

UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

**PRŮBĚH A VÝSLEDKY KULTIVACE
MODELOVÉHO PARAZITA MOTOLICE
JATERNÍ (*Fasciola hepatica*) V OVCI DOMÁCÍ
(*Ovis aries*)**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Jiří Lamka, CSc.

Hradec Králové 2018

Zdeňka Čermáková

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.“

Podpis:

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Jiřímu Lamkovi, CSc. za odborné vedení, konzultace, poskytnutí studijních materiálů, čas a trpělivost. Dále mé díky patří také PharmDr. Ivanu Vokřálovi, Ph.D. za pomoc se zpracováním dat, zapůjčení mikroskopu a konzultace. Chci také poděkovat Bc. Ježkové a Katedře parazitologie Přírodovědecké fakulty UK v Praze za poskytnutí výsledků z imunologického vyšetření a PharmDr. Virtové za zaškolení v laboratorních diagnostických metodách. V neposlední řadě děkuji své rodině a přítelovi za podporu a trpělivost.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Student/ka: Zdeňka Čermáková

Školitel: Prof. RNDr. Jiří Lamka, CSc.

Název diplomové práce: Průběh a výsledky kultivace modelového parazita motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) v ovci domácí (*Ovis aries*)

Fasciolóza je parazitární onemocnění způsobené motolicí jaterní (*Fasciola hepatica*). Tato parazitóza je významným onemocněním hospodářských zvířat, volně žijící zvěře a v některých částech světa i člověka. Působí snížení užitekosti a plodnosti zvířat, úbytky hmotnosti a vysoké ekonomické ztráty v chovech.

Cílem této práce bylo detailně popsat průběh experimentální infekce ovcí infikovaných metacerkáriemi *F. hepatica*. Konkrétně byly sledovány změny v krevním obrazu, vylučování vajíček trusem a odpovědi imunitního systému nakažených jedinců. Zjištěné hodnoty byly porovnány s již provedenými studiemi.

Pro průkaz fasciolózy u experimentálně nakažených ovcí byla využita koprologická sedimentační metoda, diferenciální stanovení leukocytů z krevních nátěrů, stanovení hematokritu a imunologická metoda ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays). K experimentu byly použity tři jehnice plemene Texel infikované 200 metacerkáriemi.

Diferenciální diagnostika leukocytů poskytla nejčasnější průkaz o průběhu a stavu experimentální infekce, kdy již od 3. týdne po nákaze lze sledovat zvýšení hladiny eozinofilů. U hematokritu došlo k pozvolnému poklesu hodnot u všech zvířat až o 1/4. K prvnímu vylučování vajíček motolice trusem nastal 10. – 11. týden od nakažení. V 11. týdnu po infekci byla naměřena zvýšená hladina protilátek IgG v průměru o 35 %. Po 16 týdnech studie byla zvířata utracena a z jejich jater byli izolováni dospělci *F. hepatica* pro účely další studie.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Zdeňka Čermáková

Supervisor: Prof. RNDr. Jiří Lamka, CSc.

Title of diploma thesis: The progression and results of the model parasite culturing liver fluke (*Fasciola hepatica*) in sheep (*Ovis aries*)

Fasciolosis is a parasitic disease caused by liver fluke (*Fasciola hepatica*). This parasitosis is a significant disease in livestock, wild animals and in some parts of the world in humans. It causes a decrease in livestock performance and fertility, weight loss and high economic losses in livestock.

The aim of this work was to describe in detail the course of artificial infection of sheep infected with *F. hepatica* metacercaria. Specifically, changes in blood count, egg excretion, and response of the immune system of infected individuals were monitored. The observed values were compared with the studies already performed.

The demonstration of fasciolosis in artificially infected sheep was performed using the coprological sedimentation method, the differential determination of leukocytes from the blood layers, the determination of hematocrit and the immunological method ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays). Three lambs of Texel breeds infected with 200 metacercaria were used for the experiment.

Differential leukocyte diagnostics provided the earliest evidence of the status and condition of the artificial infection, where elevation of eosinophils can be observed from the 3rd week after the infection. Hematocrit showed a slow decrease in all infected animals up to 1/4. The first excretion of eggs occurred in the 10th and 11th week of the infection. In the 11th post-infection week, elevated IgG antibody levels were detected by 35 %.

After 16 weeks of the study, the animals were discarded and *F. hepatica* adults were isolated from their liver for further studies.

Obsah

1. Seznam zkratk	7
2. Úvod	8
3. Teoretická část	9
3.1. Ovce domácí (<i>Ovis aries</i>)	9
3.1.1. Systematické zařazení	9
3.1.2. Chov ovcí	9
3.2. Nejčastější endoparazitózy ovce domácí	10
3.2.1. Tasemničnatost.....	10
3.2.2. Plicní červivost.....	10
3.2.3. Slezová a střevní červivost.....	11
3.2.4. Motoličnatost	11
3.3. Motolice jaterní (<i>Fasciola hepatica</i>)	11
3.3.1. Systematické zařazení	11
3.3.2. Charakteristika jednotlivých stádií.....	12
3.3.3. Vývoj motolice jaterní	14
3.3.4. Mezihostitel.....	16
3.3.5. Klinické příznaky fasciolózy u definitivních hostitelů	18
3.3.6. Terapie a prevence	19
3.3.7. Helmintorezistence.....	21
3.3.8. Fasciolóza u člověka	22
3.4. Diagnostika	23
3.4.1. Koprologie	23
3.4.2. Hematologie	24
3.4.3. Imunologie	25
4. Cíle	27
5. Experimentální část	28
5.1. Materiály	28
5.1.1. Experimentální zvířata.....	28
5.1.2. Experimentální nákaza.....	28
5.2. Metodika koprologického vyšetření	29
5.2.1. Použité pomůcky, přístroje	29
5.2.2. Modifikovaná sedimentační metoda (kvantitativní ovoskopická metoda).....	30
5.3. Metodika hematologického vyšetření.....	30

5.3.1. Použité pomůcky, přístroje	31
5.3.2. Metoda vyšetřování krevního obrazu.....	31
5.3.3. Stanovení hematokritu	32
5.4. Metodika sérologického vyšetření ELISA.....	32
5.4.1. Použité pomůcky, přístroje	32
5.4.2. Metoda ELISA	33
6. Výsledky	35
6.1. Koprologické nálezy.....	35
6.2. Hematologická vyšetření	36
6.2.1. Stanovení diferenciálního počtu leukocytů.....	36
6.2.2. Stanovení hematokritu	38
6.3. Sérologické vyšetření.....	38
6.4. Výsledky pitvy.....	39
7. Diskuze	41
8. Závěr.....	44
9. Literatura	45

1. Seznam zkratek

<i>C. novyi</i>	<i>Clostridium novyi</i>
<i>G. truncatula</i>	<i>Galba truncatula</i>
EDTA	ethylendiaminotetraoctová kyselina
EPG	eggs per gram
ES produkty	exkrečně sekreční produkty
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assays
<i>F. hepatica</i>	<i>Fasciola hepatica</i>
GGT	gama-glutamyltransferáza
GLDH	glutamátdehydrogenáza
TCBZ	triklabendazol

2. Úvod

Endoparazitózy přežvýkavců jsou celosvětově významnou skupinou onemocnění, jak z veterinárního, tak i humánního hlediska. Právě sem řadíme i onemocnění působené zástupcem třídy motolic - motolicí jaterní (*Fasciola hepatica*). Motolíčnatost hospodářských a volně žijících zvířat může představovat, zvláště pak v některých oblastech, velmi závažný problém (Kašný *et al.* 2010). Také lidská fasciolóza v některých částech světa (např. v Bolívii) je pro svou vysokou prevalenci vážným problémem (Parkinson *et al.* 2007).

Vývoj motolice jaterní je závislý na mezihostiteli, jímž je plž bahnatka malá (*Galba truncatula*). Definitivními hostiteli v životním cyklu těchto motolic se pak stávají především velcí býložraví savci (např. ovce, skot aj.) a také jím může být i člověk (Forejtek *et al.* 2013).

Závažnost onemocnění závisí hlavně na množství pozřených infekčních stádií. Pozřením velkého počtu dochází k akutnímu průběhu onemocnění, který může vést až k náhlému úhynu zvířat. Při pozření menšího množství motolic dochází k chronickému průběhu onemocnění projevujícím se např. anemií a poklesem užitkovosti. U ovcí končí fasciolóza často úhynem. U skotu bývá průběh onemocnění bez vnějších příznaků (Kassai 1999, Taylor *et al.* 2005). Mimo úhynu jsou další ztráty způsobeny snížením výtěžku mléka a snížením plodnosti, dále sníženou produkcí masa a konfiskací jater (Schweizer *et al.* 2005).

Teoretická část této práce stručně shrnuje nejběžnější endoparazitózy ovce domácí. Blíže se zaměřuje na původce fasciolózy - motolici jaterní, její životní cyklus, mezihostitele a působení na organismus definitivního hostitele. Následně jsou uvedeny možnosti prevence a léčby této parazitózy a diagnostické metody. V experimentální části je sledován vliv motolice jaterní na organismus *in vivo*. Modelovým organismem se staly jehnice plemene Texel.

Pro evidenci stavu experimentální infekce bylo využito laboratorních metod, konkrétně koprologické sedimentační metody, hematologického vyšetření a sérologického vyšetření.

3. Teoretická část

3.1. Ovce domácí (*Ovis aries*)

Experimentálním zvířecím druhem této studie byla ovce domácí. Vybraní jedinci byli uměle infikováni *F. hepatica* a následně byl sledován průběh infekce.

3.1.1. Systematické zařazení

Říše: Živočichové (*Animalia*) Kmen: Strunatci (*Chordata*) Třída: Savci (*Mammalia*) Řád: Sudokopytníci (*Artidactyla*) Podřád: Přežvýkaví (*Ruminantia*) Čeleď: Turovítí (*Bovidae*) Rod: Ovce (*Ovis*) Druh: Argali (Kuchtík 2007)

3.1.2. Chov ovcí

Ovce domácí je chována pro svůj mnohostranný užitek a vysokou odolnost vůči klimatickým podmínkám. Nejen že poskytuje produkty k lidské spotřebě jako maso, mléko, vlnu a další vedlejší produkty - lanolin, střeva, lůj, ale je i nedílnou součástí při úpravě krajiny a vypásání míst, kam se jiná zvířata ani zemědělské stroje nedostanou.

Mezi nejčastější plemena s masnou užitkovostí chovaná v České republice patří plemena Texel, Suffolk, Charolais, s kombinovanou užitkovostí je to např. Cigája a Šumavská ovce či Romanovská ovce. Pro produkci vlny jsou chovány ovce plemene Merino a pro produkci mléka např. Vychodofřízská ovce (Skoupá 2014).

Ovce patří mezi přežvýkavce. Přežvykováním tráví zhruba jednu třetinu dne. Hlavní složku potravy tvoří travnaté porosty a jetelina (Kottferová *et al.* 2008). Chov v letním období probíhá hlavně na pastvinách, s tím jsou spjaty i veterinární úkony nutné k minimalizaci rizik spojených s nemocemi různého původu a zdravotními problémy (Skoupá 2014).

3.2. Nejčastější endoparazitózy ovce domácí

Parazité zatěžující chov ovcí mají celkově negativní vliv na užitkovost, životaschopnost jehňat, produkci a reprodukci ovcí a zvyšují náchylnost k infekcím. Mezi významné parazitologické nálezy se řadí motolice, tasemnice, plicní, střevní a slezová červivost (Horák 2012). Dalšími parazity, postihující především mláďata do 3 měsíců věku, jsou škrkavky. Také se můžeme u ovcí setkat s kokcidiózou (Skoupá 2014).

3.2.1. Tasemničnost

Původcem onemocnění je tasemnice rodu *Moniezia* (Horák 2012). Parazitují u ovcí, koz, skotu a u lesní zvěře (Volf a Horák 2007). Jsou lokalizovány v tenkém střevě jedince (Kassai 1999). Rostou rychlostí až 8 cm za den a v dospělosti měří až 4 m. Zralý článek, ve kterém se nachází vajíčka, je vylučován trusem do prostředí. Přenos probíhá přes mezihostitele kontaminovanou pastvou (Horák 2012). Tato tasemnice způsobuje koliky, průjmy, ztrátu užitkovosti až úhyny mláďat (Volf a Horák 2007). K terapii se používá niklosamid, praziquantel, benzimidazolová anthelmintka (Kassai 1999).

