsob provedení kultivačního experimentu v laboratorních podmínkách, kdy jsou tímto způsobem udržovány živé buňky nebo celý organismus v kultivačním médiu, často např. ve zkumavkách. Takto můžeme zjednodušit velmi složitý systém interakcí, fungující za normálních podmínek v živém organismu, na několik regulovatelných faktorů. Zjednodušení však zároveň nese i riziko možných nesprávných interpretací výsledků a chybných závěrů extrapolovaných z *in vitro* experimentů na poměry v přírodě.

In vitro kultivace parazitárních organismů má v současnosti velký význam především pro zajištění dostatečného množství standardně připraveného biologického vzorku, pro výzkum interakce parazit-hostitel, nebo pro testování účinku léčiv. Umožňuje také detailnější porozumění životním cyklům kultivovaných organismů a v neposlední řadě nám teoreticky skýtá možnost obejít se během experimentální práce s parazity bez hostitelských organismů, jejichž chov by byl v laboratorních podmínkách velmi obtížný.

Problematika kultivace motolic je značně rozpracována u druhu *Schistosoma mansoni* z čeledi Schistosomatidae, avšak pro mnohé další skupiny motolic, jejichž zástupci jsou často využíváni jako experimentální parazitární modelové organismy, zůstávají informace omezené; takovým příkladem jsou i zástupci čeledi Fasciolidae.

Hlavní cíl práce

V navržené práci by měly být utříděny dosavadní poznatky související s transformací a kultivací motolic.

Dílčí cíle této práce

- Zpracovat dostupnou literaturu týkající se kultivace motolic, se zaměřením na čeleď Fasciolidae
- Pokusit se navrhnout postup experimentální infekce mezihostitelských plžů, *in vitro* transformace metacerkárií na dospělé jedince, a kultivace juvenilních či dospělých motolic *Fascioloides magna*.

2. Čeď Fasciolidae

Čeď Fasciolidae (kmen: Platyhelminthes, podkmen: Neodermata, třída: Trematoda, podtřída: Digenea, řád: Plagiorchiida, podřád: Echinostomata) zahrnuje devět zástupců: *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Fasciolopsis buski*, *Fascioloides magna*, *Fasciola jacksoni*, *Protofasciola robusta*, *Parafasciolopsis fasciolaemorpha*, *Fasciola nyanzae* a *Tenuifasciola tragelaphi* (Lotfy et al., 2008; Olson et al., 2003).

Minimálně čtyři z vyjmenovaných motolic jsou obzvlášť významné z hlediska humánní nebo veterinární medicíny:

Fasciola hepatica (30 × 15 mm) je kosmopolitně rozšířená, parazituje žlučovody býložravých savců, především ovcí (*Ovis aries*), ale může napadat i člověka. Larvální vývoj dokončuje např. v plžích *Galba truncatula*, *Omphiscola glabra* nebo *Lymnaea viridis* (Dreyfuss et al., 2007; Lee et al., 1995; Dreyfuss and Rondelaud, 1994; Acosta-Ferreira et al., 1979; Thomas, 1883).

Fasciola gigantica (35 × 15 mm) parazituje ve žlučovodech a žlučníku přežvýkavců i lidí na území jihovýchodní Asie a severní Afriky. Za meziphostitele jí může sloužit např. *G. truncatula*, *Lymnaea natalensis*, či *Lymnaea rufescens* (Soliman, 2008; Dar et al., 2003; Torgerson and Claxton, 1999; Madsen and Monrad, 1981; Rao, 1966).

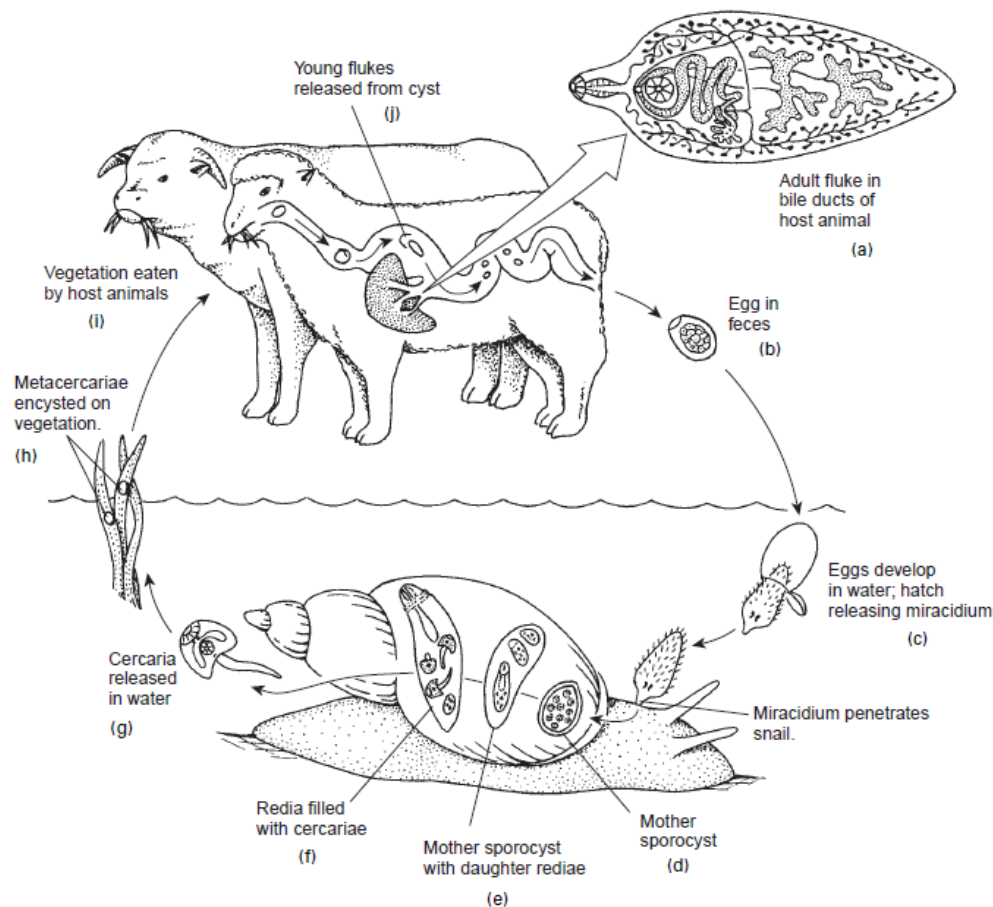
Fasciolopsis buski (40 × 15 mm), jihoasijská motolice, dokončuje životní cyklus v tenkém střevě prasat domácích (*Sus scrofa f. domestica*), ovšem nakazit se může i člověk. Meziphostiteli jsou např. *Segmentina hemisphaerula*, *Planorbis soenosus* a *Segmentina largillierti* (Lo, 1967; Buckley, 1939; Nakagawa, 1922).

Fascioloides magna (100 × 30 mm) pochází ze Severní Ameriky, kde je jejím hlavním hostitelem jelenec běloocasý (*Odocoileus virginianus*) a jelen wapiti (*Cervus elaphus canadensis*). S nimi byla transportována do Evropy, kde se adaptovala na jelena lesního (*Cervus elaphus*), daňka evropského (*Dama dama*) a srnce obecného (*Capreolus capreolus*), kteří jsou zde jejími hlavními definitivními hostiteli. Dospělé motolice jsou lokalizovány v pseudocystách v jaterním parenchymu těchto hostitelů. Cerkárie mohou být produkovány např. plži *G. truncatula*, *Stagnicola palustris* a *O. glabra* (Rondelaud et al., 2007; Dreyfuss et al., 2007; Pybus, 2001; Chroustová, 1979; Foreyt and Todd, 1976; Swales, 1935).

2.1 Životní cyklus fasciolidních motolic

Jedná se o dvouhostitelské motolice, jejichž životní cykly jsou si velmi podobné. K larválnímu vývoji využívají nejčastěji meziphostitele z čeďi Lymnaeidae, případně Planorbidae, a jako definitivní hostitele savce, především kopytníky (Lotfy et al., 2008; Pybus, 2001).

Obr. č. 1: Životní cyklus *F. hepatica* (Roberts et al., 2009).



Životní cyklus fasciolidních motolic (příklad *F. hepatica*, Obr. č. 1)

Dospělci (a) žijí v jaterních žlučovodech, kde nakladou vajíčka (b). Ta se dostávají společně se žlučí do tenkého střeva a následně s trusem do vody. K dalšímu vývoji potřebují dostatečnou vlhkost a teplotu (optimálně kolem 25°C). Ve vhodných podmínkách se líhnou obrvená miracidia (c) během dvou až tří týdnů. Miracidia musí do několika hodin aktivně vyhledat plžního mezihostitele a vniknout do něj v oblasti plášťové dutiny. Přitom se zbavují epiteliálních destiček s ciliemi.

Z miracidii se vyvinou v plicním vaku nebo volně v tělní dutině plže mladé sporocysty (d), které následně migrují do hepatopankreatu a pokračují ve vývoji. Uvnitř dospělých sporocyst jsou patrné redie (e), které se z těla sporocysty po čase uvolní a žijí v hepatopankreatu samostatně. Redie často obsahují také stádia dceřiných redií. Ty po opuštění mateřských redií začnou zvětšovat svou velikost a uvnitř jejich těl se formují ze zárodečných buněk cercárie (f). Ještě nedospělé cercárie opouští dceřiné redie a dospívají v hepatopankreatu plže. Celý vývoj od miracidia po cercárie trvá v závislosti na teplotě prostředí asi 18 až 60 dní. Zralé cercárie opouštějí mezihostitele (g) a encystují se na vegetaci ponořené ve vodě (h).

S vegetací pozřenu definitivním hostitelem (i) se cysty dostávají do žaludku a tenkého střeva hostitele. Asi za dvě až tři hodiny od pozření cyst se metacerkárie uvnitř obalů začnou aktivně pohybovat, natahují se a smršťují. Po dalších 20 minutách se přichytí ústní přísavkou k širší straně stěny cysty a mechanickým pohybem podpořeným nejspíše sekrecí enzymů vytvoří otvor, kterým se protáhnou ven.

Mladé motolice (j) pronikají během 24 hodin přes střevní stěnu, migrují břišní dutinou a přísávají se k peritoneu na povrchu jater a pronikají do jaterního parenchymu. Druhý až třetí týden po infekci jsou na játrech infikovaných ovcí zaznamenatelné stopy po migraci v oblasti těsně pod peritoneem. Motolice pak pokračují v migraci do nitra orgánu.

Svou cestu končí *F. hepatica* ve žlučovodech definitivního hostitele během 8. až 10. týdne od infekce, zde dospívá (a) a začíná vylučovat vajíčka průměrně 9. až 10. týden po infekci (Dow et al., 1968; Dixon, 1966; Dawes, 1962, 1961; Roberts, 1950; Thomas, 1883).

2.2 Kultivace motolic čeledi Fasciolidae

Pro zavedení úspěšné *in vitro* kultury je nezbytné nejprve objevit zásadní chemické a fyzikální faktory ovlivňující přežití, růst a vývoj kultivovaného organismu. Minimálně od 20. let 20. století, nejvíce v 60. až 80. letech, byly prováděny mnohdy rozsáhlé experimenty, které měly za cíl odhalení těchto důležitých faktorů, definování jejich optim a jejich zavedení v kultivačních metodách. Kritickým parametrem je v tomto ohledu především složení kultivačního média. Dále je nutné zajistit optimální pH média, teplotu kultivačního prostředí a složení atmosféry.

Kultivace mnohobuněčných organismů, kterými jsou i motolice, s sebou nese i mnoho technických překážek. Patří mezi ně vliv mikroprostředí kultivačního systému, jako je tvar a velikost nádoby, množství média, způsob jeho promíchávání a frekvence jeho výměny a počet jedinců kultivovaných společně v jedné nádobě - vlivem jejich nahromaděných metabolitů má totiž např. pH tendenci prudce kolísat. Při každé kultivaci je potřeba pracovat přísně sterilně, jelikož média představují ideální živné prostředí pro nejrůznější mikroorganismy, jako např. bakterie a plísňe (Davies and Smyth, 1978).

O kultivaci fasciolidních motolic bylo publikováno poměrně málo informací a v této oblasti nebylo prozatím dosaženo žádných mimořádných úspěchů.

2.2.1 Kultivace larválních stádií fasciolidních motolic

Kultivace larválních stádií představuje cenný nástroj při studiu molekulárních interakcí, uplatňujících se během larválního vývoje motolic, jako je např. vnímavost plže k nákaze. V souvislosti s kultivací larválních stádií fasciolidních motolic text níže shrnuje problematiku *in vitro* kultivace vajíček, miracidí, sporocyst, redií, dceřiných redií a cercarií. Aktuálně je dostupné jen omezené množství publikovaných výsledků experimentů, které popisují kultivace larválních stádií zástupců čeledi Fasciolidae.

Vajíčka

Dříve, než je možné začít experimentovat s larválními stádii motolic, je nezbytné stanovit vhodné *in vitro* podmínky pro líhnutí vajíček. Vajíčka lze získat např. dekantací trusu infikovaného definitivního hostitele nebo po jeho pitvě izolací ze žlučových či pseudocyst. Přímou z kultivovaných dospělých fasciolidních motolic je možno získat pouze omezené množství vajíček (Ractliffe et al., 1969).

K zahájení vývoje vyžadují vajíčka jak v přírodě, tak v *in vitro* podmínkách teplotu 23-26°C a vlhké prostředí, ideální je použití odstáté kohoutkové vody. V takových podmínkách trvá embryonace vajíčka *F. hepatica*, *F. gigantica* i *F. buski* přibližně 11-25 dní, u *F. magna* kolem 30 dní. Další výrazné snížení teploty ale proces zpomaluje, např. miracidia *F. hepatica* se z vajíček líhnou při 16°C až po 2-3 měsících a teplota pod 10°C vývoj vajíček zastavuje (Ghosh, 1985; Kuntz and Lo, 1967; Roberts, 1950; Swales, 1935; Thomas, 1883).

Na aktivaci miracidíí uvnitř vajíček fasciolidních motolic má nejspíš vliv parciální tlak kyslíku v prostředí a teplota (Schwabe et al., 2012; Friedl, 1960). Plně vyvinuté miracidium vykazuje kontrakční pohyby a opouští vajíčko v místě opercula (Thomas, 1883). Líhnutí bývá indukováno např. snížením z laboratorní teploty na 16-20°C, nebo naopak zvýšením teploty po přemístění vajíček skladovaných v lednici při teplotě 4°C na přibližně 22°C (Gold and Goldberg, 1976; Swales, 1935).

Miracidia

Volně plovoucím larválním stádiím, miracidíím, je v literatuře obecně věnována poměrně velká pozornost, zejména s ohledem na klíčový moment v rámci jejich krátkého života a vlastně i celého životního cyklu motolice – na nalezení mezihostitele. Důležitou roli v rozeznání specifického plžního mezihostitele hrají pro miracidia druhově specifické glykoproteiny MAGs, vylučované plži do vody (Kalbe et al., 2000). Miracidia fasciol musí nalézt vhodného mezihostitele během přibližně 8-24 hodin, než jsou spotřebovány zásobní látky. Do těla mezihostitelského plže vnikají nejčastěji přímo v oblasti plášťové dutiny (Swales, 1935; Thomas, 1883).

Transformaci miracidíí fasciolidních motolic na sporocysty v podmínkách *in vitro* byla dosud věnována jen omezená pozornost. Miracidia *F. hepatica* se pokoušeli stimulovat k vývoji ve sporocystu např. Georgieva et al. (2012) v médiu podobného složení, jako má hemolymfa plže *Galba truncatula* (PSGtr) s 0,001% obsahem lektinů ConA nebo WGA.

Přeměna miracidia *F. magna* ve sporocystu byla v laboratorních podmínkách pozorována již v roce 1955 (Campbell and Todd, 1955), nedá se však ještě hovořit o *in vitro* kultivaci. Během experimentu vědci zjistili, že po kontaktu miracidia s plžem *Stagnicola reflexa*, který není s tímto druhem motolice plně kompatibilní, miracidia do plže nepronikala a pouze se na krátkou dobu přichytila na jeho těle. Nicméně i tento krátký kontakt se substancemi na povrchu plže stačil k indukci transformace miracidíí na sporocystu, která proběhla během

24 hodin přímo ve vodním prostředí. Na základě tohoto zjištění autoři odhadli, že k transformaci ve sporocystu je zásadní přítomnost substancí produkovaných mezihostitelem do vodního prostředí a přítomných na povrchu jeho těla. Laursen a Yoshino (1999) transformovali miracidia *F. magna* na sporocysty v CBSS médiu smíchaném v poměru 1:1 s CBSS médiem přes noc inkubovaným s BGE buňkami, nebo pouze s frakcí takto inkubovaného média, obsahující látky > 30 kDa.

Sporocysty, redie a produkce cercárií

Tato část larválního vývoje bývá nejčastěji zkoumána prostřednictvím experimentálně infikovaných mezihostitelských plžů, kteří jsou vystavováni různým podmínkám prostředí a na závěr experimentu často usmrceni a pitváni. Přímý sběr přirozeně nakažených plžů z přírody je komplikován nejčastěji příliš nízkou prevalencí fasciolidních motolic. Jak již bylo řečeno výše, fasciolidní motolice využívají k larválnímu vývoji nejčastěji zástupce čeledi Lymnaeidae, případně Planorbidae. Plž *G. truncatula* je jako experimentální model infekcí motolicemi *F. hepatica*, *F. gigantica* i *F. magna* využíván nejčastěji, miracidia všech tří druhů jsou v tomto mezihostiteli schopná zahájit i dokončit svůj další vývoj vedoucí k produkci metacercárií (Faltýnková et al., 2006; Dar et al., 2003; Osborn et al., 1982). Z důvodu problematického chovu semiakvatických plžů *G. truncatula* je pro chov *F. magna* využíván také akvatický plž *Pseudosuccinea columella* (Fried and Stromberg, 1985). Za vhodný objekt experimentální infekce *F. buski* je považován plž *S. hemisphaerula* (Sey et al., 1989; Lo, 1967).

Sporocysta *F. hepatica* dosahuje 14 dní po infekci mezihostitelského plže délky 0,5-0,7 mm a sporocysta *F. magna* je 8-15 dní po infekci velká 0,3-0,4 mm (Erhardová-Kotrlá, 1971; Thomas, 1883). Následující stádium mateřské redie *F. hepatica* měří 1,3 – 1,6 mm. Mateřské redie *F. magna* obsahující vyvinuté dceřiné redie mají rozměry 0,87 × 0,21 mm, *F. buski* 1-1,5 × 0,23 mm a u *F. gigantica* dosahují délky 2,13-3,4 mm (Dinnik and Dinnik, 1964; Swales, 1935; Nakagawa, 1922; Thomas, 1883). Během 14 až 63 dní po infekci plže mohou z mateřských redií vznikat až 3 generace dceřiných redií, v nichž se zakládají cercárie (Rondelaud et al., 2009).

Rychlost larválního vývoje sporocyst, redií a cercárií závisí zejména na teplotě prostředí, ve kterém mezihostitelský plž žije. K produkci cercárií *F. hepatica* z plže *G. truncatula* chovaného při 25°C dochází během 18 dní od nákazy miracidii, vliv nižší teploty ale vývoj cercárií výrazně zpozdí, např. při 18 až 20°C vývoj trvá kolem 56-57 dní (Osborn et al., 1982; Roberts, 1950). Cercárie *F. gigantica* jsou připraveny k uvolnění do vodního prostředí asi 50 dní po infekci plže *L. natalensis* chovaného při pokojové teplotě, *F. buski* tvoří v plži *S. hemisphaerula* chovaném při 22-24°C cercárie po 46-59 dnech a *F. magna* dokončí larvální vývoj v *G. truncatula* při teplotě 20°C během 42 dní a (Erhardová-Kotrlá, 1971; Kuntz and Lo, 1967; Rao, 1966).

