

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

katedra parazitologie

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Nicol Bernardová

Cerebrální toxokaróza u myši

Murine cerebral toxocariasis

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: Mgr. Marta Chanová, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení:

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

V Družci dne 13. 8. 2016

Podpis:

Poděkování

Především bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Martě Chanové, Ph.D. za cenné a přínosné rady a obětavou pomoc, které mi poskytovala po celou dobu mé práce, také za její maximální trpělivost a vstřícnost.

Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za podporu, trpělivost a poskytnutí zázemí během studia i psaní této diplomové práce.

Svým přátelům děkuji za morální podporu.

ABSTRAKT

Toxocara canis je endoparazitický geohelminť psovitých šelem. V životním cyklu využívá paratenického hostitele (i člověka) a při napadení nervové soustavy může způsobit vážné potíže nazývané cerebrální toxokaróza. Přesné mechanismy patogenního působení larev *Toxocara canis* v nervové soustavě nejsou známy a experimentální studie řeší spíše akutní fázi toxokarózy, proto jsme v předložené diplomové práci charakterizovali průběh cerebrální toxokarózy od akutní až po chronickou fázi u myši.

V mozcích myši byly nalezeny larvy parazita během celého sledovaného období. Larvy se ve tkáních vyskytovaly jak jednotlivě, tak ve shlucích. Přítomnost larev byla pozorována v oblastech mozku, které ovlivňují jak pohyb, tak i paměť. Kolem larev ve tkáni nebylo nalezeno žádné viditelné poranění ani zápalová reakce. Histologické vyšetření ale ukázalo u všech myši přítomnost patologií, konkrétně lokální nekrózy, hemorhagie, zesílené stěny cév, infiltráty buněk v tkáni i kolem cév a abnormální angiogeneze.

Myši od 9. týdne po infekci vykazovaly neurologické příznaky se zvyšující se četností. Byla sledována i tvorba specifických protilátek. Přítomnost neurologických příznaků nesouvisela se změnami jejich hladin. Hladina protilátek byla vyšší u reinfikovaných myši v porovnání s hladinou protilátek myši s jednorázovou infekcí.

Klíčová slova: *Toxocara canis*, larvální toxokaróza, neurotoxokaróza, cerebrální toxokaróza, CNS, migrace, neurologické symptomy, histopatologie

ABSTRACT

Toxocara canis is endoparasitic geohelminth of canids. In its life cycle it uses paratenic host (even humans) and can cause severe problems called cerebral toxocariasis when attacks central nervous system. The exact mechanism of pathogenicity in nervous system is unknown and experimental studies examines rather the acute phase of toxocariasis, therefore we characterized the course of cerebral toxocarosis in mice from acute to chronic phase in this master thesis.

We found larvae of the parasite in the brains of mice. The larvae in the tissues occurred both, individually and in clusters. The presence of larvae was observed in regions that affect both movement and memory. We did not find any visible injury nor inflammation surrounding the larvae in the tissue. However, histological examination showed brain tissue pathologies in all mice, namely local necrosis, hemorrhages, thickened vessel walls, cell infiltrates in tissue and around vessels and abnormal angiogenesis.

The mice showed neurological symptoms with increasing frequency from the 9th week post infection. Production of specific antibodies was also monitored. The level of antibodies in reinfected mice was higher compared to antibody levels of mice with a single infection. No correlation with the presence of neurological symptoms was shown.

Key words: *Toxocara canis*, larval toxocariasis, neurotoxocariasis, cerebral toxocariasis, CNS, migration, neurological symptoms, histopathology

OBSAH

1	Úvod.....	1
2	Literární přehled.....	2
2.1	Toxocara canis	2
2.2	Larvální toxokaróza	4
2.2.1	Klinické a epidemiologické studie.....	4
2.2.1.1	Visceral larva migrans	4
2.2.1.2	Oční toxokaróza	5
2.2.1.3	Skrytá toxokaróza	5
2.2.1.4	Cerebrální toxokaróza	5
2.2.2	Experimentální studie zaměřené na cerebrální toxokarózu	6
2.2.2.1	Migrace larev do centrální nervové soustavy	7
2.2.2.2	Patogenní působení larev v centrální nervové soustavě.....	8
3	Cíle práce.....	10
4	Metodika.....	11
4.1	Modelový organismus.....	11
4.1.1	Hostitel.....	11
4.1.2	Parazit	11
4.2	Experimentální infekce	12
4.2.1	Skupiny myší	12
4.2.2	Infekční dávka	12
4.2.3	Podání infekční dávky	12
4.2.4	Monitorování myší.....	13
4.3	Zpracování materiálu	14
4.3.1	Usmrcení a pitva	14
4.3.2	Zpracování krve – nepřímá ELISA.....	14
4.3.3	Zpracování nativních preparátů jater a sleziny	16

4.3.4	Zpracování mozku	17
4.3.4.1	Roztlaková metoda.....	17
4.3.4.2	Trávicí metoda	17
4.3.5	Zalévání vzorků do parafínu	19
4.3.6	Řezání vzorků	20
4.3.7	Barvení histologických preparátů	20
4.3.7.1	Barvení Hematoxylin-eosin	20
4.3.7.2	Barvení Luxol Fast Blue	21
5	Výsledky.....	23
5.1	Projevy u myši v průběhu onemocnění.....	23
5.1.1	Jednorázová infekce.....	24
5.1.2	Reinfekce	25
5.2	Produkce specifických protilátek v průběhu onemocnění	27
5.2.1	Jednorázová infekce.....	27
5.2.2	Reinfekce	28
5.3	Makroskopické hodnocení jater a sleziny.....	29
5.3.1	Játra.....	29
5.3.1.1	Jednorázová infekce	29
5.3.1.2	Reinfekce	30
5.3.2	Slezina.....	31
5.3.2.1	Jednorázová infekce	31
5.3.2.2	Reinfekce	33
5.4	Výskyt červů ve vyšetřovaných orgánech	35
5.4.1	Játra.....	35
5.4.1.1	Jednorázová infekce	35
5.4.1.2	Reinfekce	35
5.4.2	Slezina.....	37

5.4.3	Mozek	37
5.5	Histopatologické změny v mozku.....	40
5.5.1	Jednorázová infekce.....	40
5.5.2	Reinfekce	41
6	Diskuze.....	43
7	Závěr.....	53
8	Použitá literatura	54
9	Přílohy	60

1 ÚVOD

Lidská společnost domestikovala psa, který s sebou kromě potěšení a užitku přináší i nebezpečí v podobě parazitů a slouží jako zdroj kontaminace prostředí, ze kterého se člověk může nakazit. Ve společnosti člověka žije pes jako oblíbený domácí mazlíček v domácnostech rozvinutých zemí, zároveň ale lidé a psi žijí pospolu v nekvalitních podmínkách v rozvojových zemích bez dostatečné úrovně hygieny.

Rizikovou skupinou pro infekci parazitem jsou zejména děti, které jsou v přímém kontaktu s kontaminovaným prostředím ať už při hrách na pískovištích, tak i v běžných denních situacích. Nejen na děti mají však parazitózy důležitý dopad.

Jedním z parazitů přenášených psem je *Toxocara canis* (škrkavka psi). Jedná se o endoparazitického geohelmita trávící soustavy psovitých šelem, který ve svém přirozeném životním cyklu využívá i paratenických hostitelů, včetně člověka.

Parateničtí hostitelé se mohou nakazit pozřením vajíček z prostředí, nebo pozřením larev v infikovaném mase jiných paratenických hostitelů. Larvy vylíhlé z vajíček nebo uvolněné z masa po průchodu žaludkem penetrují střevo hostitele a migrují jeho tělem krevním oběhem do různých tkání, včetně mozku. Zde svým působením mohou způsobit vážné patologie promítající se jako klinické příznaky souborně pojmenované larvální toxokaróza, při napadení mozku jako potenciálně nejzávažnější toxokaróza cerebrální.

Jedná se o nebezpečné onemocnění, které může skončit až smrtí pacienta. Přestože zaznamenaných klinických případů cerebrální toxokarózy v porovnání s vysokou séroprevalencí populace je pomálu, z mnohých studií zaměřených na migraci larev v paratenickém hostiteli je jasné, že v něm přežívají dlouhodobě a že jejich významné množství je lokalizováno právě v mozku. Rizika plynoucí z dlouhodobé, i když zdánlivě bezpříznakové přítomnosti patogena v centrální nervové soustavě nelze podceňovat a jejich studium je předmětem předložené diplomové práce.

Přesné mechanismy patogenního působení larev *Toxocara canis* v mozku nejsou známy a experimentální studie se zaměřují zejména na akutní fázi toxokarózy. Z tohoto důvodu jsme se v předložené diplomové práci rozhodli charakterizovat průběh cerebrální toxokarózy, od akutní až po pozdní chronickou fázi, určením počtu a lokalizace larev, popisem histopatologických změn a pozorováním rozvoje případných dalších změn souvisejících s přítomností larev v mozku u experimentálních myší.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 *Toxocara canis*

Toxocara canis (škrkavka psi) patří do kmene Nematoda, řádu Ascaridida. Rod *Toxocara* spp. pojímá kromě druhu *Toxocara canis*, parazita psovitých šelem, i další druhy, jako třeba *Toxocara cati*, škrkavku kočkovitých šelem, nebo *Toxocara vitulorum*, parazita skotu.

Jedná se o obligátně parazitického geohelmintha trávící soustavy psovitých šelem. Ve svém přirozeném životním cyklu využívá i paratenických hostitelů, včetně člověka (Roberts *et al.*, 2013).

Toxokary jsou gonochoristické škrkavky s pohlavním dimorfismem, jejichž tělo je nesegmentované, bílé až krémové barvy s kruhovitým průřezem. Délka dospělých červů se pohybuje u samců od 4 do 6 centimetrů a u samic od 6 do 15 centimetrů. Vajíčka mají velikost cca 75 × 85 mikrometrů (Roberts *et al.*, 2013). Ve vajíčku ve vnějším prostředí dochází k vývoji larev až po infekční stádium L3. Velikost infekčních L3 larev je od 290 do 500 mikrometrů na délku a od 14 do 20 mikrometrů na šířku (Ash, Orihel, 2007; Garcia, 2007). V paratenickém hostiteli larvy L3 dále nemění svou velikost. Naopak v definitivním hostiteli dochází k dalšímu růstu a přeměně přes larvu L4 až do dospělého červa.

Povrch těla červa je pokryt odolnou kutikulou, která chrání epidermis před narušením trávícími šťávami hostitele, imunitním systémem, nebo jiným poškozením. Zajišťuje integritu červa. Jedná se o multifunkční bariéru mezi parazitem a prostředím hostitele, ve kterém se parazit nachází a umožňuje parazitovi interakce s okolím. Kutikula je tvořena třemi vrstvami – kortikální, mediální a bazální. Na povrchu kutikuly se nachází lipidová epikutikula a na ní ještě povrchová vrstva, tzv. glykokalyx, bohatá na proteiny. Důležité složky kutikuly jsou nekolagenní kutikulíny a kolageny. Svlékání kutikuly odděluje jednotlivá vývojová stádia parazita (Page, Johnstone, 2007; Chisholm, Xu, 2012; Roberts *et al.*, 2013).

Dospělí červi se živí tráveninou, buňkami či krví ze střeva definitivního hostitele. Larvy migrující tkáněmi definitivního i paratenického hostitele se živí jeho buňkami, krví a tekutinami (Roberts *et al.*, 2013), ale doposud není zjištěno přesné složení jejich potravy.

Dospělá oplodněná samice parazita lokalizovaná ve střevě svého definitivního hostitele produkuje nerýhovaná vajíčka, která odchází do prostředí s trusem. Tam vajíčka zrají

2 až 6 týdnů, vyvíjejí se v nich larvy a stávají se infekčními (Strube *et al.*, 2013, Fan *et al.*, 2015). Po pozření hostitelem (definitivním, nebo paratenickým) dochází k vylíhnutí larev ve střevě, k penetraci larev ze střeva do krevního oběhu a k tělní migraci. U definitivního hostitele se pak larvy buď dostanou opět do tenkého střeva (tělní migrace vede přes plíce, larvy jsou vykašlány do ústní dutiny, spolknuty a v tenkém střevě hostitele dochází k dospění, reprodukci a uvolnění oplozených vajíček do prostředí), nebo se akumulují v různých tkáních. O osudu larev rozhoduje hormonální a imunitní stav hostitele, jeho věk a pohlaví (Fahrion *et al.*, 2008). Vyskytuje se tzv. věková rezistence (čím starší je hostitel, tím je větší pravděpodobnost, že larvy zůstanou encystovány v tkáni a nedokončí migraci do tenkého střeva).

Pro parazita je důležité, zda je definitivním hostitelem samec či samice. Jsou-li larvy zachyceny ve tkáních samce, jedná se pro ně o slepou vývojovou cestu. Pouze ve vyjimečných případech, jako snížená imunita, nebo stres hostitele může dojít k reaktivaci larev. U larev zachycených ve tkáních samic dochází k jejich reaktivaci, pokud fena zabřežne. Fyziologické a hormonální změny umožní larvám migrovat do plodu v děloze, nebo do mléčných žláz, jedná se poté o transplacentární a trasmamární přenos. Způsob přenosu larev do štěnat závisí na fázi březosti. Po porodu dochází k dospění červů ve střevě štěněte (Krämer *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 2013).

Pro naši práci je důležitější co se děje s migrujícími L3 larvami v těle paratenického hostitele. Tyto larvy nedospívají a zůstávají dlouhodobě infekční v tkáních (Sasmal *et al.*, 2008). Larvy putují krevním oběhem do nejrůznějších orgánů a částí těla, včetně jater, srdce, plic, ledvin, mozku, očí či svalů. Díky tomu se infekce může projevovat širokou škálou příznaků, od nespecifických projevů spojených s mírnou zápalovou reakcí, až po definované, jako třeba pneumonie, encefalitida, astma, hepatitida nebo kožní projevy. Soubor těchto klinických příznaků je nazýván larvální toxokaróza. Přestože nedochází k produkci vajíček, je paratenický hostitel, je-li sežrán, ekologicky významný jako zdroj infekce pro dalšího hostitele. Je-li pozřen definitivním hostitelem, larvy mohou dokončit svůj životní cyklus a paratenický hostitel tak pomáhá parazita distribuovat v prostoru a čase. Může být ale sežrán i jiným paratenickým hostitelem a v tomto případě dochází pouze k akumulaci larev ve tkáních. Paratenickým hostitelem je široká škála teplokrevných obratlovců od hlodavců (myši, potkani a pískomilové) přes ptáky (drůbež, japonské křepelky a holubi) a větší savce (králíci, prasata a primáti) až po člověka (Roberts *et al.*, 2013; Strube *et al.*, 2013; Bin *et al.*, 2016).

2.2 Larvální toxokaróza

2.2.1 Klinické a epidemiologické studie

K diagnostice larvální toxokarózy je využíváno sérodiagnostických testů (ELISA, Western Blot) na detekci specifických protilátek v krevním séru či v tělních tekutinách (Stensvold *et al.*, 2009; Maizels, 2013; Boldiš *et al.*, 2015), biopsie (Fillaux, Magnaval, 2013) a zobrazovacích metod, např. CT a MR vyšetření. (Rüttinger, Hadidi, 1991; Xinou *et al.*, 2003).

Přítomnost specifických protilátek v krvi širokého spektra vyšetřovaných lidí ukazuje, že *Toxocara canis* je škrkavka s jednou s nejvyšších séroprevalencí, byť se hodnoty liší v závislosti na prostředí a na zvolené skupině (Uhlíková, Hübner, 1998 uvádí v České republice prevalenci až 36 %, Stensvold *et al.*, 2009 zaznamenal 2,4% prevalenci v Dánsku, Nicoletti *et al.*, 2008 zase 6,6% prevalenci mezi jinak zdravými Italy, Jacquier *et al.*, 1991 zjistil 2,7% prevalenci ve Švýcarsku, Park *et al.*, 2002 zjistil v Korei séropozitivitu 5,1 % a Hakim *et al.*, 1993 zaznamenal 19,6 % séropozitivních lidí v Malaysii).

Kvůli různorodosti klinických projevů je larvální toxokaróza v současné době rozdělována na čtyři základní formy (Fan *et al.*, 2015). Jedná se o *visceral larva migrans* (Inan *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2015), oční toxokarózu, nazývanou též jako *ocular larva migrans* (Schantz *et al.*, 1980; Good *et al.*, 2004), skrytou toxokarózu (z anglického *common*, nebo též *covert toxocariasis*, Rasmussen *et al.*, 1993) a cerebrální toxokarózu, nebo též neurotoxokarózu (Bächli *et al.*, 2004; Fillaux, Magnaval, 2013; Janecek *et al.*, 2014; Fan *et al.*, 2015).

2.2.1.1 *Visceral larva migrans*

Visceral larva migrans je forma toxokarózy způsobena velkým počtem infekčních L3 larev v různých orgánech a měkkých tkáních. Typické klinické projevy jsou hepatomegalie, eosinofíie a horečka, ale mohou být doprovázeny méně častými projevy, jako astma či bolest končetin (Inan *et al.*, 2006; Chandrashekhara *et al.*, 2010; Coşkun, Akıncı, 2013; Fillaux, Magnaval, 2013; Fan *et al.*, 2015).

2.2.1.2 Oční toxokaróza

Oční toxokaróza je forma, kdy jsou larvy přítomny v očích. Ke vzniku klinických příznaků stačí infekce malým množstvím larev. Příznaky mohou být od mírných až po vážné. Ve většině případů postihuje tato forma toxokarózy pouze jedno oko. Vznik zánětu v oku zapříčiněného přítomností larev může způsobit poškození rohovky, zhoršení zraku až slepotu (Fillaux, Magnaval, 2013; Fan *et al.*, 2015).

2.2.1.3 Skrytá toxokaróza

Vysoká séroprevalence specifických protilátek v populaci, ale zároveň relativně nízký počet zaznamenaných případů *visceral larva migrans* vedly k závěru, že existují i jiné klinické projevy toxokarózy, než právě ty typické pro tuto její formu. Skrytá toxokaróza se vyznačuje nespecifickými mírnými příznaky, jako vyrážka, slabost, dýchací obtíže, bolest břicha, ztráta váhy, bolest hlavy, nevolnost, poruchy spánku, nebo bolesti končetin (Fillaux, Magnaval, 2013; Fan *et al.*, 2015). Je obtížné ji zaznamenat, protože nespecifické klinické příznaky nenaznačují přítomnost parazita, dokud nejsou provedena další vyšetření (sérologické, zobrazovací).

2.2.1.4 Cerebrální toxokaróza

Cerebrální toxokaróza, nebo též neurotoxokaróza je charakterizována napadením centrální nervové soustavy larvami, nejen mozku jak může zavádět jedno z používaných označení. Intensita projevů záleží na mnoha faktorech, jako je infekční dávka, opakované infikování toxokarami či imunitní stav hostitele (Fan *et al.*, 2015). Klinické příznaky jsou encefalitida (Caldera *et al.*, 2013), meningitida (Sick, Hennerici, 2014), meningoencefalitida (Moreira-Silva *et al.*, 2004), encefalomyelitida (Helsen *et al.*, 2011), myelitida (Goffette *et al.*, 2000), vaskulitida (Sommer *et al.*, 1994), hemorhagie a poškození neuronů vedoucí až ke vzniku epilepsie (Bächli *et al.*, 2004; Kazek *et al.*, 2006; Nicoletti *et al.*, 2008; Fan *et al.*, 2015). Vyjíměčně se může projevit i hemiplegie, tj. ochrnutí poloviny těla či jiné poruchy (Jagannath *et al.*, 2009). S cerebrální toxokarózou též souvisí neurologické poruchy a behaviorální změny (Scheid *et al.*, 2008). Může mít spojitost s roztroušenou sklerózou (Söndergaard, Theorel, 2004) a schizofrenií (Kaplan *et al.*, 2008; Khademvatan *et al.*, 2014). Napadení centrální nervové soustavy parazitem může způsobit její patologické změny s vážnými následky, které mohou vyústit až ve smrt pacienta (Moiyadi *et al.*, 2007). Právě cerebrální toxokaróza je předmětem zájmu předložené diplomové práce.

Přestože je séroprevalence v populaci vysoká, je zaznamenán minimální počet případů cerebrální toxokarózy u lidí. To nám pokládá otázku, jak je možné, že přestože se velká část populace s parazitem setkala, tak doposud bylo neúměrně málo zaznamenaných klinických případů.

Lze usuzovat, že vysoká patogenost červa se objevuje pouze v určitých případech a ostatní projevy jsou velmi mírné, nebo žádné. Séroprevalence v populaci tedy neukazuje výskyt onemocnění toxokarózou, ale ukazuje výskyt *Toxocara canis* v prostředí.

Larvy přítomny v mozku jsou pohyblivé, živí se a produkují metabolity. Porovnáme-li tuto skutečnost například s výskytem mnohem menšího parazita *Toxoplasma gondii* v mozku, který se ve tkáni nepohybuje a ani se tkání neživí a přesto je dokázáno, že způsobuje behaviorální změny člověka (Flegr, 2007; Flegr, Markoš, 2014), tak se nabízí otázka, zda larvy toxokary v dlouhodobějším horizontu opravdu nepředstavují vážné nebezpečí.

2.2.2 Experimentální studie zaměřené na cerebrální toxokarózu

Nejvhodnějším modelovým zvířetem na výzkum lidské toxokarózy je prase. Jedná se o paratenického hostitele, který je člověku fyziologicky, imunologicky a biochemicky velmi blízký (Willingham, Hurst, 1996). Na prasatech byla zkoumána migrace larev tkáněmi. Larvy v mozku prasat byly detekovány včetně patologických změn (Helwigh *et al.*, 1999; Sasmal *et al.*, 2008).

Potkani a pískomilové, kteří jsou též používáni jako modelová zvířata, se mohou lišit v distribuci larev v jednotlivých tkáních. Drůbež, holuby či japonské křepelky jsou používány v experimentech, protože se může jednat o potenciální zdroj infekce pro člověka (Strube *et al.*, 2013). Využívaným zvířetem je též králík (Bin *et al.*, 2016).

Nejčastěji využívaným modelovým zvířetem na výzkum lidské toxokarózy je ale myš. Myši lze chovat ve velkém počtu, jsou schopny rychlé reprodukce a manipulace s nimi je snadná. Další výhodou je množství vyšlechtěných kmenů se širokou škálou definovaných vlastností a současně role myši v přirozeném životním cyklu toxokary. Při výzkumu toxokarózy lze snadno detekovat larvy v malých orgánech a lze průběžně pozorovat neurologické a behaviorální změny (Holland, Hamilton, 2013). V experimentech jsou používány více imbrední kmeny myši, jako BALB/c, A/J, CBA/Ca, C3H/HeN, C57BL/6j, SWR nebo NIH, než myši outbrední (Hamilton *et al.*, 2006).

2.2.2.1 Migrace larev do centrální nervové soustavy

Larvy migrují tělem. Otázkou zůstává, zda v tkáních paratenického hostitele domigrují do určité definitivní polohy, nebo podstupují stálou migraci. Výzkumy migrace larev prováděné na různých experimentálních zvířatech ukazují, že po infekci jsou larvy nalézány v různých časových odstupech postupně v játrech, plicích, srdci a následně ve svalovině, očích a nervové soustavě (Parsons, Grieve, 1990; Resende *et al.*, 2015). Časově postupující nálezy v těchto orgánech naznačují specifické roznášení larev po těle. Dle Bardóna *et al.* (1994) dosahují larvy v 9. týdnu po infekci v orgánech svou definitivní lokalizaci, odkud se již dále nepřemísťují.

Larvy byly nalezeny v mozku u všech kmenů myší ve studii Hollanda a Hamiltona (2013). V průběhu infekce se jejich počet v mozku myší navyšoval, přičemž nejvyšší počet byl nalezen 35. den po infekci (průměrně 326 larev). Obecně nižší počet larev byl nalezen u kmene NIH než u ostatních imbredních kmenů. Počty larev v mozcích outbredních myší byly mezi jedinci více variabilní než u imbredních myší (Holland, Hamilton, 2013). Janecek *et al.* (2014) popisují též přítomnost larev v mozku C57Bl/6J myší s infekční dávkou 2000 vajíček *T. canis* od 2. do 98. dne po infekci (p.i.). Nejvyšší počet larev zachytili v mozku 42. den p.i. Eid *et al.* (2015) pozorovali počty larev v mozcích myší ve 2., 5. a 12. týdnu p.i. (infekční dávka 1000 vajíček *T. canis*, kmen myší Swiss albino). Navíc porovnávali počty larev u imunokompetentních a imunosuprimovaných jedinců. U imunokompetentních myší v 2. týdnu p.i. našli v mozcích 6,5 % larev z infekční dávky, v 5. týdnu 9,09 % a ve 12. týdnu 10,69 % z infekční dávky. U imunosuprimovaných myší byly počty larev ještě vyšší, 9,7 % z infekční dávky ve 2. týdnu p.i., v 5. týdnu p.i. 13,72 % a ve 12. týdnu p.i. dokonce 15,48 % z infekční dávky. To ukázalo, že s postupující dobou infekce docházelo k navyšování počtu larev v mozku. Imunosuprese způsobila větší invazi v mozku, než jaká se vyskytuje u imunokompetentních jedinců. Kolbeková *et al.* (2011a) při pozorování myší s dávkou 1000 larev na myš zjistila přítomnost larev v mozku již od 60. hodiny p.i. Larvy v mozku byly přítomny až do konce experimentu v 17. dni p.i.

Aktivní pohyb larev hostitelem může mít dva důvody. Jedním z nich je, že larvy aktivně migrují za živinami, nebo lepšími celkovými fyziologickými podmínkami. Pokud by se jednalo o cílený pohyb, tak je možnost, že jsou atrahovány gradientem nějaké molekuly. Tato otázka zůstává otevřená, protože se doposud zcela přesně neví, čím se larvy během migrace živí.

