

Západočeská univerzita v Plzni

Fakulta pedagogická

Katedra biologie

Diplomová práce

**PRAKTICKÁ PARAZITOLOGIE VE VÝUCE
BIOLOGIE**

Bc. Helena Hofmanová

Plzeň 2012

Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Plzni, 16.7.2012

.....

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI
Fakulta pedagogická
Akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Helena NEDVĚDOVÁ**
Studijní program: **N7503 Učitelství pro základní školy**
Studijní obory: **Učitelství biologie pro 2. st. ZŠ**
Učitelství chemie pro 2. st. ZŠ
Název tématu: **Praktická parazitologie ve výuce biologie**
Zadávací katedra: **Katedra biologie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Všeobecný přehled v této vědní disciplíně a v dostupné české i zahraniční literatuře.
2. Shromažďování materiálu v terénu, jeho laboratorní zpracování do formy preparátů a jejich pozorování pod mikroskopem, včetně fotografování.
3. Vypracování laboratorních postupů přípravy preparátů formou protokolů a druhových soupisů pozorovaných parazitů.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Volf P., Horák P. a kol. Paraziti a jejich biologie (2007). Triton, Praha, 318.

Jíra J. Lékařská helmintologie (1998). Galén, Praha, 495.

Lukešová D. Praktická cvičení z veterinární helmintologie (1990). Státní pedagogické nakladatelství, Praha, 102.

Hausmann K., Hülsmann N. Protozoologie (2003). Academia, Praha, 347.

Chroust K. Veterinární protozoologie (1998). Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno, 113.

Vedoucí diplomové práce:


Mgr. Zbyněk Houdek
Katedra biologie

Datum zadání diplomové práce:

4. prosince 2009

Termín odevzdání diplomové práce:

30. dubna 2011


Doc. PaedDr. Jana Coufalová, CSc.

děkanka





Doc. RNDr. Michal Mergl, CSc.
vedoucí katedry

V Plzni dne 3. února 2010

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda upřímně poděkovala všem, kteří mně umožnili vytvořit tuto diplomovou práci, jmenovitě:

Vedoucímu diplomové práce panu Mgr. Zbyňkovi Houdkovi, PhD. za podporu, rady a poskytnutí některého parazitologického materiálu, své matce RNDr. Heleně Nedvědové za cenné rady a informace při zpracování parazitologického materiálu, MVDr. Otto Humlovi z veterinární kliniky VEDILAB, s.r.o. za poskytnutí parazitologického materiálu, Akva-tera ZOO Plzeň za darování bezobratlých živočichů a celému kolektivu KBI ZČU v Plzni za cenné rady a podporu. Díky patří i mému manželovi a rodině za velkou trpělivost při tvorbě a psaní této diplomové práce.

OBSAH

1. Úvod	- 6-
1.1. Parazitismus jako životní strategie	-7-
1.2. Diverzita parazitů	-8-
1.3. Formy parazitismu, hostitelská specifita	- 9-
2. Charakteristika získaných druhů	-13-
2.1. Endoparazité	-13-
2.1.1. Parazitičtí prvoci	-13-
2.1.1.1. <i>Leptomonas pyrrocoris</i>	-13-
2.1.1.2. <i>Cryptobia heliciis</i>	-15-
2.1.1.3. Brvitka švábová (<i>Lophomonas blattarum</i>)	- 16-
2.1.1.4. Hromadinka (<i>Gregarina</i>)	- 17-
2.1.1.5. Hromadinka žížalí (<i>Monocystis lumbrici</i>)	-20-
2.1.1.6. Kokcidie (<i>Eimeria spp.</i>)	-21-
2.1.2. Parazitičtí helminti	-24-
2.1.2.1. Zubovka (<i>Oesophagostomum spp.</i>)	-25-
2.1.2.2. Čeleď <i>Thelastomatiidae</i>	-26-
2.1.2.3. Škrkavka psí (<i>Toxocara canis</i>)	27-
2.1.2.4. Tenkohlavec ovčí (<i>Trichuris ovis</i>)	-28-
2.2. Ektoparazité	-29-
2.2.1. Klíště obecné (<i>Ixodes ricinus</i>)	-29-
2.2.2. Kloš jelení (<i>Lipoptena cervi</i>)	-29-
2.2.3. Blecha kočičí (<i>Ctenocephalides felis</i>)	-30-
2.2.4. Kleštík včelí (<i>Varroa destructor</i>)	-32-
3. Metodika	-36-
3.1. Tvorba totálních (celkových) mikroskopických preparátů	-36-
3.2. Popis pitev bezobratlých živočichů	-39-
3.3. Sběr ektoparazitů, zhotovení trvalých preparátů ektoparazitů	-44-
3.4. Metody studia helmintů	- 45-
3.5. Metodika zpracování a určování parazitických helmintů	-46-
3.6. Mikroskopování a fotografování získaných druhů	-50-
4. Praktická část	-51-
4.1. Kvalitativní vyhodnocení formou tabulek	- 52-
4.2. Systematické zařazení získaných druhů	- 53-
4.2.1. Systematické zařazení získaných druhů prvoků	- 53-
4.2.2. Systematické zařazení získaných druhů helmintů	-55-
4.2.3. Systematické zařazení získaných druhů členovců	- 57-
4.3. Výsledky ve formě laboratorních protokolů	- 58-
4.3.1. Tématický celek parazitičtí prvoci	-59-
4.3.1.1. Laboratorní protokol č. 1	-60-
4.3.1.2. Laboratorní protokol č. 2	-66-
4.3.1.3. Laboratorní protokol č. 3	-72-
4.3.1.4. Laboratorní protokol č. 4	-76-
4.3.2. Tématický celek parazitičtí helminti	-79-
4.3.2.1. Laboratorní protokol	- 80-
4.3.3. Tématický celek parazitičtí členovci	-85-
4.3.3.1. Laboratorní protokol č. 1	-86-
4.3.3.2. Laboratorní protokol č. 2	-90-
5. Diskuse	-95-
5.1. Srovnání s učebnicemi přírodopisu pro základní školy	-95-
5.2. Srovnání s učebnicemi biologie pro střední školy	-98-
5.3. Obecné závěry a doporučený management	-100-
6. Závěr	-103-
7. Summary	-104-
8. Literatura	-105-
9. Přílohy	

1. ÚVOD

Předkládaná diplomová práce představuje tematicky dva na sebe navazující celky, což vyplývá z jejího názvu „Praktická parazitologie ve výuce biologie.“

První celek, který tvoří větší část této diplomové práce, se zabývá parazitologií. Jedná se, co do obsahu, o velmi širokou a zajímavou vědní disciplínu, která v dnešní době díky úspěšnosti moderní medicíny stále více ztrácí na významu a důležitosti. Tato parazitologická část zahrnuje výběr, shromáždění, uchování a zpracování dostupného parazitologického materiálu včetně archivace v podobě fotografií zhotovených preparátů a druhového soupisu identifikovaných parazitů v pozorovaných preparátech.

Druhý celek je méně obsáhlý, ale ne méně důležitý z pohledu mé budoucí profese učitelky, jelikož je v podstatě praktickou aplikací výše popsaného prvního celku do hodin výuky biologie na základní a střední škole, především praktických cvičení z biologie. Tato část práce je didaktickým zpracováním tématu do formy laboratorních protokolů a pracovních listů pro studenty základních, středních, popřípadě vyšších odborných škol. Vypracované laboratorní postupy včetně řešených pracovních listů jsou určeny vyučujícím i studentům jako didaktická příručka pro praktická cvičení v biologii.

Parazitologie je vědní obor, který se zabývá parazity (cizopasníky), jejich hostiteli a jejich vzájemnými vztahy. Význam a důležitost tohoto poměrně mladého vědního oboru dokládá řada lidských onemocnění, která se řadí mezi nejvýznamnější i z globálního měřítka, např. malárie, spavá nemoc, Chagasova choroba, schistosomóza, leishmanióza apod. Vědci, kteří zkoumají tyto pro člověka nebezpečné organismy, jsou sdruženi v parazitologických společnostech založených ve světě, ale i v ČR, např. Česká parazitologická společnost založená v červnu 1993 je členem Evropské federace parazitologů a Světové federace parazitologů. Její členové se věnují parazitologii v rámci základního a aplikovaného výzkumu (univerzity, hygienické, humánní a veterinární laboratoře). Významnými odbornými ústavami jsou v ČR Parazitologický ústav AV ČR, který vznikl roku 1962 v Praze, později se sídlem v Českých Budějovicích a katedra parazitologie na PřF UK v Praze.

K významným parazitologům patří zejména profesor RNDr. Otto Jírovec, DrSc., který se zabýval parazitárními prvky a je zakladatelem moderní parazitologie u nás, RNDr.

Zdeňka Žďárská, DrSc. studovala ultrastrukturu a histochemii larválních stadií motolic u našich měkkýšů, profesor RNDr. Bohumil Ryšavý, DrSc., který se řadí mezi významné helmintology a v neposlední řadě RNDr. Jiří Lom, DrSc., který se výzkumem parazitárních onemocnění ryb řadí mezi světové osobnosti parazitologie. Samozřejmě je u nás více osobností v tomto oboru, ale jejich souvislý výčet není předmětem této práce.

Parazitologie jako samostatná vědní disciplína se rozděluje na dva základní obory – lékařskou parazitologii a veterinární parazitologii. Lékařská parazitologie studuje parazity, jejichž hostitelem je člověk (např. krevnička – *Schistosoma spp.*, zimnička – *Plasmodium*). Veterinární parazitologie se zabývá parazity, kteří ovlivňují zdravotní stav hospodářských i volně žijících zvířat, např. *Trypanosoma* – nagana, dourina, *Eimeria*, Isospora - kokcidióza. Hlavním posláním tohoto oboru parazitologie je ochrana zdraví zvířat a následně i zdravých potravin pro člověka. Právě veterinární parazitologie je předmětem bádání této diplomové práce.

S rozvojem molekulární biologie a genetiky v posledních letech souvisí nedávné výzkumy, kdy se k identifikaci odlišných druhů parazitů a k odhalení příbuznosti mezi jednotlivými skupinami v rámci úzké taxonomické jednotky využívá DNA parazitů. Tyto metody odkrývají stále nové skutečnosti v tomto vědním oboru a jsou pro parazitologii velmi užitečným nástrojem.

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na shromáždění parazitů, které pokrývají všechny tři základní oblasti parazitologie dle systematické příslušnosti jednotlivých parazitů. Jedná se o zajímavé parazitární prvoky, helminty a členovce. Dalším stěžejním bodem diplomové práce bylo laboratorní zpracování nalezených parazitů do formy preparátů, jejich pozorování pod mikroskopem, případně binokulární lupou a získání obsáhlé fotodokumentace. Dalším cílem práce jsou vypracované laboratorní postupy ve formě protokolů a pracovních listů pro žáky středních škol včetně soupisů jednotlivých druhů pozorovaných parazitů.

1.1. Parazitismus jako životní strategie

Parazitismus je biologický jev, který je v živočišné říši velmi rozšířen a má důležitou úlohu jako faktor, který pomáhá za normálních podmínek udržovat ekologickou rovnováhu v ekosystémech (Ryšavý, 1988). Parazity není možné vymezit taxonomicky,

ale lze je spíše označit za ekologickou skupinu, jejíž životní strategií je parazitický způsob života (Flegr, 2010).

Organismy v přírodě nikdy nežijí osamoceně, ale společně s dalšími organismy. Podle toho, zda soužití mezi organismy přináší účastníkům škodu či prospěch, rozlišujeme různé formy soužití neboli symbiózy (Horák a Volf, 2007). Parazitismus patří mezi nejsložitější úrovně vztahů dvou organismů (Ryšavý, 1988). Parazitický způsob života je v přírodě zřejmě mnohem běžnější než kterákoliv jiná životní strategie (Flegr, 2010). V širším slova smyslu se dá říci, že parazitismus je zvláštním typem soužití, kdy jeden organismus má ze vzájemného soužití prospěch (parazit), zatímco druhému organismu toto soužití škodí (hostitel). V dostupné literatuře se objevují nejrůznější definice a názory, co je to parazit. V současnosti je nejrozšířenější názor, že parazit je organismus získávající živiny z jednoho či několika mála hostitelů, kterým obvykle škodí, ale nemusí je zabít (Horák a Volf, 2007). Pro srovnání uvádím ještě definici parazita dle J. N. Pavlovského z roku 1946: Parazit je živočich, který žije na úkor jiného živočicha a je s ním svým životním cyklem po delší nebo kratší dobu těsně svázán (Ryšavý, 1988). Žádná z definic parazitismu a parazita však nepostihuje širší parazitického způsobu života dokonale (Horák a Volf, 2007). Také výsledky této diplomové práce ukazují, že definice parazitismu není zcela univerzální. Někteří zkoumaní parazité uvedení v této práci naplňují definice i jiných symbiotických vztahů mezi organismy (mutualismus, komenzálismus). Je tedy správné je zařazovat mezi parazity? Hranice mezi čtyřmi hlavními skupinami trofických vztahů (parazit, predátor, parazitoid a mikropredátor) jsou velmi tenké, někdy téměř nezřetelné (Hampl, 2010.).

1.2. Diverzita parazitů

Ze studia evoluce a evolučních zákonitostí jasně vyplývá, že paraziti žijí v širokém spektru různých hostitelů, přičemž jsou často příbuzní organismům neparazitickým. Z toho plyne, že neexistuje žádná velká říše, kam by spadali všichni paraziti. (Hampl, 2010). Co se týče druhového spektra parazitů, parazitickému způsobu života se přizpůsobily organismy na všech úrovních, od virů přes bakterie, jednobuněčná eukaryota až po mnohobuněčné organismy (Horák a Volf, 2007). Parazitické druhy se vyskytují i v rostlinné říši (kokotice, jmelí) a mezi houbami (padlí a dřevokazné houby). Z historických důvodů se parazitologie zabývá hlavně eukaryotickými parazity obratlovců – prvoky (*P r o t o z o a*), helminty (*H e l m i n t h e s*) a členovci

(*Arthropoda*). Ostatními organismy, které rovněž vykazují parazitický způsob života, se zabývají jiné samostatné vědní obory – mikrobiologie, virologie, lékařská a veterinární mykologie, fytopatologie, apod. (Horák a Volf, 2007; Ryšavý, 1988).