O *in vitro* kultivacích larválních stádií fasciolidních motolic je známo jen málo. Augot et al. (1997) kultivovali redie *F. hepatica*, získané z infikovaného plže *G. truncatula*, v médiu L-15 s poupravenými hodnotami tak, aby více odpovídalo fyziologickým podmínkám plži hemolymfy. Mateřské redie první i druhé generace kultivované v tomto médiu produkovaly v malých počtech redie dceřiné a od 29 dne po zavedení kultury docházelo při 22°C i k produkci cercárií.

Redie *F. magna* přežily 8 dní v Ringerově roztoku obsahujícím 0,1% hydroxyprolin při 20°C bez známek dalšího vývoje (Friedl, 1961). Laursen a Yoshino (1999) kultivovali sporocysty *F. magna* hned po jejich *in vitro* transformaci z miracidí v C-BGE médiu s buňkami *B. glabrata* (BGE) při 26°C. Po 12-16 dnech byly uvnitř sporocyst patrné pohyblivé redie, které je opouštěly po 14 až 20 dnech od počátku kultivace sporocyst. Tyto redie však byly vyprodukovány pouze 1% všech sporocyst a každá sporocysta dala vznik maximálně jedné samostatné redii. Takto získané redie přežily v médiu minimálně 60 dní a dorostly velikosti 0,16-0,17 mm, dále se však nevyvíjely.

2.2.2 Kultivace juvenilních a adultních stádií fasciolidních motolic

Standardizované *in vitro* podmínky představují ideální prostředí pro provádění experimentů zaměřených na studium fyziologických, biochemických či molekulárních pochodů mladých a dospělých motolic. Úspěšná kultivace juvenilních motolic umožňuje také další zkoumání jejich vývoje, zatímco kultivací dospělých motolic lze za standardizovaných podmínek teoreticky zajistit zisk životaschopných vajíček.

Excystace metacerkárií *in vitro*

Po úspěšné experimentální infekci modelového meziphostitelského plže postupně dochází k produkci cercárií a následnému zformování metacerkárií, které zůstávají přichyceny např. na stěnách akvária či jiném pevném podkladu.

In vitro excystaci metacerkárií je možné v praxi aplikovat nejen jako krok předcházející kultivaci juvenilních motolic, ale také např. jako zkoušku životaschopnosti metacerkárií, které chceme dále využít k experimentální infekci laboratorních zvířat.

Excystace metacerkárií fasciolidních motolic je proces, zahrnující fázi aktivace a fázi uvolňování metacerkárií z cysty (Dixon, 1966). K aktivaci je zapotřebí vysoké koncentrace CO₂ (v batoru ovcí, koz a krav je to přes 40 %, podobně i v tenkém střevě koní, králíků a lidí) a dále redukční prostředí (redukční potenciál v batoru i tenkém střevě hostitelů je obecně negativní, s hodnotami kolem -300 mV) a teplota kolem 37°C. K zahájení druhé fáze, tedy opouštění cyst, je nutné metacerkárie stimulovat roztokem žluči. Aktivované metacerkárie poté začnou narušovat stěny cysty mechanicky a působením sekretů obsahujících histolytické enzymy. Na závěr se metacerkárie protahují vzniklým otvorem do vnějšího prostředí ven (Dixon, 1966, 1964).

Nejlépe byla prozkoumána v *in vitro* podmínkách excystace u *F. hepatica*. V historicky prvním experimentu zaznamenávajícím *in vitro* excystaci metacerkárií *F. hepatica* byl testován roztok o podobném složení jako žaludeční a duodenální šťávy. Na základě výsledků byla formulována hypotéza, že k natrávení stěny cysty dochází až v duodenu a ne v žaludku (Wright, 1927; dle Dixon, 1966); v izolovaných střevních tekutinách psa se po 135 minutách excystovalo 65% metacerkárií *F. hepatica* (Vogel and Brand, 1933; dle Dixon, 1966), a ve střevní tekutině králíka se po 17 hodinách excystovalo 84 % metacerkárií (Hughes, 1959; dle Dixon, 1966).

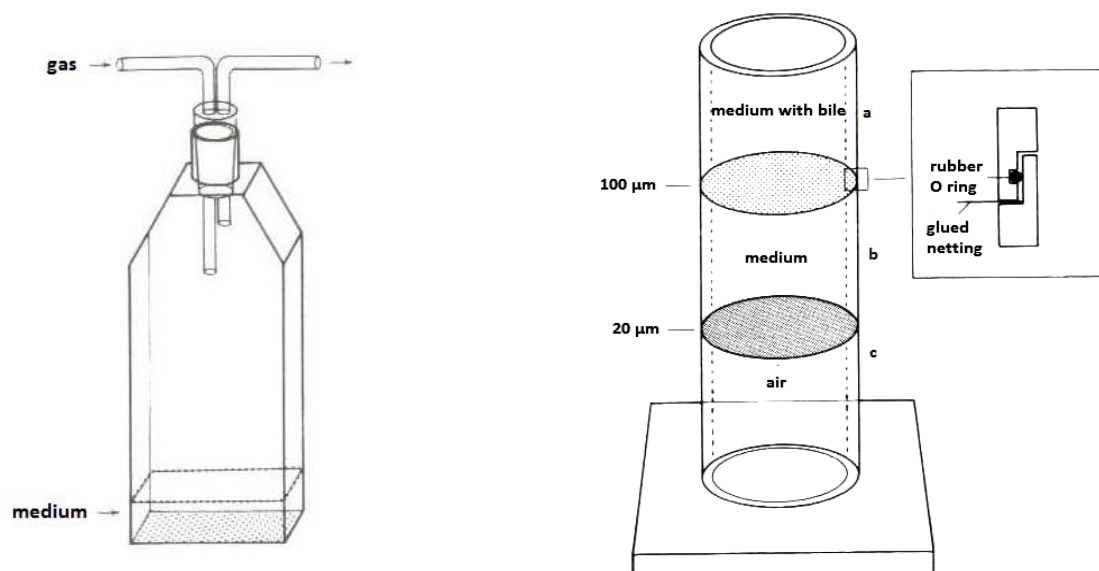
Wikerhauser (1960) experimentálně excystoval metacerkárie *F. hepatica* za použití dvou roztoků, 0,5% pepsinového a 0,4% trypsinového. Nejprve cysty vystavil působení pepsinového roztoku, kdy došlo k částečné degradaci vnější vrstvy stěny cyst. Poté je vložil do trypsinového roztoku s příměsí 20% volské žluči a do 3 h se uvolnilo až 80 % metacerkárií.

Dixon (1964) v rozsáhlých experimentech zhodnotil vliv různých faktorů na průběh excystace. Jako důležité faktory pro aktivaci metacerkárií uvnitř cyst určil přítomnost redukčních činidel, tedy 0,48% roztoku cysteinu, nebo 0,69% roztoku dithioničitanu sodného ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) v HBSS médiu. Roztok obsahoval také 10 % ovčí žluči, kterou autor potvrdil jako nejvýznamnější faktor indukující vlastní proces uvolňování z cyst, k čemuž docházelo bezprostředně po přenesení cyst do EBSS média. O dva roky později Dixon (1966) na své poznatky navázal a opět potvrdil svůj předpoklad, že excystace probíhá ve dvou krocích – aktivaci a uvolnění metacerkárií. Ovčí žluč opět v 10% koncentraci byla přidána až do EBSS média, optimálně experiment probíhal při atmosféře 40-60% CO_2 . Sewell a Purvis (1969) se pokusili nahradit v excystačním médiu žluč 1,2% syntetickým taurocholátem a zjistili, že s přidavkem 0,69% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ směs představuje účinnou kombinaci pro zahájení excystace. Experimentální přístupy publikované v pracích Dixona (1966) i Sewella a Purvise (1969) revidovali Smith a Clegg (1981), kterým se podařilo s využitím poupravené metody Dixona (1966) stabilně získávat po 3 hodinách až 85 % excystovaných metacerkárií. Nejdříve inkubovali metacerkárie v médiu, které splňovalo podmínky potřebné k aktivaci metacerkárií, tedy při zvýšené teplotě 37°C, vysokém parciálním tlaku oxidu uhličitého (probublání čistým CO_2 po dobu 30s) a v redukčních podmínkách navozených 0,35% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$. Jako médium stimuluující uvolnění motolice z metacerkariální cysty použili HBSS s 10 % králíčí žluči. Výsledků Sewella a Purvise (1969) se jim podařilo dosáhnout jen částečně, v 7 experimentech se do 5 hodin excystovalo 60 % metacerkárií, ale v dalších 5 testech excystace nenastala vůbec nebo po 8 až 12 hodinách.

Tielens et al. (1981) sestavili speciální „aktivační aparaturu“ (Obr. č. 2A) a „excystační věž“ (Obr. č. 2B), ve které uvolňování z cyst probíhalo standardizovaným způsobem. Cysty byly nejdříve vloženy mezi dvě sklíčka do kapky upraveného média EBSS, které bylo použito i v následném kroku aktivace metacerkárií. Jemným třením sklíček byla odstraněna

nejsvrchnější vrstva cysty. Metacerkárie byly následně přeneseny do lahve (Obr. č. 2A) s EBSS médiem upraveným podle Dixona (1966). Za účelem aktivace byl trvale udržován poměr 60 % CO₂ a 40 % N₂ v médiu a teplota 38°C. Aktivované metacerkárie byly přeneseny do excystační věže. V horní části (Obr. č. 2Ba) byly inkubovány v EBSS médiu s 10% ovčí žlučí při teplotě 38°. Excystování jedinci se aktivně pohybovali směrem k přepážce – síťce oddělující další oddělení věže. Po přechodu přes bariéru sítky se tak dostávaly do aerobního prostředí (Obr. č. 2Bb), protože médium (bez přídavku žluči) bylo zespodu prosycováno vzduchem (Obr. č. 2Bc). Tímto způsobem lze v krátké době excystovat velké množství metacerkárií a získat značný počet juvenilních motolic se sníženým rizikem kontaminace.

Obr. č. 2: Aparatura pro excystaci metacerkárií (láhev na tkáňové kultury) (A) a excystační věž (válec z plexiskla, složený ze 3 částí oddělených plastovou sítkou) (B) (Tielens et al., 1981).



Pro excystaci *F. gigantica* lze využít podobné postupy jako v případě *F. hepatica*, což potvrdily výsledky experimentů kolektivu vědců Hanna, Jura a Ballawy (1975). Aplikací jejich postupů bylo *in vitro* excystováno až 90 % metacerkárií uvolněných z cyst po 2 hodinách inkubace a předchozím mechanickém odstranění svrchních vrstev cysty. Jako aktivační redukční činidlo použili 0,2% L-cystein hydrochlorid ve fyziologickém roztoku s 20% hovězí žlučí.

Excystaci u *F. magna* zkoumalí Fried a Stromberg (1985). Nejprve cysty inkubovali ve 20% roztoku chlornanu sodného (NaClO) v rybniční vodě. Po prasknutí vnější stěny byly cysty a přeneseny do EBSS média obsahujícího 0,5% roztok směsi žlučových solí a 0,5% roztok trypsinu; do 2 hodin se excystovalo 100 % metacerkárií.

Další zmínky v literatuře se týkají pouze nevyjasněného druhu *Fasciola* sp., který vznikl pravděpodobně křížením *F. hepatica* a *F. gigantica* (Itagaki et al., 2005). Týmu japonských vědců (Kawano et al., 1987) se podařilo v několika fázích postupně excystovat 64 %

metacerkárií během asi 18 hodin. Nejprve byla provedena inkubace 18 h ve vodě při pokojové teplotě s následným třením cyst v kapce vody mezi dvěma sklíčky. Dále byly cysty ošetřeny 0,2% roztokem HCl s 1% pepsinem při teplotě 37°C. Aktivace proběhla ve dvou krocích, nejdřív byly metacerkárie inkubovány 1 h ve vodě probublávané 5% oxidem uhličitým s 0,35% Na₂S₂O₄ a poté byly cysty přeneseny do upraveného HBSS média (Smith and Clegg, 1981) a inkubovány v atmosféře obsahující 5 % oxidu uhličitého po dobu 18 h. Po přenesení do čistého média HBSS se začaly metacerkárie z cyst uvolňovat.

Transformace metacerkárií fasciolidních motolic na juvenilní stádia

Kultivaci dospělých fasciolidních motolic v *in vitro* podmínkách předchází transformace metacerkárií (které byly získány buď z přirozeně, nebo z experimentálně infikovaných plžů; viz výše) a následná kultivace juvenilů až do stádia dospělce.

Během vývoje *F. hepatica* od metacerkárie po dospělce *in vivo* bylo pozorováno např. postupné větvení střeva, nejprve na dvě větve a postupně vzniká asi 13 postranních laloků na každé větvi střeva. Po třech až osmi dnech od excystace v tenkém střevě hostitele se větvi i gonády, tvoří se testes, později jsou viditelná i ovaria a vaječná žláza. Z rudimentu buněk uskupených do tvaru přesýpacích hodin, pozorovatelného už u cercárií, se tvoří cirrus a uterus (Dawes, 1962, 1961).

Bylo prokázáno, že *F. hepatica* dospívá v přirozených podmínkách po 63-70 dnech, *F. gigantica* a *F. buski* přibližně po 90 dnech a *F. magna* asi 7 měsíců po infekci (Mas-Coma et al., 2005; Gupta, 1992; Foreyt and Todd, 1976; Dow et al., 1968).

Wikerhauser (1960) udržel v *in vitro* systému juvenilní jedince *F. hepatica* těsně po excystaci až 42 hodin v TBSS médiu. Wikerhauser spolu s Cvetnícem (1967) testovali vliv přítomnosti buněčných kultur z různých tkání savčích hostitelů na vývoj juvenilních motolic. Juvenilní motolice prospívaly lépe v přítomnosti buněk, v nejlepším případě se však dařilo motolice udržet naživu 14 dní, navíc bez patrného růstu nebo vývoje. O rok později se stejným autorům podařilo prodloužit přežití červů na 29 dnů díky časté výměně kultivačního média a buněk, vývoj však nepozorovali. Zjistili, že esenciální je přítomnost buněk v kultuře nezávisle na jejich tkáňovém původu (Wikerhauser et al., 1968).

Davies a Smyth (1978) dosáhli u jedinců kultivovaných v médiu NCTC-135 s přidavkem 50% kuřecího séra a ovčích erytrocytů znatelného růstu i vývoje trávicí soustavy. Po týdnu už bylo patrné rozdělení caeca na dva laloky a po dvou týdnech i sekundární větve. Rozvoj genitálií se ale zastavil brzy po zahájení kultivace a motolice přežily jen 18 dní (Davies and Smyth, 1978). Autoři (Davies and Smyth, 1978) experiment opakovali s přidavkem 50% séra získaného z jiného kuřete v médiu a někteří červi přežili až 51 dní, avšak bez vývoje.

Smith a Clegg (1981) se pokoušeli kultivační metody dále standardizovat, a proto pracovali ve sterilních podmínkách. Metacerkárie byly inkubovány v médiu RPMI-1640, obsahujícím 50% lidské krevní sérum a 2 % lidských erytrocytů a vykazovaly rychlý růst,

částečný vývoj uteru a cirru a primordií testes. Pokus byl ukončen po 2 týdnech, kdy přežívala pouze polovina chovaných motolic. Několik červů však již dosahovalo velikosti $7 \times 3,5$ mm, přičemž byl již plně vyvinut uterus, cirrus a vytvořila se vitellaria u dvou jedinců byla k vidění i spermatozoa. Ovaria zůstala u všech jen rudimentární a k produkci vajíček nedošlo.

U dalších druhů motolic z této čeledi jsou informace s ohledem na juvenilní stadia omezené. Bylo zjištěno, že juvenilní motolice *F. gigantica* přežijí v MEM médiu s 10-20% FBS a v přítomnosti telecích buněk ze slinivky minimálně 60 dní, přičemž během prvních 25 dní zvětší velikost těla až čtyřikrát (Hanna and Jura, 1976; Hanna et al., 1975).

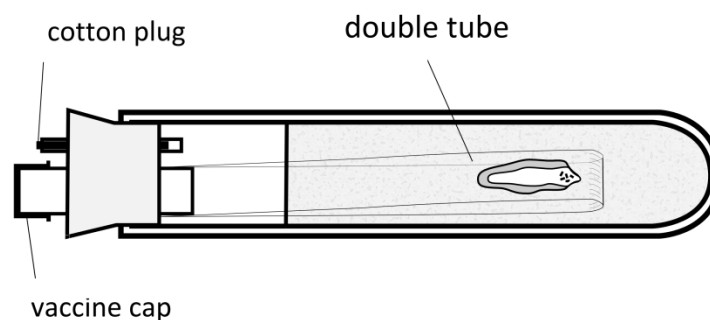
Znalosti kultivace juvenilních motolic *F. magna* jsou prozatím velmi omezené. Fried a Stromberg (1985) udrželi při životě čerstvě excystované metacerkárie v Lockeho roztoku při 42°C jen 24 h.

Kultivace dospělců fasciolidních motolic získaných z definitivního hostitele

Na jatkách nebo při pitvě definitivních hostitelů je možné získat dospělá stadia fasciolidních motolic. Takové jedince lze využít pro některé další biologické experimenty nebo i k získání vajíček. Často je však mnohem vhodnější mít k dispozici populaci červů stejně starých, kteří byli vykultivováni v totožných podmínkách.

První pokusy o kultivaci dospělých jedinců *F. hepatica* nebyly příliš úspěšné a motolice přežily v *in vitro* podmínkách nanejvýš 12 hodin (Müller, 1923; Flury and Leeb, 1926; Weinland and Brand, 1926; dle Clegg, 1956). Stephenson (1947) ze svých rozsáhlých experimentů odvodil optimální kultivační podmínky – těmi jsou přídavek monosacharidů raději než disacharidů, pH 8,4-8,6, teplota 36°C a aerobní prostředí. V alkalickém Ringerově roztoku obsahujícím 2,28% borax a 0,53 % glukózy přežívali dospělci *F. hepatica* asi 60 h (Stephenson, 1947). Dawes (1954) publikoval krátký příspěvek o kultivaci dospělců *F. hepatica* v Hédon-Fleig médiu s 0,1% glukózou, v němž červi přežívali 12 dní. Ve své práci zdůraznil nutnost výběru zaručeně živých červů určených ke kultivaci a pokusil se také o jejich sterilní odběr z jater. Clegg (1956) vylepšil Dawesovu (1954) metodu získávání dospělců *F. hepatica* z jater o další stupně sterilizace a motolice kultivoval pomocí „dialyzační trubičky“ vyrobené z celulózy, tzv. cellulose tubing (Obr. č. 3). Tuto trubičku umístil dovnitř skleněné zkumavky s Hédon-Fleig médiem s 0,1% glukózou. Semipermeabilní dialyzační membrána byla proděravěna pomocí špendlíku, aby se z média dostalo k motolici více živin. Zkumavka byla během experimentu umístěna horizontálně. V tomto aparátu červi přežívali asi 19 dní (jeden jedinec dokonce 34 dní) a po celou dobu vykazovali stále stejnou míru aktivity, což je v kontrastu s červy udržovanými jen volně ve zkumavce, kteří byli abnormálně aktivní během prvních 24 hodin, avšak hynuli už po několika málo dnech.

Obr. č. 3: Kultivace dospělců *F. hepatica* v dialyzační trubičce (podle Clegg, 1956).



Složení kultivačního média se pokoušel zdokonalit Rohrbacher (1957), který použil vlastní médium s 20% extraktem z jaterního macerátu a 1% extraktem komerčně dostupných substancí z jater (Crude Liver Extract). Dospělci *F. hepatica* se v tomto prostředí při 37°C a pH média 8,5 dožili až 3 týdnů. Z přidávaných monosacharidů je podle Rohrbachera (1957) nejvhodnější glukóza nebo fruktóza, motolice však přežily i v roztoku obsahujícím glycerol. Přídavek cholesterolu, pyruvátu, nebo glutamátu jejich život zkracoval a galaktóza, sacharóza, maltóza, ribóza a sorbitol se ukázaly být naprosto nevhodné. Wikerhauser a Cvetnić (1967) zjišťovali vliv přítomnosti buněk různého typu z několika druhů definitivních hostitelů nejen na mladé motolice, ale i na dospělé *F. hepatica*. Zjistili, že nezávisle na původu a typu buněčných kultur přežily dospělé motolice v jejich přítomnosti překvapivě kratší dobu (2 dny) než v čistém médiu (5 dní).