3.2.2. Plicní červivost

Onemocnění je vyvoláno plicnivkami z rodů *Müllerius* a *Protostrongylus*. Jedná se o malé červi, kteří napadají dýchací ústrojí hostitele. Způsobují záněty plicní tkáně, kašel a rozvoj sekundární infekce. Při diagnostice nalézáme v trusu postižených zvířat larvičky původce. K léčbě se používají léčiva ze skupin benzimidazolů a makrocyclických laktonů (Horák 2012).

3.2.3. Slezová a střevní červivost

Jedná se o významnou parazitózu způsobenou oblémy červy z několika rodů. *Heamonchus* a *Ostertagia* parazitují ve slezu. *Trichostrongylus*, *Nematodirus*, *Bunostomum* napadají tenké střevo. *Chabertia*, *Oesophagostomum* a *Trichuris* parazitují v tlustém a slepém střevě. Jsou to vláskovití až nitkovití červi způsobující akutní zánět střev, průjem, ztrátu chuti k jídlu a úhyny jehňat během 2 – 3 dnů. Stejně jako u plicní červivosti lze léčit pomocí anthelmintik ze skupin benzimidazolů a makrocyclických laktonů (Horák 2012).

3.2.4. Motoličnatost

Onemocnění přežvýkavců způsobené druhy *F. hepatica*, *Dicrocoelium dendriticum* a *Paramphistomum spp.* Zástupci těchto druhů napadají játra a žlučovody a způsobují tím anemii, úbytek na váze a žloutenku. Mají složitý vývojový cyklus (Horák 2012). Tato práce se věnuje právě jednomu z těchto významných druhů motolic, a to motolici jaterní (*F. hepatica*). Proto je jeho podrobnějšímu popisu věnována následující kapitola.

3.3. Motolice jaterní (*Fasciola hepatica*)

Parazitem vybraným pro tuto studii je motolice jaterní (*F.hepatica*).

3.3.1. Systematické zařazení

Kmen: *Platyhelminthes*, Třída: *Trematoda*, Podtřída: *Digenea*, Řád: *Echinostomida*, Čeleď: *Fasciolidae*, Rod: *Fasciola*, Druh: *Fasciola hepatica* (Svobodová et al. 2013)

3.3.2. Charakteristika jednotlivých stádií

Motolice jaterní se vyskytuje celosvětově, převládá v mírných oblastech a vyšší nadmořské výšce v tropickém a subtropickém pásmu. Infekce probíhá pozřením kontaminované pastvy nebo sena. Přenos z matky na mládě v děloze je možný, ale ne tak častý (Kassai 1999).

Konečným hostitelem jsou především ovce a ostatní přežvýkavci, ale nalezena byla i u psa, kočky, králíka, koně a dalších savců (Sedlák a Tomšíčková 2006). Také u volně žijících zvířat zejména u muflonů, jelenů, srnčí zvěře, ale i u divokých prasat se můžeme s fasciolózou setkat (Forejtek *et al.* 2013). Tento druh motolice má velký význam pro veterinární medicínu a ekonomiku chovů (Zajac a Conboy 2012).

Vajíčka motolice jaterní mají oválný tvar a jsou žlutohnědá. Velikost vajíček je 130 - 150 μm a na šířku 60 - 90 μm . Každé vajíčko má rozlišitelné víčko - *operculum* (Hendrix 2006). Pod mikroskopem lze pozorovat stavbu vajíčka. Tenká stěna ohraničuje vajíčko a téměř celé je vyplněno granuly (Taylor *et al.* 2005). Při vyloučení se každé vajíčko skládá z oplodněných buněk a shluku zárodečných buněk (Bowman *et al.* 1999).

Dalším stádiem je miracidium, které měří 0,01 - 0,35 mm. Na těle miracidia se nachází apikální papila nazývaná též *terebratorium* sloužící k přísátí na plže. Na povrchu je pokryto ciliárními buňkami napomáhající k pohybu. Někdy může mít miracidium i *stylet* – útvar, který usnadňuje průnik do mezihostitele (Bowman *et al.* 1999, Volf a Horák 2007). Miracidium může disponovat až dvěma pigmentovanými světločivnými skvrnami a receptory napomáhající k nalezení mezihostitele. Můžeme u něj pozorovat chemotaxi, fototaxi a geotaxi (Volf a Horák 2007). Toto stádium má rudimentální exkreceční systém a shluk zárodečných buněk (Bowman *et al.* 1999). Uvnitř těla vzniká nepohlavním rozmnožováním další generace, přetváří se do mateřské sporocysty, která je oválná až protáhlá a obsahuje pouze zárodečné buňky. Živiny tedy přijímá celým povrchem těla a musí tak být v kontaktu s tkáněmi plže (Volf a Horák 2007). Každá zárodečná buňka se rozmnožuje dělením a stává se zárodečným vakem vyvíjejícím se v další stádium – redie (Bowman *et al.* 1999).

Redie je larvální stádium mající ústní přísavku, trávicí soustavu a embryonální prostor se zárodečnými buňkami (Taylor *et al.* 2005, Volf a Horák 2007). Larva je protáhlého tvaru, na jejím povrchu nalezneme výrůstky, jimiž si pomáhá při pohybu (Volf a Horák 2007).

Cerkárie má diskoidní tvar těla s dlouhým ocáskem o velikosti desetin milimetru až 1 mm (Bowman *et al.* 1999, Volf a Horák 2007). Objevují se u ní již určité rysy dospělého jako např. ústní a břišní přísavka, hltan, ústa, střevo, exkrementální systém a základ reprodukčního aparátu (Bowman *et al.* 1999). Nalezneme u nich různé žlázové buňky např. cytogenní žlázy k tvorbě metacerkariálního obalu. Mohou mít i smyslové orgány jako chemoreceptory či oční skvrny určené k orientaci na hostitele (Volf a Horák 2007). Později ztrácí ocásek a probíhá jejich encystace na vodních rostlinách a zamokřené trávě. Tím přecházejí v infekční stádium metacerkárie (Svobodová *et al.* 2013, Bowman *et al.* 1999).

Metacerkárie je poslední larvální stádium. Jsou obklopeny odolnými vrstvami polysacharidového a skleroproteinového charakteru, které je chrání před vlivy vnějšího prostředí. Může u nich probíhat další vývoj vnitřních orgánů (Volf a Horák 2007).

Mladé motolice jaterní, Bowman *et al.* (1999) a Taylor *et al.* (2005) toto stádium nazývají marita, měří v období prostupu do jater pouze 1 - 2 mm. Tvar těla nedospělého jedince je podobný lancetě (Taylor *et al.* 2005).

Dospělá motolice jaterní má dorzoventrálně zploštělé tělo listovitého tvaru šedohnědé barvy, měří 2 - 3 cm na délku a je široká až 1 cm. Na těle se nachází dvě přísavky – na předním konci okolo úst je ústní přísavka a ventrálně umístěná je břišní přísavka (Kassai 1999). Dospělci jsou z převážné části tvořeni reprodukčními orgány, a to jedním vaječným a dvěma varlaty, která jsou dendritická. Ústa jsou spojena prostřednictvím jícnu k párovému slepému střevu. Slepé střevo je složitě větvené ve dva tubulární vaky (Bowman *et al.* 1999).

3.3.3. Vývoj motolice jaterní

F. hepatica je hermafrodit s nepřímým životním cyklem (viz Obr. 1), který je komplikovaný (Kassai 1999). Mezihostitelem je obojživelný plž rodu *Lymnaea* (Sedlák a Tomšíčková 2006).

Dospělá motolice jaterní se vyskytuje v žlučovodech hostitele. Její vajíčka jsou nejprve vyloučena do žluče a s ní odplavena do žlučového měchýře (Bowman *et al.* 1999).

Se žlučí se dostávají do střeva a poté s výkaly do vnějšího prostředí (Taylor *et al.* 2005, Bowman *et al.* 1999). Na rozdíl od vajíček hlístic se z jediného vajíčka motolice může vyvinout až několik set dospělců, což je klíčové pro jejich životní cyklus (Taylor *et al.* 2005).

Vajíčka motolice jaterní se šíří trusem do prostředí a ve vlhké půdě nebo ve vodě se vyvíjejí v obrvené miracidium (Sedlák a Tomšíčková 2006). Vývoj vajíček ovlivňují faktory vnějšího prostředí, jimiž jsou dostupnost kyslíku a teplota. Líhnutí miracidii ovlivňuje i světlo, osmotické parametry prostředí a také teplota (Volf a Horák 2007). Při letních teplotách je toto stadium dostatečně vyvinuto a připraveno k vylíhnutí po 2 - 4 týdnech (Bowman *et al.* 1999). Nejrychlejší vývoj trvá pouhých 9 dní, a to při teplotě 26 °C (Kassai 1999).

Miracidium opouští vajíčko otevřením *opercula* (víčka), následně plave a vyhledává vhodný druh plže (Taylor *et al.* 2005). Mezihostitelem je většinou jen jediný druh plže. U motolice jaterní se jím stává *Galba truncatula* z rodu *Lymnaea*, česky bahnatka přežívající na podmáčených pastvinách (Volf a Horák 2007).

Pokud se miracidium nepodaří nalézt vhodného plže do 24 hodin, spotřebuje své energetické zásoby a hyne (Bowman *et al.* 1999). Při úspěšném nalezení mezihostitele se dostává miracidium do těla plže a naruší tělní stěnu pomocí sekretu z apikální žlázy, který obsahuje proteolytické enzymy (Volf a Horák 2007). Ztrácí cilie z povrchu těla a migruje do gonád nebo trávicích žláz plže. Vytváří se z něj sporocysta (Taylor *et al.* 2005). V zárodečných buňkách se vyvíjí další generace larev, které se uvolní po prasknutí stěny. Tato generace se nazývá redie (Volf a Horák 2007).

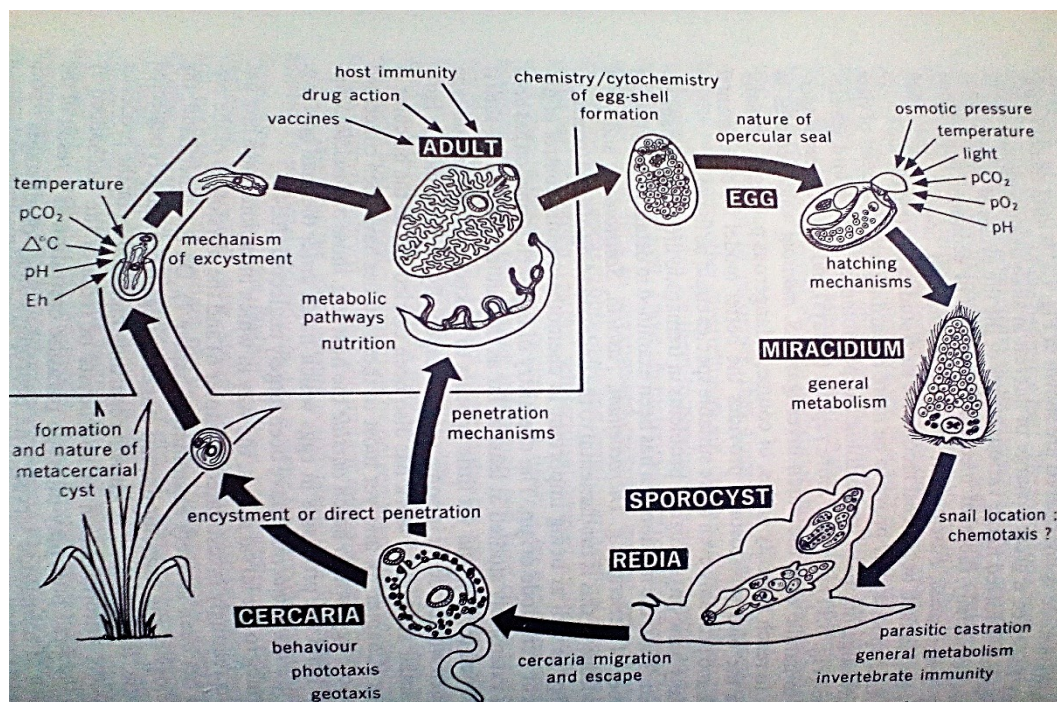
V redii se vyvíjí další stádium larvy - cercárie (Bowman *et al.* 1999). Nepohlavní vývoj v plži je také závislý na teplotě a trvá 2 až několik měsíců (Kassai 1999).

