

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra parazitologie

Kultivace savčích a ptačích schistosom *in vitro*

Bakalářská práce

Lenka Houžvičková

Praha 2007

Školitel: Prof. RNDr. Petr Horák, Ph. D.

Děkuji svému školiteli Prof. RNDr. Petru Horákovi, Ph. D. za odborné vedení a dále všem členům týmu, kteří mi byli nápomocni při psaní této práce.

Také bych chtěla poděkovat svým rodičům za plnou podporu během studia na vysoké škole.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Prof. RNDr. Petra Horáka, Ph. D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala.

V Praze dne 22. 8. 2007

.....

Podpis

Abstrakt

Do čeledi Schistosomatidae patří lidské schistosomy způsobující schistosomózu, ale i široké spektrum cizopasníků zvířat (hlavně ptáků). Životní cyklus schistosom je dixenní, tedy dvouhostitelský. Mezihostitelem je vodní plž. Definitivním hostitelem bývá pták nebo savec.

In vitro kultivace schistosom pomáhají udržet životní cyklus v laboratorních podmínkách, charakterizovat vývoj a morfogenezi, a stanovit nutriční požadavky parazita. V oblasti imunodiagnostiky mohou kultivace přispět k identifikaci exkrečně-sekrečních a somatických antigenů. Schistosomy je možné kultivovat krátkodobě nebo dlouhodobě. Krátkodobé kultivace mohou usnadnit např. vývoj diagnostických metod, chemoterapeutik a vakcín. Dlouhodobé kultivace se mohou využít např. k produkci většího množství parazitů.

Abstract

The family Schistosomatidae covers not only human schistosomes, but also a wide spectrum of avian parasites. The schistosomes have a two-host life cycle. The intermediate host is a water snail and birds or mammals can serve as final host.

In vitro cultivation of schistosomes help to keep the life cycle under laboratory conditions, characterize development and morphogenesis, and determinate specific nutritional requirements of parasites. In the area of immunodiagnosis it can contribute to identification of excretory-secretory and somatic antigens. Schistosomes can be kept in short-term or long-term cultures. The short-term cultivation can facilitate e.g. the development of diagnostic methods, chemoterapeutic agents and vaccines. The long-term cultivation can applied for e.g. mass production of parasites.

Obsah

1. Úvod	6
2. Životní cyklus zástupců čeledi Schistosomatidae	7
2. 1. Morfologie jednotlivých stadií zástupců čeledi Schistosomatidae	7
2. 2. Vývoj zástupců čeledi Schistosomatidae v mezihostiteli	9
2. 2. 1. Nalezení mezihostitele	9
2. 2. 2. Penetrace miracidíí a povrchové změny sporocyst	9
2. 2. 3. Migrace a vývoj sporocyst	10
2. 3. Vývoj zástupců čeledi Schistosomatidae v definitivním hostiteli	11
2. 3. 1. Nalezení definitivního hostitele	11
2. 3. 2. Penetrace a povrchové změny cercárií	11
2. 3. 3. Migrace a vývoj schistosomul	12
2. 3. 3. 1. Migrace lidských schistosom	12
2. 3. 3. 2. Migrace viscerálních druhů rodu <i>Trichobilharzia</i>	13
2. 3. 3. 3. Migrace nazálních druhů rodu <i>Trichobilharzia</i>	14
2. 4. <i>In vitro</i> kultivace zástupců čeledi Schistosomatidae	15
2. 4. 1. <i>In vitro</i> kultivace stadií schistosom z mezihostitele	15
2. 4. 1. 1. <i>In vitro</i> transformace miracidíí	15
2. 4. 1. 2. Získání a <i>in vitro</i> kultivace sporocyst	16
2. 4. 1. 3. Tkáňová kultura	17
2. 4. 1. 3. 1. Kultura buněk členovců	17
2. 4. 1. 3. 2. Kultura buněk embrya <i>Biomphalaria glabrata</i>	18
2. 4. 1. 4. Inkubace orgánů získaných z mezihostitele	19
2. 4. 2. <i>In vitro</i> kultivace stadií schistosom z definitivního hostitele	20
2. 4. 2. 1. Penetrační techniky	20
2. 4. 2. 2. <i>In vitro</i> inkubace a transformace cercárií	21
2. 4. 2. 3. Získání a <i>in vitro</i> kultivace schistosomul	22
3. Závěr	24
4. Seznam citované literatury	25

1. Úvod

Schistosomy jsou krevní motolice z kmene Platyhelminthes, třídy Trematoda (motolice), podtřídy Digenea a čeledi Schistosomatidae.

Motolice jsou obvykle dorzoventrálně zploštělé, výjimku tvoří čeledě Schistosomatidae, Didymozoidae a Paramphistomidae. Většina zástupců této třídy jsou endoparaziti. Typickým morfologickým znakem je přítomnost přísavek (nejčastěji dvě).

Trematoda spolu s Monogenea a Cestoda patří do monofyletické skupiny Neodermata. Povrch těla této skupiny tvoří neodermis (= tegument) (kromě 1. larválního stadia). Tegument je syncytiální útvar a bývá kryt glykokalyxem. Povrch tegumentu tvoří vnější membrána (dvojitá u krevních motolic) a vrstva bezjaderné cytoplasmy. Syncytiální vrstva vysílá cytoplasmatické výběžky, jimiž se pojí k vlastním buněčným tělům obsahujícím jádro (subtegumentální buňkám). Těla subtegumentálních buněk se nachází pod lamina basalis a pod svalovými vrstvami a zasahují až do parenchymu. Svalová soustava je málo vyvinuta. Skládá se z podélné, okružní a šikmé svaloviny. Motolice nemají tělní dutiny, anus, dýchací a cévní soustavu. Naopak mají dobře vyvinutou trávicí, exkreční a rozmnožovací soustavu. Většina motolic jsou hermafroditi s výjimkou čeledí Schistosomatidae a Didymozoidae.

Do čeledi Schistosomatidae se řadí *Schistosomatium*, *Heterobilharzia*, *Schistosoma*, *Bivitellobilharzia*, *Austroilharzia*, *Orientobilharzia*, *Ornithobilharzia*, *Macrobilharzia*, *Bilharziella*, *Jilinobilharzia*, *Gigantobilharzia*, *Dendritobilharzia*, *Trichobilharzia* (Khalil 2002) a *Allobilharzia* (Kolářová a kol. 2006). Rod *Griphobilharzia* izolovaný z krokodýla byl dříve řazen též do Schistosomatidae.

Cílem této práce je shrnout poznatky o *in vitro* kultivacích schistosom, porovnat složení kultivačních médií a vývoj stadií *in vitro* a *in vivo* na vybraných zástupcích čeledi Schistosomatidae.

2. Životní cyklus zástupců čeledi Schistosomatidae

Vývojový cyklus schistosom je dixenní, tedy dvouhostitelský. Mezihostitelem (MH) je vodní plž, zde probíhá asexuální množení. Definitivním hostitelem (DH) je obratlovec (pták, savec), kde dochází k sexuálnímu rozmnožování. Rod *Trichobilharzia* se rozděluje na druhy viscerální (*T. franki*, *T. ocellata* = *T. szidati*) a nazální (*T. regenti*) v závislosti na lokalizaci dospělců v kapilárách viscerálních orgánů nebo nazální mukózy hostitele. Viscerální druhy kladou vajíčka do kapilár a tělo hostitele opouští vajíčka ve výkalech nebo moči. Při kontaktu vajíček s vodním prostředím dojde k uvolnění obrvených larválních stadií - miracidíí.

U nazálních druhů jsou deponována do nazální mukózy a k líhnutí miracidíí dochází již ve tkáni. Některá vajíčka se nedostanou do vnějšího prostředí, zůstanou uvězněna v tkáni, kde se okolo nich utvoří granulom a jsou zničena (Fried a Haseeb 1991; Horák a kol. 2002). První larvální stadium (miracidium) se volně pohybuje ve vodě. Miracidium na základě stimulů vyhledá MH. K průniku do plže dochází pomocí penetračních žláz, z nichž se uvolňují proteolytické enzymy. Během 24 hod po penetraci vzniká mateřská sporocysta. Z mateřské sporocysty vzniká dceřiná sporocysta, která později produkuje furkocerkárie. Několik stovek cercarií opouští každý den plže. Na základě chemických stimulů cercárie naleznou hostitele a penetruje kůží. Poté se přemění na schistosomulu a migruje tělem v závislosti na druhu.