V médiu EBSS s 30% telecím sérem a 10% telecí krví jsou schopni dospělci *F. hepatica* klást vajíčka, která jsou však pravděpodobně neplodná (Ractliffe et al., 1969). Lehner a Sewell (1979) potvrdili vhodnost použití telecího séra v kultivačním médiu EBSS ve vyšších (80%) koncentracích a navrhli udržovat dospělé *F. hepatica* v aparatuře s nepřetržitým proudem vzduchu.

Ideální médium přežívání dospělců *F. hepatica* *in vitro* podmínkách je podle Fostera (1970) EBBS obohacené o 36% LAH a komerčně dostupné směsi 3,6% MEM Vitamin Solution, 3,6% L-glutamin a 7,2% MEM Amino Acid Concentrate, při pH média 6,9 a teplotě 28°C. Na jatkách získaní jedinci v tomto médiu přežili i 16 dní. Autor však poskytuje jen málo podrobností o výhodách své metody.

3. Čeleď Schistosomatidae

Čeleď Schistosomatidae (kmen: Platyhelminthes, podkmen: Neodermata, třída: Trematoda, podtřída: Digenea, řád: Diplostomida, podřád: Diplostomata), zahrnuje v současnosti 14 uznávaných rodů (*Austroilharzia*, *Bivitelloilharzia*, *Heterobilharzia*, *Macrobilharzia*, *Ornithobilharzia*, *Schistosomatium*, *Schistosoma*, *Gigantobilharzia*, *Dendritobilharzia*, *Bilharziella*, *Trichobilharzia*, *Jilinobilharzia*, *Alloilharzia* a

Anserobilharzia) a kolem 100 druhů, přibližně 30 savčích a 67 ptačích (Brant and Loker, 2013; Olson et al., 2003).

Níže v textu se budu blíže zabývat jen dvěma nejvýznamnějšími a nejprozkoumanějšími druhy:

Schistosoma mansoni (6-12 × 1 mm samci, 10-16 × 0.2 mm samice) je rozšířená na území Afriky, Arabského poloostrova a Jižní Ameriky. Dospělci parazitují v portální žíle a mezenteriálních cévách člověka. Dále mohou v přírodě infikovat i některé druhy zvířat (Gryseels et al., 2006; Martins, 1958).

Schistosoma japonicum (6-12 × 0.8 mm samci, 12-20 × 0.3 mm samice) se vyskytuje na území Číny, Filipín a Indonésie, je schopná infikovat mnoho druhů savců, jako jsou psi, opice, prasata, kozy, ovce, dobytek a hlodavce, vážné zdravotní problémy působí i lidem. Dospělci *S. japonicum* jsou lokalizováni především v portální žíle definitivních hostitelů (Gryseels et al., 2006; Ho, 1963).

3.1 Životní cyklus čeledi Schistosomatidae

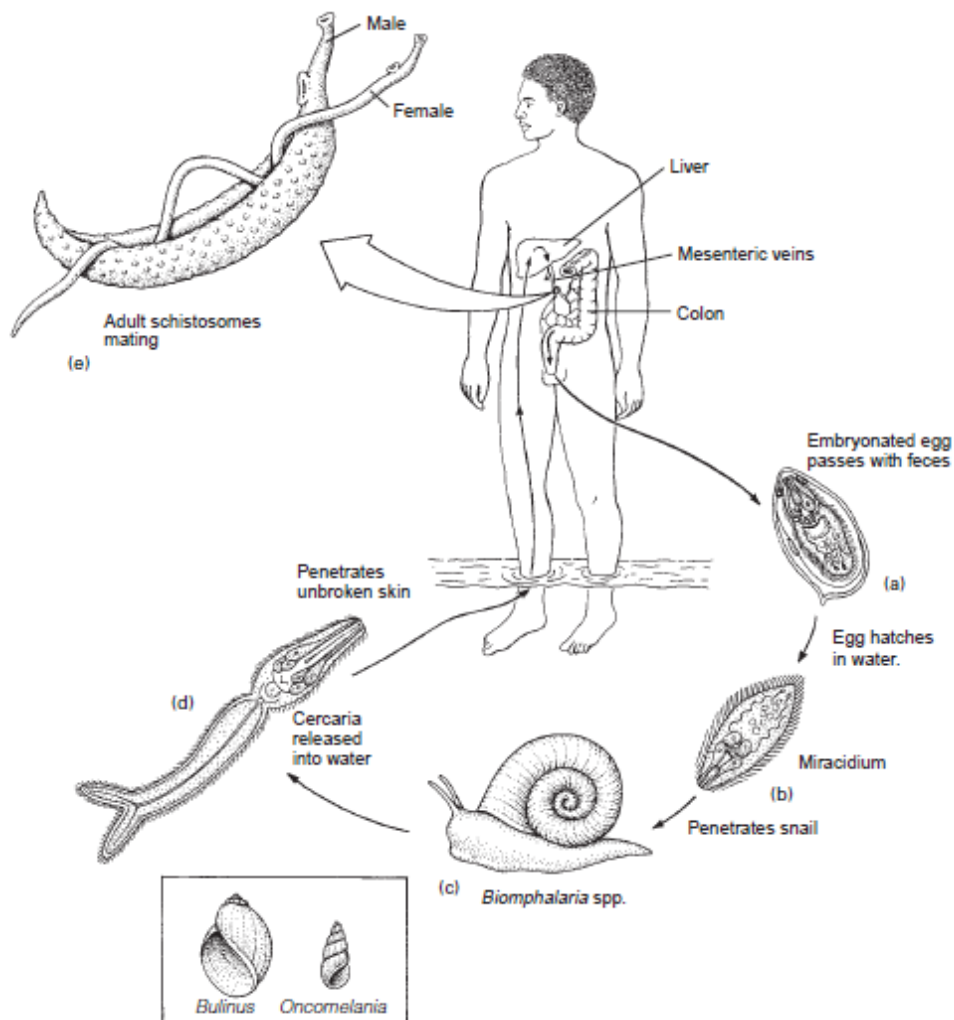
Zástupci čeledi Schistosomatidae jsou dvouhostitelské motolice s odděleným pohlavím a výrazným pohlavním dimorfizmem, vyhledávající jako mezihostitele vodní plže. U *S. mansoni* slouží jako mezihostitel rod *Biomphalaria*, a u *S. japonicum* je to *Oncomelania* spp. Vývoj tyto motolice dokončují ve vaskulárním systému endotermických definitivních hostitelů (Gryseels et al., 2006).

Životní cyklus čeledi Schistosomatidae (příklad *S. mansoni*, Obr. č. 4)

Dospělí jedinci *S. mansoni* (e) žijí v žilách odvádějících krev ze střev hostitele směrem do jater. Samičky nakladou vajíčka (a), která migrují do lumen střeva. Odsud jsou vylučována do vnějšího prostředí a po kontaktu s vodou je vyvolána aktivace miracidia (b) a jeho líhnutí. Miracidium aktivně vyhledává sladkovodního mezihostitelského plže (c), přičemž se řídí světelnými a chemickými signály. V plžím mezihostiteli podstoupí miracidium v místě, kudy vniklo do jeho těla (nejčastěji v plášťové dutině a oblasti hlavy nebo nohy) vývoj ve stádium sporocysty, která ze svých zárodečných buněk dává vznik dceřině sporocystě vyvíjející se dále v hepatopankreatu. Po 4-6 týdnech od nákazy plže vznikají v těle dceřině sporocysty shluky buněk budoucích cercárií (d). Cercárie musí po opuštění plže ve vodním prostředí najít vhodného definitivního hostitele do 24-48 hodin, proniká do jeho těla kůží a ztrácí přitom ocásek a glykokalyx. Schistosomula, jak se nyní stádium nazývá, měří kolem 118 × 32 μm. Po minimálně 3 dnech migruje z kůže krevním řečištěm přes plíce do jater, kam se dostává 8. dnem po infekci. Po 10 dnech se spojují výběžky střeva, následuje vývoj testes a uteru a tvorba spermatozoí. Vývoj ovárií začíná po 28 dnech, kdy se dospělci spárují s jedinci opačného pohlaví a migrují do drobnějších mezenterických cév. Samice produkují po

35 dnech vajíčka (Gryseels et al., 2006; Wilson et al., 1978; Cheng and Bier, 1972; Smithers and Terry, 1965; Chernin, 1964; Stirewalt, 1963).

Obr. č. 4: Životní cyklus schistosom (Roberts et al., 2009).



3.2 Kultivace motolic čeledi Schistosomatidae

S ohledem na *in vitro* kultivační experimenty motolic bylo zdaleka nejvíce pozornosti věnováno právě zástupcům motolic z čeledi Schistosomatidae, především *S. mansoni*.

Několik málo experimentů bylo kromě *S. mansoni* a *S. japonicum* zaměřeno také na kultivace dalších druhů schistosomních motolic, např. zástupce rodu *Austrobilharzia*, *Trichobilharzia* a *Schistosomatium* (Chanová et al., 2009; Basch and O'Toole, 1983; Chu and Oie, 1964).

3.2.1 Kultivace larválních stádií z mezihostitelských plžů

Jak již bylo zmíněno, larvální stádia vyvíjející se v mezihostitelských plžích jsou důležitou součástí životního cyklu motolic, přičemž se výzkumu biologie larválních stádií druhů z čeledi Schistosomatidae (miracidium, sporocysta a cercárie) stále věnuje velký počet vědeckých

skupin. Nejjednodušším způsobem zajištění larválních stádií schistosom jsou experimentální infekce typických mezihostitelských plžů, ať už získaných z přírody či z laboratorního chovu. U *S. mansoni* je to především *B. glabrata*, a v případě *S. japonicum* plž *O. hupensis* (Yang et al., 2007; Schreiber and Schubert, 1949). V naší laboratoři dlouhodobě udržujeme laboratorní cyklus 2 druhů ptačích motolic *Trichobilharzia regenti* a *T. szidati*. Úspěšná transformace a kultivace larválních stádií v *in vitro* podmínkách však může zajišťovat určité výhody.

Vajíčko

K líhnutí miracidí schistosom jsou vyžadovány podmínky výrazně odlišné od poměrů, které jsou v těle definitivního hostitele, kde by miracidium nemělo šanci na přežití. Těmi jsou snížení teploty na optimum kolem 34°C, osmolalita vody kolem 50 mOsm daná přítomností moči nebo solí ve vodě a koncentrace kyslíku. Takové podmínky většinou není obtížné v laboratoři zjistit. Ve tmě dochází obecně k výraznému zpomalení líhnutí; u *S. japonicum* indukuje světlo až 60% nárůst počtu líhnoucích se vajíček. Líhnutí je u *S. mansoni* pasivní proces, iniciovaný nejspíš osmotickým tlakem vodního prostředí (Samuelson et al., 1984; Sugiura et al., 1954; Magath and Mathieson, 1946).

Miracidia, sporocysty a produkce cercárií:

Po opuštění vajíčka má miracidium jen omezený čas pro nalezení vodního plže. Miracidia *S. mansoni* vyžadují ve vodě přítomnost sodných iontů, jinak se přestávají během 5-10 minut pohybovat (Samuelson et al., 1984). Při vyhledávání mezihostitele miracidium reaguje na světlo, teplotu vody a plžem produkované makromolekulární látky (Haberl et al., 1995; Haas et al., 1991; Samuelson et al., 1984). Miracidia schistosom se transformují do stádia mateřské sporocysty při teplotách kolem 24°C přibližně za 40 dní od infekce plže. Cercárie se vyvinou při teplotách 24-30°C po asi 30-70 dnech od vniknutí miracidia do plže, přičemž při vyšších teplotách dojde sice k urychlení vývoje, ale také ke snížení doby přežití plže (Yang et al., 2007; Schreiber and Schubert, 1949).

O *in vitro* transformaci miracidí *S. mansoni* ve sporocysty se jako jedni z prvních pokoušeli Targett a Robinson (1964) ve tkáňovém extraktu *L. stagnalis*, v němž sporocysty následně přežívaly až 63 hodin; v jednom případě došlo i k vývoji zárodečných buněk uvnitř sporocysty. Muftic (1969) zkoušel miracidia umístit do sterilní hemolymfy plže *B. glabrata* s přídatkem minimálně 0,001 % substance podobné α -ekdyzonu, izolované z mladých *B. glabrata*. Podle publikace se podařilo dosáhnout vývoje až po cercárie, autor však poskytuje jen velmi sporé informace o průběhu i výsledcích experimentu. Žádnému dalšímu vědci se zatím nic podobného nepodařilo. Voge a Seidel (1972) pozorovali transformaci miracidí a vývoj sporocyst *S. mansoni* v upraveném BME médiu s přídatkem 20% koňského séra. Během týdne došlo k odvržení ciliárních destiček, protažení těla, dediferenciaci nervového systému, ztrátě terebratoria, formaci vakuoly v zadní části těla a nárůstu

sporocysty na $180-300 \times 28-40 \mu\text{m}$. Totéž testovali i v médiu EBSS se 7% koňským sérem v monoxenické kultuře obsahující myší fibroblasty nebo opičí ledvinové buňky. V tomto případě si larvy udržely vejčitý tvar těla a po 12 dnech vyrostly na $200 \times 40 \mu\text{m}$. Celý experiment byl ukončen po 3 týdnech, kdy sice sporocysty žily, ale nedocházelo již k žádnému dalšímu růstu a vývoji. Samuelson et al. (1984) transformoval 70-90 % miracidíí ve sporocysty za použití různých médií: BME upraveného podle Voge a Seidel (1972), dále RPMI-1640, MEM a HBSS. Všechna se ukázala být podobně vhodná, ale ke kompletní úspěšné transformaci byl nezbytný aspoň krátký kontakt miracidíí s APW, tedy laboratorně připravenou rybniční vodou o přesně daném složení.

Yoshino a Laursen (1995) nejprve transformovali miracidia *S. mansoni* v CBSS médiu a mladé mateřské sporocysty poté přenesli do BGE média s buňkami BGE. Během prvních 20 dní sporocysty až čtyřnásobně vyrostly a během 30-45 dní kultury se vyvinuly dceřiné sporocysty. Ivanchenko et al. (1999) si pro kultivační experiment opatřila sporocysty *in vitro* transformací miracidíí, která nechala přes noc v médiu F s 1% BSA. Získané mladé sporocysty kultivovala společně s buňkami BGE v médiu připraveném z médií F, DMEM/F-12 a BGE v poměru 1:1:2 a s přidavkem 5 % produktu Serum Plus a 5 % FBS. Během prvních 7 dní se sporocysty obalily plžmi buňkami až na trojnásobnou velikost. Do 5 týdnů od začátku této kultury se uvnitř mateřských sporocyst vyvinuly i dceřiné sporocysty.

Bixler et al. (2001) získal i kultivoval sporocysty *S. mansoni* podle Ivanchenko (1999), ale bez přidavku Serum Plus. Namísto toho použil 10 % FBS a celé médium filtroval přes buňky BGE; během 3-4 týdnů se u 98 % sporocyst vyvinuly dceřiné sporocysty. Tímto byla získána spolehlivá metoda umožňující produkci dceřiných sporocyst bez přítomnosti buněk mezipřehostitele. Bender et al. (2002) navázal na práci týmů Bixlera a Ivanchenko (2001; 1999) a odhalil toxickou složku hemolymfy, která komplikovala předchozí kultivace sporocyst – volné radikály vznikající trávením hemoglobinu. Jejich účinky se podařilo neutralizovat přidáním katalázy do kultivačního média.

Sporocysty *S. mansoni*, získané pitvou z infikovaných *B. glabrata* 40 dní po infekci, kultivovala Chernin (1964) v médiu CBSS s tkáněmi trávicí trubice či ovotestis plže a po týdnu došlo k vývoji cercárií. V další části experimentu chtěla autorka ověřit, zda dochází k vývoji cercárií i uvnitř sporocyst získaných z plžů v polovičním čase vývoje než v případě prvního experimentu. Za tím účelem byly při stejných podmínkách použity sporocysty získané již 19 nebo 20 dní po infekci plže. Tentokrát došlo k uvolnění jen několika málo cercárií ze sporocyst po 9-13 dnech kultivace.

DiConza a Hansen (1973) dosáhli u dceřiných sporocyst v HBSS médiu obohaceném o 0,65% LAH, 10% FBS, 10% ultrafiltrát ze slepičích vajec a 0,01% BSA v přítomnosti komářích buněk (*Aedes albopictus*, AAL) růstu sporocyst a po 25 dnech i vývoje zárodečných shluků buněk, z nichž vznikají cercárie. DiConza a Basch (1974) dále zkoušeli dceřiné

sporocysty *S. mansoni* kultivovat v axenické kultuře v médiu bohatém na aminokyseliny, vitamíny a organické kyseliny s 20% lidským sérem (NHS). Po týdnu pozorovali nárůst sporocyst z původních 150 × 10 μm na 350 × 20 μm a po dvou týdnech dosáhly některé délky 350-400 μm. Tou dobou se začaly formovat malé shluky zárodečných buněk cercárií a sporocysty byly v této fázi vývoje implantovány do neinfikovaných plžů *B. glabrata*, kteří po 20-46 dnech začali produkovat cercárie. Buecher et al. (1974) umístil mateřské sporocysty *S. mansoni* do 30% SDM média s přidavkem 10% FBS a 0,2% galaktózy. Pro přežití a vývoj sporocyst je dle něj zásadní nízká koncentrace kyslíku, ideálně kolem 1 %, a zvýšená koncentrace CO₂ na 0,5 % v kombinaci s přidavkem thiolové složky do média, optimálně 0,10mM dithiothreitol, nebo 1,50mM směs cysteinu a glutathionu.

Hansen (1975) kultivoval mateřské sporocysty *S. mansoni* izolované z *B. glabrata* s BGE ve směsi médií M-260 a S-301. Média smíchal v poměru 1:1 a přidal 0,5 % FBS a 4,5 % hemolymfy z *B. glabrata* infikovaného miracidii *S. mansoni* (později označováno jako BGE médium). Po 12 dnech měřily sporocysty 370 × 60 μm, došlo k formaci shluků zárodečných buněk cercárií a plaménkové buňky vykazovaly aktivitu. Největší sporocysty, měřící i 700-1500 × 90-155 μm, přežily v kultuře i 38 dní a po následné implantaci do *B. glabrata* byly schopné dokončit larvální vývoj do 53 dní.

Voge a Seidel (1972) experimentovali kromě miracidii *S. mansoni* za stejných podmínek také s miracidii *S. japonicum*. Po přenesení miracidii do kultivačního média s BGE docházelo k odvrhování ciliárních destiček, během 5 týdnů však k zásadnímu vývoji nedošlo a velikost mateřských sporocyst zůstala přibližně stejná (160 × 72 μm). Na rozdíl od těchto výsledků Coustau et al. (1997) úspěchu dosáhl. Umístil miracidia *S. japonicum* do BGE média s buňkami BGE a transformace v mateřské sporocysty začala během 48 hodin, přičemž po 11 týdnech nacházel v médiu samostatné dceřiné sporocysty, které žily i 14 dní a dorostly průměrné délky 770 × 48 μm. Oproti kultivacím *S. mansoni* však nedošlo k obklopení sporocyst BGE buňkami a vývoj probíhal výrazně pomaleji než v primárním mezihostitelském plži *Oncomelania hupensis*. Na tyto experimenty se neúspěšně navázaly týmy Peng et al. (2002) nebo Ye et al. (2007), když se pokoušely izolovat kulturu buněk *O. hupensis* (dle Ye et al., 2013).