Druhým možným důvodem je únik před obrannými systémy hostitele. Na cizorodé látky a patogeny v těle hostitele působí jeho imunitní systém, který se jich snaží aktivně zbavit. Larvy toxokary se jakožto patogeni též musí chránit před útokem. K ochraně jim sice do určité míry slouží odolná kutikula, ale neustálá migrace jim umožňuje efektivní únik před imunitním systémem hostitele.

Je několik možností, jak imunitní systém hostitele likviduje larvy. První možností je zachycení larev ve tkáni a znemožnění jejich další migrace. Larvy v tkáních mohou být zachyceny v granulomech, které vznikají jako obranný systém těla hostitele (Parsons, Grieve, 1990; Playfair, Bancroft, 2004; Fillaux, Magnaval, 2013). Larvy v tkáních na roztlakových preparátech bez přítomnosti granulomu vykazovaly pohyb (Othman *et al.*, 2010). Toto pozorování potvrzuje, že larvy nezaujímají ve tkáních definitivní polohu, ale stále migrují tkání daného orgánu.

Na larvy mohou aktivně působit buňky nebo nebuněčné komponenty imunity, které se snaží parazita zbavit přímým působením, nebo jeho označením pro imunitní systém. Takovéto buňky jsou například eozinofily. Eozinofilie, tj. zvýšený počet eozinofilů je důležitým znakem reakce imunitního systému hostitele na larvy. Larvy se umí útoku těchto komponent bránit tím, že obměňují povrch, aby se zbavily navázaných buněk, případně protilátek, a tak i útoku imunitního systému hostitele (Maizels, 2013).

2.2.2.2 Patogenní působení larev v centrální nervové soustavě

Spekuluje se o cílené neurotropní migraci larev *Toxocara canis* v paratenickém hostiteli. Otázkou je, zda přítomnost larev v nervové soustavě je vskutku způsobena aktivní cílenou migrací, nebo jsou do nervové soustavy larvy zanášeny pasivně krevním oběhem, v tenkých mozkových cévách penetrují jejich stěny a vnikají do mozkové tkáně. Nutno podotknout, že u jiných helmintů bylo neurotropní chování v hostiteli pozorováno a dokázáno, např. u *Trichobilharzia regenti* (Hrádková, Horák, 2002).

Mozek a stejně tak oči hostitele jsou imunoprivilegovanými orgány. V těchto orgánech jsou tedy larvy částečně chráněny před přímým útokem hostitelova imunitního systému. To nabízí k úvaze variantu, že larvy mohou být do těchto orgánů zanášeny pasivně, ale mají zde větší šanci na přežití, zatímco larvy v ostatních tkáních těla jsou postupně eliminovány, a proto právě v mozku dochází k jejich dlouhodobému přežívání. Přestože je mozek imunoprivilegovaný orgán, i v něm dochází k reakcím na přítomnost poškození a patogenů. Reakcí na různorodé patogeny (viry, bakterie, parazity) mohou být zápalové reakce a různá

poškození (nekrózy, infiltráty buněk, mikroglióza, ischemie a další). Žádný z publikovaných autorů však nepozoroval zápalovou reakci kolem nalezených larev (Maruyama *et al.*, 1994; Akao *et al.*, 2003; Othman *et al.*, 2010; Kolbeková *et al.*, 2011a; Eid *et al.*, 2015). Z toho tedy plyne, že *Toxocara* má vyvinuté mechanismy k úniku před obrannými systémy hostitele.

U infekcí toxokarózy byly pozorovány mikroskopické změny, jako hemorhagie (Cardillo *et al.*, 2009; Janecek *et al.*, 2014; Resende *et al.*, 2015), léze (Dolinsky *et al.*, 1981; Resende *et al.*, 2015), infiltráty buněk ve tkáni i kolem cév, nekrózy, měknutí tkáně, tzv. malacie, nahloučení aktivovaných mikroglíí a demyelinizaci, nateklé axony (spheroid) a poškození axonů (Janecek *et al.*, 2014), leukostáze v cévách a malé abscesy (Kolbeková *et al.*, 2011b). Žádný z experimentů ale nesledoval histopatologické změny komplexně a jejich přítomnost a rozvoj v časových úsecích infekce. Sledování těchto změn je prováděno spíše jako doplňková metoda v experimentech.

Působení toxokar nebylo pozorováno pouze z histopatologického hlediska, ale byly provedeny i experimenty zkoumající dopad přítomnosti a působení larev v mozku na chování. Dolinsky *et al.* (1981) sledovali u myší výskyt explorativního chování ve známém prostředí zároveň s odpovědí na nové podněty, chování v otevřeném prostoru, schopnost učení. Cox, Holland (2001a,b) pozorovali dopad různých infekčních dávek u různých kmenů myší na chování, stejně tak i rozdíl chování u pokusných myší s jednorázovými infekcemi a reinfekcemi. Cílem jejich zájmu byly reakce na nové podněty, sledování vývoje učení a paměti, pozorování explorativního chování a aktivity a pozorování strachu jedinců v definovaných situacích.

V experimentech byly zaznamenány i neuromotorické poruchy, které mohou ukazovat na patologické dlouhodobé působení parazita v nervové soustavě. Heuer *et al.* (2015) u myší zaznamenali špatnou koordinaci pohybů, problémy s udržením rovnováhy, ochrnutí poloviny těla, oslabené končetiny a pohyb v kruhu. Hamilton *et al.* (2006) zaznamenali u myší ztrátu rovnováhy a koordinační obtíže. Akao *et al.* (2003) na pískomilech pozorovali problémy s chůzí a točení v kruhu. Přestože záznamy o neuromotorických poruchách během nález existují, nebyla zatím tato problematika zpracována komplexně od časné akutní až do pozdní chronické fáze infekce toxokarami v pravidelných krátkých časových intervalech.

3 CÍLE PRÁCE

Cílem experimentální části předložené diplomové práce bylo charakterizovat cerebrální formy larvární toxokarózy u myši v různých fázích infekce.

Konkrétně to znamenalo zjistit počty a lokalizaci larev v mozku, popsat histopatologické změny v mozkové tkáni a případné neurologické projevy a behaviorální změny u experimentálních myši.

V teoretické části práce jsme shrnuli zásadní poznatky o biologii *Toxocara canis* se zaměřením na patologii nálezů paratenických hostitelů. Porovnáním získaných výsledků s publikovanými poznatky jsme se snažili upozornit na důležitost a nebezpečí plynoucí z nákazy tímto parazitem pro člověka.

4 METODIKA

4.1 Modelový organismus

4.1.1 Hostitel

Použitými modelovými hostiteli byly dospělé myši kmene BALB/c obou pohlaví.

4.1.2 Parazit

Použitými parazity byly larvy L3 škrkavky *Toxocara canis* (Ascaridae) vylíhnuté *in vitro* a dlouhodobě uchovávané v médiu RPMI 1640 (gibco; A 10491-01).

Larvy jsme získali dle metodiky Kolbekové *et al.* (2011a), tj. vyjmutím vajíček z dospělých samic *Toxocara canis* získaných odčervením psů z útulku. Takto získaná vajíčka byla uchována v médiu RPMI 1640 (gibco; A 10491-01) až do dozrání. Následně z nich byly izolovány infekční L3 larvy parazita za použití Baermannovy metody v CO₂ inkubátoru při 37°C po dobu 12 hodin (Fan *et al.*, 2004; Kolbeková *et al.*, 2011a), které jsme dále používaly pro infekce myší.

4.2 Experimentální infekce

4.2.1 Skupiny myši

Myši byly rozděleny na 3 skupiny:

- ✓ Skupina I. – myši pro jednorázovou infekci, 33 kusů
- ✓ Skupina II. – myši pro časnou reinfekci (v 5. týdnu po infekci, p.i.), 10 kusů
- ✓ Skupina III. – myši pro pozdní reinfekci (v 17. týdnu p.i.), 5 kusů

Skupina pro jednorázovou infekci pojímala největší počet jedinců, aby dostatečně pokryla různé fáze akutní i chronické infekce od 1. po 36. týden. V této skupině byli použiti samci i samice. V obou skupinách pro reinfekce byly použity pouze samice.

Myši z I. a II. skupiny byly infikovány průběžně po menších skupinách o 4 až 10 kusech. Myši z III. skupiny byly infikovány všechny najednou.

V průběhu celého experimentu byla vždy k dispozici alespoň jedna neinfikovaná kontrolní myš kmene BALB/c a jeden kontrolní jedinec byl zpracován histologicky na začátku experimentu.

4.2.2 Infekční dávka

Každá myš byla infikována infekční dávkou 1000 larev, v případě reinfekcí byla myším stejná dávka podána při prvním i druhém infikování.

Pro stanovení počtu se larvy nechaly usadit v médiu na dně inkubační nádoby. Takto sedimentované larvy byly pipetou odsány s 1 ml média RPMI 1640 (gibco; A 10491-01) do Eppendorfovy zkumavky. Zde byly promíchány a pipetovány v 10 kapkách po 1 μ l na podložní sklo. Ve světelném mikroskopu byly spočítány živé larvy v každé kapce, vypočítán jejich průměrný počet v 1 μ l a následně přepočítán na 1000 μ l. Dle potřeby byly larvy doplněny ze zásobního média a znovu přepočítány. Konečný počet larev byl zkoncentrován na objem, který odpovídal dávce 1000 larev v 10 μ l pro jednu myš.

4.2.3 Podání infekční dávky

Infekce myši larvami škrkavek byla prováděna vždy perorálně pomocí automatické pipety (Eppendorf Research; 0,5 – 10 μ l) se sterilní špičkou. Myši přidržované za ocas a kůži

byla do tlamy vsunuta špička pipety a bylo jí pomalu podáváno 10 μ l média s larvami tak, aby došlo ke spolknutí celého objemu.

4.2.4 Monitorování myši

Monitorování myši bylo prováděno v průběhu celého experimentu u všech infikovaných myši. Přítomnost a rozsah případných změn byly porovnávány s kontrolní myši.

Ze všech infikovaných myši bylo průběžně získáváno sérum na stanovení produkce specifických protilátek. Krev byla odebírána z ocasní cévy po nastřížení špičky ocasu čistými nůžkami do Eppendorfovy zkumavky (200 μ l). Séra byla získávána nejdříve ve 3. týdnu po infekci a dále až do ukončení experimentu ve 3 – 5týdenních intervalech.

Kontrola myši probíhala pravidelně jednou týdně. Pokud se u nich začaly projevovat fyzické, neurologické či behaviorální změny, byly kontrolovány častěji. Mezi fyzické příznaky byly počítány projevy jako silně nahrbený hřbet, načepýřená srst a zhoršené hojení ocasu po odběru krve. Za neurologicko-behaviorální příznaky bylo považováno běhání v kruhu, zhoršená pohyblivost, špatná koordinace těla, snížená celková aktivita myši a částečné či úplné ochrnutí.

Pozorované změny byly zaznamenávány do protokolu, případně byl pořízen videozáznam.

Myši, u nichž byly neurologické příznaky pozorovány, byly v požadované době od infekce zpracovány přednostně. Zhoršoval-li se stav myši rapidně, nečekalo se na požadovaný termín, ale myš byla usmrcena a zpracována ihned.

4.3 Zpracování materiálu

4.3.1 Usmrcení a pitva

Usmrcení myši bylo provedeno ve stanovené fázi infekce cervikální dislokací. Žádná z ostatních myši nebyla usmrcení přítomna pro dodržení zásad humánního zacházení s laboratorními zvířaty, tj. aby nedošlo ke stresování ostatních myši.

Před samotnou pitvou byla nejprve potvrzena smrt myši silným štípnutím do končetin a ucha. Následně byla myš připevněna čtyřmi připínáčky k podložce za všechny končetiny ventrální stranou těla vzhůru.

Břišní dutina byla otevřena nastříhnutím kůže nůžkami ve spodní části břicha, jejím rozstříhnutím ke stehnům a následně byla odstraněna kůže stažením pomocí pinzet směrem k hlavě. Pobřišnice byla rozstřižena a byla odstraněna část žeber a hrudní kosti, čímž byl otevřen přístup k orgánům. Srdce a plíce byly vyjmuty a přemístěny stranou, aby se vytvořilo sběrné místo pro odebrání co největšího objemu krve do Eppendorfovy zkumavky pomocí Pasteurovy pipety. Pomocí pinzety a nůžek byly vyjmuty slezina a játra a vloženy do Tris pH 7,6 (TBS 10×; DiaPath; T0073) na Petriho miskách pro další zpracování.

Následovalo vyjmutí mozku nastřížením kůže v zátylku a odhalením lebky a části páteře. Skalpelem byla přeríznuta páteř co nejbliže k lebce. V místě odhalení míšního kanálu byla pomocí malých nůžek nastřížena lebka podél šípového švu frontálním směrem a postupně odstříhávána za účelem odhalení mozku s co nejmenším poškozením. Po zpřístupnění byl mozek pinzetou vyjmut a dále zpracován pro histologii. Případně byl mozek rozpůlen, pro histologii byla použita jedna část a druhá část pro stanovení počtu larev.

Zbytky těla byly přesunuty do sběrného mrazáku pro pozdější likvidaci.

4.3.2 Zpracování krve – nepřímá ELISA

Nasbíraná krev byla 10 minut centrifugována na centrifuze tak, aby se oddělily krevní elementy od séra a sérum bylo přepipetováno do čisté Eppendorfovy zkumavky (200 µl), označeno a zamraženo pro pozdější serologické vyšetření.

Pro detekci specifických IgG protilátek proti TES antigenu *Toxocara canis* v myších sérech byla použita metoda nepřímá ELISA.

Tato metoda byla složena z několika kroků a prováděla se na 96 jamkové destičce, reakce všech vzorků byly prováděny v dubletech.

V prvotních pokusech byla metoda optimalizována testováním různých ředění sér a vynecháváním různých kroků v kontrolních dubletech (vynechání navázání séra, vynechání navázání sekundární protilátky, vynechání navázání séra i sekundární protilátky, vynechání zviditelnění reakce pomocí TMB, všechny vynechané kroky byly nahrazeny odpovídajícím objemem vymývacího roztoku), případně testováním různých navazovacích a blokovacích roztoků.

K měření byl použit zjištěný optimální protokol. Na každé použité ELISA destičce byl vždy použit alespoň jeden vzorek séra neinfikované kontrolní myši, podle kterého byl pokus dále vyhodnocován. Taktéž byla prováděna negativní kontrola přítomností dubletu, do kterého byl přidán blokovací roztok bez vzorku séra.

Po poslední reakci byla u vzorků změřena absorbance na ELISA readeru při 450 nm proti blanku, tj. jamce se 100 μ l destilované vody.

Zjištěné hodnoty absorbance byly přepočítány na násobky ku průměru hodnot kontrolních myší. Za cut off pro stanovení pozitivivity jsme zvolili hodnotu dvojnásobnou a vyšší dle metodiky Kolbekové et al., 2011b.

Použité chemikálie: PBS (Roti-Stock 10 \times PBS; Roth; R1058.1), Tween (Tween 20; Sigma-Aldrich; P1379-25ML), Na₂CO₃ (Uhlíčan sodný bezvodý p.a.; Penta; 011-005-00-2), NaHCO₃ (Hydrogenuhlíčan sodný p.a.; Penta; 144-55-8), BSA (Albumine from bovine serum; Sigma-Aldrich; A7906-50G), Goat serum (Sigma-Aldrich; G9023-5ML), TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine; Sigma-Aldrich; Ready-to-use; T0440-100ML), 1N H₂SO₄ (Sulfuric acid; Sigma-Aldrich; 258105-100ML)

- ✓ Navazovací roztok: Na₂CO₃ (3,03 g/l) + NaHCO₃ (6 g/l) v destilované vodě (dH₂O); pH 9,6
- ✓ Vymývací roztok: 1 \times PBS + 0,05% tween
- ✓ Blokovací roztok: 1 \times PBS + 0,05% tween + 1% BSA, případně s 1 % kozího séra (Goat serum)
- ✓ Antigen parazita: TES (Exkrece-antigen *Toxocara canis*, získaný sběrem z kultivačního média s larvami dle metodiky Watthanakulpanich *et al.*, 2008), připravený a k rutinní humánní diagnostice používaný v Národní referenční laboratoři pro tkáňové helmintózy VFN v Praze
- ✓ Sekundární protilátka: HRP conjugated Anti-mouse IgG (Anti-mouse IgG whole molecule-peroxidase antibody produced in goat; Sigma-Aldrich; A4416-.5ML)

Ředění:

- ✓ Antigen: TES *Toxocara canis* 1:1000 v navazovacím roztoku
- ✓ Sérum: 1:100 nebo 1:200 v blokovacím roztoku
- ✓ Sekundární protilátka: Anti-mouse IgG 1:10 000 ve vymývacím, případně blokovacím roztoku

Měřicí přístroj: ELISA reader (MRX Microplate reader; Dynatech Laboratories)

Postup:

Uvedená množství odpovídají objemům pro 1 jamku.

- ✓ Navázání antigenu: 50 μ l naředěného antigenu v navazovacím roztoku přes noc při 4 °C
- ✓ Vymytí: 3 \times 200 μ l vymývacího roztoku
- ✓ Blokování nespecifických vazeb: 200 μ l blokovacího roztoku 2 h při pokojové teplotě
- ✓ Vymytí: 3 \times 200 μ l vymývacího roztoku
- ✓ Navázání séra: 100 μ l naředěného séra v blokovacím roztoku 1 h při teplotě 37 °C, nebo přes noc při 4 °C
- ✓ Vymytí: 3 \times 200 μ l vymývacího roztoku
- ✓ Navázání 100 μ l naředěné sekundární protilátky ve vymývacím roztoku 1 h při teplotě 37 °C
- ✓ Vymytí: 3 \times 200 μ l vymývacího roztoku
- ✓ Zviditelnění reakce: 50 μ l substrátu TMB, 5 min
- ✓ Zastavení reakce: 50 μ l 1N H₂SO₄

Reakce po přidání substrátu TMB byla modrá, po přidání 1N H₂SO₄ byla výsledná barva reakce žlutá.

- ✓ Absorbance byla změřena při 450 nm na ELISA readeru do 30 minut od přidání 1N H₂SO₄.

4.3.3 Zpracování nativních preparátů jater a sleziny

Každý orgán byl nejprve zvážen na analytických vahách. Hmotnost jater a hmotnost a rozměry sleziny byly zaznamenány a porovnány s hodnotami kontrolní myši. Oba orgány byly prohlédnuty a případné výrazné makroskopické změny (barva, tvar, velikost, přítomnost

nodulů) byly též zaznamenány. Roztlakové preparáty z orgánů byly mikroskopicky vyšetřeny na přítomnost larev.

Až na výjimky bylo vyšetřeno 10 roztlakových preparátů z jater a 5 roztlakových preparátů ze sleziny. Standardní velikost vzorku byla stanovena zprůměrováním hmotnosti 10 vzorků z jater a 5 vzorků ze sleziny. Pro játra se jednalo o průměrnou hmotnost 0,011 g na jeden vzorek. Pro slezinu byla průměrná hmotnost vzorku 0,010 g.

Započítány byly larvy živé i mrtvé, byly-li jasně rozpoznatelné na roztlakovém preparátu. Odhad celkového počtu červů na orgán byl získán přepočítáním na celkovou hmotnost orgánů.

4.3.4 Zpracování mozku

Pro histologické zpracování byly mozky fixovány v cca 8 ml Bouinova fixačního roztoku (Picroformalin acc. Bouin; DiaPath, P0104) po dobu nejméně 24 hodin.

Pro stanovení počtu červů jsme použili roztlakovou a trávící metodu. Snažili jsme se ověřit použitelnost a přesnost těchto metod pro stanovení viability a počtu červů a jejich distribuci.

Pro tyto metody byla použita polovina mozku, která byla dále rozdělena na přední a zadní část v místě, kde mozeček nasedal na koncový mozek.

4.3.4.1 Roztlaková metoda

Postup:

Přední a zadní část vyšetřované poloviny mozku byla roztláčena samostatně mezi dvě velká podložní skla 7,3 cm × 10 cm a prohlížena ve světelném mikroskopu (zvětšení 100×). Počty larev byly zaznamenány a přepočítány na celou testovanou část mozku.

4.3.4.2 Trávící metoda

Použité chemikálie: TrypLE (TrypLE Select 10×; gibco; A12177-01), PBS (Roti-Stock 10× PBS; Roth; R1058.1)

- ✓ Trávící roztok: 2× PBS + 5% TrypLE

Postup:

Každá testovaná část mozku byla samostatně zhomogenizována v jednorázovém homogenizátoru (VWR™ Pestle & microtube; 431-0098) a trávěna ve skleněné zkumavce v trávícím roztoku minimálně 2 hodiny při 37 °C. Natrávená tkáň byla následným důkladným

protřepáním zkumavky mechanicky rozmělněna. Dolitím 2 ml 2× PBS do zkumavky byl zastaven proces dalšího trávení. Natrávená tkáň sedimentovala na dno zkumavky a byla dále zpracovávána.

Barvení:

Pro zvýraznění červů pro pozorování pod binokulární lupou byly testovány tři barvení. Vitální barvivo Neutrální červeň bylo vybráno jako ideální pro barvení hlístic dle Thomas, da Cunha Lana (2008). Vyzkoušeny byly další dvě barviva – Eosin Y a Sudán III.

1. Barvení Neutrální červeň

Použité chemikálie: Neutrální červeň (Neutrální červeň; Lachema)

Ředění: Roztok 0,01% Neutrální červeň v dH₂O

2. Barvení Eosin Y

Použité chemikálie: Eosin Y (DiaPath; M00235), 70% ethylalkohol (etOH)

Ředění: 0,1% Eosin Y v 70% etOH

3. Barvení Sudán III.

Použité chemikálie: Sudán III., 95% etOH

Ředění: pro přípravu 100 ml barvicího roztoku bylo 73,5 ml 95% etOH ohřáto ve vodní lázni na teplotu 70 °C, poté bylo přidáno 0,5 g prášku barviva Sudán III. Nakonec bylo dolito 26,5 ml dH₂O, která měla teplotu 75 – 80 °C. Barvivo bylo promícháno a před použitím zchlazeno na pokojovou teplotu.

Společný postup pro všechna barvení:

Natrávená mozková tkáň v naředěném trávícím roztoku byla Pasteurovou pipetou přesunuta na Petriho misku. Poté do ní bylo za pomoci Pasteurovy pipety po kapkách přidáváno barvivo a lehkým krouživým pohybem bylo smícháno s roztokem. Míra požadovaného zabarvení byla kontrolována pod binokulární lupou. Tento postup byl opakován až do dosažení požadovaného výsledku. Celý objem natrávené tkáně na Petriho misce byl poté pod binokulární lupou prohlédnut a byla zaznamenána přítomnost a počet červů.

Po testování byla vybrána a dále používána jako přesnější roztlačková metoda.

4.3.5 Zalévání vzorků do parafínu

Použité chemikálie: 100% etOH, 96% etOH, 70% etOH, xylen, nasycený roztok parafínu v xylenu (xylen – parafín), parafín (Paraplast; Leica; 39601006)

Postup:

Nejprve bylo potřeba vzorek vyprat z fixačního Bouinova roztoku, což bylo provedeno použitím 70% etOH po dobu alespoň 30 min.

Následovalo odvodnění vzorku vzestupnou alkoholovou řadou, přičemž uvedené časy jsou minimální, doba v jednotlivých fázích byla dle potřeby prodloužena do úplného vymytí preparátu od žluté kyseliny pikrové.

- ✓ 70% etOH po dobu 30 minut
- ✓ 70% etOH po dobu 30 minut
- ✓ 96% etOH po dobu 20 minut
- ✓ 96% etOH po dobu 20 minut
- ✓ 96% etOH po dobu 20 minut
- ✓ 100% etOH po dobu 20 minut
- ✓ 100% etOH po dobu 20 minut
- ✓ 100% etOH po dobu 20 minut

Po odvodnění byl vzorek převeden přes xylen do xylen-parafínu. Uvedené časy nebyly překročeny, aby nedošlo k poškození tkáně.

- ✓ Xylen po dobu 15 – 20 minut
- ✓ Xylen po dobu 15 – 20 minut
- ✓ Xylen – parafín po dobu 15 minut

Prosycování parafínem bylo prováděno v inkubátoru při teplotách mírně nad teplotou tání parafínu, která je 56 °C. Doba druhého prosycování parafínem byla v případě potřeby prodloužena ze 3 až na 24 hodin.

- ✓ Parafín po dobu alespoň 1 hodiny
- ✓ Parafín po dobu alespoň 3 hodin

Pro zalití vzorku do parafínového bločku byl do silikonové formy nejprve nalit čistý roztavený parafín, následně byl přenesen a umístěn do parafínu pinzetou mozek a označen přiloženým papírovým štítkem.

- ✓ Zalití do parafínového bločku a tuhnutí

Ve formě byl celý parafínový bloček ponechán několik hodin k tuhnutí při pokojové teplotě.

4.3.6 Řezání vzorků

Po zalití do parafínu byly vzorky nařezány na mikrotomu (Thermo scientific; Finesse me +) na řezy o tloušťce 4 μm a přeneseny na podložní skla navlhčené destilovanou vodou, nebo do vodní lázně (Vodní lázeň WB1; ZENA-R) a z ní následně nabrány podložními skly. Po vysušení vody byly vzorky připraveny na barvení.

4.3.7 Barvení histologických preparátů

Na histologické řezy byly použity dvě barvicí metody, a to barvení Hematoxylin-eosin a Luxol fast blue.

4.3.7.1 Barvení Hematoxylin-eosin

Barvení histologických preparátů bylo prováděno barvivem Harrisův hematoxylin a Eosin Y.