Z hlediska struktury parazitárních populací jsou paraziti ve svém životě vázáni na hostitele, a proto jsou jejich zeměpisná rozšíření a struktura populace ovlivněny rozšířením a strukturou populace hostitelů. Pro společenstva parazitů na různých úrovních se ustálila následující hierarchická terminologie:

1. infrakomunita – parazité všech druhů obývajících jednoho hostitelského jedince
2. komponentní komunita (parazitofauna) – parazité obývajících hostitelský druh
3. kompaundní komunita – parazitární druhy vyskytující se v daném ekosystému (Hampl, 2010).

1.3. Formy parazitismu, hostitelská specifita

Zpracováno dle publikací: Horák, a Volf, 2007; Ryšavý, 1988.

1. Dle stupně parazitismu:

- a) **fakultativní paraziti (podmínění, příležitostní)** – obvykle volně žijící organismy, které za nepříznivých podmínek přechází k parazitickému způsobu života; tvoří jakýsi mezistupeň mezi volně žijícími a parazitickými organismy, např. volně žijící půdní hlístice, někteří zástupci dvoukřídlého hmyzu (*Fannia scalaris* – synantropní saprofág)
- b) **obligátní paraziti (typičtí, praví)** – jsou přizpůsobeni pouze parazitickému způsobu života a bez hostitele nejsou schopni života a rozmnožování se; předpokládá se, že se vyvinuli z tzv. foréze, kdy hostitel sloužil jako prostředek k transportu jinému organismu, např. tasemnice (*Taenia*)
- c) **náhodní paraziti** – napadá organismus, který není normálně jeho hostitelem a postupem času se může na tohoto nového hostitele adaptovat, např. vlasovka husí (*Amidostomum anseris*) – hlístice, která běžně cizopasí v žaludku hus, ale byla také zjištěna v žaludku hrdličky zahradní

2. Dle životní strategie parazita:

- a) **mikroparaziti** – nevytváří specifická infekční stadia a množí se v těle svého hostitele, např. viry, bakterie, houby, prvoci

b) **makroparaziti** – produkují infekční stadia, ale v hostiteli nezmnožují svůj počet; patologické projevy souvisí s počtem infikovaných jedinců, projevem je chronická infekce s nevýznamným procentem mortality, např. helminti, členovci

V rámci životního cyklu jednoho parazita se mohou objevit obě tyto životní strategie – motolice v plži (mezihostiteli) je mikroparazitem a v definitivním hostiteli makroparazitem.

3. Dle životních cyklů:

a) **jednohostitelské (monoxenní)** – např. střevní bičíkovec lamblie střevní (*Giardia intestinalis*)

b) **vícehostitelské (heterogenní)** – např. motolice jaterní (*Fasciola hepatica*), měchožil zhoubný (*Echinococcus granulosus*)

4. Dle umístění parazita u hostitele:

a) **ektoparaziti (vnější)** – parazitují na těle hostitele (kůže, žábry), např. *Cryptobia branchialis* – bičíkovec cizopasíci na povrchu žaber sladkovodních ryb v organicky znečištěných vodách, klíště obecné (*Ixodes ricinus*) – roztoč sající krev na kůži vyšších obratlovců včetně člověka

b) **endoparaziti (vnitřní)** – parazitují v těle hostitele (vnitřní orgány, tkáně, buňky, tělní dutiny, apod.); lze je rozdělit na **intracelulární (vnitrobuněční)** – např. zimnička (*Plasmodium spp.*), kokcidie (*Eimeria spp.*) a **extracelulární (mimobuněční)** – např. lamblie střevní (*Giardia intestinalis*)

5. Dle šíření parazitů v populacích hostitele:

a) **vertikálně přenosní** – parazité, kteří jsou přenosní přednostně nebo pouze výhradně na potomstvo infikovaného hostitele (přenos z rodičů na potomky), např. škrkavka psi (*Toxocara canis*)

b) **horizontálně přenosní** – přenos parazitů v populacích nepříbuzných hostitelů (sexuálně přenosní parazité), např. bičenka poševní (*Trichomonas vaginalis*)

6. Dle časového vztahu parazita k hostiteli:

a) **stálí (permanentní, trvalí)** – žijí v/na jednom nebo v/na více hostitelích celý život v pohlavně zralé formě nebo ve stádiu larvy, stálý parazit nemůže mimo tělo hostitele trvale existovat, např. tasemnice bezbranná (*Taeniarhynchus saginatus*)

b) **dočasní (temporální)** – na hostiteli se nevyvíjejí, nerozmnožují a jejich parazitace je omezená jen na přijímání potravy po kratší či delší dobu, většina ektoparazitů (komár, štěnice, ovád)

c) **periodičtí (střídaví)** – parazitují jen v některém vývojovém stádiu životního cyklu, např. střeček srnčí (*Hypoderma diana*)

7. Dle hostitelské specifity parazitů:

a) euryxenní (polyfágní, široká hostitelská specifita) – např. vícehostitelská kokcidie (*Toxoplasma gondii*), klíště obecné (*Ixodes ricinus*)

b) stenoxenní (úzká hostitelská specifita)

- monofágní paraziti – např. veš muňka (*Phthirus pubis*)
- stenofágní paraziti – např. tasemnice dlouhočlenná (*Taenia solium*), stenofágní paraziti tvoří přechodnou skupinu mezi polyfágními a monofágními parazity, vázání na úzký okruh hostitelů, zpravidla fylogeneticky blíže příbuzných

Kategorie hostitelů:

a) **definitivní hostitel (hostitel)** – parazité v nich dosahují stadia pohlavní zralosti a reprodukce

b) **mezihostitel** – živočich, ve kterém proběhne část vývoje parazita, parazit však v něm nedosáhne pohlavní zralosti, vyvíjejí se zde většinou tzv. infekční (invazní) stadia – po vniknutí do definitivního hostitele vyvolávají nákazu

c) **paratenický (transportní, rezervoárový) hostitel** – živočich, který stojí mimo vlastní životní cyklus parazita, mohou se v něm kumulovat infekční stadia parazita, popřípadě v něm i delší dobu přežívat, aniž by ztratili schopnost vyvolávat nákazu

d) **aberantní hostitel** – pro daný druh parazita hostitel netypický, parazit se u něj vyskytuje většinou sporadicky, infekce určitým parazitem může probíhat u aberantních hostitelů odlišně než u definitivního hostitele

Speciální případy parazitismu:

a) **hyperparazitismus** – parazit, který cizopasí u jiného druhu parazita, např. mikrosporidie cizopasící v člancích tasemnic či u motolic, všenky přichycené na zadečku ptačích klošů (*Ornithomyia ovisularia*) – hranice mezi forézí a hyperparazitismem

b) *pseudoparazitismus* – organismy nebo jejich části, které při diagnostice parazitů mohou být pro svou vnější podobnost zaměňovány, např. s vývojovými stadii parazitů nebo s dospělými parazity, trichomy rostlin za larvy hlístic, spory hub za cysty cizopasných prvoků

2. CHARAKTERISTIKA ZÍSKANÝCH DRUHŮ

Ve své diplomové práci jsem se zaměřila na ektoparazity i endoparazity ze tří hlavních směrů parazitologie – protozoologie, helmintologie a lékařské entomologie, tj. parazitické prvoky (*P r o t o z o a*), parazitické helminty (*H e l m i n t h e s*) a parazitické členovce (*A r t h r o p o d a*). Objektem studia helmintologie jsou helminti. Nejedná se však o přirozenou skupinu živočichů. V parazitologii je tento odborný termín používán k označení parazitických zástupců kmenů *P l a t h e l m i n t h e s* (plošší hlísti), *N e m a t h e l m i n t h e s* (oblí hlísti) a *A c a n t h o c e p h a l a* (vrtejši). Ve starších systémech a publikacích byly uvedené skupiny uváděny v rámci kmene *V e r m e s* (červi). Tento taxon nepochybně sdružoval navzájem zcela nepříbuzné skupiny, tudíž termín „parazitičtí červi“ se dnes již téměř nepoužívá a je nahrazen přesnějším termínem „parazitičtí helminti“ (Horák a Scholz, 1998). V této diplomové práci jsem zkoumala a popsala helminty ze třídy *N e m a t o d a* patřící do kmene *N e m a t h e l m i n t h e s*. V případě popsaných ektoparazitů se jedná o členovce (*A r t h r o p o d a*) ze třídy klepítkačci (*C h e l i c e r a t a*) a hmyz (*I n s e c t a*). Zkoumaní endoparazité jsou zástupci kmene prvoci (*P r o t o z o a*) žijící v tělních dutinách a tkáních bezobratlých živočichů a mezi oblí hlísty (kmen *N e m a t h e l m i n t h e s*) žijící v tělních dutinách obratlovců i bezobratlých živočichů.

2.1. Endoparazité

2.1.1. Parazitičtí prvoci

2.1.1.1. *Leptomonas pyrhhocoris* (fotografie v příloze 1)

Zařazení v systému (Horák a Volf, 2007).

Leptomonas pyrhhocoris patří mezi jednohostitelské (monogenetické) druhy řádu *T r y p a n o s o m a t i d a*, což znamená, že jsou to bičíkovci, kteří se vyskytují v trávicím traktu hmyzu, popřípadě mohou kolovat mezi fytofágním hmyzem a rostlinami (rod *Phytomonas*). Rod *Leptomonas* cizopasí vesměs v bezobratlých, zejména v různých druzích hmyzu. Druh *Leptomonas pyrhhocoris* je velmi hojný v zažívací trubici ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) – Jírovec, 1953. Řád *T r y p a n o s o m a t i d a* jsou velmi úspěšní a široce rozšíření cizopasnici, kteří napadají teplokrevné i studenokrevné obratlovce (rod *Trypanosoma*), bezobratlé (rody

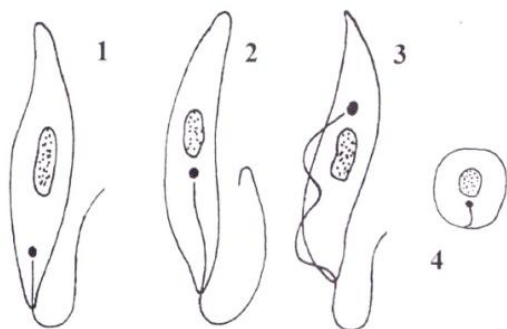
Leptomonas, *Crithidia*, *Blastocrithidia* a *Herpetomonas*), prvoky a některé rostliny (rod *Phytomonas*). Mnohá trapanosomatida jsou nebezpečnými patogeny – rody *Trypanosoma* a *Leishmania* (Hausmann a Hülsmann, 2003).

Jedná se o bičíkovce vřetenovitého těla, kteří nemají ústní otvor (cytostom). Charakteristickým znakem je pouze jeden bičík vycházející z bazálního tělíska na předním konci těla. Bičík se pohybuje volně. Při bázi bičíku je tzv. kinetoplast (dříve označovaný jako blepharoplast) – kulaté nebo protáhlé tělísko (u rodu *Leishmania* má tyčinkovitý tvar), které obsahuje DNA, Giemsovým barvivem se barví červenofialově, tato oblast dává pozitivní Feulgenovu nukleární reakci, a proto je viditelná ve světelném mikroskopu, což je důkaz přítomnosti deoxyribonukleových kyselin (Jírovec, 1953; Hausmann a Hülsmann, 2003). V těsné blízkosti bazálního tělíska a kinetoplastu se nachází mitochondrie (Horák a Volf, 2007). Kinetoplast tedy není zvláštní organelou, ale úsekem jediné mitochondrie třídy *Kinetoplastea*, v němž je neobvykle vysoký obsah kinetoplastové DNA – kDNA (Hausmann a Hülsmann, 2003).

Další významnou vlastností řádu *Trypanosomatida* je tzv. polymorfie (tělní mnohotvárnost), tj. schopnost vytvářet během vývoje morfologicky a fyziologicky odlišná stadia (morfy), které se liší délkou bičíku, polohou kinetoplastu a přítomností undulující membrány, tedy umístěním komplexu kinetosom-kinetoplast-flagelární kapsa. Hlavní morfologická stadia trypanosomatid typická pro různé fáze životního cyklu i pro různé rody řádu *Trypanosomatida* jsou (viz obr. 1):

- 1) amastigot (leishmaniová forma) – rod *Leishmania*
- 2) promastigot (leptomonádová forma) – rody *Leptomonas* a *Phytomonas*
- 3) epimastigot (kritidiová forma) – rod *Blastocrithidia*
- 4) trypomastigot (trypanosomová forma) – rod *Trypanosoma*

V některých publikacích bývají uváděna ještě další morfologická stadia trypanosomatid – opistomastigot, choanomastigot, sféromastigot a paramastigot (Hausmann a Hülsmann, 2003; Horák a Volf, 2007). U rodu *Leptomonas* se vyskytují jen dvě morfologická stadia – promastigotní a amastigotní v podobě tenkostěnných cyst.



Obr. 1: Hlavní morfologická stadia trypanosomatid: 1 – promastigot (kinetoplast před jádrem), 2 – epimastigot (kinetoplast těsně před jádrem), 3 – trypomastigot (kinetoplast za jádrem), amastigot (bez vnějšího bičíku); převzato z Chroust, 1998.

2.1.1.2. *Cryptobia helicis* (fotografie v příloze 2)

Zařazení v systému (Horák a Volf, 2007)

Cryptobia helicis je bičíkovec z parafyletického řádu (řád s nekompetentním zastoupením potomků společného předka) *Bodonida* třídy *Kinetoplastea*. Tento řád je charakterizován přítomností dvou heterodynamických bičíků původního (heterokontního) typu - jeden přední (hmatací) je kratší a namířen dopředu a druhý zpětný (vlečný) je delší a slouží ke klouzání po substrátu nebo k přichycování (u rodu *Cryptobia* je vlečný bičík přirostlý k povrchu buňky a na konci pokračuje jako volný vlečný bičík, aniž tvoří ondulující membránu). Oba bičíky vznikají ve flagelární kapse. Zástupci rodu *Cryptobia* mají protáhlý kinetoplast na rozdíl od zástupců rodu *Bodo*, kteří mají kinetoplast kulatý.

Řád *Bodonida* (*Bodo*, *Cryptobia*, *Trypanoplasma*) a zahrnuje druhy volně žijící (*Bodo saltans*), ektoparazity i endoparazity zejména sladkovodních ryb (*Ichtyobodo necator* – syn. *Costia necatrix*, *Cryptobia branchialis*, *Trypanoplasma borreli*). Zástupci tohoto řádu jsou velmi rozšířeni a často se vyskytují v prostředích bohatých na živiny, kde se žíví bakteriemi.