2. 1. Morfologie jednotlivých stadií zástupců čeledi

Schistosomatidae

Vajíčka

Vajíčko nemá operkulum. V závislosti na druhu má různý tvar a může být opatřeno trnem.

Miracidium

Miracidia mají povrch těla složený z epidermálních destiček s ciliemi a mezibuněčných valů. Na přední části těla je apikální papila (terebratorium) s vývody penetračních žláz. Dále jsou vybavena nervovým, svalovým a exkrečním systémem a senzoryckými papilami. Nemají trávicí soustavu a jsou odkázána na zásoby glykogenu. U schistosom miracidia nejsou vybavena oční skvrnou. Uvnitř těla se nachází masa zárodečných buněk (okolo 20).

Mateřská (MS) a dceřiná sporocysta (DS)

Tvar sporocyst je proměnlivý. Povrch těla sporocyst je pokryt syncytiálním tegumentem s mikrovilli, které tvoří interdigitace s hostitelskou tkání. Živiny jsou přijímány celým povrchem a musí se dostat až k buňkám embrya cercárie (Hansen 1976a). Sporocysty mají svalovou soustavu. Tato stadia sekretují histolytické enzymy, které hydrolyzují tkáň plže. Je často obtížné rozeznat MS a DS v přirozeně infikovaném plži.

Počet jedinců MS v *Biomphalaria glabrata* nepřevyšuje osm (Kassim a Richards 1979), u *Oncomelania hupensis* bylo napočítáno až 32 larev (Jourdane a Xia 1987; cit. dle Jourdane a Théron 1987).

Cerkárie

Cerkárie jsou složeny z těla a ocásku. Již jsou vytvořeny přichytávací orgány (přísavky). Na povrchu tegumentu je ochranná vrstva glykokalyx (glykosaminoglykany, glykolipidy, polysacharidy a glykoproteiny). Na sacharidové řetězce se vážou lektiny a protilátky (Horák a kol. 1998). Vnější membrána tegumentu cercárie je trilaminární. Tělo obsahuje nervový, svalový, trávicí a exkreční systém a genitální primordium. Cerkárie mohou být vybaveny receptory (např. chemo-, foto- a mechanoreceptory). Tato stadia mají dva páry preacetabulárních žláz, tři páry postacetabulárních žláz, hlavovou žlázu a pár hlavových penetračních žláz pro průnik tkání.

Dospělci

Povrch je kryt tegumentem. Vnější membrána tegumentu dospělých červů je heptalaminární a bez glykokalyx. Tělo obsahuje nervovou, svalovou, trávicí, exkreční a pohlavní soustavu. Schistosomy jsou gonochoristé s výrazným pohlavním dimorfismem. U některých rodů (*Schistosoma*, *Heterobilharzia* a *Schistosomatium*) je samice uložena v canalis gynaecophorus samce (Basch 1990). Další rody mohou mít redukovaný canalis gynaecophorus (*Gigantobilharzia*) nebo může zcela chybět (*Dendritobilharzia*) (Morand a Müller-Graf 2000). Samčí pohlavní soustavu tvoří početná varlata, vasa efferentia, vas deferens, vesicula seminalis, ductus ejaculatorius a cirrus. Součástí samičí soustavy jsou germária, ovidukt, receptaculum seminis, vitelária, ootyp, Mehlisovy žlázy, Laurerův kanálek a děloha ústící genitálním pórem. Samice mají vysoký reprodukční potenciál.

2. 2. Vývoj zástupců čeledi Schistosomatidae v meziphostiteli

2. 2. 1. Nalezení meziphostitele

Uvolnění miracidíí z vajíček je stimulováno mnoha faktory prostředí. Podnětem k líhnutí miracidíí je např. změna osmotického tlaku a zvýšení světelných stimulů (Meuleman a kol. 1984b; Xu a Dresden 1990; Kalbe a kol. 1997; cit. dle Horák a kol. 2002). Teplota vody ovlivňuje jejich dobu přežívání.

Miracidia se orientují pomocí světla a gravitace (pozitivně fototaktická a negativně geotaktická). K plži jsou atrahována miraxony (MAGs - miracidia attracting glycoproteins) (Kalbe a kol. 2000), což jsou exkrečně-sekrecní produkty plže. MAGs se u různých druhů plžů liší glykosylací.

2. 2. 2. Penetrace miracidíí a povrchové změny sporocyst

Po nalezení vhodného meziphostitele pronikají miracidia do plže. V závislosti na druhu preferují určité oblasti při penetraci. Miracidia *S. mansoni*, *S. haematobium* a *S. intercalatum* ve více než 70% penetrují do nohy a v ostatních případech do tykadel nebo okraje pláště (Jourdane a Théron 1987). Nicméně u *S. japonicum* a *Trichobilharzia australis* se penetrační místa nachází po celé hlavo-nožní oblasti (Islam 1986; Jourdane a Xia 1987; cit. dle Jourdane a Théron 1987). U 57% miracidíí *S. japonicum* byl pozorován vstup žaberní dutinou, přijímacím otvorem a rektem (Xia a Jourdane 1991).

Krátce po penetraci dojde k odvržení ciliárních destiček expanzí mezibuněčných valů pod povrch. Miracidia ztrácí senzorké papily a dojde k vytvoření neodermis. U *S. mansoni* k tomuto procesu dochází během 3 hod (DiConza a Basch 1974). Odvržené ciliární destičky stimulují imunitní odpověď plže (Amen a kol. 1992).

Během 24 - 48 hodin po expozici *B. glabrata* miracidíím *S. mansoni* jsou některé sporocysty zničeny, zatímco jiné pokračují v normálním vývoji (Newton 1954; Pan 1963).

2. 2. 3. Migrace a vývoj sporocyst

Vývoj MS může pokračovat blízko penetračního místa (*S. mansoni*, *S. haematobium*) nebo v preferovaných orgánech, např. srdci (*S. japonicum*). Zralé MS *S. mansoni* vznikají za 12 - 14 dní p.i. v plži. Mezi 10. a 17. dnem p.i. MS migrují k hepatopankreatu. Po dalších 7 - 10 dnech p.i. produkují DS. Některé DS byly nalezeny kromě hepatopankreatu i v ledvinách (Buecher a kol. 1974). Pro srovnání MS *Trichobilharzia australis* se vyskytují od 7. dne p.i. ve tkáni plicního vaku a ledvin a 10. - 12. den p.i. se zralé MS nachází v plášti a tkáních sousedících s hepatopankreatem. DS i MS se vyskytují 24. den p.i. v hepatopankreatu a 29. - 46. den p.i. cercárie opouštějí plže (Islam 1986).

DS *S. mansoni* a *S. haematobium* opouští MS porušením tegumentu (Jourdane a Théron 1987). U *S. japonicum* bylo pozorován únik DS porodním otvorem (Jourdane a Xia 1987; cit. dle Jourdane a Théron 1987). Podle některých autorů DS může migrovat aktivně (Pan 1965; Cheng a Bier 1972) tkání MH nebo pasivně cirkulačním systémem (Meuleman 1972). Je velmi pravděpodobné, že larvy používají oba typy migrace. Cercárie *S. mansoni* a *S. japonicum* opouští DS porodním otvorem, ale tato struktura nebyla popsána u *S. haematobium* a *S. bovis* (Capron a kol. 1965; Lengy 1962; cit dle Jourdane a Théron 1987).

Prepatentní perioda v plži je různá (3 - 10 týdnů) v závislosti na několika faktorech, zahrnujících i teplotu (Horák a kol. 2002). S rostoucí teplotou klesá délka prepatentní periody a vývoj parazita je rychlejší (Zbikowska 2005).

2. 3. Vývoj zástupců čeledi Schistosomatidae v definitivním hostiteli

2. 3. 1. Nalezení definitivního hostitele

Cerkárie jsou obvykle negativně geotaktické a pozitivně fototaktické. Stimulem cercárií pro přisednutí a k setrvání na kůži H je např. povrchová teplota (Cohen a kol. 1980), ceramidy, cholesterol, L-arginin (Haas 1976; Granzer a Haas 1986; Haas 1994; Haas 2003). L-arginin je zásadním stimulem pro *S. mansoni* (Granzer a Haas 1986; Haas a kol. 2002).

