

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

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

Rigorózní práce

Vedoucí rigorózní práce: Prof. RNDr. Jiří Lamka, CSc.

Hradec Králové 2016

Mgr. Blanka Vrtová

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

V Ústí nad Labem 30.6.2016

.....

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli, panu prof. RNDr. Jiřímu Lamkovi, CSc., za organizaci průběhu rigorózní práce, za jeho cenné rady a ochotu. Mé poděkování dále patří PharmDr. Ivanu Vokřálovi, Ph.D. za pomoc při tvorbě práce a za poskytnutí mikroskopu domů, což mi nesmírně usnadnilo práci. Děkuji moc za spolupráci RNDr. Martinu Kašnému, Ph.D. z Parazitologického ústavu Přírodovědecké fakulty v Praze a Mgr. Kláře Melounové, kteří mě seznámili a naučili pracovat s imunologickými metodami na pracovišti Parazitologie UK. Děkuji své rodině a svým nejbližším známým, že se mnou vše prožívali a za to, že při mně po celou dobu stáli. Děkuji i svým milovaným blízkým, kteří mě podporovali a chtěli vždycky pro mě to nejlepší, ale dnes už tu nemohou být s námi.

Mgr. Blanka Virtová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Kandidát: Mgr. Blanka Virtová

Školitel: Prof. RNDr. Jiří Lamka, CSc.

Název rigorózní práce: Průběh a výsledky kultivace modelového parazita motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) v ovci domácí (*Ovis aries*) pro potřebu biotransformačních studií

Mezi aktuálně parazitologicky a farmakologicky značně sledovanou problematiku patří tzv. helmintorezistence, tedy odolnost parazitů vůči běžně využívaným léčivům ze skupiny anthelmintik vyvolaná jejich dlouhodobým využíváním v chovatelské praxi. Mechanismy vzniku této odolnosti jsou předmětem různě zaměřených studií, mezi ně lze zařadit i studie zaměřené na biotransformační schopnosti parazitů včetně vlivu používaných léčiv na aktivity biotransformačních enzymů parazitů. Pro potřeby takovýchto studií jsou běžně využíváni modeloví parazité kultivovaní ve svých přirozených hostitelích (hospodářských či laboratorních zvířatech), ze kterých jsou později parazité izolováni a přenášeni do *ex vivo* podmínek; zde jsou realizována některá biochemická šetření neproveditelná v *in vivo* podmínkách. Součástí této rigorózní práce bylo podílet se na získání motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) v ovci domácí (*Ovis aries*) pro následná biochemická vyšetření a podrobně zmapovat parazitologické, biochemické a patofyziologické změny v organismu hostitele parazita.

V rámci experimentální práce bylo použito 5 beranů ovce domácí, kteří byli na počátku studie odčerveni monepantem v dávce 9,0 ml/ zvíře a 3 z nich byli poté nakaženi metacerkáriemi motolice jaterní (200 MC). U všech infikovaných beranů došlo ke zvýšení hladiny protilátek IgG a eozinofilů 2 týdny po infekci, produkce vajíček *F. hepatica* byla zaznamenána od 10. týdne a 11. týdne po infekci. Na konci studie byla zvířata usmrcena a izolovaní dospělci motolice *F. hepatica* byli předáni Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v HK.

THE ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Candidate: Mgr. Blanka Virtová

Supervisor: Prof. RNDr. Jiří Lamka, CSc.

Title of rigorous thesis: The progression and results of the model parasite culturing liver fluke (*Fasciola hepatica*) in sheep (*Ovis aries*) for the use of biotransformation studies

Anthelmintic resistance (of parasites to commonly used drugs from the group of anthelmintics caused by its long term use in breeding practice) is currently highly discussed parasitological and pharmacological problematic. Mechanisms of origin of this resistance are in great interest of many trials. Various studies are focused on biotransformation abilities of parasites including the influence of drugs that are used for the activity of parasite biotransformation enzymes. Model cultured parasites in their natural hosts (economic or laboratory animals) are commonly used for purposes of these studies. Parasites are later isolated and transmitted to ex vivo conditions as some of the biochemical procedures, in vivo impracticable, are performed under these conditions. Part of the thesis was to obtain liver fluke (*Fasciola hepatica*) in sheep (*Ovis aries*) for subsequent biochemical examinations and detailed mapping of parasitological, biochemical and pathological changes in the parasite host.

In this experimental work, 5 rams were used. They were dewormed with monepantel suspension at a dose of 9.0 ml per animal and consequently 3 of them were infected with metacercariae of liver fluke (MC 200). All infected rams showed increased levels of IgG antibodies and eosinophils two weeks post infection. Production of eggs *F. hepatica* was observed starting at the 10th week and the 11th week post infection. At the end of the study the animals were euthanized, adult liver fluke *F. hepatica* was isolated and handed over to the Department of Biochemical Sciences Pharmaceutical Faculty UK.

OBSAH:

1. SEZNAM ZKRATEK.....	15
2. ÚVOD.....	16
3. TEORETICKÁ ČÁST	18
3.1 Motolice jaterní (<i>Fasciola hepatica</i>)	18
3.1.1 Taxonomické zařazení	19
3.1.2 Životní cyklus	19
3.1.3 Epidemiologie.....	23
3.1.4 Patogenita.....	25
3.2 Metody využívané k diagnostice fasciolózy	28
3.2.1 Hematologické metody	29
3.2.2 Imunologické metody	31
4. CÍLE PRÁCE	33
5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	34
5.1 Sledovaná zvířata, lokalita jejich chovu	34
5.2 Vlastní experiment	34
5.3 Metodika koprologického šetření	35
5.3.1 Použité přístroje, chemikálie a suroviny.....	35
5.3.2 Modifikovaná sedimentační metoda (kvantitativní ovoskopická metoda)....	35
5.4 Metodika hematologického šetření.....	36
5.4.1 Použité přístroje, chemikálie a suroviny:.....	36
5.4.2 Metoda vyšetřování krevního obrazu	37
5.5 Metodika imunodiagnostického šetření.....	37
5.5.1 Příprava exkrečně – sekrečních produktů.....	38
5.5.2 Použité přístroje, chemikálie a suroviny.....	38
5.5.3 Metoda ELISA	39
6. VÝSLEDKY	40
6.1 Výsledky koprologického šetření.....	40
6.2 Výsledky hematologických šetření	41
6.2.1 Stanovení diferenciálního počtu leukocytů.....	41
6.2.2 Stanovení hematokritu	44

6.3 Výsledky měření hmotnosti.....	45
6.4 Výsledky imunodiagnostického šetření.....	45
6.5 Výsledky pitvy	46
7. DISKUZE	48
8. ZÁVĚR	50
9. SEZNAM LITERATURY	51

1. SEZNAM ZKRATEK

<i>G. truncatula</i>	<i>Galba truncatula</i> (bahnatka malá)
EPG	počet vajíček na 1 gram vyšetřovaného materiálu
ES produkty	Exkrečně – sekreční produkty motolic
<i>F. hepatica</i>	<i>Fasciola hepatica</i> (motolice jaterní)
MC	metacerkárie
WBC	celkový počet bílých krvinek
TBCZ	triklabendazol

2. ÚVOD

Fasciola hepatica (motolice jaterní) je celosvětově velmi rozšířeným parazitem napadajícím především játra a žlučovody mnoha savců, přičemž ani lidé nejsou výjimkou (Volf a Horák 2007). Způsobuje infekci zvířat, tzv. fasciolózu (motoličnatost) (Kotrlá et al. 1984). V evropských podmínkách je u ovcí (*Ovis aries*) toto infekční onemocnění dokonce jedno z nejčastějších (Piedrafita et al. 2010). Projevuje se především hubnutím, průjmem a slabostí infikovaných zvířat. Lze pozorovat otoky v hrudní a břišní části těla. Juvenilní motolice při svém pohybu narušují jaterní parenchym, což má negativní vliv na funkci jater. Vznikají zde degenerativní léze následované proliferací pojivové tkáně a může se vyvinout fibróza a cirhóza jater. Už pouhá přítomnost těchto parazitů ve tkáních působí na tkáň velmi dráždivě. Při větších infekcích dochází k ucpávání žlučodů motolicemi a způsobují tak městnání žluče a dilataci žlučodů, může dojít až ke kalcifikaci žlučodů a vzniku žlučových kamenů. Toxiny vylučované motolicemi mohou vyvolávat záněty. A v neposlední řadě mohou metacerkárie (vývojové stádium napadající definitivního hostitele) při své cestě do jater zavléci řadu patogenních mikroorganismů a ještě tak zhoršit celkový průběh nemoci (Taylor et al. 2005; Bowman 2009; Kotrlá et al. 1984). U chronicky nemocných zvířat se může rozvinout i anémie (Zajac a Conboy 2012; Galtier a Alvinerie 1996).

V posledních letech se často hovoří o rozširující se rezistenci motolic na běžně používaná anthelmintika, proto je z dlouhodobého hlediska používání těchto látek neudržitelné. Zvyšují se i obavy z chemických reziduí v potravinách a o vlivu takových sloučenin na životní prostředí (Dalton a Mulcahy 2001; Cooper et al. 2012). Není to tak dávno, co Evropská léková agentura stanovila i maximální limity rezduí pro triklabendazol (TCBZ) v mléce u skotu a ovcí. Předchozí limity byly nastaveny pouze pro svalovinu, tuk, játra a ledviny (EMA, 2012). Kvůli výše zmíněným důvodům se hledají nové cesty, jak šetrně a účinně parazity eradikovat. Do budoucna se jako velmi nadějně jeví vakcíny, které by tato kritéria splňovaly (Molina-Hernández et al. 2015). Vzhledem k výskytu parazitů rezistentních nejen na triklabendazol (TCBZ), ale dále také díky klimatickým změnám příznivým pro přežívání mezihostitele (*Galba*

truncatula) a pro rozvoj infekčních stádií parazita (metacerkárie), byly zaznamenány trvale vysoké hladiny prevalence jaterní motolice po celé Evropě (Piedrafita et al., 2010).

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Motolice jaterní (*Fasciola hepatica*)

Fasciola hepatica je kosmopolitním parazitem jater a žlučových cest četných druhů přežvýkavců i monogastričních savců, to znamená i u lidí (Volf a Horák 2007). Patří v Evropě mezi nejčastější původce parazitárních onemocnění u ovcí, vedle dalších jako jsou např. *Dictyocaulus viviparus*, *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* (Piedrafita et al. 2010).

Mladé motolice měří v době, kdy pronikají do jater, 1,0 – 2,0 mm. Když dozrávají ve žlučovodech, dosahují dospělé motolice velikosti 2,0 – 4,0 x 8,0 – 1,3 cm. Mají listovitý tvar a šedohnědou až šedozelenou barvu (Kotrlá et al. 1984; Taylor et al. 2005). Přední část těla je kónická a odlišná od zbytku těla, což je typickým znakem této motolice. Povrch (tegument) je pokryt vyčnívajícími trny a pod ním leží 3 vrstvy svaloviny (Kotrlá et al. 1984, Taylor et al. 2005) Na ventrální části těla je jasně zřetelná ústní a břišní přísavka. Vajíčka se vyznačují žlutohnědou barvou, jsou tenkostěnná a oválná s téměř totožnými póly. Velikostně se pohybují v rozmezí 130 – 145 x 65 – 90 µm a jsou dvakrát větší než např. vajíčka *Trichostrongyla*. Obsah je granulární a vyplňuje téměř celý prostor vajíčka (Taylor et al. 2005).

Trávicí trakt je velmi dobře vyvinut a slouží k aktivnímu příjmu a zpracování potravy, jako zdroj živin pro motolici *F. hepatica* je krev hostitele. Trávicí soustava začíná ústním otvorem, obklopeným ústní přísavkou, který je zároveň i otvorem vyvrhovacím. Následuje předhltan (prefarynx), svalnatý hltan (farynx), jícen (esofagus) a střevo, ze kterého vybíhají postranní slepé výběžky.

