

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Klára Melounová

Experimentální infekce *Oryctolagus cuniculus* motolicí *Fascioloides magna*

Experimental infection of *Oryctolagus cuniculus* with fluke *Fascioloides magna*

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Martin Kašný, Ph.D.

Praha 2015

Poděkování

Na prvním místě bych ráda poděkovala svému školiteli RNDr. Martinu Kašnému, Ph.D. za vedení práce a příjemnou spolupráci. Velké díky patří RNDr. Janě Bulantové, Ph.D. nejen za její ochotu a pomoc s přípravou a realizací experimentů, ale také za morální podporu v nelehkých fázích práce. Děkuji dále doc. Ing. Jaroslavu Vadlejchovi, Ph.D. za zprostředkování experimentu probíhajícího na ČZU. Děkuji také MVDr. Heleně Härtlové, CSc. z ČZU a RNDr. Haně Benákové, MBA z 1. LF za biochemickou analýzu vzorků, MVDr. Tomášovi Fialovi z AAVET za zasvěcení do diferenciacce lymfocytů.

Ráda bych také poděkovala lidem z laboratoře za velmi příjemné pracovní prostředí. Především chci poděkovat prof. RNDr. Petru Horákovi, Ph.D. za rodinné prostředí a zázemí v laboratoři. Z řad studentů děkuji za velkou pomoc Tomášovi a Líbě a za přípravu metacerkárií Honzovi. V neposlední řadě i všem přednášejícím, kteří nám předávali své znalosti a rady, a zasvětili nás tak do tajů parazitologie.

Mé velké díky patří také rodině, partnerovi a kamarádům, kteří po celou dobu studia stáli při mně a trpěli mé nálady a rozmary. Rodičům děkuji za dlouholetou finanční a psychickou podporu při studiu a dědovi za dohled, aby mé práce měly vždy co nejméně gramatických chyb.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou 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 dne: 12. srpna 2015

.....

Klára Melounová

ABSTRAKT

Fascioloides magna je motolice parazitující v jaterním parenchymu přežvýkavců. Její životní cyklus je vázaný na vlhké prostředí a zahrnuje mezihostitele, jimiž jsou sladkovodní plži (Lymnaeidae). Široké spektrum definitivních hostitelů lze dělit podle schopnosti tvorby určitého typu pseudocysty na specifické definitivní hostitele (jelen lesní, daněk evropský, srnec obecný), nespecifické definitivní hostitele (tur domácí, prase divoké či los evropský) a netypické hostitele (ovce domácí a koza domácí). Vedle záznamů o přirozených infekcích uvedených hostitelů byly prováděny také experimentální nákazy různých druhů potenciálních hostitelů v laboratorních podmínkách, např. kamzík horský, lama krotká a ovce tlustorohá, ale také u tradičních laboratorních zvířat, myš, morče, potkan a králík.

Během nejrůznějších typů onemocnění probíhá v hostiteli mnoho změn, které lze kvalitativně a kvantitativně stanovit. Podobně u fascioloidózy lze měřit některé změny, které jsou spojeny s přítomností parazita v hostitelově těle, např. tvorba protilátek, zvýšení počtu eozinofilů, uvolňování vajíček trusem, vnitřní krvácení nebo i poškození jater. Právě míra poškození jaterní tkáně se odráží především v biochemických parametrech měřitelných z krve. Jedná se nejen o jaterní enzymy, ale také další složky krve, které reflektují celkový zdravotní stav hostitele, např. krevní proteiny, lipidy, sacharidy, metabolity.

Za účelem stanovení vybraných parametrů spojených s fascioloidózou bylo v rámci mé experimentální práce nakaženo celkem 10 králíků (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) (50, 150 a 300 MC). Úspěšně byl infikován jeden králík, u něhož byla nalezena jedna živá nedospělá motolice. Její přítomnost způsobila značné poškození jater, zvýšení hladin protilátek IgG, IgM a zaznamenán byl také nárůst GLDH a celkových globulinů. U dalších tří králíků byl zachycen výrazný nárůst protilátek IgG, IgM a eozinofilů, přestože při pitvě nebyly žádné motolice nalezeny.

Klíčová slova:

Fascioloides magna, *Oryctolagus cuniculus*, interakce parazit - hostitel, koprologické vyšetření, ELISA, IgG, IgM, hematokrit, krevní obraz, jaterní enzymy a krevní metabolity.

ABSTRACT

Fascioloides magna is a trematode parasitizing in the liver parenchyma of ruminants. Its life cycle is associated with the humid environment and includes intermediate freshwater snail hosts from family Lymnaeidae. According to the ability of host to form a certain type of a pseudocyst during fascioloidosis, they can be divided in three groups, specific definitive hosts (red deers, fallow deers, roe deers), nonspecific definitive hosts (cattle, wild boars and elks) and atypical hosts (sheeps and goats). Beside the natural infections also the experimental infections of other potential host species has been realized (chamois, llama and bighorn sheep and traditional laboratory animals such as mice, guinea pigs, rats and rabbits).

In the context of different diseases, many changes in infected organism can occur. These can be qualitatively and quantitatively evaluated. Similarly, during fascioloidosis the changes associated with the presence of the parasite in the host's body is possible to monitor, e.g. antibody production, increase in the number of eosinophils, release of eggs in faeces, internal bleeding, or the level liver damage. The liver damage is corresponding primarily to biochemical parameters of blood, not only the liver enzymes, but also other blood components, like blood proteins, lipids, carbohydrates or metabolites reflecting the health status of the host.

In order to evaluate the selected parameters of fascioloidosis, ten rabbits (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) were exposed to 50, 150 and 300 metacercariae of *F. magna*. Only one rabbit was successfully infected and one live immature fluke was found in his body. The fluke caused considerable damage in the liver and the increase of the levels of IgG, IgM, globulins in general and GLDH and was recorded. In three other rabbits, the significant increase in IgG, IgM and eosinophils levels was observed, although no fluke was found during the autopsy.

Key words:

Fascioloides magna, *Oryctolagus cuniculus*, host - parasite interaction, coprological examination, ELISA, IgG, IgM, hematocrit, blood count, liver enzymes and blood metabolites.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. CÍLE PRÁCE.....	2
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1. Motolice <i>Fascioloides magna</i>	3
3.1.1. Obecná charakteristika	3
3.1.2. Rozšíření	4
3.1.3. Životní cyklus	5
3.1.4. Patogenita.....	6
3.1.5. Přirození definitivní hostitelé - kategorie.....	7
3.1.5.1. Specifičtí definitivní hostitelé.....	8
3.1.5.2. Nespecifičtí definitivní hostitelé.....	8
3.1.5.3. Netypičtí hostitelé.....	9
3.2. Interakce parazit – hostitel	10
3.3. Měřitelné parametry infekce	11
3.3.1. Hmotnost.....	11
3.3.2. Koprologie	12
3.3.1. Imunologie	13
3.3.2. Hematologie	16
3.3.2.1. Hematokrit.....	16
3.3.2.2. Krevní obraz	17
3.3.3. Biochemie	20
3.4. Experimentální infekce fasciolidními motolicemi.....	25
4. METODIKA	29

4.1. Chov a příprava experimentálních organismů	29
4.1.1. Chov mezipřenosných plžů	29
4.1.2. Životaschopnost metacerkárií	29
4.1.3. Chov králíků.....	30
4.2. Vlastní experimenty.....	31
4.2.1. Experiment 1	31
4.2.2. Experiment 2	31
4.2.3. Optimalizace druhého experimentu	32
4.3. Odběry vzorků králíků.....	33
4.4. Hmotnost.....	35
4.5. Koprologie	35
4.5.1. Sedimentační metoda	35
4.5.1. Flotační metody.....	36
4.5.1.1. Sheatherova metoda.....	36
4.5.1.2. Koncentrovaná McMasterova metoda.....	36
4.6. Imunologie	37
4.6.1. Příprava exkrementně-sekrecčních produktů.....	37
4.6.2. ELISA	38
4.7. Hematologie.....	38
4.7.1. Hematokrit.....	38
4.7.2. Krevní obraz.....	39
4.8. Biochemie	39
4.9. Pitva králíků	40
4.10. Histologie	41
5. VÝSLEDKY	43

5.1. Životaschopnost MC	43
5.2. Hmotnost.....	44
5.3. Koprologie	44
5.3.1. Sedimentační metoda	44
5.3.2. Sheatherova flotační metoda.....	45
5.3.3. Koncentrovaná McMasterova flotační metoda	46
5.4. Imunologie	47
5.4.1. Experiment 1	47
5.4.2. Experiment 2	49
5.5. Hematologie.....	50
5.5.1. Hematokrit.....	50
5.5.2. Krevní obraz.....	52
5.6. Biochemie	54
5.7. Pitva králíků.....	55
5.8. Histologie.....	58
5.9. Shrnutí výsledků	59
6. DISKUSE.....	61
7. ZÁVĚR	70
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	72
9. SEZNAM LITERATURY	74

1. ÚVOD

Fascioloides magna (Bassi, 1875), neboli motolice obrovská, je jaterní motolice příbuzná veterinárně i humánně velmi významné motolici *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758), která je kosmopolitně rozšířená (Pybus, 2001). Výskyt motolice *F. magna* byl zaznamenán v Severní Americe – původní areál rozšíření, a v Evropě, kam byla v druhé polovině 19. století zavlečena (Swales, 1935). Nyní se vyskytuje převážně ve střední Evropě a zdá se, že se její areál stále rozšiřuje (Novobilský a kol., 2007a; Demiaszkiewicz a kol., 2015). Zde se adaptovala na místní divokou zvěř, především jelena evropského (*Cervus elaphus*) a srnce obecného (*Capreolus capreolus*) (Erhardová-Kotrlá, 1971). *Fascioloides magna* způsobuje vážné onemocnění zvané fascioloidóza, které může vyústit až v úhyn hostitele (Foreyt, 1992). Jelikož kromě divoké zvěře napadá i hospodářská zvířata, způsobuje tak značné ekonomické ztráty (Erhardová-Kotrlá, 1971), neboť napadený dobytek mívá snížený váhový přírůstek (Chroustová a kol., 1980) a může do několika měsíců i uhynout (Swales, 1935; Foreyt a Leathers, 1980).

Nejčastější způsob diagnostiky této motolice je často na základě vyšetření trusu nebo až dle výsledků pitvy. U hospodářských zvířat však nejsou vajíčka trusem vylučována z důvodu uzavření dospělých motolic do silnostěnné pseudocysty (př. u skotu) nebo proto, že motolice vůbec nedosahují pohlavní zralosti (př. u ovcí a koz) (Erhardová-Kotrlá, 1971; Pybus, 2001). Na tomto místě se tedy naskýtá prostor pro využití jiných intravitálních metod, které buď přímo odhalí přítomnost parazita (např. hladina specifických protilátek) či určí míru poškození hostitelského organismu (např. hladina jaterních enzymů). Přítomnost parazita v hostiteli se může promítnout do mnoha parametrů, které je možné kvalitativně či kvantitativně stanovit, ať už jde o zmíněnou koprologii, vývoj imunity, jak humorální – stanovení protilátek pomocí ELISA metody, tak buněčné – stanovení krevního obrazu, nebo o celkový zdravotní stav hostitele – stanovení hmotnosti, hematokritu, krevních proteinů, lipidů, sacharidu a metabolitu z krevního séra.

Jelikož příbuzná motolice *Fasciola hepatica* ve volné přírodě napadá i divoké králíky (Li, 1952; Pybus, 2001), kteří tak slouží jako důležitý rezervoár nákazy (Olsen, 1948), mým cílem bylo ověřit, zda je prostřednictvím tohoto hostitele možný přenos *F. magna* a během experimentu zaznamenat výše zmíněné intravitálně měřitelné projevy infekce.

2. CÍLE PRÁCE

1. Na základě dostupné literatury shrnující spektrum známých přirozených a experimentálních hostitelů *Fascioloides magna* charakterizovat aspekty vzájemné interakce a stanovit základní parametry jejího kvalitativního a kvantitativního hodnocení.
2. Experimentálně ověřit využití zjištěných parametrů pro sledování interakce experimentálně infikovaného hostitele *Oryctolagus cuniculus f. domesticus* motolicí *Fascioloides magna*.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Motolice *Fascioloides magna*

3.1.1. Obecná charakteristika

Fascioloides magna (Bassi, 1975), motolice obrovská, je společně s velmi významným zástupcem, motolicí jaterní (*Fasciola hepatica*, Linnaeus, 1758) a dalšími motolicemi (*Fasciola gigantica*, *Fasciolopsis buski*, *Fasciola jacksoni*), řazena do čeledi Fasciolidae, podtřídy Digenea, třídy Trematoda (Lofty a kol., 2008). *Fascioloides magna* se od ostatních zmíněných motolic liší především svojí lokalizací v definitivních hostitelích - jaterní parenchym, velikostí - až 10 cm, druhem nejčastěji parazitovaného definitivního hostitele – jelenovití (čeleď Cervidae) a také morfologicky (Erhardová-Kotrlá, 1971).

Tvar těla motolice *F. magna* je dorzoventrálně zploštělý a oválný bez kónického výběžku v přední části těla (Špakulová a kol, 2003). Velikost těla dospělé se pohybuje mezi 3 – 10 cm. Na ventrální straně jsou patrné dvě svalnaté přísavky; ústní a břišní (acetabulum) (Obr. 1). Ústní přísavkou je ohraničen ústní otvor, kterým začíná dobře vyvinutá trávicí soustava. Ta poté pokračuje svalnatým pharynxem a následně se dělí na dvě větve střeva, která se ještě mnohonásobně větví a kde dochází k trávení hlavního zdroje živin – krve (Erhardová-Kotrlá, 1971; Pybus, 2001). Po degradaci a zpracování erytrocytů dochází k vyloučení odpadního produktu z těla motolice, tzv. hematin (železitý porfyrin), který má hnědorůžovou barvu a je typickým znakem infekce motolice *F. magna* (Campbell, 1960). Pohlavní soustava motolice *F. magna* se skládá ze samčích i samičích pohlavních orgánů (tj. hermafrodit). Samčí pohlavní soustava obsahuje párová varlata (testes) umístěna vedle sebe, z nichž vedou chámovody do semenného váčku (vesicula seminalis), který vyúsťuje ve velmi nápadný vychlípitelný cirrus (Erhardová-Kotrlá, 1971). Samičí pohlavní soustava je tvořena jedním „vaječником“ (germarium), ze kterého oocyt (zárodečná buňka) putuje do prostoru zvaného ootyp, v němž probíhá oplození a vyúsťují Mehlisovy žlázy (skořápečné) a vitelária (žloutkové žlázy). Keříčkovitá vitelária jsou velmi nápadnou strukturou umístěnou pouze na ventrální straně těla dospělého červa (Ward, 1917). Žloutkové a skořápečné žlázy zajišťují vyvíjejícímu se vajíčku potřebnou ochranu a výživu. Vajíčko vybavené víčkem (operkulum) je žlutohnědé barvy a měří 124 – 175 µm na délku a 81 – 117 µm na šířku (Erhardová-Kotrlá, 1971). Velikost vajíček přibližně odpovídá rozměrům vajíček motolice *F. hepatica* (128-142 µm a na šířku 68-82 µm; Pybus, 2001),

což znesnadňuje jejich vzájemné rozlišení. Charakteristika dalších soustav v podstatě odpovídá obecnému popisu orgánových soustav pro celou podtřídu digenetických motolic. Povrch těla je tvořen syncyziálním tegumentem, tzv. neodermis, pod kterým je uložena okružní, podélná a šikmá svalovina. Nervová soustava se skládá ze dvou hlavových ganglií spojených příčnou spojkou, ze kterých vybíhají nevětvené nervové provazce do celého těla. Vylučovací soustava je tvořena protonefridiemi s plaménkovými a kanálkovými buňkami, které vyúsťují exkrecním pórem na povrch motolice (Erhardová-Kotrlá, 1971; Horák a Mikeš, 2007).



Obr. 1: Motolice *Fascioloides magna* (foto: M. Kašný).

3.1.2. Rozšíření

Fascioloides magna se původně vyskytovala pouze na území Severní Ameriky u zástupců jelenovitých, zejména u jelena wapiti (*Cervus elaphus canadensis*) a jelence běloocasého (*Odocoileus virginianus*). V druhé polovině 19. století byla právě společně těmito hostiteli zavlečena do Evropy. První záznam týkající se motolice *F. magna* v Evropě a vlastně první popis tohoto druhu vůbec pochází z Itálie (Národní park La Mandria v Turíně), kde ji popsal Bassi (1975) (Swales, 1935). Na území Čech byla poprvé zaznamenána na konci 19. století u daňka evropského (Ulrich, 1930). V dnešní době je *F. magna* nalézána především ve střední Evropě, a to na území České republiky (Novobilský a kol., 2007a), Slovenska (Rajský a kol., 2002), Maďarska (Majoros a Sztojkov, 1994), ale také Chorvatska (Marinculić a kol., 2002), Rakouska (Winkelmayer a Prosl, 2001) a Polska (Demiaszkiewicz a kol., 2015).

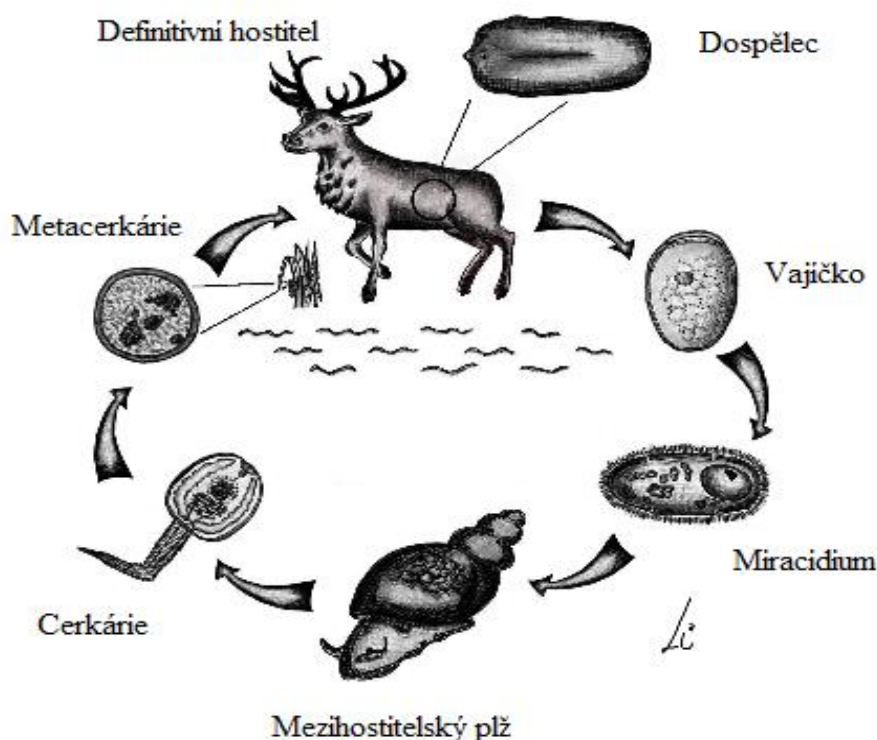
3.1.3. Životní cyklus

Životní cyklus motolice *F. magna* je dvouhostitelský (Obr. 2), zahrnuje mezihostitelského plže a přežvýkavce jako definitivního hostitele, jimiž jsou nejčastěji již několikrát zmínění zástupci jelenovitých (Erhardová-Kotrlá, 1971). Vajíčka vyprodukovaná dospělci jsou z jater odváděna žlučovody do střeva, odkud se společně s trusem dostávají do vnějšího prostředí. Ve vnějším vlhkém prostředí dochází k embryonaci vajíčka, která trvá přibližně 4 týdny (při 24 °C) (Swales, 1935; Špakulová a kol., 2003). Následující larvální stadium označované jako miracidium se po odklopení víčka (operkulum) uvolňuje z vaječné skořápky do vodního prostředí a aktivně vyhledává mezihostitele. Miracidium nepřijímá potravu a zásoba jeho energie vydrží jen po několik hodin (8 – 12 hodin) (Campbell, 1960), čas pro vyhledání mezihostitelského plže je tedy značně omezený. K nalezení plže napomáhají miracidiumu chemoreceptory, kterými vnímá látky (hemolymfu) produkované mezihostiteli (Campbell, 1960; Erhardová-Kotrlá, 1971), a také velké množství povrchových cílů umožňujících pohyb.

Jako mezihostitelé slouží druhy sladkovodních plžů rodu *Lymnaeidae*. V Severní Americe se jedná především o druh *Pseudosuccinea columella*, (Krull, 1933; Swales, 1935). V Evropě je nejčastějším mezihostitelem semiakvatický druh *Galba truncatula* (Erhardová-Kotrlá, 1971). V nedávné době bylo zjištěno, že i některé druhy rodu *Radix*, např. *Radix labiata* (Leontovyč a kol., 2014) či *Radix peregra* (Faltýnková a kol., 2006) mohou sloužit jako mezihostitelé motolice *F. magna*. V těle plže dochází k nepohlavnímu množení parazita přes stadia označované jako sporocysta, rédie, cercárie. Z jednoho miracidia může za cca 2 měsíce vzniknout přibližně 1000 cercárií (Pybus, 2001; Špakulová a kol., 2003). Vyvinuté cercárie se aktivně uvolňují z těla plže, pohybují se ve vodním prostředí pomocí ocásku a ulpívají na rostlinné vegetaci, na které se encystují a vytvoří stadia zvané metacercárie (dále jen MC). Encystované metacercárie jsou velmi odolné, mohou ve vlhkém prostředí přežívat i několik měsíců, avšak v suchém prostředí hynou většinou do dvou týdnů (Špakulová a kol., 2003). Infekční pro definitivního hostitele jsou právě metacercárie, které jsou pozřeny při spásání vegetace daným hostitelem (Chroustová a kol., 1980).

Jako definitivní hostitel slouží poměrně široké spektrum různých druhů přežvýkavců (Tab. 1). V našich podmínkách je nejčastěji infikována lesní zvěř, především jelen evropský (*Cervus elaphus*). Po pozření se metacercárie ve střevě encystuje a vzniklé stadium, juvenilní motolice, migruje přes stěnu střeva břišní dutinou do jater (Erhardová-Kotrlá, 1971; Špakulová a kol., 2003), což trvá cca 2 týdny (Presidente a kol., 1980). V jaterním

parenchymu se kolem 2 – 3 motolic vytváří tzv. pseudocysta, vazivový útvar z pojivové tkáně (velikost 5 – 10 cm) (Foreyt a kol., 1977). V této pseudocystě dochází k pohlavní zralosti, sexuálnímu rozmnožování a dlouhodobému přežívání dospělých červů. Motolice mohou v definitivním hostiteli přežít i několik let (Foreyt a kol., 1977; Novobilský a kol., 2007a). Produkovaná vajíčka jsou v ideálním případě přes stěnu pseudocysty odváděna prostupujícími žlučovody do střeva a dále s trusem do prostředí (Swales, 1935). Prepatentní doba se pohybuje mezi 3 – 7 měsíci (Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt a Todd, 1976).



Obr. 2: Schéma životního cyklu motolice *Fascioloides magna* (kresba: L. Jedličková).

3.1.4. Patogenita

Patogenita motolice *F. magna* závisí na celé řadě faktorů. Mezi nejčastější faktory se udává druh infikovaného hostitele, kdy se negativní dopad na jednotlivé druhy a typy hostitelů diametrálně liší. Například jelen dlouhodobě odolává silné nákaze bez zjevných příznaků (Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt, 1996a), naopak srnec může uhynout již při nízkém počtu motolic (Erhardová-Kotrlá, 1971; Kotrlá a kol., 1984). Mezi další faktory ovlivňující patogenní účinek fascioloidózy se řadí věk hostitele, aktuální kondice, výživa a infekční dávka metacerkárií (Kingscote, 1950; Foreyt a Todd, 1979; Pybus, 2001). Naopak hmotnost a pohlaví nejsou podle výzkumů některých autorů v míře patogenního účinku rozhodující

(Foreyt a Todd, 1975; Foreyt a kol., 1977). Bylo také prokázáno, že se stejnou pravděpodobností jsou infikována obě pohlaví, avšak u samců probíhá infekce intenzivněji (Erhardová-Kotrlá, 1971; Pybus, 2001). Díky všem těmto značně proměnným faktorům se projevy infekce pohybují v širokém rozpětí od subklinického průběhu až po úhyn hostitele (Foreyt, 2009).

K nejvýraznějším patologickým projevům fascioloidózy dochází během migrace nedospělých motolic břišní dutinou a jaterní tkání, což je doprovázeno změnami ve tkáních a vznikem tzv. migračních drah, v nichž jsou patrné zbytky degradované tkáně, hemoragie a krevní sraženiny (Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt, 1996a). Postupně bývá poškozená oblast ohraničena fibrózní (pojivovou) tkání, lemující shluk odumřelých buněk včetně bílých krvinek, nazývaný léze (Kingscote, 1950). V některých těžších případech mohou léze až kalcifikovat a okolní tkáň se může změnit v nefunkční zjizvenou až cirhotickou (Erhardová-Kotrlá, 1971; Pybus, 2001). Může také docházet k odumírání tkáně, a tudíž k tvorbě nekrotických ložisek, což může vést až k akutnímu zánětu pobřišnice (Foreyt, 1992, 1996a; Rajský a kol., 2002). Specifickým projevem infekce motolice *F. magna* je přítomnost tzv. tmavého pigmentu (= odpadní produkt degradace hemoglobinu) (Campbell, 1960).

V některých případech byly nalézány migrující motolice i v jiných orgánech než v játrech. Dalším nejčastěji infikovaným orgánem jsou plíce (Presidente a kol., 1980), následuje pak břišní dutina (Foreyt a Todd, 1975), hrudní dutina, ledviny, slezina (Conboy a Stromberg, 1991), bránice (Swales, 1935) a dokonce i páteřní kanál (Thacker, 2002) či svalovina (Chroustová a kol., 1980). Při těchto lokalizacích většinou nedochází k tvorbě pseudocysty a motolice nejen, že nedospívají, ale také dlouhodobě nepřežívají (Erhardová-Kotrlá, 1971; Presidente a kol., 1980).

Ve většině případů, zejména u jelena evropského (*Cervus elaphus*), probíhá infekce bez viditelných klinických projevů (Foreyt a Todd, 1979; Conboy a kol., 1988; Foreyt, 1992; Pybus, 2001), ale někdy se vyskytují příznaky jako odmítání potravy (nechutenství), úbytek na váze (až anorexie) a celková slabost (Foreyt, 1992, 1996a; Rajský a kol., 2002).

3.1.5. Přirození definitivní hostitelé - kategorie

Jak již bylo v úvodu řečeno, *F. magna* napadá široké spektrum definitivních hostitelů. Avšak jejich vnímavost či tolerantnost k nákaze se u jednotlivých druhů značně liší, což se může projevovat buď tvorbou konkrétní jaterní pseudocysty nebo absencí tvorby jakékoliv pseudocysty. Dosud není známo, zda je tvorba pseudocysty stimulována parazitem, nebo

zda se jedná čistě o obraný proces hostitelského organismu – uzavření parazita. (Foreyt, 1992, 1996a). Právě podle schopnosti a způsobu uzavření motolic do pseudocysty můžeme rozdělit hostitele do tří kategorií, které byly již dříve navrženy v práci Pybus (2001) a upraveny (Kašný a kol., 2012).

3.1.5.1. Specifičtí definitivní hostitelé

U této kategorie hostitelů dochází k tvorbě tenkostěnné pseudocysty kolem motolic nacházejících se v jaterní tkáni (Pybus, 2001). Tloušťka stěny této tzv. otevřené pseudocysty měří pouze 1,00-1,75 mm a je tvořena kolagenními fibrily, které ostře oddělují pseudocystu od okolní tkáně. Je také prostoupena krevními kapilárami, ze kterých motolice pravděpodobně získávají krev (Swales, 1935). Důležitým faktorem pro šíření motolice je pak propojení pseudocysty se žlučovody, což umožňuje uvolňování vyprodukovaných vajíček, ale i tmavého pigmentu a dalších odpadních látek do střeva a dál do vnějšího prostředí (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971; Chroust a Chroustová, 2004).

Hlavními zástupci této kategorie hostitelů jsou především evropské a severoamerické druhy z čeledi Cervidae (jelenovití). V původním areálu výskytu motolice *F. magna* se jedná zejména o jelena wapiti (*Cervus elaphus canadensis*), jelence běloocasého (*Odocoileus virginianus*) (Erhardová-Kotrlá, 1971), jelence ušatého (*Odocoileus hemionus*) a soba polárního karibu (*Rangifer tarandus caribou*) (Swales, 1935). V evropských podmínkách se motolice adaptovala na náš nejběžnější druh, jelena evropského (*Cervus elaphus*) (Erhardová-Kotrlá, 1971), ale je také běžně nalézána u daňka evropského (*Dama dama*) (Ulrich, 1930) a srnce obecného (*Capreolus capreolus*) (Záhoř, 1965).