Infikovaný plž uvolňuje až několik set cercárií do vodního prostředí (Sedlák a Tomšíčková 2006). Když je cercárie plně vyvinuta, opouští *lumen* redie a dostává se z plže do okolního vodního prostředí. Po krátkém plutí migruje v malé vzdálenosti nad vodní úroveň na povrch rostlin, encystuje se, ztrácí ocásek a stává se metacercárií (Bowman *et al.* 1999). Cytogenními žlázkami probíhá encystace velice rychle a je hotova během 1 hodiny.

Cysta metacercáriím poskytuje dobrou odolnost vůči vnějšímu prostředí. Největším rizikem je pro ně vyschnutí (Volf a Horák 2007, Smyth a Halton 1983). Čekání na konečného hostitele může ve vlhkém prostředí trvat i několik měsíců (Sedlák a Tomšíčková 2006). Stádium metacercárie je již infekčním stádiem pro definitivního hostitele (Bowman *et al.* 1999). Vývoj z miracidia k metacercárii trvá 6 - 7 týdnů, při nepříznivých podmínkách i několik měsíců (Taylor *et al.* 2005).

Po požití metacercárie probíhá excystace v trávicím traktu definitivního hostitele působením místních faktorů např. kyseliny, žluče, enzymů nebo samotných sekretů metacercárie (Volf a Horák 2007, Smyth a Halton 1983). Mladé motolice prostupují stěnu tenkého střeva a jater 4 - 6 dní (Kassai 1999).

Nedospělí jedinci se živí převážně jaterními buňkami a krví (Smyth a Halton 1983). Po 6 - 8 týdnech migrování v jaterním parenchymu vstupují do žlučových, dospívají a začínají vylučovat vajíčka (Bowman *et al.* 1999, Beesley *et al.* 2017). Prepatentní perioda (období mezi napadením definitivního hostitele parazitem a prvním záchytem infekčních stádií parazita) trvá 6 - 12 týdnů (Kassai 1999). Celý cyklus probíhá 3 - 4 měsíce při ideálních podmínkách (Bowman *et al.* 1999). V praxi se setkáváme se dvěma obdobími, při kterých propuká infekce metacercáriemi. První období tzv. letní infekce nastává od srpna do října. S druhým obdobím infekce se setkáváme hlavně v oblastech s mírnější zimou. Na těchto územích se v prostředí metacercárie vyskytují od května do června. V oblastech s tužší zimou probíhá většinou jen letní infekce (Kassai 1999, Taylor *et al.* 2005).



Obr. 1 Životní cyklus motolice jaterní

Převzato z: Smyth a Halton 1983

3.3.4. Mezihostitel

Mezihostitelem jsou plži z rodu *Galba* (*Lymnaea*), z nichž nejběžnější v Evropě je bahnatka malá (*G. truncatula*). Je to obojživelný plž vyskytující se po celém světě (Taylor *et al.* 2005). Jako další potenciální mezihostitelé v Evropě jsou hlášeni také *Lymnaea palustris*, *Omhiscla glabra*, *Radix balthica*, *Succinea spp.* a *Potamopyrgus antipodarum*. Nález v těchto druzích může být náhodný nebo nemusí nutně vést k produkci cercárii, ale přesto mohou sloužit jako rezervoáry infekce (Beesley *et al.* 2017).

G. truncatula dorůstá velikosti 0,5 cm, generační období trvá 4 - 5 týdnů nebo déle, záleží na teplotních podmínkách (Kassai 1999). Za jeden rok může mít až 3 generace potomstva a její život trvá přibližně 1 rok (Welter-Schultes 2012). Někteří plži přežijí i v suchých bažinách (estivace) nebo v ledu (hibernace), (Kassai 1999).

Nejčastěji tyto plže nalezneme v mělčinách stojatých vod, v pomalu tekoucích malých potocích, ve větších vodách jen na krajích, kde může být přichycena na vodní rostliny či kameny. Najdeme je např. i v cisterně na vodu či ve vlhčích lesích a na zamokřených loukách. Toleruje prostředí do pH 9,6. Nadměrně kyselé prostředí jí škodí (Taylor *et al.* 2005, Horsák *et al.* 2013, Welter-Schultez 2012). Vlhké prostředí potřebuje bahnatka k rozmnožování (Welter-Schultez 2012). K úspěšné reprodukci je také potřeba vhodná teplota. Optimální teplota pro vývoj bahnatky je mezi 15 až 22 °C, pro reprodukci je nutná teplota vyšší než 10 °C, při 5 °C se její vývoj zastavuje (Taylor *et al.* 2005).

Volf a Horák (2007) se také zmiňují o fyziologickém ovlivnění mezihostitele tzv. parazitární kastrací. Tímto procesem přeměruje parazit část energie mezihostitele určenou pro reprodukci na růst a obranu organismu. Tím prodlouží přežívání svého hostitele a zvýší tak počet potomstva, které vyprodukuje za jeho život. Kastrovaní jedinci bývají větší než starší plži.

Bahnatka malá (viz Obr. 2) je významným přenašečem parazitárních onemocnění. Slouží jako mezihostitel nejen pro motolici jaterní, ale i dalším druhům parazitů (Horsák *et al.* 2013, Welter-Schultez 2012).

Mezi jiné druhy vyskytující se mimo Evropu patří např. *L. tomentosa* v Austrálii a na Novém Zélandě, *L. humilis* v severní Americe, *L. viator*, *L. diaphena* a *L. cubensis* v jižní Americe (Taylor *et al.* 2005).



Obr. 2 Bahnatka malá (*G. truncatula*)

Převzato z:

<http://www.molluscs.at/gastropoda/index.html?/gastropoda/parasites/fasciola.html>

3.3.5. Klinické příznaky fasciolózy u definitivních hostitelů

Motolice způsobují poškození organismu několika mechanismy - mechanicky destrukcí parenchymu a krevních cév jater nedospělými jedinci a iritací epiteliálních švů žlučovodů dospělci. Svými sekrety a exkrety působí toxicky na organismus. Zapříčiňují ztráty krve jejím sáním a hemoragiemi na játrech (Kassai 1999). V první fázi onemocnění probíhá migrace mladých motolic jaterním parenchymem, v druhé fázi jsou dospělci přítomni v žlučovodech (Taylor *et al.* 2005).

U ovcí probíhá fasciolóza ve formě akutní, subakutní nebo chronické (Taylor *et al.* 2005). Manifestace příznaků závisí na migraci vyvíjejícího se parazita, počtu pozřených infekčních stadií a na imunitní odpovědi hostitele (Caffrey 2012).

Akutní forma je charakterizována pozřením většího množství metacerkárií v krátkém časovém úseku (Kassai 1999). Tato forma je spojena s narušením tkáně způsobené migrací nedospělých jedinců skrz stěnu dvanáctníku, peritonea, jaterního obalu a parenchymu (Caffrey 2012). V akutní formě probíhá traumatická hemoragická hepatitida s nálezem mitochondriálních enzymů destruovaných hepatocytů (aspartátaminotransferáza, glutamátdehydrogenáza, sukcinátdehydrogenáza) v plasmě. Charakteristickými symptomy jsou peritonitida, nechutenství, snížení hmotnosti, ascites, bledé sliznice, horečka, neochota k pohybu, dyspnoe, bolestivosti břišní dutiny a zvětšení jater. Náhlý úhyn přichází do 2 - 5 týdnů po masivní infekci zapříčiněné krvácením v játrech. Tato forma nastává vzácně (výhradně u ovcí) a trvá jen několik dní (Kassai 1999, Taylor *et al.* 2005).

Subakutní forma fasciolózy u ovcí je zapříčiněna pozřením metacerkárií v delším časovém intervalu oproti akutní fázi. Některé motolice se již dostávají do žlučovodů, kde působí cholangitidu, další ještě provrtávají parenchym. Tato forma probíhá asi 6 - 10 týdnů. U postižených zvířat se vyskytují anemie, hypoalbuminemie, až úhyn. Přibližně 1 - 2 týdny před úhynem se objevují příznaky onemocnění jako ztráta hmotnosti, nechutenství, zvětšená a bolestivá játra. Subakutní forma se nejčastěji projevuje na konci podzimu a v zimě (Taylor *et al.* 2005).

U chronické formy pozorujeme u nemocných zvířat postupnou ztrátu hmotnosti, nechutenství, anemii spojenou s bledostí sliznic a hypoalbuminemií. S infekcí je také spojen edém lokalizovaný pod čelistí (bottle jaw), (Taylor *et al.* 2005). Edém je způsoben poklesem hladiny celkové bílkoviny v krvi pod 40 - 50 g/l a albuminu pod 20 - 30 g/l z důvodu krvácení (Doubek 2010). Výskyt gama-glutamyltransferázy v plasmě indikuje chronické poškození žlučovýchodů. Chronická forma trvá několik měsíců (Kassai 1999). Období manifestace onemocnění připadá hlavně na přelom zimy a jara (Taylor *et al.* 2005). Průběh nemoci závisí také na celkovém stavu zvířete (Kassai 1999).

K fasciolóze patří i riziko fatálního onemocnění klostridiální nekrotickou hepatitidou také nazývanou „black disease“. Onemocnění propuká, pokud jsou v těle jedince přítomny spory bakterie *Clostridia novyi*. Jaterní léze, způsobené migrací mladých motolic, mohou aktivovat spory *C. novyi*. Trauma pak tvoří prostředí pro množení spor a sekreci toxinů do těla (Kassai 1999, Bowman *et al.* 1999, Riviere a Papich 2009). Dnes je toto onemocnění méně časté díky vakcinaci proti klostridiálním infekcím (Taylor *et al.* 2005).

3.3.6. Terapie a prevence

Fasciolózu lze kontrolovat podáním anthelmintik definitivním hostitelům a dodržováním vhodných zoohygienických opatření. Pro zabránění infekce motolicemi jsou důležitá preventivní opatření, mezi která nezbytně patří odvodňování pastvy, redukce populací mezihostitelských plžů, dodržování hygieny napájení a dehelmintizace zvířat v zimním období (Illek a Jirásek 2014, Volf a Horák 2007).

V praxi se využívají vodohospodářské úpravy nebo chemické tlumení plžů, které ovšem svou nespecifičností narušuje celý ekosystém. Dále jsou také známy moluskocidní účinky extraktů některých rostlin (čeled' *Euphorbiaceae* a *Phytolaccaeae*) a účinné je i zavedení přirozených predátorů plžů. I zde se ovšem setkáváme s otázkou, zda-li nemůže dojít k narušení rovnováhy celého ekosystému (Volf a Horák 2007).

Anthelmintika se podávají nejen léčebně, ale i preventivně. Léčiva proti motolicím se dělí dle chemické struktury do pěti skupin: 1. halogenované fenoly, 2. salicylanilidy, 3. benzimidazoly, 4. sulfonamidy, 5. fenoxiyalkany (Novobilský a Koudela 2005). Na přelomu dubna a května jsou podány léčiva působící proti dospělým motolicím. Mezi tato léčiva patří triklabendazol, nitroxynil, klosantel, rafoxanid, oxyklozanid, klorsulon (Taylor *et al.* 2005, Riviere a Papich 2009). V říjnu se přeléčí celé stádo antitrepatody zasahujícími stadia motolic žijící v parenchymu jater. V lednu se použijí léčiva proti nedospělým i dospělým stádiím. Dále se také v letech s nadměrnými srážkami doporučuje podání léčiv proti starším stádiím motolic v červnu a proti nedospělým stádiím čtyři týdny po říjnové dávce.