Získaný druh *Cryptobia helicis* vyskytující se v zásobních váčcích (semenných schránkách) – receptaculum seminis – hlemýždě zahradního (*Helix pomatia*) je z ekologického hlediska spíše endobiotickým komenzálem než parazitem. To znamená, že prvoci *Cryptobia helicis* v semenných schránkách hlemýždě zahradního jsou přítomni bez zřejmého účinku na svého hostitele. Jestliže by byli hostitelé těchto prvoků zbaveni, mohli by zřejmě bez větší újmy přežít (Hausmann a Hülsmann, 2003). U hlemýždě *Helix pomatia* na našem území bývá nákaza téměř 100% (Jírovec, 1953). U

druhu *Cryptobia helioides* tvoří tzv. kinetoplastová DNA (kDNA) sítivo ve formě kompaktního disku, ale je rozložena po celé přední části mitochondriální trubice jako tzv. pankinetoplastová DNA (pankDNA). Tato pankDNA tvoří přibližně 36% celkové buněčné DNA (Hausmann a Hülsmann, 2003).

2.1.1.3. Brvitka švábová (*Lophomonas blattarum*) – fotografie v příloze 7

Zařazení v systému (Horák a Volf, 2007; Hausmann a Hülsmann, 2003)

Zástupci řádu *Hypermastigida* žijí výlučně ve střevě xylofágního (živící se dřevem) hmyzu – švábi, nižší termiti. Většinou se tyto prvoci nacházejí ve zvláštních střevních divertikulech (fermentačních komůrkách) zažívacího traktu výše zmiňovaného hmyzu. Byla u nich prokázána celulólytická aktivita, což znamená, že jsou schopni štěpit celulózu nezávisle na endosymbiotických bakteriích. Zástupci řádu *Hypermastigida* jsou také hostiteli množství intracelulárních a extracelulárních bakterií a spirochét, které jsou též schopny rozkládat částičky celulózy a dřeva. Z hlediska ekologie prvoků je u těchto prvoků z řádu *Hypermastigida* žijících výlučně ve střevě termitů a švábů jasná mutualistická povaha soužití. Ačkoliv metabolismus těchto bičíkovců kmene *Parabasala* není ještě zcela objasněn, je zřejmé, že tyto prvoci mají zásadní význam při trávení celulózy nižších termitů a dřevožravých švábů (Hausmann a Hülsmann, 2003).

Jelikož zástupci řádu *Hypermastigida* v trávicím traktu dřevožravých švábů a termitů pohlcují celé kousky dřeva, u většiny druhů tak došlo k výraznému zvětšení buňky a často i ke zmnožení bičíků (až na tisíce). Proto tyto mnohabičíkaté formy byly dříve řazeny do speciální třídy *Hypermatigotea* (brvitky). Později bylo zjištěno, že u kmene *Parabasala* došlo ke zmnožení bičíků nejméně 3x nezávisle na sobě, a tak třída *Hypermatigotea* (brvitky) byla zrušena (Horák a Volf, 2007). Název kmene *Parabasala* je odvozen od parabazálního aparátu, což je mohutně vyvinutý Golgiho komplex asociovaný s jádrem pomocí žíhaných parabazálních fibril. Vnitřní kostru a zároveň osu buňky tvoří svazek mikrotubulů nazývaný axostyl. U kmene *Parabasala* není vyvinut cytostom (buněčná ústa), fagocytóza tak probíhá na celém povrchu buňky. Hydrogenosomy jsou organelami energetického metabolismu a jsou označovány jako homology mitochondrií u jiných eukaryot (Horák a Volf, 2007).

Rod *Lophomonas* zahrnuje menší bičíkovce cizopasíci v zažívacím traktu švábů. *Lophomonas blattarum* (brvitka švábová) žije běžně v zadním oddílu trávicího traktu švába obecného – *Blatta orientalis* (Sedlák, 2002). U tohoto rodu je velmi dobře vyvinut axostyl (intracelulární tyčinka složená až z tisíců mikrotubulů, která původně sloužila jako organela pohybu, ale během evoluce došlo k její současné přeměně na statickou a skeletální funkci) - Hausmann a Hülsmann, 2003.

U druhu *Lophomonas blattarum* se axostyl rozestupuje vpředu v kalich, v jehož vnitřku leží jádro a na jehož vnější straně je parabazální aparát (váčkovitý útvar, který vždy leží v blízkosti bičíků a obsahuje lipoidy, a tudíž je barvitelný i obyčejnými metodami – např. intravitální barvení) paprscitě složený z lupínek. Rozmnožování u rodu *Lophomonas* je nepohlavní a probíhá mnohonásobným dělením ve více jedinců. Plasma je granulovaná, obsahuje škrobová zrna, bakterie a kvasinky, ty jsou přijímány hlavně zadní částí těla. Přenos druhu *Lophomonas blattarum* probíhá cystami, v jejichž vnitřní části nastává resorpce pohybového ústrojí, parabazálního aparátu i axostylu. Ve zralých cystách dochází k rozdělení jádra (Jírovec, 1953). Dělení jádra u kmene *Parabasal* probíhá unikátním způsobem, neboť jaderná membrána zůstává během mitózy zachována, dělicí vřeténko je mimojaderné.

Druh *Lophomonas blattarum* byl nalezen v zadní části trávicí trubice nymfy švába pestrého (*Eublaberus distantis*) a švába velkokřídlého (*Archimandrita tessellata*). Předmětem sledování výskytu byla též trávicí trubice dospělců švába velkokřídlého (*Archimandrita tessellata*) i švába pestrého (*Eublaberus distantis*). Zde však druh *Lophomonas blattarum* nebyl nalezen.

2.1.1.4. Hromadinky (*Gregarina*) – fotografie v příloze 3, 4, 5

***Gregarina cuneata*, *G. polymorpha*, hromadinka švábí (*G. blattarum*), hromadinka žížalí (*Monocystis lumbrici* – syn. *Monocystis agilis*)**

Zařazení v systému (Horák a Volf, 2007)

Řád *Eugregarinida* je druhově nejpočetnějším ze tří řádů třídy *Gregarinea*. Jedná se o monoxenní parazity především kroužkovců *Annelida* a členovců *Arthropoda*. Kromě časných stadií žijí jako extracelulární parazité. *Eugregarinida* jsou hostitelsky a tkáňově specifictí paraziti. Zástupci tohoto řádu se vyživují osmotrofně nebo pinocytózou (Horák a Volf, 2007). Pro svou velikost

jsou gregariny často používány jako demonstrační objekty v zoologii a parazitologii (Langrová et al., 2010).

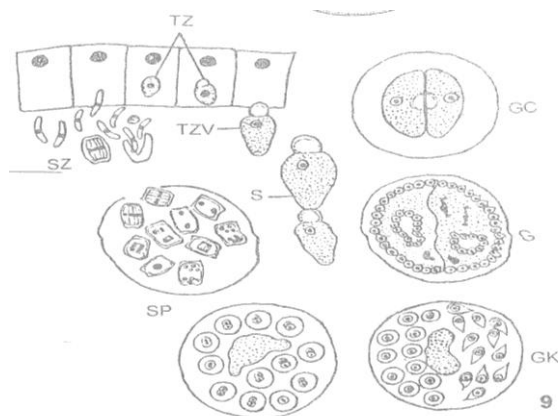
Zástupci kmene výtrusovci (*Apicomplexa*) mají velmi složité vývojové cykly se třemi rozmnožovacími fázemi životního cyklu:

- 1) merogonie (schizogonie)
- 2) gametogonie
- 3) sporogonie

U řádu Eugregarinida neexistuje merogonie (schizogonie) ve vegetativní fázi vývoje (Horák a Volf, 2007). Hlavním a primitivním znakem třídy hromadinky – gregariny (*Gregarinea*) je mnohonásobné dělení samčích i samičích gamontů, při němž se vytvoří přibližně stejný počet gamet samčích i samičích (Hausmann a Hülsmann, 2003). Vegetativní stadium gregarin – trofozoit (zoit) je v podstatě obrovsky zvětšený sporozoit, který se přemísťuje typickým klouzavým pohybem v dutině tělních orgánů svých hostitelů (převážně lumen střeva). Dle posledních teorií se ukazuje, že gregariny se pohybují působením aktinomyozinového systému pomocí kontraktilních filament (Langrová et al. 2010). Trofozoit je buňka značných rozměrů (200 μ m – 10mm), která je fibrilárními septy rozčleněna na tři části:

- 1) epimerit (gregarina je jím vnořena do hostitelské buňky a je druhově specifický)
- 2) protomerit
- 3) deutomerit

Trofozoiti se po fázi růstu uvolňují z hostitelské buňky a stávají se z nich tzv. gamonti (presexuální stadia). Poté se dva gamonti k sobě přikládají, epimerity se ztrácejí (resorbují se) a vznikají tzv. syzygie dvou partnerských buněk – protomerit zadní buňky (satelit) a deutomerit přední buňky (primit). Poté encystují v kulovitý útvar – gametocysta, kde se z jednoho gamontu uvolňují samčí gamety a z druhého gamontu samičí gamety, které spolu kopulují, vzniká zygota, která se obaluje silnou stěnou. Postupnou přeměnou se zygota mění na oocystu – obsahuje sporozoity, viz obr. 2 (Hausmann a Hülsmann, 2003; Horák a Volf, 2007).



Obr. 2: Vývojový (životní) cyklus druhů rodu *Gregarina*: SZ – průnik sporozoitů uvolněných ze spor do buněk střevního epitelu, TZ – trofozoiti v buňkách střevního epitelu, TZV – trofozoit uvolňující se z buňky, S – syzygie, GC – vznik a encystace gametocytů, G – tvorba gamet (gametogeneze), GK – kopulace gamet a vznik oocysty, SP – vznik spor obsahující sporozoity (převzato a upraveno dle Sedláka, 2002).

Hromadinka švábí (*Gregarina blattarum*) žije ve střevě švábů. *Gregarina polymorpha* a *Gregarina cuneata* žije v moučných červech (larvy potemníka moučného – *Tenebrio molitor*). Druh *Gregarina cuneata* jsou nejčastěji napadány laboratorní chovy brouků potemníka moučného – *Tenebrio molitor* (Langrová et al., 2010). V moučných červech *Tenebrio molitor* se vyskytují ještě dva druhy řádu *Eugregarina* – *Gregarina steinii* a *Steinina ovalis*. (Jírovec, 1953; Horák a Volf, 2007).

Morfologický popis získaných druhů gregarin (Matis a Valigurová, 2000) – internetový zdroj (1)

Gregarina cuneata

- podlouhlá hromadinka, nejširší v poslední třetině konce těla, vysoký cylindrický protomerit, přepážka mezi protomeritem a deutomeritem zřetelná, ale zúžení téměř nepatrné nebo zcela chybí, má kulaté a dobře viditelné jádro, epimerit bývá zpravidla na konci zaoblený, cytoplasma protomeritu i deutomeritu bývá hustě granulována
- kosmopolitní druh, nejčastěji se vyskytuje v larvách i dospělých jedincích potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)

Gregarina polymorpha

- vyskytuje se v mnoha formách, nejčastěji má prodloužený cylindrický tvar, protomerit je kopulovitý nebo polokulatý, deutomerit je cylindrický a vzadu široce zaoblený, epimerit je jednoduchý a malý, lze jej pozorovat pouze u

mladších stadií, jádro je kulovité a obvykle se nachází v druhé polovině deutomeritu, obvykle jej není možno pozorovat z důvodu husté zrnitosti cytoplasmy

- kosmopolitní druh, nejčastěji se vyskytuje v larvách i dospělých jedincích potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)

Gregarina blattarum

- tento druh je tvarově velmi rozmanitý, u jednotlivých jedinců může mít též různé rozměry, cytoplazma je velmi silně granulovaná až nepřehledná, septum mezi protomeritem a deutomeritem je jednoduché, protomerit může mít různé tvary (kulovitý, čtvercový, apod.), deutomerit je většinou cylindrický
- kosmopolitní druh gregariny vyskytující se v různých druzích švábů, v hostiteli se tyto gregariny nejčastěji vyskytují ve formě syzygie dvou gamontů, ale mohou se též vyskytovat asociace tří gamontů do jedné syzygie

2.1.1.5. Hromadinka žížalí (*Monocystis lumbrici*, syn. *Monocystis agilis*)

Zařazení v systému (Horák a Volf, 2007)

Druh *Monocystis lumbrici* patřící do stejného řádu *Eugregarinida* jako výše uvedené druhy gregarin, má i stejný životní cyklus. Podstatně se však liší stavbou trofozoitu. V buňce se nevyskytují septa rozdělující zoit na tři oddíly jako u gregarin ze skupiny *Septatina*, ale buňka je oválná nebo kulovitá s tzv. mukronem v přední části zoitu (jednoduchý váček), který slouží k přichycení v hostitelské buňce. Spory bývají na koncích stejnoměrně zúžené (podobné křemičitým schránkám rozsivek rodu *Navicula*) a jsou bez výběžků (Horák a Volf, 2007).

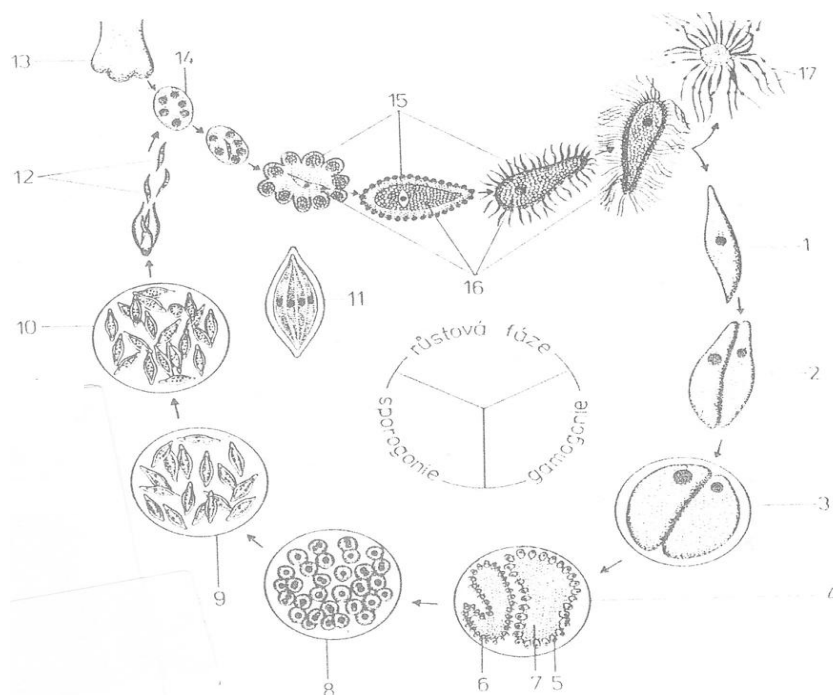
Monocystis lumbrici parazituje v semenných váčcích žížal obecných (*Lumbricus terrestris*), kde vysává jejich spermatofoxy a zbylé spermie je pak kryjí jako nějaké brvy. (Jírovec, 1953).