3.1.5.2. Nespecifičtí definitivní hostitelé

U zástupců této kategorie dochází k tvorbě pseudocysty (tzv. uzavřené pseudocysty) (Swales, 1935), která je typická velmi silnou stěnou (10 – 23 mm) (Lankester, 1974; Swales 1935). Stěna pseudocysty v nepravidelných výběžcích přechází do okolní tkáně (Swales, 1935; Kennedy a kol., 1999). Díky této nadměrné produkci vazivové tkáně tvořící stěnu pseudocysty dochází ke ztrátě průchodnosti žlučovodů prostupujících pseudocystu, a proto vyprodukovaná vajíčka ani tmavý pigment nemohou odcházet dál do trávicího traktu hostitele a hromadí se uvnitř pseudocysty (Swales, 1935; Foreyt a Todd, 1973; Chroustová a kol., 1980). Z těchto důvodů nehrají tyto hostitelé významnou roli v šíření parazita (Swales, 1936; Pybus, 2001). Na druhou stranu bylo zaznamenáno, že při značném poškození jaterní

tkáně během silné infekce, může dojít k uvolnění vajíček do žlučovodů, a tudíž k uzavření cyklu (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt a Todd, 1974).

Tato kategorie hostitelů zahrnuje nejen zástupce hospodářských zvířat, jako je tur domácí (*Bos taurus*) (Swales, 1935), prase domácí (*Sus scrofa f. domestica*) (Foreyt, 1979), či kůň (*Equus caballus*) (McClanahan a kol., 2005), ale také volně žijící prase divoké (*Sus scrofa*) (Foreyt a Todd, 1975), lama krotká (*Lama glama*) (Conboy a kol., 1988), bizon (*Bison bison*) (Cameron, 1923) a los (*Alces alces*) (Kingscote, 1950).

3.1.5.3. Netypičtí hostitelé

Netypičtí hostitelé jsou charakterizováni vysokou citlivostí na nákazu, která často vyústí ve fatální následky, až úhyn jedince (Swales, 1935). Tento fakt je pravděpodobně způsoben neschopností hostitele tvořit vazivovou bariéru kolem migrujících motolic, čímž dochází k jejich trvalé migraci, a tím k rozšiřujícímu se poškození jaterní tkáně (Foreyt, 1992). Někteří z napadených hostitelů této kategorie mohou uhynout už do několika měsíců po infekci (Swales, 1935). Jen velmi zřídka se stává, že motolice v tomto typu hostitele pohlavně dospěje a začne produkovat vajíčka do vnějšího prostředí, čímž se uzavře cyklus (Foreyt, 1990). Obecně zástupci této kategorie v šíření motolice *F. magna* nijak významně nefigurují právě díky neschopnosti dosažení pohlavní zralosti (Foreyt a Todd, 1976).

Hlavním zástupcem netypických hostitelů je ovce domácí (*Ovis aries*) a koza domácí (*Capra hircus*) (Olsen, 1949). Daly by se sem však zařadit i jiné druhy, jejichž vnímavost k nákaze byla ověřována pouze experimentálně, např. ovce tlustorohá (*Ovis canadensis*) (Foreyt, 1996b), kamzík horský (*Rupicapra rupicapra*) (Erhardová-Kotrlá, 1971), ale také laboratorní modely jako králík, morče (Swales, 1935; Foreyt, 1979; Conboy a Stromberg., 1991), potkan (nepublikováno) a myš (Foreyt, 1979).

Tab. 1: Seznam definitivních hostitelů a jejich zařazení do kategorií.

kategorie	druh hostitele	citace (př.)
Specifičtí definitivní hostitelé	Jelen wapiti (<i>Cervus elaphus canadensis</i>)	Erhardová-Kotrlá, 1971
	Jelenec běloocasý (<i>Odocoileus virginianus</i>)	Erhardová-Kotrlá, 1971
	Jelenec ušatý (<i>Odocoileus hemionus</i>)	Swales, 1935
	Jelen evropský (<i>Cervus elaphus</i>)	Erhardová-Kotrlá, 1971
	Daněk evropský (<i>Dama dama</i>)	Ulrich, 1930
	Srniec obecný (<i>Capreolus capreolus</i>)	Záhoř, 1965
	Sob karibu (<i>Rangifer tarandus</i>)	Swales, 1935
Nespecifičtí definitivní hostitelé	Tur domácí (<i>Bos taurus</i>)	Swales, 1935
	Bizon (<i>Bison bison</i>)	Cameron, 1923
	Kůň domácí (<i>Equus caballus</i>)	McClanahan a kol., 2005
	Los evropský (<i>Alces alces</i>)	Kingscote, 1950
	Prase divoké (<i>Sus strofa</i>)	Foreyt a Todd, 1975
	Prase domácí (<i>Sus scrofa f. domestica</i>)	Foreyt, 1979
	Lama krotká (<i>Lama glama</i>)	Conboy a kol., 1988
Netypičtí hostitelé	Ovce domácí (<i>Ovis aries</i>)	Olsen, 1949
	Koza domácí (<i>Capra hircus</i>)	Olsen, 1949
	Kamzík horský (<i>Rupicapra rupicapra</i>)	Erhardová-Kotrlá, 1971
	Ovce tlustorohá (<i>Ovis canadensis</i>)	Foreyt, 1996b
	Králík domácí (<i>Oryctolagus cuniculus f. dom.</i>)	Swales, 1935
	Myš laboratorní (<i>Mus musculus</i>)	Foreyt, 1979
	Morče domácí (<i>Cavia aperea porcelus</i>)	Swales, 1935

3.2. Interakce parazit – hostitel

Předmětem zájmu předních parazitologických týmů, ale i ekologů a evolučních biologů je sledování interakce mezi parazitem a hostitelem, a to jak na úrovni jedinců, tak celých populací. Tento vztah můžeme studovat jak z pohledu dlouhodobého (evoluce, ekologie) tak krátkodobého (biologická zdatnost jedince). V rámci dlouhodobého působení obou zmíněných strategií (parazit, hostitel) se studuje především tzv. závod ve zbrojení a vliv parazita na rozšíření a velikost populace hostitelského druhu (Hurtrez-Bousses a kol., 2001; Flégr a Svobodová, 2007). V krátkodobém měřítku je možné sledovat interakci parazit-

hostitel na úrovni dané populace (jak parazita, tak hostitele) či jednotlivce. Značný význam má patogenní působení parazita, který svojí přítomností v hostitelském organismu ovlivňuje různé fyziologické procesy či způsob obrany hostitele proti parazitovi. Například u infekce motolicí *F. magna* může mít hostitelova obrana podobu vyvolání silné imunitní odpovědi, ale také vytvoření mechanické zábrany v podobě pseudocysty vedoucí ke snížení negativního působení migrace parazita (Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971).

3.3. Měřitelné parametry infekce

Během infekce parazity dochází v těle hostitele k řadě změn, které lze kvantitativně či kvalitativně hodnotit, což může přímo či nepřímo parazita diagnostikovat. Přítomnost motolice *F. magna* v hostitelském organismu bývá nejčastěji odhalena až na základě pitvy (Pybus, 2001). Avšak obecně existuje velké množství metod intravitální diagnostiky, tj. za života hostitele, které je možné aplikovat právě za účelem odhalení nákazy *F. magna*. Některými metodami lze nejen odhalit, ale někdy i přímo určit druh parazita - nález vajíček v koprologickém materiálu a definování jejich morfologických parametrů (Wobesser a kol., 1985). Jiné metody odráží přítomnost parazita pouze nepřímo, avšak mohou dokreslovat celkový zdravotní stav hostitele a průběh infekce. Je známo, že přítomnost například migrujících juvenilních motolic *F. magna* v jaterní tkáni se odrazí na biochemických parametrech měřitelných v krevním séru hostitele (Foreyt a Todd, 1979; Presidente a kol., 1980; Stromberg a kol., 1985; Conboy a Stromberg, 1991; Severin a kol., 2011). Dále při kontaktu parazitárních molekul s imunitním systémem hostitele dochází k tvorbě specifických protilátek (Novobilský a kol., 2007b), které lze také změřit v krevním séru. Svojí přítomností a životními nároky parazit ovlivňuje i množství a složení hostitelovy krve projevující se v krevním obrazu (Swales, 1936; Qureshi a kol., 1990; Presidente a kol., 1980).

V níže uvedených kapitolách jsou podrobněji rozepsány diagnostické metody a kvalitativní a kvantitativní parametry, které odráží průběh parazitární infekce, vztaženo především k infekci motolicí *F. magna*.

3.3.1. Hmotnost

Váhový přírůstek je odraz celkového zdravotního stavu jedince. Proto i během parazitárního onemocnění je hmotnost hostitele určujícím znakem projevu parazita. Úbytek na váze z důvodu infekce motolicí *F. magna* má negativní dopad nejen na zdraví divoké zvěře

(Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt, 1992; Špakulová a kol., 2003), také na ekonomickou stránku v chovech s hovězím dobytkem, který nedosahuje jateční hmotnosti (Chroustová a kol., 1980). Snížení váhového přírůstku u ovcí z důvodu infekce motolicí *F. hepatica* zaznamenal také ve svých experimentech Raadsma kol. (2007) a Phiri a kol. (2007). Avšak změna hmotnosti mezi infikovanými a neinfikovanými hostiteli nebývá nutná, jak ukazují mnohé experimentální pokusy jak s *F. magna* (Foreyt a Todd, 1979; Conboy a Stromberg, 1991), tak *F. hepatica* (Venguš a kol., 2003).

3.3.2. Koprologie

Koprologické vyšetření na základě mikroskopického pozorování vzorku trusu je základní diagnostickou metodou, kterou je možné odhalit přímo přítomnost parazita. Díky své časové a finanční nenáročnosti doprovázené minimálním množstvím speciálního vybavení je tato metoda nejrozšířenější parazitologickou diagnostickou metodou (Wobesser a kol., 1985; Foreyt, 1996b). V případě motolice *F. magna* není v souvislosti s determinací vajíček možné spolehnout se pouze na mikroskopické vyšetření, poněvadž vajíčka *F. magna* jsou obtížně morfologicky odlišitelná od jiných motolic (*Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, *Paraphistomum cervi*) (Pybus, 2001; Kaufmann, 1996; Rieu a kol., 2007). U kategorie tzv. nespecifických definitivních hostitelů je průkaz vajíček značně omezen a u tzv. netypických hostitelů zcela znemožněn (z výše uvedených důvodů). Proto lze koprologické vyšetření v případě infekce *F. magna* aplikovat jen u tzv. specifických definitivních hostitelů, u ostatních kategorií je nutné aplikovat jiné diagnostické metody.

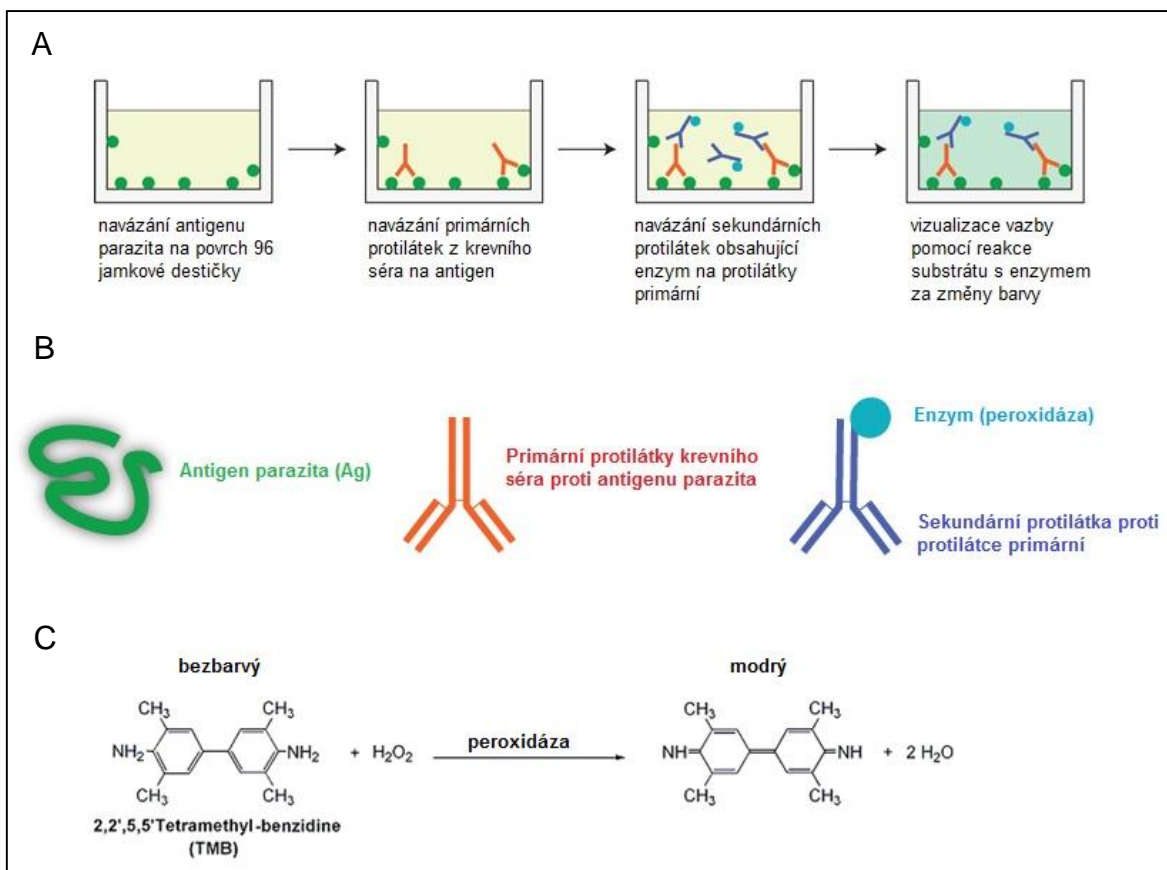
Jelikož vajíčka motolic jsou těžší než voda, využívá se ke zvýšení jejich záchytu metoda sedimentační, kdy dochází k usazení těžších vajíček na dno nádoby (Thienpont a kol., 1980; Anh a kol., 2008). Naopak flotační metody se využívají u parazitárních stadií, která mají nižší hustotu než okolní prostředí (např. záchyt oocyst kokcií), a které je charakterizováno konkrétním flotačním roztokem o dané hustotě (Tab. 2) (Faust a kol., 1938, 1939; Wobeser a kol., 1985). Výsledkem může být stanovení EPG (Eggs Per Gram) či OPG (Oocyst Per Gram) např. McMasterova metoda (Henriksen a Aagaard, 1976; Bauer a kol., 2010). McMasterova počítací destička pracuje s jasně definovaným objemem pozorovaného vzorku a díky počítací síti dochází ke snadnějšímu sčítání hledaných objektů.

Tab. 2: Typy flotačních roztoků.

název	chemikálie	hustota
Sheatherova metoda	$C_{12}H_{22}O_{11}$	1,27 g/cm ³
Faustova metoda	$ZnSO_4$	1,18 g/cm ³
Füllebornova metoda	NaCl	1,22 g/cm ³
Kozák-Mágrová metoda	$MgSO_4 + ZnSO_4 + C_3H_8O_3$	1,274 g/cm ³
Brezova metoda	$MgSO_4 + Na_2S_2O_3$	1,292 g/cm ³

3.3.1. Imunologie

Imunologické metody jsou velmi často používaný způsob vedoucí ke zjištění přítomnosti parazita v těle hostitele. Mezi nejpoužívanější metodu patří ELISA (Enzyme - Linked Immuno Sorbent Assay), která díky své citlivosti umožňuje nepřímé, ale relativně spolehlivé, stanovení přítomnosti určitého druhu parazita. Prostřednictvím této metody jsou detekovány protilátky v krevním séru. Princip této metody spočívá ve spektrofotometrickém stanovení množství primárních protilátek (např. IgG) navázaných na specifický antigen parazita (Obr. 3). S využitím značených sekundárních protilátek specificky reagujících s danou primární protilátkou je následně možné sledovat kvantitativní míru reakce (Porstmann a Kiessig, 1992).



Obr. 3: Princip nepřímé ELISA metody pro detekci protilátek v krevním séru na antigen parazita (http://bioutil.unige.ch/experiences/exp_elisa.php, upraveno). **A:** Postup navázání jednotlivých složek reakce. **B:** legenda jednotlivých značek. **C:** schéma reakce vizualizace – přeměna bezbarvého TMB pomocí enzymu (peroxidáza) vázaného na sekundární protilátku.

Jako referenční antigen se v sérodiagnostice motolic velmi často používají různým způsobem připravené a ošetřené jejich exkrementně - sekreční produkty (E/S produkty), což je směs látek, které jsou jednak vylučovány přes exkrementní pór (močovina a amoniak; Smyth a Halton, 1983), dále látky sekretované střevními buňkami (peptidázy – cysteinové, serinové; Dalton a kol., 2004) či cystogenními žlázami (elastiny, kolageny a keratiny, Dixon, 1966). E/S produkty byly v minulosti mnohokrát využity i pro zjištění přítomnosti fasciolidních motolic (Sinclair a Wassall, 1988; Pfister, 1990; Ferre a kol., 1997; Sanchez-Andrade a kol., 1998; Martínez-Moreno a kol., 1999; Bossaert a kol., 2000; Chauvin a kol., 2001). Některé z těchto testů vykazovaly až 100% specifitu a senzitivitu (např. El Ridi a kol., 2007).

Na druhou stranu mezidruhová diferenciací založená na komplexní směsi E/S produktů je často doprovázena zkříženými reakcemi (Novobilský a kol., 2007b), proto se výzkum zaměřuje na charakterizaci jednotlivých unikátních imunogenních složek E/S produktů, na jejichž základě (např. rekombinantní proteinový antigen či syntetický antigenní

peptid) by bylo možné odlišit i jednotlivé druhy. Rekombinantní protein použil Carnevale a kol. (2001) pro diagnostiku motolice *F. hepatica* u experimentálně infikovaných ovcí. Konkrétně byl použit katepsin L (34 a 38 kDa), histolytický enzym patřící mezi cysteinové proteinázy (Dalton a kol, 2003). Také Ruiz a kol. (2003) ve své práci využil cysteinové proteinázy o velikosti 28 a 34 kDa, jako referenční antigeny pro detekci protilátek ze sér experimentálně infikovaných koz motolicí *F. hepatica*. Podobně u experimentálně infikovaných koz motolicemi *F. magna* a *F. hepatica* charakterizoval Novobilský a kol. (2007b) druhově specifické cysteinové proteinázy, o velikosti 40 a 120 kDa z E/S produktů *F. magna* a 80 a 160 kDa z E/S produktů *F. hepatica*, které nevykazují zkříženou reaktivitu. Rekombinantně připravená thioredoxin–glutathion reductáza (92 kDa) byla použita také jako účinný antigen pro detekci *F. hepatica* u králíků (Maggioli a kol., 2011). V případech využití syntetických peptidů či rekombinantních proteinových antigenů byla také potvrzena vysoká specifita a senzitivita při vyšetření sér přežvýkavců infikovaných *F. hepatica* či *F. gigantica* nepřímou ELISA metodou (Cornelissen a kol. 2001; Raina a kol. 2006; Maggioli a kol., 2011).

Vývoj protilátek u infikovaných definitivních hostitelů motolicí *F. magna* případně *F. hepatica* byl zaznamenán v mnoha pracích, a to nejen u experimentálně infikovaných zvířat, ale také u volně žijících. Například Martínez-Moreno a kol. (1999) u experimentálně infikovaných koz motolicí *F. hepatica* zaznamenal signifikantní nárůst IgG již ve třetím týdnu infekce. Kozy byly opakovaně vystavovány infekční dávce MC, a tak byla nejvyšší hodnota IgG zaznamenána mezi 9. a 11. týdnem experimentu (z celkové délky 25 týdnů). Nejčastěji měřitelnými protilátkami jsou IgG, měřené ve většině publikací zabývajících se imunodiagnostikou fasciolózy (Paz a kol., 1998; Bossaert a kol., 2000; Ruiz a kol., 2003). Kromě protilátek IgG byly měřeny například i IgA u ovcí s *F. hepatica*, přičemž v porovnání s IgG byla hladina IgA mnohem nižší. Nárůst obou imunoglobulinů nastal již v 2. týdnu experimentu, ale po 8. týdnu začínala hladina IgA mírně klesat oproti IgG (Ferre a kol., 1997). Také byly měřeny protilátky IgM u fasciolózy ovcí a skotu. Během tříměsíční experimentální infekce ovcí byl zaznamenán nárůst specifických protilátek IgM vždy po 2 týdnech od inokulace MC (Chauvin a kol., 1995). Na druhou stranu nebyl zaznamenán signifikantní nárůst IgM u skotu vystaveného 1300 MC i přes statisticky významný nárůst monoklonálních IgG od 3. týdne (Clery a kol., 1996). O imunitní reakci na infekci motolice *F. magna* měřené pomocí ELISA metody je velmi málo publikací. Imunitní odpověď u experimentálně infikovaných koz se zabýval ve své práci Novobilský a kol. (2007b), který

měřil vývoj celkových imunoglobulinů. Nárůst polyklonálních protilátek byl zaznamenán již od 2. týdne po infekci a stále v průběhu experimentu hladina Ig stoupala až do ukončení v 17. týdnu.

3.3.2. Hematologie

Hematologie je vědní obor, který se zabývá studiem krve a krvetvorby. Krev je složena ze dvou základních složek, krevních buněk (erytrocyty, leukocyty a trombocyty) a krevní plazmy, což je tekutá složka tvořená z vody, organických (bílkoviny, glukóza, vitamíny, hormony a enzymy) a anorganických látek (soli). Organické i anorganické látky jsou udržovány v relativně stálých koncentracích, které se v důsledku různých podmínek, včetně patologických změn, mohou měnit (Kozák, 2001; Doubek a kol., 2003).

Vlivem přítomnosti parazita v těle hostitele může docházet ke změně složení krve, a to především v množství erytrocytů a jednotlivých typů leukocytů. Pokud je parazit hematofág, může dojít ke snížení množství erytrocytů vyúsťující až v akutní či chronickou anémii. Naopak hostitelovou reakcí na přítomnost parazita je zvýšená produkce leukocytů, konkrétně eozinofilů (Presidente a kol., 1980; Roberts, 1968; Foreyt, 2009). Proto i tyto dva parametry ovlivněné přítomností parazita v hostitelském těle je vhodné sledovat. Jednou z nejdostupnějších a nejméně finančně náročných hematologických metod je odečet hematokritu a krevního obrazu.

3.3.2.1. Hematokrit

Hematokrit je definován jako procentuální zastoupení červených krvinek v celkovém množství krve. Měření lze provést s použitím kapiláry, jejíž vnitřní stěna je pokryta antikoagulační látkou (často heparinem), kdy po centrifugaci je pak možné rozlišit tři vrstvy; horní nažloutlá vrstva je krevní plasma, která má nejnižší hustotu, proto po centrifugaci zaujímá horní část kapiláry (vnitřní ke směru středu otáčení). Spodní vrstvu tvoří erytrocyty, které jsou nejtěžší, tudíž byly při centrifugaci stočeny na vnější stranu kapiláry od centra otáčení. Mezi těmito vrstvami je možné rozeznat tenký světlý pruh tvořený leukocyty (tzv. buffy coat) (Donner, 1985; Doubek a kol., 2003, 2007). Zvýšená hodnota hematokritu může značit hypoxii nebo dehydrataci. Naopak snížení hematokritové hodnoty znamená ve většině případů anémii, která může být způsobena bakteriální infekcí, přítomností krevsajících parazitů, působení toxinů či nedostatečným příjmem živin, apod. (Kozák, 2001; Doubek a kol., 2003).

Hodnoty hematokritu byly sledovány v dřívějších studiích zaměřených na přirozené a experimentální nákazy hostitele fasciolidními motolicemi. Snížená hladina hemoglobinu či erytrocytů byla zjištěna během experimentální infekce *F. hepatica* především u ovcí (Matanović a kol., 2007; Foreyt, 2009) a skotu (Lotfollahzadeh a kol., 2008), ale i u experimentálně infikovaného jelence běloocasého (Presidente a kol., 1975) či bizona (Foreyt a Drew, 2010). Naopak Nansen a kol. (1975) u infikovaného koně nezaznamenal pokles erytrocytů; udává, že kůň je relativně odolný vůči migrujícím juvenilním stádiím motolic *F. hepatica*, a právě proto nebyl při měření hematokritu stanoven žádný projev anémie, a to i přes nález dospělých motolic ve žlučovodech.

I když je anémie charakteristickým rysem spíše u *F. hepatica* (Roberts, 1968), tak i u hostitelů motolice *F. magna* byla anémie pozorována a to především kvůli krvácení z tkání způsobeném migrací juvenilních stádií, např. u jelence běloocasého (Foreyt a Todd, 1979; Presidente a kol., 1980). Presidente a kol. (1980) odhaduje, že anémie vznikla na základě krvácení v břišní dutině experimentálně infikovaných jelenců běloocasých.

Fyziologická hodnota hematokritu za normálního stavu laboratorního králíka se pohybuje v rozsahu 33 – 57 % (Özkan a kol., 2012).

3.3.2.2. Krevní obraz

Stanovení krevního obrazu je vedle hematokritu základním vyšetřením krve, které určuje počet a vlastnosti krevních buněk. V dnešní době existuje celá řada speciálních způsobů stanovení zohledňující nejen množství, tvar a velikost jednotlivých buněk a složek krve, ale také jejich určité vlastnosti, jimiž jsou například střední objem erytrocytu, průměrná hmotnost, koncentrace hemoglobinu v erytrocytu, distribuční křivka erytrocytů a trombocytů nebo počet a objem trombocytů (Kozák, 2001; Doubek a kol., 2003). Základními parametry krevního obrazu jsou především (Pecka, 2006):

- počet červených krvinek (RBC)
- počet bílých krvinek (WBC)
- množství hemoglobinu (HGB)
- hematokrit (HCT)

Nedílnou součástí krevního obrazu je diferenciální počet bílých krvinek, který stanovuje zastoupení jednotlivých typů leukocytů (Pecka, 2006).

- ***Lymfocyty***

Lymfocyt je nejmenší bílá krvinka (velikost 7 – 15 μm) kolující v krvi, která je řazena mezi agranulocyty – v cytoplasmě se nenacházejí granula. Její jádro je velké a vyplňuje téměř celou buňku. Lymfocyty se podílejí na tvorbě specifické imunitní odpovědi. B lymfocyty produkují imunoglobuliny a T lymfocyty obecně regulují imunitní systém vylučováním cytokinů (tj. signální proteiny navozující dělení a diferenciaci buněk imunitního systému). Část těchto buněk (B – lymfocyty) je schopna přeměnit se na buňky paměťové, které tak zajišťují trvalou imunitu (Schalm, 1961; Moore, 2000; Hořejší a Bartůňková, 2005).

- ***Neutrofilly***

Jsou nejpočetnějšími krevními buňkami savců (velikost 10 – 15 μm). Patří mezi granulocyty, což znamená, že mají ve své cytoplasmě granula. Ta jsou po obarvení Giemsovým barvivem výrazně fialová a obsahují také různé hydrolytické enzymy. Zralé neutrofilly mají jádro velmi segmentované, oproti jádru časných stadií, které je protáhlé, označované jako tzv. tyčka. Neutrofilly slouží k obraně proti bakteriím, které dokážou fagocytovat. Podílejí se na obraně organismu během akutní fáze bakteriální infekce (Schalm, 1961; Moore, 2000; Hořejší a Bartůňková, 2005).

- ***Monocyty***

Monocyty jsou největší krevní buňky (velikost 15 – 18 μm), často mají nepravidelný tvar s množstvím výběžků. Některé monocyty patří mezi agranulocyty, některé však mohou mít v cytoplasmě azurofilní granula. V periferní krvi je monocyt víceméně nefunkční buňkou, poněvadž zde funguje pouze jako prekurzor makrofágů. Pokud ale z krve vstoupí přes endotel do tkání nebo tělních dutin, tak se transformuje v aktivní makrofág, který je schopen fagocytovat mikroorganismy. Monocyty hrají důležitou roli, protože jsou schopné prezentovat na svém povrchu antigen (jsou tzv. antigen prezentující buňky = APC) (Schalm, 1961; Moore, 2000; Hořejší a Bartůňková, 2005).