Transformacemi miracidii *S. japonicum* v mateřské sporocysty v různých médiích se zabýval Kawanaka et al. (1985). S kultivačními médii EBSS, MEMSE-J a RPMI-1640 s přidaným 10% FBS dosáhl po 48 h 81-84% transformace. Kultivace pokračovala ještě 16 dní, kdy v EBSS médiu přežívalo 83 % jedinců a v MEMSE-J 100 %. Později bylo zjištěno, že sporocysty *S. japonicum* přežijí v médiu RPMI-1640 s 10% králíčím sérem a přidavkem serotoninu až 48 dní (Mei and Zhou, 1988, 1989; dle Ye et al., 2013). Zhu et al. (2012) přidával do RPMI-1640 média 1% roztok proteinů izolovaných z hlavové části a nohy plže *O. hupensis*, což pozitivně ovlivnilo rychlost růstu i dobu přežití sporocyst až na 58 dní.

Jiným směrem se vydal Jiang et al. (2011; dle Ye et al., 2013), když miracidia inkuboval v médiu SF-900 II SFM společně s oocyty hmyzu *Spodoptera frugiperda* (tzv. SF9 buňky); po 1 dni byly v transformovaných sporocystách viditelné shluky zárodečných buněk a během dvaceti dnů se sporocysty obalily SF9 buňkami, ale nebyly pozorovány další známky vývoje.

Jak již bylo řečeno výše, jsou dostupné informace pro ostatní druhy schistosomních motolic prozatím kusé. Vhodné médium podporující transformaci miracidí i následný růst a vývoj sporocyst ptačí motolice *Trichobilharzia ocellata* objevili Mellink a Bovenkamp (1985). Použili médium podle DiConza a Basch (1974) s přídatkem 20% NHS nebo koňského, králíčího či kachního séra o osmolalitě 110 mOsm, ideálně 135 mOsm. Následná kultivace sporocyst se dařila pouze s přídatkem 20% NHS nebo FBS, přičemž přítomnost kachního séra působila na červy toxicky. Po 10 dnech kultury měřily sporocysty 700 × 40 μm, poté se růst zastavil a sporocysty jen přežívaly dalších 3-7 týdnů. Mateřské sporocysty získané z plžích mezihostitelů přežily za stejných podmínek 3 týdny a během prvních 25 h začala produkce dceřiných sporocyst, které bez dalšího růstu nebo vývoje přežívaly po dobu 2 týdnů. Dceřiné sporocysty získané přímo z plžích mezihostitelů v kultuře zastavily embryonaci a přežily 5 až 6 týdnů. Došlo ale k dozrání cercárií, jejichž embrya byla založena ještě za života sporocysty v plži.

Pro miracidia a následně i mateřské sporocysty *Trichobilharzia ocellata* navrhl Schallig et al. (1990) použití jednoduchého kultivačního média MSM, vyznačujícího se absencí látek jako jsou např. aminokyseliny, vitamíny, které by mohly interferovat s biochemickými analýzami. Miracidia se transformovala úspěšně v mateřské sporocysty, které však přežily v následné kultuře jen několik dní.

3.2.2 Kultivace stádií z definitivních hostitelů

V těle definitivních hostitelů schistosom se vyskytují vývojová stadia schistosomuly a dospělé motolice. Na schistosomulách se provádí mnohé imunologické studie, studie genové exprese a testování léčiv a vakcín, jelikož jsou z hlediska boje proti parazitům zranitelnější než dospělci (Damian, 1987). To je také jeden z důvodů, proč je věnována velká pozornost získávání schistosomul transformacemi cercárií. Když si představíme, jak náhlou změnu prodělá cercárie při transformaci na schistosomulu (přechod z vnějšího prostředí do vnitřního prostředí v těle hostitele) s následným spuštěním mnoha fyziologických procesů, tak lze předpokládat, že transformace cercárií a kultivace schistosomul není snadnou záležitostí.

Transformace cercárií a následná kultivace schistosomul:

Mnoho vědců se v minulosti potýkalo s definicí schistosomuly a v experimentech byly organismy transformované z cercárií posuzovány podle několika znaků. Patří mezi ně ztráta ocásku, schopnost přežít ve fyziologickém roztoku (nikoliv ve vodě), vyprázdnění

preacetabulární žlázy, ztráta glykokalyx a aglutinační reakce v séru (Brink et al., 1977; Stirewalt et al., 1966). Schistosomuly pro další experimenty získáme nejlépe transformací cercárií získaných z infikovaných meziphostitelských plžů, dosud se totiž nepodařilo transformovat cercárie získané z *in vitro* kultivací larválních stádií schistosom.

Počáteční nepříliš úspěšné snahy o získání schistosomul *S. mansoni* z cercárií zahrnovaly např. stimulaci stejnosměrným elektrickým proudem 25 mA o různých napětích a v různých intervalech (Stirewalt et al., 1966). Postupně bylo navrženo několik metod vhodných k získávání schistosomul, které se dají rozdělit obecně na průnik kůže laboratorních definitivních hostitelů *S. mansoni*, mechanické oddělení ocásku a kultivaci v médiu.

- *Transformace cercárií průnikem kůže laboratorního definitivního hostitele*

Stirewalt et al. (1966) navrhli zařízení ke sběru schistosomul, vzniklé úpravou aparátu určeného pro krmení hmyzu. V aparatuře byla natažena pokožka izolovaná z břicha myši a cercárie, které pokožkou pronikaly, se dostávaly do sběrného média HBSS. Úspěšnost metody činila 30-40% transformovaných cercárií. Později byl experiment zopakován za stejných podmínek, vědci se zaměřili na faktory ovlivňující průnik do kůže a zjistili, že významně záleží na rozdílu teploty vodného roztoku obsahujícího cercárie a sběrného média, do něhož se cercárie po průniku kůže dostávají (Stirewalt and Uy, 1969). Optimálně by teplota vodného roztoku měla být 28°C a teplota sběrného média 37°C. Důležitý je také počet cercárií ve vodném roztoku, typ kožní membrány a složení sběrného média. James and Taylor (1976) sbírali schistosomuly 3 h po průniku cercárií myši kůže do EBSS s přísadkou LAH. Úspěšnost metody činila 51 %. Stejnou metodu zopakovali s podobným úspěchem i Brink et al. (1977).

- *Transformace cercárií mechanickým odstraněním ocásku*

Opakovanou centrifugací cercárií *S. mansoni* při pokojové teplotě či 0-5°C a jejich následnou inkubací při 31°C v HBSS se pokoušeli realizovat Gazzinelli et al. (1973). Podle autorů by dostatečným stimulem pro zahájení vývoje ve schistosomulu měla být teplota a těsný kontakt s ostatními cercáriemi při centrifugaci, kterým by došlo k mechanickému oddělení ocásků. Metodu vylepšili Ramalho-Pinto et al. (1974), když cercárie zbavené ocásků pomocí vortexování ve studené vodní suspenzi přenesli do morčecího séra, v němž je inkubovali po dobu 80 minut při teplotě 37°C. Schistosomuly získali s úspěšností 90-100 %. Později byl experiment zopakován, avšak jen s 19,4% úspěšností (James and Taylor, 1976). Tiba et al. (1974) odstranili ocásky cercárií *S. mansoni* opakovaným vortexováním cercárií a následná kultivace v médiu 199 při 30°C na 40 minut vyvolala vyprázdnění preacetabulární žlázy. Celá přeměna ve schistosomulu byla dokonána další inkubací v médiu 199 při 37°C po dobu 60 minut. Brink et al. (1977) nejprve cercárie imobilizovali v ledové lázni, a následně je v HBSS médiu opakovaně vortexovali a inkubovali v EBSS s 0,5% LAH. Červi ztratili glykokalyx, ale nedošlo k vyprázdnění preacetabulární žlázy.

Jinou cestou se vydali Colley a Wikel (1974), kteří zvolili pasírování cercárií přes injekční jehlu. Po 10-14× pasážích dali cercárie inkubovat do RPMI-1640 s 2% NHS při 5% atmosféře CO₂ a 37°C. James a Taylor (1976) experiment opakovali s 96% úspěšností, když jej rozšířili o následnou inkubaci 40 minut při 30°C v EBSS. S další variantou metody přišel Basch (1981a), který cercárie nasával 12× přes jehlu a po oddělení ocásků z roztoku pomocí centrifugace umístil cercárie do BME s 5% NHS v 5% atmosféře CO₂. Milligan a Jolly (2011) vydali protokol, popisující téměř 100% získávání schistosomul *S. mansoni*. Nejprve cercárie imobilizovali na ledě ve tmě, a poté je asi 20× pasírovali přes jehlu. Následovala inkubace v RPMI-1640 s 5% FBS při 37°C a 5% atmosféře CO₂. Schistosomuly vydržely následně naživu až 6 týdnů. Coultas a Zhang (2012) vyzkoušeli metodu podle protokolu (Milligan and Jolly, 2011) se závěrem, že je velmi účinná, podobně jako nemechanický způsob, který provedli paralelně.

- *Transformace cercárií inkubací v médiu*

Cercárie *S. mansoni* se mohou vyvíjet ve schistosomuly i bez použití mechanických prostředků. Stirewalt (1970) zjistila, že pro penetraci cercárií *S. mansoni* kůži hostitele představují důležitý stimul lipidy z kůže. K vývoji schistosomul *S. mansoni* z cercárií navíc není potřeba přímý kontakt tkáně hostitele, jak vyplynulo z pokusů, kdy byly cercárie uzavřeny v difúzních komůrkách implantovaných do peritoneální dutiny myši, v nichž došlo k jejich transformaci ve schistosomuly (Eveland, 1972).

Stimulační vliv lipidů se v rámci rozsáhlé studie rozhodla otestovat skupina vědců Gilbert et al. (1972) se závěrem, že nejdůležitější frakci lipidů představují pro cercárie fosfolipidy a transformace cercárií ve schistosomuly se tedy dá navodit čerstvým sójovým lecitinem v koncentraci mezi 0,05-0,5 mg/ml vody s 50-80% úspěšností transformace, nebo vaječným lecitinem ředěným 51× vodou s účinností 90 %. Podle vědců, kteří se experiment snažili zopakovat (James and Taylor, 1976; Eveland and Morse, 1975) ale schistosomuly v takových roztocích rychle hynou.

Důležitým stimulem ke konverzi cercárií se ukázala být přítomnost séra v médiu, kdy se při inkubaci v EBSS s 50 % králíčího séra úspěšně vyvíjely schistosomuly vykazující senzitivitu na vodní prostředí, bez ocásků, s vyprázdněnými preacetabulárními žlázami a bez glykokalyx (Eveland and Morse, 1975). Brink et al. (1977) zkoušel cercárie inkubovat v EBSS s 50% čerstvým krysím sérem; během dvou hodin ztratily glykokalyx a ocásky.

Coultas a Zhang (2012) vyzkoušeli transformaci cercárií ve schistosomuly inkubací v RPMI-1640 s L-glutaminem a přísadkou 5% FBS při 37°C po dobu čtyř dní. Tuto metodu doporučili jakožto snazší v porovnání s metodou mechanické transformace vědců Milligan a Jolly (2011).

Transformací cercárií *S. japonicum* ve sporocysty se zabývá podstatně méně literatury. Nemechanicky lze cercárie transformovat v médiu NCTC-109 s obsahem 50 % NHS, kdy by

mělo dojít do 8 hodin k vyprázdnění preacetabulárních žláz a ke ztrátě cercariálních ocásků a do 72 hodin by mělo již být přítomno 70-80 % transformovaných schistosomul (Yasuraoka et al., 1978).

- *Transformace cercárií dalších zástupců čeledi Schistosomatidae*

Cerkárie havajské ptačí motolice *Austrobilharzia variglandis* transformovali přes oškrábanou kuřecí kůži Chu et al. (1962) s úspěšností až 60 %. Cerkárie pronikaly přes kůži do kuřecí plazmy, ve které byly inkubovány při teplotě 37°C dva dny.

Chanová et al. (2009) transformovali cercárie *Trichobilharzia regenti* a *T. szidati* mechanickým způsobem – pasírováním přes jehlu a následnou inkubací při 37°C nebo 39°C v médiích BME, IMDM, RPMI-1640, L-15 nebo SCM s 10% FBS.

Kultivace schistosomul

Bylo učiněno mnoho pokusů o *in vitro* vývoj mladých motolic, ať už získaných předchozí transformací cercárií v laboratorních podmínkách, nebo vyoperovaných z těla předem nakažených laboratorních modelových zvířat, především myši (*Mus musculus*) a křečků zlatých (*Mesocricetus auratus*). V následujícím textu jsou zmíněny kultivační pokusy týkající se *S. mansoni* a *S. japonicum*; jsou rozděleny podle původu kultivovaných schistosomul.

- *Schistosomuly získané z kůže myši*

Clegg (1965) získal z myši kůže schistosomuly *S. mansoni* půl hodiny po nákaze, poté je umístil na EBSS s 50% přídatkem králíčího séra, 1% králíčích erytrocytů, 0,5 % LAH a 0,1% glukózy. Pro kultivaci použil aparaturu dialyzačních trubiček, kterou testoval už v případě *F. hepatica* (Clegg, 1956, viz kapitola 2.2.2), dovnitř trubičky umístil schistosomulu i erytrocyty. Po 6 dnech se u schistosomul vyvinula testes a ovaria, další vývoj ale neproběhl.

Larvy *S. japonicum*, získané z kůže myši půl hodiny po infekci, byly až 41 dní udržovány naživu v médiu 199 s přídatkem FBS a králíčích erytrocytů, během této doby došlo pouze k vývoji testes a ovárií (Lin et al., 1985, 1983; dle Ye et al., 2013).

- *Schistosomuly získané z plic myši*

Clegg (1959) zkoušel kultivovat plicní schistosomuly *S. mansoni*, získané z myši 7 dní po infekci, v médiu shodném s tím, které použili Cheever a Weller (1958) pro larvy získané z jater myši (viz níže). Roztok si však upravil použitím 50% králíčího séra a králíčích erytrocytů. Navíc se pro zdárný vývoj ukázala být nezbytná přítomnost LAH, který byl použit v koncentraci 0,25 %. Po 4 týdnech se u samců vyvíjela testes obsahující spermatozoa a u samic malá ovaria, která se však již nevyvíjela. Později Clegg (1965) použil EBSS s 50% králíčím sérem, 1% králíčími erytrocyty, 0,1% glukózou a 5% LAH; u schistosomul byl zaznamenán 42 dní od začátku kultury i vývoj vitellárií.

- *Schistosomuly z portální žíly křečků a myši*

Schistosomuly *S. mansoni*, získané po 11 dnech po infekci křečků zlatých, udržel při životě až 58 dní Robinson (1957) v TBSS s 33% koňským sérem a 0,2% glukózou. Schistosomuly získané z laboratorně infikovaných myši po 16-18 dnech byly kultivovány v médiu HBSS s 50% koňským sérem a 10 % CEE, v němž se začali po 1 měsíci kultivace jednotliví jedinci párovat s červy opačného pohlaví (Cheever and Weller, 1958).

Schistosomuly *S. japonicum* z portální žíly myši, staré 18 dní, se vyvíjejí v médiu M-841 s přidávanými zvětšenými světlými erytrocyty inkubovanými v 0,38% NaCl (tzv. ghost cells). V takové kultuře motolice začaly po 45 dnech produkovat neplodná vajíčka (Hua et al., 1988; dle Ye et al., 2013).

- *Kultivace schistosomul získaných in vitro transformací cercárií*

Ne všechny metody transformace cercárií jsou ve výsledku rovnocenné a získané schistosomuly se mohou lišit schopností dospět během následující *in vitro* kultivace (Brink et al., 1977).

Tiba et al. (1974) zkoušeli kultivovat schistosomuly *S. mansoni* získané vortexováním kombinovaným s následnou inkubací při vyšších teplotách v upraveném médiu EBSS (Clegg, 1965), ve kterém docházelo po 40 dnech k párování červů. Získané schistosomuly byly po injikaci do žil myši schopné pokračovat ve vývoji. Stejných výsledků párování schistosom dosáhli i Yasuraoka et al. (1978) s médiem NCTC-109 a 50% králíčím sérem.

Porovnání vývoje schistosomul získaných různými transformačními *in vitro* metodami provedl Brink et al. (1977). Schistosomuly *S. mansoni* získané průnikem myši kůže dosáhly stavu propojení střevních výběžků po 12 dnech v počtu 50-70 %. Oproti tomu schistosomuly mechanicky či v séru transformované tohoto stavu dosáhly 12. den pouze v počtech 25-50 %. Všechny byly kultivovány v médiu EBSS s přísádky podle Clegg (1965), ale s lidským sérem místo králíčího. Médium EBSS obohacené podle Clegg (1965) použili i Michalick et al. (1979), když kultivovali schistosomuly získané z cercárií transformací ve stejném médiu. Stavů spojeného střeva dosáhlo jen 33 % červů po 34 dnech.

Jiným způsobem problematiku pojal Basch (1981b), který využil ke kultuře mechanicky transformované cercárie *S. mansoni*. Vložil je do média BME s přísádkem 0,1% LAH, 10% lidského séra, erytrocytů a směsí hormonů (tzv. médium 169). Ke spojení střevních výběžků došlo 11. den a k vytvoření párů docházelo od 50. dne kultivace. V navazujícím experimentu dospělci udržovaní v médiu už od stádia cercárie produkovali v 10 % případů vajíčka, která byla ale jen malá a bez obsahu zárodečných buněk (Basch, 1981a). Clemens a Basch (1989) zjistili, že 0,025% přísádek transferinu z 90 % saturovaného železem namísto séra má na kulturu schistosomul pozitivní vliv v podobné míře jako sérum.

Mechanicky transformované schistosomuly *S. japonicum* kultivoval Ye et al. (2012) v DMEM s 10% FBS a lidskými jaterními endoteliálními buňkami (ED25), pozitivně ovlivňují vývoj červů.

- *Kultivace schistosomul dalších zástupců z čeledi Schistosomatidae*

Schistosomuly *S. haematobium* izolované z portální žíly a mezenterických cév křečka zlatého a další, získané *in vitro* průnikem myši kůže, byly kultivovány v EBSS upraveném podle Clegg (1965), ale s použitím séra a erytrocytů od lidských dárců namísto králíčích. Stádia spojení střevních výběžků schistosomuly dosáhly po 22 dnech a 31. den se u sameček objevila i spermatozoa. K dalšímu vývoji však nedošlo až do ukončení experimentu po 75 dnech (Smith et al., 1976).

Cerkárie *T. ocellata* ve schistosomuly transformovali Howell a Bourns (1974) 20 minutovou inkubací v EBSS ohřátém na 40°C a následným přenesením cercárií na pruhy vlhkého celofánu překrývající kůži izolovanou z třídních kachňat. Schistosomuly přežily 22 dní v EBSS médiu s přísadkou podle Clegg (1965), se změnami v koncentraci LAH na 0,25 % a použitím kachního či kuřecího séra s odpovídajícími erytrocyty.

Chanová et al. (2009) se věnovali vývoji schistosomul *Trichobilharzia szidati* a *T. regenti*, získaných mechanickou transformací cercárií. Testovali média, která jsou v dnešní době komerčně dostupná: RPMI-1640, BME, IMDM, L-15 a SCM (médiu 169 bez přísadky séra). Do všech médií přidali 10 % BSA a erytrocyty, případně homogenizovanou nervovou tkáň u *T. regenti*. Jako nejvhodnější se ukázalo být médium SCM, i když u schistosomul obou motolic nedošlo k vývoji reprodukčních orgánů.

Schistosomuly *Schistosomatium douthitti* je možno kultivovat v médiu 169 až po jedince produkující vajíčka, která jsou však nefertilní (Basch and O'Toole, 1983).