Vzhledem k tomu, že cercárie nepřijímají potravu, hynou v přírodních vodách během 2 - 3 dnů (*Trichobilharzia* sp.), pokud se jim nepodaří najít vhodného mezihostitele (Kolářová a kol. 2004).

2. 3. 2. Penetrace a povrchové změny cercárií

Nenasycené mastné kyseliny (k. linolová, k. linolenová) (Haas 2003), glukosylceramidy a fosfolipidy (Haas a kol. 1997) stimulují sekreci penetračních žláz, které pomohou narušit tkáň a umožní průnik parazita do tkáně. Lidská kůže obsahuje větší množství mastných kyselin než ptačí, proto ptačí schistosomy mohou penetrovat i do nekompatibilního hostitele (savce).

Během penetrace cercárie odvrhne ocásek a v těle H se musí vyrovnat se změnami např. teploty, koncentrace sacharidů a osmolarity (Skelly a Shoemaker 2000). Následně se mění povrch. Trilaminární vnější membrána se transformuje na heptalaminární. Nová membrána se formuje z malých membránových tělísek, které vznikají v subtegumentálních buňkách (Abath a Werkhauser 1996). Kromě povrchu se mění i metabolismus z aerobního na anaerobní. Vznikají stadia zvaná schistosomuly.

2. 3. 3. Migrace a vývoj schistosomul

Kožní schistosomuly jsou schopny podle chemických signálů (L-arginin, D-glukóza) (Haas a kol. 2002; Grabe a Haas 2004) a teplotního gradientu hledat krevní řečiště (McKerrow a Salter 2002). L-arginin může schistosomula použít k produkci NO, který působí rozšíření cév a tím usnadňuje migraci. Nicméně *in vitro* nedokáže konverzi NO provést. Pro orientaci v H tkáni je též důležité vnímání intenzity světla (Grabe a Haas 2004). Migrující schistosomula je negativně fototaktická, v epidermis migruje paralelně s povrchem mezi stratum corneum a stratum germinativum, a poté směřuje do hlubších vrstev (Haas a kol. 2002).

2. 3. 3. 1. Migrace lidských schistosom

Během 24 hod p.i. přes 90% schistosomul *S. mansoni* a *S. haematobium* dosáhlo epidermis. Nejvíce jedinců bylo nalezeno v dermis po 48 hod p.i., dermálních cév dosáhli okolo 72 hod p.i. V porovnání schistosomuly *S. japonicum* byly přítomny v dermálních cévách během 2 hod p.i. (He a kol. 2002).

Z kůže migrují lidské schistosomy cévním a lymfatickým systémem přes pravé srdce do plic. Nejvíce schistosomul *S. mansoni* a *S. haematobium* se v plicích vyskytovalo 6. den p.i. (Rheinberg a kol. 1998). Některé schistosomuly *S. mansoni* zůstávaly v plicích až 35 dní p.i. (Wilson 1987; cit. dle Haas a Pietsch 1991). Zatímco schistosomuly *S. japonicum* byly v plicích nalezeny již za dva dny p.i. (He 1993) a nejvíce jich zde bylo 3. den p.i. (Gui a kol. 1995; Rheinberg a kol. 1998).

Z plic se schistosomuly přemísťují přes levé srdce do střeva, jater a podle druhu do cév močového měchýře či střeva. Kromě intravaskulární migrace může někdy docházet i k extravaskulární (mimocévní). Schistosomuly *S. mansoni* migrovaly v laboratorní myši z plic do jater také přes pleurální dutinu a bránici (Wilks 1967).

S. japonicum migruje a dosahuje pohlavní zralosti rychleji ve srovnání s *S. mansoni* a *S. haematobium*. *S. japonicum* klade vajíčka 24. - 27. den p.i. oproti 30. - 35. dni p.i. u *S. mansoni* a 60. - 63. dni p.i. u *S. haematobium* (He a Yang 1980; Burden a Ubelaker 1981). Vajíčka opouští tělo H výkaly nebo močí, ale část vajíček může být diseminována do jater, plic a jiných orgánů.

2. 3. 3. 2. Migrace viscerálních druhů rodu *Trichobilharzia*

Ve srovnání se *S. mansoni* migruje *T. szidazi* rychleji (Haas a Pietsch 1991).

Schistosomuly *T. szidati* opouští kachní kůži během 24 hod p.i. (Bourns a kol. 1973) až 3 dnů p.i. (Haas a Pietsch 1991), ale v nekompatibilním hostiteli mohou některé schistosomuly zůstat až 4 dny (Haas a Pietsch 1991).

Z plic migrují viscerální druhy rodu *Trichobilharzia* pravděpodobně lymfatickým a venózním oběhem do srdce a plicními kapilárami do sekundárních bronchů, kde zpětně invadují epitel.

V plicích a ledvinách kachny se vyskytovali červi již od 19 hod p.i. a malý počet jedinců až do 16. dne p.i. (Bourns a kol. 1973). Haas a Pietsch (1991) uvádí, že schistosomuly *T. szidati* byly nalezeny v plicích 2. - 4. den p.i. V plicích myši byli červi detekováni již po 10 hod p.i. (Haas a Pietsch 1991) a zůstávali až do 6. dne p.i. (Haas a Pietsch 1991; Chanová a kol. 2006). Podle jiných autorů zůstávají červi v plicích myši až 10 dní p.i. (Horák a Kolářová 2000). V nekompatibilním H jsou schistosomuly *T. szidati* lokalizované ve stěně plicních alveolů (extravaskulárně) (Chanová a kol. 2006) a některé schistosomuly se mohou dostat i do jiných orgánů (např. jater a střev), ale většina jich uhynie v kůži (Appleton a Brock 1986).

Z plic schistosomuly dále pokračují zpět přes srdce do mezenterických vén, kde dospívají. Hodně červů mezi 10. - 21. dnem p.i. bylo ve vénách a střevní tkáni kachny. Jedinci pohlavně dospívali 7. den p.i. Nejvíce červů bylo mezi 10. - 21. dnem p.i. ve vénách a střevní tkáni. Samice kladly vajíčka již 9. den, ale nejvíce se jich nacházelo ve výkalech 14. - 16. den p.i. Část vajíček byla diseminována podobně jako u lidských schistosom do různých orgánů (Bourns a kol. 1973).

2. 3. 3. 3. Migrace nazálních druhů rodu *Trichobilharzia*

Nazální druhy rodu *Trichobilharzia* migrují přes periferní nervový systém (PNS) a centrální nervový systém (CNS) do krevního řečiště či tkáně nazální sliznice. Schistosomuly *T. regenti* v kompatibilním H migrují periferními nervy, kde je lze detekovat již od 24 hod. p.i., v prodloužené míše 2. den p.i. a v mozku 10. - 12. den p.i. (Hrádková a Horák 2002). V nazální oblasti se vyskytují 13. den p.i. Vajíčka produkují samice již 14. den p.i. (Horák a kol. 1999). V nekompatibilním H se do mozku dostanou schistosomuly 3. den p.i. (Hrádková a Horák 2002).

2. 4. *In vitro* kultivace zástupců čeledi Schistosomatidae

Základem kultivačních médií je fyziologický roztok, který osmolaritou odpovídá složení vnitřního prostředí MH či H. Do médií je nutné přidat zdroj potravy (např. sérum, erytrocyty). Vliv na úspěšnou kultivaci má složení média, teplota a pH. K udržení hodnot pH se používá pufr (HEPES). Přihlédnout se též musí k metabolickým nárokům parazita a zajistit vhodný poměr hladin O₂ a CO₂. Kultivační média se musí měnit pravidelně, protože vývojová stadia produkují metabolický odpad. Pro zamezení přemnožení bakterií a plísní se přidávají do média antibiotika či antimykotika, která jinak neovlivní kultivaci.

2. 4. 1. *In vitro* kultivace stadií schistosom z mezihostitele

Důležitým krokem k úspěšné *in vitro* kultivaci je transformace miracidia. Při zajištění vhodných kultivačních podmínek a zdroje potravy dochází k vývoji dalších larválních stadií.