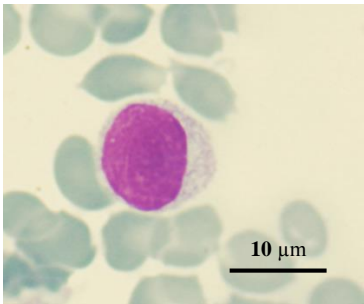
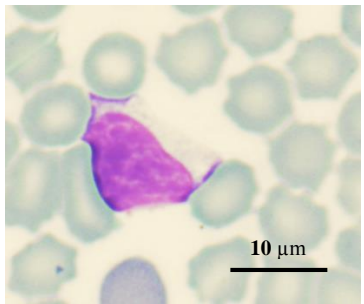
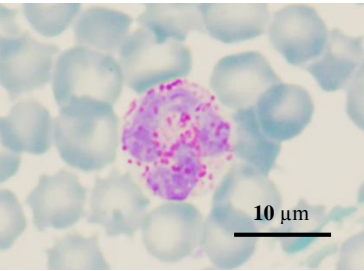
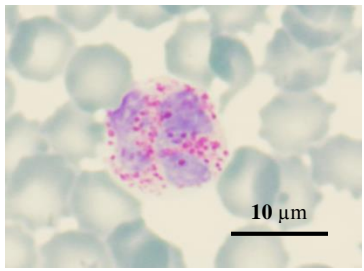
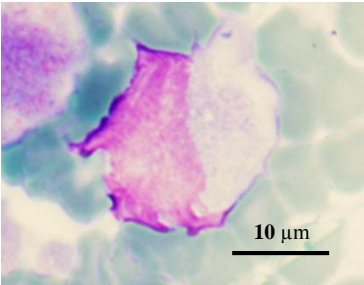
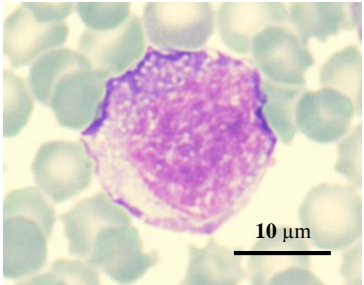
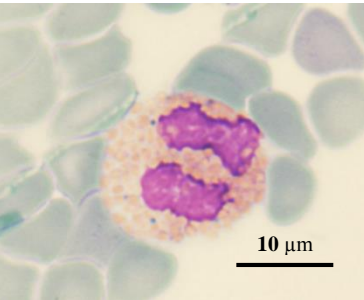
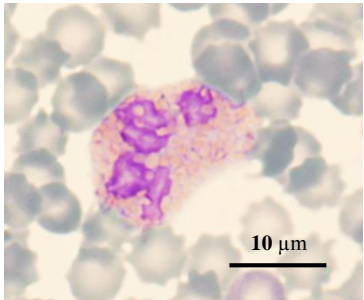
- ***Eozinofily***

Eozinofily (velikost 12 – 16 μm) patří stejně jako neutrofilly mezi granulocyty, mají však granula po obarvení Giemsou do odstínů červené, jsou také větší než granula neutrofilů. Hrají důležitou roli v obraně proti mnohobuněčným parazitům a v regulaci alergických a zánětlivých procesů. Mají totiž v granulích obsaženy toxické látky (bazické proteiny,

fosfatázy, peroxidázy), které po uvolnění mohou přispět k likvidaci patogena (Schalm, 1961; Moore, 2000; Hořejší a Bartůňková, 2005)

Poměr jednotlivých typů leukocytů je mezidruhově i vnitrodruhově variabilní. Rozpětí jejich množství a velikostí u králíků (v experimentální části práce byli využiti jako hostitelé *F. magna*) je uvedeno v Tab. 3. společně s možnými variabilními tvary.

Tab. 3: Intervaly velikostí a procentuálního zastoupení jednotlivých typů leukocytů v krvi králíka (Lester a kol., 2005) s názorným zobrazením jejich variability. Světelný mikroskop, 1000× zvětšení, imerzní olej.

<p>Lymfocyty 7 – 15 μm 43 – 80 %</p>		
<p>Neutrofilly 10 – 15 μm 34 – 70 %</p>		
<p>Monocyty 15 – 18 μm 0 – 4 %</p>		
<p>Eozinofily 12 – 16 μm 0 – 2 %</p>		

Jak již bylo uvedeno výše, hematologické vyšetření krve je doplňující metodou, která může upozornit na přítomnost parazitů v infikovaném organismu. Zvýšená hladina eozinofilů byla zaznamenána i během přirozených i experimentálních infekcí helminty, včetně motolic *F. hepatica* a *F. magna*. U experimentálně infikovaných ovcí motolicí *F. hepatica* byla velmi zvýšená hladina eozinofilů změřena již během 3. týdne experimentu, kde míra eozinofilie korelovala s množstvím infekční dávky metacerkárií (Chauvin a kol., 2001). V průměru šestkrát zvýšený počet eozinofilů zaznamenal Matanović a kol. (2007) u experimentálně infikovaných ovcí. Mírná eozinofilie byla zjištěna také jako reakce na motolici *F. magna* v 8. týdnu experimentu u jednoho ze 7 jelenců běloocasých infikovaných 100 MC (Presidente a kol., 1980). Ve své práci Conboy a Stromberg (1991) uvádí signifikantní nárůst počtu eozinofilů u experimentálně infikovaných telat motolicí *F. magna* od 2. týdne experimentu až po jeho ukončení v 26. týdnu, a to až na osminásobek počtu eozinofilů ve srovnání s hodnotami u negativních kontrol. Také u infikovaných morčat byl zaznamenán čtyřnásobný nárůst eozinofilů oproti kontrolám (Conboy a Stromberg, 1991).

3.3.3. Biochemie

Velmi důležitou součástí klinického obrazu je vyšetření krevního séra na množství různorodých látek. V rámci biochemického vyšetření se nejčastěji stanovují hladiny proteinů (albumin, globuliny), sacharidů (glukóza), lipidů (cholesterol, triacylglyceroly), ale také nebílkovinných dusíkatých látek (močovina, kreatinin, kyselina močová), enzymů (aminotransferázy, laktát-dehydrogenáza, alkalická fosfatáza, gama-glutamyltransferáza, glutamát-dehydrogenáza) a krevních metabolitů (bilirubin) (Murray, 2002; Hořejší a Bartůňková, 2005; Racek, 2006; Doubek a kol., 2007).

- *Albumin*

Albumin je produkován v jaterních buňkách (hepatocytech) a v krevní plasmě tvoří více než polovinu všech plazmatických proteinů. Jeho nejdůležitější funkcí je udržování onkotického tlaku (= osmotický tlak tvořený plazmatickými bílkovinami), ale také transport různorodých látek; látky tělu vlastní (bilirubin, mastné kyseliny, kyselina močová, některé vitamíny) a látky cizorodé (léčiva – penicilin, kyselina acetylsalicylová atd.). Dále albumin hraje důležitou roli při udržení acidobazické rovnováhy a v boji proti volným radikálům v rámci extracelulárního antioxidačního systému. Pokles hladiny albuminu (tzv. hypoalbuminémie)

je zapříčiněn různými chorobnými stavy. Například snížením syntézy při poškození hepatocytů, nebo naopak zvýšením syntézy při akutních zánětech a nádorových onemocnění, či v důsledku ztrát při onemocnění ledvin. Klinickým projevem hypoalbuminémie jsou výrazné otoky (Murray, 2002; Hořejší a Bartůňková, 2005).

- ***Globuliny***

Globuliny jsou skupinou proteinů, které lze na základě pohybu v elektrickém poli rozdělit na 3 frakce: α , β a γ – globuliny. Frakce α je tvořena v hepatocytech, které slouží převážně jako transportní proteiny. β – frakce se skládá z proteinů různých funkcí; transferin přenáší železo, hemopexin váže hem, dále sem patří i C – reaktivní protein (CRP) či C3 a C4 složky komplementu. Největší podíl v γ – frakci mají imunoglobuliny, které se uplatňují jako protilátky v ochraně organismu před patogeny. Na základě odlišného těžkého řetězce lze rozeznat pět tříd imunoglobulinů. IgG protilátky jsou nejpočetnější imunoglobuliny, které vznikají proti rozpuštěným antigenům (vyprodukovaným toxinům či produktům lýze degradovaného patogena). Protilátky IgA se vyskytují nejen v plasmě, ale také na sliznicích, kde chrání organismus především před bakteriemi. IgM protilátky jsou produkovány bezprostředně po infekci viry či bakteriemi. Jejich tvorba je v průběhu infekce nahrazena tvorbou „pozdějších“ protilátek IgG. IgD protilátky jsou v plasmě obsaženy v nepatrném množství a jejich konkrétní funkce není jasná. Poslední typem protilátky je IgE, jehož přítomnost často koresponduje např. s alergickými reakcemi (Murray, 2002; Hořejší a Bartůňková, 2005).

Celková hyperimmunoglobulinémie způsobená zvýšenou syntézou je reakce na přítomnost cizího imunogenního agens v organismu (Doubek a kol., 2007).

- ***Glukóza***

Glukóza je monosacharid, který má pro organismus velmi důležitou funkci, a to jako rychlý zdroj energie. Do krevní plasmy se glukóza dostává ze tří zdrojů: z přijímané potravy absorpcí ve střevě, z jaterního glykogenu nebo tzv. glukoneogenenzí (tvorba glukózy z nesacharidových látek – z aminokyselin). Hladina glukózy v krvi mírně kolísá v závislosti na příjmu živin, ale je zároveň přísně kontrolována (Racek, 2006; Doubek a kol., 2007).

- ***Cholesterol***

Cholesterol je lipid, který se vyskytuje především jako stavební složka membrán živočišných buněk, ale také přispívá k tvorbě steroidních hormonů. Tělo si dokáže syntetizovat vlastní cholesterol v hepatocytech, ale přijímá ho i v potravě. Nadbytečný cholesterol se vyloučí z těla žlučí buď v podobě žlučových kyselin či v nezměněném stavu. Změna hladiny cholesterolu má mnoho příčin, jednou z nich může být i rozpad jaterních buněk (Murray, 2002; Racek, 2006).

- ***Triacylglyceroly***

Triacylglyceroly jsou lipidickou směsí esterů glycerolu s různými mastnými kyselinami, která tvoří zásobárnu energie v podobě tukové tkáně. Tvorba triacylglycerolů probíhá nejen v tukové tkáni, ale také v játrech a tenkém střevě. V hepatocytech syntetizované triacylglyceroly jsou v krvi navázány na proteiny. V krvi je jejich koncentrace ovlivněna množstvím tuku v potravě, hormony (inzulin, glukagon) a množstvím jaterních enzymů (Murray, 2002; Racek, 2006; Doubek a kol., 2007).

- ***Močovina***

Močovina je dusíkatá látka a konečný metabolit degradace bílkovin, jenž je produkován játry a odsud putuje do krve, kde její hladina je relativně konstantní, následně je vyloučena ledvinami v podobě moči. Kromě vylučování má i antioxidační účinek, a tak spolu s albuminem je hlavním antioxidantem chránícím organismus před volnými kyslíkovými radikály. Zvýšená hladina močoviny v krvi značí nejen nadměrnou fyzickou zátěž, nadměrný příjem bílkovin v potravě, zhoubné novotvary, zvýšenou produkci hormonů, ale může souviset také s masivním krvácením do gastrointestinálního traktu. Naopak k poklesu močoviny v krevní plasmě dochází např. při selhání ledvin či poklesu funkci jater (Murray, 2002; Doubek a kol., 2007).

- ***Kreatinin***

Kreatinin je produkován hepatocyty a transportován krví převážně do svalových buněk. Zde slouží jako zásobárna energie, která je využita při počáteční svalové aktivitě. Jeho zvýšená koncentrace v krvi může být způsobena nejen množstvím svalové hmoty, ale také chronickou nefunkčností ledvin (Murray, 2002).

- ***Kyselina močová***

Kyselina močová je odpadní látka, která vzniká odbouráváním látek z degradovaných buněk tkání a složek potravy. Před jejím konečným vyloučením je přefiltrována v ledvinách, kde dochází až k 90% resorpci. Zvýšená produkce kyseliny močové může nastat při nadměrné konzumaci masných produktů, zvýšené fyzické námaze, snížené funkčnosti enzymů a také zániku velkého množství buněk (anémie, degradace tkáně) (Murray, 2002; Doubek a kol., 2007).

- ***Aspartátaminotransferáza***

Aspartátaminotransferáza (AST) spolu s níže uvedenou ALT umožňují přenos aminoskupiny mezi aminokyselinou a ketokyselinou. Produkce AST probíhá v různých orgánech (např. v játrech, v kosterním a srdečním svalstvu, ledvinách, slezině). AST je cytoplazmatický enzym, který se za normálních podmínek vyskytuje mimo buňku jen ve velmi omezeném množství, proto záznam i lehce zvýšeného množství AST značí poškození buněk. Kromě poškození jater (hepatitida, infekční a toxické poškození, sepse, kolika a cirhóza) může zvýšení AST v krvi značit poškození všech ostatních tkání, kde probíhá syntéza (Murray, 2002; Racek, 2006; Doubek a kol., 2007).

- ***Alaninaminotranferáza***

Alaninaminotransferáza (ALT) se velmi podobá AST, vyskytuje se však nejvíce v hepatocytech. Při poškození jater dochází k navýšení obou aminotransferáz, avšak zvýšení hladiny pouze u ALT poukazuje na poškození jedině jater, oproti AST, která se zvyšuje při poškození i jiných orgánů. Proto se stanovuje poměr AST/ALT, který může odhalit poškození hepatocytů (oproti jiným orgánům) při hodnotě nižší než 1 (Murray, 2002; Racek, 2006; Doubek a kol., 2007).

- ***Laktátdehydrogenáza***

Laktátdehydrogenáza (LD) je také cytoplazmatický enzym sloužící k přeměně pyruvátu na laktát během glykolýzy. Podle odlišné struktury lze odlišit 5 izoenzymů, které jsou produkovány ve všech orgánech, i když s různou preferencí. V krevní plazmě jsou nejvíce zastoupeny izoenzymy, které jsou produkovány játry a srdeční svalovinou. Příčinou zvýšení hladin LD může být hemolýza (i arteficiální), infarkt myokardu, onemocnění svalů, anémie

a také onemocnění jaterního parenchymu (Murray, 2002; Racek, 2006; Doubek a kol., 2007).

- ***Alkalická fosfatáza***

Alkalická fosfatáza (ALP), enzym metabolizující estery kyseliny fosforečné, je lokalizován v membránách, kde slouží i k transportu některých látek. Tvoří se ve všech tkáních, nejvíce v játrech, ledvinách a kostech. Právě izoenzymy pocházející z hepatocytů jsou rozpuštěné i v krevní plasmě, kde jejich nadměrná hladina odráží hlavně onemocnění jater a žlučových cest, což může vést až k cirhóze (Murray, 2002; Racek, 2006; Doubek a kol., 2007).

- ***Gama – glutamyltransferáza***

Gama – glutamyltransferáza (GMT) je enzym, který je syntetizován v epiteliálních buňkách žlučových cest, hepatocytech, enterocytech, buňkách sleziny a ledvin. Vyskytuje se v membránách daných buněk, a proto je jeho funkce transportní (přenos γ -glutamylového zbytku) a antioxidační (udržuje koncentraci glutathionu). Do krve se však uvolňuje pouze izoenzym z buněk jater a žlučovodů, proto při zvýšení hladiny GMT v krevní plazmě naznačuje onemocnění jater (např. cirhóza, nádor) či obstrukci žlučovodů (Murray, 2002; Racek, 2006; Doubek a kol., 2007).

- ***Glutamátdehydrogenáza***

Glutamátdehydrogenáza (GLDH) je mitochondriální enzym dosahující nejvyšší produkce v jaterních buňkách, je i v buňkách myokardu, ledvin, mozku, kosterním svalstvu a leukocytech. Podílí se na metabolismu glutamátu. V krvi se GLDH vyskytuje v zanedbatelném množství. Ke zvýšení hladiny dochází zejména při nekróze hepatocytů (Murray, 2002; Racek, 2006; Doubek a kol., 2007).

- ***Bilirubin***

Bilirubin je konečným produktem při odbourávání hemu z erytrocytů. Bilirubin je metabolizován pouze v jaterních buňkách, tudíž bilirubin vzniklý v jiných tkáních musí být nejprve přesunut do jater krevním řečištěm. V krvi během transportu do jater je vázáný na albumin, tzn. nekonjugovaný bilirubin. Až v hepatocytech je konjugován s kyselinou glukuronovou a v této formě je vylučován žlučí do střeva. Při onemocnění jater či žlučníku dochází ke zvýšení jeho hladiny v krvi (Murray, 2002; Racek, 2006; Doubek a kol., 2007).

Tím, že většina těchto biochemických parametrů odráží funkčnost jater, je snahou

parazitologických týmů dané parametry měřit, a to nejen během experimentálních infekcí, ale i jako doprovodný údaj při klinické diagnostice. Biochemické vyšetření krve doprovázelo mnoho přirozených i experimentálních infekcí, a to převážně motolicí *F. hepatica* (Wensvoort a Over, 1982; Yang a kol., 1998; Martínez-Moreno a kol., 1999; Bossaert a kol., 2000; Vengušt a kol., 2003; Matanović a kol., 2007; Raadsma a kol., 2007). Existuje pouze několik málo publikací zabývajících se změnou jaterních enzymů v průběhu infekce motolicí *F. magna* (Foreyt a Todd 1979b; Presidente a kol., 1980; Stromberg a kol., 1985; Conboy a Stromberg, 1991). Experimentální infekce, během nichž byly měřeny biochemické parametry, jsou podrobněji probírány v následující kapitole.

3.4. Experimentální infekce fasciolidními motolicemi

Experimentální infekce byly realizovány pro velké množství jednotlivých druhů hostitelů, a to jak divoké zvěře, tak hospodářských zvířat. Některé experimentální infekce motolicí *F. magna* sloužily pouze k ověření vnímavosti daného hostitelského druhu k infekci (Foreyt, 1979, 1992, 1996ab) (Tab. 4), u jiných byly během experimentu zjišťovány i různé parametry, které odrážely průběh infekce (Conboy a Stromberg, 1991; Severin a kol., 2011) (Tab. 5). Jelikož publikace o stanovování biochemických parametrů během fascioloidózy (infekce *F. magna*) jsou ve velmi omezeném množství, jsou v Tab. 6 zpracovány informace o změnách těchto parametrů také během infekce příbuzné motolice *F. hepatica*.

Laboratorní modely (tj. morče, myš, králík, potkan) byly také experimentálně infikovány. Např. Foreyt (1979a) motolicí *F. magna* úspěšně infikoval 36 morčat z 52 (69%), v jejichž játrech a břišní dutině byly nalezeny nedospělé motolice. S podobným výsledkem vyšla i infekce 15 myší, kdy byly nalezeny opět nedospělé motolice v 6 z nich, což odpovídá 40% úspěšnosti infekce (Foreyt, 1979). Vyšší úspěšnost infekce vykazovali infikovaní králíci, u kterých byla úspěšnost na 67 % (Foreyt, 1979) a 100 % (Swales, 1935). Swales (1935) infikoval 7 mladých králíků 10 – 15 MC, ve kterých našel v břišní dutině celkem 6 motolic (7,5 %). I když publikace pojednávající o experimentální infekci potkana motolicí *F. magna* doposud neexistuje, byl v naší laboratoři takový pilotní experiment v roce 2011 uskutečněn. U dvou potkanů vystavených infekční dávce 25 MC byly při pitvě nalezeny celkem 3 nedospělé motolice v břišní dutině, proto úspěšnost infekce činila 4 a 8 %. U těchto hostitelů nebyly měřeny žádné biochemické parametry, kromě infekce morčat, kdy došlo ke zvýšení hladiny AST, ale nikoliv ALT a GMT (Conboy a Stromberg, 1991).

Tab. 4: Výťah dat z experimentálních infekcí motolice *F. magna* u různých druhů hostitelů pro zjištění vnímavosti daného hostitele bez provedení biochemických analýz.

hostitel	počet MC	věk hostitelů	počet hostitelů	úspěšnost infekce	dávka MC /nalezené motolice	životní stadium	doba pokusu (týden)	vejce v trusu	citace
Jeleneč běloocasý	40 - 500	6 měs - 5 let	32	72% (23 z 32)	4,1%	dospělec	5 - 51	ano	Foreyt a Todd, 1976
Jeleneč ušatý	500	5 měs	6	100% (6 z 6)	20,0%	juvenil	10 - 19	ne	Foreyt, 1992
Jeleneč evropský	250	1 rok	3	100% (3 z 3)	4,3%	dospělec	6	ano	Foreyt, 1996a
Daněk evropský	100	2 roky	1	100% (1 z 1)	32,0%	dospělec	182	ano	Erhardová-Kotrlá, 1971
Tur domácí	10 - 500	3 měs - 8 let	11	82% (9 z 11)	5,7%	dospělec	12 - 46	ne	Foreyt a Todd, 1976
Prase domácí	50 - 250	2 - 10 týdnů	25	64% (16 z 25)	5,0%	juvenil	9 - 21	ne	Foreyt, 1979
Lama krotká	250	dospělá	1	100% (1 z 1)	1,2%	dospělec	36	ne	Foreyt a Parish, 1990
Ovce domácí	8 - 200	6 měs - 1 rok	15	53% (8 z 15)	4,7%	juvenil	5 - 41	ne	Foreyt a Todd, 1976
Koza domácí	250	4 - 8 měsíců	7	86% (6 ze 7)	8,2%	juvenil	13 - 30	ne	Foreyt a Leathers, 1980
Kamzík horský	320	6 let	1	100% (1 z 1)	7,8%	dospělec	20	ano	Erhardová-Kotrlá, 1971
Ovce tlustorohá	50 - 100	3 měs - 2,5 let	3	100% (3 z 3)	16,8%	juvenil	15 - 28	ne	Foreyt, 1996b
Králík	celkem 70	(---)	3	67% (2 z 3)	3,0%	juvenil	9 - 21	ne	Foreyt, 1979
	10 - 15	(---)	7	100% (7 ze 7)	7,5%	juvenil	4 - 15	ne	Swales, 1935
Myš	celkem 52	(---)	15	40% (6 z 15)	11,0%	juvenil	5 - 6	ne	Foreyt, 1979
Morče	10	dospělá	52	69% (36 z 52)	15,0%	juvenil	9 - 18	ne	Foreyt, 1979
	10 - 25	(---)	2	50% (1 z 2)	3%	juvenil	1 - 4	ne	Swales, 1935
Potkan	25	3 týdny	2	100% (2 z 2)	6,0%	juvenil	8 - 13	ne	nepublikováno

Tab. 5: Experimentální infekce motolicí *F. magna* pro zjištění změn klinického obrazu v průběhu infekce u různých druhů hostitelů.

hostitel	počet MC	počet hostitelů	úspěšnost infekce	dávka MC /nalezené motolice	doba pokusu (týden)	parametry změněné	parametry nezměněné	citace
Jelenec běloocasý	500	7	43% (3 ze 7)	0,05%	13	(---)	albumin, globuliny, AST	Presidente a kol., 1980
	50 - 500	6	100% (6 z 6)	2%	43	↑ globuliny	albumin	Foreyt a Todd 1979b
Jelen evropský	přirozeně	47	57,4% (27 ze 47)	(---)	(---)	↑ GLDH LD, ALT, AST, GMT, celkové proteiny, globuliny ↓ glukóza	ALP, albumin, močovina, kreatinin, TAG, cholesterol	Severin a kol, 2011
Tur domácí	1000	6	100% (6 z 6)	0,92%	26	(---)	AST GMT	Conboy a Stromberg 1991
Ovce domácí	100	13	(---)	(---)	18	(---)	AP, AST, ALP, GMT, albumin, bilirubin, kreatinin	Stromberg a kol. 1985
Morče	20	41	90 % (37 ze 41)	10,6%	16	↑ AST	ALT GMT	Conboy a Stromberg 1991

Tab. 6: Experimentální infekce motolicí *F. hepatica* pro zjištění změn klinického obrazu v průběhu infekce u různých druhů hostitelů.

hostitel	počet MC	počet hostitelů	úspěšnost infekce	dávka MC /nalezené motolice	doba pokusu (týden)	parametry změněné	parametry nezměněné	citace
Ovce domácí	150 – 300	14	100% (14 ze 14)	19%	13	↑ GLDH, GMT	(---)	Chauvin a kol., 1995
	150	16	100% (16 z 16)	42,7%	16	↑ GLDH, GMT	(---)	Ferre a kol., 1997
	250	9	100% (9 z 9)	47,6%	10	↑ GLDH, GMT	(---)	Raadsma a kol., 2007
	150 – 300	9	100% (9 z 9)	54,5%	22	↓ glukóza ↑ GLDH, GMT	(---)	Phiri a kol., 2007
	přirozeně	100	20% (20 z 100)	(---)	(---)	↓ AST, močovina, kreatinin, albumin ↑ GMT, glukóza, globuliny	celkové proteiny	Matanović a kol., 2007
	přirozeně	224	11,6% (26 – 224)	(---)	(---)	↑ LD	ALP, ALT, AST, GMT	Xhemollari a kol., 2014
přirozeně	63	46% (29 z 63)	(---)	(---)	↑ GMT, TBil, DBil	AST	Hodžić a kol., 2013	
Koza domácí	200 – 400	20	100% (20 z 20)	21%	25	↑ GMT, LD	(---)	Martínez-Moreno a kol., 1999
Tur domácí	500	8	100% (8 z 8)	22%	25	↑ GLDH, GMT	(---)	Bossaert a kol., 2000
	1000	8	100% (8 z 8)	6%	4 - 20	↑ GMT	(---)	Wensvoort a Over, 1982
	přirozeně	116	74 % (86 z 116)	(---)	(---)	↑ AST, GMT, ALP	(---)	Lotfollahzadeh a kol., 2008
Bůvol	1200	5	100% (5 z 5)	0,25%	26	↑ AST, GLDH, GMT	(---)	Yang a kol., 1998
Jelenec běloocasý	100 - 2500	6	17% (1 z 6)	0,5%	6 - 15	↑ AST, globuliny	ALT, ALP, bilirubin	Presidente a kol., 1975
Daněk evropský	přirozeně	62	30% (19 z 62)	(---)	(---)	↑ TP, ALT, močovina, glukóza	kreatinin, albumin, AST, LD, GLDH, GMT	Vengušt a kol., 2003
Kůň	400 – 800	10	10% (1 z 10)	3%	10 - 25	(---)	AST	Nansen a kol., 1975

4. METODIKA

4.1. Chov a příprava experimentálních organismů

4.1.1. Chov mezihostitelských plžů

K získání infekčních stadií, metacerkárií motolice *Fascioloides magna*, byl využit chov přirozených mezihostitelských plžů udržovaný v laboratorních podmínkách – sladkovodní druh *Pseudosuccinea columella* pocházející z USA (Oregon, řeka Columbia) a udržován v laboratorních podmínkách již od roku 2010. Plži byli chováni v akváriích s odstátou kohoutkovou vodou a krmeni 3× týdně hlávkovým salátem. Část mladých plžů o velikosti 2 – 4 mm byla vystavena expozici 10 miracidí po dobu 5 hodin. Po 100 dnech infekce byli plži vypitváni pod stereomikroskopem a uvolněné cercárie byly sesbírány pipetou a přeneseny do odstáté vody, kde došlo k jejich encystaci. Až do infekce byly metacerkárie uchovány v Petriho miskách s odstátou vodou v lednici při teplotě 4 °C. Každých 14 dní byla metacerkáriím vyměněna voda a zkontrolována jejich morfologie.

4.1.2. Životaschopnost metacerkárií

Před samotnou infekcí králíků byla ověřena životaschopnost metacerkárií pomocí dvou excystačních medií. První médium (Freid a Stromberg; 1985) bylo namícháno těsně před použitím čerstvé v Petriho misce (ø 3,5 cm) a předeřháto na 42 °C v termostatu (Melag). Při této teplotě probíhala i následná excystace metacerkárií.

Složení média:

- 0,5% trypsin (Sigma)
- 0,5% žlučová sůl (Sodium taurocholat hydrat, Sigma)
- pH = 8,1 (upraveno NaHCO₃)

Druhé excystační médium bylo připraveno na základě protokolu z Queen's University Belfast, School of Biological Sciences, v Severním Irsku (osobní sdělení Ananda Chakroborty) (dále označované jako „Belfast“). Toto médium obsahovalo dvě směsi, které se těsně před použitím smíchaly dohromady.

Směs A:

- 5 ml dH₂O
- 0,9% NaCl
- 1,2% NaCO₃
- 40 mg Sodium taurocholat hydrat

Směs B:

- 4,75 ml dH₂O
- 250 µl 1N HCl
- 40 mg L-cystein

Vzniklé směsi byly ještě odděleně zahřáty v termostatu na 37 °C a těsně před přidáním MC smíchány dohromady. Toto výsledné medium bylo stále uchováváno při 37 °C i během excystace.

Metacerkárie byly přidány do obou excystačních medií a udržovány v termostatu (42/37°C pro dané excystační médium) za tmy po dobu 30 minut. Poté byly pod stereomikroskopem zkontrolovány a vylíhlé juvenilní motolice přemístěny do předem vyhřátého média RPMI na 37 °C (Lonza). Po zkontrolování byla media s MC opět vložena do termostatu a pravidelně kontrolována v intervalu 10 minut po celkovou dobu dvou hodin. Po uplynulém čase byly spočítány vylíhlé juvenilní motolice a vypočítána průměrná životaschopnost metacerkárií.

4.1.3. Chov králíků

Během dvou experimentů byli využiti králíci dvou plemen. V prvním experimentu byli infikováni brojleroví králíci hybridní kombinace HYplus (VÚŽV Praha Uhřetěves, v.v.i.), kteří byli umístěni na České zemědělské univerzitě (ČZU) v Suchbátově Březové v Praze v laboratorním chovu experimentálních zvířat. Králíci byli chováni za stálých laboratorních podmínek (světelná perioda 12 hodin, teplota 18 °C ± 2 °C). V druhém experimentu byli zahrnuti do pokusu králíci plemene Novozélandský bílý (Velaz), kteří byli umístěni nejprve v laboratorním chovu katedry Parazitologie na PřF UK, kde byli chováni za stejných světelných a teplotních podmínek (světelná perioda 12 hodin, teplota 18 °C ± 2 °C). Následně však byli z důvodu rekonstrukce chovu přesunuti (po 5 týdnech experimentu) do provizorních prostor, kde nemohla být zcela zajištěna stálost předchozích laboratorních podmínek. Ve všech případech byli králíci chováni jednotlivě v klecích s neomezeným přístupem k pitné vodě a krmivu (kompletní krmná směs pro výkrm králíků bez antikocidik, Velaz). Dané klece měly dno v podobě roštu, kterým tekuté i pevné produkty králíků propadávaly na táč pod klecí, tudíž králíci měli znemožněn přístup k těmto odpadům.