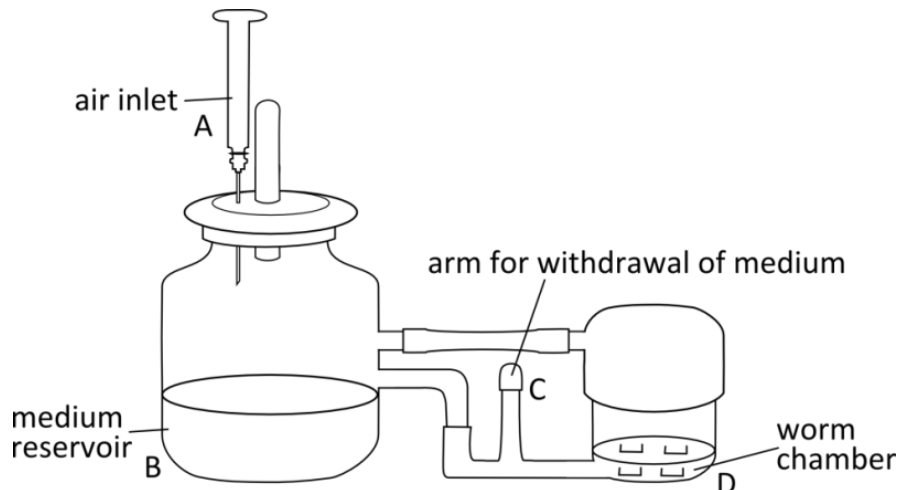
Kultivace plicních schistosomul *A. variglandis*, izolovaných z plic rybáků (*Sterna*), v médiu 199 s přísadkou 25% kuřecího séra, 2% kuřecích erytrocytů a 10% CEE vedla jen ke zvětšení jejich velikosti až trojnásobně během dvou týdnů (Chu et al., 1960). Chu a Oie (1962) zkoušeli testovat vývoj schistosomul získaných z kůže holubů v médiu 199 se 40 % koňského séra, 10% BEE a holubími erytrocyty. Po měsíci bylo stále naživu 70 % organismů, které vyrostly na několikanásobek původní délky.

Dospělé motolice z čeledi Schistosomatidae *in vitro*

Dospělé *S. mansoni* získané z portálního systému myši 6-8 týdnů po infekci cercáriemi přežijí v čistém koňském nebo volském séru 14-18 dní (Ross and Bueding, 1950). V médiu HBSS s přísadkou 5% koňského séra, 5% BEE, 45% bovinní plodové vody a myších erytrocytů umožňuje červům přežití až 87 dní, avšak tyto neprodukují vajíčka (Senft and Weller, 1956). Robinson (1960) použil ke kultivaci dospělých již spárovaných červů koňské sérum s přísadkou 0,1 % glukózy. Někteří jedinci vydrželi v párech i několik dní a během

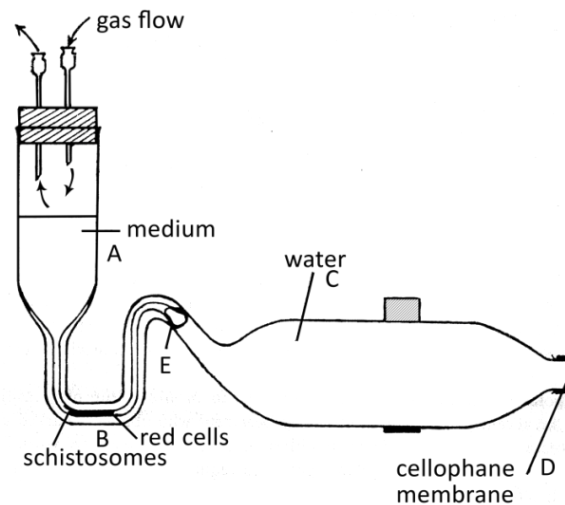
prvních 10 dní vykladli průměrně 150-200 vajíček, jejichž životaschopnost však nebyla ověřena. Ve speciálně konstruovaném aparátu (Obr. č. 5) přežívaly schistosomy v médiu TBSS s 33,3% morčecím sérem i 14 dní a kladly až 62 vajíček denně. Aparatura se skládala ze zásobníku média (Obr. č. 5B), napojeného skleněnou trubicí na komůrku (Obr. č. 5D) obsahující na dně 4 nízké skleněné nádobky. Tato kultivační komůrka byla přiklopena skleněným víkem a propojena se zásobní láhví pomocí polyethylenové hadičky, což umožnilo vyrovnání tlaku vzduchu mezi oběma nádobami. Zásobní láhev byla naplněna kultivačním médiem těsně pod výstup skleněné trubičky propojující obě nádoby a kultivační komůrka s nádobkami byla naplněna médiem asi ¼ cm nad vrchol malých nádobek uvnitř komůrky. Výměny média byly prováděny injekční stříkačkou z ramene skleněné spojovací trubice (Obr. č. 5C). Červi byli umístěni po jednom páru do každé nádobky v kultivační komůrce. Vstup vzduchu byl umožněn díky injekční stříkačce zavedené skrz víčko zásobní nádoby (Obr. č. 5A).

Obr. č. 5: Aparát pro dospělé *S. mansoni* (upraveno podle Robinson, 1960).



Další kultivační aparaturu (Obr. č. 6) pro dospělé *S. mansoni* navrhl i Clegg (1961), který vyslovil názor, že opoždění vývoje schistosom v *in vitro* podmínkách oproti situaci v definitivním hostiteli je způsobeno inhibičním efektem metabolitů vylučovaných červy, především kys. mléčné. Kultivační médium proto bylo odváděno ze zásobníku (Obr. č. 6A) úzkou kapilárou (Obr. č. 6B) postupným odpařováním vody přes celofánovou membránu (Obr. č. 6D). Rychlost toku závisela na míře výparu přes tuto membránu, což bylo dáno relativní vlhkostí a teplotou okolního vzduchu a úpravou plochy membrány. Ve vodním zásobníku (Obr. č. 6C) byla udržována malá bublinka vzduchu (Obr. č. 6E) ve vstupu do kapiláry, která oddělovala médium od vody. Toto zařízení, napojené na nepřetržitý proud 7% CO₂, by mělo škodlivé metabolity ihned odvádět od kultivovaných červů.

Obr. č. 6: Zařízení pro dospělce *S. mansoni* (upraveno podle Clegg, 1961).



3.3 Kultivace buněk izolovaných z různých životních stádií schistosom

Pro účely některých experimentů není nutné kultivovat celé červy, ale může postačit kultivace jejich buněk či tkání. Kultury buněk či tkání získaných ze schistosom mají potenciálně velké využití pro mnohé buněčné, molekulární či imunologické studie. Dosud však nebyly takové buněčné linie rutinně zavedeny, i když bylo zaznamenáno několik pilotních pokusů. Buňky je možno izolovat ze tkání červa např. použitím ostrých nůžek, skalpelu či elektronických přístrojů rozrušujících tkáň s následnou inkubací kusů tkáně v roztoku obsahujícím trypsin či speciální krabí kolagenázu (Bayne et al., 1994; Hobbs et al., 1993; Weller and Wheeldon, 1982).

Jako jedni z prvních se pokusili o kultivaci buněk z dospělých *S. mansoni* v médiu Weller a Wheeldon (1982). Buňky trypsinizovaných červů přežily minimálně 28 dní v médiu 1779, které si autoři sami navrhli. Buňky však přežily, jen pokud byl udržen fyzický kontakt s fragmentem rodičovské tkáně obsahujícím živé buňky.

Hobbs et al. (1993) získal buňky z juvenilních *S. mansoni* 18 dní po nákaze myši a přenesl je na čisté médium SM, kde přežily až 4 týdny. Když byly současně kultivovány s buněčnou linií z myších jater (BRL 3A), zvýšila se schopnost buněk přežít až na 6 měsíců. Dále s buňkami z juvenilních motolic získaných 12-21 dní po infekci myši experimentovali Bayne a Barnes (1997), kteří testovali médium BME upravené podle Basch (1981b) zároveň s kulturou BRL 3A buněk. Za takových podmínek vydržely buňky *S. mansoni* naživu až 8 měsíců.

Buňky získané ze tkání sporocyst *S. mansoni* byly kultivovány ve směsi média F a SM v poměru 1:1 s přidavkem 10% FBS. Nejdéle byly schopné přežít buňky zárodečné a u plaménkových buněk byla pozorována aktivita po dobu 30 dní, kontrakční pohyby svalových buněk byly patrné i 35 dní od nasazení kultury. Pozitivní efekt měl na buňky přidavek hemocytů *B. glabrata* nebo BGE (Bayne et al., 1994). (1997) vylepšili tuto metodu o přidavek albuminu obohaceného o lipidy do média a následnou filtraci kultivační směsi

médií přes SF9 buňky. V takových podmínkách byly udržovány při životě i buňky dceřiných sporocyst *S. mansoni* (Bayne and Barnes, 1997).

Buňky získané z dospělců *S. japonicum* je možno kultivovat v médiu DMEM/F-12 a schistosomuly v médiu 199, obojí s 10% telecím sérem (Dong et al., 2002).

Bylo dosaženo také pasírování buněk *S. japonicum* odvozených od miracidí, cercárií a 30 denních dospělců, kultivovaných na RPMI-1640 s 10% FBS obohaceném o blíže nespecifikované růstové faktory (Liu et al., 2006; Zhang et al., 2002; dle Ye et al., 2013).

4. Kultivace zástupců dalších čeledí motolic

Třída Trematoda je rozdělena do podtříd Aspidogastrea a Digenea, přičemž Digenea dle současné nomenklatury zahrnují dva řády, Diplostomida a Plagiorchiida. V rámci Trematod najdeme více než 140 čeledí (Olson et al., 2003). Pokusy o kultivaci jednotlivých vývojových stádií motolic z mezihostitelů či definitivních hostitelů byly zaznamenány u 21 čeledí.

podtřída Digenea, řád Diplostomida

V tomto řádu Digeneí byla nejvíce experimentálně zkoumána kultivace zástupců čeledi Schistosomatidae (viz výše) a Diplostomatidae (viz níže).

podtřída Digenea, řád Diplostomida, podřád Diplostomata

- *čeleď Diplostomatidae*

Motolice *Diplostomum spathaceum* parazituje u ptáků, její metacerkárie žijí v očích sladkovodních ryb. Tato motolice se stala předmětem experimentů vědců Kannangara a Smyth (1974), kteří zjistili, že pro kompletní vývoj od metacerkárie ve vajíčka kladoucí dospělce je nezbytný přídavek vaječného žloutku nebo alikvotu macerátu kompletního slepičího vejce. V médiu NCTC-135 s příměsí 14 % vaječného žloutku, 14 % vaječného bílku a několika kapkami 10% CEE a 1% kvasinkového extraktu došlo ke kladení vajíček během 10-12 dní, avšak jen v malém množství. Leno a Holloway (1986) kultivovali metacerkárie na CAM 5-12 denních kuřecích embryí se ziskem 13 % dospělců. Jeden červ z tohoto experimentu vyprodukoval vajíčko, které bylo schopné embryonace. Irwin a Saville (1988) zvýšili úspěšnost vývoje v dospělce na 20-30 % při kultivaci metacerkárií pod allantois kuřecích embryí přidáním kuřecího séra. Opět však pouze jediný červ nakladl jedno životaschopné vajíčko.

Metacerkárie *Diplostomum phoxini* dokončují svůj vývoj běžně v ptácích. První pokus o kultivaci metacerkárií získaných z mozku mezihostitelské ryby – střeve *Phoxinus phoxinus* provedl Bell a Hopkins (1955) v TBSS s 1% glukózou a 20-45 % koňského séra; motolice přežily 5-6 dní. Velkých pokroků dosáhli Kannangara a Smyth (1974), když za stejných podmínek, jaké využili pro kultivaci *D. spathaceum*, došlo v případě *D. phoxini* ke kladení

vajíček již po 4 dnech kultivace. Zjistili také, že při 4°C je možno metacerkárie uskladnit v TBSS médiu na dobu delší než 2 měsíce.

Posthodiplostomum minimum parazituje především u ptáků, metacerkárie se vyskytují v rybách. Metacerkárie tohoto druhu se podařilo kultivovat po dobu 1 měsíce v TBSS médiu, ředěném v poměru 5:3 vodou a s přidavkem několika kapek séra z mladých kuřat a kvasinkového extraktu. Na konci kultivační periody (1 měsíc) někteří jedinci produkovali neživá a deformovaná vajíčka. Při pokusech o kultivaci na CAM umírali červi brzy po zahájení experimentu (Ferguson, 1940).

Motolice *Fibricola seoulensis* parazituje především u hlodavců, je ale schopná infikovat i člověka (Sung Tae Hong, 1984). Její metacerkárie, získané pitvou infikovaných hadů *Rhabdophis tigrinus*, vykazovaly po 16 dnech kultivace vývoj reprodukčních orgánů srovnatelný se stavem po 2-3 dnech *in vivo*. Pro kultivaci bylo použito médium NCTC-109 nebo NCTC-135 s přidavkem 20 % vaječného žloutku, části macerovaného vejce, či 0,5 % komerčně dostupného kvasinkového extraktu. Při experimentech *in ovo* (tedy v neoplozených slepičích vejcích) na kuřecí CAM došlo i ke kladení vajíček, která však byla deformovaná. Živé, infekceschopné metacerkárie této motolice lze skladovat až 200 dní v HBSS nebo TBSS při teplotě 4°C (Seo, 1989).

- *čeled' Strigeidae*

Jedná se obecně o motolice ptáků, případně savců žijících se rybami, obojživelníky, plži či plazy.

Metacerkárie zvané tetrakotyly druhů *Apatemon cobitidis proterorhini* a *Cotylurus erraticus* se pokoušeli *in vitro* kultivovat Stewart et al. (2003) v NCTC-135 médiu s 50% kuřecím sérem a 25% vaječným bílkem. Po 5 dnech kultury docházelo k vývoji dospělců, kteří produkovali vajíčka, ta však neobsahovala zárodečné buňky.

Magnus a Johnson (1985) získali kultivací tetrakotyly *Cotylurus flabelliformis* po 72 h ovigerní jedince, vajíčka však nebyla schopná embryonace. Použili médium NCTC-135 s přidavkem 50% kuřecího nebo kachního séra.

Podobných výsledků bylo dosaženo u *Cotylurus strigeoides* na NCTC-135 se 40% kuřecím sérem a 20% extraktem hlenu z kuřecího střeva. Vajíčka se začala objevovat po 6 dnech, ovšem byla opět abnormální a tedy neživotaschopná (Fried et al., 1978).

Poměrně dobře rozpracovali problematiku kultivací Basch et al. (1973), když navázali na experimenty Voge a Jeong (1971) při kultivaci tetrakotyly *Cotylurus lutzi* v médiu NCTC-135. Dříve používané 50% kuřecí sérum však nahradili přidavkem 40% kuřecího séra a 20% extraktu z kuřecího srdce, jater, svalů, střevní stěny nebo extraktu hlenu ze střev. Tímto způsobem se podařilo po 1-3 dnech získat dospělé, kteří kladli větší počet vajíček, z nichž asi 10 % bylo morfologicky v pořádku, ovšem k líhnutí miracidí docházelo pouze v přítomnosti 20% extraktu střevního hlenu. Miracidia byla po vylíhnutí schopná infekce *B. glabrata*.

V plžích dále docházelo k larválnímu vývoji až po stádium cercárie, kterými byl úspěšně experimentálně infikován ptačí definitivní hostitel – zebříčka *Taeniopygia guttata*.

- *čeleď Clinostomatidae*

Metacercárie ptačí motolice *Clinostomum marginatum*, získané z rybích mezihostitelů, byly kultivované v médiích TBSS, TBSS bez obsahu sodíku a MEM. Nevykazovaly po 4-5 dnech kultivace žádný vývoj, ale červi vpravení na kuřecí CAM při experimentech *in ovo* migrovali do vaječného bílku, kde jich dospělo 6,5 % (Larson and Uglem, 1990).

- *čeleď Leucochloridiomorpha*

Motolice *Leucochloridiomorpha constantiae* běžně parazituje ve Fabriciově burze ptáků. Metacercárie jsou schopny dospět při kultivaci na kuřecí CAM a následně produkují vajíčka s vyvinutými miracidii, vývoj je však pomalejší než v případě *in vivo* (Fried and Holmes, 1979; Harris et al., 1972). Metacercárie mohou dospívat i v médiu NCTC-135 s 20 % vaječného žloutku (Fried and Contos, 1973). U dospívajících jedinců kultivovaných v médiu i na CAM bylo pozorováno v 50-100 % případů párování červů, přestože *L. constantiae* je hermafroditní motolice (Fried and Roberts, 1972).

- *čeleď Brachylaimidae*

V této čeledi bylo experimentováno s motolicí *Amblosoma suwaense*, která primárně parazituje ve střevě kachen. Metacercárie v *in vitro* podmínkách produkovaly embryonace schopná vajíčka už po 4 dnech kultivace v NCTC-135 médiu s 20% přídavkem žloutku ze slepičích vajec (Schnier and Fried, 1980).

- *čeleď Cyathocotylidae*

Kultivační experimenty s metacercáriemi motolice *Cyathocotyle bushiensis* byly realizovány v médiu NCTC-135 s 20% přídavkem vaječného žloutku. Během 3 dnů začali červi produkovat životaschopná vajíčka. Za použití 50% kuřecího séra namísto žloutku byli červi ovigerní až 8. den, dosahovali však mnohonásobné velikosti v porovnání s kultivací v přítomnosti žloutku (Fried and Ramundo, 1987).

podtřída Digenea, řád Plagiorchiida

Do řádu Plagiorchiida je zařazována většina podřádů třídy Trematoda, přičemž publikované kultivační experimenty jsou zaměřeny především na podřády Echinostomata a Xiphidiata.

podtřída Digenea, řád Plagiorchiida, podřád Echinostomata

Nejprostudovanější jsou z hlediska kultivací z tohoto podřádu zástupci čeledi Fasciolidae (viz výše) a jim blízké příbuzné čeledi Echinostomatidae (viz níže).

- *čeleď Echinostomatidae*

Jedná se především o ptačí motolice. Na základě kultivačních experimentů bylo zjištěno, že mateřské sporocysty *Echinostoma caproni* přežijí až 17 týdnů v kultuře s BGE buňkami v BGE médiu s přidavkem 10% FBS. Během kultivace probíhal ve sporocystách zárodečný vývoj, k produkci další generace však nedocházelo, a to i přes to, že *E. caproni* je v experimentálně infikovaných plžích *B. glabrata* schopna dokončit larvální vývoj (Ataev et al., 1998). V dalších experimentech bylo prokázáno, že metacerkárie této motolice se vyvíjejí až po dospělce produkující vajíčka na kuřecí CAM šestidenních embryí v 17-22,5 % případech (Fried and Rosa-Brunet, 1991; Rosa-Brunet and Fried, 1992). Na kuřecí allantois narůstají červi do větších rozměrů a dospívají dříve než je tomu v případě CAM, procento ovigerních plžů však zůstalo podobné, 18-24 % (Chien and Fried, 1992).

U dalšího echinostomního zástupce *Echinostoma revolutum* byly metacerkárie opět kultivovány na kuřecí CAM, kde dospívaly jen částečně. Stejným způsobem kultivování preovigerní dospělci však vývoj dokončili a během 7-14 dní kladli vajíčka (Fried et al., 1968). Nezvyklého výsledku dosáhli Fried a Pentz (1983), v jejich experimentech byl totiž pohlavní vývoj na CAM dokončen za stejnou dobu jako vývoj v kuřatech. Červi kultivovaní na CAM však dosáhli podstatně menšího vzrůstu, než měli ti izolovaní z kuřat. V médiu NCTC-135 s 40 % kuřecího séra a 10% extraktem střevního mukusu kuřete dosahuje *E. revolutum* během 8 dní růstu a vývoje reprodukčních orgánů srovnatelného s růstem a vývojem v kuřatech po 2 dnech od infekce (Fried and Kim, 1989). Dospělci získaní z kuřat 13-15 dní po infekci kladli vajíčka na dvojfázovém médiu tvořeném 1:1 směsí 0,8% agaru a DME s 10% FBS během 48 hodin. Přestože se jedná o hermafrodity, tvořily echinostomy v médiu páry (Fried and Vates, 1984).