Motolice jaterní je hermafroditem, v jednom jedinci se proto nachází samčí i samičí pohlavní orgány (Volf a Horák 2007). Párová varlata (testes) samčích orgánů jsou uspořádána za sebou a jsou keříčkovitě větvená (Volf a Horák 2007). Z nich pak vybíhají vývody (spermidukty), ty se spojují a ústí do semenného váčku, který je napojen na kopulační orgán ze svaloviny. Samičí orgány představuje pouze jeden vaječník (ovarium). Z něho vybíhá vejcovod (ovidukt), který se rozšiřuje v ootyp

obklopený Mehlisovou žlázou (tzv. skořápečnou) a pokračuje dál v dělohu (uterus). Děloha je pak zakončena tzv. metratermem, který zároveň i slouží i pro kopulaci. Žloutkové vajíčky (vitelaria) jsou uloženy na ventrální i dorsální straně. (Volf a Horák 2007; Kotrlá et al. 1984).

3.1.1 Taxonomické zařazení

Kmen: *Platyhelminthes* (ploštěnci)

Třída: *Trematoda*

Podtřída: *Digenea*

Čeleď: *Fasciolidae* (Kotrlá et al. 1984; Bowman 2009)

3.1.2 Životní cyklus

Vývojový cyklus motolice jaterní je komplikovaný a zahrnuje dva hostitele (Volf a Horák 2007). Během vývoje vznikají pohlavní a nepohlavní generace (Bowman 2009). A dochází tedy ke střídání těchto generací a hostitelů (Volf a Horák 2007). Mezihostitelem této motolice je v evropských podmínkách převážně *Galba truncatula* (bahnatka malá), jejíž rozšíření je celosvětové. Mimo Evropu jsou významnými vektory i další obojživelní šneci rodu *Galba* (*Lymnea*):

L. tomentosa - Austrálie, Nový Zéland

L. collumella - Střední a Severní Amerika, Austrálie, Nový Zéland

L. bulimoides - Severní a Jižní Amerika, Karibik

L. humilis - Severní Amerika

L. viator - Jižní Amerika

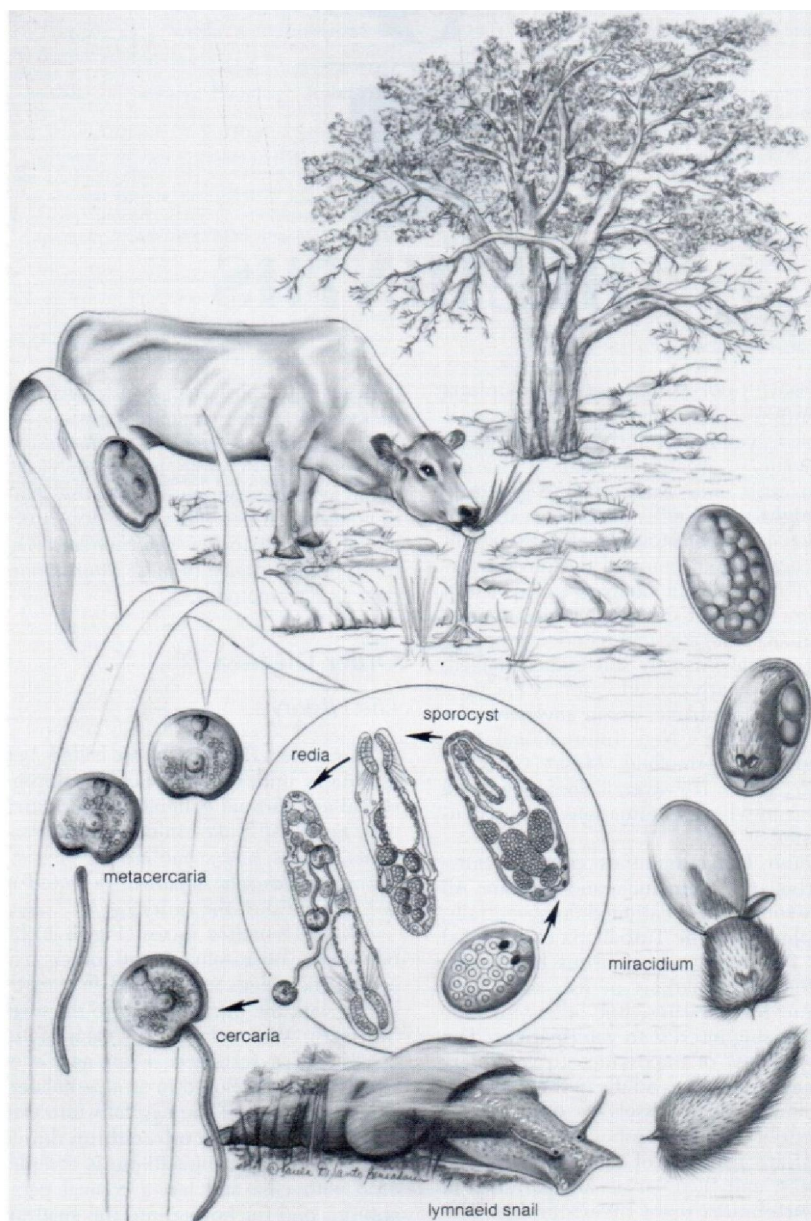
L. diaphena - Jižní Amerika

L. cubensis - Jižní Amerika

L. viridis - Čína, Papua Nová Guinea (Taylor et al. 2005)

Mezi definitivní hostitele pak patří ovce, skot, kozy, koně, jeleni, lidé a jiní savci (Taylor et al. 2005; Samuel et al. 2001; Volf a Horák 2007).

Obr. 1 Životní cyklus motolice jaterní



Převzato z: Bowman (1999)

Vajíčka motolice jaterní jsou v definitivním hostiteli odváděny zároveň s žlučí do lumen střeva, odkud se dostávají spolu s trusem do vnějšího prostředí (Bowman 2009, Kotrlá et al. 1984).

Ve vnějším prostředí se vyvíjí první larva (miracidium). Ta opouští obal poté, co

se otevře vaječné víčko (operculum). Hlavními faktory vnějšího prostředí limitujícími vývoj vajíček jsou obsah kyslíku a teplota. Mezi známé faktory indikující líhnutí miracidíí patří světlo, změny v osmotických parametrech prostředí a změna teploty. (Volf a Horák 2007). Velmi důležitá je ale právě vlhkost okolního prostředí, vývin miracidia pak trvá zhruba 2 – 4 týdny (Bowman 2009). Miracidium je mikroskopický organismus o velikosti zhruba 0,01 - 0,35 mm připomínající nálevníka. Na přední části má umístěný kónický sklerotizovaný úvar (tzv. „stylet“), který napomáhá průniku do meziphostitele (Bowman 2009; Volf a Horák 2007). Povrch larvy je hojně pokryt pásy ciliárních buněk umožňující aktivní pohyb. Oblasti bez cilií se nazývají mezibuněčné valy. Uvnitř těla miracidia se nachází shluk zárodečných buněk, ze kterých vznikají v plži nepohlavním rozmnožováním další generace. Tito jedinci pocházející z jednoho miracidia mají shodnou genetickou výbavu (jsou to klony).

Miracidium uvolňující se z vajíček má schopnost aktivně vyhledávat své meziphostitele. Nepřijímá potravu a využívá energetické zásoby, které během poměrně krátké doby vyčerpá (Volf a Horák 2007). Když tedy nenajde meziphostitele do 24 hodin, larva zahyne (Bowman 2009). K orientaci v okolním prostředí využívá různé receptory, díky kterým rozpoznává molekuly vylučované meziphostitelem (glykoproteiny). Reagují na světlo, miracidia *F. hepatica* mají dvě pigmentované světločivné skvrny, a směr gravitačního zrychlení. Vykazují tedy pozitivní chemotaxi, pozitivní nebo negativní fototaxi a geotaxi (Volf a Horák 2007).

Miracidium se přichytí na stěnu plže a penetruje jeho tělní stěnou pomocí sekretu apikální žlázy obsahujícího proteolytické enzymy. Během tohoto procesu odvrhuje již nepotřebné ciliární buňky. Buňky mezibuněčných valů expandují a membrány v místě styku sousedních buněk zanikají, vzniká povrchové syncitium (neodermis). Z miracidia se v daný moment stává primární sporocysta, která se usadí nejdříve v místě penetrace miracidia do meziphostitele, což většinou představuje oblast nohy, hlavy nebo pláště. Poté většinou migruje do dalších tkání a žláz, a to především do jater (Bowman 2009, Volf a Horák 2007).

Sporocysta obsahuje zárodečné buňky a má podobu oválného váčku. Živiny přijímá pouze pomocí povrchového tegumentu, který je v kontaktu s tkáněmi a tělními tekutinami meziphostitele. Další generace larev, které se vyvíjejí ze zárodečných buněk,

se nazývají redie.

Redie, na rozdíl od sporocyst, disponují trávicí soustavou s vakovitým střevem a aktivně se živí tkání plže, ale také vývojovými stádii jiných druhů motolic. Nicméně část živin mohou přijímat i povrchem těla. Pomocí výrůstku na povrchu jejich těla se mohou pohybovat, uvnitř těla se nachází embryonální prostor se zárodečnými buňkami, ze kterých vznikají další dceřiné redie (až několik generací). Pak dochází k produkci třetího typu larev - cercárií. Denně může vzniknout až několik tisíc cercárií, čímž je zajištěna disperze parazita v prostředí. Z každé této cercárie může teoreticky vzniknout jeden dospělý jedinec motolice *F. hepatica* (Volf a Horák 2007).

Tělo cercárie disponuje ocáskem a je základem budoucí dospělé motolice, nese již některé její charakteristické znaky. Cercárie mají vyvinutou trávicí soustavu a různé typy žláзовých buněk. Trávicí trakt však ještě není funkční, a tak zdroj energie představují zásoby glykogenu nasrádané během předchozího vývoje. Dále jsou u cercárií již patrné plaménkové buňky exkrecečního systému a také základy pohlavních orgánů. Zvláštní sekreční buňky (cystogenní žlásky) podél hltanu jsou čistě larválními strukturami, které vylučují cysty (metacerkariální obaly), díky kterým může konečné larvální stadium ve vnějším prostředí vyčkávat pasoucí se přežvýkavce (Bowman 2009; Volf a Horák 2007; Saumel et al. 2001).

Když se cercárie plně vyvine během jednoho či dvou letních měsíců, opouští aktivně tělo meziphostitele do vnějšího prostředí, kde přisedají k pevnému podkladu (např. vegetaci). Následuje odhození ocásku a pomocí cystogenních žlázek kolem sebe utvoří cystu odolnou vůči vlivům vnějšího prostředí. Vyvíjejí se tak do stádia, které se nazývá metacerkárie. Toto stadium se vyznačuje velkou odolností a je schopné přežít v prostředí po dlouhou dobu. Metacerkárie jsou pozřeny spolu s vegetací definitivním hostitelem. K excystaci dochází v tenkém střevě definitivního hostitele na základě působení více faktorů (kyseliny, oxid uhličitý, žluč, trávicí enzymy, změny pH a teploty, sekrety metacerkárií) (Bowman 2009; Volf a Horák 2007). Nezralé motolice jsou pak označovány pojmem marita (Bowman 2009).

V definitivním hostiteli mohou larvy dlouho cestovat v různých orgánech, než dosáhnou konečné lokalizace, a teprve potom pohlavně dospívají (Kotrlá et al. 1984). Několik týdnů migrují přímo v jaterním parenchymu a nakonec se usadí ve žlučovodech

(Volf a Horák 2007). Dospělci *F. hepatica* zde mohou vyprodukovat až 20000 vajíček denně (Kotrlá et al. 1984). Kompletní životní cyklus motolice *F. hepatica* zahrnuje tedy celkem 3 až 4 měsíce při příznivých podmínkách (Bowman 2009).