2. 4. 1. 1. *In vitro* transformace miracidií

Miracidia odvrhují povrch v různých solných roztocích. *In vitro* přeměna na mateřskou sporocystu probíhá relativně snadno. Důležitým faktorem je osmolarita média - nejméně 110 mOsm. Samotné médium (bez séra) nepodporovalo přeměnu miracidia. Do médií se začalo přidávat sérum o optimální koncentraci 20% z výsledného objemu (% obsah séra v médiu). Při dodání koňského séra do média se nepřeměnila všechna miracidia *S. mansoni*. Při použití lidského séra se skoro všechna transformovala během 3 hod (Basch a DiConza 1974). Pro kultivaci *T. ocellata* byla použita různá séra (lidské, koňské, králičí, kachní), která dala podobné výsledky. Po přidání fetálního telecí séra (FCS) došlo k odvržení povrchu rychleji. Přes 90% miracidií začalo během několika minut až 2 hod měnit povrch. Transformace probíhala i za použití hemolymfy infikovaných i neinfikovaných plžů. Použitá hemolymfa byla zcentrifugována a byly z ní odstraněny buňky (Mellink a van der Bovenkamp 1985).

2. 4. 1. 2. Získání a *in vitro* kultivace sporocyst

Do médií je nutno přidat zdroj potravy. Proteiny hemolymfy plže mohou být nahrazeny sérem z obratlovce (Jones 1966). Existuje několik médií, která obsahují sérum, což je důležité pro růst sporocyst (např. médium podle DiConza a Basch 1974, modifikované Schneiderovo médium podle Hansen 1976a, médium podle Buecher 1974). Při přidání čerstvé hemolymfy do média došlo k zabití sporocyst (Buecher a kol. 1974; Mellink a van der Bovenkamp 1985). Zřejmě při preparaci došlo k uvolnění toxických látek z buněk. Ani tepelně inaktivovaná hemolymfa nepodporovala vývoj MS. Přítomnost tkání plže může ovlivňovat přežívání MS. Přidáním celého cerebrálního ganglia z neinfikovaných plžů obvykle podporovalo vývoj (Mellink a van der Bovenkamp 1985).

In vitro přežití a růst MS je komplikovanější v porovnání s transformací miracidíí. MS určené ke kultivaci je možno získat z miracidíí *in vitro*, která odvrhnou povrch v médiu a nebo z MS izolovaných z plže. DS určené ke kultivaci se mohou získat *in vitro* ze zralých MS (DiConza a Basch 1974; Mellink a van der Bovenkamp 1985) nebo z MS izolovaných z MH (DiConza a Basch 1974; Meuleman 1972). Dalším možným přístupem získání DS je *in vitro* kultivace MS s následnou implantací do MH (Basch a DiConza 1974). Lepších výsledků bylo dosaženo při kultivaci DS získaných *in vivo* z MS. V médiu nevznikaly cercárie, ale jen jejich embrya (Buecher a kol. 1974; Hansen a kol. 1974; DiConza a Basch 1974; Hansen 1975, 1976b). Embrya cercárií uvolněná z DS se dále nevyvíjela (Mellink a van der Bovenkamp 1985). V některých případech se vyvíjela *in vitro*, ale nedosáhla však zralosti a infekčnosti (Hansen 1975; Hansen 1976b; Basch a DiConza 1977).

DiConza a Basch (1974) při kultivaci sporocyst *S. mansoni* použili médium doplněné lidským sérem. MS se vyvíjely a rostly, ale DS nebyly produkovány. DS *S. mansoni* získané *in vivo* z MS významně rostly. Uvnitř sporocyst se formoval zárodek, ale sekundární DS nebyly produkovány (DiConza a Basch 1974; Meuleman 1972).

Basch a DiConza (1974) použili k *in vitro* kultivaci MS *S. mansoni* médium podle Voge a Seidel (1972), které se primárně lišilo sacharidy, solemi, o něco vyšším pH (7 - 7,2 vs. 6,7 - 7), amonokyselinami (AMK) a osmolaritou. Následně implantovali 6, 8, 10 denní MS do *B. glabrata*. Infekce v implantovaných plžích byla nerozpoznatelná od přirozené infekce miracidii. První cercárie se objevily 30. - 39. den po implantaci bez ohledu na dobu kultivace.

Dalším médiem pro *S. mansoni* DS bylo 30% Schneiderovo médium s přidanou

galaktózou, inaktivovaným FCS a fenolovou červení. Výsledná osmolarita byla 163 mOsm, pH 7 a 0,5 % CO₂. Do média byly přidány redukční látky (obsahující -SH skupinu), které snižují oxidativní poškození sporocyst. Osvědčilo se použití dithiothreitolu (Glelandovo činidlo) nebo cysteinu v kombinaci s glutathionem (Buecher a kol. 1974).

Mellink a van der Bovenkamp (1985) použili pro MS *T. ocellata* modifikované základní médium dle DiConza a Basch (1974). Získali rychlejší růst MS *in vitro*. DS nebyly produkovány. MS přežívaly 4 týdny, výjimečně i 8 týdnů. Médium obsahovalo dvojitě množství AMK ze základního média (BME = Basal Medium Eagle) bez L-glutaminu (škodlivý ve vysoké koncentraci), vitamíny a 1% modifikované Schneiderovo médium s přídavkem solí (NaCl, KCl, MgCl₂, Na₂HPO₄, CaCl₂), glukózy, pufru, indikátoru (fenolové červeně) a antibiotik (penicilinu a streptomycinu). Osmolarita základního média byla 110 mOsm. Kultivace probíhala při 1,73 % CO₂ a pH 7,2. Hlavní rozdíl od originálního média DiConza a Basch (1974) byl ve složení AMK, absenci organických kyselin, množství sacharidů a přídavku antibiotik. Do základního média bylo přidáno inaktivované lidské sérum (standardní médium). Osmolarita standardního média byla 135 mOsm. V závislosti na dávce séra bylo pH 7,8 až 8, což je analogické s pH hemolymfy parazitovaného plže (pH 7,8).

2. 4. 1. 3. Tkáňová kultura

2. 4. 1. 3. 1. Kultura buněk členovců

Použití této kultury dokazuje, že médium nemusí mít přesné složení jako hemolymfa (Schneider 1972; cit. dle Hansen 1976b). O použití tkáňové kultury se zmiňují DiConza a Basch (1973). Použili monoxenickou kulturu s buňkami ze členovců (z komáří linie) pro kultivaci MS získaných z plže. Médium se skládalo z hydrolyzátu laktalbuminu v roztoku solí (HS = Hank's salts) doplněné inaktivovaným fetálním bovinním sérem (FBS), vaječným extraktem, bovinní frakcí A, penicilinem a streptomycinem (pH 6,8 - 7). MS byly získány z *B. glabrata* 14 - 17 dní p.i. a udržované při 26°C. Získané DS byly promyty v pufovaném roztoku solí (CBSS = Chernin balanced salt solution) (Chernin 1963) a inokulovány k buněčné linii (28°C). Vývoj zárodečných buněk DS byl pozorován 25. den p.i. Cerkárie se nepodařilo získat. Sporocysty přežívaly až 35 dní. V kultuře bez buněk ze členovců sporocysty přežívaly jen 7 dní.

2. 4. 1. 3. 2. Kultura buněk embrya *Biomphalaria glabrata*

Další tkáňovou kulturu lze získat z embryí *B. glabrata* (Bge) (Hansen 1975; Hansen 1976b). Sporocysty mohou být udržovány axenicky v médiích (Bixier a kol. 2001), ale růst a vývoj nastává jen při přidání živých buněk (synxenicky) (Bayne a kol. 1978). Bge buňky poskytují vhodné fyziologické prostředí pro *in vitro* transformaci MS - DS.