4.2. Vlastní experimenty

Experimenty byly v obou případech zahájeny v době, kdy byli králíci ve věku 10 týdnů. Odpočítaný počet metacerkárií společně s malým množstvím vody byl vpraven jednotlivým králíkům pipetou přímo do dutiny ústní, přičemž adekvátní imobilizací bylo zajištěno, aby králíci daný objem tekutiny spolkli. V prvním experimentu byly vzorky odebrány v den infekce. Z důvodu lepšího zachycení trendu normálních fyziologických hodnot všech měřených parametrů byla při druhém experimentu králíkům infekční dávka metacerkárií vpravena až třetí týden po zahájení experimentu.

4.2.1. Experiment 1

Do experimentu bylo zahrnuto celkem 6 králíků (hybridní kombinace HYplus, VÚŽV Praha Uhřetěves, v.v.i.), 3 samci a 3 samice. Čtyři králíci (2 samci a 2 samice) byli ve věku 10 týdnů infikováni po 50 metacerkáriemi motolice *F. magna* a 2 králíci (1 samec a 1 samice) byli ponecháni jako negativní kontroly (označení v Tab. 7). Metacerkárie byly až do dne infekce (cca 4 měsíce) uchovávány v lednici (4 °C) a jejich životaschopnost nebyla ověřována. Podání infekční dávky bylo provedeno 1. den experimentu ihned po 1. odběru krevních vzorků. Experiment probíhal 12. týdnů.

Tab. 7: Označení králíků v experimentu č. 1.

	samec		samice	
50 MC	K1	K2	K4	K5
(-) kont	K3	(---)	K6	(---)

4.2.2. Experiment 2

Do druhého experimentu bylo zahrnuto celkem 10 králíků (NZW, Velaz), všichni samci. Šest králíků bylo ve věku 12 týdnů infikováno 150 nebo 300 metacerkáriemi motolice *F. magna* a 4 králíci zůstali jako negativní kontroly (Tab. 8). Metacerkárie využité k infekci byly různého stáří (7 měsíců a 1 měsíc). Jejich životaschopnost byla změřena v obou excystačních médiích. Experiment probíhal po dobu 15. týdnů, přičemž králíci byli infikováni až ve 3. týdnu experimentu z důvodu delšího záznamu přirozených fyziologických hodnot všech parametrů.

Tab. 8: Označení králíků v experimentu č. 2.

150 MC	K1	K2	K3	(---)
300 MC	K4	K5	K6	(---)
(-) kont	K7	K8	K9	K10

4.2.3. Optimalizace druhého experimentu

Pro zvýšení pravděpodobnosti úspěšnější infekce a zlepšení měření jednotlivých parametrů interakce mezi parazitem a hostitelem došlo k optimalizaci druhého experimentu oproti experimentu prvnímu v níže uvedených bodech:

- ***Navýšení počtu infikovaných králíků i kontrol***

Ke zvýšení pravděpodobnosti úspěšné nákazy byl infikován vyšší počet králíků, současně byl více vyrovnán počet infikovaných ($n = 6$) a kontrolních králíků ($n = 4$), což umožní případné statistické vyhodnocení (Conboy Stromberg, 1991; Chauvin a kol., 1995).

- ***Umístění králíků***

Z důvodu vhodnější manipulace s odebranými vzorky a zabránění možnému ovlivnění parametrů během přepravy vzorků byl celý experiment realizován na PřF UK, kde vzorky nebyly vystavovány nadměrným teplotním výkyvům a mechanickému pohybu.

- ***Pohlaví králíků***

Jelikož samci jsou obecně náchylnější k různým infekcím a onemocněním, které u nich probíhají často intenzivněji než u samic v důsledku hladiny testosteronu, byli do druhého experimentu zahrnuti pouze samci (Erhardová-Kotrlá, 1971). Také některé hematologické parametry mohou být odlišné mezi pohlavími, např.: hematokrit, hemoglobin či množství granulocytů (Özkan a kol., 2012).

- ***Navýšení počtu metacerkárií***

Za účelem zvýšení pravděpodobnosti dosažení úspěšné infekce byla zvýšena infekční dávka MC. Dále byly podány také různé dávky MC (150 a 300), aby byly omezeny případné úhyny z důvodů nadměrné infekční dávky, současně zamezeny neúspěšné infekce z důvodu velmi nízké infekční dávky.

- ***Excystace MC***

Před samotnou infekcí byly MC excystovány in vitro v excystačních médiích, aby byla ověřena jejich životaschopnost.

- ***Délka trvání experimentu***

Doba experimentu byla prodloužena o 2 týdny před infekcí, aby bylo možné přesněji zachytit průměrné hodnoty sledovaných parametrů daného králíka ještě před infekcí. Králíci nebyli infikováni 1. den experimentu, ale až při 3. odběru (tj. 3. týden experimentu).

- ***Změna specializovaného pracoviště***

Spolupráce s více specializovaným a odborným pracovištěm na Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky na 1. LF UK umožnila získání relevantnějšího souboru dat.

- ***Stanovení biochemie ze séra***

V prvním experimentu byly biochemické parametry měřeny z plazmy, kde přidaná antikoagulační aditiva (heparin/EDTA) ovlivňovala hodnoty naměřených parametrů, proto byly v druhém experimentu parametry měřeny ze séra bez aditiv.

- ***Manipulace se vzorky***

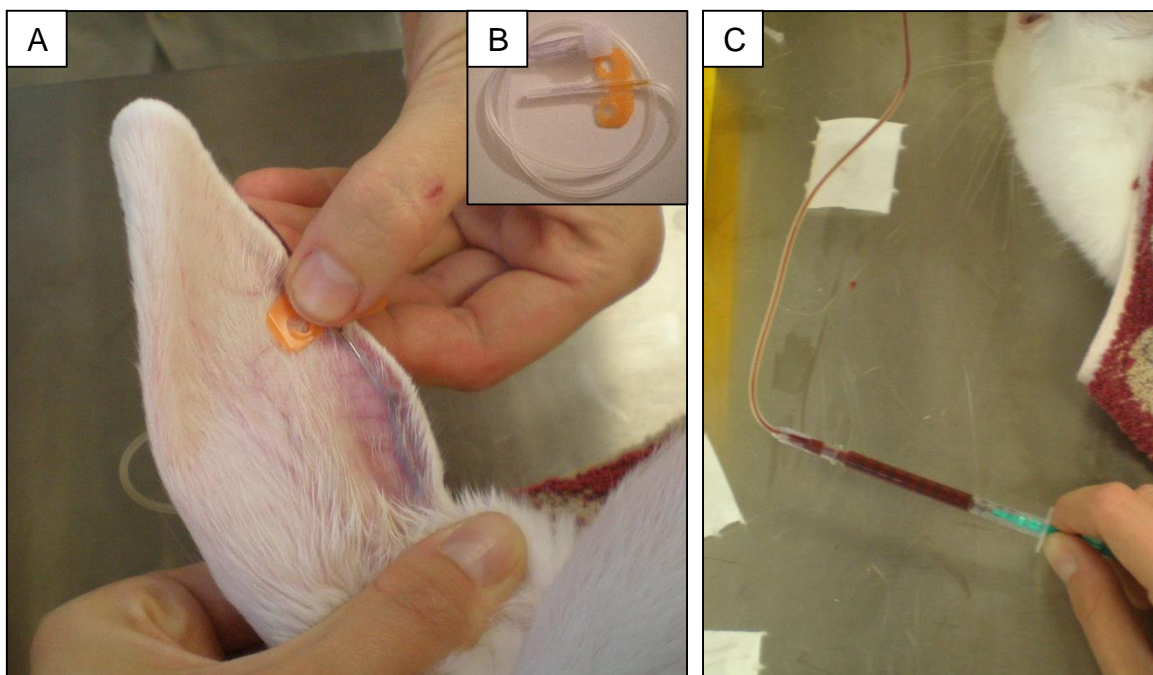
Během odběrů a skladování došlo ke snížení nežádoucích vlivů na vzorky vhodnější manipulací a skladováním. Před odběrem krve bylo místo vpichu vydesinfikováno etanolem a pečlivě vysušeno (případný zbytek etanolu by způsobil lyzi erytrocytů a tím změnu měřených parametrů). Čerstvě odebraná krev byla po dobu dalších odběrů ostatních králíků chráněna před světlem, protože některé parametry jsou citlivé na světlo (bilirubin). Získané sérum bylo pro biochemické vyšetření uchováno v mrazáku (-80 °C).

4.3. Odběry vzorků králíkům

Každému králíkovi byly pravidelně jednou týdně během celého experimentu odebírány vzorky. Odběry vzorků proběhly vždy se stejným časovým sledem jednotlivých činností. Králíkům byl odebírán trus (sesbírán ze zachytných plat) o hmotnosti cca 4 g, který byl následně uložen do 15ml plastových centrifugačních zkumavek a uchován v lednici při teplotě 4 °C až do doby zpracování. Dále byli králíci váženi na kuchyňské váze (Toro,

max. 10 kg, přesnost 2 g). Nejpodstatnějším odběrem vzorků byl odběr krve z ušní cévy (*v. vermicularis marginalis*) (Joslin, 2009) pomocí venepunkční jehly (Venofix G25, B. Braun) opatřené křídélky a 30 cm hadičkou zajišťující bezpečný odběr krve i ve chvíli pohybu králíka, jak znázorňuje Obr. 4. Před odběrem krve bylo nutné králíka imobilizovat pevně staženou látkou kolem těla (ručník). Dále oholit ucho strojkem či žiletkou a vydesinfikovat místo vpichu 96% etanolem. Osvědčilo se cévu rozšířit zahřátím a třením rukou, následně byla napíchnuta a byl odebrán adekvátní objem krve do 1ml stříkačky (dvojdílná injekční stříkačka, B-Braun). Celkem byly vždy odebírány 2 ml krve, které byly tímto způsobem získány nadvakrát (po 1 ml krve). Po nasátí byla jehla od hadičky ustřižena, aby nedošlo při přesunu krve do 1,5ml plastových mikrozkuvek k destruktivnímu pasírování krevních buněk znova přes jehlu.

Pro různé typy analýz bylo zapotřebí získat nejen sraženou krev na sérum, ale také nesraženou krev na plasmu (Tab. 9). Jako antikoagulační faktor byl využit především heparin (Heparin solution salt, Sigma), nebo 2% roztok EDTA (Sigma). Před odběrem bylo do stříkačky nabráno odpovídající množství aditiva; tj. 25 μ l/1 ml krve pro heparin a 100 μ l/1 ml krve pro EDTA. Po přesunu krve ze stříkačky do mikrozkuvky byla nesražená krev ještě pečlivě promíchána (nikoliv protřepána, aby nedošlo k mechanickému poškození krevních buněk). Po vyjmutí jehly z cévy bylo místo vpichu komprimováno a následně zastříkáno „náplastí ve spreji“ (Urgo). Odebraná krev byla minimálně 30 minut udržována ve tmě za pokojové teploty, než došlo k její následné centrifugaci (1200 \times g, 10 minut). Po centrifugaci bylo přesunuto množství séra a plasmy (cca 500 μ l) do mikrozkuvky a uchováno v mrazáku při teplotě -18 °C (-80 °C) do následného zpracování.



Obr. 4: Odběr krve králíků. **A:** Napíchnutí ušní cévy (*v. vermicularis marginalis*) pomocí venepunkční jehly opatřené křídélky. **B:** Venepunkční souprava ke krátkodobé injekci, infúzi, nebo transfúzi Venofix safety G25 oranžová, průměr jehly 0,50 mm, délka hadičky 30 cm. **C:** Odběr 1 ml krve do stříkačky přes hadičku zajišťující bezpečný odběr.

Tab. 9: Analyzované vzorky během 1. a 2. experimentu.

Experiment 1	hmotnost		Experiment 2	hmotnost	
	trus			trus	
	krev	1 ml sražené – sérum		krev	2 ml sražené – sérum
1 ml nesražené – plasma					

4.4. Hmotnost

U všech králíků byl také během obou experimentů sledován váhový přírůstek, který mohl být negativně ovlivněn infekcí. Králíci byli každý týden váženi na osobní váze (10 kg, ± 2 g).

4.5. Koprologie

4.5.1. Sedimentační metoda

Vzorky trusu o hmotnostech cca 4 g uchovávané v lednici (4 °C) v 15 ml plastových centrifugačních zkumavkách byly temperovány 30 minut v pokojové teplotě. Každý vzorek trusu byl nejprve rozmělněn špejlí ve vodě a procezen přes jemné sítko do plastové kádinky pro zachycení hrubých komponentů. Vzniklá směs se nechala minimálně 15 minut v klidu

usadit, než došlo k sedimentaci, včetně vajíček motolic. Následně bylo Pasteurovou pipetou odebráno malé množství sedimentu, přemístěného na podložní sklíčko a přiklopeno krycím sklíčkem o velikosti 2×4 cm. Takto připravený vzorek byl pozorován pod světelným mikroskopem na nejmenší zvětšení (40×) po celé své ploše. Při pozitivním nálezu byl takto vytvořený preparát z daného vzorku zhotoven 1 krát a pozorován, při negativním 3 krát. Zbytek sedimentu v 15 ml plastové centrifugační zkumavce byl uchován v lednici při 4 °C pro následné vyšetření trusu flotační metodou.

4.5.1. Flotační metody

V obou níže uvedených flotačních metodách byl použit flotační roztok, který zajišťoval zvýšení hustoty výsledné směsi natolik, že došlo k vzlínání lehčích parazitárních objektů na hladinu. Příprava roztoku probíhala ve skleněné kádince, do které byla přidána voda se sacharózou (C₁₂H₂₂O₁₁) v poměru 2:3. Za zvýšené teploty a stálého míchání byla sacharóza rozpuštěna ve vodě. Hustota výsledného roztoku byla po vychladnutí změřena hustoměrem (Sklárny Kavalier), kde hodnota měla dosahovat 1,27 g/cm³. Při dlouhodobějším skladování flotačního roztoku v lednici při 4 °C bylo nutné přidat ještě 0,5% formalínu, aby nedošlo ke znehodnocení roztoku mikroorganismy.

4.5.1.1. Sheatherova metoda

Sediment přecezeného trusu byl po vyjmutí z lednice (4 °C) centrifugován (KRD, NÜVE NF 800), 9800×g, 5 minut a supernatant byl opatrně separován. Takto zkoncentrovaný sediment zaujímal cca 1 ml objemu v 15 ml centrifugační zkumavce. Poté bylo přidáno 14 ml flotačního roztoku (tj. 1 cm pod okraj falkony), který byl se sedimentem pečlivě promíchán špejlí. Vzniklá směs byla po dobu 5 minut opět centrifugována (9800×g). Po centrifugaci bylo do centrifugační zkumavky přidáno malé množství flotačního roztoku, tak aby jeho hladina byla na horním okraji zkumavky vypouklá. Na vrchol centrifugační zkumavky se položilo krycí sklíčko (2×2 cm), aby případná stadia parazitů měla po vzlínání (20 min) možnost ulpět na sklíčku. Následně bylo krycí sklíčko odejmuto, položeno na sklíčko podložní a pozorováno pod mikroskopem.

4.5.1.2. Koncentrovaná McMasterova metoda

Postup této metody je v úvodu totožný s jednoduchou flotační metodou: Sediment trusu byl centrifugován (5 minut, 9800×g) a oddělená tekutá část byla separována. Takto

zkoncentrovaný sediment zaujímal také 1 ml objemu v 15 ml centrifugační zkumavce. Dále byl však flotační roztok přidán pouze do objemu 4 ml a rozmíchán se sedimentem v homogenní substanci. Touto substancí byly Pasteurovou pipetou naplněny obě komůrky McMasterovy počítací destičky, jež se nechaly 3 – 5 minut usadit, aby případné parazitární objekty (např. oocysty kokcií) měly opět možnost vzlínat a byl poté umožněn odečet pod světelným mikroskopem. Počítány byly pouze ty parazitární objekty, které se nacházejí uvnitř vyznačeného čtverce počítací sítě. Výpočet objektů na gram trusu lze vypočítat na základě známé hmotnosti vstupního trusu, množství vody, ve kterém byl trus rozmíchán, množství flotačního roztoku a objemu počítací komůrky (á 0,15 ml). Výslednou hodnotu OPG (= oocyst per gram) získáme vynásobením počtu oocyst v obou komůrkách číslem 20, protože 4 ml fekální suspenze v centrifugační zkumavce představují 2/3 g trusu, který byl použit, a proto vyšetřený objem 0,3 ml v McMasterově destičce představuje 1/20.

4.6. Imunologie

Pro detekci specifických protilátek ze sér byla využita nepřímá ELISA metoda (z angl. **Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay**). Jako antigen byla použita směs exkrečně-sekrečních produktů motolice *F. magna* (E/S produkty).

4.6.1. Příprava exkrečně-sekrečních produktů

Exkrečně sekreční produkty byly získány z motolic izolovaných z infikovaných jater spárkaté zvěře. Nejprve byly dospělé motolice opláchnuty ve fyziologickém roztoku (10mM PBS, 150 mM NaCl, pH 7,8) a následně kultivovány v RPMI 1640 médiu (Sigma), během níž motolice uvolňovaly E/S produkty do média. To bylo následně centrifugováno (2×20 minut, 4 500×g, 4 °C) a zkoncentrovány přes 3 kDa filtr (Amicon Ultra). Takto připravená směs E/S produktů byla až do použití skladována v mrazáku při -18 °C. Před použitím bylo provedeno kontrolní měření koncentrace proteinů E/S produktů pomocí komerčního kitu Quanti-IT™ Protein Assay Kit (Invitrogen) a spektrofotometru Infinite M200 (Tecan) v 96-ti jamkové mikrotitrační černé destičce (Nunc). Výsledná koncentrace E/S produktů byla odečítána při excitaci/emisi – 470/570 nm podle kalibrační křivky, která byla vynesena na základě změřených proteinových standardů z kitu (0 – 5 µg/µl).

4.6.2. ELISA

Antigen (tj. E/S produkty) byl naředěn uhličitanovým pufrům (0,1M; pH = 7,2) na výslednou koncentraci 0,5 µg na jamku. Dále byl po 100 µl rozpipetován do 96ti jamkové destičky (Nunc, MaxiSorb), ve které byl přes noc ve vlhké komůrce při teplotě 4 °C inkubován. Zbylý nenavázaný antigen byl poté 3× vymyt fosfátovým pufrům (PBS, 0,1 M, pH = 9,6) s přídatkem 0,05% Tween (Tween 20, Polyoxyethylenesorbitan-monolaurat, BIO-RAD). Aby nedošlo k tvorbě nespecifických vazeb, byla destička blokována roztokem 5% sušeného mléka (Blotting Grade Blocker Non-fat dry milk, Bio-Rad) naředěným PBS-T, a to 1 hodinu při pokojové teplotě ve vlhké komůrce za stálého míchání. Dále byl antigen v jamkách po dobu 3 hodin inkubován s primárními protilátkami (králičí séra), které byly naředěny v PBS-T v poměru 1:200. Po opětovném promytí v PBS-T byly do jamek pipetovány sekundární protilátky po 100 µl na jamku (Anti-Rabbit IgG (whole molecule) – Peroxidase antibody produced in goat / Anti-Rabbit IgM (µ-chain specific) - HRP conjugate produced in goat, Sigma), které byly předtím naředěny v poměru 1: 5000 s PBS-T. Inkubace probíhala 1 hodinu ve vlhké komůrce za stálého míchání na míchačce, při pokojové teplotě. Výsledné vazby mezi peroxidázou značenými sekundárními protilátkami a primárními protilátkami sér byly vizualizovány pomocí substrátu TMB (3,3' 5,5' tetramethylbenzidin, eiquid substrate system for ELISA, Sigma), který v množství 100 µl na jamku reagoval po dobu 5 minut s peroxidázou sekundární protilátky, poté byla reakce zastavena 100 µl 1M kyseliny chlorovodíkové. Absorbance byla měřena na spektrofotometru Infinite M200 (Tecan) při vlnové délce 450 nm. Naměřené hodnoty byly průměrovány, poněvadž od každého vzorku byly vždy namíchány a měřeny totožné dvojice – dublety. Hodnoty byly zobrazeny v grafu, kde byly vyjádřeny i hodnoty kontrol, z nichž bylo možno odečíst případné nespecifické vazby (tzn. vazba primárních či sekundárních protilátek bez přítomnosti antigenu).

4.7. Hematologie

4.7.1. Hematokrit

Okamžitě po odběru krve byla z plastové 1,5ml mikrozkušavky nasáta ještě nesražená krev do tenkých heparinizovaných kapilár o délce 75 mm a průměru 1,5 mm (Brand). Kapiláry byly uzavřeny modelínovou zátkou (souprava pro uzavírání kapilár, Brand) a uchovány při pokojové teplotě do následné centrifugace. Centrifugace v hematokritové centrifuze (Thermo scientific, Pico 17) po dobu 3 minut při 16250×g, byla provedena přibližně do dvou hodin po odběru. Odečet procentuálního zastoupení pevné a tekuté složky krve každého

vzorku probíhal s využitím stupnice, která byla buď přímo součástí krytu centrifugy, nebo natištěna na speciální šabloně. Od každého vzorku byly nasáty dvě kapiláry a hodnoty byly průměrovány.

4.7.2. Krevní obraz

Krevní obraz, konkrétně počet jednotlivých typů bílých krvinek, byl stanovován mikroskopicky z obarveného krevního roztěru. Krevní roztěr od každého vzorku byl zhotoven v dubletech ihned po odběru krve. Používaná podložní skla byla předem odmaštěna v roztoku obsahující etanol a ether v poměru 1:1 a měla zbroušenou stranu pro trvalé označení vzorku. Po zaschnutí byly krevní roztěry fixovány na 5 minut v metanolu a po opětovném zaschnutí ponořeny na 40 minut do Gimsova barviva. Giemsovo barvivo obsahuje směs několika barviv (methylenovou modř, eozin a azur-B), které barví bazofilní struktury v odstínech fialové, červené a růžové, acidofilní struktury barví modře. Pro barvení Giemsou byl využit komerčně dodávaný roztok (Fluka), který byl před použitím 10× naředěn vodou. Po obarvení byly všechny krevní roztěry opláchnuty pod tekoucí vodou a pozorovány pod světelným mikroskopem na 1000× zvětšení s imerzním olejem (Olympus CX21). V každém pozorovaném vzorku bylo vyhledáno celkem 100 leukocytů, přičemž byly zaznamenávány jejich jednotlivé typy (Pecka, 2006). Určení jednotlivých typů leukocytů proběhlo na základě jejich odlišné morfologie a barvitelnosti, čímž bylo zjištěno jejich výsledné procentuální zastoupení.

4.8. Biochemie

Z krevní plasmy/séra byly měřeny hladiny jaterních enzymů a krevních metabolitů, které mohou být ovlivněny přítomností motolic v jaterní tkáni (Tab. 10). Měření těchto parametrů v obou experimentech probíhalo na specializovaných pracovištích (Katedra veterinárních disciplín na ČZU, Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky na 1. LF UK), kde je ke stanovení hodnot využíván biochemický analyzátor pracující na základě spektrofotometrie. Odebrané krevní vzorky byly do předání specialistovi uchovávány v mrazáku (-18 °C či -80°C).

Tab. 10: Měřené biochemické parametry. Fyziologické hodnoty převedeny do jednotek odpovídajících jednotkám výsledků parametrů změřených v daném biochemickém analyzátoru (Hewitt a kol., 1989; Özkan a kol., 2012; medirabbit.com; asaplab.com)

č.	parametry	zkr.	jednotky	fyziologické hodnoty pro králíka dle zdroje			
				Hewitt	Özkan	Medirabbit	Asaplab
1	celk.proteiny	TP	g/l	(---)	45 - 122	50 - 75	60 – 79
2	albumin	ALBU	g/l	(---)	23 - 43	25 - 40	35 – 45
3	globuliny	GLOB	g/l	(---)	(---)	25 - 40	22 – 38
4	glukóza	GLU	mmol/l	4,5 - 10,2	3,8 - 10,7	4,2 - 8,9	4 – 8
5	cholesterol	CHOL	mmol/l	(---)	(---)	0,1 - 2	0,28 - 1,6
6	triglyceroly	TAG	mmol/l	(---)	(---)	1,4 - 1,76	(---)
7	močovina	UREA	mmol/l	(---)	(---)	9,1 - 25,5	(---)
8	kreatinin	CREA	μmol/l	12 - 146	60 - 140	53 - 124	70 – 200
9	kys. močová	UA	μmol/l	(---)	(---)	88 - 380	(---)
10	aspartátamino-transferáza	AST	μKat/l	(---)	0,1 - 0,33	0,17 - 1,63	0,27 - 1,67
11	alaninamino-transferáza	ALT	μKat/l	(---)	0,08 - 0,15	0,92 - 4,33	0,53 - 2,15
12	laktát dehydrogenáza	LD	μKat/l	0,98 - 6,5	(---)	2,2 - 4,2	(---)
13	alkalická fosfatáza	ALP	μKat/l	0,28 - 3,2	0,2 - 0,43	0,17 - 1,6	0,65 - 2,18
14	gama-glutamyl transferáza	GMT	μKat/l	0 - 0,23	0,1 - 0,52	0 - 0,12	0,2 - 0,37
15	glutamát-dehydrogenáza	GLDH	μKat/l	(---)	(---)	(---)	0,03 - 0,17
16	přímý bilirubin	DB	μmol/l	(---)	0,85 - 1,71	(---)	(---)
17	celk. bilirubin	TB	μmol/l	(---)	0,71 - 5,13	3,4 - 8,5	1 – 8

4.9. Pitva králíků

Všichni experimentální králíci byli usmrceni přímou ránou do zátylku, kdy došlo ke zlomení spodiny lebeční. Dále byli vykrveni bodnou ranou do srdce vpravenou pod klíční kostí. Vytékající krev byla zachycována do plastových centrifugačních zkumavek. Po stažení kůže byli králíci pitváni. Břišní a hrudní dutina byla otevřena přímým řezem po celé své délce. Obnažené vnitřní orgány byly prohlíženy a jakékoliv změny byly dokumentovány.

Po celkovém prohlédnutí byly jednotlivé orgány vyjmuty a ještě jednou podrobně prohlédnuty. Především játra, bránice, slezina a břišní dutina byly zkontrolovány, zda v nich nedošlo k patologickým změnám v důsledku infekce. Vyjmutá játra byla nakrájena na cca 2cm plátky, aby bylo možné zachytit a fotografovat patologické změny. Nalezené motolice byly vyjmuty z jaterní tkáně a přemístěny do kultivačního média RPMI, které bylo předeřháto na 37 °C. Stále žijící motolice byla udržována v tomto médiu pár hodin (3 h) za účelem sledování produkce vajíček. Poté byla fixována v Bouinově roztoku (Sigma) a uchována v lednici při teplotě 4 °C do histologického zpracování. Také tkáně vykazující patologické změny byly po vyříznutí fixovány v 10 % formalínu či v Bouinově roztoku (Sigma) a uchovány v lednici. Použité fixáže bylo vždy přibližně 10× více než fixované tkáně.

4.10. Histologie

Pro histologické zpracování byla celá motolice nejprve promývána 70% etanolem do úplného vymytí fixáže. Dále následovalo odvodnění tkáně etanolovou řadou o vzestupné koncentrace (75 %, 96 %, 100 %). V každé koncentraci byl vzorek promýván 3× po dobu 20 minut. Odvodněná tkáň byla vložena do xylenu na 2× 15 minut pro celkové projasnění vzorku. Poté byly vzorky převedeny do směsi xylen/parafín na 15 minut. Následné prosycení vzorků parafínem probíhalo v termostatu při teplotě 56 °C. Používaný parafín byl 3× vyměněn, nejprve po 1 hodině, pak znova po 12 hodinách a nakonec opět na poslední hodinu. Celkem byl tedy vzorek v parafínu 14 hodin. Poté následovalo zalití vzorku čistým parafínem do silikonové formy a uložení v pokojové teplotě do úplného zatumnutí. Krájení takto vytvořených parafínových bločků na 4µm tlusté řezy probíhalo na mikrotomu (Shandon Finesse ME) s využitím kovových čepelek (Thermo Scientific). Tyto tenké řezy byly napínány na vlašné vodní hladině a přesunuty na podložní sklo (na boku broušené), které bylo předem odmaštěno ve směsi etanol, éter v poměru 1:1. Na předeřháto plotně (55 °C) byly zhotovené histologické řezy ponechány do úplného přilnutí.

Pro obarvení nařezaných tkání bylo použito barvení hematoxylin-eozin. Ehrlichův kyselý hematoxylin byl připraven smícháním 2 g hematoxylinu, 100 ml 96% etanolu, 10 ml koncentrované kyseliny octové, 100 ml glycerinu, 100 ml destilované vody a 3 g síranu hlinito-draselného ($KAl(SO_4)_2$). Hematoxylin barví zásadité struktury (buněčná jádra) do modra. Barvení kyselých struktur (cytoplasma) 1% eozinem (Polysciences, Inc.) změní jejich barvu na odstíny růžové.