3.1.3 Epidemiologie

Taylor et al. (2005) ve své publikaci popisují faktory, které ovlivňují produkci vysokého počtu metacerkárií, která je nezbytná pro vypuknutí fasciolózy. Mezi hlavní faktory tedy patří níže zmíněné:

- 1) Dostupnost přirozených míst výskytu mezihostitele (bahnaty malé): *Galba truncatula* upřednostňuje zejména vlhké a bahnité prostředí před samotnou vodou. Nejčastější místa výskytu představují břehy příkopů a potoků, bažinaté oblasti a okraje malých rybníků. Po silných deštích a záplavách mohou jako dočasná stanoviště posloužit i stopy od kopyt a vyjeté koleje od kol, případně kaluže. Podezřelými oblastmi mohou být také pole s trsy rákosí. Optimální pH prostředí pro tohoto plže je slabě kyselé (7 – 8), příliš kyselé hladiny pH jsou ale škodlivé, ty můžeme najít na příklad v rašeliništích (Volf a Horák 2007; Taylor et al. 2005)
- 2) Teplota: Průměrná denní/noční teplota 10 °C a výše je potřebná pro rozmnožování plžů, veškeré jejich činnosti se zastavují při 5 °C. Tento rozsah je také limitující pro vývoj vajíček *Fasciola hepatica*. Nicméně pokud venkovní teploty stoupnou nad 15 °C a udržují se nad touto hranicí, následuje mnohonásobné zvýšení počtu plžů a larválních stádií motolic (Taylor et al. 2005).
- 3) Vlhkost: Ideální podmínky vlhkosti pro rozmnožování plžů a pro vývoj vajíček motolice *F. hepatica* uvnitř mezihostitele jsou dosaženy při deštích, kdy je okolní prostředí plně saturováno vodou. Tyto podmínky jsou rovněž důležité pro

vývoj vajíček motolice jaterní, dále pro miracidia aktivně vyhledávající plže a pro únik cercárií z plžů (Taylor et al. 2005, Bowman 2009).

V mírném podnebném pásmu tyto podmínky obvykle splňují pouze měsíce v rozmezí od května do října (Taylor et al. 2005, Kotrlá et al. 1984). K výraznému nárůstu počtu metacercárií je proto možné během dvou období. Za prvé během letních infekcí plžů, z nichž se uvolňují larvální stádia motolic na pastviny od srpna do října. Tyto infekce mezihostitelů vznikají z miracidia pocházející buď z vajíček, které byly vylučovány na přelomu jara a začátku léta infikovanými zvířaty, a nebo z vajíček, která přežila zimu. K vývoji uvnitř bahnatky dochází během léta a cercárie proniká tkáněmi plže do okolí právě od srpna do října. Alternativně může nastat případ, kdy larvální stádia motolice infikují mezihostitele na podzim a přečkají uvnitř zimní období. Následně vyvinuté metacercárie se proto objeví na pastvinách od května do června. Jak vajíčka, tak metacercárie mohou přežít zimu, což hraje důležitou roli v epidemiologii. Ztížené podmínky k přežití mají metacercárie při vysoké venkovní teplotě a v období sucha, kdy rychle ztrácejí svoji infekčnost, a to zejména při procesu silážování (nicméně mohou přežít i několik měsíců na seně) (Taylor et al. 2005).

Ve většině evropských zemí jsou významné především letní nákazy a nárůst metacercárií je zaznamenáván každoročně od srpna do října (Kotrlá et al. 1984; Taylor et al. 2005). Nárůst je pak nejvyšší v letech, kdy jsou letní srážky obzvláště vydatné. Zimní infekce plžů jsou méně významné, ale občas mohou vést k výskytu velkého počtu metacercárií během konce jara a počátkem léta, zejména pokud předchází měsíce byly deštivé. V teplejších oblastech, jako je například jih USA nebo Austrálie, má průběh životního cyklu odlišnou sezónnost, ale epidemiologické principy zůstávají stejné (Taylor et al. 2005).

Většina z výše uvedených poznámek k ekologii plovatky *G. truncatula* platí zároveň i pro ostatní druhy rodu *Lymnaea* / *Galba*, které přenášejí parazita *F. hepatica*. Diferenciace těchto druhů je úkolem pro odborníky a je obvykle založena na morfologických charakteristikách, ačkoli lze nyní využít i metody biochemické a imunologické.

Situace se nepatrně liší *L. tomentosa*, která je ačkoli kvalifikována jako

semiakvatický plž, tak je lépe přizpůsobena podvodnímu způsobu života v bažinatých oblastech nebo zavlažovacích kanálech, a proto nejdůležitější kontrolní biologický aspekt pro toho plže představuje teplota. Například ve východní Austrálii *L. tomentosa* produkuje vajíčka po celý rok, i když míra reprodukce je řízena v závislosti na teplotě (na nejnížší úrovni je v zimě). Nižší zimní teploty také způsobují oddálení líhnutí vajíček motolice *F. hepatica* a zpomaluje larvální vývoj uvnitř meziphostitele, tudíž velké množství metacerkárií se nejprve objeví koncem jara. Během léta a podzimu nastává druhá vlna metacerkariální produkce odvozena od nové generace plžů. Výhodou tohoto obojživelníka tedy je, že může zvýšit svůj rozsah pomocí plavání vodními proudy. Existují ale i důkazy, že prevalence fasciolózy je vyšší v teplejším klimatu po několika měsících sucha. Je to pravděpodobně způsobené tím, že se zvířata, jakožto definitivní hostitelé, shromažďují kolem oblasti vodních ploch a napajedel, kde se zvyšují i šance nakažených plžů na přežití (Taylor et al. 2005).

3.1.4 Patogenita

Fasciola hepatica se vyznačuje schopností přežít a šířit se i v extrémních nehostinných podmínkách (např. ve vysokých nadmořských výškách) (Mas-Coma et al. 2005).

Přestože fasciolóza je relativně dobře prostudována, je jen málo známo o interakcích mezi motolicí *F. hepatica* a jejími savčími hostiteli na molekulární úrovni. Tyto poznatky jsou obzvlášť důležité vzhledem k velmi odlišné odpovědi ovcí oproti skotu na toto onemocnění. Akutní fáze tohoto onemocnění je typická u ovcí, zatímco chronická fasciolóza je běžnější spíše u skotu (Alvarez Rojas et al. 2015).

Závažnost fasciolózy je do značné míry ovlivněna infekční dávkou (tedy počtem metacerkárií, kterou hostitel přijal), dále stádiem vývoje parazita, věkem a stavem imunitního systému hostitele (Behm a Sangster 1999; Taylor et al. 2005). Je prokázáno, že ovce jsou velice citlivé na infekci způsobenou motolicí *F. hepatica*, a to i když je infekční tlak velmi nízký (Chauvin et al. 2001).

Patogenita je v podstatě dvojího typu. První fáze se vyznačuje migrací motolic v jaterním parenchymu, to je spojeno s poškozením jater a krvácením. Druhá fáze se popisuje výskytem parazita ve žlučovodech, poškozením žlučovodů způsobené kutikulárními trny motolic a schopností dospělců rozkládat hemoglobin hostitele (Taylor et al. 2005).

Fasciolózu můžeme rozdělit na akutní, subakutní a chronickou. Akutní infekce je méně častá a probíhá 1 – 6 týdnů (Taylor et al. 2005; Dow et al. 1968) po pozření velkého počtu metacerkárií, obvykle přes 2000, a vede k těžkému poškození jaterního parenchymu a masivnímu krvácení, které je způsobeno migrací nezralých motolic v játrech a rupturou cév (Taylor et al. 2005). V průběhu prvních dvou týdnů po infekci jsou játra ovčí pokrytá vláknitými značkami na svém povrchu a krvácivými stopami v parenchymu, a to zejména v levém laloku. Kolem čtvrtého až pátého týdne po infekci migrační stopy zežloutnou a je přítomno krvácení. U některých laloků může být pozorována tkáňová atrofie, fibrinový povlak a také sklerotické zjizvení, což naznačuje hojení ran (Behm a Sangster 1999). Vypuknutí akutní fasciolózy může být ještě komplikováno souběžnou infekcí *Clostridium novyi*, která způsobuje nekrózu jaterní tkáně. Dnes je toto ale méně běžné, protože je využívána vakcinace proti klostridiálním nákazám (Taylor et al. 2005; Bowman 2009; Kotrlá et al. 1984).

V subakutní infekci jsou metacerkárie hostitelem přijímány po delší dobu, zatímco některé dospějí a proniknou do žlučovodu, kde způsobují zánět. Ostatní motolice stále migrují v játrech, kde poškozují parenchym, ale ne tak závažně jako při akutní infekci. Játra jsou zvětšena a na povrchu i uvnitř jsou viditelné četné nekrotické a hemoragické plochy. Krvácení je ve tkáni viditelné, ale k úplné ruptuře dochází zřídka. Tento druh infekce probíhá 6 až 10 týdnů po pozření 500 – 1500 ks metacerkárií a většinou se vyskytuje na podzim a v zimním období. Projevuje se těžkou anémií a hypoalbuminemií. Pokud je neléčena, může vést i k úhynu zvířete. Nevede ale tak rychle k úhynu jako u akutní infekce, ovce mohou vykazovat klinické příznaky nemoci 1 až dva týdny, pak nastává smrt. Příznakem je úbytek na váze, snížená chuť k jídlu, výrazná bledost sliznic, zvětšená a hmatatelná játra. Může se vyskytnout i podčelistní otok (známý jako „bottle jaw“) a ascites (hromadění tekutiny v dutině břišní) (Taylor et

al. 2005; Kotrlá et al. 1984).

Chronická fasciolóza se většinou vyskytuje na přelomu zimy a jara a je nejběžnějším typem nemoci u ovcí. Probíhá 4 – 5 měsíců po pozření mírného počtu metacerkárií (200 – 500). Hlavním patologickým projevem je anémie a hypoalbuminémie. Zvíře může ztratit více než 0,5 ml krve na jednu motolici ve žlučovodu každý den. Dochází k úniku plazmatických proteinů skrz poničenou stěnu žlučovodu (Taylor et al. 2005). Po zrání ve žlučovodu zde dospělci mohou přetrvávat i několik let, což způsobuje fibrózu a sklerózu tkáně (opět výraznější u skotu než u ovcí). Stav infikovaného zvířete je charakterizován nechutenstvím, ztrátou produktivity a celkovým neprospíváním (Behm a Sangster 1999), anémií (Galtier a Alvinerie 1996; Roberts 1986), pak také hypoalbuminemií, hypoglykemií (Dargie a Berry 1979) a eozinofilií (Chauvin et al. 2001). Dále fyziologické změny u nakažených zvířat zahrnují hypoglykémii (Phiri et al. 2007), lipidemii (Kozat a Denizhan 2010), snížení hladiny kyseliny askorbové v plasmě (Gameel 1982), zhoršení rozkladu testosteronu v játrech (Fleming a Fetterer 1986), zvýšení hladiny železa a železo-vazebné kapacity (Gameel 1982) a proměnlivý efekt na koagulaci (Joachim et al. 2003). Nicméně konkrétní molekulární mechanismy těchto změn nejsou zatím detailně prozkoumány.

Buněčné změny v infikovaných játrech jsou spojeny s narušením mitochondriálního elektronového řetězce, podstatnou ztrátou aktivity cytochromu P450 a obsahu glykogenu v levém jaterním laloku (Behm a Sangster 1999).