Vývoj miracidí na MS a MS na DS *S. mansoni* lze realizovat ve společné kultuře Bge buněk či jejich produktů a kompletního média (C-Bge). C-Bge médium obsahovalo CBSS, antibiotika, glukózu, trehalózu a FBS. Sporocysty v médium bez séra nepřežily déle než 12 - 14 dní. Společná kultura Bge buněk či jejich produktů a C-Bge média vykazovala nejlepší výsledky v přežívání a růstu MS oproti C-Bge médiu samotnému. Zárodky DS se začaly objevovat v MS během prvních 20 dnů. Zralé DS se uvolňovaly přibližně za 30 - 45 dní od začátku kultivace. *In vitro* vývoj DS byl srovnatelný s vývojem *in vivo* (Yoshino a Laursen 1995)

Pomocí společné kultury Bge buněk a C-Bge média je možné zajistit i vývoj miracidí - MS a MS - DS *S. japonicum*. Miracidia byla promyta v CBSS obsahujícím glukózu, trehalózu a gentamicin. Po transformaci byla umístěna do C-Bge média s přidaným inaktivovaným FBS a gentamicinem. Transformace nastala během 48 hod. Produkce DS trvala minimálně 11 týdnů místo 6 - 7 týdnů (Coustau a kol. 1997).

Bge linie podporuje i *in vitro* přeměnu miracidí na MS a MS na redie jaterní motolice *Fascioloides magna*. Transformace miracidí byla závislá na přítomnosti produktů Bge buněk (Laursen a Yoshino 1999).

Krátkodobou kultivaci vedoucí k produkci infekčních cercárií *S. mansoni* popsali Kapp a spol. (2003). Miracidia byla udržována *in vitro* s Bge buňkami nebo produkty Bge buněk v médiu. V obou případech byly produkovány MS. Dva dny staré MS byly transplantovány do cephalopedálního sínu. Cercárie byly získány za 6 týdnů po implantaci (jako v přírodní infekci) a úspěšně infikovaly křečka.

S. mansoni sporocysty získané ze společné kultivace s Bge buněk a C-Bge média byly injekčně vpraveny do hepatopankreatu. O 5 - 8 týdnů později se začaly produkovat infekční cercárie (Ivaschenko a kol. 1999).

2. 4. 1. 4. Inkubace orgánů získaných z mezihostitele

Vývoj cercárií pokračuje i ve fragmentech hepatopankreatu a gonád *B. glabrata* inkubovaných v médiu. Lepších výsledků se dosáhlo použitím CBSS s glukózou, trehalózou a antibiotiky než s komplexním médiem, které obsahovalo lidské sérum, antibiotika, embryonální extrakt z kuřete, hydrolyzát laktalbuminu a kvasinkový extrakt. Odstraněná tkáň (19. - 20. den p.i.) obsahovala DS se zárodky cercárie. Po 9. dni v kultuře se uvolňovaly cercárie, kterými bylo možno infikovat myši. Toto médium bylo vhodné i pro kultivaci pozdějších larválních stadií (Chernin 1964).

2. 4. 2. *In vitro* kultivace stadií schistosom z definitivního hostitele

Kultivace stadií z obratlovce umožňují vývoj z cercárie, která penetruje kůží hostitele, přeměnu na schistosomulu, dosažení pohlavní zralosti, vytvoření páru dospělých červů a produkci životaschopných vajíček samicí.

2. 4. 2. 1. Penetrační techniky

Cercárie je možno zbavit ocásku několika způsoby (např. penetrací, mechanickým a chemickým stresem).

K penetraci se dá využít např. potkaní, myší, křeččí, kachní (Clegg 1965; Haas a Roemer 1998) a lidská kůže (Haas a Roemer 1998; Bartlett a kol. 2000; He a kol. 2002; Whitfield a kol. 2003). Při použití kůže se vyprodukuje relativně malý počet schistosomul. Lidskou kůži lze inkubovat v médiu RPMI s FBS, lidským sérem, gentamycinem a fungizonem (37°C, 5% CO₂) (He a kol. 2002).

Dále je možno k penetraci použít ekvivalentu kůže (LSE = living skin equivalent) (Fusco a kol. 1993; Khammo a kol. 2002). LSE je složen z dermální vrstvy s lidskými dermálními fibroblasty v kolagenní mřížce a epidermální vrstvy s lidskými keratinocyty. Penetrace nebyla pozorována v prvních 15 min expozice. Maximum penetrací proběhlo po 20 hod (80%). Do LSE obohaceného kyselinou linolovou penetrovalo více cercárií než do neupraveného LSE. LSE byl inkubován v médiu (1:1 DMEM = Dulbecco's Modified Eagles Medium a F-12 obsahující fenolovou červeň, bikarbonát sodný a gentamycin sulfát) při 35°C, 6 - 8% CO₂. Počátek penetrace LSE cercáriemi byl zpožděn oproti penetraci kůže, což je zřejmě způsobeno odlišným množstvím lipidů a mastných kyselin ve stratum corneum LSE. (Fusco a kol. 1993).

Ocásek cercárie je možno nechat odstranit mechanicky, např. pasáží přes injekční jehlu (Colley a kol. 1974; Basch 1981a; Basch a O'Toole 1982; Samuelson a Stein 1989; Wang a kol. 2006) a vortexováním (Ramalho-Pinto a kol. 1974). Využitím těchto dvou mechanických metod lze získat velké množství schistosomul (Samuelson a Caulfield 1985; Gold a Flescher 2000).

Dalším způsobem odstranění ocásku je použití chemického stresu (Eveland a Morse 1975; Wang a kol. 2006). Inaktivované lidské sérum (bez komplementu) podporovalo transformaci u části cercárií *S. mansoni*, nikoliv *S. japonicum*. Komplement v čerstvém séru je důležitý pro

transformační proces povrchu cercárie (Eveland a Morse 1975; Greenblatt a kol. 1979; Wang a kol. 2006). V čerstvém lidském séru se 40 - 50% cercárií *S. japonicum* přeměnilo během 24 hod. *S. mansoni* přeměna byla mnohem rychlejší (30 min) než *S. japonicum*. U *S. mansoni* následně komplement zabíjel schistosomuly, zatímco *S. japonicum* přežívaly v *in vitro* kultuře (Wang a kol. 2006).

2. 4. 2. 2. *In vitro* inkubace a transformace cercárií

Pro inkubaci cercárií *S. mansoni* (uvolněných z MH) lze použít laboratorně připravené rybníční vody (APW). APW je roztokem solí (CaCl_2 , MgSO_4 , FeCl_3 , K_2SO_4) s osmolaritou 18 mOsm a pH 7. Pro cercárie, které byly získány z hepatopankreatu MH, je vhodné 120 mOsm PBS (NaCl , Na_2HPO_4) nebo 120 mOsm RPMI 1640 (Samuelson a Stein 1989).

Pro úspěšnou transformaci je třeba zajistit fyziologické stimuly a médium, které by podporovalo tuto přeměnu. Transformaci je možno podpořit přidáním serotoninu (Basch 1981a, b; Samuelson a Caulfield 1985) a séra. Naopak inhibici působí APW, eserin sulfát a EDTA (Samuelson a Caulfield 1985).

Cercárie *S. mansoni* byly inkubovány při 37°C po dobu 3 hod v roztocích s různou osmolaritou. K transformaci cercárie na schistosomulu došlo již při 120 mOsm PBS nebo RPMI (Samuelson a Stein 1989). Při použití 120 mOsm PBS byla transformace o něco pomalejší než v RPMI (Skelly a Shoemaker 2000). Nejvíce cercárií se přeměnilo při použití 300 mOsm PBS nebo RPMI. Zvýšení koncentrace solí bylo silnějším stimulem než samotné zvýšení osmolarity, protože při použití 300 mOsm roztoku mannitolu došlo k transformaci jen u 14% cercárií (Samuelson a Stein 1989).

2. 4. 2. 3. Získání a *in vitro* kultivace schistosomul

Schistosomuly pro následnou kultivaci či inkubaci lze získat izolací z DH (Cheever a Weller 1958; Clegg 1965) nebo *in vitro* transformací cercárie.

Pro kultivaci lze použít definované syntetické médium (DSM) obsahující RPMI 1640 a F-12 médium, doplněné glutaminem, HEPES, penicilinem, streptomycinem a gentamycinem (6% CO₂ a 37°C) (Gold a Flescher 2000).