Morfologický popis *Monocystis lumbrici* (Matis a Valigurová, 2000) – internetový zdroj (1):

- tělo nečleněné na epimerit, protomerit a deutomerit, dospělá hromadinka žížalí ve střední části širší, na koncích zašpičatělá, v širší střední části jsou v cytoplasmě nahromaděná zrníčka, která se při pohybu přemísťují, a tím nabývá její buňka různých tvarů, cysty obsahují velké množství spor

vřetenovitého tvaru, cytoplasma je hyalinní, obsahuje malé množství granul, jádro je okrouhlé, při pohybu téměř oválné

- vyskytuje se v semenných vajíčkách zástupců čeledi *Lumbricidae*



Obr. 3: Vývojový (životní) cyklus zástupců rodu *Monocystis*: 1 – tofozoit, 2 – gamonti, 3 – syzygie gamontů v cystě, 4 – tvorba gametů (5 – makrogametů, 6 – mikrogametů), 7 – zbytkové těleso, 8 – kopulace gametů a tvorba zygot, 9 - tvorba sporocyst, 10 – zrání sporocyst, 11 – zralá sporocysta se sporozoity, 12 – uvolnění sporozoitů ze sporocysty, 13 – semenný vajíček žížaly, 14 - cytofor (centrální protoplazmatický sloupek, na kterém jsou uchyceny samčí pohlavní buňky), 15 – vývojová stadia spermii u žížaly, 16 – trofozoit mladé hromadinky, 17 – cytofor se spermatozoidy žížaly (převzato dle Buchara, 1993).

2.1.1.6. Kokcidie (*Eimeria spp.*) – fotografie v příloze 6

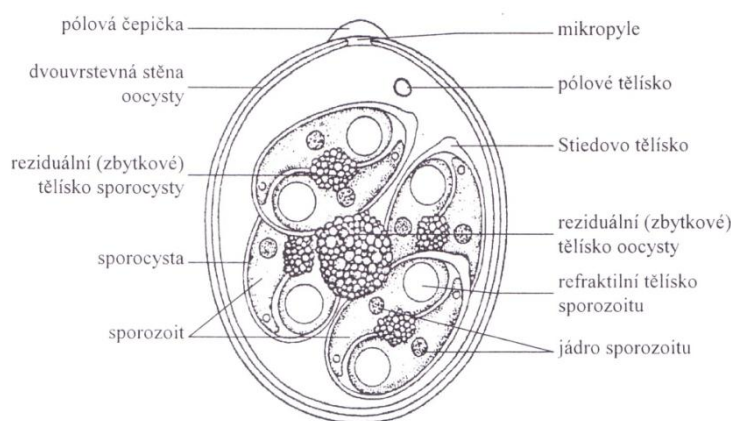
Zařazení v systému (Horák a Volf, 2007); charakteristika dle publikací: Černá, 1983; Chroust, 1998; Horák a Volf, 2007

Druhy třídy *Coccidea* jsou převážně intracelulárními endoparazity a od předchozího řádu *Eugregarida* se liší především absencí mukronu či epimeritu. Během rozmnožování kokcií je kromě gamogonie a sporogonie přítomna ve vegetativní fázi vývoje merogonie na rozdíl od předchozích druhů řádu *Eugregarinida*. Systematické rozdělení kokcií závisí především na tom, zda před gamogonií dochází či nedochází k syzygii (Horák a Volf, 2007).

Další popis je zaměřen jen na charakteristiku řádu *Eimerida* a především čeledi *Eimeriidae*, kam je systematicky řazen získaný druh kokcidie *Eimeria spp.*

Pro zástupce řádu *Eimeriida* jsou charakteristické následující znaky: syzygie gametocytů chybí, gamety jsou morfologicky značně odlišné. Pro určení jednotlivých rodů řádu *Eimeriida* dle určovacích klíčů jsou důležité tyto determinační znaky: počet sporocyst v oocystě, počet sporozoitů ve sporocystách, morfologie oocyst a sporocyst, typ hostitele a životního (vývojového) cyklu, tkáňová a orgánová specifita (Horák a Volf, 2007) a délka sporulace za standardních podmínek (Chroust, 1998). Čeleď *Eimeriidae* je nejpočetnější a zároveň rodově i druhově nejbohatší skupinou s obligátně jednohostitelským (monoxenním) typem vývojového cyklu. Tato čeleď zahrnuje 18 rodů obligátních intracelulárních jednobuněčných parazitů a několik druhů parazitů u bezobratlých živočichů (Chroust, 1998). Typickými určovacími znaky pro zařazení kokcií do čeledi *Eimeriidae* dle určovacích klíčů (Černá, 1983; Chroust, 1998) jsou nevysporulované oocysty vycházející z hostitele a otevírání sporocyst rozpuštěním Stiedova tělíska.

Oocysty druhu *Eimeria* spp., které byly nalezeny v trusu ovce, patří do rodu *Eimeria*, který je typickým zástupcem čeledi *Eimeriidae*. Do tohoto rodu patří většina ekonomicky významných parazitů domácích zvířat. Kromě gastrointestinálního traktu parazitují kokcie také v játrech, žlučníku a ledvinách různých druhů živočichů. Charakteristická stavba a tvar oocyst rodu *Eimeria* je zobrazen na obr. 4. Rod *Eimeria* má oocysty se 4 sporocystami, každá sporocysta obsahuje dva sporozoity, typický je monoxenní (jednohostitelský) vývojový cyklus. Celkem je popsáno přibližně 1200 druhů kokcií.



Obr. 4: Charakteristická stavba a tvar oocyst rodu *Eimeria* (převzato dle Chrousta, 1998)

Vývojový (životní) cyklus kokcií rodu *Eimeria*

Popsáno dle publikace: Chroust, 1998.

Vývojový cyklus jednohostitelských druhů rodu *Eimeria* můžeme rozdělit na 4 hlavní fáze:

1. Excystace
2. Merogonie (schizogonie)
3. Gametogonie
4. Sporogonie

Sporogonie

Finální část vývojového cyklu, jehož konečným stadiem je infekční endogenní stadium, tzv. oocysta. Oocysty jsou relativně snadno diagnostikovatelné v trusu zvířat, a proto jedno ze základních kritérií rozdělení zástupců čeledi *Eimeriidae* do jednotlivých rodů (*Eimeria*, *Isospora*, *Wenyonella*, *Tyzzeria*, *Caryospora*).

V procesu sporogonie dochází k uvolnění oocysty z hostitelské buňky a k jejímu dělení v následujícím sledu: sporont – sporoblast – sporozoit (infekční stadium). Termínem sporulace je označován proces přeměny jednobuněčného sporontu na zralou, infekce schopnou oocystu. Sporulace může být exogenní (u většiny druhů kokcií), ke které dochází za příznivých podmínek ve vnějším prostředí. Druhým typem sporulace je endogenní, kdy jsou v trusu hostitele vylučovány již zralé a infekce schopné oocysty.

Excystace

Jedná se o proces, kdy po pozření infekční vysporulované oocysty vhodnými hostiteli dochází k uvolnění sporozoitů z oocyst. Faktory ovlivňující excystaci jsou: tělesná teplota hostitele, koncentrace oxidu uhličitého, redukční potenciál, žlučové kyseliny a trypsin.

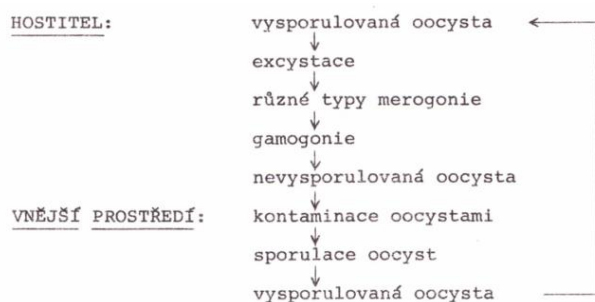
Merogonie (syn. schizogonie)

Merogonie je druh nepohlavního rozmnožování, při kterém dochází k rozpadu jádra mateřské buňky na množství dceřinných buněk. Merogonie (schizogonie) se mohou i několikrát opakovat, ale u většiny druhů kokcií je počet merogoniálních generací víceméně konstantní (u rodu *Eimeria* se většinou pohybuje mezi 2 – 4. Merogonie začíná penetrací (průnikem) sporozoitů do buněk hostitele, kde se sporozoity zakulacují a mění se na jednojaderný meront (syn. schizont, trofozoit). Pro řadu druhů rodu *Eimeria* je typická tvorba tzv. globidií (obrovských, makroskopicky patrných merontů).

Důležitou roli při penetraci sporozoitů do hostitelské buňky přes buněčnou membránu hrají orgány apikálního komplexu – polární prsteneček, konoid, rhoptrie, mikronema a subpelikulární mikrotubuly. Uvnitř merontu dochází k tzv. endopolygonii (mnohočetné mitotické dělení), při kterém dochází ke vzniku tzv. merozoitů (rohličková stadia).

Gametogonie

Gametogonie (syn. gamogonie, gametogeneze) je stadium pohlavního množení kokcií (tvorba a zrání) gamet. Merozoiti poslední generace se po penetraci do hostitelské buňky transformují na tzv. gamonty – mikrogamonty (samčí) a makrogamonty (samičí), které jsou morfologicky velmi odlišné. Po oplodnění makrogamontu mikrogamontem vzniká zygota, která je nepohyblivá a vylučuje kolem sebe silnou stěnu. Ta nejdříve opouští hostitelskou buňku a následně i organismus hostitele, dostává se do vnějšího prostředí a celý vývojový cyklus se opět opakuje (viz obr. 5).



Obr. 5: Schéma vývojového (životního) cyklu kokcie rodu *Eimeria* (převzato dle Černé, 1983).

Eimeria spp. nalezené v trusu ovce byly určeny dle determinačních znaků určovacích klíčů pro diagnostiku oocyst kokcií (Černá, 1983; Chroust, 1998). Jelikož některé determinační znaky (mikropyle, mikropylová čepička, nevysporulované sporocysty) u nalezeného druhu rodu *Eimeria* v trusu ovce byly špatně identifikovatelné, nemusí být určení druhu zcela správné. Pravděpodobně se jedná o druh *Eimeria ninakohlyakimovae* (syn. *E. ovinoidalis*) dle rozměrů oocyst (27 x 22µm) a eliptického až vejčitého tvaru oocysty. U ovcí a muflonů se jedná o nejčastější a nejvíce patogenní druh rodu *Eimeria*. Mikropylová čepička nebyla vytvořena a mikropyle nebylo příliš zřetelné.

2.1.2. Parazitičtí helminti

Již v úvodu této kapitoly (viz výše) bylo uvedeno, jak různorodou skupinu živočichů zahrnují helminti. Všichni získaní a pozorovaní helminti v této diplomové práci patří do kmene *N e m a t h e l m i n t h e s* (oblí hlísti), konkrétně do třídy hlístic

(*Nematoda*). Třída *Nematoda* je jednou z nejpočetnějších, nejrozšířenějších a velmi rozmanitou skupinou helmintů. Zahrnuje jednak druhy volně žijící (v půdě, ve vodě), jednak formy žijící paraziticky. Druhy hlístic žijící parazitickým způsobem života napadají především obratlovce (doposud popsáno téměř 20 tisíc druhů hlístic). Mohou být i parazity bezobratlých (v této práci nalezený druh hlístice z čeledi *Thelastomatiidae* ve střevě švába velkokřídlého – *Archimandrita tessellata*) a rostlin – fytonematoda (např. háďátko řepné – *Heterodora schachtii*).

Základní charakteristika třídy *Nematoda* (Horák a Scholz, 1998):

Tělo bývá protáhlé, nesegmentované, většinou nit'ovitého, válcovitého nebo vřetenovitého tvaru. Většina parazitických hlístic má oddělené podhlaví (gonochoristé) s trubicovitými pohlavními orgány. Častý je pohlavní dimorfismus, kdy samička zpravidla dorůstá větších rozměrů než sameček. Tělní dutina hlístic je prvotní, pseudocoelního nebo schizocoelního typu. Dobře je vyvinuta trávicí soustava, část živin mohou některé hlístice přijímat i povrchem těla.

Vývojové cykly parazitických hlístic

2 typy:

- monoxenní (vývoj přímý) – geohelminți
- heteroxenní (ve vývoji se účastní mezipřihostitel) – biohelminți

Systematika a fylogenetické vztahy a zařazení hlístic nejsou doposud v rámci ostatních mnohobuněčných organismů (*Metazoa*) dostatečně vyřešeny (Horák a Volf, 2007). Ačkoliv jsou hlístice tradičně řazeny jako třída *Nematoda* do kmene *Nemathelminthes* (nebo *Aschelminthes*), jejich postavení neodpovídá skutečným fylogenetickým vztahům s ostatními zástupci tohoto kmene a výrazně se odlišují od prakticky všech metazoi, včetně plathelminťů (Horák a Scholz, 1998).

2.1.2.1. Zubovka (*Oesophagostomum spp.*) – fotografie v příloze 8

Zařazení v systému a charakteristika dle publikací: Horák a Scholz, 1998; Horák a Volf, 2007.

Je cizopasníkem tlustého střeva přežvýkavců a prasat. Patří mezi zástupce čeledi *Oesophagostomatiidae* (zubovky), která patří do řádu *Strongylida*.

Larvy rodu *Oesophagostomum* prodělávají vývoj ve stěně střeva v tzv. submukózních nodulech. Ústní kapsula dospělých jedinců je redukována a tenkostěnná, kutikula hlavové části tvoří typický útvar v podobě kápě. Významnou charakteristikou řádu

Strogylida je mohutná komplexní ústní kapsula s útvarem corona radiata (lístkové kutikulární struktury kolem labiálního otvoru) a trojlaločná kopulační burza u samců na kaudálním konci těla.