Cirkulující protilátky proti *F. hepatica* jsou u ovcí snadno zjištělné. V přirozených podmínkách není zatím žádný důkaz, že by byly ovce imunní vůči reinfekci *F. hepatica* a pokud se taková infekce neléčí, tak motolice přežívají uvnitř těla hostitele až do jeho smrti. Takže závažná propuknutí fasciolózy často postihují dospělé ovce, které již byly předtím vystaveny infekci. Naproti tomu, když infekce propukne u mladého skotu, obvykle se postupně vyvíjí získaná imunita. Ta pak omezuje rozvoj primární infekce, zpomaluje nástup sekundární infekce a nakonec snižuje počty motolic v definitivním hostiteli. V endemických oblastech se často objevují případy dospělého skotu, který nevykazuje klinické příznaky této nákazy, zatímco u dospělých ovcí může

docházet kvůli fasciolóze k těžkým ztrátám (Taylor et al. 2005). Tento trend potvrzují i experimentální studie provedené u ovcí, které ukázaly, že lehké často se opakující infekce, podobné těm přirozeným, způsobují vážnější jaterní léze daleko více než nákaza vyvolaná jednou infekční dávkou stejného celkového počtu metacerkárií. Tato zjištění mohou naznačovat, že hlavní roli v patologii fasciolózi představuje jednak mechanická destrukce tkáně způsobená pronikáním parazita, ale zároveň i imunitní odpověď a následné hojení (Perez et al., 2002).

Na konec je třeba připomenout, že *F. hepatica* může infikovat celou řadu savců, včetně koní, oslů, jelenů, prasat a králíků (Taylor et al. 2005; Samuel et al. 2001), zubrů (Virtová 2013; Samuel et al. 2001) a je možné, že tyto případy, hostitelé mohou působit jako rezervoáry infekce. Lidé se mohou nakazit také, a to zejména z konzumace řechy (potočnice lékařské) z infikovaných oblastí. (Taylor et al. 2005; Bowman 2009).

3.2 Metody využívané k diagnostice fasciolózy

Diagnóza fasciolózy probíhá v první řadě na základě klinických příznaků hostitele, lze vycházet i z ročního období a stavu počasí v závislosti na životním cyklu parazita, dalším předpokladem je předchozí výskyt fasciolózy v dané oblasti, pokud je identifikováno přirozené místo výskytu mezihostitele (Taylor et al. 2005). Během nákazy dochází v těle definitivního hostitele k řadě změn, které lze sledovat a tím pádem je možné parazita identifikovat. Infekce je nejčastěji detekována postmortem, tedy při pitvě (Samuel et al. 2001, Taylor et al. 2005). Běžně jsou využívána i hematologická a koprologická šetření za života hostitele a ta mohou být doplněna dalšími přesnějšími metodami (Taylor et al. 2005). Přítomnost parazita se na příklad odráží na váhovém přírůstku, krevním obrazu hostitele, ale také na biochemických parametrech, které poukazují na (akutní i chronické) poškození jaterní tkáně a dále dochází i k tvorbě specifických protilátek, které lze detekovat a kvantifikovat (Taylor et al. 2005, Samuel et al. 2001; Chauvin et al. 1995; Raadsma et al. 2007; Presidente et al. 1975; Novobilský et al. 2007b). V následujícím popisu bych se chtěla blíže věnovat metodám, které představovaly hlavní náplň mé práce.

3.2.1 Hematologické metody

Během nákazy parazitem může v těle hostitele docházet ke změně složení krve, nejčastěji se tyto změny odráží v hladině erytrocytů a jednotlivých typů leukocytů. U infekcí vyvolanými hematofágními parazity může dojít ke snížení množství erytrocytů, které může vyústit až v akutní či chronickou anémii. Často sledovaným parametrem je také zvýšená hladina leukocytů (konkrétně eozinofilů), tento jev je pak označován jako eozinofilie. Vzhledem k dostupnosti a finanční nenáročnosti jsou pak nejvíce využívány metody odečtu hematokritu a stanovení počtu leukocytů (Taylor et al. 2005; Raadsma et al. 2007; Chauvin et al. 1995; Vengust et al. 2003; Weiss a Wardrop 2010).

Principem určování diferenciálního počtu leukocytů je zhotovení krevního nátěru, jeho fixace, panoptické obarvení a následně jeho vyhodnocení za pomoci mikroskopu. Stanovuje se tak zastoupení jednotlivých typů leukocytů (Pecka 2006). Nejprve je nutné vyhotovit nátěry dle metodického postupu, které se většinou fixují metanolem. K barvení sklíček je používáno diferenciální barvení podle Pappenheima (též je možné se setkat s termínem Wright-Giemsa). Giemsovo barvivo obsahuje směs několika barviv (methylenovou modř, eozin a azur-B), které barví bazofilní struktury v odstínech fialové, červené a růžové, acidofilní struktury barví modře. Obarvené a osušené nátěry se hodnotí mikroskopicky meandrovitým pohybem pod imerzním objektivem při zvětšení 1000x v okrajové tenké části nátěru s rovnoměrným rozložením buněk. Zhodnotí se 100 buněk leukocytární řady a to jak početně, tak i jejich morfologie – tzn. granulace, zabarvení cytoplazmy, charakter jádra, inkluze, vakuolizace, fragmenty buněk, holá jádra, jaderné stíny atd. Výhodou metody je finanční dostupnost i možnost opakovaného šetření dle potřeby (Pecka et al. 2010; Matýšková et al. 2013). V rámci diagnostiky krevního obrazu u ovcí rozlišujeme tyto typy krevních buněk:

- **Lymfocyty** ovcí jsou malé až střední velikosti (7 – 15 μm), řadí se mezi agranulocyty, tudíž v cytoplasmě nemají obsažena granula. Tyto krevní elementy hrají důležitou roli při vytváření specifické imunitní odpovědi. Jehňata se rodí s větším poměrem granulocytů, avšak během 3 měsíců již počet lymfocytů již představuje 70 – 80 % celkového počtu bílých krvinek (WBC). V průběhu let může počet lehce kolísat.

Jádro lymfocytu je velké a může vyplňovat téměř celý prostor buňky (Hořejší a Bartůňková 2005; Weiss a Wardrop 2010).

- **Neutrofil** mají zrnitou strukturu a velikostně se pohybují v rozmezí 10 – 15 μm . Tyto buňky obsahují granula (primární, sekundární a terciární), patří tedy mezi granulocyty. Členité jádro i granula jsou po obarvení fialové. Neutrofilové mají schopnost fagocytózy a obsahují i řadu enzymů. Zvláštností je, že enzym lysozym, který je běžný u většiny živočišných druhů, však cytoplasmě ovčích neutrofilů chybí (Hořejší a Bartůňková 2005; Weiss a Wardrop 2010).

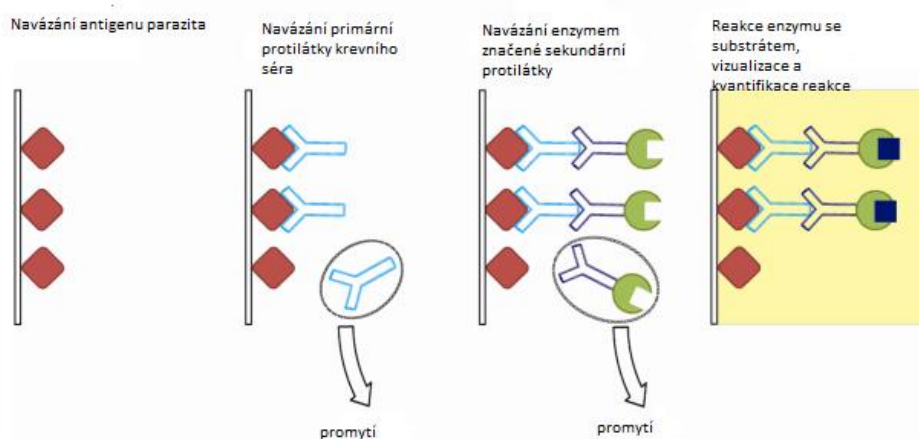
- **Monocyty** jsou největší bílé krvinky (velikost 13 – 19 μm). Mají kulovitý tvar, ale ten může být často i nepravidelný. Pokud je na tyto buňky použito Wright-Giemsovo barvivo, mohou být v šedě zbarvené cytoplasmě viditelná granula a velké jádro. Monocyt představuje jakýsi prekurzor makrofágů a má důležitou schopnost prezentovat na svém povrchu antigen (Hořejší a Bartůňková 2005; Weiss a Wardrop 2010).

- **Eozinofily** (12 – 16 μm) – charakteristickým znakem eozinofilů po obarvení Giemsou jsou jasně červená, kulatá granula. V cytoplasmě ovčích eozinofilů lze nalézt také jedinečné, husté krystalické struktury. (Hořejší a Bartůňková 2005; Weiss a Wardrop 2010). Imunologická odpověď hostitele na probíhající parazitózy je charakterizovaná eozinofilií (Chauvin et al. 2001; Raadsma et al. 2007; Chauvin 1996; Weiss a Wardrop 2010). Dochází tak ke zvýšení hladiny eozinofilů nad běžnou hranici, která se u nenakažených ovcí pohybuje od 0- 10 % WBC (Weiss a Wardrop 2010). Zvýšení počtu eozinofilů může být dokonce až několikanásobné (Matanovic et al. 2007; Raadsma 1996).

3.2.2 Imunologické metody

ELISA (z anglické zkratky Enzyme - Linked Immuno Sorbent Assay) je imunoanalytická metoda v praxi hojně využívaná k detekci a kvantitativnímu stanovení primárních protilátek proti antigenům parazitů z krevního séra hostitele. Tato metoda má obecně více variant provedení (např. přímá, nepřímá, sendvičová), ale všechny mají společný základní princip a to ten, že se antigen nebo protilátka zakotví na nerozpustný nosič (nejčastěji povrch mikrotitrační destičky) a dochází ke specifické interakci antigenu a protilátky. To vše probíhá prostřednictvím inkubace a oddělování vázaných a volných reakčních složek za použití promývacích roztoků. Na jedno z reakčních činidel je kovalentně navázán enzym (peroxidáza či alkalická fosfatáza), který katalyzuje přeměnu substrátu (chromogenní substrát). Na základě této enzymatické reakce dochází k barevné změně, která tak umožní kvantifikovat míru reakce. Nejčastější stanovení pak probíhá spektrofotometricky nebo fluorometricky. Nespornou výhodou této metody je citlivost, rychlost a přesnost (Crowther 2001).

Obr. 2 Základní schéma metody (nepřímá ELISA) pro detekci protilátek na antigen parazita v krevním séru hostitele



Převzato z: www.rockland-inc.com/elisa.aspx, upraveno

Protilátky proti motolici jaterní mohou být v séru detekovány 2 – 4 týdny po infekci a jejich hladina může v průběhu kolísat. Pozitivní výsledky nemusí poukazovat pouze na právě probíhající infekci, ale také na expozici parazitem již v minulosti (Taylor et al. 2005). Ve zveřejněných pracích, které studují průběh infekce *F. hepatica* v hostitelově organismu, se nejčastěji sledují a měří protilátky typu IgG (Ruiz et al. 2003; Raadsma et al. 2007). Pro detekci protilátek proti *F. hepatica* ze séra nakaženého hostitele jsou ve studiích často využívány ES (exkrečně - sekreční) produkty (Bossart et al. 2000; Chauvin et al. 2001; Novobilský et al. 2007) nebo také extrakty z motolic (Raadsma et al. 2007). Použití zmiňovaných ES produktů může přinést až 100% specifitu a senzitivitu (El Ridi et al. 2007). Nicméně vyskytl se i případ, kdy byla zaznamenána zkřížená reakce, jelikož ES produkty nejsou druhově specifické. Jednotlivé druhy motolic produkují podobné antigeny, proto je od sebe za použití tohoto směsného antigenu nelze spolehlivě rozlišit (Novobilský et al. 2007). Trendem v diagnostice fasciolózi je proto zaměřit se na co nejspecifičtější (imunodominantní) markery infekce, mezi tyto antigeny jsou řazeny rekombinantní proteiny (konkrétně např. katepsin L) (Carnevale et al. 2001; Cornelissen et al. 2001; Ruiz et al. 2003). Ve všech těchto případech použití syntetických proteinů jakožto antigenů byla zjištěna nejen vysoká citlivost, ale i vysoká specifita reakce.