Ke kultivaci *S. mansoni* (získané po mechanickém odstranění ocásku) bylo použito BME, do kterého byl přidán hydrolyzát laktalbuminu, glukóza, lidské sérum, hormony (např. serotonin a inzulin) a další složky. Kultivace probíhala při 36°C a 5% CO₂. Schistosomuly byly krmeny lidskými erytrocyty. Dospělci tvořili páry během sedmi týdnů kultivace *in vitro*. Párování nastalo později než *in vivo* (Basch 1981a).

Po více než 2 měsících kultivace *S. mansoni* byla dosažena stálá produkce infertilních vajíček asi u 10% kultivovaných červů. Vajíčka měla poloviční velikost a měla malý laterální trn. Dospělci měli málo vyvinuté vitelinní žlázy, germária a testes. Alternativní pokusy se změnou plynné fáze nebo přidání redukujících látek, antioxidantů, steroidních hormonů a specifických adsorpčních látek nebo extraktu z dospělých červů nezlepšily produkci vajíček (Basch 1981b).

Signifikantní růst *S. mansoni* jako první ukázali Cheever a Weller (1958). Použili schistosomuly získané z plic nebo jater infikované myši. Médium obsahovalo koňské nebo lidské sérum, HS, extrakt z kuřecího embrya a erytrocyty. Schistosomuly rostly relativně pomalu a nedosáhly sexuální zralosti.

K dalším pokusům bylo použito podobné médium (médium I) s AMK (místo extraktu z kuřete), doplněno hydrolyzátem laktalbuminu a Na₂CO₃ (při pH 7,4, 7% CO₂). Schistosomuly byly získány z kůže. V médiu se vyvíjeli samci se spermii a samice s malými germárii bez vajíček v uteru (Clegg 1959; cit. dle Clegg 1965).

V médiu II (modifikované médium I) byly kultivovány schistosomuly *S. mansoni* získané z plic myši. Medium II obsahovalo inaktivované králičí sérum, roztok solí (ES = Earle's salt), králičí erytrocyty, hydrolyzát laktalbuminu, glukózu, penicilin, streptomycin a Na₂CO₃ (při 37°C, pH 7,4 a 8,8% CO₂). Od média I se tedy lišilo nahrazením HS za ES, zvýšením koncentrace hydrolyzátu laktalbuminu a Na₂CO₃. Vývoj probíhal do stadia, kdy se tvoří protein vaječné stěny ve vitelinních buňkách. Tento proces vyžadoval 42 dní, oproti 30 dním v *in vivo* podmínkách v myši. Schistosomuly získané z kůže se vyvíjely jen do stadia,

kdy se tvoří testes a germária. Médium II obohacené o extrakt z kuřecího embrya, extrakt z králičích jater a glukózu nepodporoval vývoj dále než do stadia tvorby proteinu vaječné stěny. Zvýšená koncentrace glukózy měla inhibiční efekt, jelikož došlo ke zvýšené exkreci kyseliny mléčné (Clegg 1965).

Schistosomuly *T. ocellata* získané penetrací kachní kůží nebo želatinovou membránou byly kultivovány v médium II (Clegg 1965). Králičí sérum, erytrocyty byly nahrazeny kuřecím nebo kachním sérem a homologními erytrocyty, dále byl přidán mykostatin (5% CO₂, pH 7,2 - 7,4 a 39 - 40°C). Červi trávili erytrocyty a maximum vývoje dosahovali 12. den (Howell a Bourns 1974).

Schistosomuly *S. mansoni* a *S. japonicum* byly kultivovány v médiu NCTC - 109 (anorganické sole, aminokyseliny, vitamíny, glukóza a další složky) obsahující lidské nebo králičí sérum. Schistosomuly dospěly, ale samice neprodukovaly vajíčka (Yasuraoka a kol. 1978).

Basch a O'Toole (1982) kultivovali *Schistosomatium douthitti* podle Basch (1981a). Růst *in vitro* byl rychlejší než u *S. mansoni*. Kultivovaní červi *S. douthitti* byli menší než z H. Vajíčka měla normální velikosti tvar, ale nebyla životaschopná.

Injikování schistosomul, juvenilních jedinců a párů dospělých červů *S. mansoni* do mezenterické vény myši vedlo k plnému vývoji a kladení vajíček. Všechna uvedená stadia se vyvíjela z cercárie *in vitro*. Schistosomuly staré 2 hod nebo 13 dní byly injikovány do H. Starší červi byli chirurgicky implantováni do myši. Páry dospělých červů *in vivo* byly schopní znovu klást životaschopná vajíčka, když byli kultivováni *in vitro*. Ale červi rostoucí do dospělosti *in vitro* nebyli schopni produkovat životaschopná vajíčka. Zřejmě postrádali nějaký stimul, který nemůže být opatřen později (Basch a Humbert 1981).

Získat životaschopná vajíčka je možno též při chirurgickém odstranění *S. mansoni* dospělých jedinců z cév H. Když byl separovaný červ z páru kultivován s původním partnerem, došlo k páření rychleji než při nahrazení červem z jiného páru (Shirazia a Schiller 1982).

Lidské schistosomy jsou již dlouho studovány vzhledem k závažnosti onemocnění, které způsobují. Zatímco výzkum ptačím schistosom byl tak trochu opomíjen a doposud je jen málo popsáných pokusů vztahující se k *in vitro* kultivacím ptačích schistosom.

3. Závěr

Schistosomy jsou známy jako lidský patogen v tropických a subtropických zemích. Způsobují nemoc zvanou schistosomóza. Na celém světě je nakaženo 200 - 300 milionu osob a ročně umírá kolem 200 - 300 tisíc. Nicméně ptačí schistosomy se vyskytují kosmopolitně a některé rody byly popsány jako původci lidské cercáriové dermatitidy, a nejen proto si zasluhují naši pozornost.

Základem kultivačních médií je fyziologický roztok, který osmolaritou odpovídá složení vnitřního prostředí MH či H. Do médií je nutné přidat zdroj potravy (např. sérum, erytrocyty). Vliv na úspěšnou kultivaci má složení média, teplota a pH. K udržení hodnot pH se používá pufr. Přihlédnout se též musí k metabolickým nárokům parazita a zajistit vhodný poměr hladin O₂ a CO₂. Při zajištění těchto podmínek mohou v budoucnu *in vitro* kultivace mimo jiné přispět i k omezení počtu používaných experimentálních zvířat.

Na tuto bakalářskou práci bude navazovat diplomová práce. V naší laboratoři používáme ptačí schistosomy *Trichobilharzia szidati* a *T. regenti* jako modelové organismy, které budou použity ke srovnávacím studiím. Oba druhy se liší v nutričními i ekologickými nároky. Cílem bude definovat optimální složení kultivačního média, které by umožnilo dlouhodobé přežívání a vývoj ptačích schistosom do dospělosti. *In vitro* kultivace stadií z mezihostitele mohou přispět k identifikaci neznámých ptačích schistosom. V oblasti imunodiagnostiky budou charakterizovány exkrečně-sekreční a somatické antigeny, které mohou hrát roli v interakcích parazit-hostitel.

4. Seznam citované literatury

- **Abath F. G. C., Werkhauser R. C. (1996):** The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. *Parasite Immunology* 18: 15–20
- **Amen R. I., Baggen J. M. C., Bezemer P. D., Jong-Brink M. (1992):** Modulation of the activity of the internal defense system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Parasitology* 104: 33–40
- **Appleton C. C., Brock K. (1986):** The penetration of mammalian skin by cercariae of *Trichobilharzia sp.* (Trematoda: Schistosomatidae) from South Africa. *Journal of Veterinary Research* 53: 209–211
- **Bartlett A., Brown M., Marriott C., Whitfield P. J. (2000):** The infection of human skin by schistosome cercariae: studies using Franz cells. *Parasitology* 121: 49–54
- **Basch P. F. (1981a):** Cultivation of *Schistosoma mansoni in vitro*. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. *The Journal of Parasitology* 67: 179–185
- **Basch P. F. (1981b):** Cultivation of *Schistosoma mansoni in vitro*. II. Production of infertile eggs by worm pairs cultured from cercariae. *The Journal of Parasitology* 67: 186–190
- **Basch P. F. (1990):** Why do schistosomes have separate sexes? *Parasitology Today* 5: 160–163
- **Basch P. F., DiConza J. J. (1974):** The miracidium - sporocyst transition in *Schistosoma mansoni* cercariae. *The Journal of Parasitology* 60: 935–941
- **Basch P. F., DiConza J. J. (1977):** *In vitro* development of *Schistosoma mansoni* cercariae. *The Journal of Parasitology* 63: 245–249
- **Basch P. F., Humbert R. (1981):** Cultivation of *Schistosoma mansoni in vitro*. III. Implantation of cultured worms into mouse mesenteric veins. *The Journal of Parasitology* 67: 191–195
- **Basch P. F., O'Toole M. L. (1982):** Cultivation *in vitro* of *Schistosomatium douthitti* (Trematoda: Schistosomatidae). *International Journal for Parasitology* 12: 541–545
- **Bayne C. J., Owczarzak A., Allen J. R. (1978):** Molluscan (*Biomphalaria glabrata*) cell line: serology, karyotype, behavioral and enzyme electrophoretic characterization. *Journal of Vertebrate Pathology* 32: 35–39