Při akutním průběhu onemocnění se zvířata přesunou mimo kontaminované pastviny. Mohou být uzavřena do stáje nebo přesunuta na jinou pastvinu, kde se nevyskytují metacerkárie (Kassai 1999). V terapii fasciolózy se zatím nejlépe osvědčil TCBZ (Novobilský a Koudela 2005)

Boray *et al.* (1983) testovali ve své práci efektivitu podání různých dávek TCBZ. TCBZ poskytuje vysokou efektivitu proti nedospělým i dospělým stádiím *F. hepatica* v závislosti na dávce. Dávka 5 mg/kg spolehlivě usmrtila dospělá stadia 12 týdnů stará. Na stadia mladší musela být použita vyšší dávka TCBZ. Až stoprocentní účinnost proti 2, 4 a 6 týdenním motolicím vykazovala dávka 10 mg/kg a dávka 15 mg/kg působila s vysokou účinností už 1. den po infekci.

Mechanismus účinku TCBZ a ostatních benzimidazolů spočívá v narušení využitelnosti β -tubulinu motolicí. Naváže se na místo pro kolchicin a narušuje tak tvorbu mikrotubulů. Narušuje funkci vylučovacích orgánů, mitotickou aktivitu spermatogenních buněk a zárodečných buněk (Riviere a Papich 2009, Novobilský a Koudela 2005). Dalším používaným benzimidazolem je albendazol (Bowman *et al.* 1999). Mezi další používaná léčiva patří klosantel a nitroxynil. Tato léčiva eliminují stadia motolice stará 4 - 6 týdnů a je nutné, aby léčba byla po 4 až 6 týdnech zopakována. Pokud není možnost stádo přestěhovat na jinou pastvu, opakuje se léčba každé 3 týdny po dobu 6 týdnů (Taylor *et al.* 2005).

Při subakutní a chronické formě se používají léčiva efektivní proti stádiu o stáří 6 a více týdnů (nitroxynil, klosantel, rafoxanid, TCBZ), (Kassai 1999).

Opět je nutné přemístění na jinou pastvinu. Pokud není tato možnost, tak po 4 a 8 týdnech se zopakuje léčba kvůli dospívajícím motolicím (Taylor *et al.* 2005)

Ovce a kozy, na rozdíl od skotu, myši a potkanů, nezískávají rezistenci vůči opakujícím se infekcím (Smyth a Halton 1983, Raadsma *et al.* 2007). U skotu dochází k fibrotickým změnám jaterního parenchymu, což brání migraci nedospělých motolic do žlučových, a tak dochází k eliminaci sekundární infekce (Kassai 1999).

3.3.7. Helmintorezistence

Rezistence helmintů na léčiva způsobuje vážné problémy ve veterinární medicíně a také ohrožuje zdraví člověka (Prichard *et al.* 2007). Rezistencí na anthelmintika se rozumí existence více jedinců v rámci populace helmintů, kteří jsou schopni snášet terapeutickou dávku léčiva ve srovnání s citlivou populací stejného druhu parazita (Nováková a Koudela 2006). Úplné rezistence je dosaženo, když maximální dávka léčiva, kterou hostitel toleruje, nemá žádný efekt na parazita (James *et al.* 2009).

Anthelmintika zatím zůstávají hlavním prostředkem kontroly hlístových infekcí u zvířat i lidí. Přetrvávající závislost na těchto léčivých přípravcích přispívá k selekčnímu tlaku na parazity, což vede k vzniku rezistentních jedinců (Prichard *et al.* 2007).

Rezistence se může vyvinout při častém používání stále stejného anthelmintika, ale její vznik hrozí i při opakovaném užívání léčiv patřících do stejné skupiny anthelmintik, proto je vhodné léčiva střídat (Taylor *et al.* 2005, Kassai 1999). Dále se může rozvinout i při podávání léčiv v nižší koncentraci než je účinná dávka (James *et al.* 2009).

Existuje několik mechanismů utváření rezistence. Může dojít ke změně cílové struktury účinné látky, také mohou být pozměněny metabolické dráhy parazita, což vede k přeměně látky na neúčinnou formu, dále dochází i k změnám distribuce léčiva v napadeném jedinci, takže je přesměrováno mimo místa infekce nebo dochází k amplifikaci cílových genů bránících účinku léčiva (Wolstenholme *et al.* 2004).

Ačkoli rezistence motolic na léčiva dosud nedosáhla takové úrovně, jako je tomu např. u nematod, existuje již rezistence pro salicylanilidy, rafoxanid a klosantel. Nejzávažnější problém ovšem představuje rezistence na TCBZ (Wolstenholme *et al.* 2004). TCBZ je jediné léčivo, které působí jak na nezralé migrující formy, tak i na dospělé jedince *F. hepatica*. Proto se stal lékem volby. Jeho nadměrné užívání nevyhnutelně vedlo ke vzniku rezistence. Rozšířená rezistence na lék značně ohrožuje kontrolu fasciolózy u hospodářských zvířat a lidí. Mechanismy, které jsou základem rozvoje rezistence, nejsou známy (Kelley *et al.* 2016). V praxi se setkáváme s absencí rychlého a spolehlivého testu pro detekci rezistence. Nejpoužívanější je pravděpodobně metoda faecal egg count reduction test (FECRT) spočívající v počtu vajíček před a po léčbě. V řadě studií je použita metoda egg hatch assay (EHA) – test líhnutí vajíček a coproantigen reduction test (CRT) založený na detekci antigenů v trusu infikovaných zvířat. Beesley *et al.* (2017) zdůrazňuje důležitost rozpoznání jednonukleotidových polymorfismů a molekulárně biologických metod k porozumění biologie motolice. Znalosti genomů parazitů jsou přínosem v boji proti infekcím způsobených helminty.

3.3.8. Fasciolóza u člověka

Rozšíření fasciolózy u člověka je v některých venkovských oblastech zemí s extrémní chudobou např. v jižní Americe a v Iránu vážným problémem. Prevalence není přímo spojena s výskytem u hospodářských zvířat a lidí (Kassai 1999). Člověk se nakazí pozřením rostlin s opouzdřeným parazitem, méně již kontaminovaným ovocem nebo vodou. Nejčastějším zdrojem nákazy člověka jsou syrové saláty z vodních rostlin (Sedlák a Tomšíčková 2006). Možný je také přenos konzumováním pokrmů připravených ze syrových jater infikovaných nedospělými motolicemi. Juvenilní jedinci se mohou přichytit v hltanu a drážděním způsobit bolesti v místě uchycení, edém a krvácení. Souhrnně se tyto symptomy nazývají halzoun (Volf a Horák 2007).

Mezi nejčastější symptomy lidské fasciolózy patří střevní potíže, bolestivost v místě jater, žloutenka z obstrukce žlučových doprovázena hypereozinofilií a anemií, hmotnostní úbytek (Kassai 1999, Volf a Horák 2007).

U člověka byly popsány i motolice vyskytující se v plicích nebo děloze, případně i v podkoží. Do těchto míst se mohou dostat jak migrací, tak krevní cestou (Volf a Horák 2007).

3.4. Diagnostika

K průkazu fasciolózy mohou přispět klinické symptomy projevující se u infikovaných zvířat, sezónní výskyt, předpověď počasí, výskyt onemocnění v dané lokalitě v předchozích letech a výskyt stanovišť plžů (Taylor *et al.* 2005).

Fasciolóza je tradičně diagnostikována především detekcí vajíček ve výkalech. Tato metoda je však použitelná po uplynutí prepatentní periody (Beesley *et al.* 2017).

Ukazatelem epiteliální destrukce v játrech jsou vyšší hladiny GLDH a GGT v krvi. Zvýšení počtu leukocytů, hypereozinofilie, snížení hladiny hemoglobinu a hodnoty hematokritu jsou rovněž projevem onemocnění (Raadsma *et al.* 2007, Kassai 1999, Taylor *et al.* 2005).

U uhynulých zvířat je vhodné uskutečnit pitvu se zaměřením na vyšetření jater a žlučovodů (Kassai 1999, Taylor *et al.* 2005). Při pitvě mohou být nalezena zvětšená hemoragická játra pokrytá fibrinózním exudátem, rozsáhlý rozpad a koagulativní nekróza jaterních buněk a hojná infiltrace zánětlivých buněk. U chronické infekce je pozorována destrukce sliznice žlučovodů a přítomnost dospělých motolic v žlučovodech (Kassai 1999, Rahko 1969).

K monitorování infekce jsou používány také imunodiagnostické metody (Beesley *et al.* 2017). Pro stanovení protilátek v séru byla v této práci zvolena ELISA.

3.4.1. Koprologie

Pro koprologické vyšetření jsou preferovány odběry vzorků přímo z rekta. Ideální je množství okolo 5 g (Taylor *et al.* 2005). Vyšetření trusu probíhá sedimentační metodou (Svobodová *et al.* 2013).

Při této metodě se koncentruje trus i vajíčka na dně tekutého media, obvykle vody. Sedimentace se nepoužívá běžně kvůli znečištění vzorku a tím ztíženému vyhledání vajíček, ale u vajíček motolic má nejlepší uplatnění, protože její vajíčka jsou těžší a někdy i větší než u oblych parazitů (Taylor *et al.* 2005, Bowman *et al.* 1999).

Kvantitativní vyšetření trusu nám udává počet vajíček na gram trusu. Výsledkem je přibližná situace závažnosti infekce, protože exkrece vajíček probíhá u motolice nepravidelně. Závažnější symptomy onemocnění se objevují ještě před vylučováním vajíček (Hendrix 2006, Kassai 1999).

3.4.2. Hematologie

Motolice se živí krví, narušuje parenchym jater a způsobuje krvácení. Tyto vlivy mají dopad na biochemické a hematologické parametry krve. V této práci bylo použito stanovení diferenciálního počtu leukocytů a stanovení hematokritu. Hematologickými metodami stanovíme zastoupení krevních elementů, z nich typickým ukazatelem parazitózy je hypereozinofilie. Hemtaokrit (podíl erytrocytů na objemu krve) se snižuje se ztrátami krve (Doubek 2010, Taylor *et al.* 2005, Raadsma *et al.* 2007). Pro stanovení diferenciálního počtu leukocytů byly zhotoveny krevní nátěry.

Eozinofily v krevním nátěru rozeznáváme dle kulovitého tvaru buňky obsahující uvnitř velká granula a centrální krystaloid. Barva zrn je načervenalá až pomerančová. Jádro je tvořeno dvěma segmenty podobné tvaru brýlí. Eozinofily mají velmi malou populaci. Vývoj v kostní dřeni probíhá 2 – 6 dní a pak se v krevním oběhu vyskytují jen 6 – 12 hodin, v tkáni maximálně 10 dní (Doubek 2003, Toman 2009). Eozinofily se množí zejména při parazitárních a alergických onemocněních a u chronických zánětů. Fagocytují imunitní komplexy a mnohobuněčné parazity pak zabíjejí toxickými produkty. Obsahují lipidy, plazminogen, myeloeroxidásu, histamin a histaminázu. Eozinofily patří mezi granulocyty. Granulocyty jsou leukocyty s jádrem různého tvaru a obsahují granula. Fyziologická hodnota u ovce domácí je 0 - 1 x 10⁹/l, 1 - 6 % (Doubek 2003, Jelínek a Koudela 2003).

Do skupiny granulocytů, pozorovaných v preparátu, řadíme i neutrofil a bazofily. Neutrofil má okrouhý tvar s lehce fialovými a růzovofialovými kulatými granuly. Tvoří až 90% granulocytů v krvi. Produkce se zvyšuje při zánětlivých infekčních procesech, kdy rychle pronikají do tkání postižených zánětem a pohlcují mikroorganismy, především pak opsonizované (označené protilátkou). Je to hlavní buněčná populace při akutním bakteriálním zánětu. Fyziologické hodnoty ovce domácí jsou $0,7 - 6 \times 10^9/l$, 20 – 50 %. Bazofil je rovněž okrouhlého tvaru. Jádro bývá často o dvou segmentech a cytoplazma je většinou šedofialová. Zrna jsou velká tmavomodrá až černá. Jsou to induktory zánětu, regulují propustnost cév, sekreci hlenu, hladkou svalovinu (Doubek 2003, Jelínek a Koudela 2003).

Granulocyty mají různé obranné funkce nespecifické imunity. Vývoj probíhá v kostní dřeni v několika úrovních. V době zralosti vstupují do oběhu. Typicky se v jejich cytoplasmě objevují četná granula. Granulocyty žijí pouze několik hodin.