Další experimenty v rámci této čeledi byly provedeny s rediemi *Himasthla elongata* (dospělci parazitují u vodního ptactva, které se nakazí pozřením různých druhů škeblí). Redie byly kultivovány v médiu L-15 ředěném sterilní mořskou vodou, kde přežívaly 70-163 dní při 14°C a produkovaly cercárie (Gorbushin and Shaposhnikova, 2002). V tomto experimentu se cercárie po encystaci spontánně do 2 týdnů excystovaly a dále se vyvíjely do stádií juvenilních motolic.

Lloyd a Poulin (2011) zjistili, že redie *Acanthoparyphium* spp. přežijí v médiu L-15 s 20% kuřecím sérem až 29 dní.

- *čeleď Psilostomatidae*

U metacerkárií ptačí motolice *Sphaeridiotrema globulus* lze v *in vitro* podmínkách dosáhnout vývoje dospělců kladoucích vajíčka po 126 dnech; vajíčka jsou schopna embryonace. Nejvhodnějším médiem se ukázalo být NCTC-109 s 20% vaječného žloutku a teplota 41°C. Vývoj byl však ve srovnání s přirozenými podmínkami (produkce vajíček po 68 h) výrazně opožděn (Berntzen and Macy, 1969).

- *čeleď Philophthalmidae*

V pokusech s rediemi rodu *Philophthalmus* tyto přeživaly až 56 dní v médiu získaném smícháním médií F a L-15 v poměru 1:1 s přídatkem 20% kuřecího séra při osmolalitě 954 mOsm (Lloyd and Poulin, 2011).

- *čeleď Cyclocoelidae*

Dospělé motolice *Cyclocoelum microstomum* parazitují ve vzdušných váčcích ptáků. Experimenty byly prováděny s rediemi získanými transformací miracidí v médiu složeném z 0,9% roztoku NaCl s přídatkem 18,75% králičího séra, 20% CEE a 16,25 % roztoku dle Carrikera (1946). Redie byly kultivovány na dvoufázovém médiu, kde pevnou fází představoval 2% agar, a vodnou již zmíněné médium, použité už k transformaci miracidí. Redie přeživaly pouze 12 dní bez růstu a vývoje (Ingersoll, 1956).

- *čeleď Paramphistomatidae*

Zástupci rodu *Paramphistomum* spp. jsou běžnými a rozšířenými parazity přežvýkavců. O kultivaci dospělců izolovaných z bachoru experimentálně nakažených ovcí se pokoušel kolektiv Huesca-Guillén et al. (2007). Dospělci v jejich experimentech přežívali v Rohrbacherově médiu (Rohrbacher, 1957) až 11 dní. Metacerkárie excystované podle postupů Smith a Clegg (1981) přežily následně v Hédon-Fleig médiu 10 dní.

podtřída Digenea, řád Plagiorchiida, podřád Xiphidiata

Z této skupiny byli kultivováni hlavně zástupci čeledi Paragonimidae, mezi kterými najdeme i pro člověka patogenní motolice.

- *čeleď Paragonimidae*

Zástupci této významné čeledi zpravidla parazitují v plicích saveců včetně člověka, kteří se nakazí požitím infikovaného mezihostitelského korýše.

Metacerkárie nejvýznamnějšího druhu této čeledi, *Paragonimus westermani*, dosáhly po 203 dnech kultivace v TBSS s 25-50% kočičím sérem a erytrocyty až dvanáctinásobné velikosti a měly vyvinutý uterus a testes (Yokogawa et al., 1955). Podobný pokus realizoval i Kannangara (1974) v médiu NCTC-135 s 40% lidským sérem, 2% kvasinkovým extraktem, 10% CEE a lidskými erytrocyty a také na dvoufázovém médiu s krevním agarem. V obou případech musel být experiment předčasně ukončen z důvodu kontaminace už 43. den, touto dobou však jeden z červů již začal produkovat nezralá vajíčka.

Druh *Paragonimus miyazakii* byl *in vitro* kultivován v médiu NCTC-109 s 30% králičím sérem, 50% vaječným žloutkem a králičími erytrocyty od stádia metacerkárií a během 172 dní se vytvářel u metacerkárií uterus a testes (Hata et al., 1987).

Metacerkárie *Paragonimus ohirai* v médiu NCTC-109 se 30% psím sérem, 10% kvasinkovým extraktem a s přídatkem psích erytrocytů dokázaly dospět a produkovat neživotaschopná vajíčka. Za stejných podmínek a ve stejném médiu přežívali dospělci

P. ohirai získání pitvou nakažené krysy až 60 dní, během kterých taktéž kladli vajíčka (Hata et al., 1987).

- *čeleď Microphallidae*

Úspěšnou kultivaci motolice *Microphallus turgidus*, parazitující u vodních ptáků, zavedli Pung et al. (2009). Metacerkárie tito autoři získávali z mezihostitelské krevety *Palaemonetes pugio* a kultivovali je v RPMI-1640 s 20% koňským, případně telecím sérem při 37°C. Po 10-12 dnech začali dospělci produkovat vajíčka. Miracidia z takto získaných vajíček byla infekceschopná a experimentálně se jimi podařilo nakazit prvního mezihostitele – plže *Spurwinkia salsa* a následně cercáriemi dokonce i mezihostitelskou krevetou.

Podobně úspěšné byly i kultivační pokusy s ptačí motolicí *Maritrema novaezealandensis*. Ovigerní jedinci byli získáni kultivací metacerkárií (izolovaných z krabů rodu *Macrophthalmus* a *Halicarcinus*) v médiu NCTC-109 s 20% nebo 40% kuřecím sérem již po 2 dnech kultury při teplotě 40°C (Fredensborg and Poulin, 2005). Dále bylo experimentálně zjištěno, že sporocysty této motolice je možné udržet v životaschopném stavu 42 dní v médiu smíchaném z médií F a L-15 v poměru 1:1 s přídavkem 20 % kuřecího séra a osmolalitě 954 mOsm (Lloyd and Poulin, 2011).

- *čeleď Brachycoeliidae*

Grano-Maldonado a Álvarez-Cadena (2010) úspěšně kultivovali *in ovo* metacerkárie druhu *Cymatocarpus solearis*, motolice parazitující mořské želvy. Po 24 dnech byla v uteru nalézána vajíčka bez patrných změn v morfologii.

- *čeleď Gymnophallidae*

Motolice *Parvatrema timondavidi* se vyvíjí v ptácích i savcích, v přírodě je jejím častým hostitelem ústřičník (*Haematopus ostralegus*). Metacerkárie mohou být kultivovány v médiu NCTC-109 s 20% kuřecím sérem nebo FBS při teplotě 37°C nebo 41°C až do stádia ovigerních dospělců během cca 144 h (Yasuraoka et al., 1974).

podtřída Digenea, řád Plagiorchiida, podřád Opisthorchiata

Z podřádu Opistorchiata je věnováno nejvíce pozornosti čeledím Heterophyidae a Opistorchiidae, které jsou významné z pohledu humánní medicíny.

- *čeleď Heterophyidae*

Metagonimus yokogawai je významný zástupce této čeledi, parazituje ve střevě rybožravých savců a člověka. Tento druh motolice byl kultivován od stádia metacerkárií po dospělé, kteří po 12 dnech měli v děloze vajíčka, vitellaria však nebyla plně vyvinuta. Ke kultivaci byla použita směs média NCTC-109, 40% CEE a 30% lidského séra při 37,5°C. Podle autorů je k vývoji vitellarií nezbytné oplození jiným jedincem, přestože se jedná o hermafroditní druh (Yasuraoka and Kojima, 1970).

Haplorchis taichui parazituje u savců včetně člověka. Tento druh motolice je možné poměrně úspěšně kultivovat ve dvoufázovém médiu RPMI-1640 s 15% krevním agarem od metacerkárií až po dospělé, kteří během 6 dnů tvoří vajíčka (Chaithong et al., 2001).

- *čeleď Opisthorchiidae*

Uddin et al. (2012b) zkoušeli experimentálně testovat schopnost přežívání dospělých motolic významného druhu *Clonorchis sinensis*, který v přirozených podmínkách parazituje ve žlučovodech rybožravých obratlovců včetně člověka. Pro kultivaci se jako vhodné médium osvědčilo RPMI-1640 a IMDM při teplotě 37°C, ve kterých bylo možné udržet dospělé motolice izolované z přirozeně infikovaných hostitelů až 114 dní. Kultivace byla opakována za použití IMDM, v němž dospělci produkovali vajíčka již od prvního dne v počtech kolem 5 000 vajíček na červa za den. Po 21 dnech však došlo ke snížení produkce na méně než 100 vajíček a od 90. dne vajíčka neobsahovala miracidia (Uddin et al., 2012a).

Dalším významným druhem motolice z této čeledi je *Opisthorchis viverrini*, parazitující podobně jako *C. sinensis* u rybožravých savců i člověka. Pitvou experimentálně nakažených křečků zlatých byly získány dospělé motolice, které přežívaly asi 50 dní v médiu BME s 5% lidskou žlučí nebo 1% lidským či křeččím sérem. Klazení vajíček však ustalo po 10-14 dnech kultivace (Tuti et al., 1982).

podtřída Digenea, řád Plagiorchiida, podřád Bucephalata

V rámci podřádu Bucephalata byl učiněn jediný kultivační pokus, a to u zástupce čeledi Bucephalidae *Bucephaloides gracilescens*, motolice specificky vyhledávající jako definitivní hostitele mořské ďasy, *Lophius piscatorius* (Eydal et al., 1998).

- *čeleď Bucephalidae*

Metacerkárie *B. gracilescens* dospívaly a kladly abnormální vajíčka po 14 dnech kultivace v NCTC-135 médiu s 25 % kuřecího séra, 25 % vaječného žloutku a 25 % bílku při 18°C (Halton and Johnston, 1983).

podtřída Aspidogastrea

V rámci této podtřídy byl proveden pravděpodobně jediný experiment, kdy Cleave a Williams (1943) zkoušeli udržet v *in vitro* podmínkách naživu dospělé motolice *Aspidogaster conchicola* z čeledi Aspidogastridae, izolované z dutin perikardia a ledvin mušlí *Obovaria olivaria* a *Leptodea fragilis*. Jelikož se jedná o parazity mušlí, hadů, ryb i želv, byla kultivace prováděna v hemolymfě mušlí při teplotě 2-9°C. V tomto prostředí motolice přežívaly 30-72 dní.

5. Závěr

U žádného zástupce třídy Trematoda se dosud nepodařilo kultivovat všechna jeho stádia souvisle od vajíčka až po dospělé produkujícího opět životaschopná vajíčka.

Dílčích úspěchů však bylo dosaženo u kultivací jednotlivých vývojových stádií z různých fází životního cyklu některých druhů motolic. Největšího pokroku bylo dosaženo při *in vitro* kultivaci larválních stádií *F. magna* a *S. mansoni*. Z miracidíí získaných z mezihostitelských plžů a transformovaných v kultivačním médiu byly dále získány až redie a dceřiné sporocysty (Ivanchenko et al., 1999; Laursen and Yoshino, 1999; Yoshino and Laursen, 1995).

Vývoj od stádia metacerkárie po dospělé produkujícího životaschopná vajíčka byl zdokumentován např. u *D. spathaceum*, *C. lutzi*, *L. constantiae*, *A. suwaense*, *E. caproni*, *S. globulus*, *M. turgidus*, *C. solearis* a *C. bushiensis* (Grano-Maldonado and Álvarez-Cadena, 2010; Pung et al., 2009; Fried and Rosa-Brunet, 1991; Irwin and Saville, 1988; Fried and Ramundo, 1987; Leno and Holloway, 1986; Schnier and Fried, 1980; Fried and Holmes, 1979; Basch et al., 1973; Berntzen and Macy, 1969). Zřejmě největšího úspěchu dosáhl Basch et al. (1973), když jeho tým *in vitro* kultivoval z metacerkárií *C. lutzi* až ovigerní dospělé a miracidii z vajíček těchto dospělců infikovali mezihostitelského plže a následně cercáriemi ptačího hostitele, ve kterém červi dospěli.

Co se týká čeledi Fasciolidae, tak se v případě *F. magna* podařilo dosáhnout v *in vitro* podmínkách téměř kompletního larválního vývoje od miracidíí po redie, které však neprodukovaly cercárie (Laursen and Yoshino, 1999). Úspěšná byla i kultivace cercárií *F. hepatica*, získaných z experimentálně infikovaných mezihostitelských plžů. Motolice se podařilo *in vitro* udržet až do stadia dospěléce. Takto kultivovaní červi měli již vytvořeny vaječníky, vitellaria a testes produkující spermatozoa, avšak k produkci vajíček nedocházelo (Smith and Clegg, 1981). Dospělce *F. hepatica* se podařilo v *in vitro* podmínkách udržet při životě nejdéle 3 týdny (Rohrbacher, 1957).

I ty nejúspěšnější kultivační experimenty se opakovaně setkávaly s výrazně pomalejším vývojem jednotlivých vývojových stádií ve srovnání s přirozeným vývojem v živém hostiteli. V případě *S. mansoni* se dokonce zjistilo, že *in vitro* transformované schistosomuly se od schistosomul získaných izolací z hostitelů liší (např. schopností přijímat různé makromolekulární látky a úrovní exprese některých genů) (Thornhill et al., 2010; Chai et al., 2006). I v tomto ohledu mají tedy *in vitro* metody ještě stále značné rezervy.

Přes množství dostupné literatury jsou znalosti *in vitro* kultivací stále značně nekompletní, přičemž ve většině experimentů bylo dosaženo pouze částečných úspěchů. Proto toto téma i nadále zůstává velkou výzvou.

Návrh postupu kultivace *F. magna*

Na základě prostudované literatury a předběžných experimentálních pokusů v naší laboratoři je níže navržen postup pro kultivaci *F. magna* – modelový organismus, kterým se budu zabývat v průběhu magisterského studia.

Vajíčka a larvální vývoj:

- získání vajíček: dekantací splachu pitvaných jater infikovaných zvířat nebo jejich trusu
- skladování: při 4°C 12-15 týdnů (Campbell, 1961)
- zahájení embryonace: vajíčka umístíme v tenké vrstvě do odstáté kohoutkové vody o teplotě 19-25°C, vodu je nutné vyměňovat vždy po 3 dnech
- líhnutí miracidíí: po 2-3 týdnech dochází k líhnutí miracidíí, vhodná je stimulace líhnutí umístěním vajíček na 2 h do lednice a poté do vody o pokojové teplotě
- skladování miracidíí: při 4°C asi 6 týdnů (Foreyt and Todd, 1978)
- experimentální infekce plžů: *G. truncatula* nebo *P. columella*, miracidia v počtu 1-4 na jednoho plže, expozice cca 30 minut
- chov infikovaných plžů: v akváriu při teplotě 20°C, produkce cercárií během 4-6 týdnů, přichycení na stěnách akvária nebo na pevném podkladu

Excystace metacerkárií:

- skladování metacerkárií: při 4°C i několik měsíců
- podmínky excystace: protokol Fried a Stromberg (1985):
 - inkubace ve 20% roztoku NaClO v rybniční vodě, dokud nepraskne vnější stěna cyst
 - promytí cyst a jejich propasírování přes síto 325-mesh
 - inkubace v médiu EBSS s 0,5% roztokem trypsinu a 0,5% směsí žlučových solí, pH 8,1-8,2, 42°C, asi 2 h

Kultivace juvenilních motolic:

- kultivace excystovaných červů dle protokolu pro *F. hepatica* Smith a Clegg (1981):
 - médium RPMI-1640 s 50% lidským sérem a 2% lidských erytrocytů a přísadkou antibiotik (50 jednotek/ml penicilinu a streptomycinu), 37°C, 8% CO₂; pravidelná výměna média

Kultivace dospělců:

- kultivace dospělců v médiu dle postupu pro *F. hepatica* Rohrbacher (1957):
 - Rohrbacherovo médium s 20% extraktem z jaterního macerátu, 1% směsí Crude Liver Extract a přísadkou antibiotik (1000 jednotek/ml penicilin a 2,5 mg/ml streptomycin), pH 8,5, 37°C; výměna média 1× týdně.

Seznam použité literatury

sekundární citace jsou označeny *

- Acosta-Ferreira, W., Vercelli-Retta, J., Falconi, L.M.**, 1979. *Fasciola hepatica* human infection. *Virchows Archiv. A*, Pathological anatomy and histology 383, 319–327.
- Ataev, G.L., Fournier, A., Coustau, C.**, 1998. Comparison of *Echinostoma caproni* mother sporocyst development *in vivo* and *in vitro* using *Biomphalaria glabrata* snails and a *B. glabrata* embryonic cell line. *The Journal of Parasitology* 84, 227–235.
- Augot, D., Rondelaud, D., Dreyfuss, G., Cabaret, J.**, 1997. *Fasciola hepatica*: *in vitro* production of daughter rediae and cercariae from first- and second-generation rediae. *Parasitology Research* 83, 383–385.
- Basch, P.**, 1981a. Cultivation of *Schistosoma mansoni in vitro*. II. Production of infertile eggs by worm pairs cultured from cercariae. *The Journal of Parasitology* 67, 186–190.
- Basch, P.**, 1981b. Cultivation of *Schistosoma mansoni in vitro*. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. *The Journal of Parasitology* 67, 179–185.
- Basch, P., DiConza, J., Johnson, B.**, 1973. Strigeid trematodes (*Cotylurus lutzii*) cultured *in vitro*: production of normal eggs with continuance of life cycle. *The Journal of Parasitology* 59, 319–322.
- Basch, P.F., O'Toole, M.L.**, 1983. Cultivation *in vitro* of *Schistosomatium douthitti* (trematoda: Schistosomatidae). *International Journal for Parasitology* 13, 541–545.
- Bayne, C.J., Barnes, D.W.**, 1997. Culture of cells from two life stages of *Schistosoma mansoni*. *Cytotechnology* 23, 205–210.
- Bayne, C.J., Menino, J.S., Hobbs, D.J., Barnes, D.W.**, 1994. *In vitro* cultivation of cells from larval *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology* 80, 29–35.
- Bell, E.J., Hopkins, C.A.**, 1955. The development of *Diplostomum phoxini* (Strigeida, Trematoda). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 50, 275–282.
- Bender, R.C., Bixler, L.M., Lerner, J.P., Bayne, C.J.**, 2002. *Schistosoma mansoni* sporocysts in culture: host plasma hemoglobin contributes to *in vitro* oxidative stress. *The Journal of Parasitology* 88, 14–18.
- Berntzen, A.K., Macy, R.W.**, 1969. *In vitro* cultivation of the digenetic trematode *Sphaeridiotrema globulus* (Rudolphi) from the metacercarial stage to egg production. *The Journal of Parasitology* 55, 136–139.
- Bixler, L.M., Lerner, J.P., Ivanchenko, M., McCormick, R.S., Barnes, D.W., Bayne, C.J.**, 2001. Axenic culture of *Schistosoma mansoni* sporocysts in low O₂ environments. *The Journal of Parasitology* 87, 1167–1168.
- Brant, S.V., Loker, E.S.**, 2013. Discovery-based studies of schistosome diversity stimulate new hypotheses about parasite biology. *Trends in Parasitology* 29, 449–459.
- Brink, L.H., McLaren, D.J., Smithers, S.R.**, 1977. *Schistosoma mansoni*: a comparative study of artificially transformed schistosomula and schistosomula recovered after cercarial penetration of isolated skin. *Parasitology* 74, 73–86.
- Buckley, J.J.C.**, 1939. Observations on *Gastrodiscoides hominis* and *Fasciolopsis buski* in Assam. *Journal of Helminthology* 17, 1–12.
- Buecher, E.J., Perez-Mendez, G., Hansen, E.L., Yarwood, E.**, 1974. Sulfhydryl Compounds Under Controlled Gas in Culture of *Schistosoma mansoni* Sporocysts. *Experimental Biology and Medicine* 146, 1101–1105.
- Campbell, W.C.**, 1961. Notes on the Egg and Miracidium of *Fascioloides magna*, (Trematoda). *Transactions of the American Microscopical Society* 80, 308–319.
- Campbell, W.C., Todd, A.C.**, 1955. *In vitro* metamorphosis of the miracidium of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) Ward, 1917. *Transactions of the American Microscopical Society* 74, 225–228.
- Carriker, M.R.**, 1946. Observations on the Functioning of the Alimentary System of the Snail *Lymnaea stagnalis* appressa Say. *Biological Bulletin* 91, 88–111.
- Chai, M., McManus, D.P., McInnes, R., Moertel, L., Tran, M., Loukas, A., Jonesa, M.K., Gobert, G.N.**, 2006. Transcriptome profiling of lung schistosomula, *in vitro* cultured schistosomula and adult *Schistosoma japonicum*. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 63, 919–929.
- Chaithong, U., Sukontason, K., Boonsriwong, N., Sukontason, K.L., Piangjai, S.**, 2001. *In vitro* development of *Haplorchis taichui* (Trematoda: Heterophyidae). *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 32 Suppl 2, 31–35.
- Chanová, M., Bulantová, J., Máslo, P., Horák, P.**, 2009. *In vitro* cultivation of early schistosomula of nasal and visceral bird schistosomes (*Trichobilharzia* spp., Schistosomatidae). *Parasitology Research* 104, 1445–1452.
- Cheever, A.W., Weller, T.H.**, 1958. Observations on the growth and nutritional requirements of *Schistosoma mansoni in vitro*. *American Journal of Epidemiology* 68, 322–339.
- Cheng, T.C., Bier, J.W.**, 1972. Studies on molluscan schistosomiasis: An analysis of the development of the cercaria of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 64, 129–141.
- Chernin, E.**, 1964. Maintenance *in vitro* of larval *Schistosoma mansoni* in tissues from the snail, *Australorbis glabratus*. *The Journal of Parasitology* 50, 531–545.
- Chien, W.-Y., Fried, B.**, 1992. Cultivation of excysted metacercariae of *Echinostoma caproni* to ovigerous adults in the allantois of the chick embryo. *The Journal of Parasitology* 78, 1019–1023.
- Chroustová, E.**, 1979. Experimental infection of *Lymnaea palustris* snails with *Fascioloides magna*. *Veterinary Parasitology* 5, 57–64.
- Chu, G., Oie, H.**, 1964. Effect of mammalian sera on the *in vitro* growth of *Austrobilharzia variglandis* Penner. *The Journal of Parasitology* 50, 26.
- Chu, G.W.T.C., Au, N., Watson, D.E.**, 1960. Culturing Hawaiian avian marine schistosome *Austrobilharzia variglandis* Penner in laboratory media. *The Journal of Parasitology* 46, 33.
- Chu, G.W.T.C., Oie, H.**, 1962. A skin culture technic as an aid in the cultivation of *Austrobilharzia variglandis* Penner. *The Journal of Parasitology* 48, 23.
- Cleave, H.J.V., Williams, C.O.**, 1943. Maintenance of a Trematode, *Aspidogaster conchicola*, outside the body of its natural host. *The Journal of Parasitology* 29, 127.
- Clegg, J.A.**, 1956. Studies on the maintenance of *Fasciola hepatica* L. *in vitro*. King's College London.
- Clegg, J.A.**, 1959. Development of sperm by *Schistosoma mansoni* cultured *in vitro*. *Bulletin of the Research Council of Israel*. Section E: Experimental medicine 8, 1–6.
- Clegg, J.A.**, 1961. A continuous-flow apparatus for *in vitro* culture of *Schistosoma mansoni*. *Bulletin of the Research Council of Israel* 168–170.
- Clegg, J.A.**, 1965. *In vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* 16, 133–147.