- **Bixier L. M., Lerner J. P., Ivaschenko M, McCormick R. S., Barnes D. W., Bayne C. (2001):** Axenic culture of *Schistosoma mansoni* sporocysts in low O₂ environments. The Journal of Parasitology 87: 1167–1168
- **Bourns T. K. R., Ellis J. C., Rau M. E. (1973):** Migration and development of *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda: Schistosomatidae) in its duck host. Canadian Journal of Zoology 54: 1021–1030
- **Buecher E. J., Perez-Mendez G., Hansen E. L., Yarwood E. (1974):** Sulphydryl compounds under controlled gas in culture of *Schistosoma mansoni* sporocysts. Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine 146: 1101–1105
- **Burden C. S., Ubelaker J. E. (1981):** *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*: difference in development. Experimental Parasitology 54: 28–34
- **Clegg J. A. (1965):** *In vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni*. Experimental Parasitology 16: 133–147
- **Cohen L. M., Neimark H., Eveland L. K. (1980):** *Schistosoma mansoni*: response of cercariae to a thermal gradient. The Journal of Parasitology 66: 362–364
- **Colley D. G., Wikel S. K. (1974):** *Schistosoma mansoni*: simplified method for the production of schistosomula. Experimental Parasitology 35: 44–51
- **Coustau C., Ataev G., Jourdane J., Yoshino T. P. (1997):** *Schistosoma japonicum*: *in vitro* cultivation of miracidium to daughter sporocyst using a *Biomphalaria glabrata* embryonic cell line. Experimental Parasitology 87: 77–87
- **DiConza J. J., Basch P. F. (1973):** Cultivation of *Schistosoma mansoni* daughter sporocyst in arthropod tissue cultures. The Journal of Parasitology 59: 211–212
- **DiConza J. J., Basch P. F. (1974):** Axenic cultivation of *Schistosoma mansoni* daughter sporocyst. The Journal of Parasitology 60: 757–763
- **Eveland L. K., Morse S. I. (1975):** *Schistosoma mansoni*: *in vitro* conversion of cercariae to schistosomula. Parasitology 71: 327–335
- **Fried B., Haseeb M. A (1991):** Platyhelminthes: Aspidogastrea, Monogenea, and Digenea. In: Microscopic Anatomy of Invertebrates (Frederick W. H., Bogitsh J.B., eds). Vol. 3. Wiley-Liss. New York: 141–209
- **Fusco A. C., Cassoppi L., Safalsky B., Shibuya T. (1993):** Penetration of *Schistosoma mansoni* cercariae into a living skin equivalent. The Journal of Parasitology 79: 444–448

- **Gold D., Flescher E. (2000):** Influence of mechanical tail - detachment techniques of schistosome cercariae on the production, viability, and infectivity of resultant schistosomula: a comparative study. *Parasitology Research* 86: 570–572
- **Grabe K., Haas W. (2004):** Navigation within host tissues: *Schistosoma mansoni* and *Trichobilharzia ocellata* schistosomula respond to chemical gradients. *International Journal for Parasitology* 34: 927–934
- **Grabe K., Haas W. (2004):** Navigation within host tissues: cercariae orientate towards dark after penetration. *Parasitology Research* 93: 222–113
- **Granzer M., Haas W. (1986):** The chemical stimuli of human skin surface for the attachment response of *Schistosoma mansoni* cercariae. *International Journal for Parasitology* 16: 575–579
- **Greenblatt H. C., Eveland L. K., Morse S. I. (1979):** *Schistosoma mansoni*: complement and cercarial tail loss during *in vitro* transformation. *Experimental Parasitology* 48: 100–108
- **Gui M., Kusel J. R., Shi Y. E., Ruppel A. (1995):** *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni*: comparison of larval migration patterns in mice. *Journal of Helminthology* 69: 19–25
- **Haas W. (1976):** Die Anheftung (Fixation) der Cercariae von *Schistosoma mansoni*. Einfluss natürlicher Substrate und der Temperatur. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 49: 63–72
- **Haas W. (1994):** Physiological analyses of host - finding behaviour in trematode cercariae: adaptations for transmission success. *Parasitology* 109: 815–829
- **Haas W. (2003):** Parasitic worms: strategies of host finding, recognition and invasion. *Zoology* 106: 349–364
- **Haas W., Pietsch U. (1991):** Migration of *Trichobilharzia ocellata* schistosomula in the duck and in the abnormal murine host. *Parasitology Research* 77: 642–644
- **Haas W., Roemer A. (1998):** Invasion of the vertebrate skin by cercariae of *Trichobilharzia ocellata*: penetration processes and stimulating host signals. *Parasitology Research* 84: 787–795
- **Haas W., Diekhoff D., Koch K., Schmalfuss G., Loy C. (1997):** *Schistosoma mansoni* cercariae: stimulation of acetabular gland secretion is adapted to the chemical composition of mammalian skin. *The Journal of Parasitology* 83: 1079-1085

- **Haas W., Grabe K., Geis C., Päch T., Stoll K., Fuchs M., Haberl B., Loy C. (2002):** Recognition and invasion of human skin by *Schistosoma mansoni* cercariae: the key-role of L-arginine. *Parasitology* 124: 153–167
- **Hansen E. L. (1975):** Secondary daughter sporocysts of *Schistosoma mansoni*: their occurrence and cultivation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 266: 426–436
- **Hansen E. L. (1976a):** Application of Tissue Culture of a Pulmonate Snail to Culture of Larval *Schistosoma mansoni*. In: *Invertebrate Tissue Culture: Application in Medicine, Biology, and Agriculture* (Kurstak E., Maramorosch K., eds.). Academic Press. New York: 87–97
- **Hansen E. L. (1976b):** A Cell Line from Embryo *Biomphalaria glabrata* (Pulmonata): Establishment and Characteristics. In: *Invertebrate Tissue Culture: Application in Medicine, Biology and Agriculture* (Kurstak E., Maramorosch K., eds.). Academic Press. New York: 75–99
- **Hansen E. L., Perez-Mendez G., Yarwood E., Buecher E. J. (1974):** Second generation daughter sporocysts of *Schistosoma mansoni* in axenic culture. *The Journal of Parasitology* 60: 371–372
- **He Y. X. (1993):** Biology of *Schistosoma japonicum*. From cercariae penetrating into host skin to producing eggs. *Chinese Medical Journal* 106: 320–324
- **He Y. X., Yang H. Z. (1980):** Physiological studies on the post-cercarial development of *Schistosoma japonicum*. *Acta Zoologica Sinica* 26: 32–39
- **He Y. X., Chen I., Ramaswamy K. (2002):** *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum*: early events associated with penetration and migration of schistosomula through human skin. *Experimental Parasitology* 102: 99–108
- **Horák P., Kolářová L. (2000):** Survival of bird schistosomes in mammalian lungs. *International Journal for Parasitology* 30: 65–68
- **Horák P., Kolářová L., Adema C. M. (2002):** Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*. *Advances in Parasitology* 52: 155–233
- **Horák P., Dvořák J., Kolářová L., Trefil L. (1999):** *Trichobilharzia regenti*, a pathogen of the avian and mammalian central nervous system. *Parasitology* 119: 577–581
- **Horák P., Kovář L., Kolářová L., Nebesářová J. (1998):** Cercaria-schistosomulum surface transformation of *Trichobilharzia szidati* and its putative immunological impact. *Parasitology* 116: 139–147