4. CÍLE PRÁCE

Dílčími cíli rigorózní práce byly:

- 1) Vypracovat literární rešerži o fasciolóze ovcí a stanovit základní parametry jejího hodnocení
- 2) Sledovat průběh experimentální nákazy odpovídajícími metodami a podrobně tak mapovat parazitologické, biochemické a patofyziologické změny v organismu hostitele (odezvu na infekci)
- 3) Kultivovat a předat dospělé motolice *F. hepatica* pro následná biochemická vyšetření

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Sledovaná zvířata, lokalita jejich chovu

K experimentální nákaze byli využiti tři beránci ovce domácí (*Ovis aries*) plemeno Texel s daty narození 1. 3. 2014, 14. 3. 2014, 7. 5. 2014, kteří byli dovezeni do farmy v Hořiněvsi 3. 10. 2014. Dne 20. 2. 2015 byli do farmy umístěni další dva beránci. Před samotným experimentem prošla zvířata 23. února 2015 vyšetřením na parazitostatus. Vyšetření na ploché červy bylo bez nálezu, mikroskopické šetření na oblé červy prokázalo výskyt parazita rodu *Trichuris*. Beránci proto byli odčerveni, 3. března byl podán monepantel v dávce 9,0 ml/zvíře.

5.2 Vlastní experiment

Dne 23. 3. 2015 byly třem beranům podány metacerkárie *F. hepatica*, každému zvířeti 200 ks. Ostatní dva berani byli pro projekt ponecháni jako negativní kontroly, studie probíhala po celou dobu zaslepeně. Sledování zvířat probíhalo 17 týdnů včetně 2 týdnů předcházejících infekci. Byly odebírány vzorky individuálního trusu s frekvencí 1x týdně, každý vzorek byl uložen zvlášť do igelitových rukavic, celý soubor byl pak označen datem sběru a každý vzorek číslem zvířete. Materiál byl do doby vyšetření uložen v mrazáku při teplotě -18 °C na Farmaceutické fakultě v HK. Současně se vzorky trusu byla zvířatům odebírána krev na získání séra, ale také krev na stanovení hematokritu a na zhotovení krevních nátěrů na podložní sklíčka. U všech beránek byl sledován i váhový přírůstek, na který by měla mít infekce negativní vliv. Na konci experimentu byla zvířata vyražena a z jater byly izolovány dospělé motolice *F. hepatica*, ty byly předány Katedře biochemických věd FAF HK.

5.3 Metodika koprologického šetření

Individuální vzorky trusu ovcí byly sbírány s frekvencí 1x týdně a to od 12. 3. 2015 do 7. 7. 2015, tzn. 17 týdnů včetně 2 týdnů předcházející infekci. Vzorky byly označeny termínem a zároveň i číslem berana (311 = beran č. 1, 319 = beran č. 2, 334 = beran č. 3, 344 = beran č. 4, 355 = beran č. 5). Byly uchovávány označené v plastových sáčcích na Katedře farmakologie a toxikologie v Hradci Králové k následnému vyšetření. Byla zvolena kvantitativní ovoskopická metoda (sedimentační). Za pomocí této metody bylo možné vajíčka motolic identifikovat a také stanovit hodnotu EPG (počet vajíček na 1g trusu vyšetřovaného materiálu).

5.3.1 Použité přístroje, chemikálie a suroviny

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

5.3.2 Modifikovaná sedimentační metoda (kvantitativní ovoskopická metoda)

Pomocí cca 15 ml vody bylo rozmělněno v třetí misce 2,0 g trusu do kašovité

konzistence. Obsah třetí misky byl přenesen do skleněné misky přes kovové sítko a miska byla ještě 2x opláchnuta vodou z první kádinky. Sítko se zachyceným materiálem se louhovalo přibližně 20 s v misce s vodou. Vzniklá suspenze se přelila do první kádinky a se sítkem a zbytky materiálu byl celý proces louhování zopakován v druhé misce. Obsah misky byl pak přenesen do druhé kádinky, obě suspenze v kádinkách se nechaly 5 minut stát. Vodní vývěvou byla odstraněna vrchní vrstva roztoku z obou kádinek a zbylý obsah z druhé kádinky se přelil do první kádinky. Následovala opět sedimentace po dobu 5 minut a odstranění vrchní části obsahu kádinky vývěvou. Tento proces byl několikrát zopakován, dokud nebyl vodní sloupec na sedimentem čirý. Poté byl objem zredukován na cca 20 ml a kádinka byla položena na magnetickou míchačku za účelem rovnoměrného rozmísení suspenze (otáčky byly nastaveny v rozmezí 400 – 500/min). Automatickou pipetou se zkrácenou špičkou byly zhruba v poloviční hloubce suspenze odebrány 3 vzorky, každý o objemu 167 μ l, a nanесeny na podložní sklíčko, kde byly pozorovány pod mikroskopem při zvětšení 40x. Pomocí skleněného odměrného válce byl změřen přesný objem zbylé suspenze (Anonym 1989).

Z každého vzorku trusu byly připraveny 3 podložní sklíčka. Počet vajíček byl stanoven průměrem všech tří nalezených hodnot a z celkového objemu vyšetřené suspenze. Z tohoto vypočítaného množství byla stanovena i hodnota EPG.

5.4 Metodika hematologického šetření

Krevní roztěry byly prováděny ve stejných časových intervalech jako u předchozích šetření, označování vzorků bylo totožné. Nátěry byly zhotoveny ihned po odběru periferní krve, barvení probíhalo na Katedře parazitologie v Praze. K diagnostice byla použita metoda stanovování diferenciálního počtu leukocytů.

5.4.1 Použité přístroje, chemikálie a suroviny:

- Roztěry krve na podložních sklíčkách zafixované methanolem (v dubletech)
- Giemsa (Fluka)

- Voda (neupravovaná z vodovodu)
- Světelný mikroskop s imerzním objektivem se zvětšením 10x100 (Meopta 60962)
- Imerzní olej (Nikon)

5.4.2 Metoda vyšetřování krevního obrazu

Metoda, při které byl stanovován diferenciální počet leukocytů, byla založena na manuální identifikaci krevních buněk pomocí světelného mikroskopu. Krevní nátěry byly provedeny ihned po odběru krve (v dubletech od každého vzorku) a po zaschnutí byly zafixovány metanolem. K barvení sklíček bylo použito komerční barvivo Giemsa naředěné s vodou v poměru 1:9, proces barvení trval u všech roztěrů 40 minut. Poté byla sklíčka s roztěry opláchnuta pod tekoucí vodou a po oschnutí pozorována pod imerzním objektivem mikroskopu při zvětšení 1000×. Určení jednotlivých typů leukocytů proběhlo na základě jejich odlišné morfologie a barvitelnosti, čímž bylo zjištěno jejich výsledné procentuální zastoupení. Ve vzorcích bylo vyhledáno 100 leukocytů a bylo zároveň i pozorováno zastoupení jednotlivých typů leukocytů podle morfologie a barvitelnosti, pak bylo vypočteno jejich procentuální zastoupení (Pecka 2006).

5.5 Metodika imunodiagnostického šetření

Vzorky sér ovcí byly odebírány s frekvencí přibližně 1x týdně a to 2 týdny před infekcí, až do ukončení studie. Vzorky byly označeny termínem a zároveň i číslem berana (311 = beran č. 1, 319 = beran č. 2, 334 = beran č. 3, 344 = beran č. 4, 355 = beran č. 5). Séra byla spolu s E/S produkty dospělých motolic *F. hepatica* převezena v hluboce zmrazeném stavu na Katedru parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, byla uchovávána v -76°C a zde byla vyšetřena nepřímou metodou ELISA.

5.5.1 Příprava exkrečně – sekrečních produktů

E/S produkty byly získány přímo z motolic izolovaných z jater nakažených ovcí a byly izolovány na Katedře biochemických věd UK v HK. Roztok s E/S produkty byl zcentrifugován (2x20 min, 4500xg, 4°C) a zkoncentrován přes 3 kDa filtr (Amicon Ultra). Přesná koncentrace proteinů E/S produktů byla změřena za pomoci komerčního kitu Quanti-IT™ Protein Assay Kit a spektrofotometru Infinite M200 na černé 96-jamkové mikrotitrační destičce. Výsledná koncentrace pak byla odečtena při excitaci/emisi – 470/570 nm dle kalibrační křivky, která byla získána změřením proteinových standardů z komerčního kitu (0 – 5 µg/µl) s využitím programu Magellan na PC. Tyto exkrečně-sekreční produkty o koncentraci 0,6 µg/µl byly následně použity jako antigen.

5.5.2 Použité přístroje, chemikálie a suroviny

- Individuální vzorky ovčích sér (= primární protilátky)
- ES produkty získané z motolic z nakažených ovcí o koncentraci 0,6 µg/µl (=antigen)
- Komerční sekundární protilátky (donkey anti-sheep IgG 1:5000 – Peroxidase antibody produced in donkey, Sigma)
- Mikrotitrační destička 96-jamková (Nunc, MaxiSorb)
- Multikanálová pipeta manuální a digitální, pipety s variabilním objemem
- Plastové mikrocentrifugační zkumavky s víčkem o objemu 0,5ml a 1 ml
- Laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce)
- Třepačka a vortex mixer
- pH-metr
- Stopky
- ELISA reader
- Vlhká komůrka
- PBS (0,1 M) a 0,05% Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan-monolaurat, BIO-RAD)
- Sušené mléko (Blotting Grade Blocker Non-fat dry milk, BIO-RAD)

- 1M HCl (=zastavovací roztok)
- TMB-substrát
- Na₂CO₃, NaHCO₃
- Destilovaná voda

5.5.3 Metoda ELISA

Do uhličitanového pufru o pH 9,6 (hodnota pH předem ověřena na pH-metru) byl přidán antigen (E/S produkty motolic) o koncentraci 0,5 µg/jamka. Pomocí multikanálové pipety bylo přeneseno 100 µl do každé jamky mikrotitrační destičky. Vzhledem k počtu vzorků sér byly použity 2 destičky. Takto připravený antigen se nechal inkubovat ve vlhké komůrce přes noc při 4°C. Následující den se nenavázaný antigen 3x promyl roztokem 0,1M PBS (pH 7,2) + 0,05% Tween (PBS-T) v objemu 120 µl na jamku. Připravený roztok 5% mléka v PBS-T byl nanesen po 100 µl a destičky se nechaly blokovat po dobu 1,5 hodiny na míchačce při pokojové teplotě, aby se zamezilo tvorbě nespecifických vazeb. Po vylití obsahu destiček byla nanesena primární protilátka (testovaná ovčí séra) a PBS-T. V důsledku předchozí optimalizace metody bylo zvoleno ředění 1:200. Následovala inkubace při pokojové teplotě po dobu 3 hodin a poté opět promytí v PBS-T (3x). Do jamek byla přenesena sekundární protilátka (donkey anti-sheep IgG) v ředění 1:5000, ředění zvoleno opět na základě předchozí optimalizace metody. Sekundární protilátka byla inkubována 1 hodinu při pokojové teplotě. Po uplynutí doby bylo provedeno promytí destiček celkem 3x v PBS-T, pak byl přidán substrát TMB Sigma (100 µl na jamku) ustálený na pokojovou teplotu, který na jamky reagoval 2 minuty. Reakce byla zastavena přidáním 100 µl 1M HCl a pomocí spektrofotometru byla změřena optická denzita (OD) při 450 nm. Ke zpracování výsledků byl použit program Magellan.