Použité chemikálie: Harrisův hematoxylin (Sigma-Aldrich; SLBD 9194), Eosin Y (DiaPath; M00235), xylén, 100% etOH, 96% etOH denaturovaný, 70% etOH, Kanadský balzám (ROTH; 8016.2)

Postup:

Nařezané vzorky byly zality v parafínu, který bylo potřeba odstranit pomocí xylenu. Doba 2 minut byla vždy dodržena přesně.

- ✓ Xylen po dobu 2 minuty
- ✓ Xylen po dobu 2 minuty

Vzorek byl poté zavodněn sestupnou alkoholovou řadou a destilovanou vodou.

- ✓ 100% etOH po dobu 1 minuty
- ✓ 96% etOH po dobu 1 minuty
- ✓ 70% etOH po dobu 1 minuty
- ✓ dH₂O po dobu 2 minuty

Po zavodnění vzorku se mohlo přejít k samotnému barvení, a to nejprve hematoxylinem a poté eosinem. Mezi barvením jednotlivými barvivy bylo potřeba přebytečný hematoxylin řádně vypláchnout kohoutkovou vodou. Naopak přebytečný eosin byl vyplachován vodou destilovanou.

- ✓ Hematoxylin po dobu 2 minuty
- ✓ Vypláchnutí H₂O
- ✓ Namáčení do eosinu 30 vteřin
- ✓ Vypláchnutí dH₂O po dobu 2 minuty
- ✓ Krátké opláchnutí dH₂O

Po barvení bylo potřeba vzorek opět odvodnit vzestupnou alkoholovou řadou, převést do xylenu a zalít do kanadského balzámu.

- ✓ 70% etOH po dobu 1 minuty
- ✓ 96% etOH po dobu 1 minuty
- ✓ 100% etOH po dobu 1 minuty
- ✓ Xylen po dobu 1 minuty
- ✓ Zamontování do kanadského balzámu

4.3.7.2 Barvení Luxol Fast Blue

Barvení bylo prováděno barvivem Luxol Fast Blue a Cresyl fast violet'.

Použité chemikálie: Luxol Fast Blue (Solvent Blue 38; Sigma-Aldrich; S3382-25G), 0,5% nebo 1% Cresyl fast violet' (Cresyl Violet acetate; Sigma-Aldrich, C5042-10G), roztok uhličitanu lithitého (Lithium carbonate; Sigma-Aldrich; 62470-100G-F), kyselina octová (Acetic acid 99,8%; Lachner; 10047-A9B), xylen, 100% etOH, 96% etOH, Kanadský balzám (ROTH; 8016.2)

Postup:

Nejprve bylo nutné ze vzorků vypláchnout parafín pomocí xylenu.

- ✓ Xylen po dobu 2 minuty
- ✓ Xylen po dobu 2 minuty

Vzorky poté byly částečně zavodněny použitím 100% a 96% etOH.

- ✓ 100% etOH po dobu 1 minuty
- ✓ 96% etOH po dobu 1 minuty

Následovalo barvení Luxol Fast Blue, které probíhalo ve vodní lázni rozeřáté na 60 °C po dobu 2 hodin a poté ještě 20 minut mimo vodní lázeň, aby vzorky v barvivo vychladly.

- ✓ Luxol Fast Blue + 5 kapek kyseliny octové po dobu 2 hodin při 60 °C + 20 minut chlazení

Přebytečné barvivo bylo potřeba opláchnout v destilované vodě

- ✓ Opláchnutí dH₂O

Výsledné barvení bylo diferenciováno, aby byly obarveny pouze žádoucí struktury ve tkáni. Vzorky byly během diferenciaci průběžně kontrolovány pod světelným mikroskopem, nebyla-li nemyelinizovaná tkáň dostatečně odbarvena do bleďa, byla diferenciaci zopakována. Diferenciaci byla zastavena opláchnutím vzorků v destilované vodě.

- ✓ Diferenciaci v uhličitanu lithitím po dobu 5 – 7 minut
- ✓ Opláchnutí dH₂O

Dobu barvení Cresyl fast violetí bylo nutné dodržovat přesně, aby nedošlo k nedobarvení, nebo naopak přebarvení tkáně. Přebytečné barvivo bylo opláchnuto v destilované vodě, ale pouze krátce, aby nedocházelo k přílišnému vymývání barviva.

- ✓ 0,5% Cresyl fast violet' + 10 kapek kyseliny octové po dobu 1 minuty 30 vteřin, nebo 1% Cresyl fast violet' po dobu 10 vteřin
- ✓ Opláchnutí v dH₂O

Po barvení byl vzorek převeden přes 100% etOH a xylen a zalit do kanadského balzámu.

- ✓ 100% etOH po dobu 30 vteřin
- ✓ Xylen po dobu 1 minuty
- ✓ Zamontování do kanadského balzámu

5 VÝSLEDKY

5.1 Projevy u myši v průběhu onemocnění

Pozorované myši dlouhodobě nejevily neurologické příznaky, ty se začaly projevovat s postupující dobou infekce. Jejich výskytu vždy předcházela nástup fyzických změn, tj. nahrbenost, načepýřená srst a zhoršení hojení po odběru krve.

Neurologické příznaky byly rozděleny na šest kategorií podle zaznamenaného projevu chování u všech myši s jednorázovými infekcemi i reinfekcemi. Některé myši vykazovaly pozvolný nástup neurologických změn v rámci až několika týdnů, u jiných se naopak příznaky objevily velmi rychle během pár dnů. Popsané příznaky byly zaznamenány během pozorování v den (případně během několika předchozích dní) usmrcení myši.

Kategorie projevů neurologických změn byly vytvořeny následovně:

- I. Snížená aktivita – do této kategorie byla myš zařazena, vykazovala-li zřetelný útlum aktivity. V některých případech byla aktivita snížena do takové míry, že myš se již nebyla schopná skoro pohybovat, nešlo ale o ochrnutí.
- II. V odpočinkové poloze váha přenesena silně vzad – tento jev předcházela, nebo se vyskytoval zároveň se ztrátou rovnováhy (obrázek č. 1).
- III. Ztráta rovnováhy – do této kategorie jsme počítali myši s problémy udržet rovnováhu a se špatnou koordinací těla.
- IV. Zhoršená pohyblivost zadních nohou – u některých myši byla pozorována zhoršená hybnost zadních končetin v různé míře, a to jak jednostranně tak i oboustranně.
- V. Zhoršená pohyblivost poloviny těla – v některých případech měl jedinec jasně postiženou pouze levou, nebo pravou polovinu těla.
- VI. Točení v kruhu – jednalo se o jasné patologické neovladatelné chování, kdy myš běžela vysokou rychlostí (umožňoval-li to její stav) v kruhu. Pozorovali jsme točení jak doprava, tak i doleva. Vždy však myš běžela na jednu stranu po celou dobu výskytu této poruchy.

Všechny myši v pozdní fázi infekce byly nahrbené, měly načepýřenou srst (obrázek č. 1) a měly zhoršenou schopnost hojení ran po odebrání krve z ocasu.



Obrázek č. 1: Myš vykazující fyzické změny způsobené infekcí – nahrbenost, načepýřená srst a váha těla přenesená vzad.

5.1.1 Jednorázová infekce

V tabulce č. 1 jsou zaznamenány pozorované neurologické změny všech myší od 1. do 36. týdne p.i. s jednorázovou infekcí. Poprvé se neurologické změny objevily v 9. týdnu p.i., a to pouze u jediné myši. Další myš se změnami se objevila až v 19. týdnu p.i. Čím více infekce postupovala, tím častěji se změny vyskytovaly, po 30. týdnu byly téměř u všech myší.

Myš, která vykazovala neurologické příznaky již v 9. týdnu p.i. se při zvednutí za ocas silně rozrotovávala tělo kolem vlastní osy. Při následném položení na podložku nebyla schopná tuto rotaci ukončit samostatně, ale kutálela se až do zastavení se o pevný objekt. Tento jev byl pozorován pouze u této jediné myši.

Jedna z myší zpracovaných ve 25. týdnu p.i. (v tabulce uvedena jako druhá ze dvou) vykazovala náznaky točení v kruhu směrem doleva, ale v tak nízké míře, kdy ještě nebyla zařazena do odpovídající kategorie.

Tabulka č. 1: Neurologické příznaky myši s jednorázovou infekcí *Toxocara canis* zaznamenané v době usmrcení. Přítomnost neurologických příznaků označena +

Jednorázová infekce	Bez neurologických příznaků	S neurologickými příznaky					
		Snížená aktivita	V odpočinkové poloze váha přenesena silně vzad	Ztráta rovnováhy	Zhoršená pohyblivost zadních nohou	Ochrnutí poloviny těla	Točení v kruhu
1	+						
3	+						
3	+						
5	+						
6	+						
7	+						
9		+			+	+	+
9	+						
11	+						
13	+						
15	+						
17	+						
19		+	+	+			
21	+						
23	+						
25		+	+	+			
25			+	+			
28				+			+
30	+						
31		+		+	+		+
31		+		+	+		+
32		+		+	+		+
32					+		
34	+						
36					+		

5.1.2 Reinfekce

V Tabulce č. 2 jsou zaznamenány pozorované neurologické změny myši reinfikovaných v 5. týdnu p.i. Poprvé se neurologické příznaky vyskytly u jediné myši v 10. týdnu p.i. Ve 14. týdnu p.i. vykazovala změny jediná myš. Navíc začínala projevat

náznak běhání v kruhu. Od 15. týdne p.i. byly neurologické změny zaznamenány u všech myší. Obě dvě myši v 15. týdnu p.i. měly silně sníženou schopnost pohybu, pouze ležely a přetočení z polohy na boku do polohy na břicho jim činilo velké problémy.

Tabulka č. 2: Neurologické příznaky myší s časnou reinfekcí *Toxocara canis* zaznamenané v době usmrcení. Přítomnost neurologických příznaků označena +

Časná reinfekce	Bez neurologických příznaků	S neurologickými příznaky					
Doba usmrcení-týdny p.i.		Snížená aktivita	V odpočinkové poloze váha přenesena silně vzad	Ztráta rovnováhy	Zhoršená pohyblivost zadních nohou	Ochrnutí poloviny těla	Točení v kruhu
8	+						
10	+						
10		+					
12	+						
14	+						
14		+	+	+	+	+	
15		+					
15		+					
16			+	+			+

Myši s pozdní reinfekcí v 17. týdnu p.i. vykazovaly všechny točení v kruhu, ale jelikož šlo o první záchyty těchto neurologických příznaků, tak až na jednoho jedince (zpracovaný ve 44. týdnu p.i., viz tabulka č. 3.) poumíraly. Z těchto myší nejsou další data.

Tabulka č. 3: Neurologické příznaky myší s pozdní reinfekcí *Toxocara canis* zaznamenané v době usmrcení. Přítomnost neurologických příznaků označena +

Pozdní reinfekce	Bez neurologických příznaků	S neurologickými příznaky					
Doba usmrcení-týdny p.i.		Snížená aktivita	V odpočinkové poloze váha přenesena silně vzad	Ztráta rovnováhy	Zhoršená pohyblivost zadních nohou	Ochrnutí poloviny těla	Točení v kruhu
44							+

5.2 Produkce specifických protilátek v průběhu onemocnění

Vyšetřována byla séra získaná jak z průběžných odběrů, tak z pitev. Metoda byla optimalizována během experimentu, z toho důvodu byla použitelná pouze data získaná vyšetřením sér z pitev, jejichž množství bylo dostatečné pro opakované vyšetření.

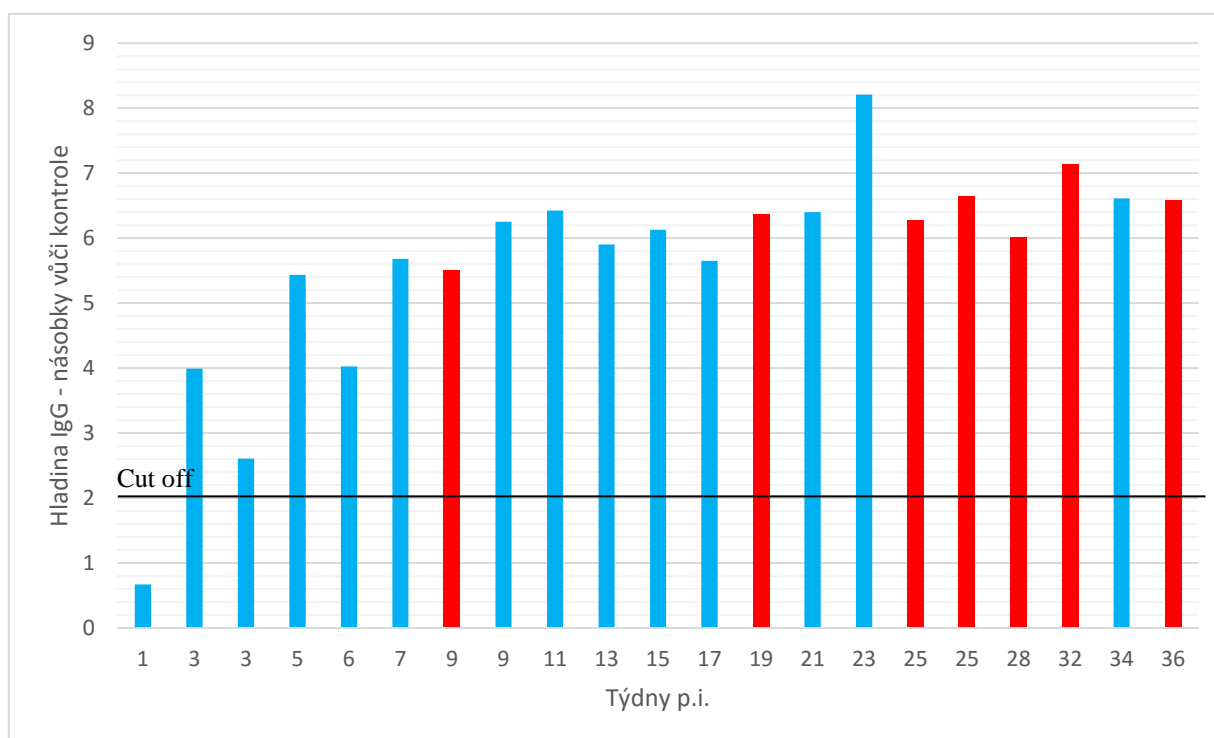
5.2.1 Jednorázová infekce

Byla testována séra od 1. do 36. týdne p.i. Jako pozitivní jsme dle stanovené cut off hodnoty určili myši od 3. do 36. týdne p.i.

Výsledky (graf č. 1) ukázaly, že hladina protilátek byla zvýšená u všech infikovaných myši. K nárůstu docházelo do 11. týdne p.i. (nejvíce do 7. týdne p.i.), poté se hladina protilátek ustálila. Výrazně vyšší hladinu protilátek oproti ostatním měla myš ve 23. týdnu p.i. Pro vyloučení chyby bylo sérum otestováno opakovaně na další destičce. Výsledek byl potvrzen jako správný.

Myši s neurologickými příznaky (graf č. 1, sloupce vyznačeny červenou barvou) nevykazovaly výrazně odlišnou hladinu protilátek vůči neurologicky zdravým myším.

*Graf č. 1: Nárůst hladiny protilátek v průběhu onemocnění (relativní hodnota vypočítaná jako poměr naměřené absorbance k průměrné absorbanci negativních kontrol). Myši s jednorázovou infekcí *Toxocara canis*. Přítomnost neurologických příznaků vyznačena červenou barvou sloupce.*

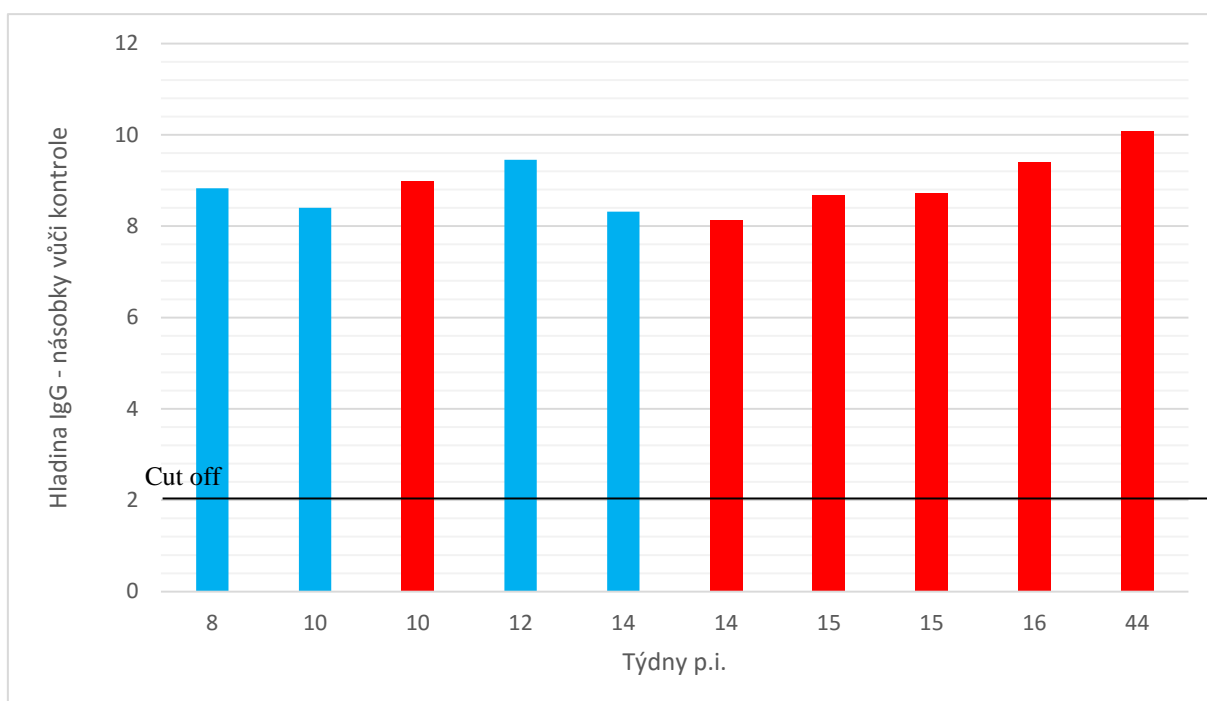


5.2.2 Reinfekce

Jako pozitivní jsme dle stanovené cut off hodnoty určili myši od 8. do 44. týdne p.i.

Séra myši s časnou ani pozdní reinfekcí nevykazovala v průběhu onemocnění výrazný pokles ani nárůst, jejich hladina se od počátku měření pohybovala mezi osmi až desetinásobkem hodnoty průměru hodnot kontrolních myši (graf č. 2). Rozdíl v imunitní odpovědi myši neurologicky zdravých a vykazujících neurologické příznaky se neprokázal.

Graf č. 2: Nárůst hladiny protilátek v průběhu onemocnění (relativní hodnota vypočítaná jako poměr naměřené absorbance k průměrné absorbanci negativních kontrol). Myši s reinfekcí Toxocara canis. Přítomnost neurologických příznaků vyznačena červenou barvou sloupce.



Imunitní odpověď reinfikovaných myši byla prokazatelně vyšší než odpověď myši s jednorázovou infekcí. Jedinou výjimkou byla myš s jednorázovou infekcí ve 23. týdnu p.i., jejíž imunitní odpověď dosáhla hodnoty odpovídající reinfikovaným myším.

5.3 Makroskopické hodnocení jater a sleziny

5.3.1 Játra

5.3.1.1 *Jednorázová infekce*

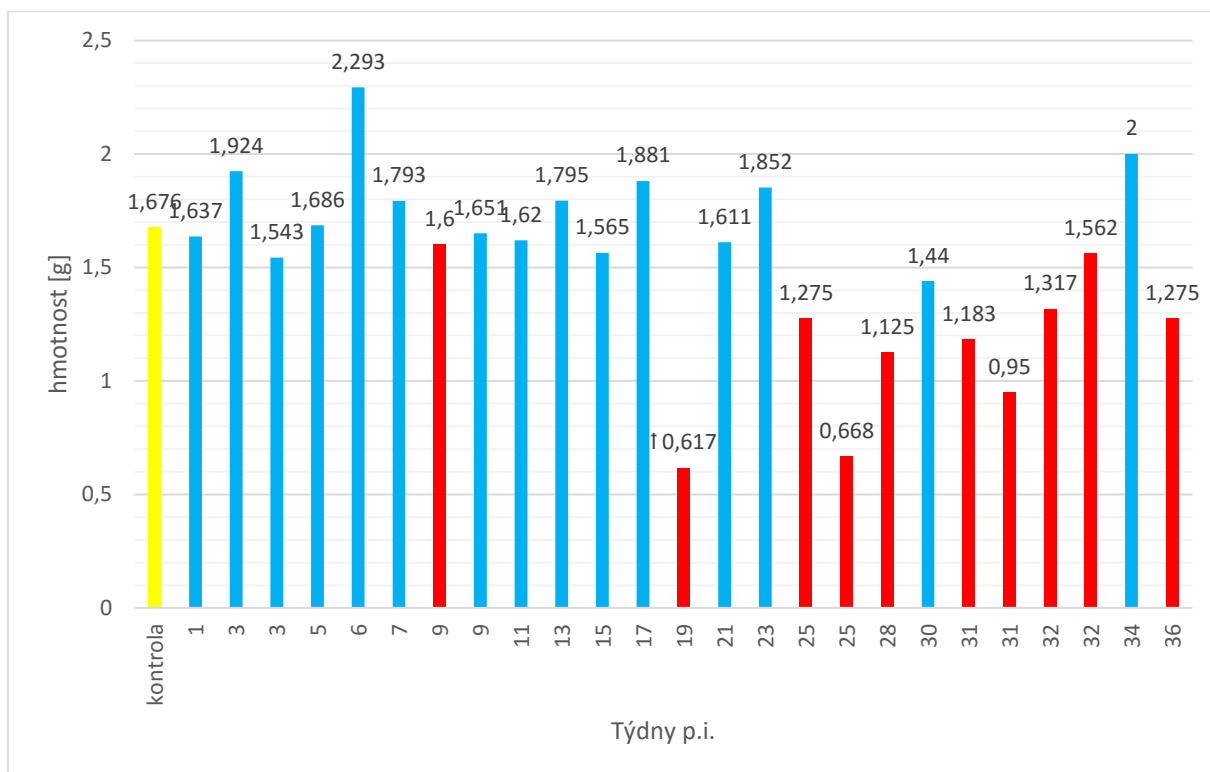
Granulomy, které se jevíly jako drobné bílé noduly ve tkáni, byly na játrech pozorovány u většiny myši s jednorázovou infekcí od 3. do 36. týdne pi. Granulomy byly pozorovány jak v celém objemu jater ve vysoké hustotě, tak i jako ojedinělé noduly v okrajových částech laloků orgánu.

Zjištěné hmotnosti jater myši od 1. do 36. týdne p.i. zobrazené v grafu č. 3 ukázaly, že v porovnání s kontrolou se zvětšení jater nevyskytovalo. Jedině u myši v 6. týdnu p.i. byla hmotnost jater výrazně vyšší než u myši kontrolní a u ostatních infikovaných myši, tudíž lze tvrdit, že tato myš trpěla hepatomegalií.

Myši s neurologickými příznaky měly většinou výrazně nižší hmotnosti jater než myš kontrolní a průměrně nižší hmotnosti jater než myši bez neurologických příznaků.

Hmotnost jater myši z 19. týdne p.i. je sice v grafu č. 3 uvedena, orgán této myši však byl měřen až několik hodin po smrti na rozdíl od orgánů ostatních myši, proto je možné, že nízká hmotnost je způsobena posmrtnými změnami a částečnou dehydratací orgánu.

Graf č. 3: Hmotnosti jater myši s jednorázovou infekcí *Toxocara canis*. Přítomnost neurologických příznaků vyznačena červenou barvou sloupce, hodnota kontrolní myši vyznačena žlutou barvou sloupce. 1...myš zpracována několik hodin po smrti



5.3.1.2 Reinfekce

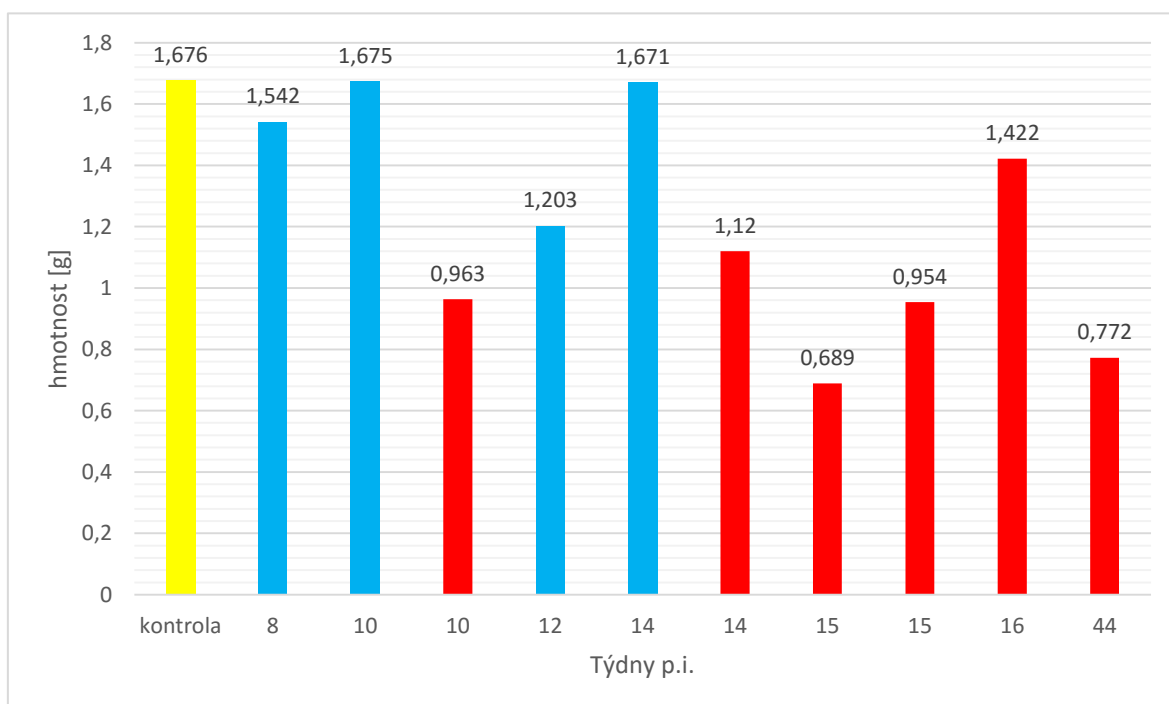
Granulomy byly na játrech pozorovány u většiny myši s časnou reinfekcí od 8. do 16. týdne p.i. Granulomy byly stejně jako u myši s jednorázovou infekcí pozorovány jak v celém objemu jater ve vysoké hustotě, tak i jako ojedinělé noduly v okrajových částech laloků orgánu.