- Clemens, L.E., Basch, P.F.**, 1989. *Schistosoma mansoni*: Effect of transferrin and growth factors on development of schistosomula *in vitro*. The Journal of Parasitology 75, 417–421.
- Colley, D.G., Wikell, S.K.**, 1974. *Schistosoma mansoni*: simplified method for the production of schistosomules. Experimental Parasitology 35, 44–51.
- Coultas, K.A., Zhang, S.-M.**, 2012. *In vitro* cercariae transformation: comparison of mechanical and nonmechanical methods and observation of morphological changes of detached cercariae tails. The Journal of Parasitology 98, 1257–1261.
- Coustau, C., Ataev, G., Jourdain, J., Yoshino, T.P.**, 1997. *Schistosoma japonicum*: *in vitro* cultivation of miracidium to daughter sporocyst using a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line. Experimental Parasitology 87, 77–87.
- Damian, R.T.**, 1987. Immunological aspects of host-schistosome relationships. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 82, 13–16.
- Dar, Y., Rondelaud, D., Dreyfuss, G.**, 2003. Cercarial shedding from *Galba truncatula* infected with *Fasciola gigantica* of distinct geographic origins. Parasitology Research 89, 185–187.
- Davies, C., Smyth, J.D.**, 1978. *In vitro* cultivation of *Fasciola hepatica* metacercariae and of partially developed flukes recovered from mice. International Journal for Parasitology 8, 125–131.
- Dawes, B.**, 1954. Maintenance *in vitro* of *Fasciola hepatica*. Nature 174, 654–655.
- Dawes, B.**, 1961. On the early stages of *Fasciola hepatica* penetrating into the liver of an experimental host, the mouse: a histological picture. Journal of Helminthology 35, 41–52.
- Dawes, B.**, 1962. On the growth and maturation of *Fasciola hepatica* L. in the mouse. Journal of Helminthology 36, 11–38.
- DiConza, J., Basch, P.**, 1974. Axenic cultivation of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts. The Journal of Parasitology 60, 757–763.
- DiConza, J.J., Hansen, E.L.**, 1973. Cultivation of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts in Arthropod tissue cultures. The Journal of Parasitology 59, 211–212.
- Dinnik, J.A., Dinnik, N.N.**, 1964. The influence of temperature on the succession of redial and cercarial generations of *Fasciola gigantica* in a snail host. Parasitology 54, 59–65.
- Dixon, K.E.**, 1964. Excystment of metacercariae of *Fasciola hepatica* L. *in vitro*. Nature 202, 1240–1241.
- Dixon, K.E.**, 1966. The physiology of excystment of the metacercaria of *Fasciola hepatica* L. Parasitology 56, 431–456.
- Dong, H.-F., Chen, X.-B., Ming, Z.-P., Zhong, Q.-P., Jiang, M.-S.**, 2002. Ultrastructure of cultured cells from *Schistosoma japonicum*. Acta Tropica 82, 225–234.
- Dow, C., Ross, J.G., Todd, J.R.**, 1968. The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep. Parasitology 58, 129–135.
- Dreyfuss, G., Novobilský, A., Vignoles, P., Bellet, V., Koudela, B., Rondelaud, D.**, 2007. Prevalence and intensity of infections in the lymnaeid snail *Omphiscola glabra* experimentally infected with *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna* and *Paramphistomum daubneyi*. Journal of Helminthology 81, 7–12.
- Dreyfuss, G., Rondelaud, D.**, 1994. *Fasciola hepatica*: a study of the shedding of cercariae from *Lymnaea truncatula* raised under constant conditions of temperature and photoperiod. Parasite 1, 401–404.
- Erhardová-Kotrlá, B.**, 1971. Occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in Czechoslovakia. Academia, Prague.
- Eveland, L.K.**, 1972. *Schistosoma mansoni*: Conversion of cercariae to schistosomula. Experimental Parasitology 32, 261–264.
- Eveland, L.K., Morse, S.I.**, 1975. *Schistosoma mansoni*: *in vitro* conversion of cercariae to schistosomula. Parasitology 71, 327–335.
- Eydal, M., Bambir, S., Helgason, S., Ólafsdóttir, D.**, 1998. *Proserhynchoides gracilescens* (Digenea) in fish from icelandic waters. Parasitology International 47, Supplement 1, 302.
- Faltýnková, A., Horáčková, E., Hirtová, L., Novobilský, A., Modrý, D., Scholz, T.**, 2006. Is *Radix peregra* a new intermediate host of *Fascioloides magna* (Trematoda) in Europe? Field and experimental evidence. Acta Parasitologica 51, 87–90.
- Ferguson, M.S.**, 1940. Excystment and sterilization of metacercariae of the avian strigeid trematode, *Posthodiplostomum minimum*, and their development into adult worms in sterile cultures. The Journal of Parasitology 26, 359–372.
- Flury, F., Leeb, F.**, 1926. Zur Chemie und Toxikologie der Distomen (Leberegel). Journal of Molecular Medicine 5, 2054–2055.*
- Foreyt, W.J., Todd, A.C.**, 1976. Development of the large American liver fluke, *Fascioloides magna*, in white-tailed deer, cattle, and sheep. The Journal of Parasitology 62, 26–32.
- Foreyt, W.J., Todd, A.C.**, 1978. Experimental infection of lymnaeid snails in Wisconsin with miracidia of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica*. The Journal of Parasitology 1132–1134.
- Foster, G.R.**, 1970. A suggested medium for maintaining *Fasciola hepatica* prior to *in vitro* experimentation. Zeitschrift für Parasitenkunde 34, 177–178.
- Fredensborg, B.L., Poulin, R.**, 2005. *In vitro* cultivation of *Maritrema novaezealandensis* (Microphallidae): the effect of culture medium on excystation, survival and egg production. Parasitology Research 95, 310–313.
- Fried, B., Barber, L., Butler, M.**, 1978. Growth and development of the tetracotyle of *Cotylyrus strigeoides* (Trematoda) in the chick, on the chorioallantois and *in vitro*. The Journal of Parasitology 45, 162–166.
- Fried, B., Contos, N.**, 1973. *In vitro* cultivation of *Leucochloridiomorpha constantiae* (Trematoda) from the metacercaria to the ovigerous adult. The Journal of Parasitology 59, 936–937.
- Fried, B., Holmes, M.**, 1979. Further studies on the development of *Leucochloridiomorpha constantiae* (Trematoda) metacercariae on the chick chorioallantois. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 46, 70–73.
- Fried, B., Kim, S.**, 1989. *In vitro* cultivation of *Echinostoma revolutum* (Trematoda) metacercariae in an extract of chick mucosal epithelium. Proceedings of the Helminthological Society of Washington 56, 168–172.
- Fried, B., Pentz, L.**, 1983. Cultivation of excysted metacercariae of *Echinostoma revolutum* (Trematoda) in chick embryos. International Journal for Parasitology 13, 219–223.
- Fried, B., Ramundo, G.B.**, 1987. Excystation and cultivation *in vitro* and *in ovo* of *Cyathocotyle bushiensis* (Trematoda) metacercariae. The Journal of Parasitology 73, 541.
- Fried, B., Roberts, T.M.**, 1972. Pairing of *Leucochloridiomorpha constantiae* (Mueller, 1935) (Trematoda) *in vitro*, in the chick and on the chorioallantois. The Journal of Parasitology 58, 88–91.
- Fried, B., Rosa-Brunet, L.**, 1991. Cultivation of excysted metacercariae of *Echinostoma caproni* (Trematoda) to ovigerous adults on the chick chorioallantois. The Journal of Parasitology 77, 568–571.
- Fried, B., Stromberg, B.**, 1985. *In vitro* excystation of metacercariae of *Fascioloides magna* (Trematoda). The Journal of Parasitology 71, 263–264.
- Fried, B., Vates, T.S.**, 1984. *In vitro* maintenance and tracking of *Echinostoma revolutum* (Trematoda) adults. Proceedings of the Helminthological Society of Washington. pp. 351–353.
- Fried, B., Weaver, L., Kramer, M.**, 1968. Cultivation of *Echinostoma revolutum* (trematoda) on the chick chorioallantois. The Journal of Parasitology 54, 939–941.
- Friedl, F.**, 1960. Induced hatching of operculate eggs. The Journal of Parasitology 46, 454.

- Friedl, F.**, 1961. Studies on larval *Fascioloides magna*. I. Observations on the survival of rediae *in vitro*. The Journal of Parasitology 47, 71–75.
- Gazzinelli, G., de Oliveira, C.C., Flgueiredo, E.A., Pereira, L.H., Coelho, P.M.Z., Pellegrino, J.**, 1973. *Schistosoma mansoni*: Biochemical evidence for morphogenetic change from cercaria to schistosomule. Experimental Parasitology 34, 181–188.
- Georgieva, K., Georgieva, S., Mizinska, Y., Stoitsova, S.R.**, 2012. *Fasciola hepatica* miracidia: lectin binding and stimulation of *in vitro* miracidium-to-sporocyst transformation. Acta Parasitologica 57, 46–52.
- Ghosh, S.K.**, 1985. Development and hatching of eggs of *Fasciola gigantica* Cobbold, 1955 M. Veterinary Science, Bangladesh Agricultural University.
- Gilbert, B., Da Rosa, M.N., Borojević, R., Pellegrino, J.**, 1972. *Schistosoma mansoni*: *in vitro* transformation of cercariae into schistosomula. Parasitology 64, 333–339.
- Gold, D., Goldberg, M.**, 1976. Effect of light and temperature on hatching in *Fasciola hepatica* (trematoda: Fasciolidae). Israel Journal of Zoology 25, 178–185.
- Gorbushin, A.M., Shaposhnikova, T.G.**, 2002. *In vitro* culture of the avian echinostome *Himasthla elongata*: from redia to marita. Experimental Parasitology 101, 234–239.
- Grano-Maldonado, M., Álvarez-Cadena, J.**, 2010. *In vitro* cultivation of *Cymatocarpus solearis* (Brachycoeliidae) metacercariae to obtain the adult stage without the marine turtle definitive host. The Korean Journal of Parasitology 48, 49–55.
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., Kestens, L.**, 2006. Human schistosomiasis. The Lancet 368, 1106–1118.
- Gupta, S.C.**, 1992. Sexual maturity of *Fasciola gigantica* in experimentally infected rabbit, goat and buffalo. Indian Journal of Parasitology 16, 133–134.
- Haas, W., Gui, M., Haberl, B., Ströbel, M.**, 1991. Miracidia of *Schistosoma japonicum*: Approach and attachment to the snail host. The Journal of Parasitology 77, 509–513.
- Haberl, B., Kalbe, M., Fuchs, H., Ströbel, M., Schmalfuss, G., Haas, W.**, 1995. *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium*: Miracidial host-finding behaviour is stimulated by macromolecules. International Journal for Parasitology 25, 551–560.
- Halton, D.W., Johnston, B.R.**, 1983. Development *in vitro* of the metacercaria of *Bucephaloides gracilescens* (Trematoda: Bucephalidae). International Journal for Parasitology 13, 157–164.
- Hanna, R.E., Ballawy, S.S., Jura, W.**, 1975. Methods for *in vitro* study of the invasive processes of *Fasciola gigantica*. Research in Veterinary Science 19, 96–97.
- Hanna, R.E., Jura, W.**, 1976. *In vitro* maintenance of juvenile *Fasciola gigantica* and their use to establish infections in mice. Research in Veterinary Science 21, 244–246.
- Hansen, E.L.**, 1975. Secondary daughter sporocysts of *Schistosoma Mansoni*: Their occurrence and cultivation. Annals of the New York Academy of Sciences 266, 426–436.
- Harris, K.R., Fried, B., Mayer, D.A.**, 1972. Infectivity, growth, and development of *Leucochloridiomorpha constantiae* (Trematoda) in the chick and on the chorioallantois. The Journal of Parasitology 58, 213–216.
- Hata, H., Yokogawa, M., Kobayashi, M., Niimura, M., Kojima, S.**, 1987. *In vitro* cultivation of *Paragonimus miyazakii* and *P. ohirai*. The Journal of Parasitology 73, 792–796.
- Ho, Y.-H.**, 1963. On the host specificity of *Schistosoma japonicum*. Chinese Medical Journal 82, 405–414.
- Hobbs, D.J., Fryer, S.E., Duimstra, J.R., Hedstrom, O.R., Brodie, A.E., Collodi, P.A., Menino, J.S., Bayne, C.J., Barnes, D.W.**, 1993. Culture of cells from juvenile worms of *Schistosoma mansoni*. The Journal of Parasitology 79, 913–921.
- Howell, M.J., Bourns, T.K.R.**, 1974. *In vitro* culture of *Trichobilharzia ocellata*. International Journal for Parasitology 4, 471–476.
- Hua, X., Li, Y., Zhou, S.**, 1988. Growth, development and oviposition of hepatic-portal-phase schistosomula of *Schistosoma japonicum* cultured *in vitro*. Acta Academica Medical University of Hebei 9, 195–199.*
- Huesca-Guillén, A., Ibarra-Velarde, F., Sánchez-González, M.G.**, 2007. *Paramphistomum* spp: improved artificial excystment and *in vitro* culture of immature and adult stages. Parasitology Research 102, 41–45.
- Hughes, D.L.**, 1959. Chemotherapy of experimental *Fasciola hepatica* infections. University of London.*
- Ingersoll, E.M.**, 1956. *In vitro* survival of rediae of *Cyclocoelum microstomum*. Experimental Parasitology 5, 231–237.
- Irwin, S.W., Saville, D.H.**, 1988. An alternative method for the culture of *Diplostomum spathaceum* (Trematoda) in chick embryos. The Journal of Parasitology 74, 504–505.
- Itagaki, T., Kikawa, M., Sakaguchi, K., Shimo, J., Terasaki, K., Shibahara, T., Fukuda, K.**, 2005. Genetic characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. Parasitology 131, 679–685.
- Ivanchenko, M.G., Lerner, J.P., McCormick, R.S., Toumadje, A., Allen, B., Fischer, K., Hedstrom, O., Helmrich, A., Barnes, D.W., Bayne, C.J.**, 1999. Continuous *in vitro* propagation and differentiation of cultures of the intramolluscan stages of the human parasite *Schistosoma mansoni*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 96, 4965–4970.
- James, E.R., Taylor, M.G.**, 1976. Transformation of cercariae to schistosomula: a quantitative comparison of transformation techniques and of infectivity by different injection routes of the organisms produced. Journal of Helminthology 50, 223–233.
- Jiang, Y., Gong, R.M., Yang, Y., Li, X.H., Liu, Y., Zhu, C.G., Lu, K., Zheng, H.**, 2011. Preliminary investigation on *in vitro*-cultivation and manipulation of *Schistosoma japonicum* sporocysts. International Journal of Medical Parasitic Diseases 38, 158–162.*
- Kalbe, M., Haberl, B., Haas, W.**, 2000. Snail host finding by *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata*: Compound analysis of “Miracidia-Attracting Glycoproteins”. Experimental Parasitology 96, 231–242.
- Kannangara, D.W.**, 1974. *In vitro* cultivation of the metacercariae of the human lung fluke *Paragonimus westermani*. International Journal for Parasitology 4, 675–676.
- Kannangara, D.W., Smyth, J.D.**, 1974. *In vitro* cultivation of *Diplostomum spathaceum* and *Diplostomum phoxini* metacercariae. International Journal for Parasitology 4, 667–673.
- Kawanaka, M., Sidner, R.A., Carter, C.E.**, 1985. *In vitro* transformation of *Schistosoma japonicum* miracidia to young sporocysts in a culture system for egg maturation. The Journal of Parasitology 71, 368–370.
- Kawano, J., Ishimaru, T., Umeda, S., Shimizu, A., Kimura, S.**, 1987. *In vitro* excystment of *Fasciola* sp. metacercariae. The Japanese Journal of Veterinary Science 49, 917–919.
- Kuntz, R.E., Lo, C.-T.**, 1967. Preliminary studies on *Fasciolopsis buski* (Lankester, 1857) (giant Asian intestinal fluke) in the United States. Transactions of the American Microscopical Society 86, 163–166.