Jelikož byly měřené vzorky vždy nanášeny v dubletech, byly výsledné hodnoty do grafů průměrovány. V grafu byla zaznamenána i hodnota kontroly, která by odhalila případné nespecifické vazby protilátek bez přítomnosti antigenu.

6. VÝSLEDKY

Výsledky jednotlivých vyšetření spolu s tabulkami a grafy jsou uvedeny v následující kapitole.

6.1 Výsledky koprologického šetření

U individuálních vzorků trusu byla použita sedimentační metoda pro zachycení vajíček motolice *F. hepatica* v průběhu experimentu. Z tabulky č. 1 je patrné, že první nález vajíček v trusu byl zaznamenán u berana č. 1 dne 1. 6. 2015, tedy 10 týdnů po infekci (experimentální nákaza byla provedena 23. 3. 2015). U ostatních nakažených zvířat (č. 3 a 4) byl zaznamenán výskyt vajíček o týden později 8. 6. 2015, 11 týdnů po infekci. U kontrolních beranů č. 2 a 5 byly nálezy kompletně negativní po celou dobu studie.

Tab. 1 Hodnoty EPG nálezů motolice *F. hepatica* u jednotlivých zvířat v průběhu experimentální nákazy

datum	označení zvířete				
	Beran č. 1	Beran č. 2	Beran č. 3	Beran č. 4	Beran č. 5
12.3.	0	0	0	0	0
23.3.	0	0	0	0	0
30.3.	0	0	0	0	0
7.4.	0	0	0	0	0
13.4.	0	0	0	0	0
20.4.	0	0	0	0	0
27.4.	0	0	0	0	0
4.5.	0	0	0	0	0
11.5.	0	0	0	0	0
18.5.	0	0	0	0	0
25.5.	0	0	0	0	0
1.6.	157	0	0	0	0
8.6.	236	0	45	82	0
15.6.	407	0	215	539	0
22.6.	611	0	168	375	0
29.6.	515	0	253	246	0
7.7.	269	0	235	204	0

Vysvětlivky: EPG = počet vajíček/1g trusu

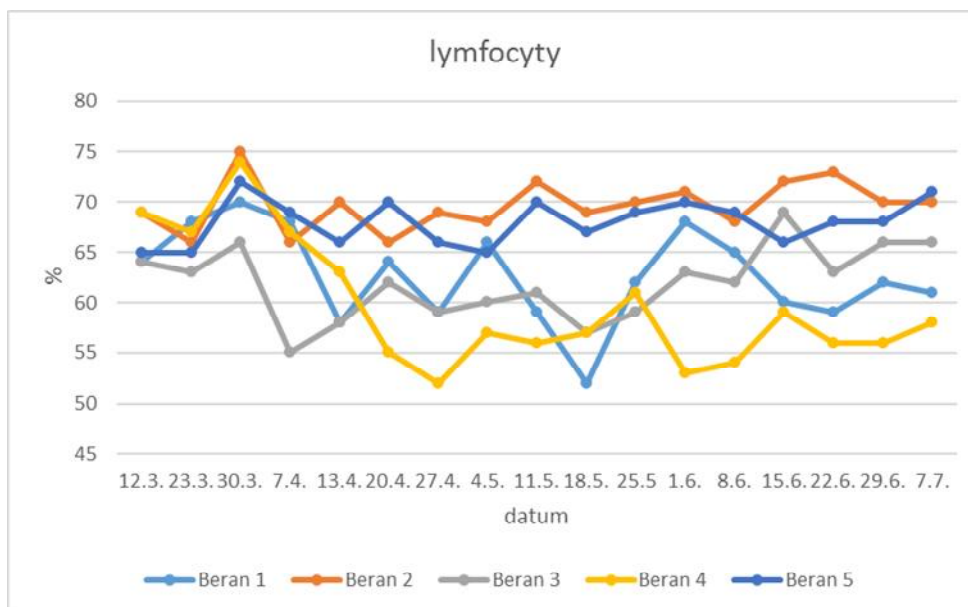
6.2 Výsledky hematologických šetření

6.2.1 Stanovení diferenciálního počtu leukocytů

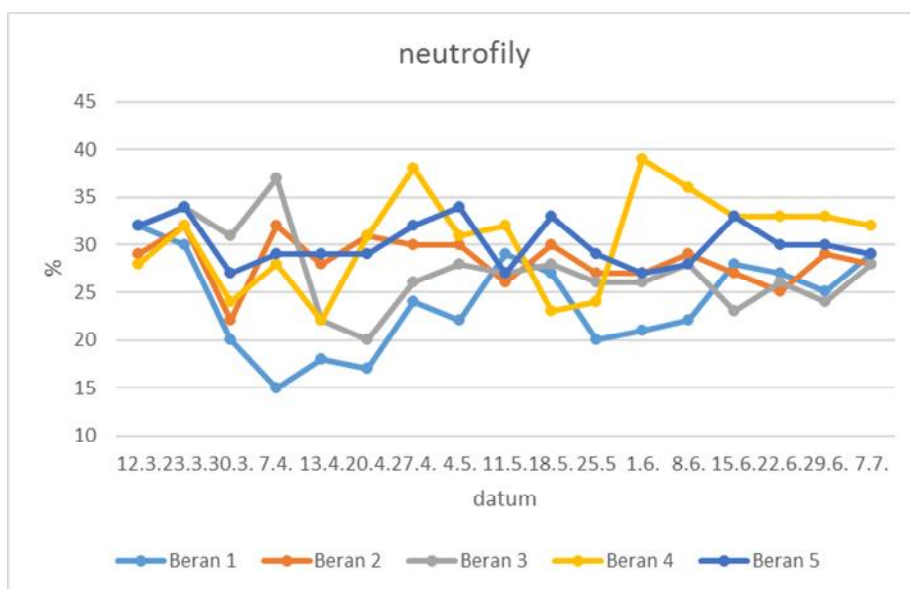
Pomocí mikroskopické diagnostiky byly určeny jednotlivé typy bílých krvinek a jejich diferenciální počet. Jednoznačně byly určeny následující typy leukocytů:

lymfocyty, neutrofilů, monocytů a eozinofilů. Počty monocytů se v průběhu studie téměř nelišily a pohybovaly se stále ve fyziologické hladině. U počtu neutrofilů hladiny kolísaly, avšak udržovaly se také ve fyziologických mezích a nebyl rozdíl v tomto počtu mezi nakaženými a kontrolními zvířaty. Počet lymfocytů byl první týden po infekci zvýšen u všech beranů, od druhého týdne po nákaze do konce studie vykazovaly krevní roztěry nižší hladinu u infikované skupiny oproti skupině kontrolní. Úbytek počtu lymfocytů byl způsoben nárůstem počtu eozinofilů od 7. 4. u infikovaných ovcí, tedy právě 2 týdny po infekci. Hladina eozinofilů byla nejdůležitějším a hlavním sledovaným parametrem při vyšetřování krevních roztěrů. Detailní výsledky jsou uvedeny v následujících grafech.

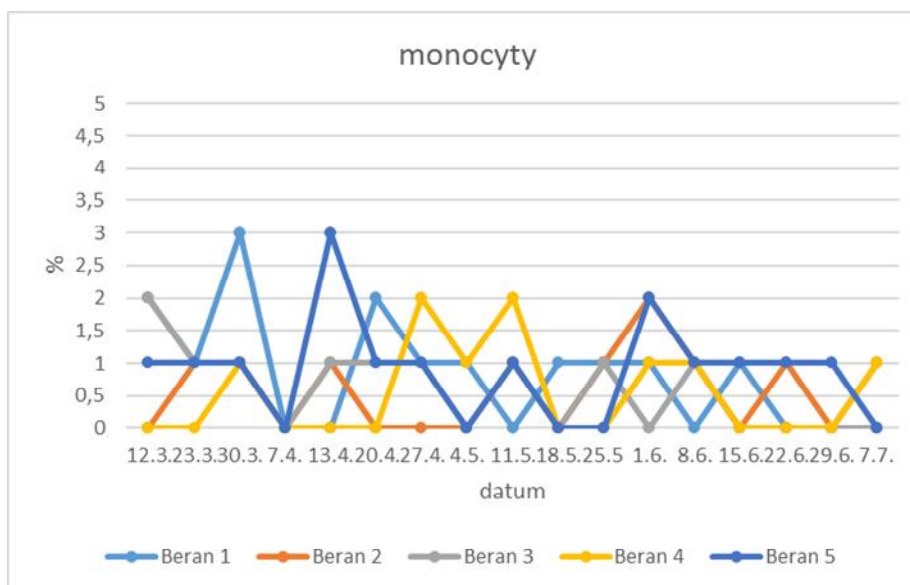
Graf 1 Vývoj procentuálního zastoupení lymfocytů během experimentu



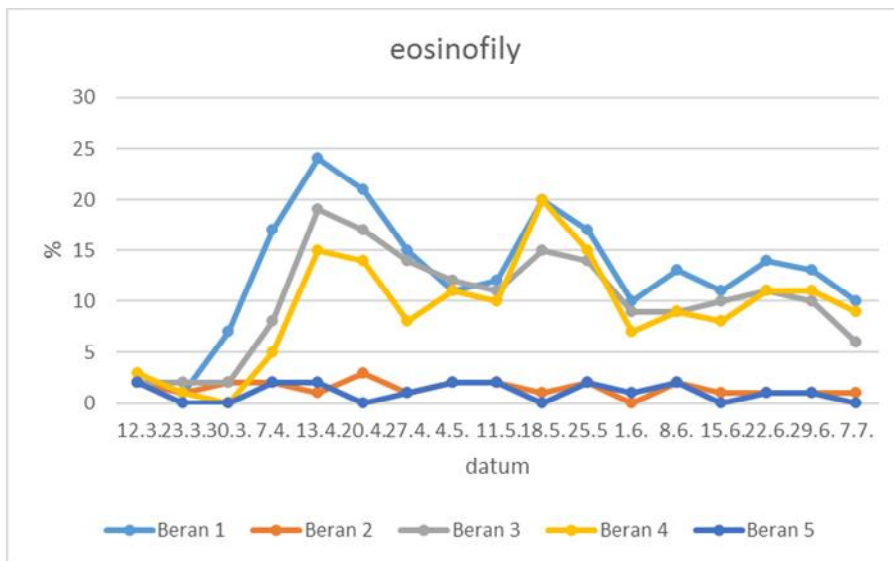
Graf 2 Vývoj procentuálního zastoupení neutrofilů během experimentu



Graf 3 Vývoj procentuálního zastoupení monocytů během experimentu



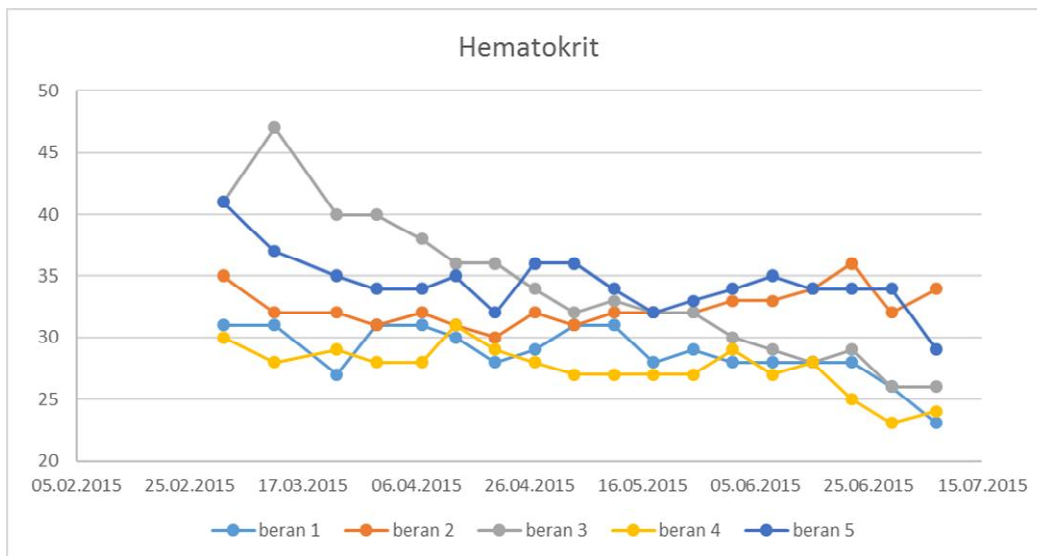
Graf 4 Vývoj procentuálního zastoupení eozinofilů během experimentu



6.2.2 Stanovení hematokritu

Každý týden byl na katedře Farmakologie a toxikologie v HK stanovován i poměr pevné a tekuté složky krve, tedy podíl erytrocytů a celkového objemu krve. Hodnoty hematokritu u infikovaných zvířat v průběhu studie postupně klesaly, což je typickým projevem infekce. Vývoj je zachycen v následujícím grafu.