Myš s pozdní reinfekcí granulomy na játrech neměla.

Hmotnosti jater reinfikovaných myši (8. až 44. týden p.i.) byly vždy nižší než hmotnost jater kontrolní myši, viz graf č. 4.

Myši s neurologickými příznaky (jedna ze dvou myši v 10. a 14. týdnu p.i., myši v 15., a 44. týdnu p.i.) měly nižší hmotnosti jater než myši bez neurologických příznaků s jedinou výjimkou myši v 16. týdnu p.i.

Graf č. 4: Hmotnosti jater myši reinfikovaných *Toxocara canis*. Přítomnost neurologických příznaků vyznačena červenou barvou sloupce, hodnota kontrolní myši vyznačena žlutou barvou sloupce



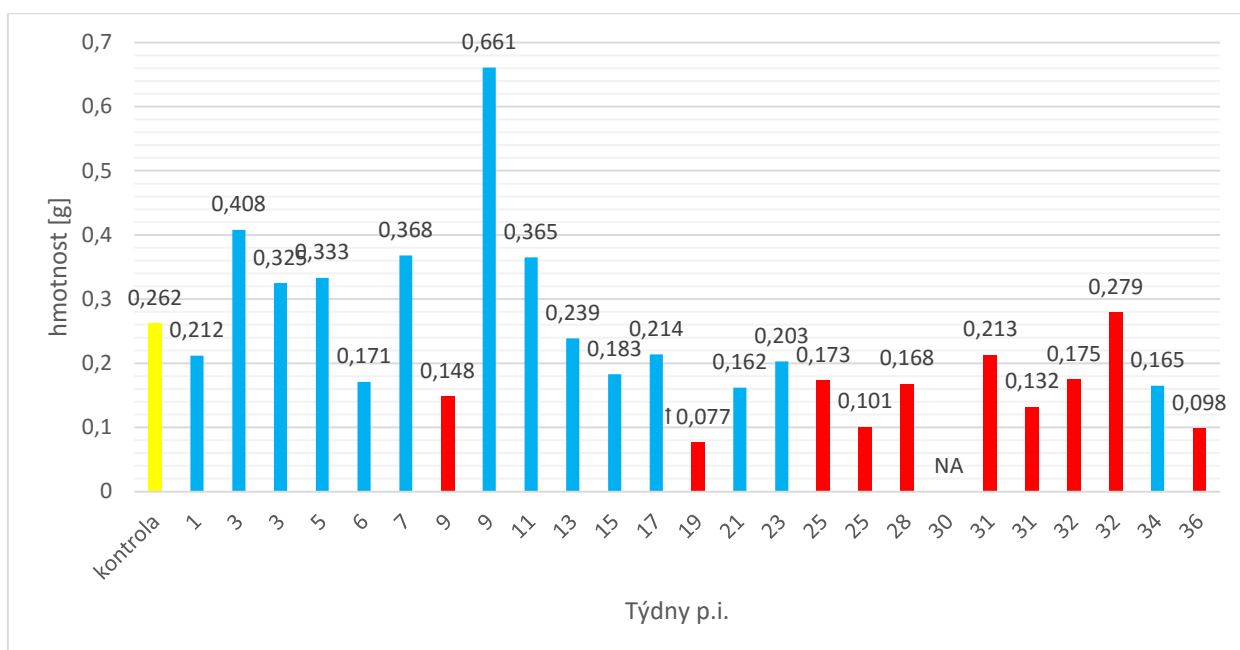
5.3.2 Slezina

5.3.2.1 Jednorázová infekce

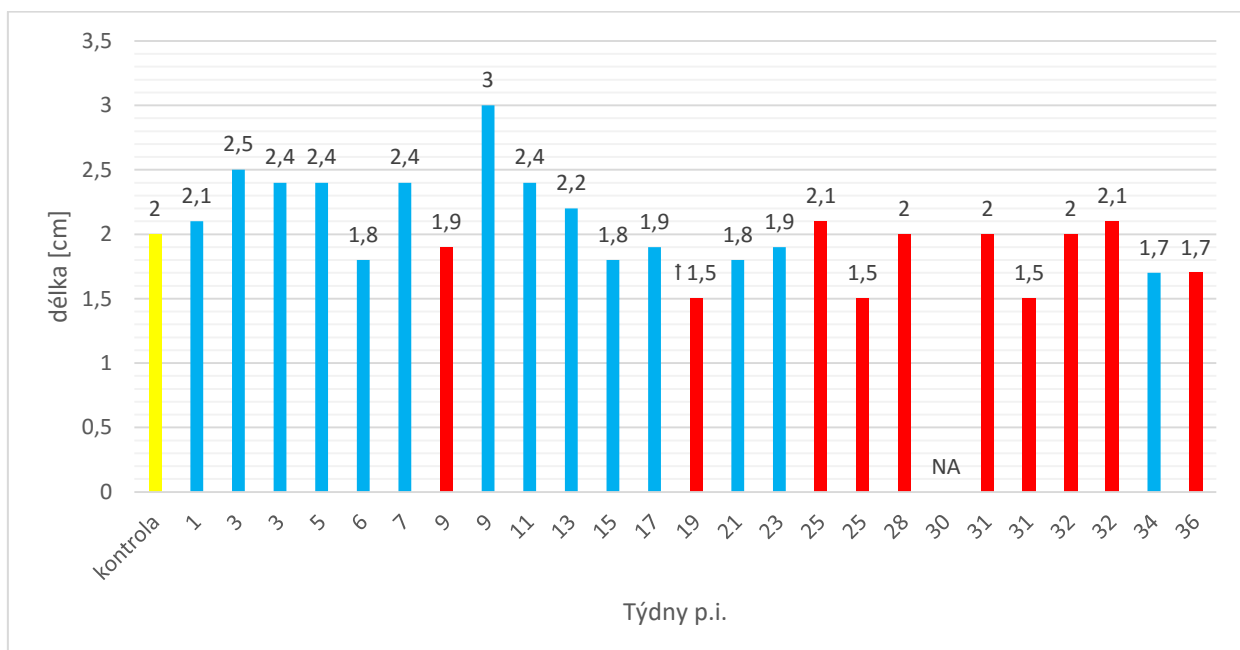
U myši s jednorázovou infekcí nebyly pozorovány žádné makroskopické patologie kromě změny velikosti orgánu.

Grafy č. 5 a 6 zobrazují hmotnosti a délky slezin u myši s jednorázovou infekcí od 1. do 36. týdne p.i. Největší slezinu měla myš v 9. týdnu p.i. bez neurologických příznaků. Velikosti slezin myši bez neurologických příznaků byly větší než velikosti myši s neurologickými příznaky. Hmotnost a délka sleziny myši ve 30. týdnu p.i. nebyla měřena z důvodu přítomnosti kožní infekce a předpokladu probíhajícího zánětu, který mohl mít vliv na velikost orgánu.

Graf č. 5: Hmotnosti slezin myši s jednorázovou infekcí *Toxocara canis*. Přítomnost neurologických příznaků vyznačena červenou barvou sloupce, hodnota kontrolní myši vyznačena žlutou barvou sloupce. †...myš zpracována několik hodin po smrti



Graf č. 6: Délka slezin myši s jednorázovou infekcí *Toxocara canis*. Přítomnost neurologických příznaků vyznačena červenou barvou sloupce, hodnota kontrolní myši vyznačena žlutou barvou sloupce. †...myš zpracována několik hodin po smrti



5.3.2.2 Reinfekce

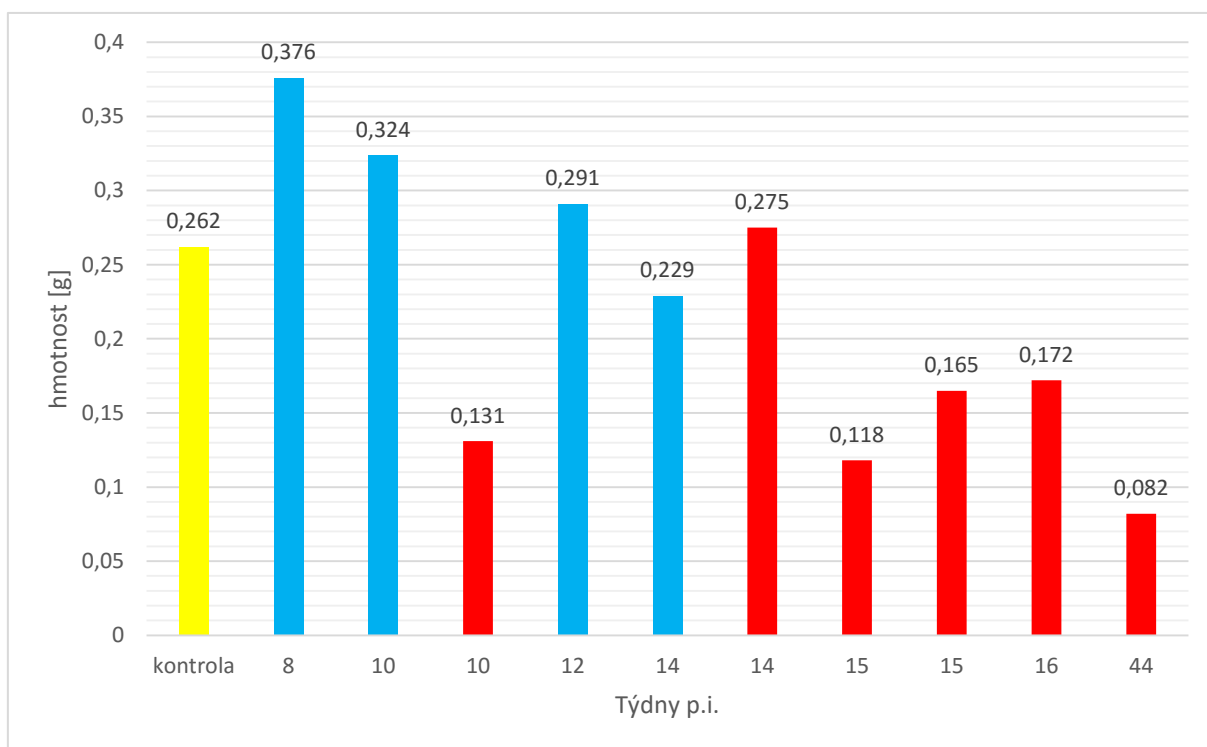
U myši s reinfekcí nebyly pozorovány žádné makroskopické patologie kromě změny velikosti orgánu.

Hmotnosti a délky slezin reinfikovaných myši od 8. do 44. týdne p.i. jsou zobrazeny v grafech č. 7 a 8. Největší slezina byla zaznamenána u myši v 8. týdnu p.i., tato myš nejevila neurologické příznaky.

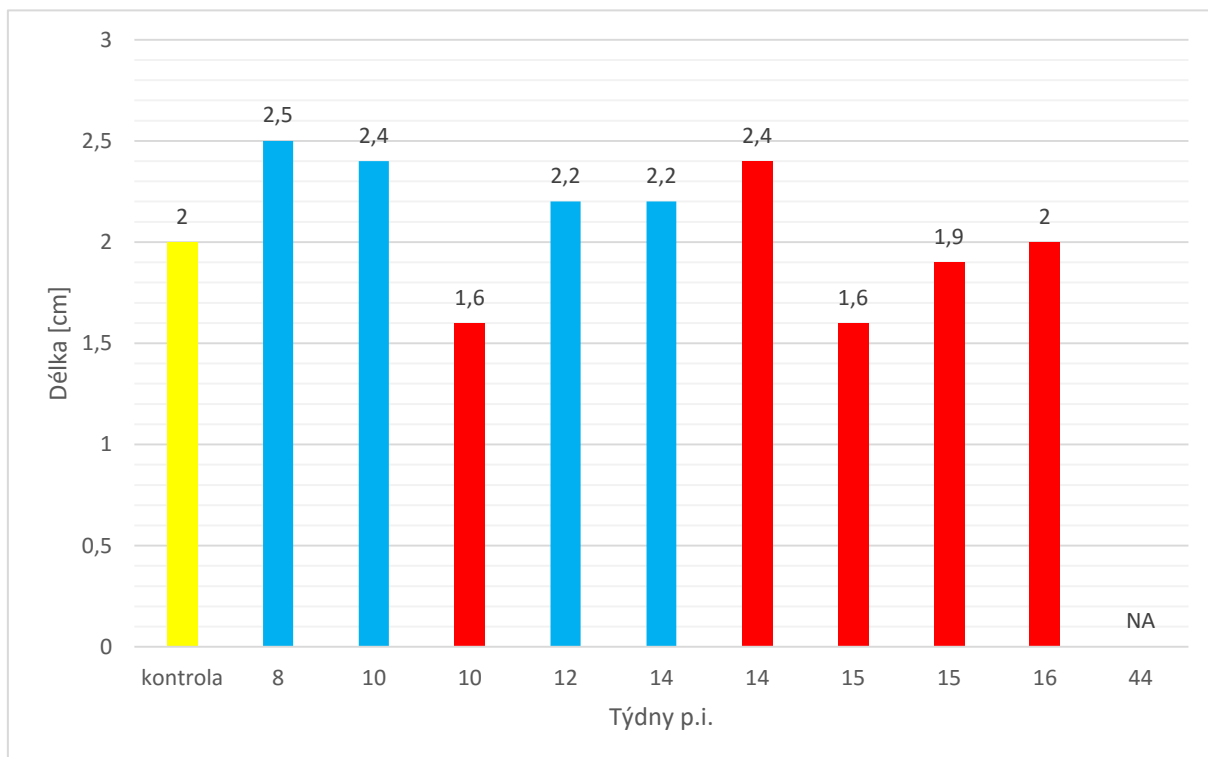
Myši s neurologickými příznaky měly průměrně menší hmotnost sleziny než myši bez neurologických příznaků.

Délka sleziny myši reinfikované v 17. a zpracované ve 44. týdnu p.i. nebyla změřena.

Graf č. 7: Hmotnosti slezin myši reinfikovaných *Toxocara canis*. Přítomnost neurologických příznaků vyznačena červenou barvou sloupce, hodnota kontrolní myši vyznačena žlutou barvou sloupce



Graf č. 8: Délka slezin myši reinfikovaných *Toxocara canis*. Přítomnost neurologických příznaků vyznačena červenou barvou sloupce, hodnota kontrolní myši vyznačena žlutou barvou sloupce



5.4 Výskyt červů ve vyšetřovaných orgánech

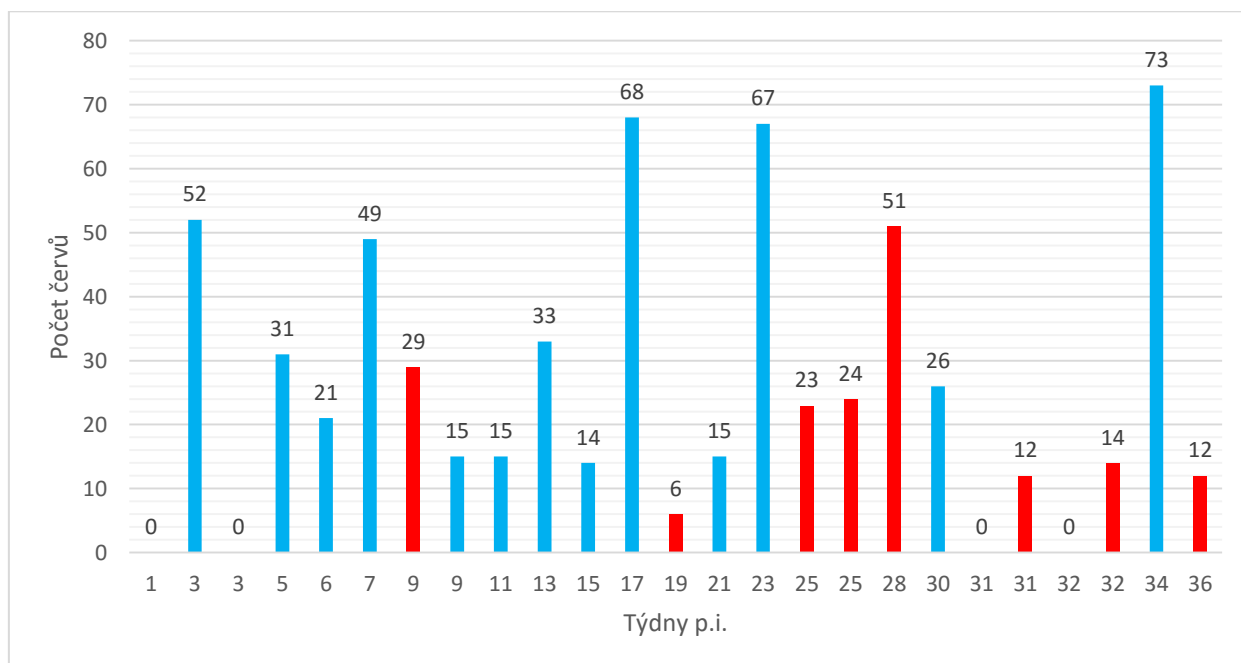
5.4.1 Játra

5.4.1.1 Jednorázová infekce

Larvy v játrech byly poprvé nalezeny ve 3. týdnu p.i. a vyskytovaly se až do 36. týdne p.i. Jejich počty se pohybovaly v rozmezí od 6 do 73 kusů, s výjimkou 1., 3. (jedna myš ze dvou testovaných), 31. (jedna myš ze dvou testovaných) a 32. týdne p.i., kde žádné larvy nebyly nalezeny, viz graf č.9.

Nejvyšší počet larev byl nalezen u myši zpracované v 34. týdnu p.i. Počet larev v průběhu infekce kolísal.

Graf č.9: Počet larev *Toxocara canis* v játrech myši s jednorázovou infekcí v požadovaných týdnech. Přítomnost neurologických příznaků vyznačena červenou barvou sloupce



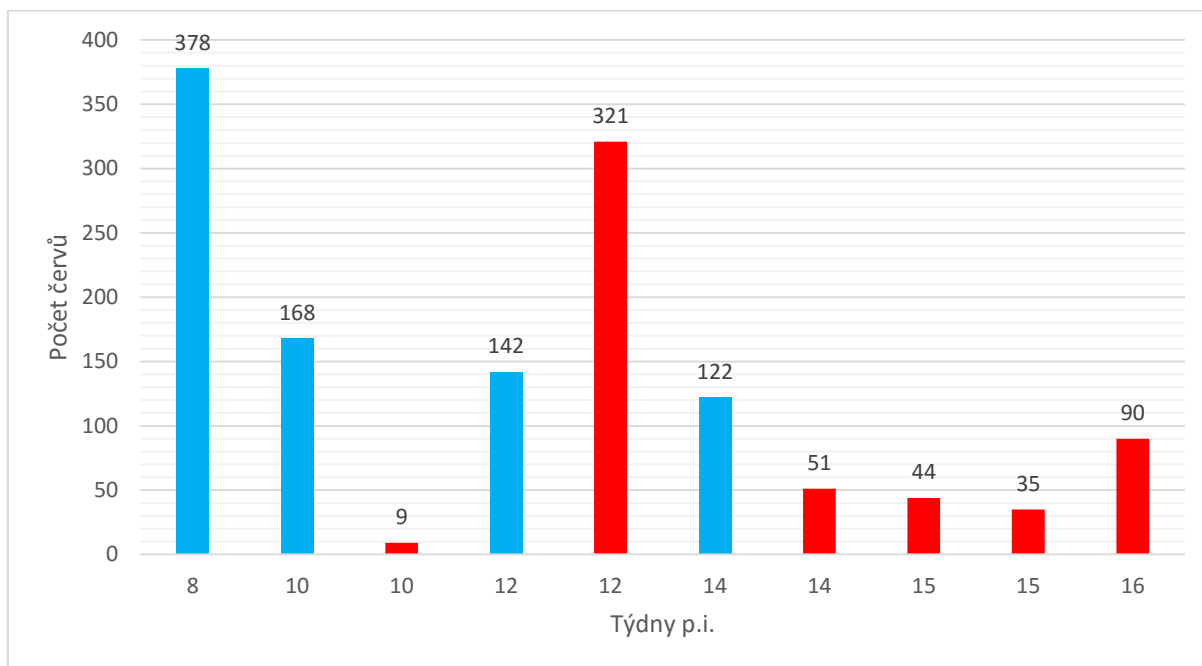
5.4.1.2 Reinfekce

Larvy v játrech byly přítomny u všech myši reinfikovaných v 5. týdnu p.i. a zpracovávaných od 8. do 16. týdne p.i. Rozsah počtu larev byl od 9 do 378 kusů, viz graf č. 10.

Larvy v játrech myši reinfikované v 17. týdnu p.i. a zpracované ve 44. týdnu p.i. se vyskytovaly v počtu 11 kusů. Orgán byl prověřen 6 roztlakovými preparáty (obrázek č. 2).

Nejnižší počet larev byl zjištěn u jedné z myši zpracované v 10. týdnu p.i. Nejvyšší počet larev byl nalezen u myši zpracované v 8. týdnu p.i., tj. 3 týdny po reinfekci. Počet larev s postupujícím průběhem infekce klesá.

Graf č. 10: Počet larev *Toxocara canis* v játrech reinfikovaných myši. Přítomnost neurologických příznaků vyznačena červenou barvou sloupce





Obrázek č. 2: Larva *Toxocara canis* nalezená v játrech myši s reinfekcí v 8. týdnu p.i. Roztlaková metoda. Zvětšení 400×.

5.4.2 Slezina

U žádné myši s jednorázovou infekcí nebo s reinfekcí nebyly larvy ve slezině nalezeny.

5.4.3 Mozek

Počty larev v mozcích myší byly zjišťovány dvěma metodami – trávící a roztakovou, u nichž byla porovnávána záchytnost a spolehlivost. Z výsledků se trávící metoda ukázala jako nevhodná, protože v porovnání s roztakovou metodou vykazovala nižší záchytnost.

Počty byly zjištěny u myší s jednorázovou infekcí z 1., 3., 15., 17., 19., 21., 23. a 25. týdne p.i. Počty uváděné u myší zpracovaných výlučně trávící metodou (15. a 17. týden p.i.) jsou nepřesné vzhledem ke zjištěné nízké záchytnosti. Uvádíme minimální množství zachycených červů.

Rozsah počtu larev byl od 4 do 246 kusů, viz tabulka č. 4 a graf č. 11.

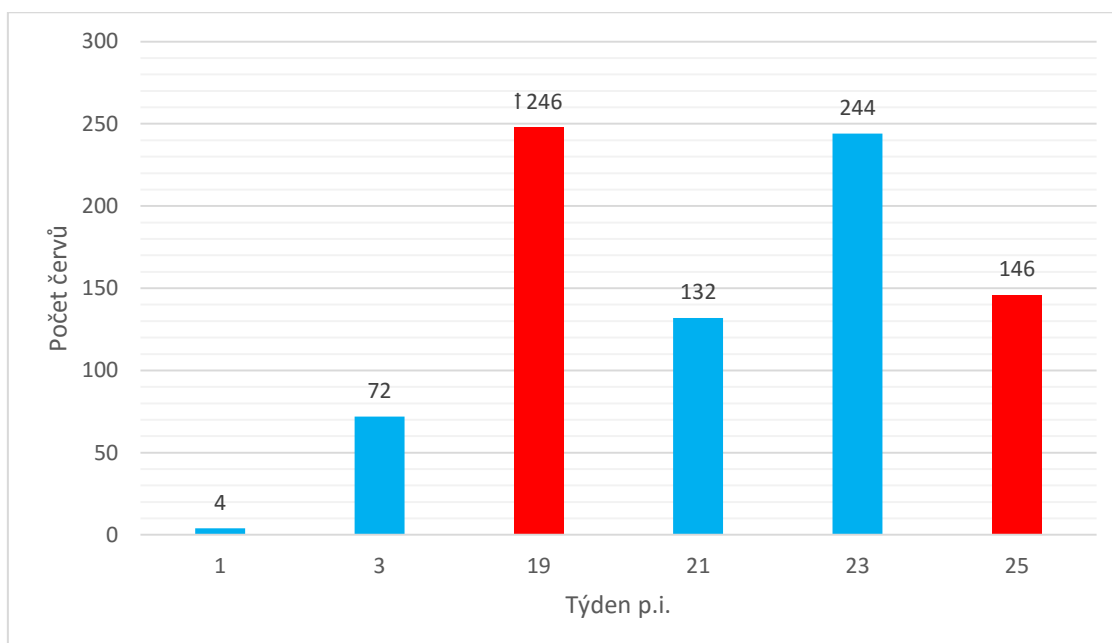
Nejnižší počet larev byl zjištěn u myši zpracované v 1. týdnu p.i. Nejvyšší počet larev byl nalezen u myši zpracované v 19. týdnu p.i.