Lymfocyty a monocyty patří do skupiny agranulocytů. Lymfocyty mají kulatý tvar a velké jádro s malým množstvím modře zbarvené plasmy. Mezi hlavní populace patří T- a B-lymfocyty. Zajišťují specifickou imunitu. $2 - 9 \times 10^9 /l$, 50 - 70%. Monocyt je nepravidelného tvaru s laločnatým jádrem umístěným ve středu či excentricky a má šedomodrou cytoplasmou. Plní roli makrofágů. Fyziologické rozmezí u ovce domácí je 1 – 4 % (Doubek 2003, Toman 2009, Jelínek a Koudela 2003).

3.4.3. Imunologie

Pro detekci motolic v organismu je používána sérologická metoda ELISA. Patří mezi nejcitlivější testy, jejíž princip stojí na imunoenzymatické reakci (Toman 2009). Zjednodušeně ji můžeme popsat tak, že antigen se naváže do jamek sérologické destičky, označí se enzymem a přidá se vyšetřované sérum. Za přítomnosti specifické protilátky v séru s ní antigen reaguje a dojde ke změně barvy roztoku (Ryšková 2000). K detekci se dá použít nejen sérum, ale i slzy, sliny či extrakt z výkalů (Toman 2009).

Protilátky proti *F. hepatica* jsou v séru detekovány 2 – 4 týdny po infekci, hladiny mohou v průběhu infekce klesat nebo stoupat. Dokonce pozitivní výsledek vyšetření nemusí znamenat akutní infekci, nýbrž vystavení organismu infekci dříve (Taylor *et al.* 2005).

4. Cíle

Mezi cíle této diplomové práce patří:

1. Vypracování rešerše o motolici jaterní (*F. hepatica*)
2. Aktivní podíl na realizaci experimentální studie
3. Zajištění průběžného sběru experimentálních vzorků (exkrementy, krev) a jejich laboratorní zpracování (ovoskopie, diferenciální stanovení leukocytů, měření hematokritu, ELISA)
4. Zpracování dat získaných při experimentálních vyšetřeních
5. Izolace dospělců motolice z jater infikovaných jedinců a jejich poskytnutí pro další studie (Katedra biochemických věd FaF UK HK)
6. Vypracování vlastní diplomové práce

5. Experimentální část

5.1. Materiály

5.1.1. Experimentální zvířata

Ke studii byly použity tři jehnice ovce domácí (*Ovis aries*) plemene Texel z hospodářství Dibaq a. s., Helvíkovice 90, kraj Pardubický, registrační číslo hospodářství 53019547. Jehnice byly označeny známkami CZ 75 575/953 (č. 575), CZ 75 591/953 (č. 591) a CZ 75 615/953 (č. 615). Datum narození těchto jehnic bylo 22. 2. 2015 (č. 575), 26. 2. 2015 (č. 591), 20. 4. 2015 (č. 615), přivezeny na farmu v Hořiněvsi byly dne 6. 1. 2016. Před experimentální nákazou metacerkáriemi *F. hepatica* dne 18. 1. 2016 a 28. 1. 2016 byly koprologicky vyšetřeny na přítomnost vajíček motolic.

5.1.2. Experimentální nákaza

Dne 4. 2. 2016 byly jehnicím perorální suspenzí podány metacerkárie o dávce 200 ks metacerkárií/zvíře. Viabilita metacerkárií nebyla z technických důvodů stanovena. Metacerkárie pocházely z laboratorní produkce metacerkárií citlivého kmene *F. hepatica* v Ridgeway Research, Velká Británie. Celý experiment trval 18 týdnů, z toho první dva týdny byly předinfekční. Po celou dobu studie byly 1x týdně odebírány vzorky trusu. Odběr probíhal z rekta do igelitové rukavice, jednotlivé vzorky byly označeny číslem zvířete, vloženy do uzavíratelného sáčku a popsány datem odběru. Odebraný materiál byl uchován při teplotě -18 °C v mrazicím boxu na Katedře farmakologie a toxikologie FaF UK v HK. V den sběru jednotlivých vzorků trusu byla experimentálním zvířatům odebírána také periferní krev do dvou hemosek. V jedné hemosce byla krev ošetřena ethylendiaminotetraoctovou kyselinou (EDTA) v druhé hemosce byla krev bez ošetření. Později byla tato krev využita k získání séra pro imunologické vyšetření, ke stanovení hematokritu a pro přípravu krevních nátěrů.

Na konci studie byla zvířata utracena a z jater izolováni dospělci motolice *F. hepatica*. Tyto si převzala Katedra biochemických věd FaF UK v HK.

5.2. Metodika koprologického vyšetření

Vzorky pro koprologické vyšetření jednotlivých ovcí byly odebírány 1x týdně. První dva odběry proběhly 18. 1. 2016 a 28. 1. 2016. U těchto vzorků byla sledována negativita trusu na vajíčka motolice jaterní. V dalším týdnu proběhla infekce ovcí, poslední sběr vzorků se konal 23. 5. 2016, tedy 16 týdnů po infekci. Vzorky byly označovány termínem a konkrétním číslem jehnice.

Vzorky trusu byly uchovávány v plastových sáčcích na Katedře farmakologie a toxikologie v Hradci Králové k následnému vyšetření. Vajíčka se kvůli své specifické hmotnosti usazují na dně nádoby, proto byla zvolena kvantitativní ovoskopická metoda (sedimentační). Touto metodou byla sledována a identifikována vajíčka motolice ve vzorcích a poté byla stanovena hodnota EPG (počet vajíček na 1g vyšetřovaného materiálu).

5.2.1. Použité pomůcky, přístroje

- vzorky trusu jednotlivých ovcí
- laboratorní sklo (kádinky 100 ml, skleněné tyčinky, misky, odměrný válec)
- třenka s tloučkem
- kovové sítko s otvory 1 mm
- pipety
- rukavice a PVC sáčky
- voda (vodovodní)
- digitální váhy KERN 440-43
- magnetická míchačka
- podložní mikroskopová sklíčka
- světelný mikroskop DN 45

5.2.2. Modifikovaná sedimentační metoda (kvantitativní ovoskopická metoda)

Do třenky byly vneseny 2,0 g trusu a 15 ml vody. Obsah třenky byl rozmísen na kašovitou konzistenci. Po rozmělnění následovalo přenesení obsahu z třenky přes kovové sítko do skleněné misky. Poté byla miska vypláchnuta 2x vodou z první kádinky. Kovové sítko se louhovalo asi 20 s ve skleněné misce s vodou. Po 20 s byl vylouhovaný obsah skleněné misky převeden do první kádinky a zopakoval se celý proces znovu s druhou kádinkou naplněnou vodou. Obsah misky byl přemístěn do druhé kádinky. Obě kádinky se ponechaly 5 minut stát. Po 5 minutách byla vrstva nad sedimentem odsáta pomocí vodní vývěvy z obou kádinek. Obsah obou kádinek byl umístěn do první kádinky, doplněn vodou a opět byl ponechán 5 minut sedimentovat. Poté byla znovu odstraněna vrstva nad sedimentem. Proces byl opakován do doby, kdy vrstva nad sedimentem zůstala čirá. Obsah kádinky byl upraven dekantací na 20 ml suspenze. Do kádinky se suspenzí bylo vloženo míchadlo a byla postavena na magnetickou míchačku (rozmezí otáček bylo 400 - 500 ot/min). Tím došlo k rovnoměrnému rozptýlení částic obsažených v suspenzi a vzniklo homogenní prostředí pro odběr. Automatickou pipetou nastavenou na objem 167 μ l byl zhruba v poloviční hloubce suspenze odebrán 3 krát vzorek, který byl postupně nanesen na podložní sklíčko. Sklíčko bylo vloženo pod mikroskop při zvětšení 40x a nanesený obsah byl sledován. Zbylý obsah kádinky byl změřen v odměrném válci a zaznamenán (Anonym 1989). Pro každý vzorek trusu byla připravena 3 podložní sklíčka. Zjištěný počet vajíček byl zprůměrován, vynásoben celkovým objemem vyšetřené suspenze a vydělen dvěma (hmotnost vzorku trusu byla 2 g). Z těchto hodnot byla určena hodnota EPG.

5.3. Metodika hematologického vyšetření

V totožných časových periodách jako u předchozí metody byla odebírána krev ze zevní hrdelnice (*vena jugularis externa*) pro zhotovení krevních nátěrů. Krev byla odebírána do hemosek s antikoagulační látkou - EDTA. Označování vzorků bylo totožné jako u předchozí metody.

Zhotovení a barvení nátěru jednotlivých vzorků proběhlo hned po odběru a dodání do laboratoře Katedry farmakologie a toxikologie FaF HK. Pro diagnostiku byla využita metoda stanovování diferenciálního počtu leukocytů.

5.3.1. Použité pomůcky, přístroje

- Hemoska
- Kyselina etylendiaminotetraoctová (EDTA)
- Roztěry krve na podložních sklíčkách zafixované methanolem (po dvou sklíčkách od každého vzorku)
- Giemsa (Fluka)
- Voda (vodovodní)
- Světelný mikroskop s imerzním objektivem se zvětšením 10x100 (Meopta 60962)
- Imerzní olej (Nikon)

5.3.2. Metoda vyšetřování krevního obrazu

Stanovování diferenciálního počtu leukocytů probíhalo vizuálně pomocí světelného mikroskopu individuální identifikací krevních buněk. Provádění krevních nátěrů bylo uskutečněno ihned po odběrech krve a vždy ve dvou provedeních od každého vzorku. Kapka krve byla aplikována na kraj podložního sklíčka a přiložením druhého podložního sklíčka byla rozprostřena pod úhlem 30 - 45 stupňů po sklíčku rovnoměrným pohybem. Vznikl tak nátěr, který pokrýval polovinu až dvě třetiny sklíčka. K zafixování nátěru po zaschnutí byl použit methanol. Krevní nátěr před obarvením musí být naprosto suchý, aby nevznikaly artefakty (Allison a Meinkoth 2008). Po fixaci se provedlo barvení nátěrů za použití komerčního barviva Giemsa naředěného s vodou v poměru 1:9. Barvení trvalo u všech roztěrů 40 minut. Potom se sklíčka s roztěry opláchla pod tekoucí vodou. Pozorování počtu a typu leukocytů bylo zaznamenáno po oschnutí sklíček. Byl použit imerzní objektiv mikroskopu při zvětšení 1000×. Bylo napočítáno 100 leukocytů a zároveň zjištěno procentuální zastoupení jednotlivých typů.

Jednotlivé typy leukocytů byly rozlišeny díky jejich odlišné morfologie a barvitelnosti. Poté bylo vypočteno jejich procentuální zastoupení (Pecka 2006).

5.3.3. Stanovení hematokritu

Hematokrit stanovujeme za pomoci odstředění sloupce nesrážlivé krve. Ten se rozdělí dle specifických hmotností na jednotlivé složky krve. Sloupec, který je nazýván PCV (packed cell volume) tvoří červené krvinky nahromaděné nejnižše. Nad sloupcem červených krvinek se hromadí v tenké vrstvě leukocyty a trombocyty a nejdříve se pak nachází krevní plazma (Reece 1998). Hematokrit byl stanovován každý týden při odběrech krve u všech jehnic.

5.4. Metodika sérologického vyšetření ELISA

Krev, ze které bylo získáno sérum, byla jehnicím odebrána 22. 1. 2016 a 11. 4. 2016. Každý vzorek byl označen termínem odběru a číslem zvířete (575, 591, 615).

E/S produkty motolic *F. hepatica* a získaná séra byla odvezena ve zmrazeném stavu na Katedru parazitologie Přírodovědecké fakulty UK v Praze, kde byla uchovávána při teplotě $-76\text{ }^{\circ}\text{C}$. Poté proběhlo vyšetření sér nepřímou metodou ELISA.