Před vlastním barvením se musela sklíčka s jednotlivými řezy nejprve odparafinovat, a to předežhřátím v termostatu (52 °C) po dobu 20 minut a následně v xylenu na 30 minut, přičemž v polovině času byl xylen vyměněn za čistý. Dále následovalo zavodnění tkáně sestupnou etanolovou řadou o koncentracích 100 %, 96 % a 75 %. V jednotlivých koncentracích etanolu byly vzorky ponechány 2 minuty a nakonec byly na stejnou dobu přemístěny do destilované vody. První obarvení probíhalo v Ehrlichově kyselém hematoxylinu po dobu 5 minut, následovalo promývání pod tekoucí vodou z kohoutku do doby, než pod světelným mikroskopem byly jasně viditelné obarvené struktury. Dále byly vzorky ponořeny na 30 vteřin do 1% eozinu a poté opět promyty pod tekoucí vodou do doby, než došlo k optimálnímu kontrastu mezi oběma barvami viditelnému pod mikroskopem. Před zamontováním do DPX média (Mountant for histology, Sigma) bylo potřeba vzorky odvodnit vzestupnou etanolovou řadou (75 %, 96 % a 100 % etanol), vždy 2 minuty a následně opět projasnit 2× v xylenu, také vždy 2 minuty. Zamontované histologické řezy tuhly při pokojové teplotě a pak byly prohlíženy pod světelným mikroskopem (zvětšení 40× – 400×) (Olympus BX51) a vyfotografovány v programu Olympus DP Controller.

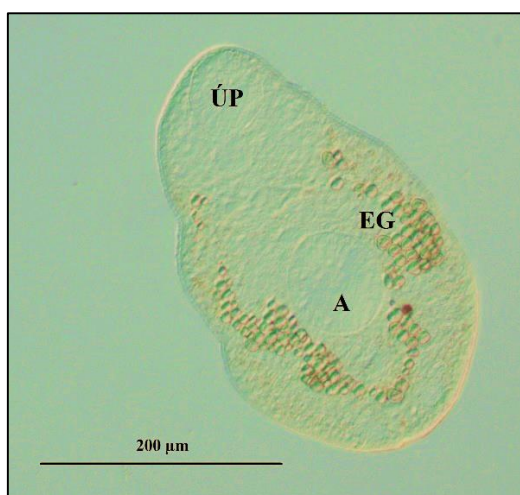
5. VÝSLEKDY

5.1. Životoschopnost MC

Životoschopnost metacerkárií uchovaných 7 měsíců v lednici při 4 °C v odstáté vodě byla měřena zejména v případě druhého experimentu. Avšak i čerstvé, 1 měsíc staré metacerkárie byly pro kontrolu také podrobeny zkoušce životoschopnosti. Byla použita obě excystační media. Při použití prvního excystačního média (Fried a Stromberg, 1985) byla životoschopnost ověřována u 60 MC (z každé věkové skupiny 30 MC), kde se excystovala do dvou hodin pouze 1 MC z každé věkové skupiny. Životoschopnost byla stanovena na 3 %. V případě druhého excystačního média („Belfast“) bylo kontrolováno opět po 30 MC z obou věkových skupin. Do dvou hodin došlo k vylíhnutí 12 MC ze skupiny 7 měsíčních MC (40% životoschopnost) a 6 MC ze skupiny 1měsíčních MC (20% životoschopnost) (Obr. 5). Procento excystovaných MC vyjadřuje Tab. 11. Životoschopnost byla stanovena na výsledných 30%.

Tab. 11: Počet úspěšně excystovaných metacerkárií různého stáří (1 a 7 měsíců) v různých excystačních médiích. V každé excystované variantě bylo zahrnuto 30 MC.

	„Belfast“	Fried a Stromberg, 1985
7 měsíců staré MC	12/30	1/30
1 měsíc staré MC	6/30	1/30



Obr. 5: Vylíhla juvenilní motolice ze stadia metacerkárie pomocí excystačního média. ÚP - ústní přísavka, A - acetabulum, EG - exkreční granula.

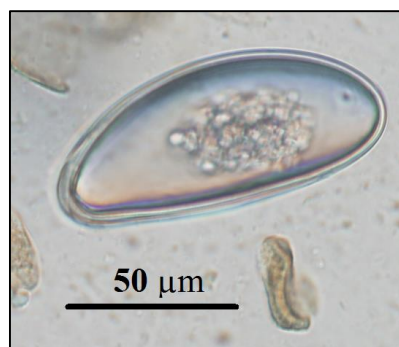
5.2. Hmotnost

Měření hmotnosti každého králíka probíhalo pravidelně každý týden, přičemž celkový vývoj hmotnosti ani váhového přírůstku (nárůst g za týden) u infikovaných králíků se nelišil od negativních kontrol. Hmotnost se v průběhu obou experimentů pohybovala od 1997 g \pm 242 g ze dne zahájení experimentu do 4765 g \pm 291 g ze dne ukončení experimentu.

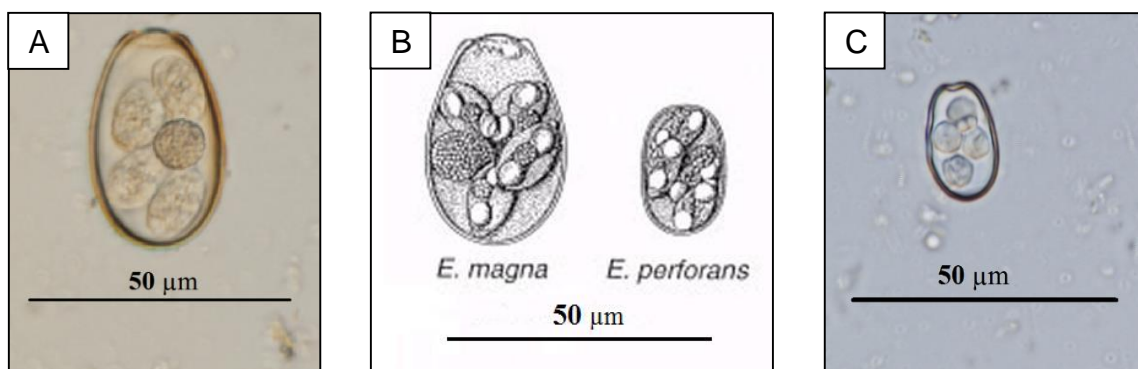
5.3. Koprologie

5.3.1. Sedimentační metoda

Sedimentační metoda byla použita v obou experimentech pro zachycení uvolňovaných vajíček motolice *F. magna* a případných jiných parazitóz. Vajíčka *F. magna* ani jiných parazitů nebyla v žádném z pozorovaných vzorků prvního experimentu nalezena. V druhém experimentu byla nalezena u většiny králíků vajíčka roupa *Passalurus sp.* (Obr. 6) a oocysty kokcidie *Eimeria spp.* (Obr. 7). Na základě proběhlé sporulace, které se dosáhlo opožděným vyšetřením trusu o několik týdnů, bylo možné určit 2 druhy eimerií. Díky tomu mohly být podle diferenciačního klíče určeny jako *Eimeria magna* a *Eimeria perforans* (Coudert a kol., 1995).



Obr. 6: Nalezená vajíčka roupa *Passalurus* v trusu všech králíků z obou experimentů.



Obr. 7: Nalezené oocysty kokcií *Eimeria magna* (A) a *Eimeria perforans* (C) v trusu všech králíků z druhého experimentu určené podle klíče (B).

5.3.2. Sheatherova flotační metoda

Tato flotační metoda byla použita pro zjištění parazitárních objektů v obou experimentech. V prvním experimentu bylo u králíka s označením K4 v 8. týdnu experimentu nalezeno jedno vajíčko roupa *Passalurus*. V následujících odběrech byla vajíčka postupně nalézána u všech králíků. Kromě vajíček roupa byly v trusu nalezeny oocysty eimerií, avšak nikoliv u všech králíků a ve stejném množství (Tab. 12).

Tab. 12: Nález vajíček roupa *Passalurus* a oocyst kokcií *Eimeria* Sheatherovou flotační metodou v trusu králíků z prvního experimentu. * desítky oocyst, *** tisíce oocyst (nepočítatelné množství – odhad).

králík /odběr		1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
K1	<i>Passalurus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	40
	<i>Eimerie</i>	0	0	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K2	<i>Passalurus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	2
	<i>Eimerie</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	***	0	0
K3	<i>Passalurus</i>	0	0	*	*	0	0	0	0	0	1	7	3
	<i>Eimerie</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K4	<i>Passalurus</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
	<i>Eimerie</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K5	<i>Passalurus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	5	4
	<i>Eimerie</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	***	0
K6	<i>Passalurus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
	<i>Eimerie</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

U druhého experimentu bylo u všech králíků v prvních týdnech experimentu nalézáno velké množství eimerií, jejichž počet během experimentu klesal až do úplného vymizení. Na druhou stranu bylo postupně nacházeno malé množství vajíček roupu (Tab. 13).

Tab. 13: Nález vajíček roupa *Passalurus* a oocyst kokcií *Eimeria* Sheatherovou flotační metodou v trusu králíků z druhého experimentu. * desítky oocyst, ** stovky oocyst, *** tisíce oocyst (nepočítatelné množství – odhad).

králík / odběr		1.	3.	5.	7.	9.	11.	13.	15.
K1	<i>Passalurus</i>	0	0	1	0	0	2	0	0
	<i>Eimerie</i>	***	9	*	0	0	0	0	0
K2	<i>Passalurus</i>	0	0	1	3	6	0	0	**
	<i>Eimerie</i>	*	8	6	1	4	0	0	0
K3	<i>Passalurus</i>	0	0	0	7	2	3	0	*
	<i>Eimerie</i>	5	0	***	*	8	0	0	0
K4	<i>Passalurus</i>	0	0	1	0	0	1	0	0
	<i>Eimerie</i>	**	**	**	0	0	0	0	0
K5	<i>Passalurus</i>	0	0	4	0	4	0	0	*
	<i>Eimerie</i>	***	*	5	9	0	0	0	0
K6	<i>Passalurus</i>	0	0	0	1	1	4	*	5
	<i>Eimerie</i>	**	*	8	1	0	0	0	0
K7	<i>Passalurus</i>	0	0	0	*	1	0	0	0
	<i>Eimerie</i>	*	1	***	0	0	0	0	0
K8	<i>Passalurus</i>	0	0	0	1	0	0	2	2
	<i>Eimerie</i>	*	*	*	0	0	0	0	0
K9	<i>Passalurus</i>	0	0	0	0	0	0	0	8
	<i>Eimerie</i>	*	10	0	0	0	0	0	0
K10	<i>Passalurus</i>	0	0	0	3	0	1	0	*
	<i>Eimerie</i>	***	0	*	4	0	0	0	0

5.3.3. Koncentrovaná McMasterova flotační metoda

Trus králíků z druhého experimentu byl podroben také koncentrované McMasterově flotační metodě. Pomocí počítači McMasterovy komůrky bylo pro zjištěné kokcidie vypočítáno OPG (oocyst per gram), jak je uvedeno v Tab. 14.

Tab. 14: Vývoj počtu oocyst kokcií *Eimeria* v 1 gramu trusu králíků během druhého experimentu. Stanovené hodnoty jsou v OPG (oocyst per gram).

odběr králík	1.	3.	5.	7.	9.	11.	13.	15.
K1	288 000	10680	5280	280	0	0	0	0
K2	38 400	1680	20 800	5240	1760	0	0	0
K3	3320	0	348 000	35 040	3440	80	80	0
K4	144 000	138 000	136 000	80	160	0	0	0
K5	324 000	34 000	2920	5480	200	0	0	0
K6	120 000	28 800	9840	320	40	40	0	0
K7	86 000	7240	318 000	240	0	0	0	0
K8	84 000	27 200	37 200	200	0	0	0	0
K9	22 000	3160	160	0	0	0	0	0
K10	312 800	40	112 000	21 720	2280	1000	0	0

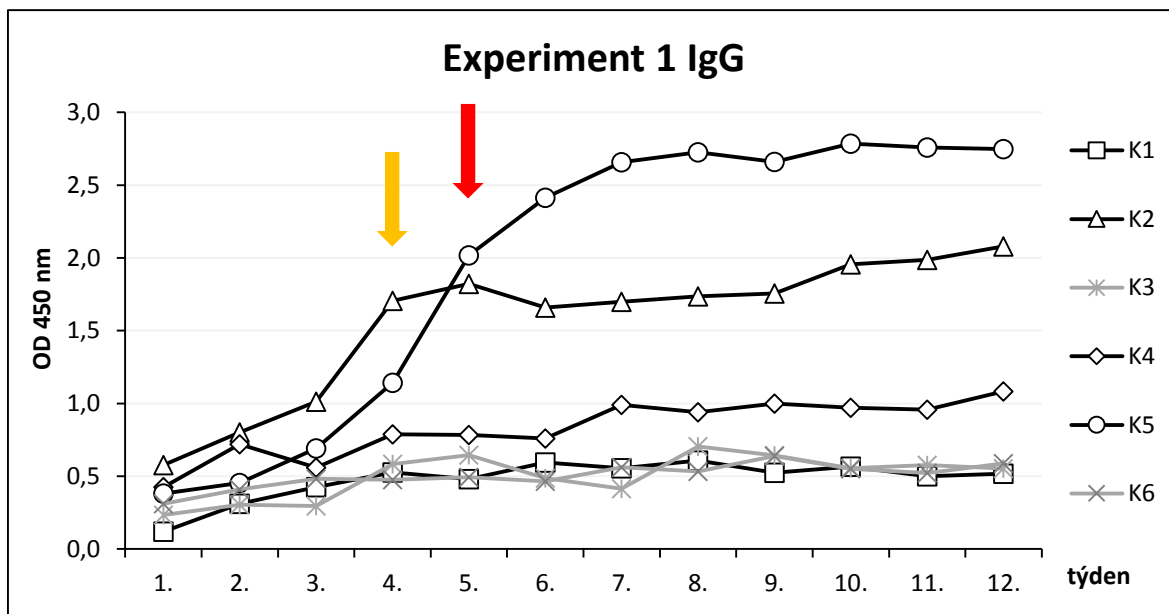
5.4. Imunologie

Po skončení každého experimentu byly u všech odebraných krevních sér změřeny hladiny protilátek, jak chronické fáze (IgG), tak protilátek akutní fáze (IgM) pomocí nepřímé ELISA metody.

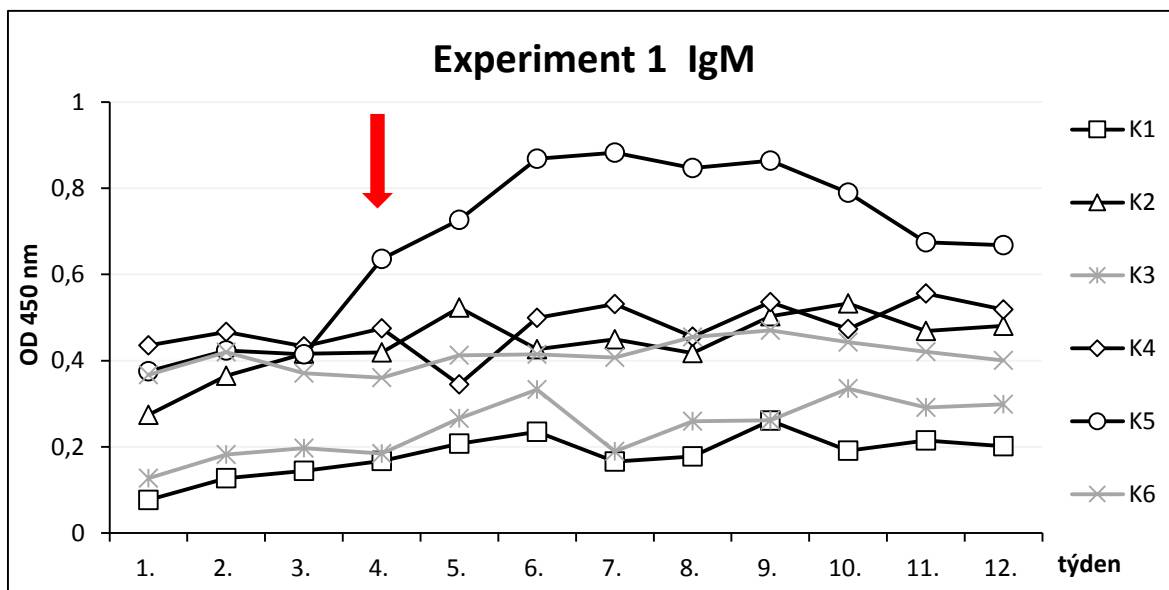
5.4.1. Experiment 1

V prvním experimentu došlo k významnému nárůstu protilátek u králíka K5, a to jak protilátek chronické fáze, tak akutní. Hladina protilátek IgG se významně zvyšovala od 5. týdne infekce a udržela se v nejvyšších hodnotách až do ukončení experimentu (Graf 1). Navýšení těchto protilátek bylo však naměřeno i u králíka K2, u kterého bylo již od 4. týdne experimentu zaznamenáno zvýšení produkce IgG, kdy mezi 4. a 5. týdnem experimentu byla hladina IgG na maximální hodnotě a následující týden došlo k mírnému poklesu. Oproti králíkovi K5 měl králík K2 celkově nižší hladinu IgG, avšak oproti nenakaženým kontrolám stále významnou. Hodnoty naměřené u ostatních králíků se během celého experimentu nelišily od negativních kontrol. Protilátky akutní fáze IgM se navýšily pouze u králíka K5 a to od 4. týdne experimentu. Maximální hodnota byla naměřena mezi 6. a 7. týdnem a po 9. týdnu začaly tyto protilátky klesat na téměř původní hodnoty (Graf 2).

Graf 1: Vývoj hladiny protilátek IgG v průběhu prvního experimentu. Měřeno nepřímou ELISA metodou při optické densitě 450 nm (antigen: E/S produkty, 0,5 µg / jamka; primární protilátky: krevní sérum, ředění 1:200; sekundární protilátky: Anti-Rabbit IgG (whole molecule) produced in goat, ředění 1:5000); černé křivky – králíci vystaveni 50 MC, šedé křivky – negativní kontroly (K3 a K6); červená šipka – zvýšená hladina IgG infikovaného králíka K5 od 5. týdne experimentu; oranžová šipka – zvýšená hladina IgG infikovaného králíka K2 od 4. týdne experimentu.



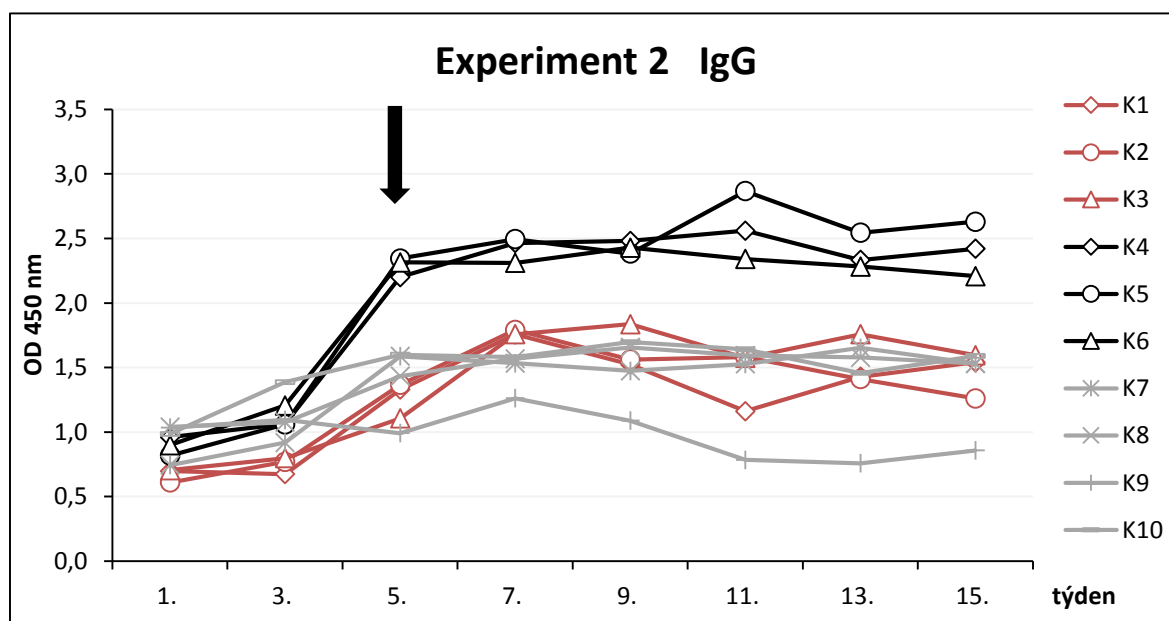
Graf 2: Vývoj hladiny protilátek IgM v průběhu prvního experimentu. Měřeno nepřímou ELISA metodou při optické densitě 450 nm (antigen: E/S produkty, 0,5 µg / jamka; primární protilátky: krevní sérum, ředění 1:200; sekundární protilátky: Anti-Rabbit IgM (µ-chain specific) - HRP conjugate produced in goat, ředění 1:5000); černé křivky – králíci vystaveni 50 MC, šedé křivky – negativní kontroly (K3 a K6); červená šipka – zvýšená hladina IgM infikovaného králíka K5 od 5. týdne experimentu.



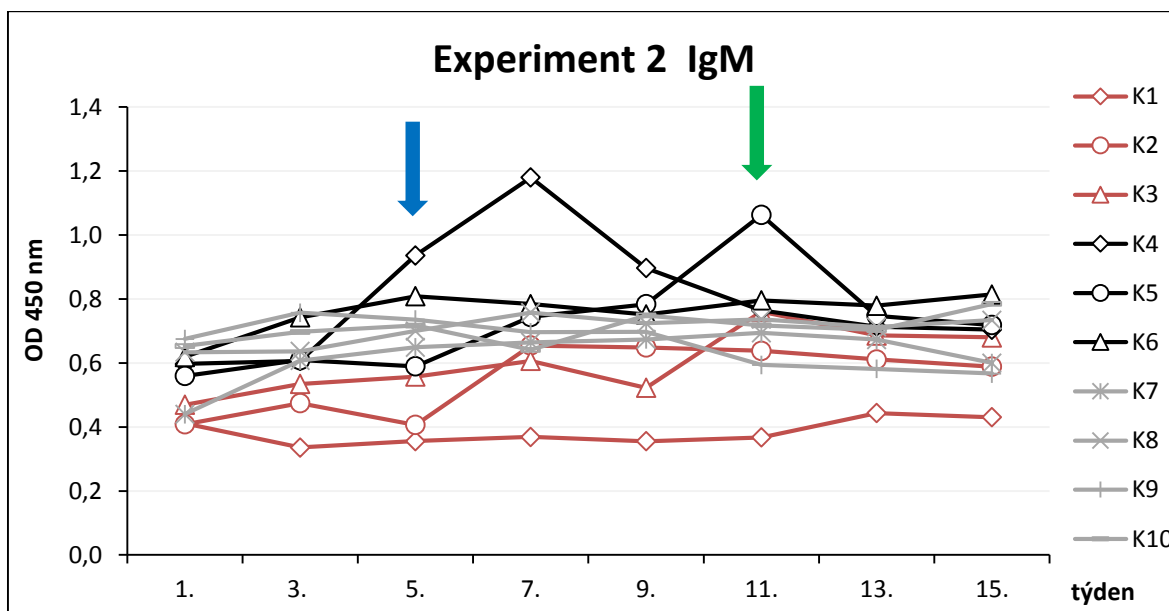
5.4.2. Experiment 2

V průběhu druhého experimentu byly opět změřeny hladiny protilátek IgG a IgM. Při tomto měření byla zjištěna zvýšená produkce protilátek IgG u králíků, kteří byli vystaveni infekční dávce 300 MC. Rostoucí hladina protilátek IgG byla zaznamenána již od 2. týdne po infekci (tj. 4. týden experimentu). U králíků, kteří byli infikováni 150 MC, nebyl oproti negativním kontrolám zaznamenán téměř žádný nárůst IgG protilátek (Graf 3). Protilátky IgM byly významně navýšené pouze v krátkém čase (4 týdny) a to u králíka K4 a K5, kteří byli vystaveni 300 MC. U králíka K4 byl zaznamenán krátkodobý nárůst IgM v 11. týdnu a u králíka K5 v týdnu 9. – 13. (Graf 4). V sérech ostatních králíků nebyla zaznamenána jakákoliv změna hladiny IgM protilátek.

Graf 3: Vývoj hladiny protilátek IgG v průběhu druhého experimentu. Měřeno nepřímou ELISA metodou při optické densitě 450 nm (antigen: E/S produkty, 0,5 µg / jamka; primární protilátky: krevní sérum, ředění 1:200; sekundární protilátky: Anti-Rabbit IgG (whole molecule) produced in goat, ředění 1:5000); černé křivky – králíci vystaveni 300 MC, červené křivky – králíci vystaveni 150 MC, šedé křivky – negativní kontroly (K7 – K10); černá šipka – zvýšené hodnoty IgG infikovaných králíků 300 MC od 5. týdne experimentu.



Graf 4: Vývoj hladiny protilátek IgM v průběhu druhého experimentu. Měřeno nepřímou ELISA metodou při optické densitě 450 nm (antigen: E/S produkty, 0,5 µg / jamka; primární protilátky: krevní sérum, ředění 1:200; sekundární protilátky: Anti-Goat Anti-Rabbit IgM (µ-chain specific) – HRP conjugate produced in goat, ředění 1:5000); černé křivky – králíci vystaveni 300 MC, červené křivky – králíci vystaveni 150 MC, šedé křivky – negativní kontroly (K7 – K10); modrá šipka – zvýšené hodnoty IgM infikovaného králíka 300 MC K4 od 5. týdne experimentu; zelená šipka – zvýšené hodnoty IgM infikovaného králíka 300 MC K5 od 11. týdne experimentu.

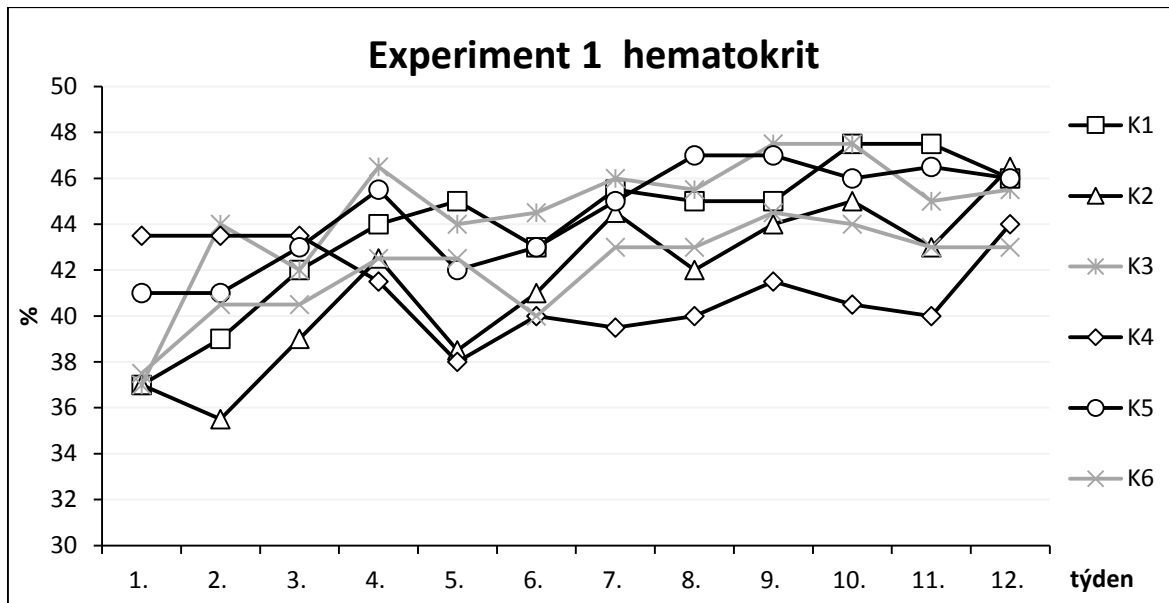


5.5. Hematologie

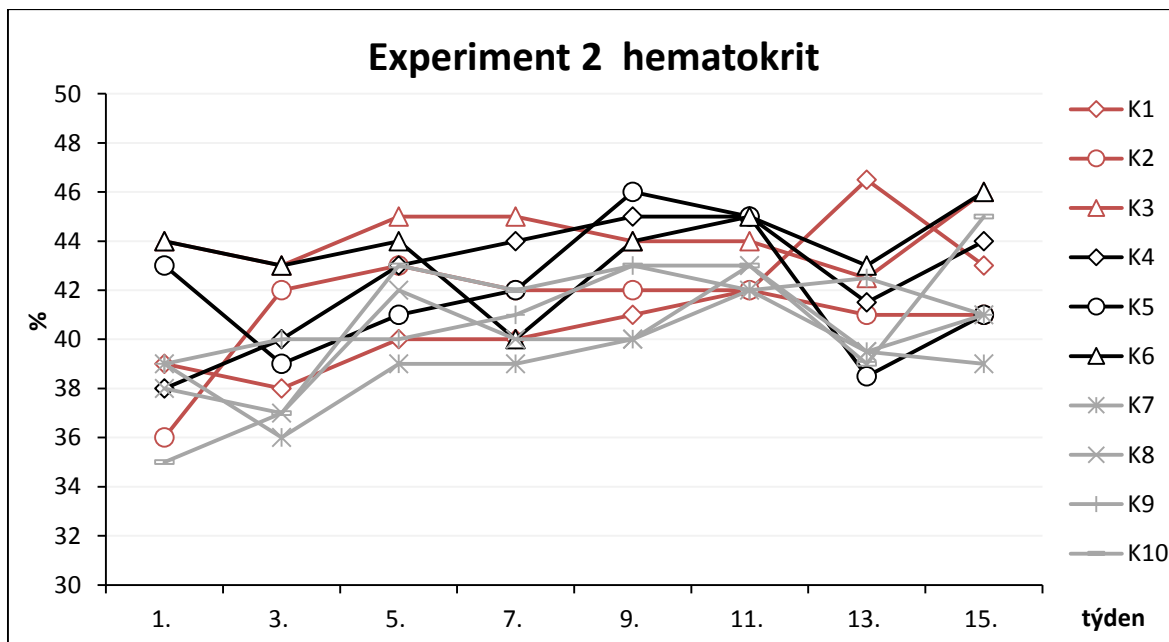
5.5.1. Hematokrit

Hematokrit, poměr pevné a tekuté složky krve, byl stanovován pravidelně během obou experimentů každý týden. Avšak žádné odlišné hodnoty u infikovaných králíků oproti kontrolám nebyly zaznamenány (Graf 5, 6).