- Larson, O.R., Uglem, G.L.**, 1990. Cultivation of *Clinostomum marginatum* (Digenea: Clinostomatidae) metacercariae *in vitro*, in chick embryo and in mouse coelom. The Journal of Parasitology 76, 505–508.
- Laursen, J.R., Yoshino, T.P.**, 1999. *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line supports *in vitro* miracidial transformation and early larval development of the deer liver fluke, *Fascioloides magna*. Parasitology 118 (Pt 2), 187–194.
- Lee, C.G., Cho, S.H., Lee, C.Y.**, 1995. Metacercarial production of *Lymnaea viridis* experimentally infected with *Fasciola hepatica*. Veterinary Parasitology 58, 313–318.
- Lehner, R.P., Sewell, M.M.H.**, 1979. Maintenance *in vitro* of adult *Fasciola hepatica* in a continuous-flow system. Veterinary Parasitology 5, 315–323.
- Leno, G.H., Holloway, H.L., Jr.**, 1986. The culture of *Diplostomum spathaceum* metacercariae on the chick chorioallantois. The Journal of Parasitology 72, 555–558.
- Lin, J., Li, Y., Zhou, S.**, 1983. Preliminary studies on the *in vitro* cultivation of lung-phase schistosomula of *Schistosoma japonicum*. Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases 1, 164–167.*
- Lin, J., Li, Y., Zhou, S.**, 1985. *In vitro* cultivation of skin stage schistosomula of *Schistosoma japonicum* and the observation on the early surface changes of cultured schistosomulum. National Medical Journal of China 65, 49–50.*
- Liu, W., Zeng, T., Zeng, Q., Cai, C., Zhang, Z., Gong, Y., Cai, L., Zhang, S., Xu, X.**, 2006. Biological identification on sub-cultivation cells of *Schistosoma japonicum* adult worms *in vitro*. Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases 24, 395–397.*
- Lloyd, M.M., Poulin, R.**, 2011. *In vitro* culture of marine trematodes from their snail first intermediate host. Experimental Parasitology 129, 101–106.
- Lo, C.-T.**, 1967. Life history of the snail, *Segmentina hemisphaerula* (Benson), and its experimental infection with *Fasciolopsis buski* (Lankester). The Journal of Parasitology 53, 735–738.
- Lotfy, W.M., Brant, S.V., DeJong, R.J., Le, T.H., Demiaszkiewicz, A., Rajapakse, R.P.V.J., Perera, V.B.V.P., Laursen, J.R., Loker, E.S.**, 2008. Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 79, 248–255.
- Madsen, H., Monrad, J.**, 1981. A method for laboratory maintenance of *Lymnaea natalensis* and for mass production of *Fasciola gigantica* metacercariae. The Journal of Parasitology 67, 735–737.
- Magath, T.B., Mathieson, D.R.**, 1946. Factors affecting the hatching of ova of *Schistosoma japonicum*. The Journal of Parasitology 32, 64–68.
- Magnus, R., Johnson, A.**, 1985. *In vitro* and *in vivo* development of the tetracotyles of *Cotylurus flabelliformis* (Trematoda: Strigeidae). Proceedings of the Helminthological society of Washington 52, 283–288.
- Martins, A.V.**, 1958. Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni*. Bulletin of the World Health Organization 18, 931–944.
- Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Valero, M.A.**, 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. International Journal for Parasitology, Parasitic Zoonoses - Emerging Issues 35, 1255–1278.
- Mei, B.S., Zhou, S.**, 1988. Effects of osmolarity and pH on the transformation of *Schistosoma japonicum* miracidium to mother sporocyst *in vitro*. Acta Academica Medical University of Hebei 9, 200–205.*
- Mei, B.S., Zhou, S.L.**, 1989. Effects of nutritive factors on *Schistosoma japonicum* miracidial transformation and mother sporocyst culture *in vitro*. Acta Hydrobiologica Sinica 13, 326–333.*
- Mellink, J.J., Bovenkamp, W. van den.**, 1985. *In vitro* culture of intramolluscan stages of the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. Zeitschrift für Parasitenkunde 71, 337–351.
- Michalick, M.S., Gazzinelli, G., Pellegrino, J.**, 1979. Cultivation of *Schistosoma mansoni* cercarial bodies to adult worms. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 21, 115–118.
- Milligan, J.N., Jolly, E.R.**, 2011. Cercarial transformation and *in vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni* schistosomules. Journal of Visualized Experiments: JoVE.
- Muftic, M.**, 1969. Metamorphosis of miracidia into cercariae of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. Parasitology 59, 365–371.
- Müller, W.**, 1923. Die Nahrung von *Fasciola hepatica* und ihre Verdauung. Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology 57, 273–281.*
- Nakagawa, K.**, 1922. The development of *Fasciolopsis buski* Lankester. The Journal of Parasitology 8, 161–166.
- Olson, P.D., Cribb, T.H., Tkach, V.V., Bray, R.A., Littlewood, D.T.J.**, 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). International Journal for Parasitology 33, 733–755.
- Osborn, G.D., Gron, N., Simmons, D.**, 1982. Maintenance and infection of the mud snail *Lymnaea truncatula* for *Fasciola hepatica* studies. Journal-Institute of Animal Technicians.
- Peng-Yan, Jiang, M., Zhong, Q., Gui, J., Dong, H.**, 2002. Preliminary study on primary culture of cells from *Oncomelania hupensis*. Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Diseases 21, 176–178.*
- Pung, O.J., Burger, A.R., Walker, M.F., Barfield, W.L., Lancaster, M.H., Jarrous, C.E.**, 2009. *In vitro* cultivation of *Microphallus turgidus* (Trematoda: Microphallidae) from metacercaria to ovigerous adult with continuation of the life cycle in the laboratory. The Journal of Parasitology 95, 913–919.
- Pybus, M.J.**, 2001. Liver flukes, Parasitic Diseases of Wild Mammals, Second Edition. Iowa State Press, 121–149.
- Ractliffe, L.H., Guevara-Pozo, D., Lopez-Roman, R.**, 1969. *In vitro* maintenance of *Fasciola hepatica*: a factorial approach based on egg production. Experimental Parasitology 26, 41–51.
- Ramalho-Pinto, F.J., Gazzinelli, G., Howells, R.E., Mota-Santos, T.A., Figueiredo, E.A., Pellegrino, J.**, 1974. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule *in vitro*. Experimental Parasitology 36, 360–372.
- Rao, M.P.C.**, 1966. On the comparative susceptibility of *Lymnaea natalensis* (Kraus) and *L. rufescens* (Gray) to infection with *Fasciola gigantica* (West African strain) and the tissue responses in the snails. Journal of Helminthology 40, 131–140.
- Roberts, E.W.**, 1950. Studies on the life-cycle of *Fasciola hepatica* (Linnaeus) and of its snail host, *Limnaea (Galba) truncatula* (Müller), in the field and under controlled conditions in the laboratory. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 44, 187–206.
- Robinson, D.L.H.**, 1957. *S. mansoni* schistosomulae *in vitro*. Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. pp. 300–300.
- Robinson, D.L.H.**, 1960. Egg-Laying by *Schistosoma mansoni* *in vitro*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 54, 112–17.
- Rohrbacher, G., Jr.**, 1957. Observations on the survival *in vitro* of bacteria-free adult common liver flukes, *Fasciola hepatica* Linn., 1758. The Journal of Parasitology 43, 9–18.
- Rondelaud, D., Belfaiza, M., Vignoles, P., Moncef, M., Dreyfuss, G.**, 2009. Redial generations of *Fasciola hepatica*: a review. Journal of Helminthology 83, 245–254.

- Rondelaud, D., Fousi, M., Vignoles, P., Moncef, M., Dreyfuss, G.,** 2007. Optimization of metacercarial production for three digenean species by the use of petri dishes for raising lettuce-fed *Galba truncatula*. *Parasitology Research* 100, 861–865.
- Rosa-Brunet, L., Fried, B.,** 1992. Growth, development, pathogenicity, and transplantation of *Echinostoma caproni* (Trematoda) on the chick chorioallantois. *The Journal of Parasitology* 78, 99–103.
- Ross, O.A., Bueding, E.,** 1950. Survival of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Experimental Biology and Medicine* 73, 179–182.
- Samuelson, J.C., Quinn, J.J., Caulfield, J.P.,** 1984. Hatching, chemokinesis, and transformation of miracidia of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology* 70, 321–331.
- Schallig, H.D.F.H., Schut, A., Knaap, W.P.W. van der, Jong-Brink, M. de,** 1990. A simplified medium for the *in vitro* culture of mother sporocysts of the schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology Research* 76, 278–279.
- Schnier, M.S., Fried, B.,** 1980. *In vitro* cultivation of *Amblosoma suwaense* (Trematoda: Brachylaimidae) from the metacercaria to the ovigerous adult. *International Journal for Parasitology* 10, 391–395.
- Schreiber, F., Schubert, M.,** 1949. Experimental infection of the snail *Australorbis glabratus* with the trematode *Schistosoma mansoni* and the production of cercariae. *The Journal of parasitology* 35, 91–100.
- Schwabe, C., Kilejian, A., Florkin, M.,** 2012. Chapter 6. Chemical Aspects of the Ecology of Platyhelminthes, *Chemical Zoology V2: Porifera, Coelenterata, And Platyhelminthes*. Elsevier, London Academic Press, 474.
- Senft, A., Weller, T.,** 1956. Growth and regeneration of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine 93, 16–19.
- Seo, B.-S.,** 1989. Comparative growth and development of the metacercariae of *Fibricola seoulensis* (Trematoda: Diplostomidae) *in vitro*, *in vivo* and on the chick chorioallantois. *The Korean Journal of Parasitology* 27, 231–248.
- Sewell, M.M.H., Purvis, G.M.,** 1969. *Fasciola hepatica*: the stimulation of excystation. *Parasitology*, P4.
- Sey, O., Forró, L., Murai, É., Korsós, Z., Pintér, L.,** 1989. Laboratory model for studying experimental fasciolopsiosis. *Miscellanea Zoologica Hungarica* 5.
- Smith, M., Clegg, J.A., Webbe, G.,** 1976. Culture of *Schistosoma haematobium* *in vivo* and *in vitro*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 70, 101–107.
- Smith, M.A., Clegg, J.A.,** 1981. Improved culture of *Fasciola hepatica* *in vitro*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 66, 9–15.
- Smithers, S.R., Terry, R.J.,** 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology* 55, 695–700.
- Soliman, M.F.M.,** 2008. Epidemiological review of human and animal fascioliasis in Egypt. *Journal of Infection in Developing Countries* 2, 182–189.
- Stephenson, W.,** 1947. Physiological and histochemical observations on the adult liver fluke, *Fasciola hepatica* L; survival *in vitro*. *Parasitology* 38, 116–122.
- Stewart, M.T., Mousley, A., Koubková, B., Šebelová, Š., Marks, N.J., Halton, D.W.,** 2003. Development *in vitro* of the neuromusculature of two strigeid trematodes, *Apatemon cobitidis proterorhini* and *Cotylurus erraticus*. *International Journal for Parasitology* 33, 413–424.
- Stirewalt, M.A.,** 1963. Cercaria vs. schistosomule (*Schistosoma mansoni*): absence of the pericercarial envelope *in vivo* and the early physiological and histological metamorphosis of the parasite. *Experimental parasitology* 13, 395–406.
- Stirewalt, M.A.,** 1970. Analysis of cercarial penetration stimuli. *The Journal of Parasitology* 56, 300.
- Stirewalt, M.A., Minnick, D.R., Fregeau, W.A.,** 1966. Definition and collection in quantity of schistosomules of *Schistosoma mansoni*. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 60, 352–360.
- Stirewalt, M.A., Uy, A.,** 1969. *Schistosoma mansoni*: cercarial penetration and schistosomule collection in an *in vitro* system. *Experimental Parasitology* 26, 17–28.
- Sugiura, S., Sasaki, T., Hosaka, Y., Ono, R.,** 1954. A Study of Several Factors Influencing Hatching of *Schistosoma japonicum* Eggs. *The Journal of Parasitology* 40, 381–386.
- Sung Tae Hong, T.K.C.,** 1984. Fifteen human cases of *Fibricola seoulensis* infection in Korea. *The Korean Journal of Parasitology* 22, 61–65.
- Swales, W.E.,** 1935. The life cycle of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875), the large liver fluke of ruminants, in Canada. *Canadian Journal of Research* 12, 177–215.
- Targett, G.A.T., Robinson, D.L.H.,** 1964. Observations on the *in vitro* survival of miracidia of *Schistosoma mansoni*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 58, 453–456.
- Thomas, A.P.,** 1883. The Life History of the Liver-Fluke (*Fasciola hepatica*). *Quarterly Journal of Microscopical Science* 2, 99–133.
- Thornhill, J., Kusel, J., Oliviera, F.A. de, Ribeiro, F., Lima, S.F., Coelho, P.M.Z., McVeigh, P., Mattos, A.C.A.,** 2010. Uptake of macromolecules by cercariae during skin penetration and transformation to schistosomula (*Schistosoma mansoni*). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 387–390.
- Tiba, Y., Holanda, J.C., Ramalho-Pinto, F.J., Gazzinelli, G., Pellegrino, J.,** 1974. Schistosomula (*Schistosoma mansoni*) obtained *in vitro*: Viability in culture and infectivity for mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 68, 72.
- Tielens, A.G., Van der Meer, P., Van den Bergh, S.G.,** 1981. *Fasciola hepatica*: simple, large-scale, *in vitro* excystation of metacercariae and subsequent isolation of juvenile liver flukes. *Experimental Parasitology* 51, 8–12.
- Torgerson, P., Claxton, J.,** 1999. Epidemiology and control. *Fasciolosis* 113–149.
- Tuti, S., Vichasri, S., Sirisinha, S.,** 1982. Effect of culture media on production of excretory-secretory products and egg output of *Opisthorchis viverrini* *in vitro*. *The Journal of Parasitology* 68, 892–897.
- Uddin, M.H., Bae, Y.M., Choi, M.-H., Hong, S.-T.,** 2012a. Production and deformation of *Clonorchis sinensis* eggs during *in vitro* maintenance. *PLoS ONE* 7, e52676.
- Uddin, M.H., Li, S., Bae, Y.M., Choi, M.-H., Hong, S.-T.,** 2012b. *In vitro* maintenance of *Clonorchis sinensis* adult worms. *The Korean Journal of Parasitology* 50, 309–315.
- Voge, M., Jeong, K.,** 1971. Growth *in vitro* of *Cotylurus lutzi* Basch 1969 (Trematoda: Strigeidae), from tetracotyle to patent adult. *International Journal for Parasitology* 1, 139–143.
- Voge, M., Seidel, J.S.,** 1972. Transformation *in vitro* of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* into young sporocysts. *The Journal of Parasitology* 58, 699–704.
- Vogel, H., Brand, T.,** 1933. Über das Verhalten des Fettes in den einzelnen Entwicklungsstadien von *Fasciola hepatica* und seine Beziehungen zum Exkretionssystem. *Parasitology Research* 5, 425–431.*
- Weinland, E., Brand, T.F.,** 1926. Beobachtungen an *Fasciola hepatica*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 4, 212–265.*

- Weller, T.H., Wheeldon, S.K.**, 1982. The cultivation *in vitro* of cells derived from adult *Schistosoma mansoni*. I. Methodology; criteria for evaluation of cultures; and development of media. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 31, 335–348.
- Wikerhauser, T.**, 1960. A rapid method for determining the viability of *Fasciola hepatica* metacercariae. American Journal of Veterinary Research 21, 895–897.
- Wikerhauser, T., Cvetnić, S.**, 1967. Survival of young and sexually mature adult *Fasciola hepatica* in various cell-free media with and without mammalian cell cultures. Experimental parasitology 20, 200–204.
- Wikerhauser, T., Cvetnić, S., Brudnjak, Z.**, 1968. Further study of the survival of young *Fasciola hepatica* in cell cultures. Wiadomości parazytologiczne 14, 703–705.
- Wilson, R.A., Draskau, T., Miller, P., Lawson, J.R.**, 1978. *Schistosoma mansoni*: The activity and development of the schistosomulum during migration from the skin to the hepatic portal system. Parasitology 77, 57–73.
- Wright, W.R.**, 1927. Studies on larval trematodes from North Wales. Part I. Observations on the redia, cercaria, and cyst of *Fasciola hepatica*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 21, 47–56.*
- Yang, G.-J., Utzinger, J., Sun, L.-P., Hong, Q.-B., Vounatsou, P., Tanner, M., Zhou, X.-N.**, 2007. Effect of temperature on the development of *Schistosoma japonicum* within *Oncomelania hupensis*, and hibernation of *O. hupensis*. Parasitology Research 100, 695–700.
- Yasuraoka, K., Irie, Y., Hata, H.**, 1978. Conversion of schistosome cercariae to schistosomula in serum-supplemented media, and subsequent culture *in vitro*. The Japanese journal of experimental medicine 48, 53–60.
- Yasuraoka, K., Kaiho, M., Hata, H., Endo, T.**, 1974. Growth *in vitro* of *Parvatrema timondavidi* Bartoli 1963 (Trematoda: Gymnophallidae) from the metacercarial stage to egg production. Parasitology 68, 293–302.
- Yasuraoka, K., Kojima, K.**, 1970. *In vitro* cultivation of the heterophid trematode, *Metagonimus yokogawai*, from the metacercaria to adult. Japanese journal of medical science & biology 23, 199–210.
- Ye, Q., Dong, H.-F., Greveling, C.G., Hu, M.**, 2013. *In vitro* cultivation of *Schistosoma japonicum*-parasites and cells. Biotechnol. Adv. 31, 1722–1737.
- Ye, Q., Zhu, J., Zhong, Q., Jiang, M., Dong, H.**, 2007. Primary culture of the cells from *Oncomelania hupensis* liver. Chinese journal of parasitology & parasitic diseases 25, 478–482.*
- Ye, Q., Zhu, J.Y., Ming, Z.P., Zhao, Q.P., Greveling, C.G., Liu, R., Zhong, Q.P., Jiang, M.S., Dong, H.F.**, 2012. Studies on the establishment of a co-culture system of lung stage *Schistosoma japonicum* with host cells. Parasitology Research 111, 735–748.
- Yokogawa, M., Oshima, T., Kihata, M.**, 1955. Studies to maintain excysted metacercariae of *Paragonimus westermani* *in vitro*. Journal of Parasitology. pp. 28–28.
- Yoshino, T.P., Laursen, J.R.**, 1995. Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cells. The Journal of Parasitology 81, 714–722.
- Zhang, Z., Zeng, X., Li, Z., Yi, X., Zhang, J., Yan, G., Zeng, Q., Zhang, J.**, 2002. Success *in vitro* cultivation of cells derived from miracidia, cercariae and adult of *Schistosoma japonicum* I. Research into *in vitro* cultivation of cells derived from miracidia of *Schistosoma japonicum*. Journal of Tianjin Agricultural College 5–12.*
- Zhu, J.Y., Ye, Q., Zhao, Q.P., Ming, Z.P., Greveling, C.G., Jiang, M.S., Dong, H.F.**, 2012. Effects of protein extract from head-foot tissue of *Oncomelania hupensis* on the growth and gene expression of mother sporocysts of *Schistosoma japonicum*. Parasitology Research 110, 721–731.

Obrázky

- Roberts L., Janovy J., Schmidt G., Larry S.**, 2009, Foundations of Parasitology. The McGraw-Hill Companies, Inc, 253, 270
- Tielens, A.G., Van der Meer, P., Van den Bergh, S.G.**, 1981. *Fasciola hepatica*: simple, large-scale, *in vitro* excystment of metacercariae and subsequent isolation of juvenile liver flukes. Experimental Parasitology 51, 8–12.
- Clegg, J.A.**, 1956. Studies on the maintenance of *Fasciola hepatica* L. *in vitro*. King's College London.
- Robinson, D.L.H.**, 1960. Egg-Laying by *Schistosoma mansoni* *in vitro*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 54, 112–17.
- Clegg, J.A.**, 1961. A continuous-flow apparatus for *in vitro* culture of *Schistosoma mansoni*. Bulletin of the Research Council of Israel 168–170.

Umístění tabulky

<https://onedrive.live.com/view.aspx?resid=AFF5AB10117C3C95!4954&ithint=file%2c.xlsx&app=Excel&authkey=!ADbbg4XDwWfMhW4>