Larvy ve tkáni byly stočené, nebo se ve tkáni pohybovaly, a to jak pomalu, tak i rychle.

Tabulka č. 4: Počet larev *Toxocara canis* v mozku myši s jednorázovou infekcí.

Doba usmrcení-týdny p.i.	Počet larev v přední části mozku	Počet larev v zadní části mozku	Počet larev v celém mozku	Metoda
1	4	0	4	roztlaková
3	58	14	72	roztlaková
15	NA	20	20+	Trávící
17	60	NA	60+	Trávící
19	162	84	246	trávící + roztlaková
21	80	52	132	roztlaková
23	196	48	244	roztlaková
25	106	40	146	roztlaková

Graf č. 11: Počet larev *Toxocara canis* v mozku myši s jednorázovou infekcí. Přítomnost neurologických příznaků vyznačena červenou barvou sloupce. †...myš zpracována několik hodin po smrti



Počet larev v mozku s postupujícím průběhem infekce měl stoupající tendenci.

Larvy nalezené roztakovou metodou byly na sklíčku nacházeny jak samostatně, tak ve shlucích o několika kusech (obrázek č. 3).



Obrázek č.3: Larvy Toxocara canis ve shluku nalezené v mozku myši s jednorázovou infekcí v 19. týdnu p.i. Roztlaková metoda. Zvětšení 100×.

5.5 Histopatologické změny v mozku

Při makroskopickém pozorování se mozky nejevily pozměněné v porovnání s mozkiem kontrolní myši. Zaznamenali jsme však makroskopické hemorhagie na kůře mozku, a to pouze u dvou myší v celém experimentu, myš s jednorázovou infekcí ve 25. týdnu p.i. a myš s časnou reinfekcí v 15. týdnu p.i.

Byly pozorovány patologické změny ve tkáních, jejich lokalizace a souvislost s lokalizací larev. Pozorované histopatologické změny byly rozděleny do šesti kategorií.

- I. Nekróza – vždy byly pozorovány jen lokální malé nekrotické oblasti se zbytky tkáně (příloha č. 1 a 2)
- II. Hemorhagie – krvácení ve tkáni bylo zaznamenáno malé lokální i jako velká ložiska (příloha č. 3).
- III. Zesílené stěny cév – do této kategorie byly zařazeny cévy se zesíleným epitelem (příloha č. 4).
- IV. Infiltrát kolem cév – byly-li buňky namigrované kolem stěn cév (příloha č. 5, 6 a 7).
- V. Infiltrát buněk – kategorie, kdy buňky byly nahloučené v tkáni (příloha č. 8).
- VI. Angiogeneze – v některých případech byly pozorovány cévy v neobvyklé hustotě a uspořádání (příloha č. 9).

Počet pozorovaných larev se na řezech lišil, larvy byly na preparátech zachyceny ojedinele, nebo naopak ve vysokém množství až 19 larev na řez.

Červi byli pozorováni vždy v nervové tkáni, výjimečně v blízkosti velkých cév. Žádné z pozorovaných poškození se nevyskytovalo v bezprostřední blízkosti zachycených larev (příloha č. 10 a 11).

Kolem larev nebyla pozorována demyelinizace (příloha č. 12), ani jiné poškození tkáně. V preparátech byly zaznamenány neurony, u kterých se chromatin v jádře jevil jako částečně z kondenzovaný. Mohlo se jednat o začínající pyknózu jádra (příloha č. 13).

5.5.1 Jednorázová infekce

V tabulce č. 5 jsou zaznamenány histopatologické změny u myší s jednorázovou infekcí od 1. do 36. týdne p.i.

Nejčastěji vyskytující se změnou byla nekróza, která nebyla vůbec pozorována pouze u myší v 3., 5., 7. a 28. týdnu p.i. a u jedné ze dvou myší ve 32. týdnu p.i. Naopak zesílené stěny cév nebyly u primárních infekcí pozorovány vůbec.

Myš v 19. týdnu p.i. byla zpracována až několik hodin po smrti, proto nelze určit, jestli nekrotická tkáň vznikla během života, nebo až posmrtně.

Tabulka č. 5: Pozorované histopatologické změny myší s jednorázovou infekcí *Toxocara canis*. Přítomnost histopatologických změn označena +

Jednorázová infekce	Histopatologické změny						
	Nekróza	Hemorhagie	Zesílené stěny cév	Infiltrát kolem cév	Infiltrát buněk	Angiogeneze	Červi
1	+	+		+			
3							+
5		+		+	+		+
6	+	+			+		
7				+			+
9	+			+	+	+	
11	+			+			+
13	+	+			+		+
15	+						+
17	+	+			+		+
19	+			+			+
21	+	+		+			+
23	+	+		+	+		+
25	+				+		
28							+
30	+				+		+
31	+				+		+
31	+				+	+	+
32	+				+	+	+
32		+			+		
34	+			+	+		+
36	+			+			+

5.5.2 Reinfekce

V tabulce č. 6 jsou zaznamenány histopatologické změny u myší s časnou reinfekcí od 8. do 16. týdne p.i.

Nejčastější histopatologickou změnou byla nekróza, kterou neměla pouze myš v 16. týdnu p.i., a infiltrát buněk, který nebyl pozorován pouze u myši v 15. týdnu p.i. Naopak angiogeneze nebyla pozorována u žádné z myší. Přítomnost larev na řezech byla pozorována u všech myší kromě myši v 8. týdnu p.i.

Tabulka č. 6: Pozorované histopatologické změny myši s časnou reinfekcí Toxocara canis. Přítomnost histopatologických změn označena +

Časná reinfekce	Histopatologické změny						
Doba usmrcení-týdny p.i.	Nekróza	Hemorhagie	Zesílené stěny cév	Infiltrát kolem cév	Infiltrát buněk	Angiogeneze	Červi
8	+	+			+		
10	+				+		+
10	+	+	+	+	+		+
12	+				+		+
14	+		+	+	+		+
15	+	+	+				+
16		+	+	+	+		+

U myši s pozdní reinfekcí (tabulka č. 7) byla pozorována nekróza a infiltrát buněk. Larvy byly přítomny.

Tabulka č. 7: Pozorované histopatologické změny myši s pozdní reinfekcí Toxocara canis. Přítomnost histopatologických změn označena +

Pozdní reinfekce	Histopatologické změny						
Doba usmrcení-týdny p.i.	Nekróza	Hemorhagie	Zesílené stěny cév	Infiltrát kolem cév	Infiltrát buněk	Angiogeneze	Červi
44	+				+		+

6 DISKUZE

Toxokaróza je závažné onemocnění a i přes relativně nízký počet zaznamenaných klinických případů séroprevalence populace ukazuje, že setkání se škrkavkou *Toxocara canis* není ojedinělé. Vzhledem ke schopnosti napadnout centrální nervovou soustavu a způsobit cerebrální toxokarózu s velmi závažnými komplikacemi nelze tohoto parazita a jeho vliv zanedbat. Tato problematika v souvislosti s poškozením nervové soustavy má oblasti, které zůstávají neprozkoumány a na které jsme se zaměřili i my.

Námi zvolenými experimentálními zvířaty byly myši kmene BALB/c. Jedná se o imbrední kmen standardně používaný k výzkumu toxokarózy (Hamilton *et al.*, 2006). Myši jsou praktické svým snadným chovem v laboratorních podmínkách ve velkém množství a rychlou reprodukcí, což z nich dělá vhodné modelové zvíře pro náš experiment, přestože prase je fyziologicky bližší člověku a je považované za ideální model pro studium toxokarózy (Willingham, Hurst, 1996), ale náročnější na chov v laboratorních podmínkách.

Perorální podání infekční dávky bylo zvoleno jako způsob, který nejvíce odpovídá přirozenému způsobu nákazy. Nejčastěji je hostitel (definitivní i paratenický) nakažen požitím vajíček, ale vyskytuje se i nákaza požitím larev (z infikovaného masa paratenického hostitele, Sasmal *et al.*, 2008; Dutra *et al.*, 2014). Pro infekce našich myší byly použity vylíhlé L3 larvy. Výhoda použití larev na rozdíl od vajíček je ta, že při výpočtu infekční dávky lze určit viabilitu larev. Díky tomu je poté vypočítaná infekční dávka přesnější, než kdyby byla použita vajíčka, u kterých nelze s takovou přesností určit, jaké procento larev vylíhlých z dlouhodobě kultivovaných vajíček bude životaschopných. Larvy jsou schopny infikovat hostitele po perorálním podání bez problémů, neboť průchod trávící soustavou je část jejich životního cyklu, a to ve dvou případech. Dostanou-li se po tělní migraci do ústní dutiny hostitele a jsou poté spolknuty, anebo jsou-li ve tkáni hostitele pozřeny dalším hostitelem.

Podání pomocí automatické pipety je snadným a účinným způsobem podání infekční dávky, neboť myši se po vsunutí špičky do ústní dutiny do špičky zahryznou a při pomalém vypouštění infekční dávky ochotně polykají. Tímto způsobem podání navíc lze snadno ohlídat, zda myš pozřela celou infekční dávku.

Námi použitá infekční dávka byla 1000 larev na myš a byla zvolena na základě porovnání publikovaných experimentů. Při pozorování toxokarózy z různých hledisek (migrace larev do mozku, behaviorální změny, imunopatologické změny) použili stejné

infekční dávky i Holland, Cox (2001), Kolbeková *et al.* (2011b) a Eid *et al.*, (2015). Holland, Cox (2001) použili při pozorování behaviorálních změn i infekční dávky 100 a 3000 vajíček, přičemž se ukázalo, že dávka 3000 vajíček je příliš vysoká. Maruyama *et al.* (1994) infikovali myši dávkou 200 larev a během 120 dní experimentu nepozorovali žádné klinické příznaky infekce.

Námi použité množství larev jsme považovali za dostatečné, aby larvy byly schopny případně vyvolat neurologické, fyzické i histopatologické změny u myši a nebyly okamžitě eliminovány imunitním systémem. Zároveň toto množství larev ukázalo migrační cesty v námi sledovaných orgánech v rámci našeho experimentu.

Jedna z našich myší, která nebyla zařazená do hodnocení, byla infikována dávkou 500 larev. Sloužila jako kontrola, zda i poloviční dávka způsobí u myši neurologické změny a patologie, nebo ne a pokud ano, tak v jaké míře. Z myši byly orgány zpracovány stejným způsobem jako u myši v experimentu, tj. krev byla odebrána a zpracována na zjištění imunitní odpovědi, játra a slezina byly změřeny a byly zjištěny počty červů, mozek byl rozdělen na poloviny, jedna byla zpracována roztlakovou metodou, druhá byla zafixována. Histologické zpracování nebylo prozatím uskutečněno. Jak se ukázalo, tak i u této myši byly pozorovány neurologické příznaky, a to ve 29. týdnu p.i.

Vyvstává otázka, zda je možné, nebo dokonce pravděpodobné, aby se takovouto infekční dávkou nakazil člověk z prostředí. Z imunologického vyšetření pacientů nelze zpětně zjistit, jak velkou infekční dávku lidé s přítomností protilátek v krvi pozřeli.

Jedna z variant nákazy je, že člověk může být vystavován infekci vajíčky, která kontaminovala prostředí. Zvyšující se počet koček a psů žijících s lidmi ve městech znamená vyšší nebezpečí nákazy lidí vajíčky *Toxocara* spp. (Boldiš *et al.*, 2015) Tímto způsobem se člověk nakazí spíše nízkou infekční dávkou, a to i opakovaně, např. pracuje-li v létě s kontaminovanou půdou. Druhou variantou nákazy je jednorázová infekce silnější dávkou, což je spíše než pozřením vajíček možné pozřením tepelně neupraveného infikovaného masa obsahujícího L3 larvy.

Průběh infekce v předložené diplomové práci byl sledován u 48 infikovaných a reinfikovaných myši od akutní až po pozdní chronickou fázi.

Sledovat delší časový úsek infekce helmintem je pro pochopení vlivu na hostitele a tím i pro praktickou medicínu důležité, protože je-li nakažen, tak se klinické projevy zpravidla objevují až po různě dlouhé době a v čase se mohou měnit. Postupný rozvoj onemocnění souvisí s vývojem, migrací a lokalizací parazita. V případě toxokarózy jsme předpokládali, že během dostatečně dlouhého období se mohou významně projevit případné

neurologické, fyzické i histopatologické změny spojené s jednotlivými fázemi infekce, které se navíc mohou lišit u jednorázových infekcí a reinfekcí.

Různí autoři myši s toxokarózou pozorují a zpracovávají v rozmezí od několika hodin do 150 dnů po infekci. Převážně se autoři zaměřují na různé fáze infekce, které nepravidelně charakterizují. Někteří autoři uskutečňují pozorování v několikadenních intervalech (např. Resende *et al.*, 2015 vyšetřovali myši 1., 3., 5. a 7. den p.i., Kolbeková *et al.*, 2011a sledovali myši od 6 hodin p.i. až do 17. dne p.i., tj. do 2. týdne p.i.). Jiní autoři naopak pozorují postup toxokarózy s velkými časovými odstupy (např. Eid *et al.*, 2015 zpracovávali myši v 2., 5. a 12. týdnu p.i., Corrêa *et al.*, 2014 pozorovali myši v 5., 10. a 20. týdnu p.i.). Pozorování dlouhodobých infekcí bylo provedeno v rozmezí od 14. týdne p.i. (Janecek *et al.*, 2014), přes 17. týden p.i. (Maruyama *et al.*, 1994) a 20. týden p.i. (Corrêa *et al.*, 2014) až po nejpozdější 21. týden p.i. (Heuer *et al.*, 2015), vždy se ale jednalo o ojedinělá pozorování. Doposud žádný publikovaný experiment popisující histopatologické a neurologické změny nepokryl kompletně rozmezí doby infekce tak, jak jsou pokryty v předložené diplomové práci. Pro většinu publikovaných experimentů je standartní jednorázová infekce. Naším cílem při použití jednorázových infekcí i reinfekcí bylo zjistit, zda a jaké jsou rozdíly u opakovaného vystavení hostitele larvám po určité době, kdy larvy z první dávky již podstoupily tělní migraci a tělo hostitele mělo čas na ně dostatečně zareagovat, a tím se případně chovat jinak po infekci druhou dávkou larev.

Náš experiment pokrýval u jednorázových infekcí 1. až 36. týden v jedno a dvoutýdenních intervalech, s jedním třítýdenním intervalem mezi 25. a 28. týdnem p.i. U časných reinfekcí byl interval sledování výskytu toxokarózy od 8. do 16. týdne p.i. U pozdní reinfekce byl zachycen pouze jeden okamžik infekce, a to 44. týden p.i.

Jako způsob usmrcení v požadované fázi po infekci byla zvolena cervikální dislokace. Další variantou zpracování tkání je perfuze. Spočívá v nahrazení krve hluboce uspaných zvířat nejprve fyziologickým roztokem a poté fixází. Tento způsob však pro naše účely nebyl vhodný, protože *Toxocara canis* je parazit s největší pravděpodobností migrující do mozku pomocí cévní soustavy. Jedním z našich cílů bylo pozorovat lokalizaci červů, tudíž jsme potřebovali zachovat jejich původní lokalizaci ve vnitřních orgánech, a ta by mohla být perfuzí narušena. Při cervikální dislokaci nedochází během procesu k mechanickému poškození námi vyšetřovaných orgánů (mozek, játra, slezina). Problém, který mohl vzniknout touto metodou usmrcení je přítomnost vakuolizace mozkové tkáně zjištěná na některých histologických preparátech. Nejsme si jistí, zda tento nálezný je opravdu vznikl právě způsobem usmrcení, ale preventivně nebyl zařazen do výsledků.

Byť jsme červy nacházeli volně v mozkové tkáni v okolí velkých cév, není vyloučeno, že někteří byli situováni v drobných kapilárách, jejichž epitel nemusí být pod světelným mikroskopem vidět (Doc. Jirkovská, CSc., Ústav histologie a embryologie, 1.LF UK v Praze, prosinec 2015, osobní sdělení).

Před usmrcením byly myši pravidelně monitorovány. Zajímal nás primárně rozvoj poruch naznačující poškození centrální nervové soustavy. Doposud publikované experimenty snažící se objasnit důsledky přítomnosti larev v centrální nervové soustavě jsou spíše než na neurologické projevy zaměřeny na behaviorální změny, jako chování infikované myši ve volném prostoru, čištění kožichu, reakce na nové podněty, sociální chování a poruchy paměti (Cox, Holland, 1998; Holland, Cox, 2001; Hamilton *et al.*, 2006).

Neurologické problémy byly zaznamenány spíše jako náhodně pozorovaný jev v rámci rozsáhlých behaviorálních studií a není jim věnována dostatečná pozornost, např. Heuer *et al.* (2015) v průběhu experimentu myši kvůli výskytu vážných neurologických problémů usmrtil a pro svoje účely snížil infekční dávku, aby se tak silnému rozvoji neurologických příznaků vyhnul. Sporadicky pozorované neurologické projevy zahrnují např. špatnou koordinaci pohybů, problémy s udržením rovnováhy, ochrnutí poloviny těla nebo zadních končetin, oslabené končetiny a pohyb v kruhu (Heuer *et al.*, 2015). Hamilton *et al.* (2006) pozorovali ztrátu rovnováhy a koordinační obtíže. Janecek *et al.* (2014) pozorovali u myši balanční problémy a sníženou agresi. U pískomilů Akao *et al.* (2003) pozorovali houpavou chůzi a problémy s balancí, pohyb v kruhu jedním směrem, problém s udržením hlavy v přirozené pozici, ochrnutí zadních nohou a nechtěný únik moči zvířat.

My jsme pozorovali patologické neurologické změny bez provádění behaviorálních testů, sledovali jsme jejich nástup a rozvoj v čase a hledali souvislost pozorovaných změn s histopatologickým nálezem postižených myši. Zaznamenali jsme výskyt většiny neurologických problémů, které pozorovali i výše zmínění autoři. Na rozdíl od pozorování Akaa *et al.* (2003; které ale prováděl na pískomilech) naše myši nevykazovaly problémy s udržením hlavy v přirozené pozici, ani únik moči.

U myši s jednorázovou infekcí se příznaky poprvé objevily v 9. týdnu p.i. Do 23. týdne p.i. se neurologické příznaky objevily pouze u dvou myši, v 9. a 19. týdnu p.i. Od 23. týdne p.i. až do ukončení experimentu v 36. týdnu p.i. se neurologické příznaky vyskytovaly téměř u všech myši. Nejčastěji pozorovaný neurologický příznak byla ztráta rovnováhy (zaznamenali ji i Akao *et al.*, 2003; Hamilton *et al.*, 2006 a Heuer *et al.*, 2015), naopak nejméně pozorovaný příznak bylo ochrnutí poloviny těla (pozorovali i Heuer *et al.*, 2015), které se projevilo pouze u myši v 9. týdnu p.i. Tato myš navíc jako jediná v celém

experimentu po zvednutí z podložky za ocas roztáčela nekontrolovatelně své tělo kolem vlastní osy. Teoreticky by tento patologický projev mohl být podobný s problémy infikovaných pískomilů udržet hlavu v přirozené pozici (Akao *et al.*, 2003).

Myši s reinfekcí vykazovaly od 15. týdne p.i. neurologické příznaky všechny. Do této doby se příznaky objevily u jedné myši v 10. a jedné ve 14. týdnu p.i. Nejčastějším neurologickým projevem byla zhoršená pohyblivost. Nejméně časté změny byly dvě – zhoršená pohyblivost zadních nohou a ochrnutí poloviny těla. Obě tyto změny se vyskytly pouze u jediné myši ve 14. týdnu p.i.

Běhání v kruhu, které se vyskytovalo u jednorázových infekcí i reinfekcí bylo u všech myší zřetelně neovladatelné. Daná myš se po celou dobu projevu této neurologické změny točila jen jedním směrem. Nezaznamenali jsme významně převládající výskyt jednoho směru u různých myší.

Fyzické změny pozorované na myších, konkrétně načepýřená srst, nahrbený hřbet a zhoršené hojení ocasu po odběru krve bylo nejpravděpodobněji způsobeno postupným vyčerpáváním organismu v důsledku dlouhotrvající infekce. Tyto fyzické změny byly zpočátku vždy nenápadné a nastupovaly pozvolna.

Námi infikovaná myš dávkou 500 larev vykazovala stejné fyzické (načepýřená srst, nahrbenost, zhoršené hojení ocasu po odběru krve) i neurologické změny. Neurologické potíže se u ní projeví v 29. týdnu p.i. Konkrétně myš trpěla ztrátou rovnováhy. Tím se potvrdilo, že k výskytu stejných neurologických příznaků stačí i poloviční infekční dávka.

Pro detekci protilátek v myším séru jsme použili metodu nepřímá ELISA (zkratka z *Enzyme-linked immunosorbent assay*). Jedná se o jednu z nejpoužívanějších imunologických metod, jejíž princip spočívá v interakci antigenu a protilátky a následném zvýraznění vazby změnou substrátu na barevný produkt za katalýzy enzymu. Tato analytická metoda nám poskytla informaci o přítomnosti a množství specifických IgG protilátek proti parazitovi v myším séru. Nevýhoda měření hladiny specifických protilátek je neschopnost z naměřených hodnot určit fázi infekce (Boldiš *et al.*, 2015). Průběh protilátkové odpovědi u myší larvální toxokarózy byl již detailně prostudován, např. Kolbeková *et al.* (2011b) zaznamenali nárůst IgG protilátek u myší od 2. do 16. týdne p.i. jak u myší s jednorázovou infekcí, tak i reinfekcí, přičemž hodnoty reinfikovaných myší byly oproti myším s jednorázovou infekcí ve stejném čase prokazatelně vyšší. Lescano *et al.* (2012; 2015) měřil hladiny IgG protilátek od 23. Nárůst zaznamenával do 90. dne p.i. a poté do 120. dne p.i. následoval lehký pokles. Schoenardie *et al.* (2014) zaznamenali narůstání IgG protilátek od 15. do 90. dne p.i., do 105. dne p.i. došlo poté k lehkému poklesu hladiny IgG.

Naší snahou bylo pomocí detekce hladiny IgG protilátek dokreslit celkový průběh infekce, ověřit úspěšnost infekce ještě před usmrcením myši a zjistit, zda například zvýšená hladina protilátek v krvi koreluje s přítomností neurologických příznaků u myši.

Za cut off hodnotu pro stanovení pozitivitu myši jsme zvolili hodnotu dvojnásobnou a vyšší ku průměru hodnot kontrolních myši dle metodiky Kolbekové *et al.* (2011b). Pozitivní u jednorázových infekcí byly všechny myši od 3. do 36. týdne. U reinfekcí byly pozitivní všechny vyšetřované myši, ale síla imunitní odpovědi byla několikanásobně vyšší než u jednorázově infikovaných myši. Průměrná odpověď myši s jednorázovou infekcí 1000 larev byla 5,6× vyšší než hodnoty naměřené u kontrolní neinfikované myši. Průměr imunitní odpovědi myši od 11. týdne p.i., kdy se odpověď začala zdát ustálená do 36. týdne p.i. byla 6,5× vyšší než hodnoty kontrolní myši. Průměrná imunitní odpověď myši reinfikovaných od 8. do 44. týdne p.i. byla 8,9× vyšší než hodnoty kontrolních myši. Z výsledků je vidět, že dvojnásobná infekční dávka vyvolala silnější imunitní odpověď, ne však úměrně, tj. dvojnásobně silnou.

Imunitní odpověď myši s dávkou 500 larev byla ve 29. týdně p.i. 9× vyšší než hodnoty kontrolních myši.

U jednorázových infekcí docházelo od 1. do 11. týdne p.i. k pozvolnému nárůstu hladiny protilátek, která se časem ustálila. Infekční dávka 1000 larev zajistila, že živé larvy byly přítomny v orgánech během celé doby infekce (potvrzeno roztlakovými preparáty), tudíž předpokládáme, že imunitní systém reagoval na jejich přítomnost. S největší pravděpodobností by v případě úhynu všech larev v organismu myši imunitní odpověď s postupujícím časem slábla, přestože Lescano *et al.* (2015) u infikovaných myši po ošetření antihelmintiky pozorovali nárůst hladiny IgG protilátek. To vysvětluje jako reakci na uvolnění antigenů z kutikuly uhynulých larev. U reinfikovaných myši byly protilátky v sérech měřeny až od 8. týdne p.i. Hladina změřených protilátek u reinfikovaných myši byla stabilní od 8. až po 44. týden p.i.

Nebyly zjištěny žádné rozdíly v hladinách protilátek myši s neurologickými příznaky a bez nich. Tím se ukázalo, že přítomnost neurologických příznaků v našich experimentech nesouvisela se silou protilátkové imunitní odpovědi našich myši.

Při toxokaróze se mohou vyskytovat zvětšená játra a slezina (Baldisserotto *et al.*, 1999).

Optická kontrola a měření čerstvě vyjmutých jater a sleziny odhalila případné makroskopické patologické problémy myši způsobené migrací larev tělem.

Během našeho experimentu nebyly myši váženy, proto nebylo s jistotou možné zjistit z poměru celkové hmotnosti a hmotnosti jednotlivých orgánů (játra a slezina) jejich případné zvětšení. Hmotnosti orgánů infikovaných myší byly porovnávány s orgány kontrolní myši. U žádné z myší v celém experimentu (až na jednu výjimku, myš v 6. týdnu p.i.) nevykazovaly zvětšení orgánů proti kontrole.

Myši s neurologickými příznaky měly všeobecně hmotnost orgánů nižší než myši bez neurologických příznaků, což bylo s největší pravděpodobností způsobeno vyšším vyčerpáním a podvýživou.