- **Howell M. J., Bourns T. K. R. (1974):** *In vitro* culture of *Trichobilharzia ocellata*. International Journal for Parasitology 4: 471–476
- **Hrádková K., Horák P. (2002):** Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice. Journal of Helminthology 76: 137–141
- **Chanová M., Vuong S., Horák P. (2006):** *Trichobilharzia szidati*: the lung phase of migration within avian and mammalian hosts. Parasitology Research 100: 1243–1247
- **Cheever A. W., Weller T. H. (1958):** Observations on the growth and nutritional requirements of *Schistosoma mansoni in vitro*. American Journal of Hygiene 68: 322–329
- **Cheng T. C., Bier J. W. (1972):** Studies on molluscan schistosomiasis: an analysis of the development of the cercariae of *Schistosoma mansoni*. Parasitology 64: 129–141
- **Chernin E. (1963):** Observation on heart explanted *in vitro* from the snail, *Australorbis glabratus*. The Journal of Parasitology 49: 353–364
- **Chernin E. (1964):** Maintenance *in vitro* of larval *Schistosoma mansoni* in tissues from the snail, *Australorbis glabratus*. The Journal of Parasitology 50: 531–545
- **Islam K. S. (1986):** Development of *Trichobilharzia australis* Blair and Islam, 1983 in the snail, *Lymnaea lessona* Deshayes and in an experimental definitive host, the Muscovy duck. Journal of Helminthology 60: 301–306
- **Ivaschenko M. G., Lerner J. P., McCormick R. S., Toumadje A., Allen B., Fischer K., Hedstrom O., Helmrich A., Barnes D. W., Bayne C. J. (1999):** Continuous *in vitro* propagation and differentiation of cultures of the intramolluscan stages of the human parasite *Schistosoma mansoni*. Proceedings of the National Academy of Sciences 96: 4965–4970
- **Jones B. M. (1966):** Invertebrate Tissue and Organ Culture in Cell Research. In: Cells and Tissues in Culture (Willmer E. N., eds.). Vol. 3. Academic Press. New York: 397–457
- **Jourdane J., Théron A. (1987):** Larval Development: Eggs to Cercariae. In: The Biology of Schistosomes (Rollinson D., Simpson A. J. G., eds.). Academic Press. New York: 83–106
- **Kalbe M., Haberl B., Haas W. (2002):** Snail host finding by *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata*: compound analysis of „miracidia-attracting glycoproteins“. Experimental Parasitology 96: 231–242

- **Kapp K., Coustau C., Wipperfurth V., Jourdain J., Kunz W., Grevelding C. (2003):** Transplantation of *in vitro*-generated *Schistosoma mansoni* mother sporocysts into *Biomphalaria glabrata*. *Parasitology Research* 91: 482–485
- **Kassim O., Richards C. S. (1979):** Host reaction in *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* miracidia, involving variations in parasite strain, numbers and sequence of exposures. *International Journal for Parasitology* 9: 565–570
- **Khalil L. F. (2002):** Family Schistosomatidae Stiles and Hass all, 1898. In: *Keys to Trematoda* (Gibson D. I., Jones A. Bray R. A., eds.). Vol. 1. CAB International. Wallingford: 419–432
- **Khammo N., Bartlett A., Clothier R. H., Whitfield P. J. (2002):** The attachment of *Schistosoma mansoni* cercariae to human skin cells. *Parasitology* 124: 25–30
- **Kolářová L., Horák P., Skirnisson K. (2004):** O nákazách ptáků schistosomami rodu *Trichobilharzia*. *Veterinářství* 54: 213–216
- **Kolářová L., Rudolfová J., Hampel V., Skirnisson K. (2006):** *Allobilharzia visceralis* gen. nov., (Schistosomatidae - Trematoda) from *Cygnus cygnus* (L.) (Anatidae). *Parasitology International* 55: 179–186
- **Laursen J. R., Yoshino T. P. (1999):** *Biomphalaria glabrata* embryonic (Bge) cell line supports *in vitro* miracidial transformation and early larval development of the deer liver fluke, *Fascioloides magna*. *Parasitology* 118: 187–194
- **McKerrow J. H., Salter J. (2002):** Invasion of skin by *Schistosoma* cercariae. *Trends in Parasitology* 18: 193–195
- **Mellink J. J., van der Bovenkamp W. (1985):** *In vitro* culture of intramolluscan stages of the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 71: 337–351
- **Meuleman E. A. (1972):** Host-parasite interrelationships between the freshwater pulmonate *Biomphalaria pfeifferi* and the trematode *Schistosoma mansoni*. *Netherlands Journal of Zoology* 22: 355 – 427
- **Morand S., Müller-Graf C. D. (2000):** Muscles or testes? Comparative evidence for sexual competition among dioecious blood parasites (Schistosomatidae) of vertebrates. *Parasitology* 120: 45–56
- **Newton W. L. (1954):** Tissue response to *Schistosoma mansoni* in second generation snails from a cross between two strains of *Australorbis glabratus*. *The Journal of Parasitology* 40: 352–355

- **Pan C. T. (1963):** Generalized and focal tissue responses in the snail, *Australorbis glabratus*, infected with *Schistosoma mansoni*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 113: 475–485
- **Pan C. T. (1965):** Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 14: 931–976
- **Ramalho-Pinto F. J., Gazzinelli G., Howells R. E., Mota Santos R. A., Figueiredo E. A., Pellegrino J. (1974):** *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercariae to schistosomula *in vitro*. *Experimental Parasitology* 36: 360–372
- **Rheinberg C. E., Mone H., Caffrey C. R., Imbert-Establet D., Jourdane J., Ruppel A. (1998):** *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mansoni* a *S. rodhaini* in mice: relationship between patterns of lung migration by schistosomula and perfusion recovery of adult worms. *Parasitology Research* 84: 338–342
- **Samuelson J. C., Caulfield J. P. (1985):** The cercarial glycoalyx of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Cell Biology* 100: 1423-1434
- **Samuelson J. C., Stein L. (1989):** *Schistosoma mansoni*: increasing saline concentration signals cercariae to transform to schistosomula. *Experimental Parasitology* 69: 23–29
- **Shirazia D., Schiller E. (1982):** Mating recognition by *Schistosoma mansoni in vitro*. *The Journal of Parasitology* 68: 650–652
- **Skelly P. J., Shoemaker Ch. B. (2000):** Induction cues tegument formation during the transformation of *Schistosoma mansoni* cercariae. *International Journal of Parasitology* 30: 625–631
- **Voge M., Seidel J. S. (1972):** Transformation *in vitro* of miracidia of *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* into young sporocysts. *The Journal of Parasitology* 58: 699–704
- **Wang W., Kirschfink M., Ruppel A. (2006):** *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* cercariae: different effects of protein in medium, of mechanical stress, and of an intact complement system on *in vitro* transformation to schistosomula. *Parasitology Research* 99: 269–274
- **Whitfield P. J., Barlett A., Brown M. C., Marriott C. (2003):** Invasion by schistosome cercariae: studies with human skin explants. *Trends in Parasitology* 19: 339–340
- **Wilks N. E. (1967):** Lung-to-liver migration of schistosomes in the laboratory mouse. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene* 16: 599–60

- **Xia M. Y., Jourdane J. (1991):** Penetration and migration routes of *Schistosoma japonicum* miracidia in the snail *Oncomelania hupensis*. *Parasitology* 103: 77–83
- **Yoshino T. P., Laursen J. R. (1995):** Production of *Schistosoma mansoni* daughter sporocysts from mother sporocysts maintained in synxenic culture with *Biomphalaria glabrata* embryonic (BGE) cells. *The Journal of Parasitology* 81: 714–722
- **Yasuraoka K., Irie Y., Hata H. (1978):** Conversion of schistosome cercariae to schistosomula in serum-supplemented media, and subsequent culture *in vitro*. *The Japanese Journal of Experimental Medicine* 48: 53–60
- **Zbikowska E. (2005):** Do larvae of *Trichobilharzia szidati* and *Echinostoma revolutum* generate behavioral fever in *Lymnaea stagnalis* individuals? *Parasitology Research* 97: 68–72