5.4.1. Použité pomůcky, přístroje

- Jednotlivé vzorky sér jehnic (= primární protilátky)
- E/S produkty motolic získaných z nakažených ovcí o koncentraci $0,6\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (= antigen)
- Komerční sekundární protilátky (donkey anti-sheep IgG 1:5000 – Peroxidase antibody produced in donkey, Sigma)
- Mikrotitrační destička 96-jamková (Nunc, MaxiSorb)
- ELISA reader
- Multikanálová pipeta manuální a digitální, pipety s variabilním objemem

- Plastové mikrocentrifugační zkumavky s víčkem o objemu 0,5 ml a 1 ml
- Laboratorní sklo – odměrný válec, kádinka
- Vlhká komůrka
- Třepačka a vortex mixer
- pH-metr
- Stopky
- PBS (0,1 M) a 0,05% Tween (Polyoxyethylenesorbitan-monolaurat, BIO-RAD)
- Sušené mléko (Blotting Grade Blocker Non-fat dry milk, BIO-RAD)
- 1M HCl (=zastavovací roztok)
- Na₂CO₃, NaHCO₃
- TMB-substrát (tetramethylbenzidin)
- Destilovaná voda

5.4.2. Metoda ELISA

Pro tuto metodu byly použity dva antigeny. První z nich byly koncentrované a přečištěné exkrečně-sekreční produkty motolice *F. hepatica* (ES1). Druhý antigen byl nekonzentrovaný a nepřečištěný RPMI 1640 medium – odebrané po 6 h inkubace dospělých *F. hepatica* – s ES produkty (ES2). Koncentrace antigenu ES1 byla 0,6 µl na jamku po naředění uhličitanovým pufrem (pH = 9,6). Druhý antigen byl připraven na 5 µl na jamku. Oba antigeny byly ve 100 µl uhličitanového pufru napipetovány do příslušných jamek a inkubovány přes noc. Druhý den pomocí fosfátového pufru – PBS (0,1M; pH – 7,2) s přídavkem 0,05 % Tween (Bio-Rad) byly z jamek nenavázané zbytky antigenu vymyty. Promývání bylo opakováno třikrát po 1 min. Destička byla blokována roztokem 1 % BSA s PBS a inkubována 1 h při pokojové teplotě, aby se předešlo tvorbě nespecifických vazeb. Zbytky blokovacího roztoku byly odstraněny z destičky a do jamek bylo napipetováno celkem 100 µl roztoku obsahujícího naředěné primární protilátky (sérum jehnice) v poměru 1:50 s PBS. Destička byla uchována při pokojové teplotě po dobu 3 hodin. Poté byla destička třikrát promyta PBS a následovalo přidání sekundární protilátky (anti-sheep IgG) naředěné v poměru 1:1000 v PBS a o celkovém objemu 100 µl.

Modré zbarvení se objevilo po přidání substrátu a měřila se absorbance vzorků při 635nm na přístroji Infinite M200 (Tecan), (Ježková 2016).

6. Výsledky

6.1. Koprologické nálezy

Pro vyšetření vzorků trusu jednotlivých jehnic byla využita sedimentační metoda. Ve vzorcích jsem pozorovala přítomnost vajíček *F. hepatica*. První průkaz vajíček byl zaznamenán dne 11. 4. 2016, a to v 10. týdnu po infekci u jehnice č. 591 a u dalších dvou jehnic č. 575 a č. 615 o týden později, tedy 11. týden po infekci. Přehled všech nálezů je uveden v Tab. 1.

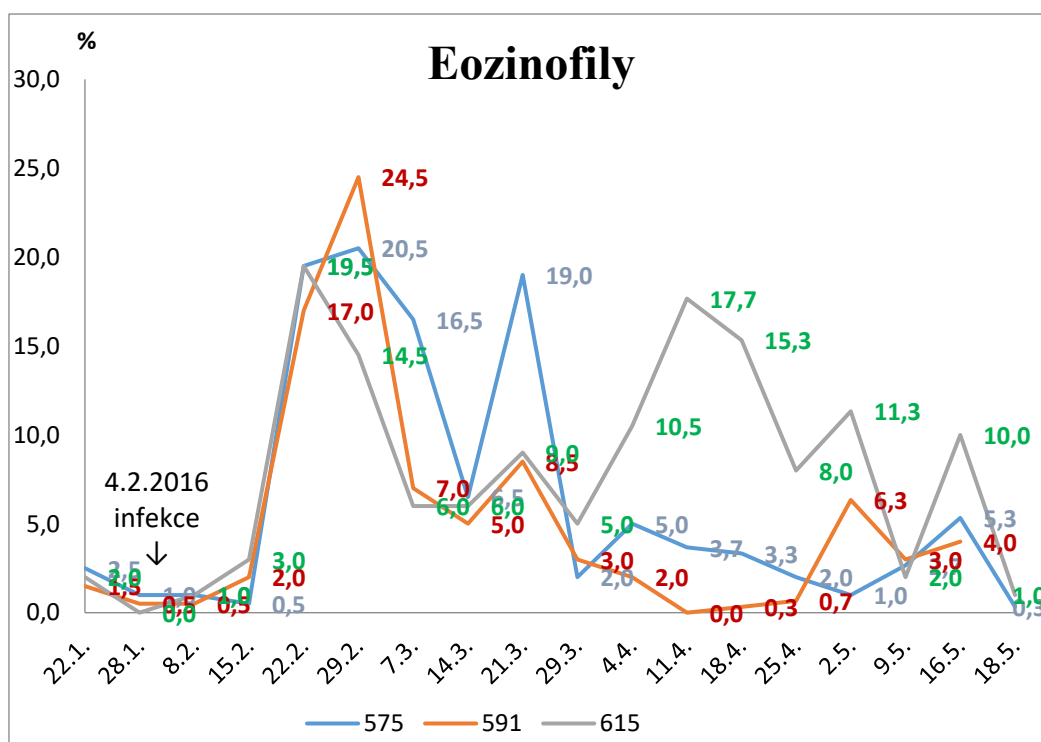
Tab. 1 Hodnoty EPG (počet vajíček/1g trusu) z koprologického vyšetření trusu

EPG nález u jednotlivých ovcí			
datum vzorkování	č. 575	č. 591	č. 615
22.1.	0,0	0,0	0,0
28.1.	0,0	0,0	0,0
8.2.	0,0	0,0	0,0
15.2.	0,0	0,0	0,0
22.2.	0,0	0,0	0,0
29.2.	0,0	0,0	0,0
7.3.	0,0	0,0	0,0
14.3.	0,0	0,0	0,0
21.3.	0,0	0,0	0,0
28.3.	0,0	0,0	0,0
4.4.	0,0	0,0	0,0
11.4.	0,0	16,0	0,0
18.4.	56,7	46,7	49,3
25.4.	79,3	73,3	31,0
2.5.	240,5	144,0	84,0
9.5.	180,0	62,8	36,0
16.5.	204,2	99,2	93,2
23.5.	208,3	40,0	42,0

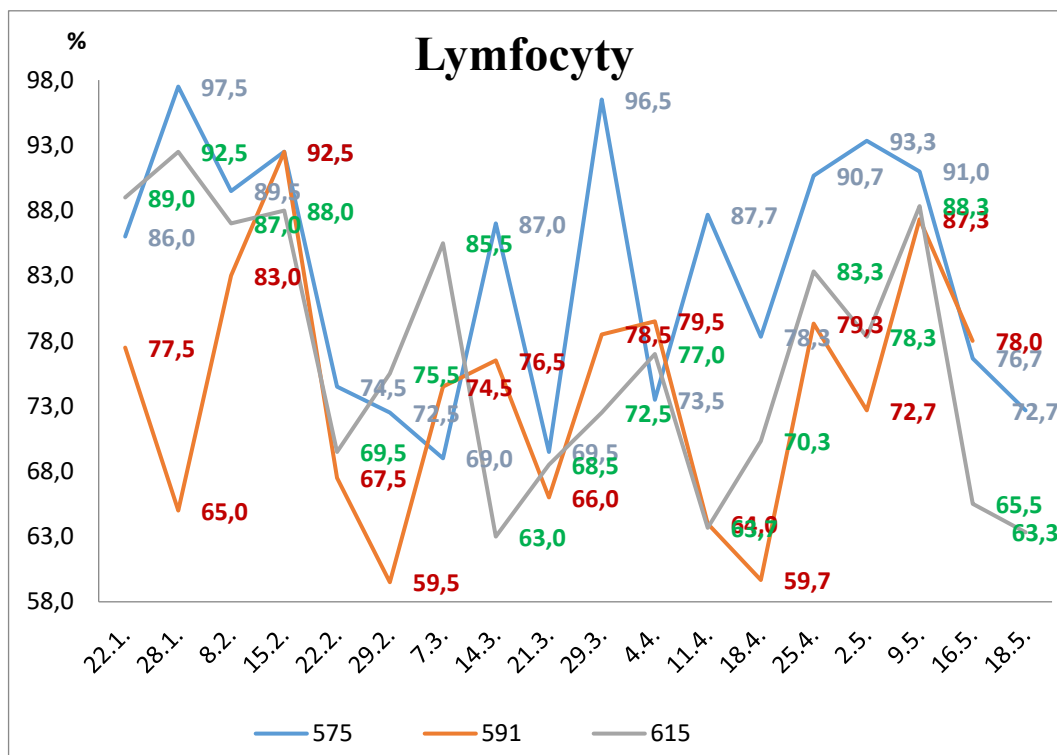
6.2. Hematologická vyšetření

6.2.1. Stanovení diferenciálního počtu leukocytů

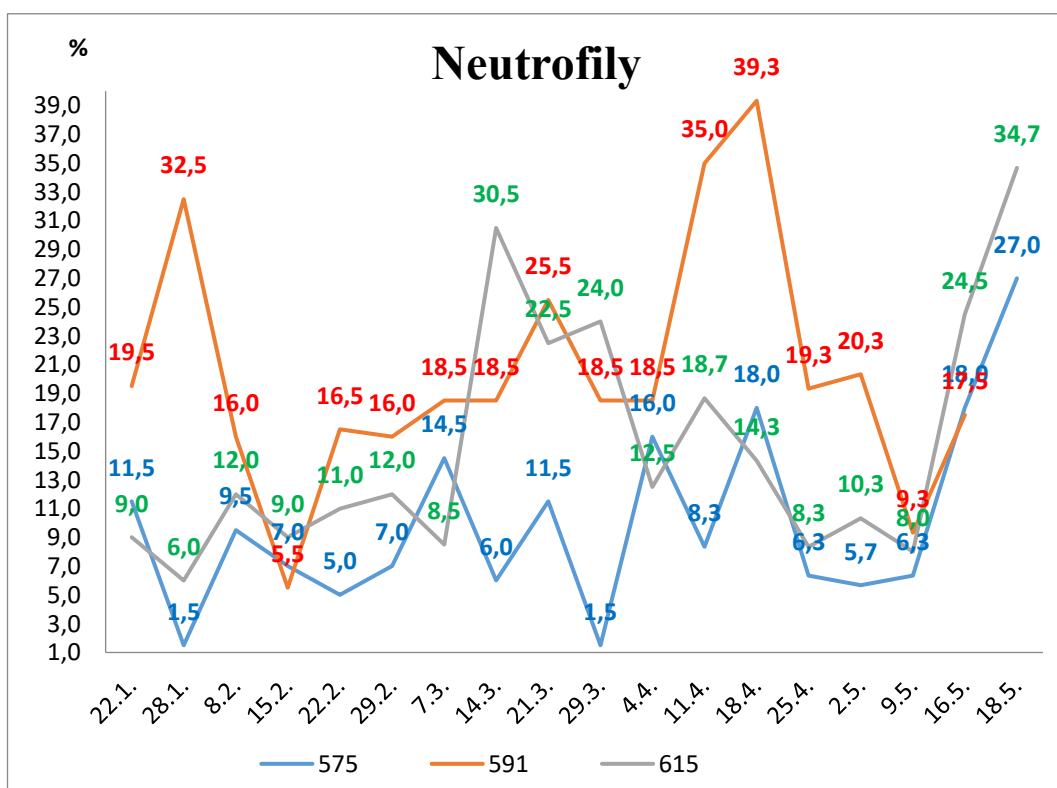
Mikroskopicky byly vyšetřeny krevní nátěry připravené v každém týdnu v průběhu infekce. Během pozorování nátěrů byla zaznamenána přítomnost jednotlivých typů leukocytů – lymfocytů, neutrofilů, eozinofilů a monocytů. Bylo zjištěno procentuální zastoupení jednotlivých typů. Hladina eozinofilů byla nejdůležitějším parametrem. V prvních dvou týdnech po infekci se významně neměnila, ve 3. týdnu po infekci, byl pozorován výrazný nárůst hladiny eozinofilů u všech tří testovaných zvířat. Jejich množství po prudkém nárůstu následně klesal, stále se ale pohyboval nad předinfekční hodnotou (viz Obr. 3). Lymfocyty (viz Obr. 4) a neutrofilů (viz Obr. 5) u všech tří zvířat kolísaly v průběhu infekce a pohybovaly se i mimo fyziologické meze uváděné v literatuře. Počet monocytů se v průběhu studie téměř neměnil a zůstal ve stejném rozmezí jako před infekcí. Z technických důvodů nebyly vyhodnoceny krevní nátěry z 16. týdne infekce.