Hmotnost orgánů myši s infekční dávkou 500 larev nebyla výrazně odlišná od hmotností orgánů myši s infekční dávkou 1000 larev, ani se výrazně nelišila od hmotnosti orgánů kontrolní neinfikované myši. Vzhledem k tomu, že hmotnost orgánů kontrolní myši byla větší než u této infikované myši, lze předpokládat, že myš hepatosplenomegálií netrpěla.

Přítomnost larev byla zjišťována v játrech a v mozku. Larvy zachyceny v játrech byly živé i mrtvé (v granulomech), larvy zachyceny v mozku byly vždy živé. Rozdíly mezi larvami z těchto dvou orgánů byly pozorovány i v jejich pohyblivosti. Larvy zachycené v játrech byly stočené, nebo se velmi pomalu a obtížně pohybovaly tkání. Larvy zachycené v mozku byly stočené, nebo se pohybovaly rychleji než v játrech a rychle měnily svou lokalizaci na roztlakovém preparátu (aktivní pohyb mozkovou tkání u larev *Toxocara canis* zaznamenali i Othman *et al.*, 2010). Jednoznačně vykazovaly větší životaschopnost v mozkové tkáni v porovnání s tkání jaterní.

Larvy se vyskytovaly u myší jednorázově infikovaných i u myší reinfikovaných. Uváděné počty larev z roztlakových preparátů prováděných z jater byly v porovnání s roztlakovými preparáty z mozku méně validní, protože bylo z jater vyšetřeno pouze 4,8 – 17,8 % orgánu. Roztlakovou metodou mozkové tkáně jsme vyšetřili 50 % orgánu.

Výrazně vyšší počty larev v játrech byly u myší reinfikovaných. V mozku nebyly počty u reinfikovaných myší zjišťovány.

Z roztlaků v mozku bylo zjištěno, že larvy se v orgánu vyskytují ve shlucích. Je pravděpodobné, že larvy jsou ve shlucích i v ostatních orgánech, včetně jater. To může být důvod, proč se počty larev v játrech tak lišily (z 10 roztlaků mohly být zachyceny místa bez červů a naopak červi mohli být v jiné části orgánů). Roztlaková metoda je doplňkovou metodou, která má dokreslit průběh infekce v těle myši. Přesnější by však bylo dělat roztlak celého orgánu, právě kvůli zjištění, že červi se vyskytují ve shlucích.

Larvy ve shlucích v mozkové tkáni pozorovali i Kolbeková *et al.* (2011b), kteří navíc zjistili, že vyšší počet larev v mozku je nacházen u myší reinfikovaných (2× 1000 larev/ myš,

reinfeke v 3. týdnu p.i.), než u myši s jednorázovou infekcí (1000 larev/myš). Dle výsledků, které ukazují, že počet larev v mozcích myši s reinfekcí byl po stejně dlouhé době po infekci výrazně více než dvojnásobný v porovnání s počty larev z mozků myši s jednorázovou infekcí lze usuzovat, že se nejednalo pouze o nárůst způsobený zdvojnásobením počtu larev v těle hostitele. První infekční dávka zjevně ovlivnila tělo hostitele, takže larvy z druhé infekční dávky ve větším množství namigrovaly do mozku.

Na histologických preparátech se námi pozorovaný počet larev lišil. Larvy byly pozorovány jako jednotlivci nebo ve shlucích v relativně vysokém množství až 19 larev/řez. To potvrzuje naše pozorování z roztlakových preparátů, kde se červi též vyskytovali jak jednotlivě, tak ve skupinách. Můžeme tedy vyloučit vznik shluků červů v roztlakových preparátech vlivem komprese tkáně.

Výskyt skupin červů může být způsoben tím, že červi během migrace oběhovým systémem penetrují cévu. V místě penetrace je céva narušena, a tím je toto místo nejsnazším vstupem pro další čerby. Tím dojde k vytvoření shluku larev v těchto místech. Další možnou hypotézou je, že červi se navzájem atrahují, anebo jsou atrahováni gradientem nějaké molekuly, a proto vytváří skupiny. Ke shlukování červů může docházet v místech, která jsou pro ně nutričně vhodná nebo v místech, kde struktura tkáně umožňuje snazší pohyb larvám a proto zde dochází k jejich akumulaci.

Shluky larev zjištěné histologicky byly nacházeny zejména v oblasti mozku, která byla dle atlasu mozku (Keith, Paxinos, 2008) určena jako *internale capsule*. Tato oblast mozkové bílé hmoty je tvořena z vláken, která souvisí s přenosem informací o pohybu. Poškození různých částí této oblasti mozku může vést k různým poruchám, a to k ochablosti rukou a obličeje, k ataxii, nebo k poškození paměti člověka (Sullivan *et al.*, 2010). U myši bylo při nálezích toxokarou doposud pozorováno jak poškození paměti (Holland, Cox, 2001; Hamilton *et al.*, 2006), tak ataxie. V našem experimentu myši též vykazovaly ataxii a ochablost až ochrnutí zadních končetin, naopak ochablost předních končetin pozorována nebyla. Pozorování případného poškození paměti provedeno nebylo, takže nelze určit, zda se u našich myši poruchy paměti vyskytovaly.

Před použitím roztlakové metody jsme použili metodu trávící. Tato metoda nesnižuje životaschopnost larev. Narazili jsme na problém zviditelnění larev pro určení jejich množství. Vyzkoušeny byly tři barvení, ani jedno však nebylo dostatečně efektivní k přesnému spočítání všech larev. Barvení neutrální červení je sice vitální a larvy v malém množství nezabije, nepovedlo se nám však larvy tímto barvením zviditelnit. Dle článku Thomase, da Cunha Lana (2008) bylo použito na barvení hlístic. Došlo k obarvení pouze zbytků natrávené okolní tkáně

a larvy nebyly obarveny. Sudán III. a Eosin Y nejsou vitálními barvenými, takže larvy zabíjí. Přesto ani pomocí těchto barvení se nám nepodařilo larvy zviditelnit.

Během přípravy histologických preparátů mohou vznikat změny ve tkáni v důsledku zpracování, tzv. artefakty, které poté mohou vést ke špatné interpretaci pozorování. Během mikroskopování vzorku je proto nutné brát v úvahu výskyt takovýchto změn (Chatterjee, 2014).

Artefakty mohou vznikat během různých částí procesu zpracování tkáně, v našem případě například během vyjímání mozku pomocí pinzety, kdy i menší komprese může vést k roztrhnutí tkáně. Další nebezpečí skýtá kontaminace během fixace, například spórami. Častý problém jsou artefakty způsobené mikrotomem, jako nerovnoměrná tloušťka řezu, krabacení řezu, případně potrhání řezu a mnoho dalších (Chatterjee, 2014). Na každém řezu bylo proto zvažováno, zda nejde o artefakt a všechny pochybné změny byly ze závěru hodnocení vyloučeny.

Na řezech jsme v některých případech pozorovali artefakty jednoznačné, jako zvrásnění tkáně, zbytky špatně vypláchnutého barviva, nebo roztržení řezu během řezání na mikrotomu. Zároveň jsme pozorovali artefakty hůře rozpoznatelné, jako rozvolněná tkáň v důsledku řezání, která v určitých situacích mohla být chybně zaměňována s nekrózou tkáně. Během mikroskopování se na řezech dále vyskytovaly rozsáhlé hemorhagie pod plenami, které mohly být důsledkem způsobu vyjmutí mozku z lebky (jednalo se o relativně velká ložiska, která však během makroskopického vyšetřování po pitvě nebyla zaznamenána), nebo vakuolizace na některých řezech, která zase mohla být způsobena způsobem usmrcení myši. Tyto tři vyjmenované změny proto nebyly počítány do histopatologických poškození způsobených infekcí toxokarami.

Maruyama *et al.* (1994) nepozorovali žádné histologické změny u myši s dávkou 200 larev, ani žádné zápalové reakce kolem larev v mozku. Othman *et al.* (2010) u myši s infekční dávkou 1000 vajíček taktéž nezaznamenali žádnou zápalovou reakci kolem larev v mozku. Kolbeková *et al.* (2011a) pozorovali pouze přítomnost červů v bílé hmotě mozku bez zápalových reakcí (infekční dávka 1000 larev). Makroskopické i histopatologické změny u myši pozorovali Janecek *et al.* (2014). Histopatologické vyšetření mozku ukázalo poškození tkáně (myši s infekční dávkou 2000 vajíček), nejintenzivnější 98. den p.i. Pozorované změny autorka popisuje jako měknutí a odumření tkáně (malacia), nahloučení aktivovaných mikroglíí a demyelinizaci, nateklé axony (spheroid), poškození axonů. Eid *et al.* (2015) při histopatologickém vyšetření mozku myši infikovaných 1000 vajíčky nepozorovali kolem červů žádnou zápalovou reakci. Heuer *et al.* (2015) pozorovali u myši (infekční dávka

2000 vajíček) spheroidy naznačující poškození axonů s nahloučenými krystaly cholesterolu, ohniskové nekrózy a lokální demyelinizace. Resende *et al.* (2015) našli v myších (infekční dávka 1000 vajíček na myš) mozcích lokální hemorhagie.

V našem pozorování jsme zaznamenali ojedinělý výskyt patologických hemorhagických ložisek na kůře mozku, která byla zřetelná už během pitvy. Tyto nálezy krvácení odpovídají pozorování Janecek *et al.* (2014, hemorhagie na mozkové kůře), pouze námi pozorované hemorhagie byly mnohem menšího rozměru a byly pozorovány ojediněle. Naše infekční dávka byla poloviční. Je tedy možné, že závažnost makroskopických změn na mozkové tkáni souvisí s velikostí infekční dávky.

Kolem larev jsme nepozorovali žádnou zápalovou reakce. Toto pozorování souhlasí s nálezy všech výše zmíněných autorů.

Námi nejčastěji pozorované histopatologické poškození mozkové tkáně byla nekróza. Nekrotická ložiska a odumírání tkáně pozorovali i Janecek *et al.* (2014) a Heuer *et al.* (2015). Ložiskové hemorhagie ve tkáni, které jsme zaznamenali, pozorovali Resende *et al.* (2015). Infiltráty buněk zmiňují Janecek *et al.* (2014). Zesílené stěny cév žádný z autorů nepozoroval. Stejně tak ani perivaskulární infiltráty, angiogenezi nebo z kondenzovaný chromatin v jádrech neuronů. My jsme naopak na rozdíl od pozorování Janecek *et al.* (2014) a Heuer *et al.* (2015) nezaznamenali ani demyelinizaci tkáně ani nateklé či jinak poškozené axony neuronů.

Naše nálezy společně s pozorováním ostatních autorů jasně dokazuje, že v mozcích myši s toxokarózou dochází k makroskopickým i mikroskopickým patologickým změnám. Janecek *et al.* (2014) navrhuje hypotézu, že mikroskopické hemorhagické léze mohou být způsobeny larvami penetrujícími artérie v kůře mozku.

Mikroskopické nálezy ukázaly přítomnost larev, kolem kterých se ale nevytváří žádná zánětlivá reakce. Eid *et al.* (2015) navrhuje hypotézu, že absence infiltrátů zápalových buněk kolem larev může být způsobena tím, že larvy mimetují hostitelské antigeny a unikají pozornosti imunitního systému hostitele. Další variantou je, že nervová tkáň inhibuje vznik zápalu kvůli vlastní ochraně. Larvy dokáží obměnit svůj povrch s navázanými buňkami či protilátkami a tím se vyhnout útoku imunitního systému hostitele (Maizels, 2013). Zbytky kutikuly ve tkáni mohou stimulovat případné zápalové reakce.

Vznik patologických poškození v mozku a jejich přesný dopad na hostitele zůstává stále dostatečně neobjasněn. Výskyt neurologických příznaků v pozdních fázích infekce ukazuje na dlouhodobé pozvolné působení parazita na hostitele.

7 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo charakterizovat cerebrální formu larvální toxokarózy v různých fázích infekce u myší s jednorázovou infekcí i u myší reinfikovaných.

Naše pozorování potvrdilo, že toxokaróza je doprovázena neurologickými příznaky, které se začínají objevovat s postupem doby v pozdních fázích infekce bez ohledu na její typ. Poprvé byly tyto příznaky zaznamenány 9 týdnů po infekci a četnost jejich výskytu se postupně navyšovala.

Vyšetřením orgánů, konkrétně jater, sleziny a mozku jsme se ujistili, že larvy *Toxocara canis* podstupují tělní migraci a putují do mozku svého paratenického hostitele. Počty červů zjištěné u myší s jednorázovou infekcí ukázaly, že k akumulaci larev v mozku docházelo do 19. týdne po infekci, kdy počet larev dosáhl maxima. Nebyla prokázána pozitivní korelace mezi množstvím larev v mozku a přítomností neurologických příznaků. Přítomnost neurologických příznaků nemá souvislost ani se specifickou imunitní odpovědí myšího hostitele. Zjistili jsme ale, že larvy byly často akumulovány v oblasti mozku, která ovlivňuje jak pohyb, tak i paměť.

Kolem larev ve tkáni nebylo nalezeno žádné viditelné poranění ani zápalová reakce. V mozcích však byly zjištěny patologické změny a poškození u všech myší bez závislosti na fázi a typu infekce. Jednalo se o lokální nekrózy, hemorhagie, zesílené stěny cév, infiltráty buněk v tkáni i kolem cév a abnormální angiogeneze. Některé neurony měly kondenzovaný chromatin.

Přítomnost a působení larev v mozku experimentálních zvířat jednoznačně způsobuje paratenickému hostiteli poškození, které ústí v nástup neurologických příznaků a zhoršování celkového stavu. Tento proces je pozvolný, ale má fatální následky. Je známo, že séroprevalence u lidí je vysoká, ale otázkou zůstává, do jaké míry je naše populace tímto parazitem ovlivněna, a je proto je potřeba proniknout do hloubky této problematiky.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- Akao N, Tomoda M, Hayashi E, Suzuki R, Shimizu-Suganuma M, Shichinohe K, Fujita K (2003):** Cerebellar ataxia due to *Toxocara* infection in Mongolian gerbils, *Meriones unguiculatus*. *Vet Parasitol.* 113(3-4):229-37.
- Ash LR, Orihel TC (2007):** Atlas of Human Parasitology. 5th ed. *American Society for Clinical Pathology*. Chicago. ISBN 08-918-9167-6.
- Bächli H, Minet JC, Gratzl O (2004):** Cerebral toxocariasis: a possible cause of epileptic seizure in children. *Childs Nerv Syst.* 20(7):468-72.
- Baldisserotto M, Conchin CF, Soares Mda G, Araujo MA, Kramer B (1999):** Ultrasound findings in children with toxocariasis: report on 18 cases. *Pediatr Radiol.* 29(5):316-9.
- Bardón R, Cuéllar C, Guillén JL (1994):** Larval distribution of *Toxocara canis* in BALB/c mice at nine weeks and one year post-inoculation. *J Helminthol.* 68(4):359-60.
- Bin LL, Santarém VA, Laposy CB, Rubinsky-Elefant G, Roldán WH, Giuffrida R (2016):** Kinetics and avidity of anti-*Toxocara* antibodies (IgG) in rabbits experimentally infected with *Toxocara canis*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 25(1):99-104.
- Boldiš V, Ondriska F, Špitalská E, Reiterová K (2015):** Immunodiagnostic approaches for the detection of human toxocarosis. *Exp Parasitol.* 159:252-8.
- Caldera F, Burlone ME, Genchi C, Pirisi M, Bartoli E (2013):** *Toxocara* encephalitis presenting with autonomous nervous system involvement. *Infection.* 41(3):691-4.
- Cardillo N, Rosa A, Ribicich M, López C, Sommerfelt I (2009):** Experimental infection with *Toxocara cati* in BALB/c mice, migratory behaviour and pathological changes. *Zoonoses Public Health.* 56(4):198-205.
- Corrêa FM, Chieffi PP, Lescano SA, Santos SV (2014):** Behavioral and memory changes in *Mus musculus* coinfecting by *Toxocara canis* and *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 56(4):353-6.
- Coşkun F, Akıncı E (2013):** Hepatic toxocariasis: a rare cause of right upper abdominal pain in the emergency department. *Turkiye Parazitol Derg.* 37(2):151-3.
- Cox DM, Holland CV (1998):** The relationship between numbers of larvae recovered from the brain of *Toxocara canis*-infected mice and social behaviour and anxiety in the host. *Parasitology.* 116 (Pt 6):579-94.
- Cox DM, Holland CV (2001)a:** Influence of mouse strain, infective dose and larval burden in the brain on activity in *Toxocara*-infected mice. *J Helminthol.* 75(1):23-32.
- Cox DM, Holland CV (2001)b:** Relationship between three intensity levels of *Toxocara canis* larvae in the brain and effects on exploration, anxiety, learning and memory in the murine host. *J Helminthol.* 75(1):33-41.

- Dolinsky ZS, Burrigth RG, Donovan PJ, Glickman LT, Babish J, Summers B, Cypess RH (1981):** Behavioral effects of lead and *Toxocara canis* in mice. *Science*. 213(4512):1142-4.
- Dutra GF, Pinto NS, de Avila LF, Dutra PC, Telmo Pde L, Rodrigues LH, Silva AM, Scaini CJ (2014):** Risk of infection by the consumption of liver of chickens inoculated with low doses of *Toxocara canis* eggs. *Vet Parasitol*. 203(1-2):87-90.
- Eid MM, El-Kowrany SI, Othman AA, El Gendy DI, Saied EM (2015):** Immunopathological changes in the brain of immunosuppressed mice experimentally infected with *Toxocara canis*. *Korean J Parasitol*. 53(1):51-8.
- Fahrion AS, Staebler S, Deplazes P (2008):** Patent *Toxocara canis* infections in previously exposed and in helminth-free dogs after infection with low numbers of embryonated eggs. *Veterinary Parasitology*. 152(1-2):108-15.
- Fan CK, Lan HS, Hung CC, Chung WC, Liao CW, Du WY, Su KE (2004):** Seroepidemiology of *Toxocara canis* infection among mountain aboriginal adults in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg*. 71(2):216-21.
- Fan CK, Holland CV, Loxton K, Barghout U (2015):** Cerebral toxocariasis: silent progression to neurodegenerative disorders? *Clin Microbiol Rev*. 28(3):663-86. REVIEW
- Fillaux J, Magnaval JF (2013):** Laboratory diagnosis of human toxocariasis. *Veterinary Parasitology*. 193(4), 327-336.
- Flegr J (2007):** Effects of *Toxoplasma* on human behavior. *Schizophr Bull*. 33(3):757-60.
- Flegr J, Markoš A (2014):** Masterpiece of epigenetic engineering - how *Toxoplasma gondii* reprogrammes host brains to change fear to sexual attraction. *Mol Ecol*. 23(24):5934-6.
- Garcia LS (2007):** Diagnostic medical parasitology. 5th ed. *ASM Press*. Washington, D.C. ISBN 1-55581-380-1.
- Goffette S, Jeanjean AP, Duprez TP, Bigaignon G, Sindic CJ (2000):** Eosinophilic pleocytosis and myelitis related to *Toxocara canis* infection. *Eur J Neurol*. 7(6):703-6.
- Good B, Holland CV, Taylor MR, Larragy J, Moriarty P, O'Regan M (2004):** Ocular toxocariasis in schoolchildren. *Clin Infect Dis*. 39(2):173-8.
- Hakim SL, Mak JW, Lam PL (1993):** ELISA seropositivity for *Toxocara canis* antibodies in Malaysia, 1989-1991. *Med J Malaysia*. 48(3):303-7.
- Hamilton CM, Stafford E, Pinelli E, Holland CV (2006):** A murine model for cerebral toxocariasis: characterization of host susceptibility and behaviour. *Parasitology*. 132, 791-801.
- Helsen G, Vandecasteele SJ, Vanopdenbosch LJ (2011):** Toxocariasis presenting as encephalomyelitis. *Case Rep Med*. 2011:503913.
- Helwich AB, Lind P, Nansen P (1999):** *Visceral larva migrans*: migratory pattern of *Toxocara canis* in pigs. *International Journal for Parasitology*. 29: 559-565.

Heuer L, Beyerbach M, Lühder F, Beineke A, Strube C (2015): Neurotoxocarosis alters myelin protein gene transcription and expression. *Parasitol Res.* 114(6):2175-86.

Holland CV, Cox DM (2001): *Toxocara* in the mouse: a model for parasite-altered host behaviour? *Journal of Helminthology.* 75:125-135. REVIEW

Holland CV, Hamilton CM (2013): The significance of cerebral toxocariasis: a model system for exploring the link between brain involvement, behaviour and the immune response. *The Journal of Experimental Biology.* 216:78-83.

Hrádková K, Horák P (2002): Neurotropic behaviour of *Trichobilharzia regenti* in ducks and mice. *J Helminthol.* 76(2):137-41.

Chandrashekhara SH, Sharma R, Bagh S, Garg P (2010): Image of the month. Hepatic *visceral larva migrans* due to *Toxocara Canis*. *Gastroenterol Clin Biol.* 34(11):573-4.

Chatterjee S (2014): Artefacts in histopathology. *J Oral Maxillofac Pathol.* 18(Suppl 1):S111-6. REVIEW

Chisholm AD, Xu S (2012): The *Caenorhabditis elegans* epidermis as a model skin. II: differentiation and physiological roles. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 1(6):879-902. REVIEW

Inan M, Sakru N, Vatansever U, Bilgi S (2006): *Visceral larva migrans* presenting as acute abdomen in a child. *J Pediatr Surg.* 41(3):e7-9.

Jacquier P, Gottstein B, Stingelin Y, Eckert J (1991): Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay kit. *J Clin Microbiol.* 29(9):1831-5.

Jagannath PM, Venkataramana NK, Rao SA, Naik AL, Shivakumar SK, Saktepar A, Gopalakrishnan R, Shankar SK (2009): Recurrent cerebral *larva migrans*: A case report and review of literature. *J Pediatr Neurosci.* 4(1):36-40.

Janecek E, Beineke A, Schnieder T, Strube C (2014): Neurotoxocarosis: marked preference of *Toxocara canis* for the cerebrum and *T. cati* for the cerebellum in the paratenic model host mouse. *Parasit Vectors.* 7:194.

Jirkovská M (2015): osobní sdělení

Kaplan M, Kalkan A, Kuk S, Demirdag K, Ozden M, Kilic SS (2008): *Toxocara* seroprevalence in schizophrenic patients in Turkey. *Yonsei Med J.* 49(2):224-9.

Kazek B, Jamroz E, Mandera M, Bierzyńska-Macyszyn G, Kluczevska E, Marszał E (2006): The cerebral form of toxocarosis in a seven-year-old patient. *Folia Neuropathol.* 44(1):72-6.

Keith BJ, Franklin KBJ, Paxinos G (2008): The mouse brain in stereotaxic coordinates. 3rd ed. *Academic Press.* New York. ISBN 9780123694607.