K nákaze hostitele dochází převážně perorálně (pozřením infekční larvy s potravou). U některých druhů dochází k nákaze též cestou perkutánní (průnikem přes kůži). Vývoj je přímý (bez mezihostitele), jedná se tedy o geohelminta. *Oestophagostomum spp.* způsobuje u zvířat silná průjmovitá onemocnění, poruchy trávení, v případě neléčení i úhyny dobytka.

Oestophagostomum spp. bylo prokázáno v infikované stolici ovce, která obsahovala vajíčka této hlístice z rodu *Oestophagostomum*, jež jsou chráněna pouze velmi tenkým obalem. Přítomnost vajíček druhu *Oestophagostomum spp.* v infikovaném trusu ovce byla zachycena v různé fázi rozrýchování.

2.1.2.2. čeled' Thelastomatiidae – fotografie v příloze 11

Zařazení v systému dle mezinárodní encyklopedie BioLib (internetový zdroj (2)).

Parazitický druh hlístice z čeledi *Thelastomatiidae* byl získán zcela náhodně při pitvě švába velkokřídleho (*Archimandrita tessellata*) za účelem získání prvoka brvitky švábové (*Lophomonas blattarum*) z trávicí trubice švába. Stupeň parazitace tímto druhem hlístice byl velmi masivní, nejen v trávicí trubici, ale i v celé tělní dutině švába. V české literatuře se autoři o těchto druzích hlístic ani o čeledi samotné nezmiňují, a proto byla determinace této hlístice provedena na základě webového klíče dle K. B. Nguyen (internetový zdroj (3)).

Do čeledi *Thelastomatiidae* patří 6 různých rodů, které byly shromážděny při výzkumu švábů velkokřídlejších v letech 2003 – 2006 na Kostarice (internetový zdroj (4)). Vzhledem k velké podobnosti jednotlivých rodů byla provedena determinace hlístic z trávicího ústrojí švába velkokřídlejšího pouze do taxonomické kategorie na úrovni čeledi. Hlístice z čeledi *Thelastomatiidae* byly také nalezeny v trávicí trubici a tělní dutině při pitvě nymfy švába pestrého (*Eublaberus distantis*).

Čeled' *Thelastomatiidae* patří do řádu *Oxyurida*, kam patří kromě druhů hlístic silně parazitických též druhy s malým či žádným patogenním účinkem. U některých druhů lze dokonce uvažovat o komenzálismu, což je pravděpodobně i případ hlístic z čeledi *Thelastomatiidae* nalezených v tělní dutině a trávicí trubici

pitvaných švábů. Zástupci řádu *Oxyurida* jsou většinou úzce hostitelsky specifictí (Horák a Volf, 2007).

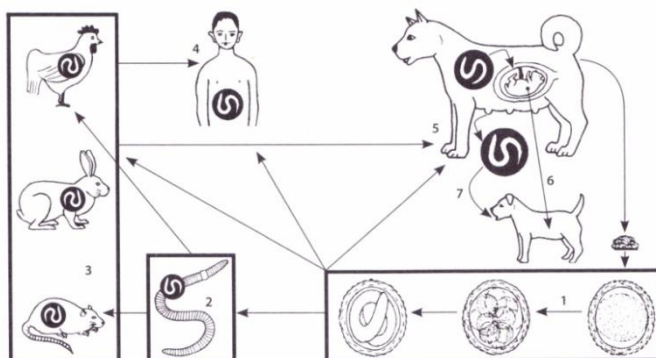
2.1.2.3. Škrkavka psí (*Toxocara canis*) – fotografie v příloze 9

Zařazení v systému a charakteristika: Horák a Scholz, 1998; Horák a Volf, 2007.

Škrkavka psí (*Toxocara canis*) je druh hlístice z řádu *Ascariida* parazitující u psovitých šelem. Jedná se o druhy hlístic parazitujících u všech tříd obratlovců. Obvykle obývají střevo nebo žaludek hostitelů a živí se jejich tráveninou.

Druh *Toxocara canis* byl identifikován ve formě silnostěnných vajíček v infikovaném trusu psa. Velmi častým jevem ve vývojovém cyklu *Toxocara canis* je tzv. amfiparateneze, kdy se larvy škrkavek aktivují v období březosti a laktace fen a následně migrují do plodů. Štěňata se tak rodí již infikovaná nebo se larvami škrkavek nakazí z mateřského mléka fen, kam larvy škrkavek domigrovaly. Jedná se o typický vertikální přenos na hostitele (z rodičů na potomstvo). Častým jevem u druhu *Toxocara canis* je tzv. paratenický (rezervoárový) parazitismus. K nákaze paratenických hostitelů včetně člověka dochází vajíčky s infekční larvou, která se vyvíjí ve vnějším prostředí nebo pozřením již nakažených paratenických hostitelů. K nákaze definitivních hostitelů dochází stejným způsobem jako u paratenických hostitelů.

Toxocara canis představuje rovněž nebezpečí pro člověka, na kterého je tento druh přenosný a způsobuje tzv. larvální toxokarózu, tj. infekční larvy vylíhnuté z vajíček migrují tělem a poškozují různé orgány, zejména plíce, známy jsou také případy oční a cerebrální toxokarózy (viz obr. 6).



Obr. 6: Vývojový (životní) cyklus škrkavky psí (*Toxocara canis*): 1 – vajíčka v infikovaném trusu, vývoj larvy ve vaječných obalech ve vnějším prostředí, 2-4 – nákaza paratenických hostitelů včetně člověka, ke které dochází vajíčky s infekční larvou či pozřením již nakaženého paratenického hostitele, 5 – nákaza definitivního hostitele (stejným způsobem jako u paratenického hostitele), 6 – v těle fen mohou larvy prodělávající somatickou migraci infikovat plod transplacentárně, 7 – nákaza štěňat migrujícími larvami transmamárně při kojení (převzato a upraveno dle Horáka a Volfa, 2007).

2.1.2.4. Tenkohlavec ovčí (*Trichuris ovis*) – fotografie v příloze 10

Zařazení v systému a charakteristika: Horák a Scholz, 1998; Horák a Volf, 2007; Koudela, 2007

Druh *Trichuris ovis* je zástupcem čeledi *T r i c h u r i d a e*, která spadá do řádu *E n o p l i d a* zahrnující jak parazitické formy hlístic, tak formy volně žijící. Rod *Trichuris* žije ve střevě hostitele, kde se živí hostitelovými živinami, čímž mu způsobuje závažné onemocnění projevující se úpornými průjmy, kdy může dojít až k vyhřeznutí konečníku. Onemocnění způsobené tímto parazitem se nazývá trichurióza. Dospělé hlístice žijí ve střevě hostitele 5 – 6 měsíců. Mají bělavou barvu a vyznačují se vláskovitým předním koncem těla a silnějším zadním koncem.

Rodové jméno *Trichuris* je etymologicky nesprávné, neboť vychází z mylné představy, že tenká nitkovitá část těla představuje ocásek (thrix – vlas, ura – ocas). Věcně správnější je tedy později navržený rodový název *Trichocephalus* (cephalea – hlava), který je používán v odborné literatuře jako synonymum k rodovému označení *Trichuris* (Koudela, 2007).

Samička tenkohlavce denně vyloučí 2000 – 12000 vajíček, která odcházejí z hostitelova těla nerozrýhovaná. Vajíčka jsou infekční až v období, kdy obsahují larvu v prvním vývojovém stadiu (instaru). Vajíčka jsou typicky silnostěnná, tvarem připomínají protáhlejší citron se dvěma pólovými zátkami. Mají žluté až hnědavé zbarvení. Vývoj zástupců rodu *Trichuris* je přímý, bez mezihostitele (geohelmit). Vývoj larvy probíhá ve vajíčku mimo hostitele ve vnějším prostředí a závisí na teplotě a vlhkosti. Vajíčka tenkohlavců jsou velmi odolná vůči vlivům vnějšího prostředí a infekční zůstávají po mnoho let.

Dle současných studií je prokázáno, že tenkohlavci svými enzymy formují v epitelu tlustého střeva syncytium (buněčný celek), jehož cytoplazmou se živí. Mechanismus patogenního působení spočívá v tom, že nakažený hostitel je sužován produkty metabolismu parazita. Při silných infekcích je porušena propustnost krevních kapilár ve střevní sliznici. Celkově se infekce projevuje podvýživou, která může skončit až hostitelovou smrtí (Koudela, 2007).

Silnostěnná vajíčka *Trichuris ovis* byla nalezena v infikovaném trusu ovce a determinována dle diagnostického klíče vajíček a larev hlístic přežvýkavců (Lukešová, 1990).

2.2. Ektoparazité

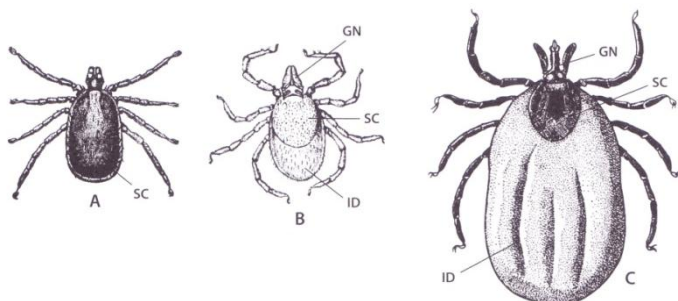
2.2.1. Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) – fotografie v příloze 12

Zařazení a charakteristika dle: Horák a Volf, 2007.

Druh *Ixodes ricinus* se vyskytuje na území ČR ve volné přírodě téměř výhradně zejména v listnatých a smíšených lesích s křovinatým podrostem. Amplituda výskytu *Ixodes ricinus* je v období mezi V. – IX. měsícem v nížinách a pahorkatinách.

Ixodes ricinus má tříhostitelský cyklus, který trvá cca tři roky (každé stadium se vyvíjí zhruba jeden rok). Larvy a nymfy tohoto druhu parazitují na těle drobných hlodavců, ptáků a ještěrek, nymfy mohou parazitovat navíc i na vyšších obratlovcích. Dospělé samičky *Ixodes ricinus* sají krev na těle větší lesní zvěře, domácích kopytníků a psů. Člověk je hostitelem všech tří vývojových stadií *Ixodes ricinus* – larev, nymf i dospělých samiček - (Horák, P. a Volf, P. 2007). Vědecký druhový název ricinus je odvozen od podoby nasáté samičky s ricinovým bobem (internetový zdroj (5)).

Nebezpečný pro člověka je druh *Ixodes ricinus* zejména proto, že je přenašečem viru klíšťové meningoencefalitidy, bakterie *Borrelia burgdorferi* – původce lymeské boreliózy a prvoka klíštěnky (*Babesia bovis*), který je původcem infekčních onemocnění domácích zvířat (zejména hovězího dobytka).



Obr. 7: Klíště obecné (*Ixodes ricinus*): A – dospělý ♂, B – dospělá ♀ nenasátá, C – dospělá ♀ nasátá; GN – gnathosoma, SC – scutum, ID – idiosoma; (převzato dle Horák a Volf, 2007).

2.2.2. Kloš jelení, „lojnice“, jelení moucha (*Lipoptena cervi*) – fotografie v příloze 13

Zařazení v systému a charakteristika dle: Horák a Volf, 2007

Čeď *Hippoboscidae* (klošovití) je poměrně malou skupinou čítající cca 150 druhů. Typickým znakem, podobně jako u mouchy tse-tse, je způsob rozmnožování, který se nazývá adenotrofní viviparie. Jedná se o zvláštní druh viviparie, kdy samička

neklade vajíčka ani malé larvy. Své potomky si ponechává v těle po značnou část larválního vývoje. Vývoj larev probíhá ve speciálně upravené, roztažitelné vagině (obdoba dělohy), kde jsou vyživovány „mléčným“ výměškem (bohatým na proteiny) z přídatných žláz. Mladší larvy získávají kyslík ze stěny „dělohy“ bohatě prostoupené vzdušnicemi, starší larvy se řadí vedle sebe se zadečky otočenými k pohlavnímu otvoru a dýchají vzdušný kyslík. Uvnitř „dělohy“ se larva vyvíjí až do třetího larválního instaru. Samice rodí dospělé larvy, které se hned proměňují v pupária (kuklí se) - (Horák a Volf, 2007; internetový zdroj (6)).

Hippoboscidae (klošovíti) jsou parazité ptáků (rod *Ornithomyia*), vysoké zvěře (rod *Lipoptena*, kopytníků (rod *Hippobosca*), ale i netopýrů a domácích zvířat. Některé druhy klošů lze považovat za permanentní parazity, neboť jsou velmi dobře adaptováni k životu na tělech svých hostitelů – zploštělé tělo, silná sklerotizace umožňující značnou odolnost vůči mechanickému poškození a silné končetiny. Typickým příkladem takového kloše je kloš ovčí (*Melophagus ovinus*).

Druh *Lipoptena cervi* je parazitem vysoké zvěře v lese. V místech s hojnějším výskytem napadá i člověka, kde usedá v jeho vlasech či vousech. Silnou lidskou kůží však není schopen probodnout a krev tudíž člověku nesaje. Tento druh po nalezení svého hostitele ztrácí křídla. Druh *Lipoptena cervi* se vyskytuje ve smíšených lesích v pozdních letních a podzimních měsících.