Obr. 3 Podíl eozinofilů (% předinfekčního stavu) na leukogramu v průběhu experimentální infekce



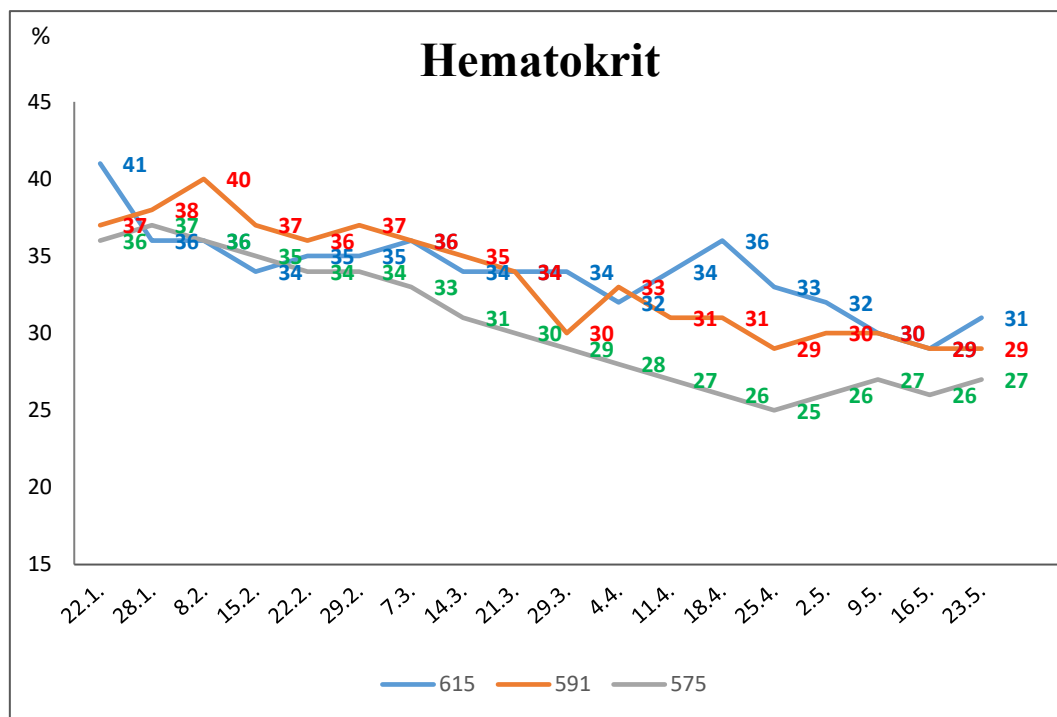
Obr. 4 Podíl lymfocytů (% předinfekčního stavu) na leukogramu v průběhu experimentální infekce



Obr. 5 Podíl neutrofilů (% předinfekčního stavu) na leukogramu v průběhu experimentální infekce

6.2.2. Stanovení hematokritu

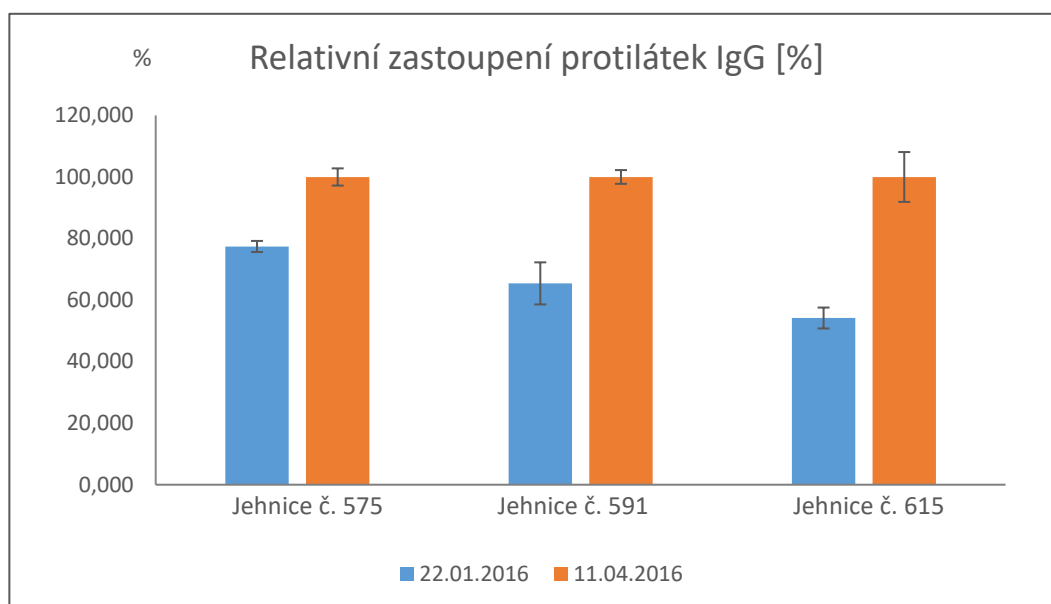
Hodnoty hematokritu v průběhu infekce klesaly, oproti předinfekčnímu stavu dosáhly poklesu o přibližně 1/4. Grafické znázornění nálezů u všech ovcí je uvedeno v Obr. 6.



Obr. 6 Vývoj hodnot hematokritu v průběhu studie

6.3. Sérologické vyšetření

Za použití nepřímého ELISA testu byla sledována hladiny protilátek v krvi jehnic (viz Obr. 7), využity byly vzorky odebrané před infekcí a z 11. týdne po infekci. Do 11. týdnu infekce vzrostly hladiny protilátek IgG v krvi v rozpětí o 25 - 46 % (Ježková 2016).



Obr. 7 Rozdíly v relativním zastoupení protilátek ve vzorcích sér jednotlivých jehnic před nákazou a po nákaze měřené metodou nepřímou ELISA

6.4. Výsledky pitvy

Při ukončení studie dne 25. 5. 2016 byla všechna zvířata utracena a játra podrobena pitvě. Byly sledovány změny na jaterním parenchymu a ve žlučovodech. Jaterní parenchym byl viditelně narušen dospělci motolice jaterní a žlučovody obstruovány taktéž dospělými jedinci tohoto parazita. Z jater jehnice č. 575 bylo vyjmuto 78 ks dospělých motolic, 40 ks dospělců z jehnice č. 591 a u jehnice č. 615 bylo nalezeno 41 ks dospělých motolic (viz Obr. 8). Veškerý získaný materiál byl poskytnut Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové pro biotransformační studie.



Obr. 8 Játra infikované ovce s nálezem dospělců *F. hepatica* při pitvě
(foto J. Lamka)

7. Diskuze

Teoretická část této práce shrnuje již známé informace o motolici jaterní, jejím životním cyklu, jednotlivých vývojových stádií, mezihostiteli, možné prevenci, terapii motolichnosti a využívaných diagnostických metodách. V experimentální části proběhla infekce jehnic plemene Texel metacerkáriemi citlivého kmene *F. hepatica* z laboratorní produkce Ridgeway Research, Velká Británie a poté následovalo pravidelné odebrání vzorků, sledování průběhu nákazy a odpovědi organismu. Sledování nákazy u ovcí probíhalo pomocí vybraných diagnostických postupů používaných k zjištění fasciolózy. Bylo použito ovoskopické vyšetření, stanovení hematokritu, stanovení diferenciálního počtu leukocytů a stanovení protilátek metodou ELISA.

Mezi nejčastější konvenční metody diagnostiky fasciolózy patří koprologické sedimentační vyšetření. Je to běžná diagnostická metoda použitelná pouze po ukončení prepatentní periody. S pomocí kvalitativní metody podle Chyli, která byla pro účel této práce modifikována na kvantitativní, byly vyšetřeny všechny fekální vzorky odebrané před a během infekce. Modifikace spočívá v přípravě suspenze ze sedimentu, který byl klasicky připravován, úprava metodiky byla již dříve využita v jiné diplomové práci (Virtová 2015). První výskyt vajíček byl zpozorován v exkrementech hostitele 10. - 11. týden po infekci, což koreluje jak s literárními údaji (Calvani *et al.* 2018, Kassai 1999), tak i s výsledky shodně koncipované studie jiné fakultní autorky (Virtová 2015). Výsledky koprologického vyšetření byly do tabulky uvedeny v hodnotách EPG, jejich hodnota během infekce kolísá (Kassai 1999). V případě vajíček zadržovaných v žlučovém měchýři se může falešná pozitivita objevit i po 2 týdnech od úspěšné léčby (Beesley *et al.* 2017).

Hematologickými vyšetřeními byly sledovány reakce organismu hostitele na probíhající parazitózu. Infekce helminty jsou spojovány s eozinofilií lišící se dle stádia a druhu parazita (Carranza-Rodríguez *et al.* 2018). Krevní nátěry ukázaly signifikantní zvýšení hladiny eozinofilů u všech testovaných zvířat ve 3. týdnu infekce. Je nutné podotknout, že první odběr vzorků následoval z organizačních důvodů již 3 dny po umělé infekci, nikoli týden, proto je rozdíl ve výsledku vzestupu eozinofilů v porovnání s uvedenými studiemi.

Studie Virtové (2015) a Raadsma *et al.* (2007) uvádí vzestup eozinofilů ve 2. týdnu po infikaci a také popisují další dva vzestupy v průběhu infekce. Tyto výkyvy přisuzují odpovídajícímu průběhu životního cyklu motolice - migraci mladých motolic v játrech a poté jejich přemístění do žlučových. V této práci byly zaznamenány další vzestupy v 7. týdnu po infekci u jehnice č. 575 a v 10. týdnu u jehnice č. 615. Mimo tyto výkyvy měla hladina eozinofilů po dosažení maxima ve 3. týdnu infekce spíše sestupnou tendenci. Některé hodnoty se dostaly ke konci studie až na nulu. V tomto případě tedy můžeme říct, že diagnostická metoda není vhodnou vypovídající metodou. Pro terénní podmínky, kdy nevíme přesnou dobu infikace, tyto hodnoty nemusí být směrodatné. Navíc se eozinofilie projevuje nejen u parazitóz, ale je přítomna i např. u hematologických malignit, myositidy, pneumonie, kožních nemocí a dokonce se fyziologicky vyskytuje během říje u fen (Doubek 2003).

Fyziologická hladina neutrofilů u ovcí má rozmezí 20 – 50 % (Doubek 2003). V průběhu této studie byly zaznamenány některé hodnoty pod tímto rozmezím. Naopak v jiné studii byla pozorována hladina neutrofilů vyšší (Matanović *et al.* 2007). Zhang *et al.* (2005) a Virtová (2015) nepozorovali v jejich experimentech žádné významné změny v počtech neutrofilů. Hladina neutrofilů není pro toto onemocnění rozhodující. Neutrofilní granulocyty většinou odpovídají na akutní bakteriální zánět hlavně ve slizničním a oběhovém systému (Toman 2009). Odlišné výsledky v hladinách neutrofilů mohou být zapříčiněny interindividuálními rozdíly hostitelů.

Dalším parametrem krve, který byl ovlivněn infekcí, byl hematokrit. Fyziologické hodnoty hematokritu ovcí dle Doubka (2010) jsou 0,27 - 0,45. U všech zvířat oproti předinfekčnímu stavu dosáhly hodnoty hematokritu na konci studie poklesu o přibližně 1/4. Nejnižší hodnota byla 0,25 u jehnice č. 575 v 11. týdnu po infekci. Výrazně nízká hodnota hematokritu může naznačovat závažnost infekce a předpovídat až fatální komplikace u hostitele. Matanović *et al.* (2007) ve své práci uvádí, že přirozeně infikované ovce s hodnotami hematokritu 10 % žili, zatímco Hawkins (1984) uvedl úhyn u uměle infikovaného hostitele při 15 % hodnotě hematokritu. Z toho vyplývá, že závisí na délce období příjmu metacerkárií, jelikož juvenilní jedinci nemigrují najednou, ale postupně (Matanović *et al.* 2007).