- Khademvatan S, Khajeddin N, Izadi S, Yousefi E (2014):** Investigation of anti-*Toxocara* and anti-*Toxoplasma* antibodies in patients with schizophrenia disorder. *Schizophr Res Treatment*. 2014:230349.
- Ko KD, Lee JJ, Kim KK, Sun HS, Hwang IC, Choi SJ (2015):** Hepatic *visceral larva migrans* due to *Toxocara canis* in a 72-years-old man. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 46(2):181-3.
- Kolbeková P, Kolářová L, Větvicka D, Syrůček M (2011a):** Imaging of *Toxocara canis* larvae labelled by CFSE in BALB/c mice. *Parasitology Research*. 108(4):1007-14.
- Kolbeková P, Větvicka D, Svoboda J, Skírnisson K, Leissová M, Syrůček M, Marečková H, Kolářová L (2011b):** *Toxocara canis* larvae reinfesting BALB/c mice exhibit accelerated speed of migration to the host CNS. *Parasitol Res*. 109(5):1267-78.
- Krämer F, Hammerstein R, Stoye M, Epe C (2006):** Investigations into the prevention of prenatal and lactogenic *Toxocara canis* infections in puppies by application of moxidectin to the pregnant dog. *Journal of Veterinary Medicine*. B 53, 218-223.
- Lescano SA, Nakhle MC, Ribeiro MC, Chieffi PP (2012):** IgG antibody responses in mice coinfecting with *Toxocara canis* and other helminths or protozoan parasites. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 54(3):145-52.
- Lescano SA, Santos SV, Assis JM, Chieffi PP (2015):** Efficacy of nitazoxanide against *Toxocara canis*: larval recovery and humoral immune response in experimentally infected mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 57(4):337-41.
- Maizels RM (2013):** *Toxocara canis*: molecular basis of immune recognition and evasion. *Vet Parasitol*. 193(4):365-74.
- Maruyama S, Yamamoto K, Katsube Y (1994):** Infectivity of *Toxocara canis* larvae from Japanese quails in mice. *J Vet Med Sci*. 56(2):399-401.
- Moreira-Silva SF, Rodrigues MG, Pimenta JL, Gomes CP, Freire LH, Pereira FE (2004):** Toxocariasis of the central nervous system: with report of two cases. *Rev Soc Bras Med Trop*. 37(2):169-74.
- Moiyadi A, Mahadevan A, Anandh B, Shivashankar RS, Chickabasavaiah YT, Shankar SK (2007):** *Visceral larva migrans* presenting as multiple intracranial and intraspinal abscesses. *Neuropathology*. 27(4):371-4.
- Nicoletti A, Sofia V, Mantella A, Vitale G, Contrafatto D, Sorbello V, Biondi R, Preux PM, Garcia HH, Zappia M, Bartoloni A (2008):** Epilepsy and toxocariasis: a case-control study in Italy. *Epilepsia*. 49(4):594-9.
- Othman AA, Abdel-Alem GA, Saied EM, Mayah WW, Elatrash AM (2010):** Biochemical and immunopathological changes in experimental neurotoxocariasis. *Mol Biochem Parasitol*. 172(1):1-8.
- Page AP, Johnstone IL (2007):** The cuticle. *WormBook*. 19:1-15. REVIEW

- Park HY, Lee SU, Huh S, Kong Y, Magnaval JF (2002):** A seroepidemiological survey for toxocariasis in apparently healthy residents in Gangwon-do, Korea. *Korean J Parasitol.* 40(3):113-7.
- Parsons JC, Grieve RB (1990):** Kinetics of liver trapping of infective larvae in murine toxocariasis. *J Parasitol.* 76(4):529-36.
- Playfair JHL, Bancroft G (2004):** Infection and immunity. 2nd ed. *Oxford University Press.* New York. ISBN 01-992-6495-3.
- Rasmussen LN, Dirdal M, Birkebaek NH (1993):** "Covert toxocariasis" in a child treated with low-dose diethylcarbamazine. *Acta Paediatr.* 82(1):116-8.
- Resende NM, Gazzinelli-Guimarães PH, Barbosa FS, Oliveira LM, Nogueira DS, Gazzinelli-Guimarães AC, Gonçalves MT, Amorim CC, Oliveira FM, Caliari MV, Rachid MA, Volpato GT, Bueno LL, Geiger SM, Fujiwara RT (2015):** New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. *Parasit Vectors.* 8:354.
- Roberts LS, Janovy J, Nadler S, Schmidt GD (2013):** Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology. 9th ed. *McGraw-Hill.* New York. ISBN 978-0-07-132641-4.
- Rüttinger P, Hadidi H (1991):** MRI in cerebral toxocaral disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 54(4):361-2.
- Sasmal NK, Acharya S, Laha R (2008):** Larval migration of *Toxocara canis* in piglets and transfer of larvae from infected porcine tissue to mice. *Journal of Helminthology.* 82:245-249.
- Schantz PM, Weis PE, Pollard ZF, White MC (1980):** Risk factors for toxocaral *ocular larva migrans*: a case-control study. *Am J Public Health.* 70(12):1269-72.
- Scheid R, Jentsch RT, Schroeter ML (2008):** Cognitive dysfunction, urinary retention, and a lesion in the thalamus--beware of possible toxocariasis of the central nervous system. *Clin Neurol Neurosurg.* 110(10):1054-7.
- Schoenardie ER, Scaini CJ, Avila LF, Sperotto RL, Borsuk S, Felicetti CD, Pepe M, Berne ME (2014):** Determination of IgG avidity in BALB/c mice experimentally infected with *Toxocara canis*. *Rev Bras Parasitol Vet.* 23(3):403-6.
- Sick C, Hennerici MG (2014):** Expect the unexpected: a case of isolated eosinophilic meningitis in toxocariasis. *Case Rep Neurol.* 6(3):259-63.
- Sommer C, Ringelstein EB, Biniek R, Glöckner WM (1994):** Adult *Toxocara canis* encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 57(2):229-31.
- Söndergaard HP, Theorell T (2004):** A putative role for *Toxocara* species in the aetiology of multiple sclerosis. *Med Hypotheses.* 63(1):59-61.
- Stensvold CR, Skov J, Møller LN, Jensen PM, Kapel CM, Petersen E, Nielsen HV (2009):** Seroprevalence of human toxocariasis in Denmark. *Clin Vaccine Immunol.* 16(9):1372-3.

- Strube Ch, Heuer L, Janecek E (2013):** *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Veterinary Parasitology*. 193:375-389. REVIEW
- Sullivan EV, Zahr NM, Rohlfing T, Pfefferbaum A. (2010):** Fiber tracking functionally distinct components of the *internal capsule*. *Neuropsychologia*. 48(14):4155-63.
- Thomas MC, Da Cunha Lana P (2008):** Evaluation of vital stains for free-living marine nematodes. *Brazilian journal of oceanography*. 56(3):249-251.
- Uhlíková M, Hübner J (1998):** Seroprevalence of *Toxocara canis* infection in Czech Republic. *Cent Eur J Public Health*. 6(3):195-8.
- Xinou E, Lefkopoulos A, Gelagoti M, Drevelegas A, Diakou A, Milonas I, Dimitriadis AS (2003):** CT and MR imaging findings in cerebral toxocaral disease. *AJNR Am J Neuroradiol*. 24(4):714-8.
- Watthanakulpanich D, Smith HV, Hobbs G, Whalley AJ, Billington D (2008):** Application of *Toxocara canis* excretory-secretory antigens and IgG subclass antibodies (IgG1-4) in serodiagnostic assays of human toxocariasis. *Acta Trop*. 106(2):90-5.
- Willingham AL 3rd, Hurst M (1996):** The pig as a unique host model for *Schistosoma japonicum* infection. *Parasitol Today*.12(4):132-4; discussion 164.

9 PŘÍLOHY

Seznam příloh:

Příloha č. 1: Mikrofotografie ze světelného mikroskopu. Myš. 10. týden p.i. Mozek.

Příloha č. 2: Mikrofotografie ze světelného mikroskopu. Myš. 13. týden p.i. Mozek.

Příloha č. 3: Mikrofotografie ze světelného mikroskopu. Myš. 10. týden p.i. Mozek.

Příloha č. 4: Mikrofotografie ze světelného mikroskopu. Myš. 15. týden p.i. Mozek.

Příloha č. 5: Mikrofotografie ze světelného mikroskopu. Myš. 16. týden p.i. Mozek.

Příloha č. 6: Mikrofotografie ze světelného mikroskopu. Myš. 13. týden p.i. Mozek.

Příloha č. 7: Mikrofotografie ze světelného mikroskopu. Myš. 16. týden p.i. Mozek.

Příloha č. 8: Mikrofotografie ze světelného mikroskopu. Myš. 17. týden p.i. Mozek.

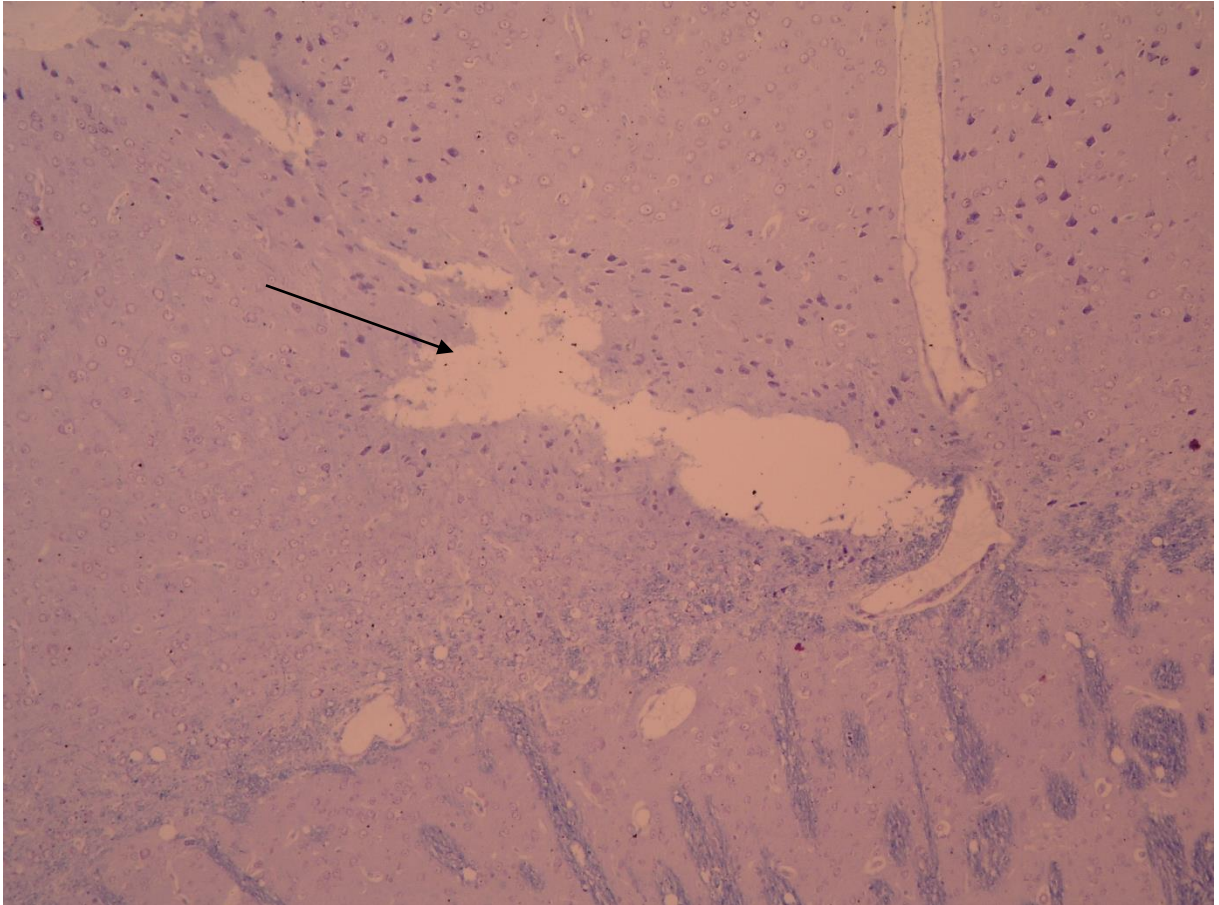
Příloha č. 9: Mikrofotografie ze světelného mikroskopu. Myš. 31. týden p.i. Mozek.

Příloha č. 10: Mikrofotografie ze světelného mikroskopu. Myš. 10. týden p.i. Mozek.

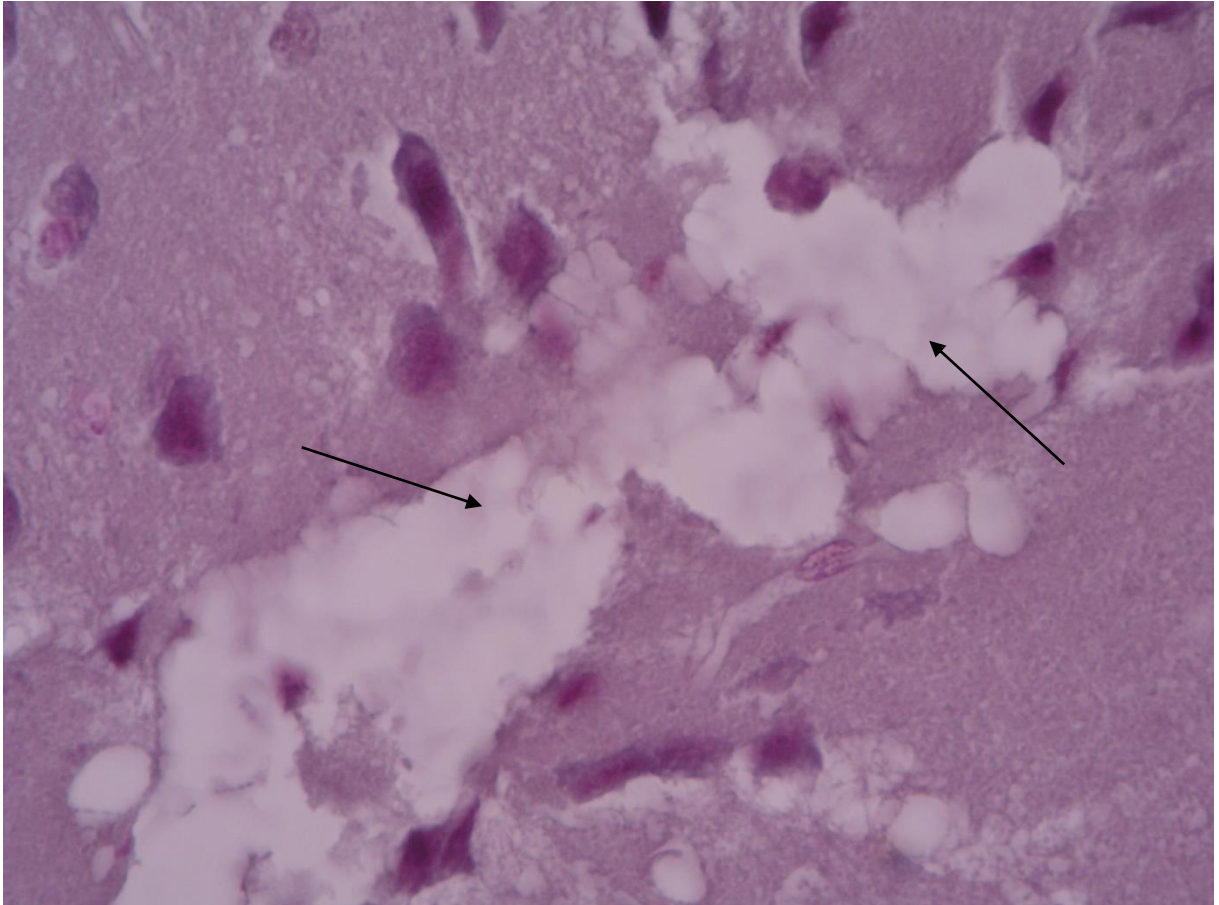
Příloha č. 11: Mikrofotografie ze světelného mikroskopu. Myš. 14. týden p.i. Mozek.

Příloha č. 12: Mikrofotografie ze světelného mikroskopu. Myš. 25. týden p.i. Mozek.

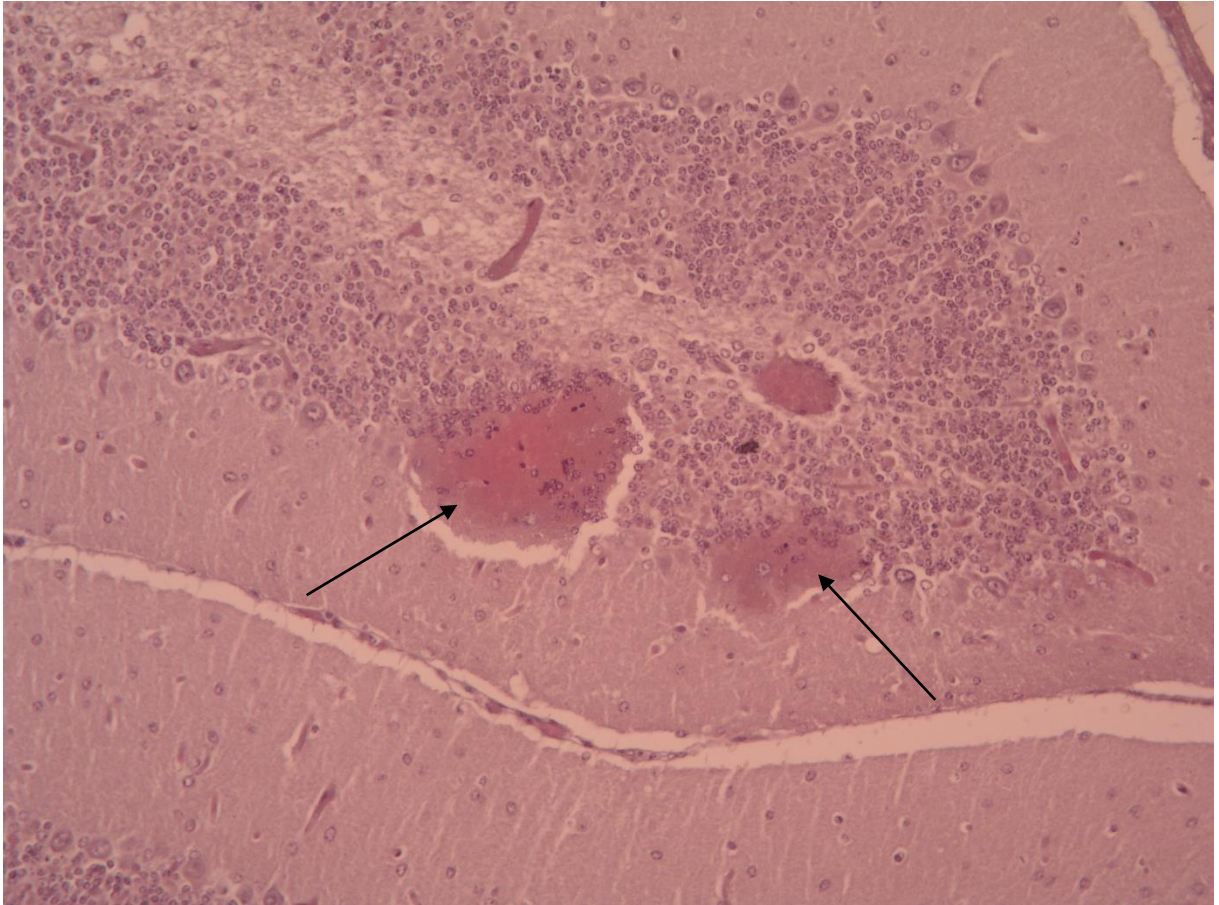
Příloha č. 13: Mikrofotografie ze světelného mikroskopu. Myš. 25. týden p.i. Mozek.



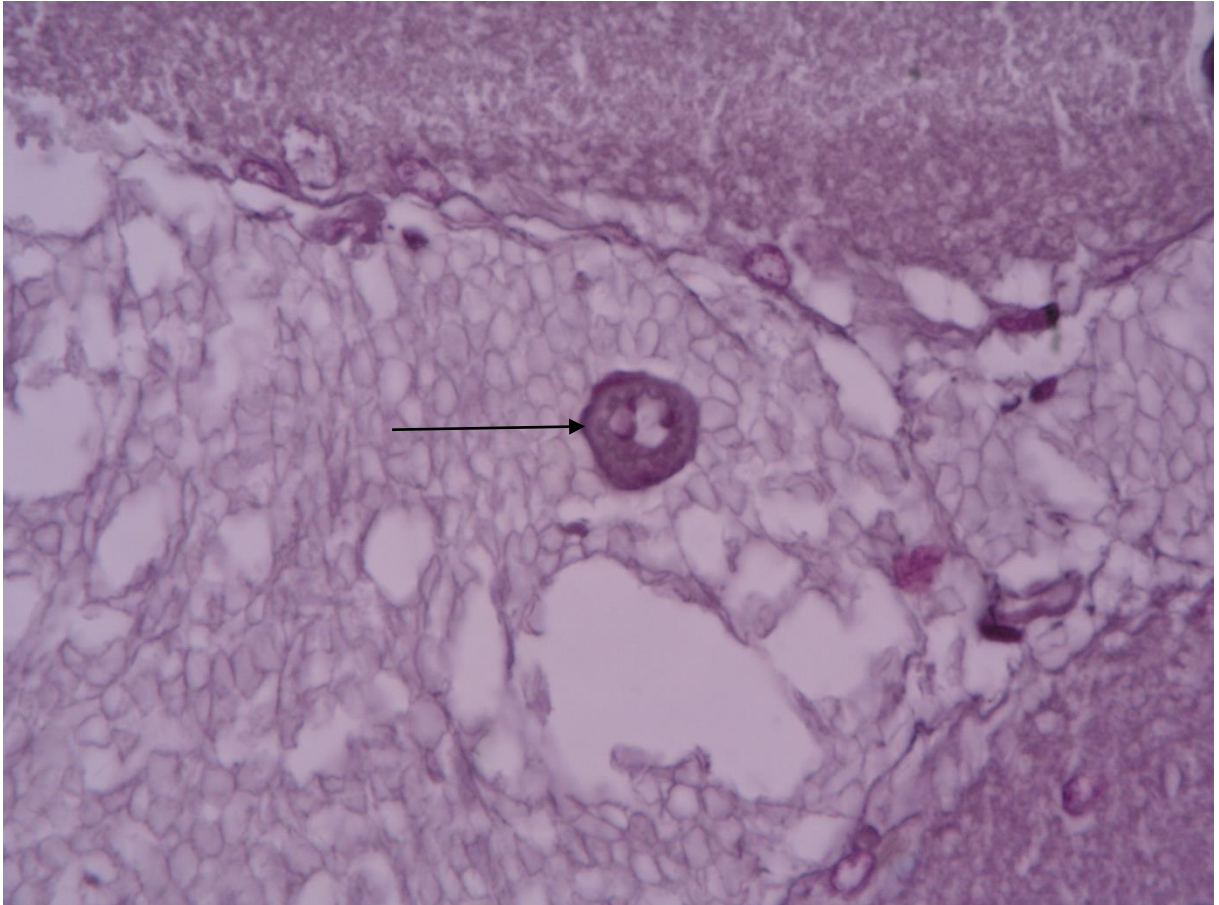
Příloha č. 1: Myš s jednorázovou infekcí Toxocara canis v 10. týdnu p.i. Mozek. Nekróza. Luxol fast blue. Zvětšení 100×. Řez 4 μm. Poškození tkáně označeno šipkou



Příloha č. 2: Myš s jednorázovou infekcí Toxocara canis v 13. týdnu p.i. Mozek. Nekróza. Hematoxylin-eosin. Zvětšení 1000×. Řez 4 μm. Poškození tkáně označeno šipkou



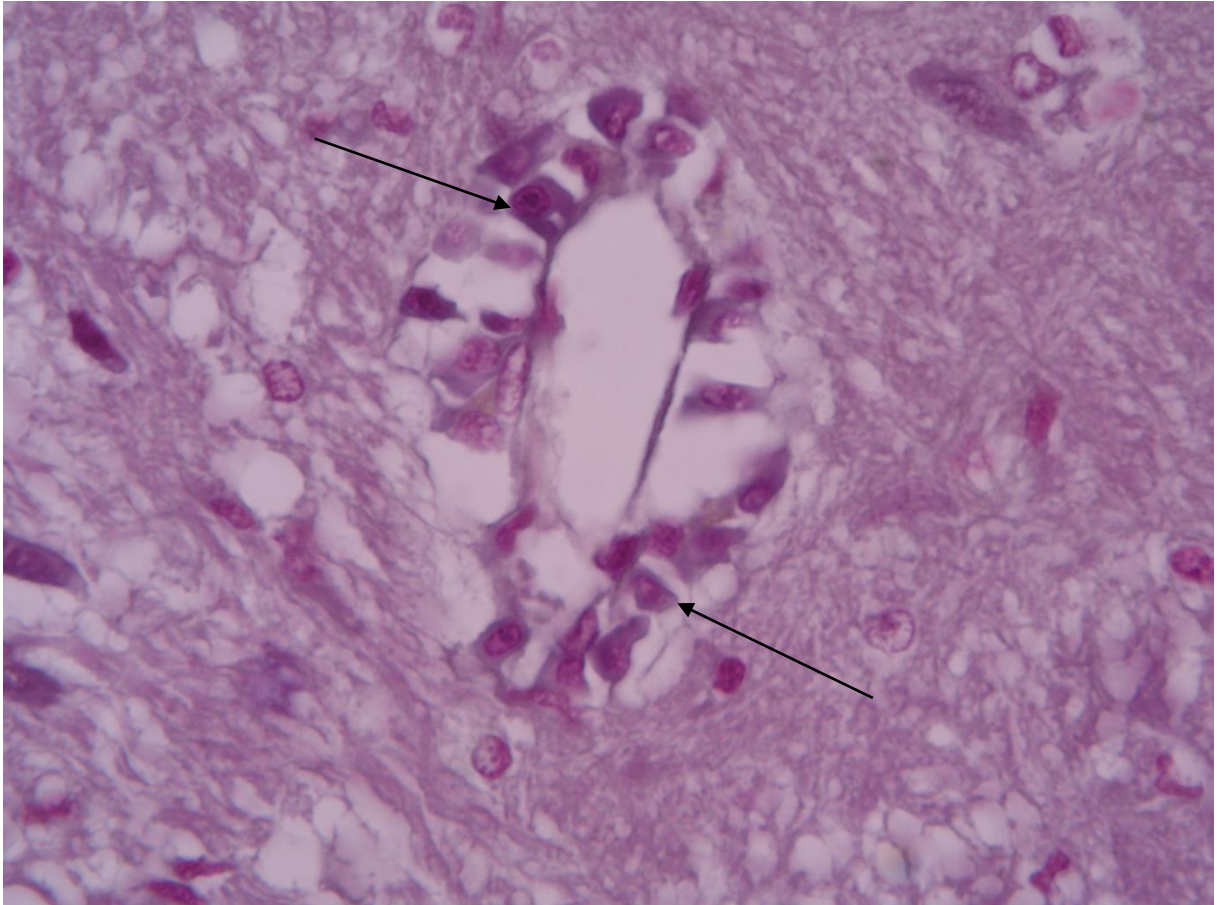
Příloha č. 3: Myš s reinfekcí Toxocara canis v 10. týdnu p.i. Mozek. Hemorhagie v mozečku. Hematoxylin-eosin. Zvětšení 200×. Řez 4 μm. Poškození tkáně označeno šipkou