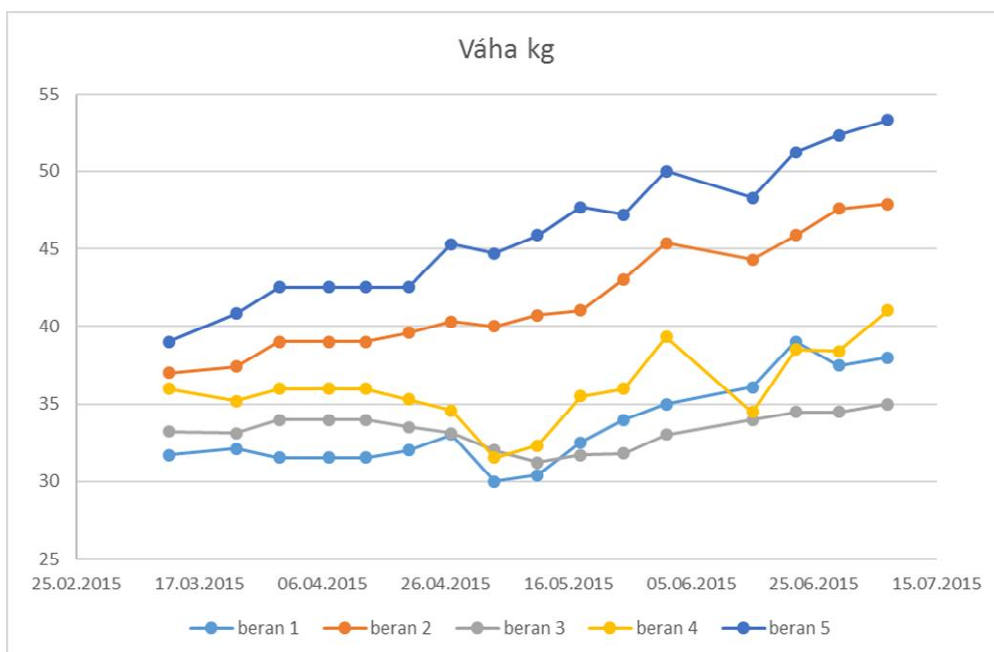
Graf 5 Vývoj hematokritu v průběhu experimentu



6.3 Výsledky měření hmotnosti

Během studie byla kontrolována hmotnost zvířat s frekvencí 1x týdně. Výjimkou byl termín 8. 6. 2015, kdy sledované ovce nebyly zváženy. Z následujícího grafu je patrné, že infekce měla negativní dopad na růst a celkové prospívání nakažených zvířat v porovnání s plynulým nárůstem hmotnosti u kontrolních zvířat.

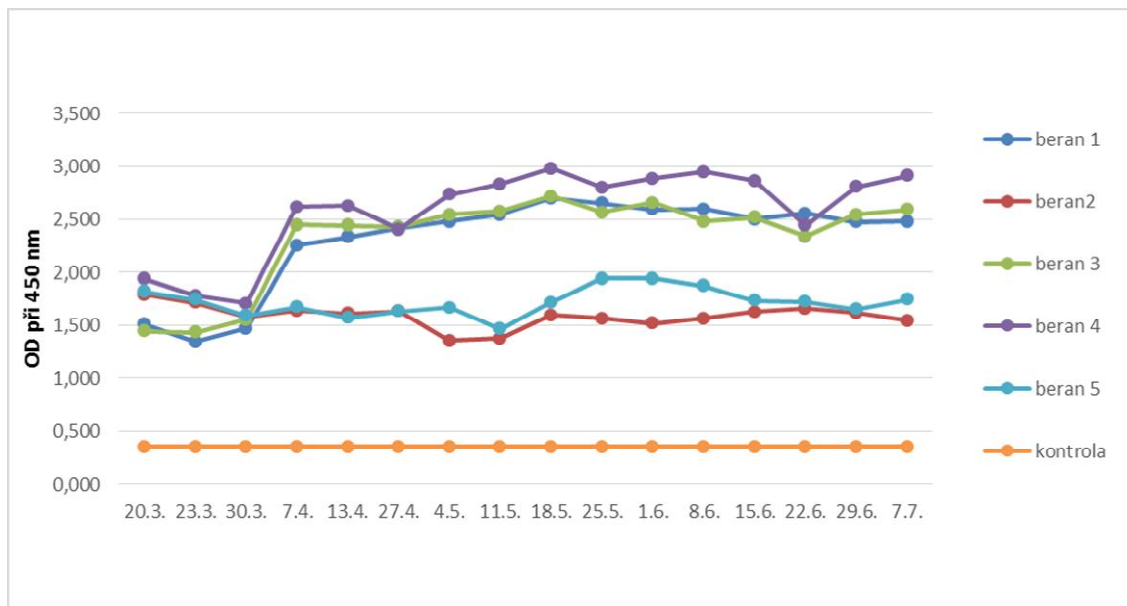
Graf 6 Vývoj hmotnosti v průběhu experimentu



6.4 Výsledky imunodiagnostického šetření

Pomocí nepřímé ELISA metody byly u vzorků individuálních ovčích sér měřeny hladiny protilátek typu IgG. Z důvodu nepřesného označení vzorků a prostorového provedení metody bylo vyšetřeno 15 termínů. Z grafu vyplývá, že u kontrolních zvířat č. 2 a 5 nedošlo ke zvýšení hladiny IgG v průběhu studie. U ostatních beranů (č. 1, 3 a 4) bylo zaznamenáno výrazné zvýšení hladiny IgG v odběrovém termínu 7. 4. 2015, tedy 2 týdny po infekci. Maximální hodnota byla naměřena u všech zvířat v 8. týdnu po infekci. Vysoká hladina protilátek se u nakažených beranů udržovala až do ukončení studie.

Graf 7 Vývoj hladiny protilátek IgG v průběhu experimentu měřeného nepřímou ELISA metodou při optické denzitě 450 nm (antigen: E/S produkty o koncentraci 0,5 µg na jamku, PP: ovčí sérum v ředění 1:200, SP: donkey anti-sheep IgG v ředění 1:5000)



6.5 Výsledky pitvy

Vyřazená zvířata byla podrobena pitvě, při které byla odhalena značná destrukce jaterní tkáně. Játra byla celkově zvětšená a na řezech byla patrná obstrukce žlučvodů. Bylo izolováno 43 dospělých motolic *F. hepatica* z jater berana č. 1, 26 dospělců motolice z jater berana č. 2 a 23 ks motolic z berana č. 3. Všechny získané motolice byly předány Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Obr. 1 Nález dospělých jedinců motolice *F. hepatica* v játrech infikované ovce



Foto: J. Lamka

7. DISKUZE

Stěžejním cílem této rigorózní práce bylo sledovat odezvu v těle hostitelova organismu (ovce domácí) na právě probíhající infekci motolicí *Fasciola hepatica*. Za účelem sledování patologických změn v definitivním hostiteli jsme zvolili několik metod, které se nejčastěji využívají při hodnocení a sledování průběhu parazitóz. Mezi hlavními sledovanými parametry experimentální infekce byly: produkce vajíček dospělými motolicemi, hladina protilátek typu IgG v séru hostitele, diferenciální počet leukocytů na krevních roztěrech, hodnoty hematokritu a hmotnost sledovaných zvířat.

Koprologická šetření patří v parazitologii k nejběžněji používaným (Taylor et al. 2005), a proto zvolení sedimentační metody bylo logickým krokem. Výhodou koprologie je možnost detekce parazita ještě za života definitivního hostitele, nespornou výhodou je také jednoduchost metody a její finanční nenáročnost. V naší práci jsme vycházeli z kvalitativní sedimentační metody podle Chyli, kterou jsme modifikovali na metodu kvantitativní. Vylučování vajíček do trusu bylo mikroskopickým vyšetřením zaznamenáno u berana č. 1 již 10. týden po infekci, u ostatních dvou beranů o týden později, tedy 11 týdnů po infekci. Z dostupné literatury jsme ověřili, že prepatentní perioda (tedy doba zahrnující vstup infekčního stádia parazita do hostitelova organismu až do doby vyvrání parazita, tzn. kladení vajíček) je u motolice *F. hepatica* zpravidla 8 až 10 týdnů (Samuel et al. 2001; Bowman 2009).

Diagnostika krevních roztěrů za pomoci mikroskopu odhalila jednotlivé zastoupení leukocytů v krvi v průběhu infekce. Hlavním sledovaným parametrem byl počet eozinofilů. Zvýšená hladina (dle Weisse a Wardopa (2010) nad 10 % celkového počtu bílých krvinek), tzv. eozinofilie, je totiž typickým znakem probíhající infekce a byla zaznamenána v mnoha studiích (Chavin et al. 1995; Chauvin et al. 2001; Raadsma et al. 2007; Matanović et al. 2007). Od druhého týdne po infekci jsme mohli sledovat patologicky zvýšený počet eozinofilů u nakažených ovcí, tento trend pokračoval až do ukončení studie. V průběhu jsme zaznamenali dva výrazné nárůsty hodnot eozinofilie, konkrétně ve 3. a 8. týdnu po infekci. Podobný jev byl zaznamenán i v jiné experimentální studii (Raadsma et al. 2007), kdy maxima hodnot počtu eozinofilů bylo

dosaženo ve 4. a 9. týdnu po infekci. Tento výkyv by měl odpovídat periodě životního cyklu motolice *F. hepatica*, kdy mladí jedinci nejdříve migrují v játrech hostitele a poté se přemísťují do žlučových, kde pohlavně dozrávají.

Další zvolenou metodou byla imunodiagnostická metoda ELISA, která se vyznačuje vysokou citlivostí pro detekci protilátek v séru, a to nejen u ovcí (Santiago a Hillyer 1988; El Ridi et al. 2007). První zvýšení protilátek typu IgG bylo detekováno v druhém týdnu po infekci u všech nakažených zvířat, maximálních hodnot protilátky dosahovaly v týdnu osmém. Uvádí se, že protilátky jsou ze séra detekovatelné 2 až 4 týdny po infekci (Taylor et al. 2005), toto tvrzení jsme tedy potvrdili. Ale na příklad Raadsma et al. (2007) ve své studii zaznamenali elevaci hladin protilátek IgG již v prvním týdnu po infekci.