Graf 5: Vývoj hematokritu v průběhu prvního experimentu měřený v heparinizovaných kapilárách stočených v hematokritové centrifuze po dobu 3 minut při 16250×g. Černé křivky – králíci vystaveni 50 MC, šedé křivky – negativní kontroly (K3 a K6).

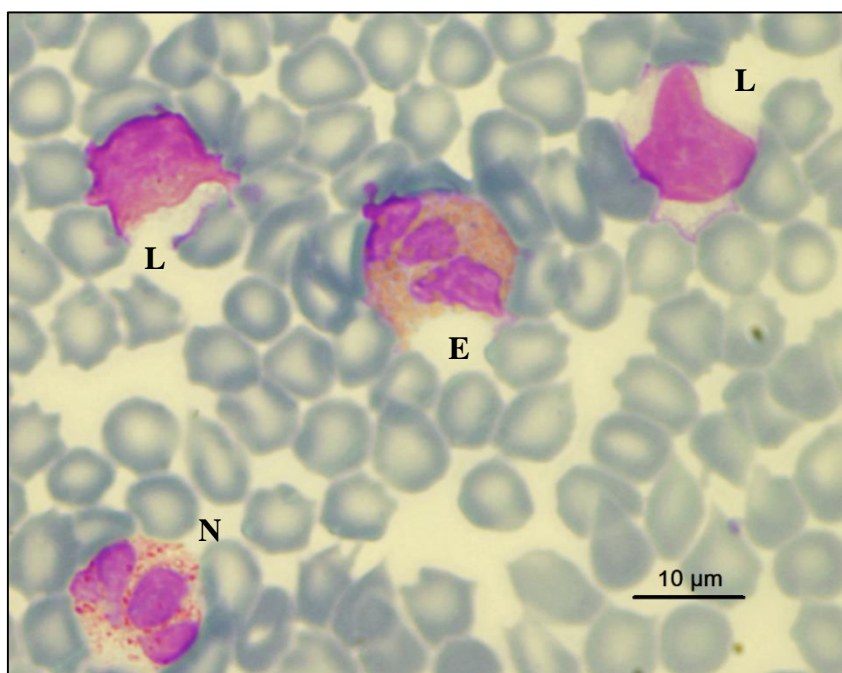


Graf 6: Vývoj hematokritu v průběhu druhého experimentu měřený v heparinizovaných kapilárách stočených v hematokritové centrifuze po dobu 3 minut při 16250×g. Černé křivky – králíci vystaveni 300 MC, červené křivky – králíci vystaveni 150 MC, šedé křivky – negativní kontroly (K7 – K10).



5.5.2. Krevní obraz

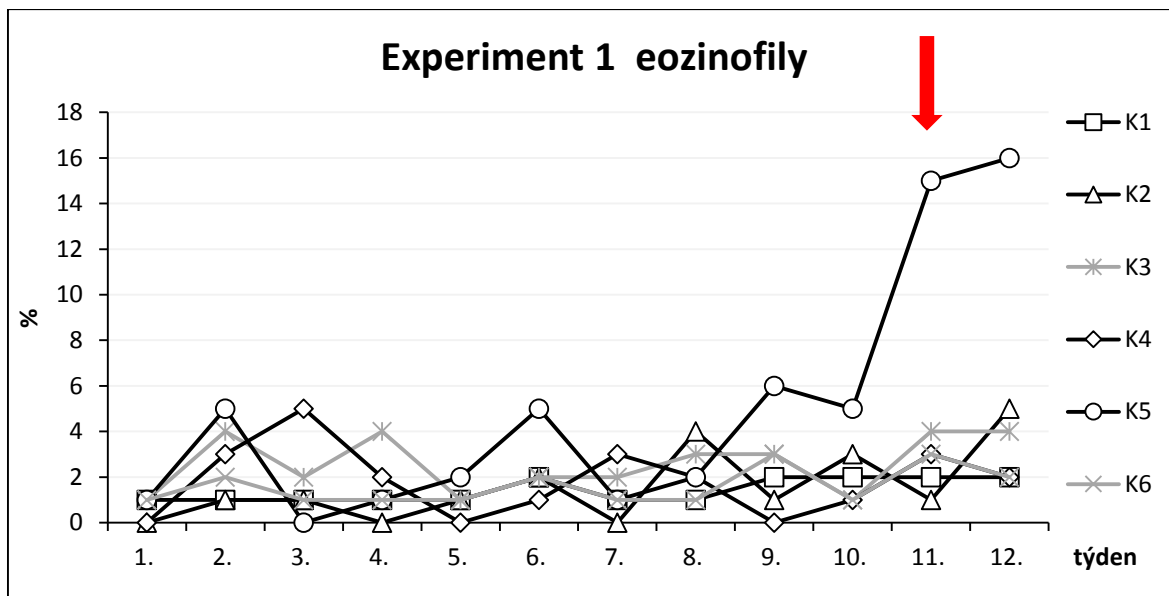
Počet jednotlivých leukocytů byl stanovován mikroskopickým odečítáním na základě odlišné morfologie buněk po obarvení Giemsovým barvivem (Tab. 3). Z velkého množství různých typů králíčích leukocytů byly jasně diferencovány 4 typy: lymfocyty, neutrofil, monocyt a eozinofil (Obr. 8).



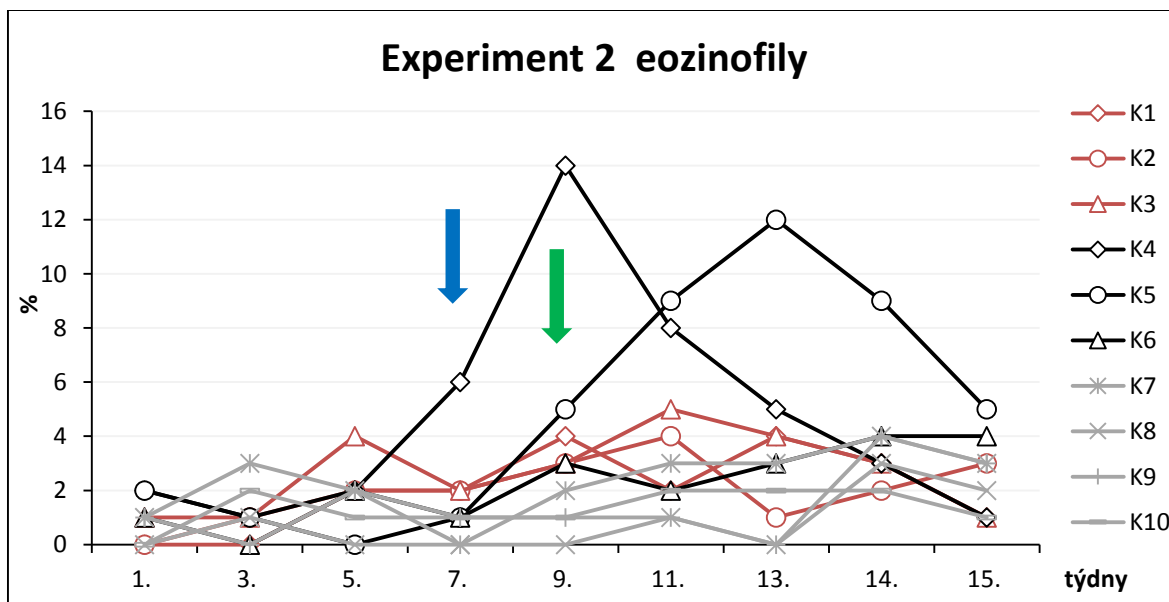
Obr. 8: Diferenciace jednotlivých typů leukocytů z krevního roztěru obarveného Giemsou a odečítané pod světelným mikroskopem. L – lymfocyt, E – eozinofil, N – neutrofil.

Počet lymfocytů, neutrofilů a monocytů se v průběhu experimentů významně nelišil mezi infikovanými králíky a kontrolními králíky. Došlo však k významnému navýšení hladiny eozinofilů u králíka K5 z prvního experimentu a u králíků K4 a K5 z experimentu druhého (Graf 7, 8).

Graf 7: Vývoj procentuálního zastoupení eozinofilů během prvního experimentu. Černé křivky – králíci vystaveni 50 MC, šedé křivky – negativní kontroly (K3 a K6); červená šipka – zvýšený počet eozinofilů infikovaného králíka K5 od 11. týdne experimentu.



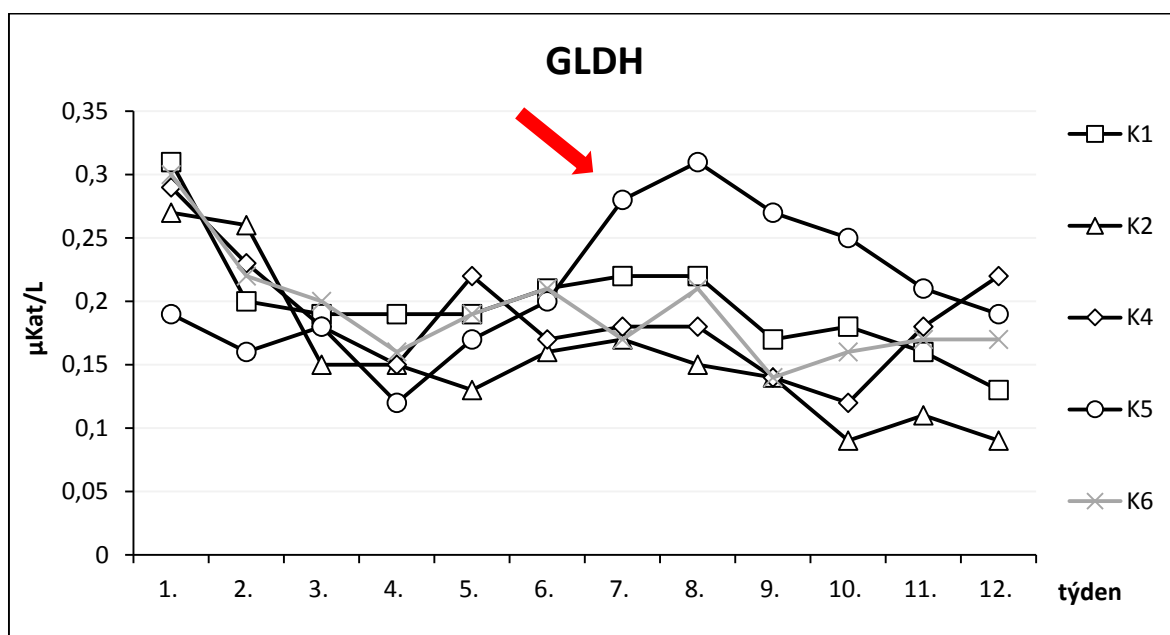
Graf 8: Vývoj procentuálního zastoupení eozinofilů během druhého experimentu. Černé křivky – králíci vystaveni 300 MC, červené křivky – králíci vystaveni 150 MC, šedé křivky – negativní kontroly (K7 – K10); modrá šipka – zvýšený počet eozinofilů infikovaného králíka 300 MC K5 mezi 7 až 13. týdnem experimentu; zelená šipka – zvýšený počet eozinofilů infikovaného králíka 300 MC K5 mezi 9 až 15. týdnem experimentu.



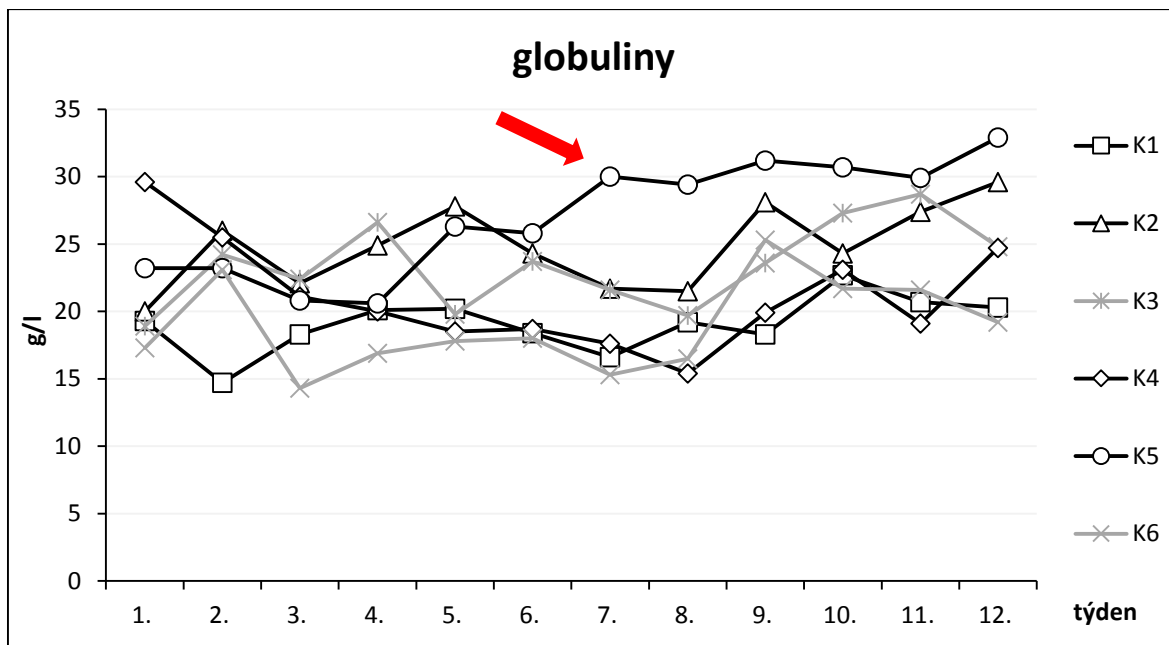
5.6. Biochemie

Během experimentů bylo z krevní plazmy (1. experiment) či ze séra (1. a 2. experiment) stanovováno celkem 17 biochemických parametrů (Tab. 10). V prvním experimentu byly parametry měřeny všem pokusným králíkům. Avšak během celého experimentu žádný z parametrů nevykazoval významné změny mezi králíky vystavenými MC a králíky kontrolními. Pouze hladina GLDH a globulinů byla mírně zvýšená u infikovaného králíka K5, v jehož poškozených játrech byla nalezena motolice, viz níže (Graf 9, 10). Během druhého experimentu nebyly zaznamenány žádné rozdíly v měřených biochemických parametrech mezi infikovanými králíky a kontrolami.

Graf 9: Vývoj hladiny gama-glutamátdehydrogenázy u králíků během experimentu 1. Černé křivky – králíci vystaveni 50 MC, šedá křivka – negativní kontrola (K6). Naměřené hodnoty GLDH u negativní kontroly K3 nejsou zahrnuty v grafu, neboť vykazovaly posun z optimálních mezí tak, že by ovlivnily výpovědní hodnotu grafu (tj. hodnoty kolem 1,5 $\mu\text{Kat/L}$); červená šipka – zvýšená hladina GLDH infikovaného králíka K5 od 7. týdne experimentu.

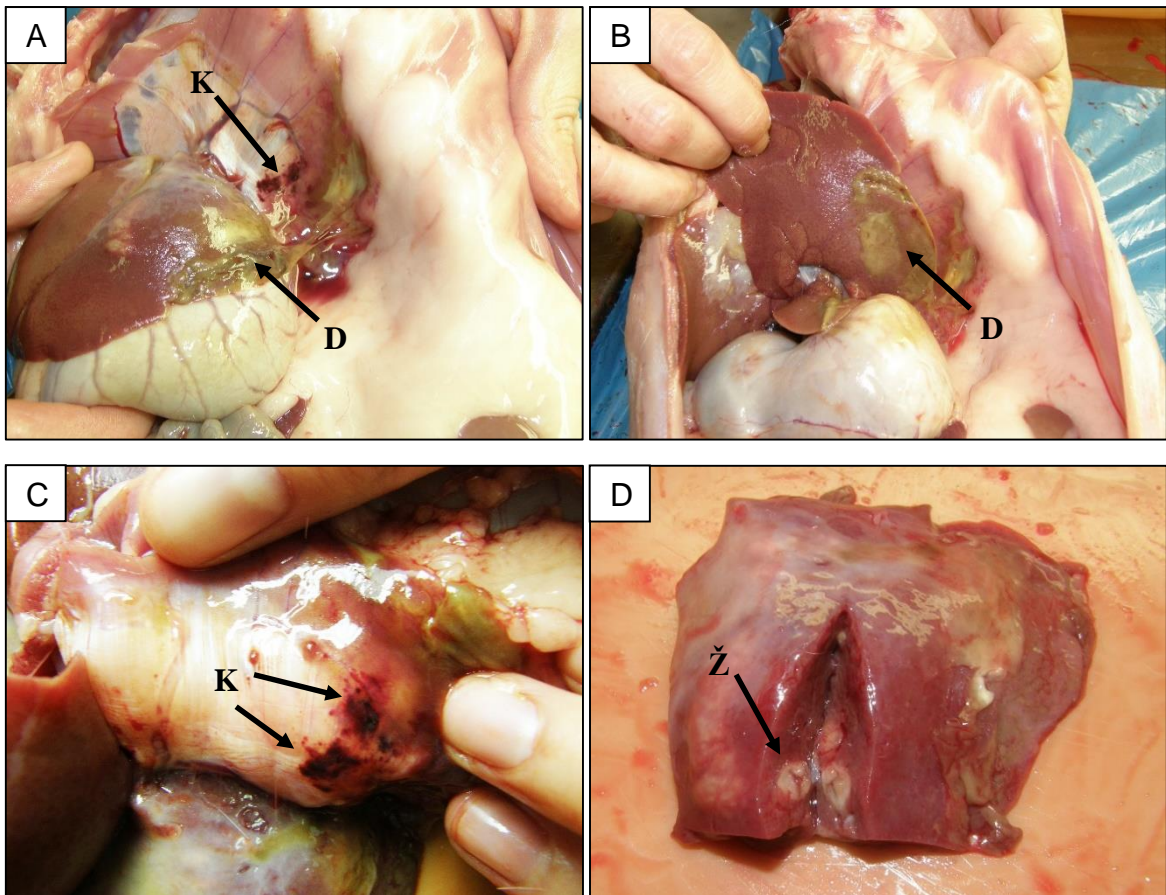


Graf 10: Vývoj hladiny globulinů u všech králíků během experimentu 1. Černé křivky – králíci vystaveni 50 MC, šedé křivky – negativní kontroly (K3 a K6); červená šipka – mírně zvýšená hladina globulinů infikovaného králíka K5 od 7. týdne experimentu.

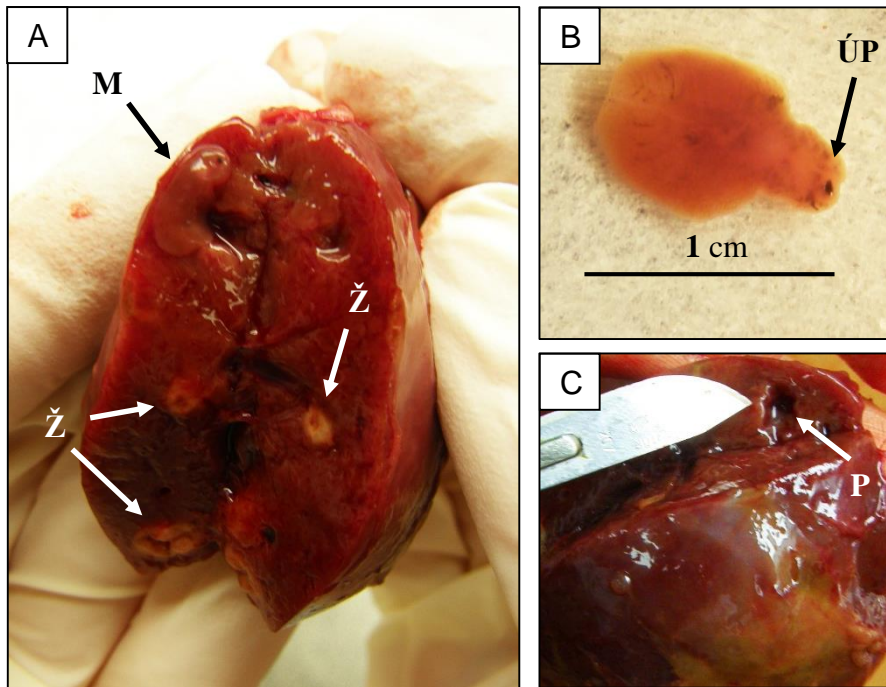


5.7. Pitva králíků

Při pitvě všech králíků zahrnutých do obou experimentů byly všechny vnitřní orgány v dutině břišní prohlédnuty a játra nakrájena na přibližně 2cm plátky. V prvním experimentu pitva králíků odhalila značné poškození jater u králíka označeného K5 (Obr. 9). Jaterní tkáň a bránice vykazovaly specifické projevy přítomnosti motolice: migrační tunely, krvácení, destruovanou tkáň, obstrukci žlučovýchodů. Při krájení těchto jater na plátky byla nalezena jedna 1 cm velká motolice lokalizovaná volně v jaterním parenchymu (Obr. 10). Ta byla přenesena do kultivačního média RPMI předem vyhřátého na 37 °C a udržována při životě po několik hodin (3 h) a následně fixována v Bouenově fixáži. Poté bylo kultivační médium prohlíženo pod světelným mikroskopem pro průkaz vajíček, a tudíž dospělosti motolice.

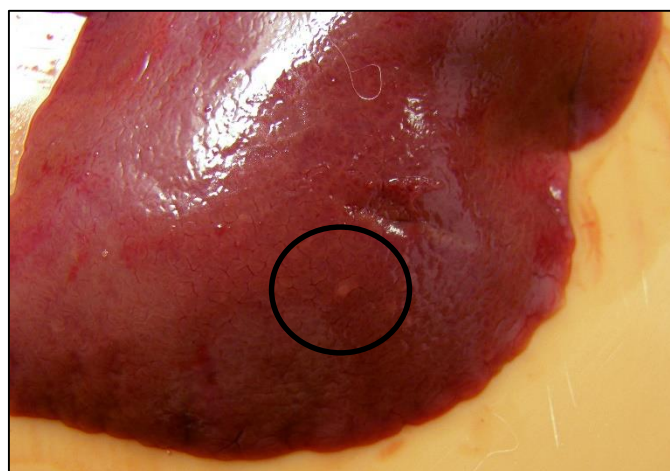


Obr. 9: Poškozená jaterní tkáň králíka K5 způsobená přítomností jedné motolice *Fascioloides magna* po 12. týdnu infekce. **A:** Patologie na levém jaterním laloku a na bránici; **B:** Poškození na ventrální straně levého jaterního laloku; **C:** Postižená bránice se známkami krvácení; **D:** Řez fibrotizovaným žlučovodem. K - krvácení, D - destruovaná tkáň, Ž - obstrukce žlučovodu (foto: M. Kašný).



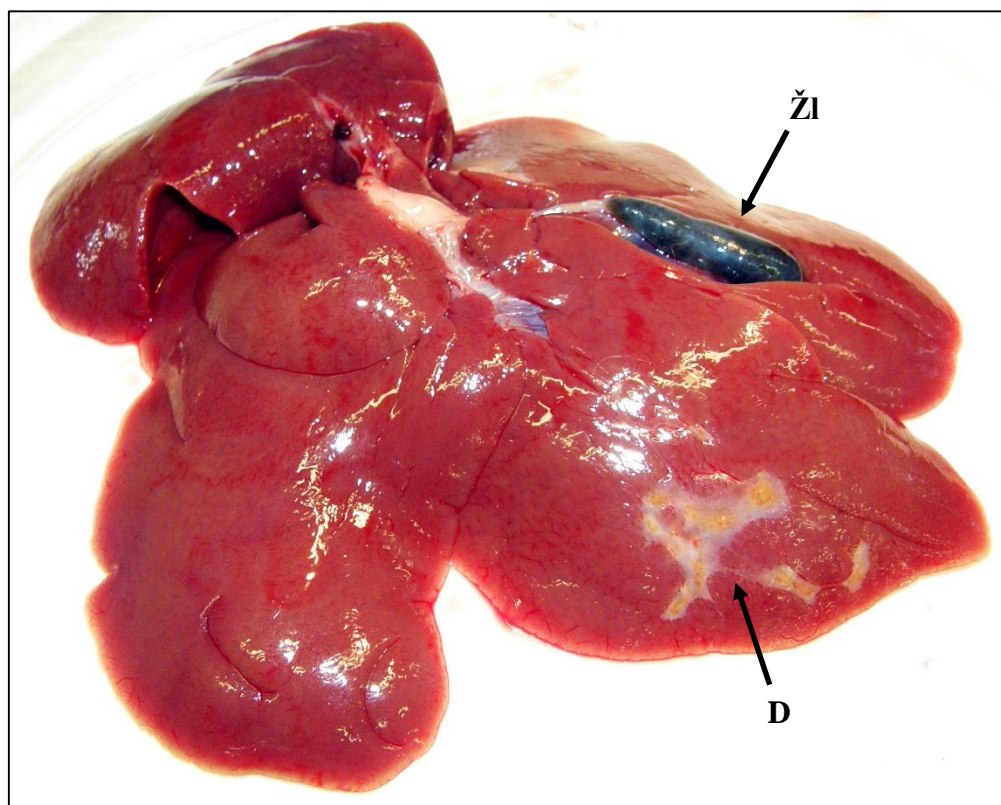
Obr. 10: Nález motolice *Fascioloides magna* u králíka K5. **A:** Nalezená motolice v poškozených játrech infikovaného králíka; **B:** *Fascioloides magna* po vyjmutí z jater v kultivačním médiu RPMI, velikost 1 cm; **C:** Prostor v jaterním parenchymu, ve kterém byla motolice nalezena. Ž - fibrotizované žlučovody, M - motolice *Fascioloides magna*, ÚP - ústní přísavka, P - prostor (foto: M. Kašný).

U králíka K2 byla nalezena pouze nepatrná bílá oblast pojivové tkáně (Obr. 11), ale žádné rozsáhlejší poškození neleženo nebylo, ani na jiných orgánech či v břišní dutině. Žádná motolice nebyla objevena. Nalezený malý útvar podezřelé pojivové tkáně by však s působením motolice ve tkáni mohl souviset. U všech ostatních králíků játra ani jiné orgány nevykazovaly přítomnost motolice *F. magna*.



Obr. 11: Malá oblast pojivové tkáně na povrchu jater nalezená při pitvě infikovaného králíka K2 (foto: M. Kašný).

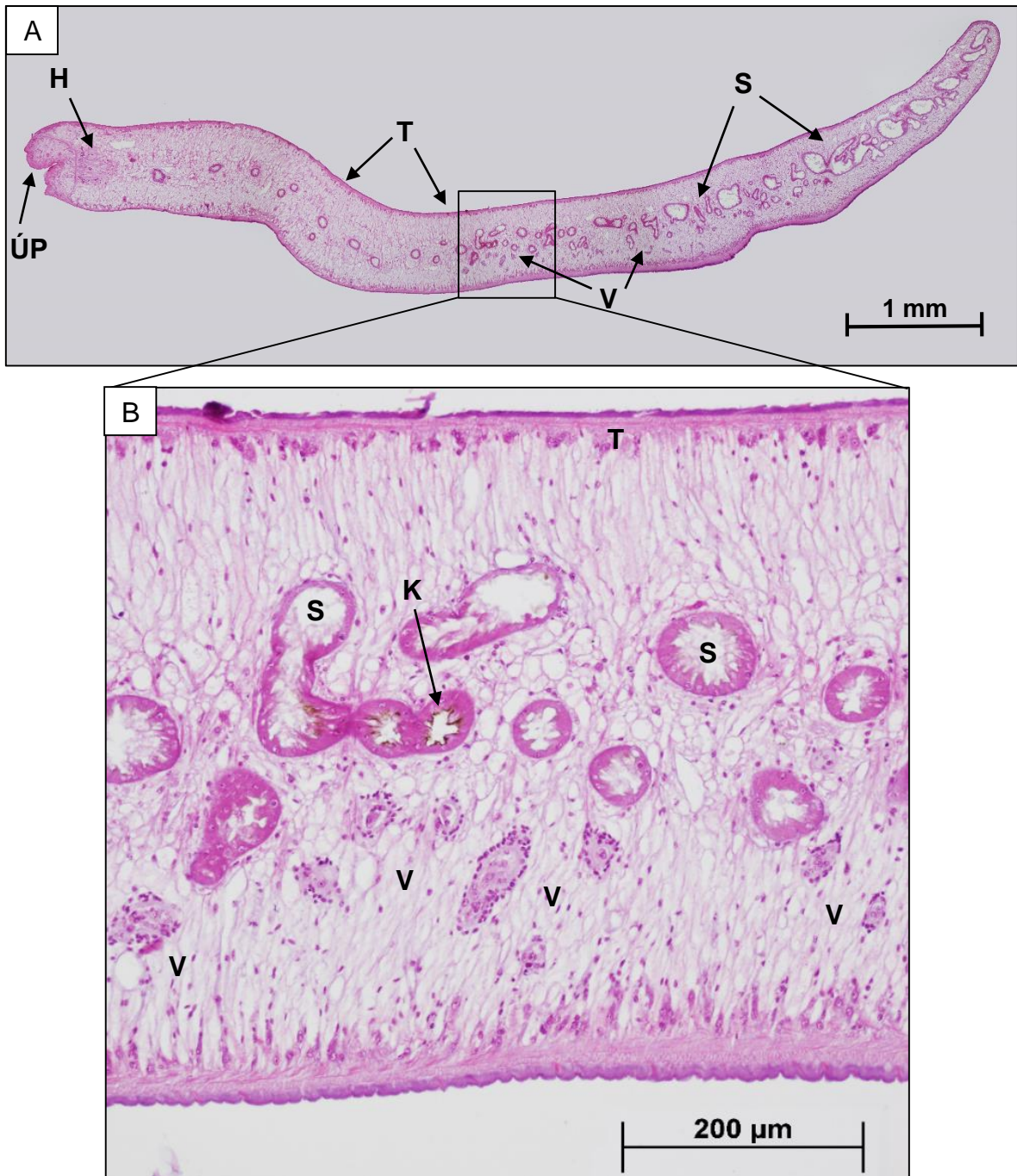
U žádného infikovaného králíka z druhého experimentu v játrech ani v jiných orgánech nebyla nalezena motolice. Pouze u králíka (K5) bylo patrné mírné poškození jaterní tkáně (Obr. 12), avšak žádná motolice nebyla, ani v jiných orgánech, nalezena. Destruovaná tkáň na povrchu jater značí, že zde motolice alespoň krátkodobě migrovala.