2.2.3. Blecha kočičí (*Ctenocephalides felis*) – fotografie v příloze 13

Zařazení v systému (Horák a Volf, 2007)

Charakteristika (Ryšavý et al., 1988; Sedlák, 2002; Horák a Volf, 2007)

Blechy jsou vývojově pokročilý a sekundárně bezkřídlý hmyz z řádu *Siphonaptera* (syn. *Aphaniptera*). Nelze jednoznačně stanovit jejich fylogenetický původ ve vývoji hmyzu. Předpokládá se, že pocházejí z dvoukřídých, síťokřídých či ze srpic. V dospělosti se jedná o výlučně cizopasný hmyz (převážně hematofágní ektoparazité ptáků – 6% druhů a savců – 94% druhů včetně člověka). Cizopasným způsobem života jsou blechy morfologicky značným způsobem pozměněny na rozdíl od neparazitických druhů hmyzu. Jejich tělo je laterálně zploštělé aerodynamického tvaru. Tělní pokryv mají blechy silně sklerotizovaný včetně kýlovité hlavy, což jim umožňuje rychlý pohyb v srsti nebo peří hostitele. Různé brvy a trny na povrchu těla i hlavy uspořádané v řady (hřebínky) – tzv. ktenidia slouží blechám pro

lepší fixaci na hostiteli. Ktenidia se liší svou skladbou a počtem mezi jednotlivými rody blech. Zvláště u dvou velmi podobných druhů blech *Ctenocephalides canis* (blecha psí) a *Ctenocephalides felis* (blecha kočičí) je počet a skladba ktenidií jedním z důležitých determinačních znaků. Dalším charakteristickým znakem dospělých blech je třetí pár nohou, který je delší, svalnatější a skákavý. Uvnitř třetího páru mohutných končetin jsou uloženy polštářky zvláštní hmoty bílkovinné povahy, tzv. resilin. Po jejím stlačení vydává během krátkého intervalu velké množství energie potřebné ke skoku. Ústní ústrojí blech je bodavě sací.

Životní (vývojový) cyklus blech

Blechy jsou hmyz s proměnou dokonalou, tj. larva – kukla – imago (viz obr. 8). Larvy jsou protáhlé, apodnní (beznohé) s dobře vyvinutou hlavou (eucefalní) a s kousacími orgány. Larvální stadia (instary) blech žijí v příbytcích svých hostitelů (hnízda, boudy, pelechy, doupata, apod.), kde se živí organickým detritem i trusem dospělých blech. Stadium larvy prochází třemi instary a poté se kuklí v hedvábném zápředku (kokonu), který si tvoří z lepkavého sekretu ústních žláz. Na lepkavá vlákna kokonu se přichycuje drobný materiál z hnízda hostitele, který jednak plní funkci maskovací a jednak chrání kuklu před vyschnutím. Stadium kukly (pupa exarata, libera) trvá několik dnů až týdnů, popř. i měsíců. Líhnutí dospělých blech (imág) z kukel je vyvolané většinou mechanickými podněty zvenčí (např. návratem hostitelů do svých příbytků) a bývá velmi masové.



Obr. 8: Životní cyklus blech *Ctenocephalides felis* a *Ctenocephalides canis* (upraveno dle internetového zdroje (7))

V ČR je zjištěn výskyt více jak sta druhů blech, celkem je známo asi 2000 druhů blech. Blechy nejsou na své hostitele zpravidla vázány tak úzce jako vši nebo všenky a jsou schopné přežívat dlouhodobě i bez hostitele (budky ptáků po jejich odletu). Z toho plyne, že hostitelská specifita blech nebývá vždy vyhraněná a jednotlivé druhy lze najít na hostitelích spíše podle míst výskytu hostitele. Mohou tedy poměrně snadno přecházet z jednoho hostitelského druhu na jiný. Blechy vytvářejí tzv. aphanipteria, neboli pásma hostitelského rozšíření.

Sání krve blechy na hostiteli je poměrně bolestivé a může vyústit i v silnou alergii u hostitele. Kromě toho jsou blechy přenašeči mnoha bakteriálních onemocnění, např. moru, bartonelózy koček, ale i viróz (blechy jsou vektory myxomatózy králíků). U hlodavců přenášejí blechy několik druhů trypanosom (parazitický prvok). Jsou rovněž přenašeči některých parazitických helmintů, např. druhu *Dipylidium caninum* ze třídy *Cestoda*.

V této diplomové práci byl determinován druh *Ctenocephalides felis* dle určovacího klíče (Kolářové et al., 3. lékařské fakulty přístupného na internetových stránkách (internetový zdroj (8)), který byl získán ze srsti kočky. I když se tento druh vyskytuje převážně na kočkách, žije spokojeně i na psech. Blecha psí (*Ctenocephalides canis*) na kočkách tak snadno nepřežívá. V důsledku toho může blecha kočičí blechu psí vytlačit. Blecha kočičí není na světě nejčastějším druhem blech. V některých zemích, jako je Řecko, Nový Zéland nebo Irsko je převažujícím druhem blech na psech blecha psí (převzato z internetového zdroje (9)). Blecha psí (*Ctenocephalides canis*) může snadno přecházet i na člověka, zatímco blecha kočičí (*Ctenocephalides felis*) na člověka přechází jen velmi zřídka (Ryšavý a kol. 1988).

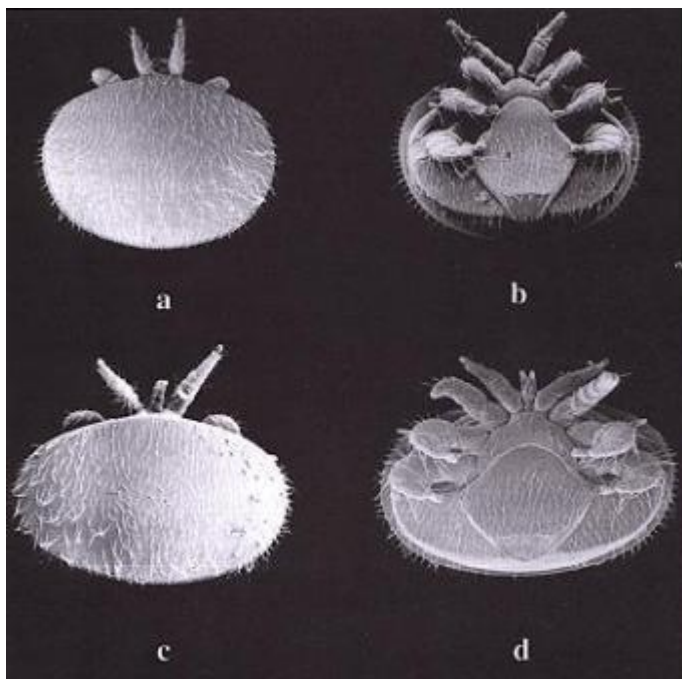
2.2.4. Kleštík včelí, včelík zhoubný (*Varroa destructor*) – fotografie v příloze 12

Zařazení v systému a charakteristika dle publikace: Horák a Volf, 2007 a odborného článku (Přidal, 2007) přístupného z internetového zdroje (10)

Kleštík včelí (*Varroa destructor*) je zástupcem řádu *Acarina*, který způsobuje velmi nebezpečné onemocnění včelstev tzv. varroázu. Původně se vyskytoval druh *Varroa destructor* podobně jako všechny ostatní druhy rodů *Varroa* a *Euvarroa* pouze v Orientální oblasti, ovšem vinou člověka byl rozvlečen po celém světě, zejména pohybem a výměnou včelstev a včelích královen. Druhové označení destructor bylo

odvozeno podle toho, že je ze všech druhů čeledi *V a r r o i d a e* nejvíce patogenní. Saje hemolymfu jak u dospělých včel, tak u kukel a může způsobit postupný úhyn celých včelstev. Do Evropy byl kleštík včelí (*Varroa destructor*) zavlečen s největší pravděpodobností v roce 1967, na území naší republiky asi o deset let později. Dříve byla včelstva napadená tímto roztočem povinně likvidována spálením, dnes jsou do úlů napadených kleštíkem aplikovány různé akaricidní chemické látky (Taktik, Formidol, apod.).

Čeleď *V a r r o i d a e* zahrnuje dva rody: *Varroa* a *Euvarroa*. Do roku 1974 byl v této skupině znám pouze druh kleštík Jakobsonův (*Varroa jacobsoni*). Do roku 2000 byl i druh *Varroa destructor* považován za *Varroa jacobsoni*, neboť se nevědělo, že se jedná o dva odlišné druhy (viz obr. 9). Na základě měření a analýzy DNA u vybraných populací druhů rodu *Varroa* bylo zjištěno, že druh kleštíka *Varroa jacobsoni* se vyskytuje v asijské oblasti a druh rozvlečený z původně orientální oblasti rozvlečený po celém světě je druh kleštík doposud nepopsaný – *Varroa destructor* (Anderson a Trueman, 2000).



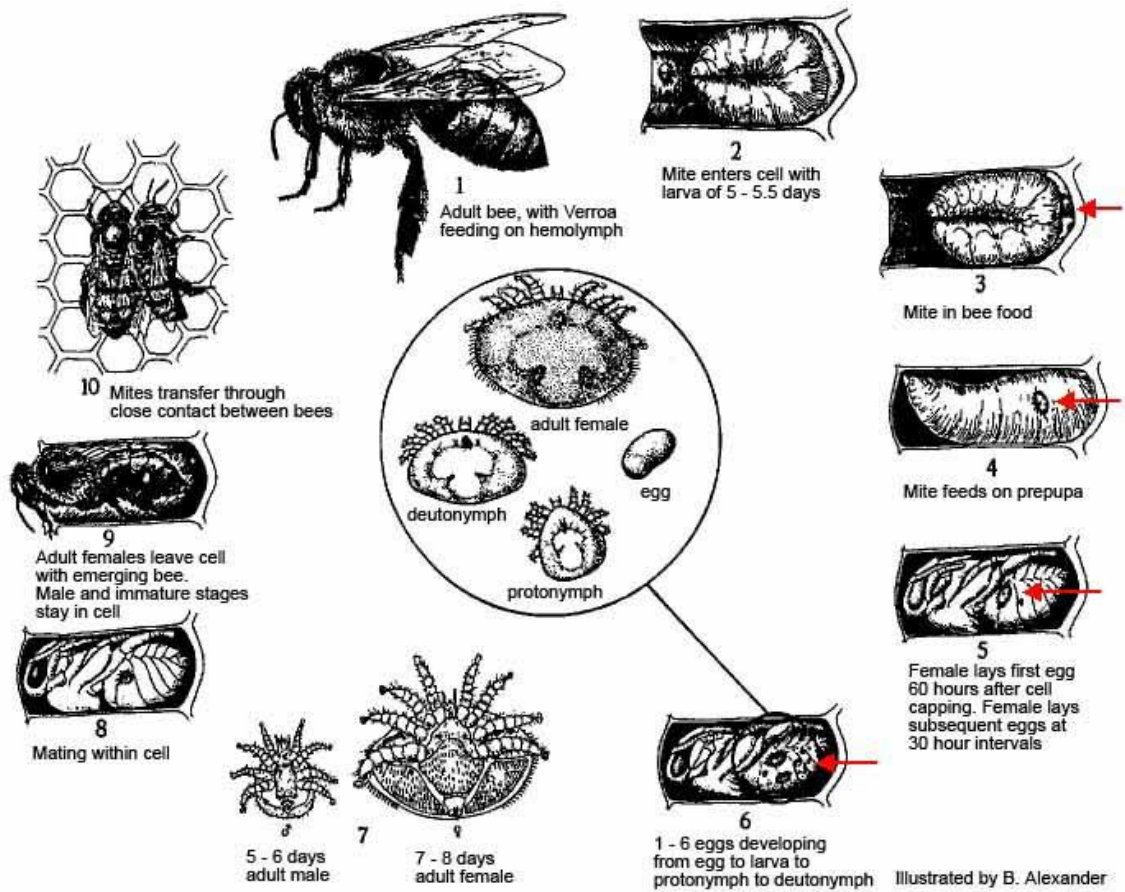
Obr. 9: Srovnání druhů *Varroa jacobsoni* (a, b) a *Varroa destructor* (c, d), převzato z internetového zdroje (11)

Morfologie kleštíka včelího (*Varroa destructor*)

- poměrně velký druh – cca 1,5mm, robustní, zbarvení světle hnědé
- hostiteli jsou dva druhy včel: včela indická (*Apis cerana*), včela medonosná (*Apis mellifera*)

Životní (vývojový) cyklus kleštíka zhoubného (*Varroa destructor*)

- oplozená samička kleštíka opouští hostitelskou včelu a vniká do nezavíčkované buňky plástve, která obsahuje larvu včelí dělnice nebo larvu trubce
- po zavíčkování buňky saje kleštík hemolymfu včelí kukly, na stěnu buňky včelí plástve klade samička kleštíka svá vlastní vajíčka – každá samička klade 5 – 6 vajíček a pouze z prvního vajíčka se vylíhne sameček
- z nakladených vajíček kleštíka se líhnou šestinohé larvy, které se následně mění na osminohé protonymfy a sají na včelí kukle
- po nasátí na včelí kukle se protonymfy mění na deutonymfy, které se svlékáním mění na dospělé jedince
- mladí jedinci kleštíka se páří ve shromaždišti výkalů, samečci po páření hynou v buňce
- oplodněné samičky kleštíka se přichytí na mladé vylíhlé včely a společně s nimi opouštějí buňku včelí plástve
- životní cyklus kleštíka včelího (*Varroa destructor*) v buňce včelí plástve trvá cca 12 dní (odpovídá i průměrné době vývoje včelí kukly) – viz obr. 10



Obr. 10: Životní cyklus roztoče kleštíka zhoubného (*Varroa destructor*), převzato z časopisu America Bee Journal, 1987 (dostupné z internetového zdroje (12)).

3. METODIKA

3.1. Tvorba totálních (celkových) mikroskopických preparátů

Parazitologický materiál jsem zpracovávala a vyšetřovala pokud možno vždy čerstvý. Totální (celkové) preparáty jsou takové, které prohlížíme a montujeme vcelku, např. roztoči, planktonní organismy, apod. (Lelláková, 1973; Jírovec, 1977).