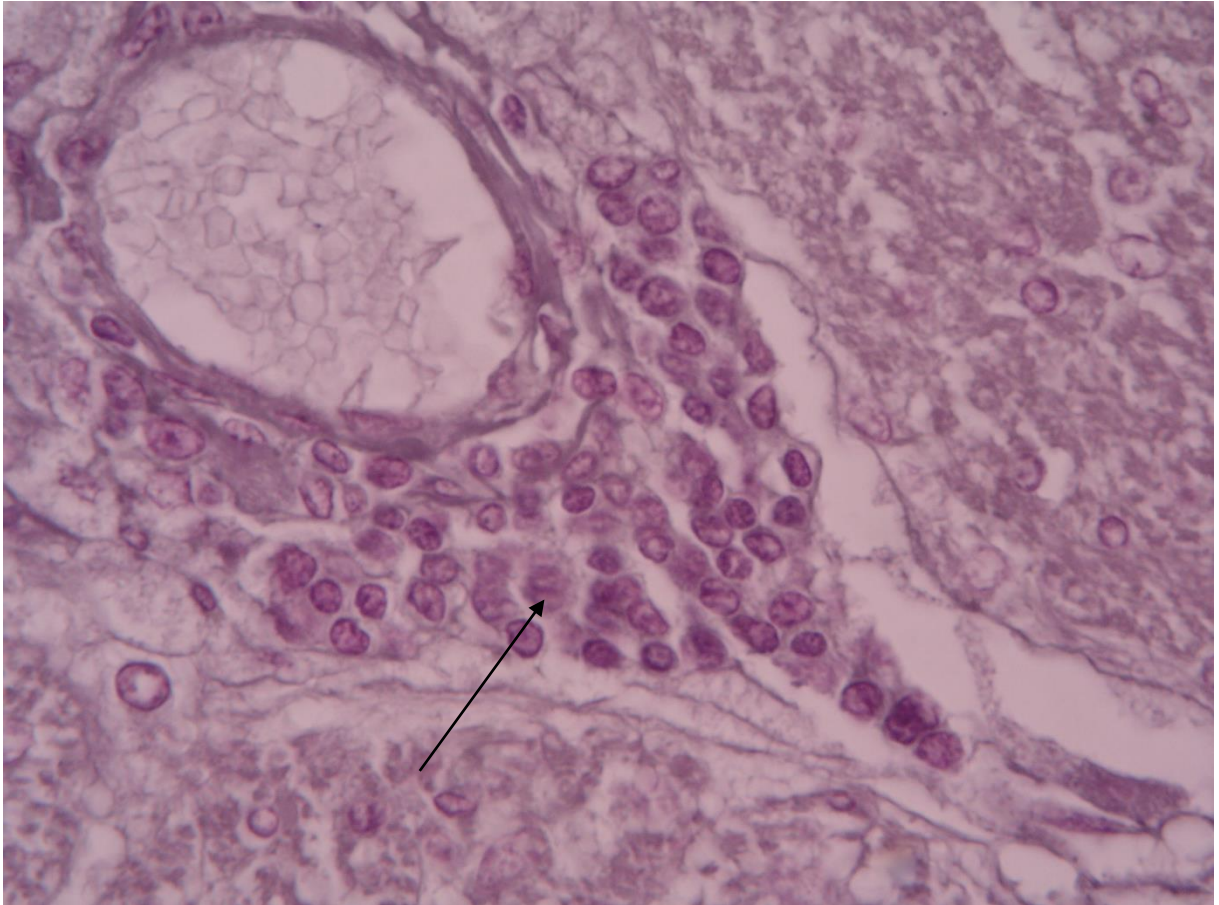
Příloha č. 4: Myš s reinfekcí Toxocara canis v 15. týdnu p.i. Mozek. Céva se zesílenou stěnou. Hematoxylin-eosin. Zvětšení 1000×. Řez 4 μm. Céva označena šipkou



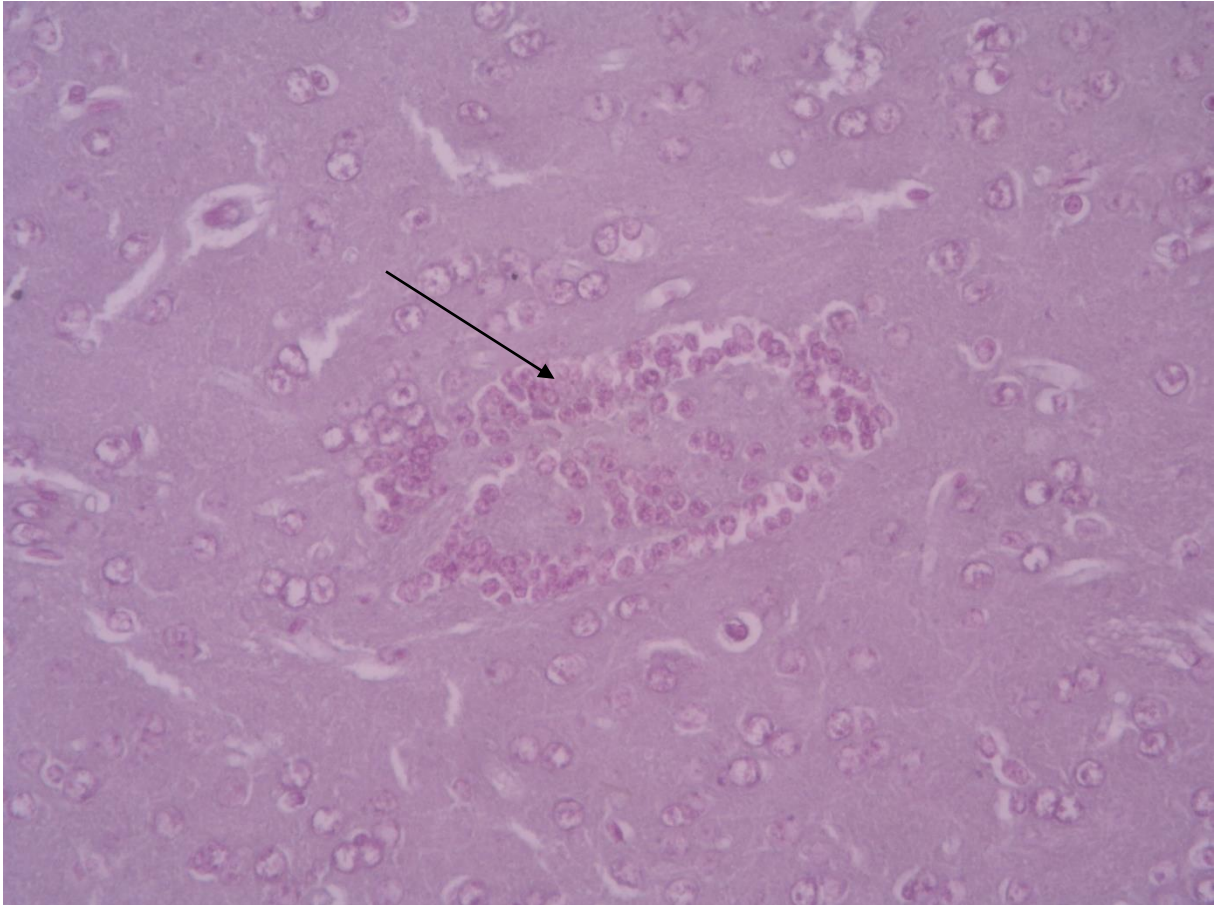
Příloha č. 5: Myš s reinfekcí Toxocara canis v 16. týdnu p.i. Mozek. Infiltrát kolem cévy. Hematoxylin-eosin. Zvětšení 400×. Řez 4 μm. Infiltrát označen šipkou



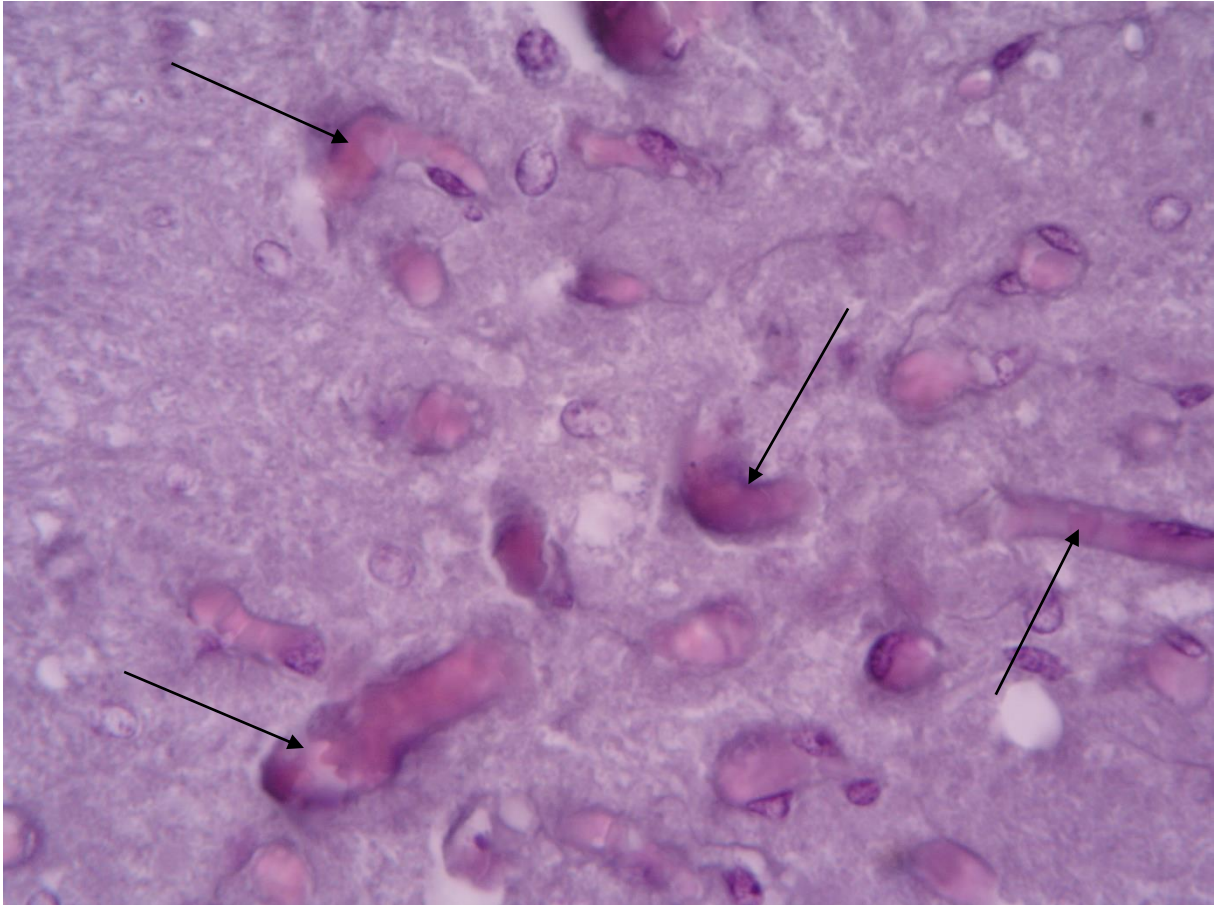
Příloha č. 6: Myš s jednorázovou infekcí Toxocara canis v 13. týdnu p.i. Mozek. Infiltrát kolem cévy. Hematoxylin-eosin. Zvětšení 1000×. Řez 4 μm. Infiltrát označen šipkou



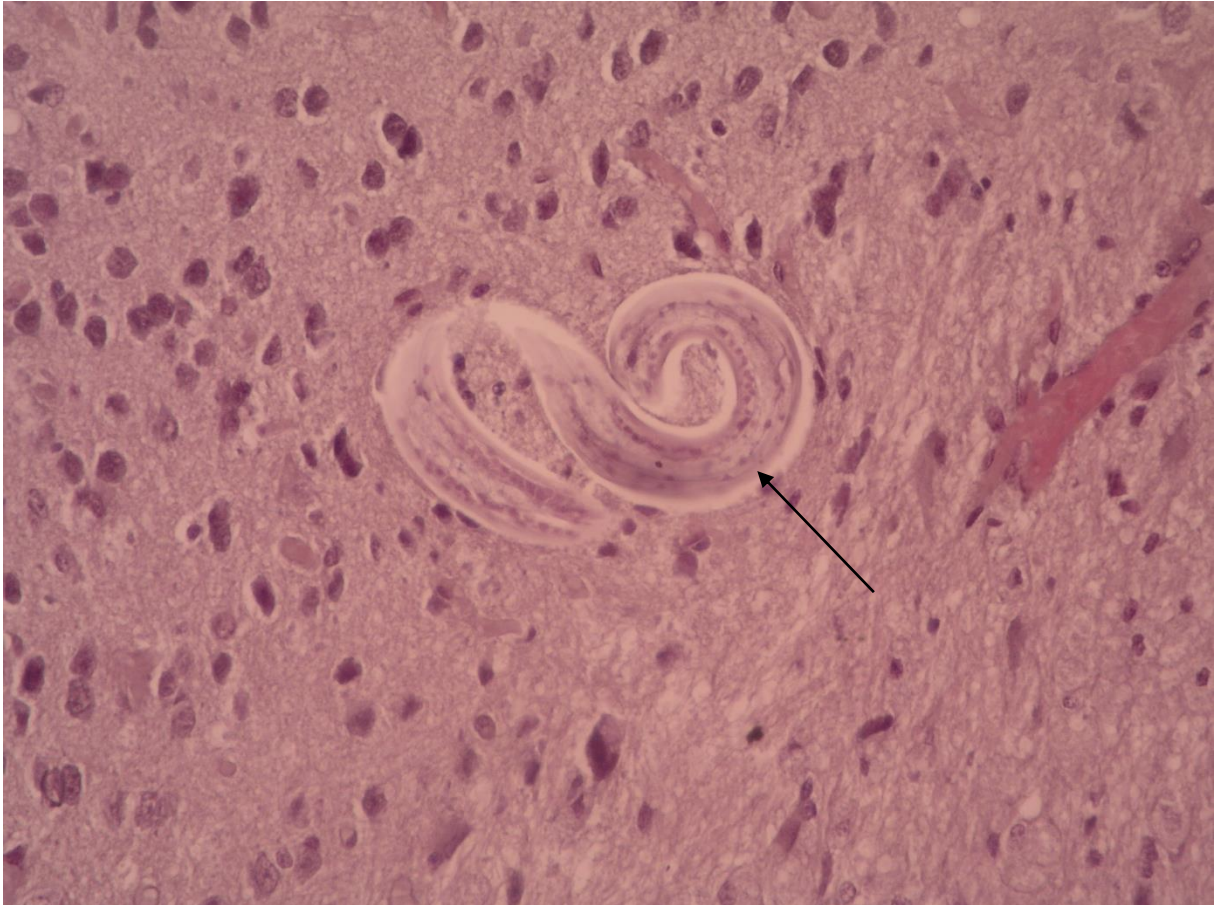
Příloha č. 7: Myš s reinfekcí Toxocara canis v 16. týdnu p.i. Mozek. Infiltrát kolem cévy. Hematoxylin-eosin. Zvětšení 1000×. Řez 4 μm. Infiltrát označen šipkou



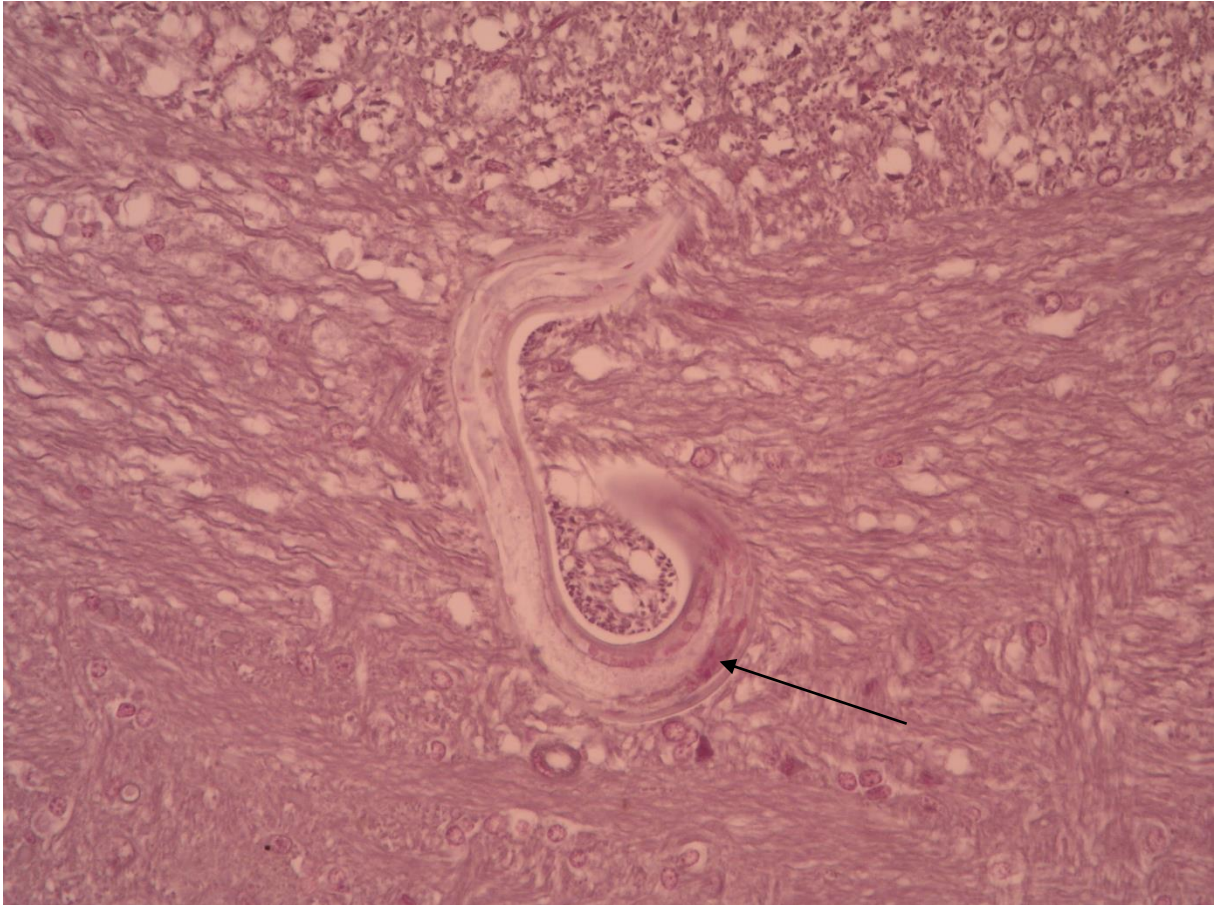
Příloha č. 8: Myš s jednorázovou infekcí Toxocara canis v 17. týdnu p.i. Mozek. Infiltrát buněk. Hematoxylin-eosin. Zvětšení 400×. Řez 4 μm. Infiltrát označen šipkou



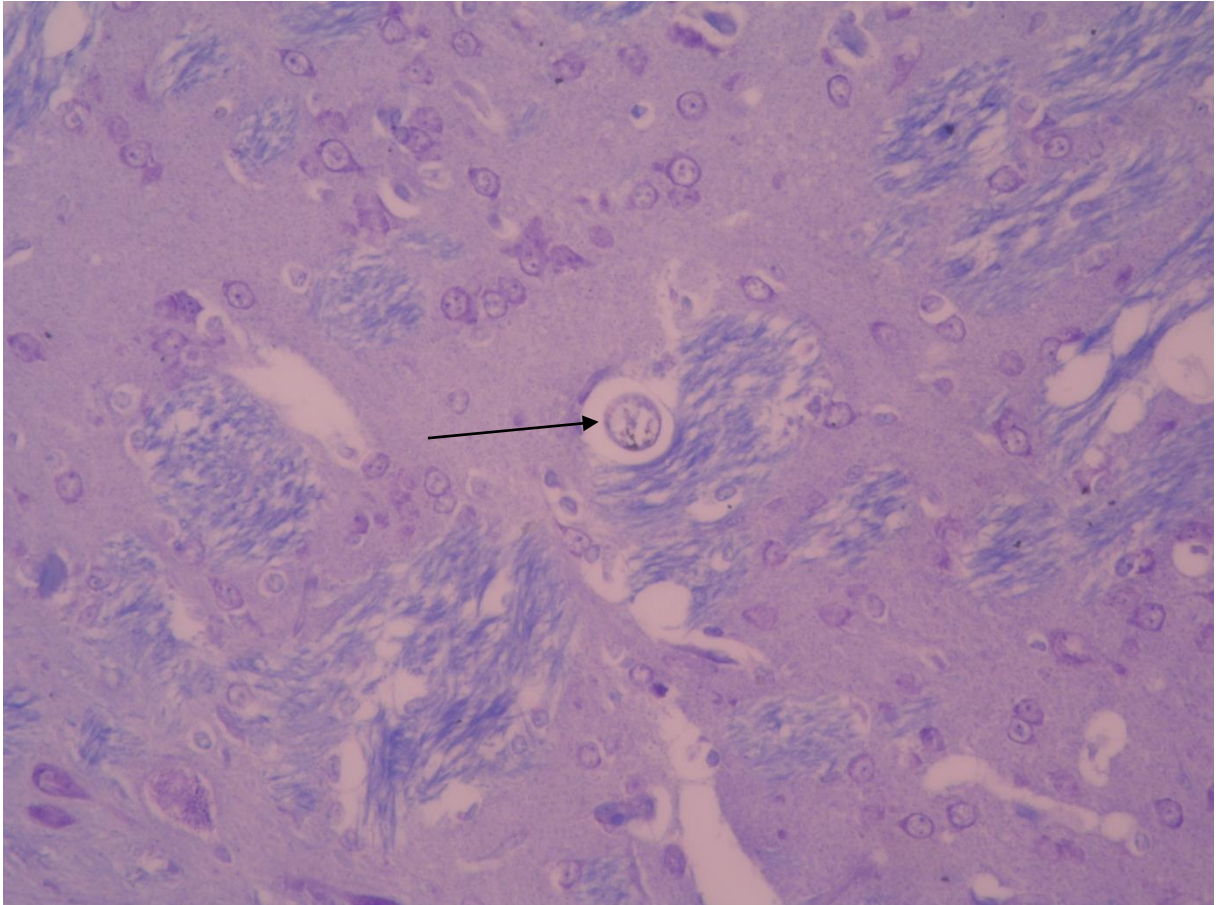
Příloha č. 9: Myš s jednorázovou infekcí Toxocara canis v 31. týdnu p.i. Mozek. Angiogeneze. Hematoxylin-eosin. Zvětšení 1000×. Řez 4 μm. Cévy označeny šipkou



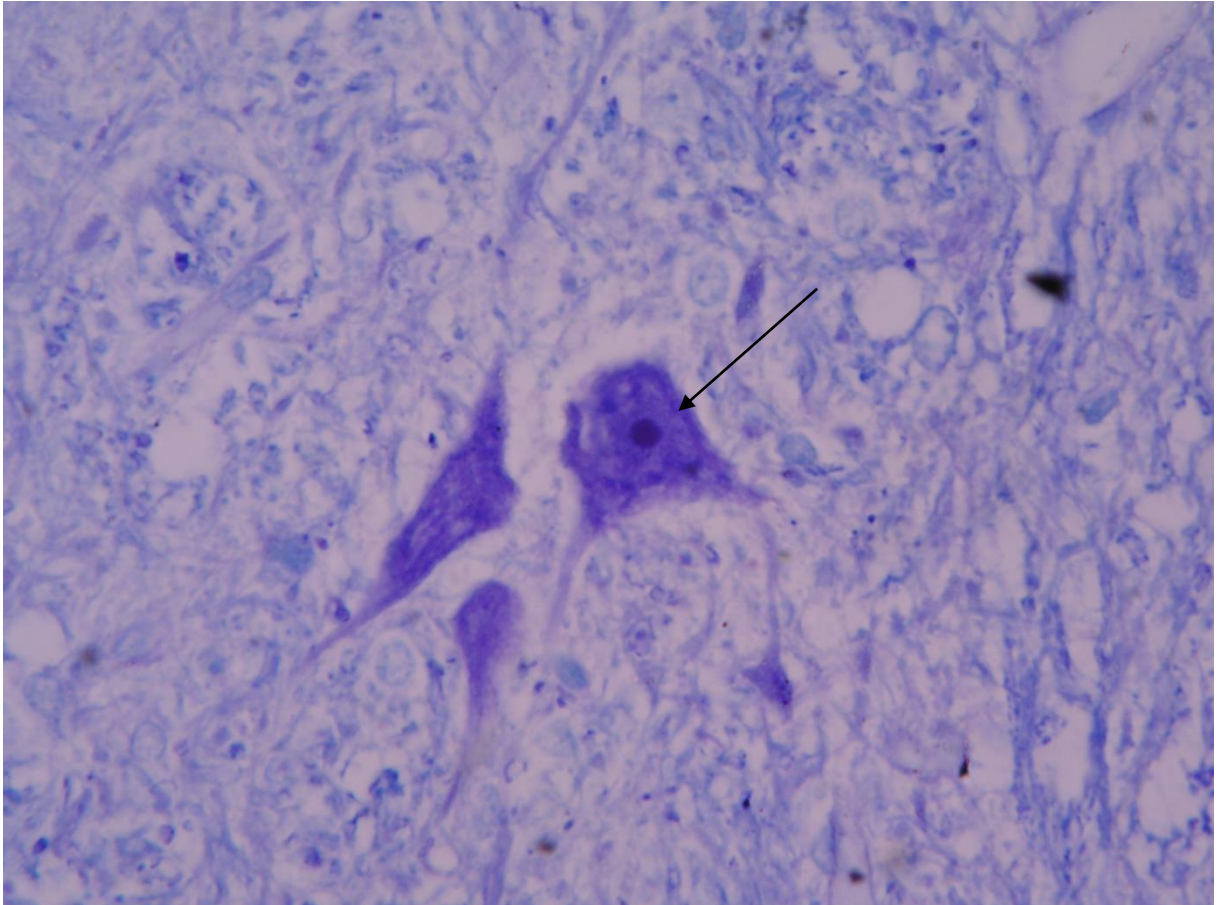
Příloha č. 10: Myš s reinfekcí Toxocara canis v 10. týdnu p.i. Mozek. Červ. Hematoxylin-eosin. Zvětšení 400×. Řez 4 μm. Červ označen šipkou



Příloha č. 11: Myš s reinfekcí Toxocara canis v 14. týdnu p.i. Mozek. Červ. Hematoxylin-eosin. Zvětšení 400×. Řez 4 μm. Červ označen šipkou



Příloha č. 12: Myš s jednorázovou infekcí Toxocara canis v 25. týdnu p.i. Mozek. Červ ve tkáni bez porušené myelinizace. Luxol fast blue. Zvětšení 200×. Řez 4 μm. Červ označen šipkou



Příloha č. 13: Myš s jednorázovou infekcí Toxocara canis v 25. týdnu p.i. Mozek. Buňka s kondenzovaným chromatinem. Luxol fast blue. Zvětšení 1000×. Řez 4 μm. Buňka označena šipkou