Obr. 12: Mírně poškozená játra králíka (K5) z druhého experimentu vystaveného infekční dávce 300 MC. D – destruovaná jaterní tkáň, Žl – žlučník (foto: M. Kašný).

5.8. Histologie

Nalezená motolice po vyjmutí z jater infikovaného králíka K5 z prvního experimentu byla ještě po dobu několika hodin (cca 3 hodiny) kultivována v RPMI médiu. Toto médium bylo po odebrání motolice do fixáže zcentrifugováno (1 minutu, 2000×g) a pozorováno pod světelným mikroskopem (zvětšení 40×). Žádná vajíčka nebyla pozorována, proto byla motolice histologicky zpracována, aby se ověřilo, zda se jedná opravdu o nedospělé stadium. Na obarvených řezech byly kromě základních orgánů (přísavky, hltan, střevo) viditelné i základy budoucích vitelarií. Avšak pohlavní orgány jako takové či vytvářející se vajíčka nebyly pozorovány (Obr. 13).



Obr. 13: Histologický řez motolice *F. magna* (laterálně) z infikovaného králíka K5 z prvního experimentu. Bouenova fixáž, 4µm řezy, barvení hematoxylin-eozin, zvětšení 40×. **A:** celkový laterální řez; **B:** Výřez histologického řezu v oblasti umístění vitelárií. ÚP – ústní přísavka, H – hltaň, S – střevo, T – tegument, V – vitelária, K – požitá krev hostitele.

5.9. Shrnutí výsledků

Jelikož bylo měřeno větší množství parametrů u každého králíka, jsou výsledky shrnuty v níže uvedené tabulce (Tab. 15).

Tab. 15: Shrnutí změn v měřených parametrech u každého králíka z obou experimentů. Nezměněné parametry zobrazeny nejsou. (-) – negativní kontroly, (x) – nezaznamenaná změna parametru oproti kontrolám, (✓) – zaznamenaná změna parametru oproti kontrolám.

	počet MC	označení králíka	nález motolice	poškozená játra	IgG	IgM	eozinofilie	GLDH	globuliny
Experiment 1	50	K1	x	x	x	x	x	x	x
		K2	x	x	✓	x	x	x	x
	0	K3	-	-	-	-	-	-	-
	50	K4	x	x	x	x	x	x	x
		K5	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
	0	K6	-	-	-	-	-	-	-
Experiment 2	150	K1	x	x	x	x	x	x	x
		K2	x	x	x	x	x	x	x
		K3	x	x	x	x	x	x	x
	300	K4	x	x	✓	✓	✓	x	x
		K5	x	✓	✓	✓	✓	x	x
		K6	x	x	✓	x	x	x	x
	0	K7	-	-	-	-	-	-	-
		K8	-	-	-	-	-	-	-
		K9	-	-	-	-	-	-	-
		K10	-	-	-	-	-	-	-

6. DISKUSE

Cílem této diplomové práce bylo ověřit u králíků experimentálně infikovaných motolicí *Fascioloides magna* změnu vybraných kvalitativních i kvantitativních intravitálně měřitelných parametrů, jakožto projev přítomnosti parazita v hostiteli.

Mezi nejběžnější intravitální metody v parazitologii patří různé typy koprologického vyšetření založené zejména na sedimentaci (např. vajíčka motolic) či flotaci (např. oocysty kokcií). Vajíčka či jiná ontogenetická stádia některých druhů parazitů se však z různých důvodů nemusí vždy dostávat se stolicí hostitele do vnějšího prostředí, jako je tomu např. u motolice *F. magna*, kdy je infikován např. tur domácí (nespecifický definitivní hostitel) (Erhrdová-Kotrlá, 1971). Z těchto důvodů se zde nabízí prostor pro využití dalších metod, které by v podobných případech umožnily spolehlivě odhalit přítomnost parazita během života hostitele, nikoliv až při pitvě (např. měření hladiny protilátek nebo molekulární diagnostika ze vzorku krve). Nejnovější studie navíc naznačují, že motolice *F. magna* je i v dnešní době stále se šířící parazit (Demiaszkiewicz a kol., 2015). Jelikož tato motolice škodí nejen divoké zvěři, ale jak již bylo zmíněno, také hospodářským zvířatům (Leontovyč a kol., 2014), je velmi důležité znát veškeré detaily související s projevem nákazy a odchylky od normálního zdravotního stavu hostitele, na kterých lze následně postavit spolehlivou diagnostiku onemocnění.

Detailní monitoring širokého spektra parametrů, které je možné sledovat u infikovaného hostitele, nám kromě diagnostických možností přináší i obrázek o průběhu onemocnění a umožňuje nám tak lépe pochopit biologickou podstatu vztahu mezi parazitem a hostitelem. Na základě znalosti změn sledovaných parametrů souvisejících s infekcí je pak také možné přesněji odhadnout např. potenciál šíření nepůvodních parazitárních druhů. V mé bakalářské práci bylo shrnuto, že spektrum definitivních hostitelů dvou příbuzných motolic, *F. magna* a *F. hepatica* se částečně překrývá, přičemž v případě *F. hepatica* může sloužit k šíření nákazy i králík (*Oryctolagus cuniculus*; Olsen, 1948; Li, 1952; Pybus, 2001). Proto byla realizována tato studie směřující k prozkoumání parametrů souvisejících s fascioloidózou u králíka jakožto potenciálního hostitele *F. magna* v České republice, který je u nás hojně rozšířen (Anděra a Červený, 2008). S ohledem na srovnání výsledků se pro experimentální nákazu motolicí *F. magna* zdál být králík vhodným druhem definitivního hostitele také z důvodu předchozích realizací podobných laboratorních studií (Swales, 1935; Foreyt, 1996b). Králík je ideálním experimentálním hostitelem také pro svou velikost,

snadný chov, optimální manipulovatelnost a možnost pravidelného odběru adekvátního množství krve.

Celkově se jednalo o dva nezávislé experimenty, mezi nimiž byl časový odstup a kde výsledky prvního experimentu posloužily k optimalizaci experimentu následného. Výsledkem prvního, pilotního, experimentu byl jeden úspěšně infikovaný králík, u kterého byla během pitvy nalezena jedna živá motolice. S využitím těchto výsledků byl uskutečněn vylepšený druhý experiment. Avšak ani přes mnohé úpravy podmínek se ve druhém experimentu nepodařilo v těle infikovaných králíků nalézt juvenilní stádia či dospělé motolice *F. magna*.

První experiment se odehrával na ČZU, kde nám byli doporučeni brojleroví králíci hybridní kombinace HYplus. V druhém experimentu, který probíhal na PřF UK, bylo do experimentu vybráno plemeno Novozélandský bílý (NWZ), jakožto nejběžnější plemeno určené pro laboratorní chov, a také z důvodu referencí v literatuře pojednávajících o experimentální infekci tohoto plemene motolicí *F. hepatica* (Cebán-Hernández a kol., 2012). Obě zvolená plemena králíků byla outbrední (= geneticky jedineční jedinci), což mohlo také ovlivnit vnímavost k nákaze (Dorman a kol., 2004). Změna umístění králíků mezi oběma experimenty, z ČZU na PřF UK, měla pozitivní vliv zejména na rychlost uložení a zpracování vzorků. V obou experimentech bylo zvoleno menší množství králíků z důvodu omezené kapacity chovu, časové a finanční náročnosti během odebírání a analyzování vzorků. Zvoleni byli co nejmladší jedinci, hned po odstavu, aby byla zajištěna jejich vyšší vnímavost vůči nákaze (Foreyt, 1979; Pybus, 2001).

V obou experimentech bylo zvoleno menší množství králíků (6 a 10 ks) kvůli omezené kapacitě chovu, časové a finanční náročnosti během odebírání a analyzování vzorků. Vybráni byli co nejmladší jedinci (10 a 12 týdnů), hned po odstavu, aby byla zajištěna jejich vyšší vnímavost vůči nákaze (Foreyt, 1979; Pybus, 2001).

Metacerkárie určené k infekci králíků byly získány pitvou infikovaného plže, z důvodu nedostatečného spontánního vylučování. Po pitvě byly cercárie přeneseny do odstáté vody, kde se samovolně encystovaly na stěně Petriho misky. U takto získaných metacerkárií byla před infekcí ověřována životaschopnost MC ve dvou excistačních médiích. V médiu Fried a Stromberg (1985) docházelo k excystaci pouze u 3% MC a použití tohoto média se nám jevilo jako nevhodné. S využitím druhého excystačního média (návod byl získán od kolegů z Queens University Belfast), bylo dosaženo lepších výsledků, 30% excystovaných MC. Rozdílnost v účinnosti obou médií mohla spočívat například v různém

složení a poměrů jednotlivých chemikálií. Dle měřeného procenta excystace MC se zdá, že stáří MC (1 a 7 měsíců) nemělo na úspěšnost excystace vliv. Tento fakt podporují také informace ze studií (Ferre a kol., 1997; Martínez-Moreno a kol., 1999), kdy autoři dokládají vysokou infekceschopnost MC i po 5-ti měsíčním skladování u experimentálně infikovaných ovcí a koz motolicí *F. hepatica*. Na druhou stranu existuje značné množství prací o experimentálních infekcích různých druhů hostitelů motolicemi *F. magna* a *F. hepatica*, kde o tak zásadním parametru, jakým je životaschopnost metacerkárií, není ani zmínka (např. *F. magna*: Swales, 1935; Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt a Todd, 1979b; Conboy a Stromberg, 1991; *F. hepatica*: Presidente a kol., 1975; Nansen a kol., 1975; Wensvoort a Over, 1982; Chauvin a kol., 1995; Ferre a kol., 1997; Yang a kol., 1998; Raadsma a kol., 2007).

Další experimentátoři aplikovali jiné způsoby ověření životaschopnosti. Například Foreyt a Tood (1976) použili na ověření životaschopnosti MC infekci morčat, které po několika týdnech (4 – 8) vypitvali a z počtu nalezených motolic stanovili životaschopnost MC. V další práci Foreyt (1992 a 1996ab) považoval za životaschopné ty MC, u kterých viděl pohyb plaménkových buněk protonefridií. Phiri a kol. (2007) vybral pro infekci ovcí motolicí *F. hepatica* takové MC, které měly zrnitý vzhled vnější stěny.

Pro účely prvního experimentu byla připravena dávka 50 MC pro každého králíka. Infekční dávka byla zvolena na základě publikovaných údajů týkajících se experimentálních infekcí různých druhů hostitelů (Swales, 1935; Foreyt, 1979; Cebán-Hernández a kol., 2012). Jelikož úspěšnost infekce prvního experimentu byla velmi nízká (0,5%), byl v druhém experimentu počet MC navýšen na 150 a 300 kusů. Rozdílná infekční dávka byla zvolena pro zajištění co možná nejvyšší úspěšnosti infekce a současně vyvarování se úhynu hostitele, tak jako v jiných experimentech (Presidente a kol., 1975; Foreyt a Todd, 1976; Foreyt, 1979ab; Chauvin a kol., 1995; Foreyt, 1996b; Phiri a kol., 2007).

Doba experimentu byla stanovena na 12 a 15 týdnů (Swales, 1935; Cebán-Hernández a kol., 2012), během které juvenilní motolice obvykle dosáhnou jaterní tkáně a začnou dospívat. Jelikož nalezená motolice byla nedospělá (experiment 1), je otázkou, zda tato doba nebyla krátká, jelikož u králíků je známá velmi dlouhá migrace břišní dutinou, než dosáhnou jater – více než 4 měsíce (Swales, 1935). Na druhou stranu je zdokumentována i velmi krátká doba potřebná pro dosažení jater, např.: u jelence běloocasého byly již po 2 týdnech od infekce nalezeny v játrech nedospělé motolice (Presidente a kol., 1980).

Před započítáním samotného experimentu byly na základě prostudované literatury

vybrány různé měřitelné parametry, které odráží přítomnost parazita v hostiteli. Důležitým faktorem těchto kvalitativně i kvantitativně měřitelných parametrů byla především možnost jejich stanovení v průběhu infekce (tzn. intravitálně během života hostitele). Speciální pozornost byla věnována nejen parametrům, které mohou sloužit k přímé diagnostice (vyšetření trusu, změření hladin protilátek), ale také jako doprovodný odraz celkového zdravotního stavu jedince, především odrážející míru poškození jaterní tkáně (Murray a kol., 2002).

Jeden ze sledovaných parametrů odrážejících celkový stav jedince byla hmotnost, konkrétněji váhový přírůstek. Je známo, že při infekci motolicí *F. magna* může docházet ke snížení váhového přírůstku či k poklesu celkové hmotnosti (Erhardová-Kotrlá, 1971; Foreyt, 1992, 1996a; Špakulová a kol., 2003), která může vyústit až v anorexii (Rajský a kol., 2002). Na druhou stranu existují i záznamy o silných infekcích motolicí *F. magna*, které neměly zásadní vliv na hmotnost hostitelů (Foreyt a Todd, 1979; Conboy a Stromberg, 1991). V tomto případě se jednalo o experimentálně infikovaného tura domácího (Conboy a Stromberg, 1991) nebo o experimentálně infikovaného specifického definitivního hostitele, jímž byl jelenec běloocasý ((Foreyt a Todd, 1979). V našich experimentech s králíky jsme nezaznamenali žádné změny v přibývání na váze mezi infikovanými a neinfikovanými králíky, a to ani u úspěšně infikovaného králíka K5 z prvního experimentu. Toto lze vysvětlit tak, že tento králík, i přes značné poškození jaterní tkáně, byl stále v dobrém zdravotním stavu a díky stálému příjmu vyvážené potravy neměl problémy daný deficit vyrovnat.

V průběhu experimentů bylo prováděno také základní korpologické vyšetření (sedimentace a flotace), a to jak za účelem zachycení eventuálních vajíček motolic, tak doprovodných parazitárních infekcí. U králíků je běžná přítomnost kokcií a roupi (Griffiths, 1971). Oba druhy těchto parazitů jsou však lokalizováni ve střevě (kromě jaterní kokcie *Eimerie stiedai*) a pokud se intenzita nákazy drží na nízké úrovni, tak by přítomnost těchto druhů neměla zásadně zkreslovat parametry měření (Griffiths, 1971; Papeschi a kol., 2013). Na druhou stranu Hana a kol. (2011) uvádí, že nalezený mírně patogenní druh *Eimeria magna*, může ovlivnit některé parametry, jako je hmotnost (↓), hematokrit (↓) a hladina jaterního enzym ALP (↑). Ani u jednoho z těchto parametrů však nebyla v průběhu našeho experimentu zaznamenána žádná změna. Infikovaní králíci nebyli na kokcidiózu léčeni z důvodu obavy z možného vlivu přípravku na úspěšnost uchycení a přežívání motolic.

V prvním experimentu byly ke konci pokusu nalézány u všech králíků roupi

(*Passalurus* sp.) a u většiny (4 z 6) kokcií rodu *Eimeria*. Jelikož oocysty eimerií nebyly nalezeny u všech králíků, můžeme uvažovat nejen o pozitivitě/negativitě daných králíků, ale také o možnosti nepravidelného vylučování oocyst, která je u kokcií známá (Gallazzi, 1977; Nosal a kol., 2006). Je zajímavé, že nejvyšší počet oocyst byl zaznamenán právě u králíků K2 a K5, kteří vykazovali zvýšenou imunitní odpověď proti motolici *F. magna* tvorbou protilátek IgG. Tyto výsledky mohou naznačovat, že se obě infekce (kokciemi a motolicemi) mohou vzájemně ovlivňovat (Christensen a kol., 1987).

Ve druhém experimentu byl zaznamenán opačný trend, kdy bylo v trusu vyšetřovaných králíků již od počátku experimentu zaznamenáváno velké množství eimerií (až 3×10^5 OPG). Hodnota OPG měla v průběhu experimentu klesající trend, až oocysty zcela vymizely. Tyto výsledky mohou souviset s rozvojem imunitního systému sledovaných králíků v čase (Gomez-Bautista a kol., 1987; Pakandl, 2009), a také s přechodem infekce do latentní fáze (Papeschi a kol., 2013). Právě Papeschi a kol. (2013) uvádí snižující se uvolňování oocyst od maximální hodnoty OPG kolem 50. dne od narození (necelé 2 měsíce) až po úplné vymizení do 4. měsíce věku, což přibližně odpovídá trendu v našem druhém experimentu.

Nálezy roupů (*Passalurus* sp.) v průběhu experimentů měly oproti kokciím opačný trend, v trusu byli roupi nalezeni až později po zahájení experimentů, což naznačuje pravděpodobnou infekci z chovného prostředí. Roupi jsou velmi častými parazity právě v laboratorních chovech králíků (Sparrow, 1976; Rinaldi a kol., 2007).

Podobně jako v pracích zaměřených na sledování průběhu infekce u *F. hepatica*, např. Chauvin a kol. (1995) a Clery a kol. (1996), byly měřeny hodnoty časných a pozdních protilátek, kdy byla využita optimalizovaná nepřímá ELISA metoda. Jako antigen byly použity E/S produkty z dospělců *F. magna*. Výsledky z prvního experimentu jasně ukazují zvýšený nárůst IgM u infikovaného králíka K5, u něhož byla nakonec při pitvě nalezena jedna živá motolice *F. magna* a značně poškozená játra. Nárůst hodnot IgM koreluje také s výsledky experimentů infikovaných potkanů a ovcí motolicí *F. hepatica* (Poitou a kol., 1993; Chauvin a kol., 1995). I v případě IgG došlo v průběhu experimentu k nárůstu hodnot u králíka K5 a k mírnému nárůstu i u králíka K2, u něhož při pitvě motolice nalezena nebyla. Zřejmě se v tomto případě projevila pouze částečná kompatibilita parazita s hostitelem a infekce byla pravděpodobně potlačena imunitním systémem. Zajímavé rovněž je, že došlo ke zvýšení hladin pouze protilátek IgG nikoli však IgM. K takovému výsledku však dospěl i Clery a kol. (1996), který u úspěšně infikovaného skotu změřil signifikantní nárůst pouze

IgG, nikoliv IgM. Během druhého experimentu byly hladiny protilátek IgG zvýšené u všech králíků, kteří byli vystaveni 300 MC. Králíci, kteří byli infikováni jen 150 MC, nevykazovali žádné změny oproti negativním kontrolám. Je tedy pravděpodobné, že u králíků vystavených dávce 300 MC došlo také ke krátkodobému vývoji a migraci juvenilních motolic, které však opět nedosáhly jater a brzy uhynuly. Tuto domněnku podporuje i zjištění, že u králíků vystavených dávce 150 MC nebyly zaznamenány žádné změny v hladině protilátek IgM a IgG, ani během pitvy nebyly zaznamenány žádné patologické změny tkání hostitele. Protilátky IgM byly u 2 z 3 králíků vystavených 300 MC (tj. K4 a K5) zvýšeny pouze krátkodobě. Krátkodobé zvýšení IgM je také závislé na poločasů odbourávání z těla, které je rychlejší než u IgG protilátek (Murray a kol., 2002).

Hematokrit nebyl u žádného králíka změněn, což odpovídá zjištění, že žádný z králíků nevykazoval známky anémie. U neúspěšně infikovaných králíků je pochopitelné, že anémií trpět nemohli, ale u králíka K5 z prvního experimentu, u něhož byla nalezena živá motolice a zjištěna poškozená játra, případně také u králíka K5 z druhého experimentu s lehce poškozenými játry, je s podivem, že také nevykazovali sebemenší změny poměru červených krvinek k plazmě. S největší pravděpodobností poškození nebylo nakolik rozsáhlé, aby se daná ztráta krve při vnitřním krvácení projevila v hodnotách hematokritu.

Výrazná eozinofilie byla opět zaznamenána u králíka K5 z prvního experimentu a dočasné zvýšení počtu eozinofilů vykazovali také králíci K4 a K5 z druhého experimentu, kteří byli vystaveni infekční dávce 300 MC a u kterých byl zaznamenán nárůst protilátek nejen IgG, ale i IgM. Tyto souvislosti opět podporují hypotézu, že tělem králíků K4 a K5 z druhého experimentu po určitou dobu motolice migrovaly.

Poslední velmi důležitou skupinou měřených parametrů odrážející aktivitu parazita v játrech jsou především hodnoty jaterních enzymů. Veškeré biochemické parametry byly stanovovány na specializovaných pracovištích, neboť vybavení pro takovou analýzu není v naší laboratoři dostupné. V prvním experimentu byly měřeny parametry z plazmy, kde byl jako antikoagulant přidáván heparin. Postupně bylo zjištěno, že přídavek heparinu zkresluje měření bilirubinu, který byl opakovaně měřen v hodnotách 0 $\mu\text{mol/l}$, přestože by se jeho fyziologické hodnoty u králíka měly pohybovat v intervalu 3,4 – 8,5 $\mu\text{mol/l}$ (medirabbit.com). Když byla provedena porovnávací zkouška různých antikoagulantů a séra ze stejného vzorku bez antikoagulantu, byl prokázán značný vliv aditiv (Tab. 16).

Tab. 16: Naměřené odlišné hodnoty bilirubinu ze stejného vzorku s jinými aditivy

vzorek	naměřená hodnota
s heparinem	0 $\mu\text{mol/l}$
s EDTA	0,8 $\mu\text{mol/l}$
sérum	4,7 $\mu\text{mol/l}$

V prvním experimentu byly parametry měřeny průběžně v časových odstupech 2 – 4 týdnů, zatímco ve druhém experimentu byly parametry měřeny najednou po získání všech vzorků. Tímto bylo eliminováno možné zkreslení hodnot při použití analyzátoru v různých časech a za jiných podmínek (vlhkost, teplota, kalibrace přístroje). Do doby analýzy byly vzorky uchovávány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ne všechny měřené parametry odrážejí přímo poškození jaterní tkáně, ale některé z nich pouze dokreslují celkový zdravotní stav hostitele (např. globuliny, kreatinin, kyselina močová, glukóza). Toto široké spektrum parametrů bylo zvoleno nejen na základě literatury (Stromberg a kol., 1985; Vengušt a kol., 2003; Matanovič a kol., 2007; Severin a kol., 2011), ale také z nastavení analyzátorů, kdy bylo optimálnější změřit větší množství parametrů. Hodnoty biochemických parametrů, především jaterních enzymů, nebyly u většiny králíků změněny, což lze vysvětlit tím, že k žádnému poškození jater nedošlo. Nejnáchylnější na patologické působení parazita v játrech, např. *F. hepatica*, je dle literatury GLDH (Chauvin a kol., 1995; Ferre a kol., 1997; Yang a kol., 1998; Bossaert a kol., 2000; Raadsma a kol., 2007; Phiri a kol., 2007). V této souvislosti existuje pouze jediná publikace pojednávající o nárůstu GLDH u přirozeně infikovaných jelenů motolicí *F. magna* (Severin a kol., 2011). Dalším mírně se zvyšujícím parametrem u králíka K5 byla hladina celkových globulinů, což odpovídá nárůstu změřených protilátek ELISA metodou. K navýšení globulinů došlo i během experimentální infekce jelence běloocasého motolicí *F. magna* (Foreyt a Todd, 1979) či motolicí *F. hepatica* (Presidente a kol., 1975).

Dalšími důležitými projevy poškození jater jsou zvýšené hodnoty GMT, AST, ALT, ALP a LD, jejichž změna však nebyla ani u králíka K5 z prvního experimentu zaznamenána. Změna těchto parametrů byla zaznamenána u přirozené infekce jelenů motolicí *F. magna*, kde byly játra značně poškozená díky přítomnosti velkého množství motolic, docházelo k enormnímu navýšení GMT, AST, ALT a LD (Severin a kol., 2011). V našem experimentu (nález jedné motolice) k takovému rozsáhlému poškození jater nedošlo. Jsou však známy i experimenty, kde i přes úspěšnou infekci motolicí *F. magna* nebyly naměřeny změny

v jaterních enzymech, např. hladina AST se nezměnila u infikovaných jelenců běloocasých (Presidente a kol., 1975), skotu (Conboy a Stromberg, 1991), ovcí (Stromberg a kol., 1985). Pouze u experimentálně infikovaných morčat motolicí *F. magna* došlo k významnému zvýšení hladiny AST (Conboy a Stromberg, 1991). Ani v případě GMT nebyl zaznamenán nárůst u infikovaného skotu, morčat (Conboy a Stromberg, 1991) a ovcí (Stromberg a kol., 1985). I v případě infekcí motolicí *F. hepatica* byly odhaleny různé hladiny zmiňovaných enzymů, např. AST se u infikovaných jelenců běloocasých zvyšovala a ALT byla beze změny (Presidente a kol., 1975), avšak u infikovaných daňků tomu bylo právě naopak (Vengušt a kol., 2003).

Na základě publikovaných údajů a také našich zjištění vyplývá, že změna hladin biochemických parametrů sice odráží míru poškození jaterní tkáně a může sloužit ke sledování průběhu, v optimalizované podobě snad i diagnostice onemocnění, avšak významnou roli hraje značná druhová variabilita a také aktuální stav imunitního systému jedince.

Z výše diskutovaných výsledků se zdá být také patrné, že králík za těchto podmínek není vhodným hostitelem pro vývoj a reprodukci motolice *F. magna* nebo že pravděpodobnost nákazy je velmi nízká. Tomuto zjištění odpovídá i experimentální infekce králíka Foreytem (1979a), kdy infikoval 3 králíky 70 MC, přičemž po uplynutí teoretické prepatentní periody (60+ dní) pouze 2 z nich obsahovali jednu motolici. Taková „úmrtnost“ MC mohla být způsobena různými faktory, avšak velmi pravděpodobnou se zdá být poměrně nízké pH žaludku králíka (1 – 2) (Davies a Davies, 2003) oproti typickým přežvýkavým hostitelům jako je skot nebo ovce, kde pH předžaludků je v rozmezí 5,5 – 7 (Chilliard a kol., 2009) a slezu 2 – 3 (Ash, 1959). Například pH žaludku jelena wapiti je 2,5 (Waldrup a Mackintosh, 1993). Většina metacerkárií tak mohla být eliminována již v žaludku a jen zlomek z nich mohlo mít šanci penetrovat stěnu střeva a pokračovat tělní dutinou do jater.

Na druhou stranu naše neúspěšnost infikovat králíky mohla spočívat i v kvalitě MC, které mohly mít sníženou schopnost se vyvinout v hostiteli. Jedním z důvodů mohla být snížená životaschopnost v důsledku dlouhodobějšího uskladnění (1-7 měsíců). Toto je však nepravděpodobné, jelikož pro různé publikované experimentální infekce byly použity MC 5 měsíců staré (Ferre a kol., 1997; Martínez-Moreno a kol., 1999). A dokonce Griffiths a Christensen (1974) uvádí, že v experimentu úspěšně použili MC staré 393 dní (skladovány ve 4 °C). V neposlední řadě by mohla být snížená úspěšnost experimentální infekce vysvětlena také snížením odolnosti MC vzniklé během manipulace před inokulací (počítání,

výběr, přesuny, odejmutí od stěny Petriho misky). Nezanedbatelným faktorem je způsob podání metacerkárií, během kterého i přes důkladnou imobilizaci hostitele a kontrolu prázdné špičky mohlo dojít ke spolknutí jen části infekční dávky. Toto by se dalo v příštích experimentech řešit vpravením infekční dávky do želatinové kapsle, která by byla podána na kořen jazyka králíka.

7. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá experimentální infekcí králíka (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) motolicí *Fascioloides magna*, během kterých byly sledovány různé kvalitativní a kvantitativní projevy interakce mezi parazitem a hostitelem.