Zhotovení nativních (čerstvých) mikroskopických preparátů

Nativní (čerstvé) mikroskopické preparáty jsou takové, kdy jsou objekty pozorovány živé, např. čisté kultury prvoků, drobné hlístice z třídy *Nematoda* nebo flotované roztoky infikovaného trusu obsahující jejich vajíčka hlístic. Pro tuto diplomovou práci byly nativní mikroskopické preparáty zhotoveny za účelem pozorování následujících endoparazitických prvoků a endoparazitických helmintů:

1. *Leptomonas pyrrhocoris* z trávicí dutiny ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*)
2. *Cryptobia helicis* z receptaculum seminis hlemýždě zahradního (*Helix pomatia*)
3. Brvitka švábová (*Lophomonas blattarum*) z vypreparované zadní části střeva nymf i imag švába velkokřídleho (*Archimandrita tessellata*) a švába pestrého (*Eublaberus distantii*)
4. *Gregarina cuneata* a *Gregarina polymorpha* z trávicího traktu larev potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)
5. Hromadinka švábí (*Gregarina blattarum*) z vypreparované trávicí trubice švába velkokřídleho (*Archimandrita tessellata*) a švába pestrého (*Eublaberus distantii*)
6. *Monocystis lumbrici* z vypreparovaných semenných kanálek žížaly obecné (*Lumbricus terrestris*)
7. Oocysty kokcidie rodu *Eimeria* z infikované stolice ovce
8. Vajíčka zubovky (*Oesophagostomum spp.*) z infikované stolice ovce
9. Drobné hlístice z čeledi *Thelastomatiidae* z tělní dutiny a trávicí trubice nymf a dospělců švába velkokřídleho (*Archimandrita tessellata*)
10. Vajíčka škrkavky psí (*Toxocara canis*) z infikované stolice psa
11. Vajíčka tenkohlavce ovčího (*Trichuris ovis*) z infikované stolice ovce

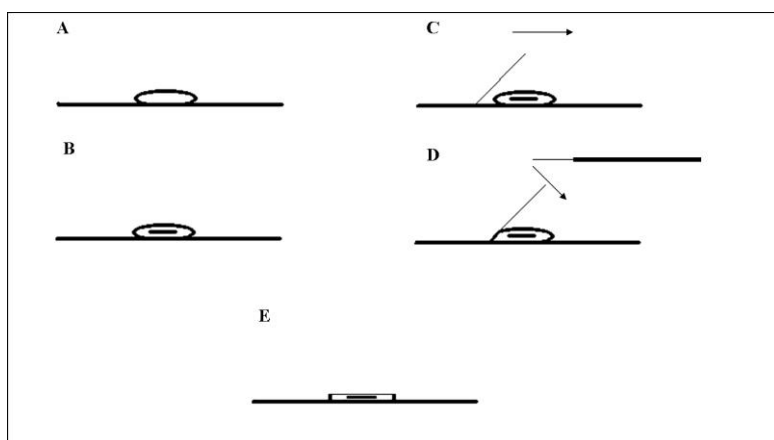
Pomůcky a chemikálie:

Podložní a krycí skla, preparační jehla, jednorázové plastové pipety, vlákna vaty, proužky filtračního papíru, fyziologický roztok (0,9 g chloridu sodného – NaCl do 100 ml destilované vody), skalpel, lékařský benzín, mikroskop

Postup:

Na dobře vyčištěné a odmaštěné podložní sklo lékařským lihem kápneme pomocí jednorázové plastové pipety kapku fyziologického roztoku. Poté do kapky fyziologického roztoku přeneseme obsah příslušné části trávicího traktu výše zmíněných hostitelů parazitů.

Parazity ve tkáních (semenné kanálky a vajíčky žížaly obecné – *Lumbricus terrestris*, zásobní vajíčky hlemýžďe zahradního – *Helix pomatia*) hledáme tak, že kousek tkáně roztrháme skalpelem nebo preparační jehlou v kapce fyziologického roztoku a potom rozdrtíme krycím sklem. Organismy, které se pohybují pomalu (všechny druhy hromadinek – *Gregarina blattarum*, *G. cuneata*, *G. polymorpha* a *Monocystis lumbrici*), není nutno přikrývat krycím sklem. Naopak u čile se pohybujících druhů prvoků (*Cryptobia helicis*, *Leptomonas pyrrocoris*, *Lophomonas blattarum*) omezíme pohyb přidáním několika vláken vaty a opatrně je přikryjeme dobře vyčištěným a odmaštěným krycím sklem tak, aby bylo zamezeno vzniku vzduchových bublin. Dalšími alternativami zamezující příliš rychlý pohyb objektů je např. mírný tlak krycího skla či přikápnutí 1% roztoku želatiny nebo klovatiny. Pokud vzduchové bubliny přesto vznikají, lze je odstranit mírným tlakem preparační jehly na krycí sklo a přebytečnou tekutinu odstranit proužkem filtračního papíru (viz obr. 11).



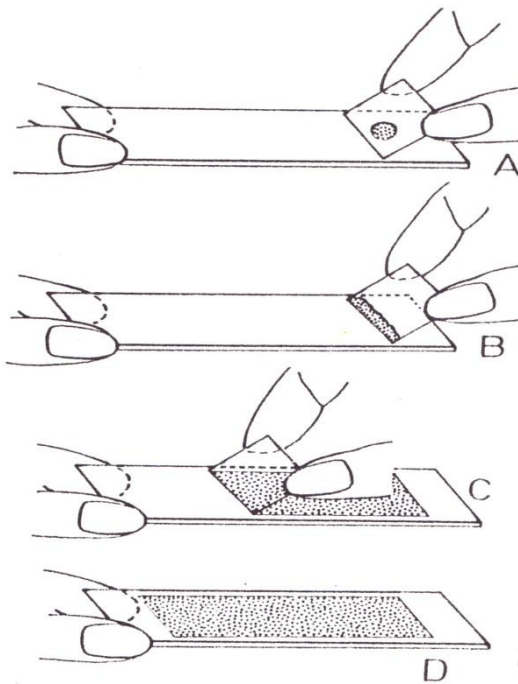
Obr. 11: Postup přiložení krycího sklíčka, dle internetového zdroje (13)

Při delším pozorování nativního mikroskopického preparátu v mikroskopu fyziologický roztok vysychá a krystalizuje, proto je nutné jej doplnit jednorázovou plastovou pipetou přiloženou k jedné hraně krycího skla.

Zhotovení trvalých mikroskopických preparátů – suchých i obarvených

Při studiu vnitřní organizace parazitů a zejména k přesnému určení cizopasných prvoků nelze vystačit jen s nativními preparáty, a proto je nutné k těmto účelům zhotovit preparáty trvalé. Jedná se o preparáty nebarvené a barvené. Trvalé preparáty z cizopasníků se zhotovují dle různého původu materiálu a účelu studia jako suché a vlhké roztěry, totální preparáty.

V předkládané studii byly zhotoveny trvalé preparáty barvené následujících prvoků: *Cryptobia helicis*, *Leptomonas pyrrocoris*, *Lophomonas blattarum*, *Gregarina polymorpha*, *Gregarina cuneata* a *Gregarina blattarum*. Byly zhotoveny jako suché nátěry a obarveny metodou Giemsy – Romanowského.



Obr. 12: Postup při zhotovení nátěru (roztěru) – přežato a upraveno dle Buchar, J. 1993.

(A – přiložíme krycího skla v úhlu 45° na podložní sklo s kapkou kultury prvoků

B – kapku s kulturou prvoků necháme roztéct po hraně krycího skla a stejnsměrným pohybem zprava doleva při stejném sklonu zhotovíme roztěr po celé ploše

C – je potřeba pohybovat krycím sklem velmi lehce, aby prvoci nebyli shrnováni a drceni

D – hotový roztěr necháme zaschnout na vzduchu při pokojové teplotě (nikdy se nesmí zahřívát))

Suché nátěry se zhotovují a používají všude tam, kde se sledované objekty vyskytují v tekutém či polotekutém prostředí (z krve – krevní buňky, paraziti žijící v krvi, různé

střevní parazitičtí prvoci, prvoci z nálevů, jednotlivé tkáňové buňky – jaterní, apod.). Výhodou trvalých preparátů zhotovených z nátěrů je plošné a izolované rozložení pozorovaných objektů v jediné vrstvě. Princip zhotovení suchého nátěru spočívá v rozetření tekutého prostředí s objekty na podložní sklíčko, které se před dalším zpracováním nechá rychle zaschnout.

Postup při zhotovení trvalého preparátu:

1. Suchý nátěr – rozetření obsahu trávicí trubice nebo zásobních (semenných) váčků výše uvedených hostitelů pomocí krycího sklíčka na podložním sklíčku (viz obr. 12).
2. Zaschnutí nátěru (částečná fixace).
3. Na suchý nátěr nakapeme pomocí jednorázové pipety metanol jako fixační medium a necháme působit cca 3 min.
4. Pomocí proužků filtračního papíru opatrně osušíme metanol a opět necháme nátěr uschnout.
5. Dále suchý nátěr barvíme pomocí barviva Giemsy-Romanowského, které ředíme těsně před použitím v poměru 1:10 destilovanou vodou. Barvení provádíme na barvicím můstku po dobu 30 – 60 min.
6. Po výše uvedeném časovém intervalu nátěr opláchneme destilovanou vodou a osušíme proužky filtračního papíru a necháme na vzduchu doschnout.

Suché nátěry barvené metodou Giemsy-Romanowského nikdy nezaléváme do kanadského balzámu, neboť je kyselý a obarvené preparáty v něm blednou a mění barvu. Barvené preparáty uchováváme v dobře uzavřených krabicích s drážkami.

Zdařile obarvené trvalé preparáty poznáme podle správně obarvených organel parazitických prvoků: jádro, bičíky, kinetoplast (karmínově červené), cytoplasma (modrá až nafialovělá).

3.2. Popis pitev bezobratlých živočichů (hostitelů)

Zpracováno dle skript Buchar, J. 1993 a pokynů vedoucího této práce.

Ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus*)

Tato ploštica je hostitelem bičivky *Leptomonas pyrrhocoris* z řádu *Trypanosomatida*, která se vyskytuje v jejím zažívacím traktu a odtud se přenáší na rostliny.

Sběr ruměnic pospolných:

Ruměnice pospolné, ve kterých byly nalezeny bičivky *Leptomonas pyrrocoris*, byly nasbírány v září 2011 pod lipami (*Tilia sp.*) v areálu Klatovské nemocnice a.s.

Pomůcky a chemikálie:

Preparační (pítevní) miska, nůžky, skalpel, pinzeta, preparační jehla, podložní a krycí sklíčko, jednorázová plastová pipeta, fyziologický roztok

Postup:

Pinzetou uchopíme živou ploštici a nůžkami odstříhneme hlavičku od těla. Na preparační misku položíme usmrcenou ruměnici břišní stranou vzhůru a provedeme nůžkami stříh směrem od zadní k přední části těla. Vypreparujeme trávicí trubici z těla ploštice pomocí preparační jehly a část jejího obsahu vytlačíme do kapky fyziologického roztoku na podložním sklíčku a dle výše uvedeného postupu přiklopíme krycí sklíčko a pozorujeme nativní preparát pod mikroskopem při zvětšení 200 – 600x.

Potemník moučný (*Tenebrio molitor*) – larvy tzv. „mouční červi“

Larvy potemníka moučného jsou hostiteli gregarin (hromadinek) z kmene *Apicomplexa*, konkrétně druhů *Gregarina cuneata* a *Gregarina polymorpha*.

Mouční červi byli zakoupeni v obchodech s chovatelskými potřebami Zverimex. Uchovávání byli v uzavíratelné plastové nádobě a krmeni moukou.

Pomůcky a chemikálie:

Preparační miska, nůžky, skalpel, pinzeta, preparační jehla, podložní a krycí sklíčko, jednorázová plastová pipeta, fyziologický roztok, mikroskop

Postup:

Vybereme středně velkou živou larvu potemníka moučného, uchopíme ji pinzetou a nůžkami odstříhneme hlavičku. Do připravené kapky fyziologického roztoku na podložním sklíčku pomocí preparační jehly vymačkáme část obsahu trávicí trubice. Přiklopíme krycí sklíčko a nativní preparát pozorujeme pod mikroskopem při zvětšení 100 – 600x. Vzhledem k tomu, že gregariny (hromadinky) se pohybují pomalu, nemusíme v tomto případě ani krycí sklíčko používat.

Šváb velkokřídový (*Archimandrita tessellata*), šváb pestrý (*Eublaberus distantis*) – nymfy, dospělci

Jedná se o teplomilné druhy hmyzu z řádu *Blattaria*. Ve svém zaživacím ústrojí mohou přechovávat mikroorganismy, které získají konzumací kontaminovaných materiálů a

svými výkaly jimi zamořovat potraviny – původci střevních bakterióz, cystami střevních prvoků, vajíčky červů, apod. (Daniel, M. 1996).

V této práci bylo zkoumáno zažívací ústrojí uvedených druhů švábů zejména kvůli výskytu symbiotického prvoka *Lophomonas blattarum*, který jim pomáhá trávit celulózu. V zažívacím ústrojí švába byla též nalezena hromadinka *Gregarina blattarum* z kmene *A p i c o m p l e x a*. Zcela náhodně byl pozorován v tělní dutině i v trávicí trubici nymf i dospělých jedinců švába velkokřídleho (*Archimandrita tessellata*) druh hlístice z čeledi *T h e l a s t o m a t i d a e*.

Dospělí jedinci i nymfy výše zmíněných druhů švábů mně byli poskytnuty v Akva-tera ZOO Plzeň.

Pomůcky a chemikálie:

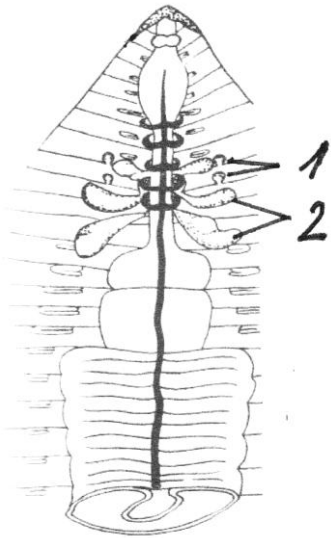
Preparační miska, nůžky, skalpel, pinzeta, preparační jehla, špendlíky, podložní a krycí sklíčka, jednorázová plastová pipeta, fyziologický roztok

Postup:

Živého dospělého švába nebo jeho nymfu pevně uchopíme pinzetou a pomocí nůžek odstříháme hlavičku od zbylé části těla. Na preparační misce připevníme usmrceného švába pomocí špendlíků na předním a zadním konci těla břišní stranou vzhůru. Tělo prostříháme nůžkami směrem ven. Břišní stěnu pomalu rozevíráme a fixujeme špendlíky. Pomocí preparační jehly a pinzety vyjmeme trávicí trubici švába. Část obsahu zadní části trávicí trubice vymačkáme do kapky fyziologického roztoku na podložním sklíčku. Přiklopíme krycím sklíčkem a takto vyrobený nativní preparát pozorujeme pod mikroskopem při zvětšení 200 - 600x. V tomto případě je nutné krycí sklíčko použít, neboť prvoci *Lophomonas blattarum* se pohybují značnou rychlostí. Krycí sklíčko tak částečně omezí jejich rychlý pohyb.