Postupný pokles hodnot u všech jehnic poukazuje na ztráty krve zapříčiněné motolicemi v játrech. Raadsma *et al.* (2007) ve své studii uvádí strmý pokles hematokritu v 9. týdnu infekce.

Infekce fasciolózou je charakterizována také zvýšením hladiny protilátek IgG, která je prvně detekovatelná 2 - 4 týdny po infekci a dosahuje vrcholu mezi 8. a 10. týdnem po infekci (Beesley *et al.* 2017, Taylor *et al.* 2005). K detekci protilátek v naší studii byla použita imunologická metoda ELISA. Testováno bylo předinfekční sérum a sérum z 11. týdne infekce za použití exkrečně - sekrečních produktů motolice jaterní jakožto antigenů. Metoda potvrdila nárůst hladiny protilátek v průměru o 35 % v 11. týdnu (Ježková 2016). Pokud by měření pokračovala i v dalších týdnech infekce, pravděpodobně by docházelo k dalšímu nárůstu případně udržení vyšší hladiny protilátek v séru, jako je tomu v práci Virtové (2015).

Sérologické metody umožňují časnou detekci fasciolózy, ale cirkulace protilátek může v krvi přetrvávat několik měsíců po úspěšném odčervení. Sérologie pouze potvrzuje expozici hostitele parazitovi, ale ne vždy poukazuje na aktuální infekci. Rozlišení zvířete s infekcí od léčeného zvířete je rozhodující pro posouzení účinnosti léčby (Arifin *et al.* 2016).

Kombinace koprologického vyšetření s imunologickým je doporučovaným postupem při diagnostice fasciolózy. Výsledky mohou poskytnout přesnější informace o reálné parazitární situaci (Matanović *et al.* 2007).

8. Závěr

V první části diplomové práce jsem nejprve uvedla obecné informace k experimentálnímu zvířeti, ovci domácí, a jejím endoparazitózám, ze kterých jsem se následně zaměřila na zpracování informací o fasciolóze a jejím původci motolici jaterní (*F. hepatica*). Práce pokračovala v druhé části vlastním experimentem. Po dovezení tří jehnic plemene Texel a jejich koprologickém vyšetření na negativitu přítomnosti motolic, proběhla infekce metacerkáriemi a následujících 16 týdnů byl zajišťován odběr vzorků pro vyšetření koprologickou, hematologickou a sérologickou metodou. Po ukončení studie byla zvířata usmrcena a při pitvě byli izolováni dospělci *F. hepatica*. Tito dospělci byli poskytnuti pro další výzkum na Katedru biochemických věd Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové. Studií jsme potvrdili, že prepatentní perioda trvá 10 – 11 týdnů. Fasciolóza byla také potvrzena zvýšením eozinofilie 3. týden po infekci. Hodnoty hematokritu se během studie postupně snižovaly u všech tří jehnic. V týdnu před infekcí (22. 1. 2016) a v 11. týdnu infekce byla provedena ELISA s jednoznačným zvýšením hladiny protilátek IgG v rozpětí o 25 – 46 % u všech testovaných zvířat.

9. Literatura

Allison RW, Meinkoth J. Klinická patologie a diagnostické techniky. Praha: Pierot, 2008:203-407. Veterinary clinics of North America. ISBN 9788073530884.

Anonym. Veterinárne laboratorné metodiky – parazitológia. Bratislava: Štátna veterinárna správa Bratislava, publ. č. 180/1989, 1989:171 s.

Arifin MI, Hoglund J, Novobilský A. Comparison of molecular and conventional methods for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in the field. *Veterinary Parasitology* 2016;232:8-11

Beesley NJ, Caminade C, Charlier J, et al. *Fasciola* and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transbound Emerg Dis*. [serial online] 2017;00:000 – 000. 4. 4. 2017 Wiley online library. In: *Wiley online library*. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tbed.12682> Prístup 1. 4. 2018

Boray J, Crowfoot P, Strong M, Allison J, Schellenbaum M, Von Orelli M, Sarasin G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Veterinary Record* 113, 1983:315-317 s.

Bowman DD, Lynn RC, Georgi RJ. *Georgis' parasitology for veterinarians*. 7. vyd. Philadelphia: W.B. Saunders Co. 1999:414 s. ISBN 0721670970.

Calvani NED, George SD, Windsor PA, Bush RD, Šlapeta J. Comparison of early detection of *Fasciola hepatica* in experimentally infected Merino sheep by real-time PCR, coproantigen ELISA and sedimentation. *Veterinary Parasitology* 2018;251;85-89.

Carranza-Rodríguez C, Escamilla-González M, Fuentes-Corripio I, Perteguer-Prieto MJ, Gárate-Ormaechea T, Pérez-Arellano JL. Helminthosis and eosinophilia in Spain (1990–2015). *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed.)* [seriál online]. 2018;36(2);120-136. February 2018

ScienceDirect In: *ScienceDirect*. Dostupné na:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2529993X18300066> Přístup 3. 4. 2018

Doubek J. Veterinární hematologie. Brno: Noviko, 2003:464 s. ISBN 8086542025.

Doubek J. Interpretace základních biochemických a hematologických nálezů u zvířat. 2., dopl. vyd. Brno: Noviko, 2010:102 s. ISBN 9788086542225.

Edited by Caffrey CR. Parasitic helminths: targets, screens, drugs, and vaccines. Weinheim, German: Wiley-Blackwell, 2012:540 s. ISBN 9783527652945.

Forejtek P, Rajský D, Vodňanský M, Rajský M. Zdravotní problematika zvěře: příručka pro mysliveckou praxi. Brno: Středoevropský institut ekologie zvěře, 2013:232 s. ISBN 9788073056520.

Hawkins CD. The use of haemoglobin, packed-cell volume and serum sorbitol dehydrogenase as indicators of the development of fascioliasis in sheep. *Veterinary Parasitology* [seriál online] 1984;15(2);125-133. August 1984. ScienceDirect. In: *ScienceDirect*. Dostupné z:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0304401784900281>. Přístup 15. 4. 2018

Hendrix ChM. Diagnostic parasitology for veterinary technicians. 3rd ed. St. Louis, Mo.: Mosby/Elsevier, c2006:304 s. ISBN 0323036147.

Horák F. Chováme ovce. Praha: Ve spolupráci se Svazem chovatelů ovcí a koz v ČR vydalo nakl. Brázda, 2012:383 s. ISBN 9788020903907.

Horsák M, Juříčková L, Pícka J. Měkkýši České a Slovenské republiky: Molluscs of the Czech and Slovak Republics. Zlín: Kabourek, 2013:270 s. ISBN 9788086447155.

Chroust K, Forejtek P. Motolice u lovné zvěře. *Myslivost* 2010;88;68

Illek J, Jirásek T. Epidemiologie parazitárních onemocnění skotu mastných plemen v ČR. *Veterinářství* 2014;64:368-370.

James CE, Hudson AL, Davey MW. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends Parasitol.* 2009;25;328–335.

Jelínek P, Koudela K. Fyziologie hospodářských zvířat. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2003:414 s. ISBN 8071576441.

Ježková Monika. Jaterní motolice – možnosti diagnostiky a predikce výskytu. Bakalářská práce. ČVUT, Fakulta biomedicínského inženýrství, Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva. 2016;76 s.

Kassai T. *Veterinary helminthology.* Boston: Butterworth-Heinemann, 1999:260 s. ISBN 9780750635639.

Kašný M, Siegelová V, Siegel T, Beránková K. Aktuální rozšíření motolice velké (*Fascioloides magna*) v České republice. *Myslivost* 2010;88;58.

Kelley JM, Elliott TP, Beddoe T, Anderson G, Skuce P, Spithill TW. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. *Trends Parasitol.* 2016;32;458–469.

Kottferová J, Novácký M, Mareková J, Hvozdík A. *Veterinárna etológia.* Košice: Univerzita veterinárneho lekárstva v Košiciach. 2008:357 s. ISBN: 9788080771010

Kuchtík J. Chov ovcí. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007:110 s. ISBN 9788073750947.

Matanović K, Severin K, Martinković F, Šimpraga M, Janicki Z, Barišić J.. Hematological and biochemical changes in organically farmed sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology Research.* 2007;101(6);1657-1661.

Nováková K, Koudela B. Výskyt rezistence na anthelmintika v chovech koní na Moravě. *Veterinářství* 2006;56;20-23.

Novobilský A, Koudela B. Terapie a prevence fascioloidózy spárkaté zvěře – review. *Veterinářství* 2005;55;98-102

Parkinson M, O'Neill SM, Dalton JP. Endemic human fasciolosis in the Bolivian Altiplano. *Epidemiology and Infection* [serial online] 2007;135(04);669 May 2007 *Epidemiology and Infection*. In: *Cambridge* Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S095026880600728X Přístup 20. 3. 2018

Pecka M. Laboratorní hematologie v přehledu (2. díl). Fyziologie a patofyziologie krevní buňky. Český Těšín: Infiniti art, s. r. o. 2006: 304 s. ISBN 8086682021.

Prichard RK, von Samson-Himmelsterna G, Blackhall WJ, Geary TG. Foreword: towards markers for anthelmintic resistance in helminths of importance in animal and human health. *Parasitology* 2007;134;1073–1076.

Raadsma HW, Kingsford NM, Suharyanta, Spithill TW, Piedrafita D. 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* 2007;143:275 – 286.

Rahko T. The pathology of natural *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Pathology Veterinary* 1969;6:244-256.

Reece WO. Fyziologie domácích zvířat. Praha: Grada, 1998:449 s. ISBN 8071695475.

Riviere JE, Papich MG. *Veterinary pharmacology and therapeutics*. 9th ed., Iowa: Wiley-Blackwell, 2009:1544 s. ISBN 0813820618.

Ryšková O. *Základy lékařské mikrobiologie a imunologie: učební texty pro bakalářské studium*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2000:130 s. ISBN 8024601354.

Sedlák K, Tomšíčková M. *Nebezpečné infekce zvířat a člověka*. Praha: Scientia, 2006:167 s. Biologie pro všední den. ISBN 8086960072.

Schweizer G, Braun U, Deplazes P, Torgerson PR. Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record* 2005;157(7); 188-193.

Skoupá L. Začínáme s chovem ovcí a koz. Praha: Brázda, 2014:104 s. ISBN 9788020904065.

Smyth JD, Halton DW. The physiology of trematodes. 2nd ed. New York: Cambridge University Press, 1983:256 s. ISBN 0521222834.

Svobodová V, Svoboda M, Vernerová E. Klinická parazitologie psa a kočky. 2. vyd. Brno: B-V-M, 2013:242 s. ISBN 9788090546813.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL. Veterinary parasitology. 4. vyd. Chichester: Wiley Blackwell, 2005:1032 s. ISBN 9780470671627.

Toman M. Veterinární imunologie. 2., doplněné a aktualizované vydání. Praha: Grada, 2009:392 s. ISBN: 9788024724645.

Virtová Blanka. Průběh a výsledky kultivace modelového parazita motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) v ovci domácí (*Ovis aries*) pro potřeby biotransformačních studií. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2015:56 s.

Volf P, Horák P. Paraziti a jejich biologie. Praha: Triton, 2007:318 s. ISBN 9788073870089.

Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, Von Samson-Himmelstjerna G, Sangster NC. Drug resistance in veterinary helminths. Trends Parasitol. 2004;20;469–476.

Welter-Schultes FW. European non-marine molluscs, a guide for species identification: Bestimmungsbuch für europäische Land- und Süßwassermollusken. Göttingen: Planet Poster Editions, 2012:760 s. ISBN 9783933922755.

Zajac A, Conboy GA. Veterinary clinical parasitology. 8. vyd. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2012:368 s. ISBN 0813820537.

Zhang WY, Moreau E, Hope JC, Howard CJ, Huan WY, Chauvin A. *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*: Comparison of cellular response to experimental infection in sheep. Experimental Parasitology 2005;111(3);154-159.

Internetové stránky:

<http://www.molluscs.at/gastropoda/index.html?/gastropoda/parasites/fasciola.html>