Dosažené výsledky:

- Na základě dostupné literatury byly vybrány měřitelné parametry, které odráží přítomnost motolice *Fascioloides magna* v experimentálně infikovaném hostiteli, v našem případě králíkovi (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*). Konkrétně se jednalo o hmotnost, koprologické vyšetření, stanovení protilátkové odpovědi, hematokrit, krevní obraz, stanovení hladin jaterních enzymů, krevních metabolitů a dalších složek.
- V prvním experimentu se podařilo úspěšně infikovat jednoho králíka (dávka 50 MC), u něhož byla při pitvě zaznamenána značně poškozená játra, v nichž byla nalezena jedna nedospělá motolice. V druhém experimentu nebyly v králících infikovaných dávkou 150 ani 300 MC nalezeny žádné motolice, pouze jeden králík měl mírně poškozená játra.
- Z měřených parametrů z obou experimentů nebyly stanoveny změny u žádného králíka v hmotnosti a hematokritu. U všech ostatních analýz byly zaznamenány tyto výsledky:
 - Z vyšetření trusu sedimentační a flotační metodou byly zaznamenány vajíčka roupa *Passalurus sp.* a oocysty *Eimeria spp.* v obou experimentech. U eimérií byla stanovena hodnota OPG a určeny konkrétní druhy (*E. magna*, *E. perforans*).
 - Vývoj protilátek IgG a IgM byl pozorován v obou experimentech, avšak nikoliv u všech králíků vystavených infekční dávkou. Kromě výrazného zvýšení u úspěšně infikovaného králíka K5 byly protilátky zvýšené i u

jiných, neúspěšně infikovaných, králíků, u kterých nejspíše došlo k potlačení infekce.

- Zvýšená hladina eozinofilů byla zaznamenána opět u úspěšně infikovaného králíka K5, avšak i u dalších králíků (K4, K5) z druhého experimentu, kteří kromě zvýšené hladiny IgG měli zvýšenou hladinu i IgM, což opět značí aktivitu imunitní odpovědi proti motolici *F. magna*. U jiných typů leukocytů nedošlo ke změně jejich počtu.
- Ze všech biochemických parametrů došlo k nárůstu pouze dvou hodnot - GLDH a globulinů, a to opět u úspěšně infikovaného králíka K5. Zvýšená koncentrace GLDH v séru odráží značné poškození jaterní tkáně a hladina globulinů tvorbu protilátek.
- Fascioloidóza způsobuje u králíků měřitelnou buněčnou i humorální imunitní odpověď a pokud dosáhne motolice jater, kde způsobí poškození, dojde i ke změnám hladin především jaterních enzymů. Úspěšnost infekce králíků byla velmi nízká a žádná pohlavně dospělá motolice nebyla zaznamenána. To znamená, že králík zřejmě není vhodným definitivním hostitelem, který by sloužil jako rezervoár infekce motolice *F. magna*, jak je tomu u příbuzné motolice *F. hepatica*.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1. LF UK	1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
APC	antigen prezentující buňky
AST	aspartátanimotransferáza
CRP	c-reaktivní protein
ČZU	Česká zemědělská univerzita
DB / TB	přímý bilirubin / celkový bilirubin
E/S produkty	exkrečně-sekreční produkty
EDTA	antikoagulant kyselina ethylendiamintetraoctová
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EPG	počet vajíček na gram trusu
GMT	gama-glutamyltransferáza
HCT	hematokrit
HGB	množství hemoglobinu
K1 - K10	označení králíků z druhého experimentu
K1 - K6	označení králíků z prvního experimentu
LD	laktátdehydrogenáza
MC	metacerkárie
NZW	novozélandský bílý
OPG	počet oocyst na gram trusu
PBS-T	fosfátový pufr s 0,05% Tween 20
PřF UK	Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze
RBC	počet červených krvinek
SPF	specific patogen free
SZÚ	Státní zdravotní ústav
TAG	triacylglyceroly
TP	celkové proteiny
UA	kyselina močová
VÚŽV	Výzkumný ústav živočišné výroby
WBC	počet bílých krvinek

Publikace vzniklé v průběhu vypracování diplomové práce:

Siegelová V., Pankrác J., Košťáková M., Melounová K., Siegel T., Leontovyč R., Kašný, M., 2012. Nález motolice obrovské (*Fascioloides magna*) u skotu a zhodnocení rizik fascioloidózy v České republice. Veterinářství, 7: 440 – 443.

Leontovyč R., Košťáková M., Siegelová V., Melounová K., Pankrác J., Vrbová K., Horák P., Kašný M., 2014. Highland cattle and *Radix labiata*, the hosts of *Fascioloides magna*. BMC Veterinary Research, 10: 1 – 7.

9. SEZNAM LITERATURY

Anděra M., Červený J., 2008. Změny v rozšíření králíka divokého (*Oryctolagus cuniculus*) na území České republiky (Lagomorpha: Leporidae). Lynx, series nova, 39: 5 – 23.

Anh N. T., Phuong N. T., Ha G. H., Thu L. T., Johansen M. V., Murrell D. K., Thamsborg S. M., 2008. Evaluation of techniques for detection of small trematode eggs in faeces of domestic animals. Veterinary Parasitology, 156: 346 – 349.

Ash R. W., 1959. Inhibition and excitation of reticulo-rumen contractions following the introduction of acids into the rumen and abomasum. The Journal of Physiology, 147: 58 – 73.

Bauer B. U., Pomroy W. E., Gueydon J., Gannac S., Scott I., Pfister K., 2010. Comparison of the FLOTAC technique with the McMaster method and the Baermann technique to determine counts of *Dictyocaulus eckerti* L1 and strongylid eggs in faeces of red deer (*Cervus elaphus*). Parasitology Research, 107: 555 – 560.

Bossaert K., Farnin F., Leclipteux T., Protz M., Lonneux J-F., Losson B., 2000. Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with *Fasciola hepatica*. Veterinary Parasitology, 87: 103 – 123.

Cameron A. E., 1923. Notes on buffalo: Anatomy, pathological conditions, and parasites. British Veterinary Journal, 79: 331–336.

Campbell W. C., 1960. Nature and possible significance of the pigment in fascioloidiasis. The Journal of Parasitology, 46: 769 – 775.

Carnevale S., Rodríguez M. I., Guarnera E. A., Carmona C., Tanos T., Ange S. O., 2001. Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cystein proteinase. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 41: 43 – 49.

Cebán-Hernández K., Gaudier J. F., Espino A. M., 2012. Characterization and differential expression of a ferritin protein from *Fasciola hepatica*. Molecular and Biochemical Parasitology, 182: 54 – 61.

Clery D., Torgerson P., Mulcahy G., 1996. Immune responses of chronically infected adult cattle to *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 62: 71 – 82.

Conboy G. A., O'Brien T. D., Stevens D. L., 1988. A natural infection of *Fascioloides magna* in a llama (*Lama glama*). *The Journal of Parasitology*, 74: 345 – 346.

Conboy G. A., Stromberg B. E., 1991. Hematology and clinical pathology of experimental *Fascioloides magna* infection in cattle and guinea pigs. *Veterinary Parasitology*, 40: 241 – 255.

Cornelissen J. B. W. J., Gaasenbeek C. P. H., Borgsteede F. H. M., Holland W. G., Harmsen M. H., Boersma W. J. A., 2001. Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant *Fasciola hepatica* cathepsin L - like protease. *International Journal for Parasitology*, 31: 728 – 737.

Coudert, P., Licois D., Drouet-Viard F., 1995. Eimeria species and strains of rabbits. In *Guidelines on techniques in coccidiosis research*. COST, 820: 52 – 73.

Dalton J. P., O'Neill S. O., Stack C., Collins P., Walshe A., Sekyia M., Doyle S., Mulcahy G., Hoyle D., Khaznadji E., Moiré N., Brennan G., Mousley A., Kreshchenko N., Maule A. G., Donnelly S. M., 2003. *Fasciola hepatica* cathepsin L - like proteases: biology, function, and potential in the development of first generation liver fluke vaccines. *International Journal for Parasitology*, 33: 1173 – 1181.

Dalton J. P., Skelly P., Halton D. W., 2004. Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic platyhelminths. *Canadian Journal of Zoology*, 82: 211 – 232.

Davies R. R., Davies J. A. R., 2003. Rabbit gastrointestinal physiology. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 6: 139 – 153.

Demiaszkiewicz A. W., Kuligowska I., Pyziel A. M., Lachowicz J., Kowalczyk R., 2015. Extension of occurrence area of the american fluke *Fascioloides magna* in south-western Poland. *Annals of Parasitology*, 61: 93 – 96.

Dixon K. E., 1966. A morphological and histochemical study of cystogenic cells of the cercaria *Fasciola hepatica* L. *Parasitology*, 56: 287 – 297.

Donner L., 1985. Klinická hematologie. 1. vyd. Praha: Avicenum, 448 s. *

Dorman S. E., Hatem C. L., Tyagi S., Aird, K., Lopez-Molina J., Pitt, M. L. M., Manabe Y. C., 2004. Susceptibility to tuberculosis: clues from studies with inbred and outbred New Zealand White rabbits. *Infection and Immunity*, 72: 1700 – 1705.

Doubek J., Bouda J., Doubek M., Fűrll M., Knotková Z., Pejřilová S., Pravda D., Scheer P., Svobodová Z., Vodička R., 2003. Veterinární hematologie. Brno, 464 s. *

Doubek J., Šlosárková S., Řeháková K., Scheer P., Beránková J. 2007. Interpretace základních biochemických a hematologických nálezů u zvířat. Brno, 78 s. *

El Ridi E., Salah M., Wagih A., William H., TallimaH., El Shafie M. H., Abdel Khalek T., El Amir A. Abo Ammou F. F., Motawi H., 2007. *Fasciola gigantica* excretorysecretory products for immunodiagnosis and prevence of sheep fasciolosis. *Veterinary Parasitology*, 149: 219 – 228.

Erhardová-Kotrlá B., 1971. The occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in Czechoslovakia. Academia, Prague, 155 s.

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.

Faust E. C., D'Antoni J. S., Odom V., Miller M. J., Peres Ch., Sawitz W., Thomen L. F., Tobie J., Walker J. H., 1938. A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18, 169 – 183.

Faust E. C., Sawitz W., Tobie J., Odom V., Peres Ch., Lincicome D. R., 1939. Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. *The Journal of Parasitology* 25, 241 – 262.

Ferre I., Ortega-Mora L. M., Rojo-Vázquez A., 1997. Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Veterinary Parasitology*, 68: 261 – 267.

Flégr J., Svobodová M., 2007. Helminthologie. Ve: Paraziti a jejich biologie, Wolf P., Horák P. a kol., Triton, 319 s. *

Foreyt W. J., 1979. *Fascioloides magna*: development in selected nonruminant mammalian hosts. *Experimental Parasitology*, 47: 292 – 296.

Foreyt W. J., 1990. Domestic sheep as a rare definitive host of the large American liver fluke *Fascioloides magna*. *The Journal of Parasitology*, 76: 736 – 739.

Foreyt W. J., 1992. Experimental *Fascioloides magna* infections of mule deer (*Odocoileus hemionus hemionus*). *The Journal of Wildlife Diseases*, 28: 183 – 187.

Foreyt W. J., 1996a. Mule deer (*Odocoileus hemionus*) and elk (*Cervus elaphus*) as experimental definitive hosts for *Fascioloides magna*. *The Journal of Wildlife Diseases*, 32: 603 – 606.

Foreyt W. J., 1996b. Susceptibility of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) to experimentally - induced *Fascioloides magna* infections. *The Journal of Wildlife Diseases*, 32: 556 – 559.

Foreyt W. J., 2009. Experimental infection of Bighorn sheep with liver fluke (*Fasciola hepatica*). *The Journal of Wildlife Diseases*, 45: 1217 – 1220.

Foreyt W. J., Drew M. L., 2010. Experimental infection of liver flukes, *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna*, in bison (*Bison bison*). *The Journal of Wildlife Diseases*, 46: 283 – 286.

Foreyt W. J., Leathers C. W., 1980. Experimental infection of domestic goats with *Fascioloides magna*. *American Journal of Veterinary Research*, 41: 883 – 884.

Foreyt W. J., Parish S., 1990. Experimental infection of liver flukes (*Fascioloides magna*) in a llama (*Lama glama*). *The Journal of Zoology and Wildlife Medicine*, 21: 468 – 470.

Foreyt W. J., Samuel W. M., Todd A. C., 1977. *Fascioloides magna* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): Observations on the paging tendency. *The Journal of Parasitology*, 63: 1050 – 1052.

Foreyt W. J., Todd A. C., 1973. Action of oxyclozanide against adult *Fascioloides magna*

infections in white-tailed deer. *The Journal of Parasitology*, 59: 208 – 209.

Foreyt W. J., Todd A. C., 1975. *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in feral swine from southern Texas. *The Journal of Wildlife Diseases*, 11: 554 – 559.

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., 1979. Selected clinicopathologic changes associated with experimentally induced *Fascioloides magna* infection in white-tailed deer. *The Journal of Wildlife Diseases*, 15: 83 – 89.

Fried B., Stromberg B. E., 1985. In vitro excystment of metacercariae of *Fascioloides magna*. *The Journal of Parasitology*, 71: 263 – 264.

Gallazzi D., 1977. Cyclical variations in the excretion of intestinal coccidial oocysts in the rabbit. *Folia Veterinaria Latina*, 7: 371 – 380. *

Gomez-Bautista M., Rojo-Vazquez F. A., Alunda J. M., 1987. The effect of host's age on the pathology of *Eimeria stiedai* infection in rabbit. *Veterinary Parasitology*, 24: 47 – 57.

Griffiths H. J., 1971. Some common parasites of small laboratory animals. *Laboratory Animals*, 5: 123 – 135.

Griffiths H. J., Christensen C. A., 1974. Further observations on the survival of metacercariae of *Fascioloides magna* in water at room temperature and under refrigeration. *The Journal of Parasitology*, 60: 335.

Hana A., Salasia S. I. O., Mangkoewidjojo S., Kusindarto D. L., 2011. Blood profile of rabbits infected with *Eimeria magna*. *Animal Production*, 13: 185 – 190.

Henriksen S. A., Aagaard K. A., 1976. A simple flotation and McMaster method. *Nordisk Veterinaermedicin*, 28: 392 – 397.

Hewitt C. D., Innes D. J., Savory J., MR Wills M. R., 1989. Normal biochemical and hematological values in New Zealand white rabbits. *Clinical Chemistry*, 35: 1777 – 1779.

Hodžić A., Zuko A, Avdić R., Alić A., Omeragić J. and Jažić A., 2013. Influence of *Fasciola hepatica* on serum biochemical parameters and vascular and biliary system of sheep liver. The Iranian Journal of Parasitology, 8: 92 – 98.

Horák P., Mikeš L., 2007. Helmintologie. Ve: Paraziti a jejich biologie, Wolf P., Horák P. a kol., Triton, 319 s. *

Hořejší V., Bartůňková J., 2005. Základy imunologie. 3. vyd. Praha: Triton, s.r.o. 279 s. *

Hurtrez-Bousses S., Meunier C., Durand P., Renaud F., 2001. Dynamics of host - parasite interaction: the example of population biology of the liver fluke (*Fasciola hepatica*). Microbes and Infection, 3: 841 – 849.

Chauvin A., Bouvet G., Boulard Ch., 1995. Humoral and cellular immune responses to *Fasciola hepatica* experimental primary and secondary infection in sheep. International Journal for Parasitology, 25: 1227 – 1241.

Chauvin A., Moreau E., Boulard Ch., 2001. Responses of *Fasciola hepatica* infected sheep to various infection levels. Veterinary Research, 32: 87 – 92.

Chilliard Y., Doreau M., Veissier I., Bocquier F., 2009. Ruminant physiology; digestion, metabolism and effects of nutrition on reproduction and welfare. Wageningen Academic Publishers, 864 s. *

Christensen N. Ø., Nansen P., Fagbemi B. O., Monrad J., 1987. Heterologous antagonistic and synergistic interactions between helminths and between helminths and protozoans in concurrent experimental infection of mammalian hosts. Parasitology Research, 73: 387 – 410.

Chroust K., Chroustová E., 2004. Motolice obrovská (*Fascioloides magna*) u spárkaté zvěře v jihočeských lokalitách. Veterinářství, 54: 296 – 304.

Chroustová E., Hůlka J., Jaroš J., 1980. Prevence a terapie fascioloidózy skotu bithionolsulfoxidem. Veterinární Medicína, 25: 557 – 563.

Joslin J. O., 2009. Blood collection techniques in exotic small mammals. Journal of Exotic Pet Medicine, 18: 117 – 139.

Kaufmann J., 1996. Parasitic infections of domestic animals. A diagnostic manual. Birkhäuser Basel, Boston, Berlin, Germany, 423 s.

Kennedy M. J., Acorn R. C., Moraiko D. T., 1999. Survey of *Fascioloides magna* in farmed wapiti in Alberta. The Canadian Veterinary Journal, 40: 252 – 254.

Kingscote A. A., 1950. Liver rot (fascioloidiasis) in ruminants. The Canadian Journal of Comparative Medicine, 14: 203 – 208.

Kotrlá B., Černý V., Kotrlý A., Minář J., Ryšavý B., Šebek Z., 1984. Parazitózy zvěře. Academica, 192 s. *

Kozák T., 2001. Vnitřní lékařství: Hematologie. Praha: Galén, Karolinum, 230 s. *

Krull W. H., 1933. A new intermediate hosts for *Fascioloides magna*. Science, New Series, 78: 508 – 509.

Lankester M. V., 1974. *Parelaphostrongylus tenuis* (Nematoda) and *Fascioloides magna* (Trematoda) in moose of southeastern Manitoba. Canadian Journal of Zoology, 52: 235 – 239.

Leontovyč R., Košťáková M., Siegelová V., Melounová K., Pankrác J., Vrbová K., Horák P. and Kašný M., 2014. Highland cattle and *Radix labiata*, the hosts of *Fascioloides magna*. BMC Veterinary Research 10: 1 – 7.

Lester V. K., Tarpley H. L., Latimer K. S., 2005. Small mammal hematology: Leukocyte identification in rabbits and guinea pigs. Dept. of pathology (tarpley, latimer) college of veterinary medicine. University of Georgia, Athens. Presented at Veterinary Clinical Pathology Clerkship Program [Online]: <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/lester>. *

Lofty W. M., Brant S. V., DeJong R. J., Hoa Le T., 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.

Lotfollahzadeh S., Mohri M., Bahadori S. R., Dezfouly M. R., Tajik P., 2008. The relationship between normocytic, hypochromic anaemia and iron concentration together

with hepatic enzyme activities in cattle infected with *Fasciola hepatica*. The Journal of Helminthology, 82: 85 – 88.

Maggioli G., Silveira F., Martín-Alonso J. M., Salinas G., Carmona C., Parra F., 2011. A recombinant thioredoxin-glutathione reductase from *Fasciola hepatica* induces a protective response in rabbits. Experimental Parasitology, 129: 323 – 330.

Majoros G., Sztojkov V., 1994. Appearance of the large American liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) (Trematoda: Fasciolata) in Hungary. Parasitologia Hungarica, 27: 27 – 38.

Martínez-Moreno A., Jiménez-Luque V., Moreno T., Redondo E. S. H., Martín de las Mulas J., Pérez J., 1999. Liver pathology and immune response in experimental *Fasciola hepatica* infections of goats. Veterinary Parasitology, 82: 19 – 23.

Matanović K., Severin K., Martinković F., Šimpraga M., Janicki Z., Barišić J., 2007. Hematological and biochemical changes in organically farmed sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. Parasitology Research, 101: 1657 – 1661.

McClanahan S. L., Stromberg B. E., Hayden D. W., Averbek G. A., Wilson J. H., 2005. Natural infection of a horse with *Fascioloides magna*. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 17: 382 – 385.

Moore D. M., 2000. Hematology of rabbits and hematology of the guinea pig. In: Feldman B. F., Zinkl J. G., Jain N. C., Schlam's Veterinary Hematology, 5th ed, Lippincott Williams a Wilkins, 1100 – 1110. *

Murray R. K., Granner D. K., Mayes P. A., Rodwell V. W., 2002. Harperova biochemie. H+H, 4. vydání, 871 s. *

Nansen P., Andersen S., Hesselholt M., 1975. Experimental infection of the horse with *Fasciola hepatica*. Experimental Parasitology, 37: 15 – 19.

Nosal P., Petryszak A., Nowosad B., Sobolewska M., 2006. Gastrointestinal parasites of rabbits in coproscopic investigations. Wiadomosci Parazytologiczne, 52: 327 – 330. *

Novobilský A., Horáčková E., Hirtová L., Modrý D., Koudela B., 2007a. The giant liver

fluke *Fascioloides magna* (Bassi 1875) in cervids in the Czech Republic and potential of its spreading to Germany. *Parasitology Research*, 100: 549 – 553.

Novobilský A., Kašný M., Mikeš L., Kovařík K., Koudela B., 2007b. Humoral immune responses during experimental infection with *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica* in goats and comparison of their excretory/secretory products. *Parasitology Research*, 101: 357 – 364.

Olsen O. W., 1948. Wild rabbits as reservoir hosts of the common liver fluke, *Fasciola hepatica*, in southern Texas. *The Journal of Parasitology*, 34: 119 – 123.

Olsen, O.W., 1949. White-tailed deer as a reservoir host of the large American liver fluke. *Veterinary Medicine*, 44: 26 – 30.

Özkan, C., Kaya, A., Akgül, Y., 2012. Normal values of haematological and some biochemical parameters in serum and urine of New Zealand White rabbits. *World Rabbit Science*, 20: 253 – 259.

Pakandl M., 2009. Coccidia of rabbit: a review. *Folia Parasitologica*, 56: 153 – 166.

Papeschi C., Fichi G., Perrucci S., 2013. Oocyst excretion pattern of three intestinal *Eimeria* species in female rabbits. *World Rabbit Science*, 21: 77 – 83.

Paz A., Sánchez-Andrade R., Panadero R., Díez-Baños P., Morrondo P., 1998. IgG isotype specific immune response in rats infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 79: 229 – 237.

Pecka M., 2006. Laboratorní hematologie v přehledu. Fyziologie a patofyziologie krevní buňky. Finidr s.r.o., Český Těšín, 304 s. *

Pfister K., 1990. Serodiagnosis of fasciolosis in ruminants. *Revue Scientifique et Technique*, 9: 511 – 508.

Phiri I. K., Phiri A. M., Harrison L. J. S., 2007. The serum glucose and b-hydroxybutyrate levels in sheep with experimental *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* infection. *Veterinary Parasitology*, 143: 287 – 293.

Poitou I., Baeza E., Boulard C., 1993. Kinetic responses of parasite-specific antibody isotypes, blood leucocyte pattern and lymphocyte subsets in rats during primary infestation with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 49: 179 – 190.

Presidente P. J. A., McCraw B. M., Lumsden J. H., 1975. Experimentally induced *Fasciola hepatica* infection in White-tailed deer I. Clinicopathological and parasitological features. *The Canadian Journal of Comparative Medicine*, 39: 155 – 165.

Presidente P. J. A., McCraw B. M., Lumsden J. H., 1980. Pathogenicity of immature *Fascioloides magna* in white-tailed deer. *The Canadian Journal of Comparative Medicine*, 44: 423 – 432.

Pybus M. J., 2001. Liver flukes. In: Samuel W. M., Pybus M. J., Kocan A.A., *Parasitic diseases in wild mammals*. Iowa State Press, Iowa City, 121 – 149.

Raadsma H. W., Kingsford N. M., Suharyanta, Spithill T. W., Piedrafita D., 2007. Host responses during experimental infection with *Fasciola gigantica* or *Fasciola hepatica* in Merino sheep: I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection. *Veterinary Parasitology*, 143: 275 – 286.

Racek J., 2006. *Klinická biochemie*. Nakladatelství Galén, 329 s. *

Raina O. K., Yadav S. C., Sriveny D., Gupta S. C., 2006. Immuno-diagnosis of bubaline fasciolosis with *Fasciola gigantica* cathepsin - L and recombinant cathepsin L1 - D proteases. *Acta Tropica*, 98: 141 – 151.

Rajský D., Čorba J., Várady M., Špakulová M., Cabadaj R., 2002. Control of fascioloidosis (*Fascioloides magna* Bassi, 1875) in red deer and roe deer. *Helminthologia*, 39: 67 – 70.

Rieu E., Recca A., Bénet J. J., Saana M., Dorchies P., Guillot J., 2007. Reliability of coprological diagnosis of *Paramphistomum* sp. infection in cows. *Veterinary Parasitology*, 146: 249 – 253.

Rinaldi L., Russo T., Schioppi M., Pennacchio S., Cringoli G., 2007. *Passalurus ambiguus*: new insights into copromicroscopic diagnosis and circadian rhythm of egg

excretion. *Parasitology Research*, 101: 557 – 561.

Roberts H. E., 1968. Observations on experimental acute fascioliasis in sheep. *British Veterinary Journal*, 124: 433 – 450.

Ruiz A., Molina J. M., González J., Martínez-Moreno F. J., Gutiérrez P. N., Martínez-Moreno Á., 2003. Humoral response (IgG) of goats experimentally infected with *Fasciola hepatica* against cysteine proteinases of adult fluke. *Veterinary Research*, 34: 435 – 443.

Schalm O. W., 1961. *Veterinary hematology*. Ballière, Tindall a Cox, 1232 s. *

Severin, K., Mašek, T., Janicki, Z., Konjević, D., Slavica, A., Marinculić, A., Džaja, P., 2011. Liver enzymes and blood metabolites in a population of free-ranging red deer (*Cervus elaphus*) naturally infected with *Fascioloides magna*. *The Journal of Helminthology*, 86: 190 – 196.

Sinclair L. J., Wassall D. A., 1988. Sero-diagnosis of *Fasciola hepatica* infections in cattle. *Veterinary Parasitology*, 27: 283 – 290.

Smyth J. D., Halton D. W., 1983. *The physiology of trematodes*, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 445 s. *

Špakulová M., Rajský D., Vodňanský J., Sokol J., 2003. Giant liver fluke (*Fascioloides magna*), an important liver parasite of ruminants. Parpress Bratislava, 61 s.

Sparrow S., 1976. The microbiological and parasitological status of laboratory animals from accredited breeders in the United Kingdom. *Laboratory Animals*, 10: 365 – 373.

Stromberg B. E., Conboy G. A., Hayden D. W., Schlotthauer J. C., 1985. Abstrakt: Pathophysiologic effects of experimentally induced *Fascioloides magna* infection in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 46: 1637 – 1641.

Swales W. E., 1935. The life cycle of *Fascioboides inagna* (Bassi 1875) the large liver fluke of ruminants in Canada with observations on the bionomics of the larval stages and the intermediate hosts, pathology of *Fascioboides magna* and the control measures. *Canadian Journal of Research*, 12: 177 – 215.

Thacker H. L., 2002. Final diagnosis: *Fascioloides magna* in spinal cord. Purdue University, West Lafayette, Diagnostic Forum Editor, Animal Disease Diagnostic Laboratory, 406 s., www.addl.purdue.edu/newsletters/2002/fall/fall2002.pdf.

Thienpont D., Rochette F., Vanparijs O. F. J., 1980. Diagnosing helminthiasis through coprological examination. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29: 1021 s.

Ulrich K., 1930. Über das Vorkommen von seltenen oder wenig bekannten Parasiten der Säugetiere und Vögel in Böhmen und Mähren. *Prager Archiv für Tiermedizin*, 10: 19 – 43. *

Vengušt G., Klinkon M., Bidovec A., Vengušt A., 2003. *Fasciola hepatica*: effects on blood constituents and liver minerals in fallow deer (*Dama dama*). *Veterinary Parasitology*, 112: 51 – 61.

Waldrup K. A., Mackintosh C. G., 1993. A difference in abomasal pH between Canadian wapiti affected with chronic illthrift and unaffected deer. *New Zealand Veterinary Journal*, 41: 142 – 143.

Ward H. B., 1917. On the structure and classification of North American parasitic worms. *The Journal of Parasitology*, 4: 1 – 12.

Wensvoort P., Over H. J., 1982. Cellular proliferation of bile ductules and gamma-glutamyl transpeptidase in livers and sera of young cattle following a single infection with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Quarterly*, 4: 161 – 172.

Winkelmayer K., Prosl H., 2001. Riesenleberegel – jetzt auch bei uns? *Österreichisches Weidwerk*, 3: 42 – 44.

Wobeser G., Gajadhar A. A., Hunt H. M., 1985. *Fascioloides magna*: Occurrence in Saskatchewan and distribution in Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 26: 241 – 244.

Xhemollari E., Dhaskali L., Papaioannou N., Kritsepi M., 2014. Serum enzymes and hepatic changes in sheep infested with *Fasciola hepatica*. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*, 371 – 378.

Yang Q., Mao W. H., Ferre I., Bayón J. E., Mao X. Z., González-Gallego J., 1998. Plasma aspartate aminotransferase (AST), glutamate dehydrogenase (GLDH) and gamma-

glutamyl transpeptidase (GGT) activities in water buffaloes with experimental subclinical fasciolosis. *Veterinary Parasitology*, 78: 129 – 136.

Záhoř, Z., 1965. Výskyt velké motolice (*Fascioloides magna* Bassi, 1875) u srnčí zvěře. *Veterinářství*, 15: 322 – 324. *

* sekundární citace

Internetové odkazy:

www.addl.purdue.edu/newsletters/2002/fall/fall2002.pdf

www.medirabbit.com

www.vet.uga.edu/vpp/clerk/lester