Experimentální nákaza měla také negativní dopad na růst a celkovou hmotnost nakažených ovcí, což se projevovalo téměř nulovým váhovým přírůstkem oproti neinfikované kontrolní skupině. Je známo, že akutní i chronická nákaza motolicí jaterní má dopady na hmotnost zvířat, výsledkem jsou úbytky na váze a celkové neprospívání (Kotrlá et al. 1984; Behm a Sangster 1999; Taylor et al. 2005). Negativně byl ovlivněn i hematokrit ovcí, kdy hodnoty u nakažených beranů v průběhu experimentu postupně klesaly. Nízké hodnoty hematokritu naznačují právě probíhající infekci, rovněž může značit i anémii (Galtier a Alvinerie 1996; Roberts 1968). Fyziologické rozmezí hodnot hematokritu u ovcí se pohybuje od 27 do 45 % (Weiss a Wardrop 2010). V našem experimentu těchto hodnot sledované ovce již nedosahovaly poslední dva týdny před ukončením studie.

8. ZÁVĚR

V teoretické části byla vypracována literární rešerže, která se zabývá obecnou charakteristikou motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) ve vztahu k ovci domácí (Ovis aries). Byly také stanoveny základní parametry hodnocení fasciolózy.

V rámci experimentální části rigorózní práce byla zhodnocena experimentální nákaza beránek ovce domácí. Zvířata byla před infekcí odčervena a v průběhu nákazy vyšetřována koprologickými, imunologickými a hematologickými metodami. Na konci studie byla zvířata utracena a z jater byly izolovány dospělé motolice, které byly předány k dalšímu výzkumu na Katedru biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové. Z provedené studie vyplývá, že prepatentní perioda (interval mezi podáním metacerkárií a začátkem produkce vajíček) je 10 až 11 týdnů, zvýšenou hladinu protilátek IgG a eozinofilů lze detekovat 2 týdny po infekci.

9. SEZNAM LITERATURY

ALVAREZ ROJAS, C. A., ANSELL, B. R., HALL, R. S., GASSER, R. B., YOUNG, N. D., JEX, A. R., & SCHEERLINCK, J.-P. Y. *Transcriptional analysis identifies key genes involved in metabolism, fibrosis/tissue repair and the immune response against Fasciola hepatica in sheep liver*. Parasites & Vectors, 2015, 8: 124.

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

BEHM, C. A., SANGSTER, N. C., Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In Dalton J.P. (Ed) Fasciolosis, CAB International, Wallingford, UK, 1999, pp.185–224.

BOSSAERT, K., FARNIN, F., LECLIPTEUX, T., PROTZ, M., LONNEUX, J-F., LOSSON, B. *Humoral immune response in calves to single-dose, trickle and challenge infections with Fasciola hepatica*. Veterinary Parasitology, 2000, 87: 103 – 123.

BOWMAN, D D., LYNN, R. C., GEORGI, R J. *Georgis' parasitology for veterinarians*. 7. vyd. Philadelphia: W.B. Saunders Co.,1999, XII, 414 s. ISBN 07-216-7097-0.

BOWMAN, D D. *Georgis' parasitology for veterinarians*. 9. vyd. St. Louis: Saunders Elsevier, 2009, 451 s. ISBN 978-1-4160-4412-3.

CARNEVALE, S., RODRÍGUEZ, M. I., GUARNERA, E. A., CARMONA, C., TANOS, T., ANGE, S. O. *Immunodiagnosis of fasciolosis using recombinant procathepsin L cystein proteinase*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2001, 41: 43 – 49.

COOPER, K.M., KENNEDY, D.G., DANAHER, M. *Pro SafeBeef and anthelmintic drug residues—a case study in collaborative application of multi-analyte mass*

spectrometry to enhance consumer safety. Anal. Bioanal. Chem. 2012, 404(6–7):1623–1630.

CORNELISSEN, J. B. W. J., GAASENBEEK, C. P. H., BORGSTEEDE, F. H. M., HOLLAND, W. G., HARMSSEN, M. H., BOERSMA, W. J. A. *Early immunodiagnosis of fasciolosis in ruminants using recombinant Fasciola hepatica cathepsin L - like protease*. International Journal for Parasitology, 2001, 31: 728 – 737.

CROWTHER, J. R., *Methods in molecular biology. The ELISA Guidebook*. New Jersey: Humana press, 2001, ISBN 0-89603-728-2.

DALTON, J.P., MULCAHY, G. *Parasite vaccines—a reality?* Veterinary Parasitology, 2001, 98(1–3):149–167.

DARGIE, J. D., BERRY, C. I. *The hypoalbuminaemia of ovine fascioliasis: the influence of protein intake on the albumin metabolism of infected and of pair-fed control sheep*. The International Journal for Parasitology. 1979 Feb; 9(1):17-25.

DOW, C., ROSS, J. G., TODD, J. R. *The histopathology of Fasciola hepatica infections in sheep*. Parasitology, 1968; 58(1):129-35.

FLEMING, M. W., FETTERER, R. H. *Peripheral androgen levels in peripuberal rams infected with Fasciola hepatica*, Veterinary Parasitology, 1986, 19(3-4):295-9.

GALTIER, P., ALVINERIE, M. *Pharmacological basis for hepatic drug metabolism in sheep*. Veterinary Research, 1996; 27(4-5):363-72.

GAMEEL, A. A. *Fasciola hepatica: plasma ascorbic acid, plasma iron and iron-binding capacity in experimentally infected sheep*. Zeitschrift für Parasitenkunde, 1982, 68(2):185-9.

HOŘEJŠÍ, V., BARTUŇKOVÁ, J., 2005. *Základy imunologie*. 3. vyd. Praha: Triton, s.r.o., 279 s. ISBN: 978-80-7387-280-9.

CHAUVIN, A., BOUVET, G., BOULARD, CH. *Humoral and cellular immune responses to Fasciola hepatica experimental primary and secondary infection in sheep*. International Journal for Parasitology, 1995, 25: 1227 – 1241.

CHAUVIN, A., MOREAU, E., BOULARD, CH. *Responses of Fasciola hepatica infected sheep to various infection levels*. Veterinary Research, 2001, 32: 87 – 92.

JOACHIM, A., ALI, S. F., DAUGSCHIES, A. *Fasciola hepatica alters coagulation parameters in sheep plasma in vivo and in vitro*. Parasitol Research, 2003, 89(1):53-8.

KOTRLÁ, B. ČERNÝ, V., KOTRLÝ, A., MINÁŘ, J., RYŠAVÝ, B., ŠEBEK, Z., *Parazitózy zvířete*. Praha: Academia, 1984, 192 s. ISBN 21-055-84.

KOZAT, S., DENIZHAN, V. *Glucose, lipid, and lipoprotein levels in sheep naturally infected with Fasciola hepatica*. The Journal for Parasitology, 2010, 96(3):657-9.

MAS-COMA, S., BARQUES, M. D., VALERO, M. A., *Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses*. International Journal for Parasitology, 2005, 35(11-12):1255-78.

MATANOVIĆ, K., SEVERIN, K., MARTINKOVIĆ, F., ŠIMPRAGA, M., JANICKI, Z., BARIŠIĆ, J. *Hematological and biochemical changes in organically farmed sheep naturally infected with Fasciola hepatica*. Parasitology Research, 2007, 101: 1657 – 1661.

MOLINA-HERNÁNDEZ, V., MULCAHY, G., PÉREZ, J., MARTÍNEZ-MORENO, A., DONNELLY, S., O'NEILL, S. M., DALTON, J. P., CWILINSKI, K. *Fasciola hepatica vaccine: we may not be there yet but we're on the right road*. Veterinary Parasitology, 2015, 28;208(1-2):101-11.

NOVOBILSKÝ, A., KAŠNÝ, M., MIKEŠ, L., KOVAŘČÍK, K., KOUDELA, B.
Humoral immune responses during experimental infection with Fascioloides magna and Fasciola hepatica in goats and comparison of their excretory/secretory products.
Parasitology Research, 2007b, 101: 357 – 364.

PECKA M. *Laboratorní hematologie v přehledu* (2. díl). Fyziologie a patofyziologie krevní buňky. Český Těšín: Infiniti art, s. r. o., 2006. 1. vydání. 304 s. ISBN 80-86682-02-1.

PECKA M. et al. *Praktická hematologie. Laboratorní metody.* Český Těšín: Infiniti Art, s. r. o. 2010. 1. vydání. 343 s. ISBN 978-80-903871-9-5.

PEREZ, J., ORTEGA, J., MORENO, T., MORRONDO, P., LOPEZ-SANDEZ, C., MARTINEZ-MORENO, A. *Pathological and immunohistochemical study of the liver and hepatic lymph nodes of sheep chronically reinfected with Fasciola hepatica, with or without triclabendazole treatment.* Journal of comparative pathology, 2002, 127(1):30–36.

PHIRI, I. K., PHIRI, A. M., HARRISON, L. J. *The serum glucose and beta-hydroxybutyrate levels in sheep with experimental Fasciola hepatica and Fasciola gigantica infection.* Veterinary Parasitology, 2007, 28; 143(3-4):287-93.

PIEDRAFITA, D., SPITHILL T. W., RAADSMA H. W. *Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology.* Parasite Immunology, 2010, 32(8):572-81.

RAADSMA, H. W., KINGSFORD, N. M., SUHARYANTA, SPITHILL, T. W., PIEDRAFITA, D. *Host responses during experimental infection with Fasciola gigantica or Fasciola hepatica in Merino sheep: I. Comparative immunological and plasma biochemical changes during early infection.* Veterinary Parasitology, 2007, 143: 275 – 286.

ROBERTS, H. E. *Observations on experimental acute fascioliasis in sheep*. British Veterinary Journal, 1986, 124: 433 – 450.

RUIZ, A., MOLINA, J. M., GONZÁLEZ, J., MARTÍNEZ-MORENO, F. J., GUTIÉRREZ, P. N., MARTÍNEZ-MORENO, Á. *Humoral response (IgG) of goats experimentally infected with Fasciola hepatica against cysteine proteinases of adult fluke*. Veterinary Research, 2003, 34: 435 – 443.

SAMUEL, W. M., PYBUS, M. J., KOCAN, A.A.,. *Parasitic diseases in wild mammals*. 2. vyd. Iowa City: Iowa State Press, 2001, 559 s. ISBN 1-84076-009-5.

SANTIAGO, N., HILLYER, G. V. *Antibody profiles by EITB and ELISA of cattle and sheep infected with Fasciola hepatica*. International Journal for Parasitology, 1988, 74:810-818.

TAYLOR, M. A., COOP, R. L., WALL, R. L. *Veterinary parasitology*. 4. vyd. Chichester: Wiley Blackwell, 2005, 132 s. ISBN 978-0-470-67162-7.

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

VOLF, P., HORÁK, P. *Paraziti a jejich biologie*. 1. vyd. Praha: Triton, 2007. ISBN 978-80-7387-008-9.

WEISS, D. J., WARDROP K. J. *Schalm's Veterinary hematology*. 6. vyd. Iowa: Blackwell Publishing Ltd, 2010, 1232 s. ISBN: 978-0-8138-1798-9.

ZAJAC, A., CONBOY, G. A. *Veterinary clinical parasitology*. 8. vyd. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2012. ISBN 0813820537.

Internetové stránky:

www.rockland-inc.com/elisa.aspx

European public MRL assessment report (EPMAR): Triclabendazole (extrapolation to bovine and ovine milk). Dostupnost na:

http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2012/03/WC500124511.pdf.

MATÝŠKOVÁ M., BULIKOVÁ A., KAČÍRKOVÁ P., BOURKOVÁ L. Doporučení České hematologické společnosti ČLS JEP – „Postup při hodnocení nátěru periferní krve“. 2013. Dostupnost na: <http://www.hematology.cz/doporuceni-chs-kcinnostem.php>
http://www.hematology.cz/doporuceni/laboratorni_sekce/files/k_cinnostem/Doporuceni_LS_CHS_CLS_JEP-Hodnoceni_nateru_pk_2013.pdf