Žížala obecná (*Lumbricus terrestris*)

Žížala obecná z kmene *A n n e l i d a* je hostitelem výtrusovce *Monocystis lumbrici* (syn. *Monocystis agilis*) z řádu *E u g r e g a r i n i d a*, který se nachází v semenných váčcích (vesiculae seminales). Tři páry větších nažloutlých laločnatých váčků vyrůstají na přepážkách mezi 9., 10. a 11. článkem.



Obr. 13: Vyústění semenných a zásobních váčků u žížaly obecné – *Lumbricus terrestris* (převzato a upraveno dle Buchar, J. 1995)

1 – zásobní váčky (receptaculum seminis), 2 – semenné váčky (vesiculae seminales)

Žížaly pro pitvu byly získány na zahradě v Klatovech po dešti na jaře 2010.

Pomůcky a chemikálie:

Preparační miska, nůžky, skalpel, pinzeta, preparační jehla, žiletka, špendlíky, podložní a krycí sklíčka, jednorázová plastová pipeta, fyziologický roztok, binokulární lupa

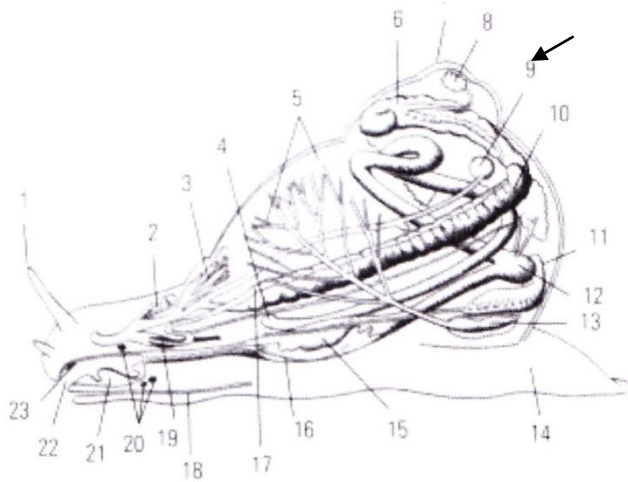
Postup:

Čerstvě usmrcenou žížalu položíme na preparační misku hřbetní stranou vzhůru. Žížalu fixujeme k preparační misce pomocí špendlíku na předním a zadním konci těla. Pod binokulární lupou vyhledáme 9. – 12. článek těla žížaly. Dva páry varlat (*testes*) se vyvíjejí mezi 9. a 10. a mezi 10. a 11. článkem a jsou kryty testikulárními vaky. Pomocí skalpelu a preparační jehly vypreparujeme semenné kanálky (1. pár varlat vystupuje z přepážky mezi 9. a 10. článkem, 2. pár varlat mezi 10. a 11. článkem a 3. pár varlat přecházející v semenné váčky mezi 11. a 12. článkem – viz obr. 13).

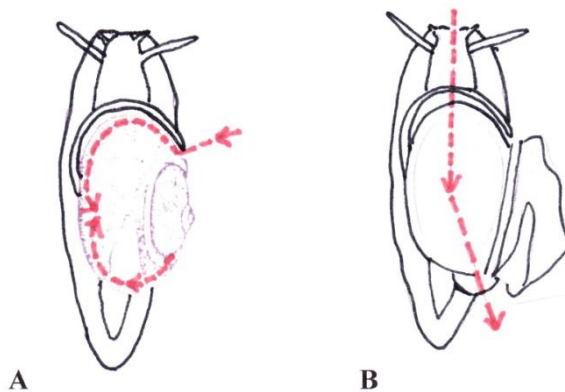
Vypreparované semenné kanálky vložíme do kapky fyziologického roztoku na podložní sklíčko a přiklopíme krycím sklíčkem. Mírným tlakem na krycí sklíčko provedeme roztlačení semenných váčků. Získaný nativní preparát prohlédneme v mikroskopu při zvětšení 200 - 600x.

Hlemýžď zahradní (*Helix pomatia*)

Hlemýžď zahradní je plicnatý plž z kmene *Mollusca*. V zásobních váčcích (receptaculum seminis) hostí bičíkovce *Cryptobia helicis* z řádu *Bodonida*. Lokalizace zásobního váčku hlemýždě zahradního viz obr. 14.



Obr. 14: Anatomie a morfologie hlemýždě zahradního (*Helix pomatia*): 9 – zásobní váček (receptaculum seminis); převzato ze skript Langrová, I. et al. 2010



Obr. 15: A – čárkovaně naznačen průběh stříhu k otevření plášťové dutiny po odstranění ulity; B – směr stříhu tělní dutiny a útrobního vaku (převzato a upraveno dle publikace Buchar, J. 1993)

Hlemýždi zahradní, kteří byli použiti k pitvě, byli nasbíráni v květnu 2012 na zahradě v obci Líně (Plzeň - sever).

Pomůcky a chemikálie:

Preparační (pítevní) miska, nůžky, skalpel, tvrdá pinzeta, preparační jehla, žiletka, špendlíky, podložní a krycí sklíčka, jednorázová plastová pipeta, fyziologický roztok

Postup:

Usmrcenému hlemýždi (20 – 24 hodin před pitvou) nejprve po částech pomocí tvrdé pinzety odstraníme ulitu. Hlemýždě připevníme k voskovému dnu pítevní misky

pomocí špendlíků a přelijeme vodou. Poté provedeme pomocí nůžek a skalpelu otevření tělní dutiny a útrobního vaku (vedení stříhu viz obr. 15) a vypreparujeme semennou schránku (receptaculum seminis), ve které je shromažďováno sperma druhého jedince při kopulaci.

Vypreparovanou semennou schránku vložíme do kapky fyziologického roztoku na podložním sklíčku a přiklopíme krycím sklíčkem a mírným tlakem na krycí sklíčko provedeme roztláčení semenných schránek. Získaný nativní preparát prohlédneme v mikroskopu při zvětšení 200 -600x.

3.3. Sběr ektoparazitů, zhotovení trvalých preparátů ektoparazitů

Sběr a získávání ektoparazitických druhů

Ektoparazité zkoumaní v této diplomové práci – klíště obecné (*Ixodes ricinus*) a kloš jelení (*Lipoptena cervi*), byli získáni v předem vytipované lokalitě (viz příložená mapa), kde se vyskytují v hojném množství. Hostiteli těchto ektoparazitů byl pes a člověk. Jedná se o lokalitu v chatové oblasti poblíž bývalého vojenského prostoru Malý Bítov (vyznačeno na mapě – obr. 16).

Další zkoumaní ektoparazitů – blecha kočičí (*Ctenocephalides felis*) a kleštík včelí (*Varroa destructor*) byli získáni ze srsti kočky a včelích pláství, které mi byly poskytnuty vedoucím této diplomové práce.



Obr. 16: Mapa výskytu klíštěte obecného a kloše jeleního (vyznačeno body A, B), dle internetového zdroje (14):

Odvodnění a tvorba trvalých preparátů ektoparazitů

Trvalé mikroskopické preparáty byly vytvořeny z následujících ektoparazitů:

Rotoči (A c a r i n a): kleštík včelí (*Ixodes ricinus*)

klíště obecné (*Varroa destructor*)

Hmyz (I n s e c t a): blecha kočičí (*Ctenocephalides felis*)

kloš jelení (*Lipoptena cervi*)

Kanadský balzám je nejlepší uzavírací médium o vysokém indexu lomu (1,535), který je rozpustný pouze v xylenu, benzolu, chloroformu, toluenu, atd. Získává se jako pryskyřice z jedle balzámové (*Abies balsamea*) a preparáty v něm vydrží několik desítek let. Příliš hustý kanadský balzám lze ředit dle potřeby xylenem, popřípadě benzenem (Lelláková, 1973; Jírovec, 1977). Dnes jsou používány k těmto účelům moderní syntetické pryskyřice (entellan, eukitt).

Suché objekty (křídla hmyzu, chlupy, apod.) není potřeba před zalitím do kanadského balzámu odvodňovat ani projasňovat. Naopak jemné objekty obsahující vodu (klíště i kloš) je zapotřebí nejprve dokonale odvodnit alkoholovou řadou a převést do xylenu. K odvodnění používáme alkoholy o stoupající koncentraci, tzv. vzestupnou alkoholovou řadu. Odvodnění tkáně alkoholy od nízké do nejvyšší koncentrace je dokonalé, ale při současném co nejmenším smrštění tkáně. Dle jiné literatury nemá vzestupná alkoholová řada podstatné výhody a lze odvodňovat jen 96% alkoholem (etanol – C₂H₅OH), který několikrát vyměníme. Tento postup byl použit v předkládané práci.

Na dobře vyčištěné a odmaštěné podložní sklíčko kápneme pomocí skleněné tyčinky kanadský balzám, vložíme odvodněný objekt a hned přikrýváme krycím sklem. Případné vzduchové bubliny odstraníme mírným tlakem na krycí sklo nebo preparační jehlou, případně můžeme předtím smočit krycí sklo xylenem (dimethylbenzen) a vzduchové bubliny se pak zpravidla ani nevytvoří.

3.4. Metody studia helmintů

Zpracováno dle publikace: Horák a Scholz, 1998.

Na rozdíl od parazitických prvoků (*P r o t o z o a*) a členovců (*A r t h r o p o d a*) je získávání a určování parazitických druhů helmintů (*H e l m i n t h e s*) mnohem obtížnější, protože je ve většině případů nezbytné vyšetření jejich hostitelů. V této

diplomové práci byla získána a určena především vajíčka endohelminťů ze třídy *Nematoda*.

U nakažených jedinců (obratlovci) parazitickými hlísticemi byl vyšetřován infikovaný trus, který mně byl poskytnut veterinární klinikou VEDILAB, s.r.o. v Plzni. V infikované stolici obratlovců byla prokazována vajíčka či larvy parazitických helmintů. Dospělí jedinci helmintů v tomto materiálu přítomni nebyli.

S nálezem dospělců parazitických helmintů se v tomto typu materiálu setkáváme velmi zřídka. Naprostá většina dospělých endohelminťů musí být z nakaženého hostitele získána pitevně. Běžnou metodou morfologického studia dospělých jedinců helmintů je správná fixace helmintů a jejich následné zpracování (včetně barvení a zhotovení trvalých preparátů). Nezbytnou součástí morfologického studia dospělých jedinců helmintů je elektronová mikroskopie – řádkovací SEM (povrchové struktury) a transmisní TEM (ultrastruktury). Tyto metody nebyly v diplomové práci použity pro svou náročnost a nákladnost.

Moderní parazitologie i helmintologie umožňují průkaz infekce v experimentálních laboratořích metodami biochemickými (stanovení sacharidů, lipidů, enzymů pomocí značených prób, kolorimetrické reakce), imunologickými (ELISA, imunoblast) nebo molekulárně – biologickými (sekvenování proteinů a nukleových kyselin metodou PCR).

3.5. Metodika zpracování a určování parazitických helmintů

Níže uvedená metodika byla vypracována dle publikace: Lukešová, 1990.

1) Vyšetřovací metody koprologické

Touto vyšetřovací metodou, která zkoumá trus odcházející z hostitele, lze odhalit a diagnostikovat řadu parazitárních stadií (např. oocysty kokcií rodu *Eimeria* a *Isospora*), vajíčka motolic (rod *Fasciola*), střevních hlístic (rody *Toxocara* a *Ascaris*), larvy plicních hlístic (rod *Dictyocaulus*), články tasemnic neboli strobila (rod *Taenia*), dospělé oblé helminty (rod *Toxocara*). Mezi další parazitární zástupce, které můžeme ve stolici hostitelů nalézt, patří také patogenní prvoci (rody *Giardia* a *Trichomonas*), vajíčka roztočů, dospělé některých členovců a larvální stadia hmyzu (střečci rodu *Gastrophylus*).

Koprologickou vyšetřovací metodou byl v diplomové práci zkoumán infikovaný trus ovce a psa, konkrétně oocysty kokcidie rodu *Eimeria*, vajíčka hlístic rodů: *Oesophagostomum*, *Toxocara*, *Trichuris*.

Aby bylo možné provést správnou parazitologickou diagnostiku infikovaného trusu, je nezbytné dodržovat základní pravidla při odběru trusu (pro potřeby zpracování diplomové práce mi byl poskytnut výše zmíněnou veterinární klinikou v Plzni již odebraný trus) a hlavně správné zacházení s odebraným materiálem.

Obecné nároky a pravidla pro správné zacházení s odebranými vzorky trusu:

1. Nutnost rychlého zpracování co nejčerstvějšího materiálu odebraného trusu.
2. Vhodné a správné skladování a uchovávání odebraného materiálu pokud nemůže být provedeno okamžité vyšetření (uložení do chladničky – zejména vajíčka hlístic velmi rychle dozrávají ve vnějším prostředí, popřípadě v tekutém dusíku za přítomnosti různých příměsí, které zabraňují destrukci odebraného vzorku trusu – proteolytické enzymy a antibakteriální látky (Horák a Scholz, 1998).
3. Pokud mezi vlastním odběrem trusu a vyšetřením vzorku uplyne doba delší než 24 hodin, je zapotřebí (zejména v letním období) použít k fixaci vzorku trusu 4% roztok formaldehydu; nikdy neprovádíme fixaci 4% roztokem formaldehydu takového vzorku trusu, který je vyšetřován na zástupce rodu *Dictyocaulus* (plicnivky) a citlivá vývojová stadia oocyst kokcií.
4. U některých druhů parazitických původců sehrává důležitou roli také doba odběru trusu, např. motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) vylučuje vajíčka nejčastěji kolem poledne.
5. Množství trusu k parazitologické diagnostice závisí na tom, zda použijeme koncentrační vyšetřovací metodu, metodu koprokultury či larvoskopické vyšetření, obvykle stačí 5 – 10 gramů trusu.

K parazitologické diagnostice infikovaného trusu byla v této diplomové práci použita metoda koncentrování parazitů z trusu.

Pomůcky a materiál:

Vzorek trusu, třecí miska s tloučkem, plastové sítko, jednorázové plastové pipety nebo kličky, centrifuga, zkumavky a stojan na zkumavky, kádinky, skleněná tyčinka, podložní a krycí skla, destilovaná voda, stříčka, zásobní plastové lahve, zásobní roztok bezvodého síranu hořečnatého nebo chloridu sodného, roztok dichromanu draselného –

$K_2Cr_2O_7$ k uchování vajíček hlístic a oocyst kokcií, digitální váhy, filtrační papír, lihový fix, jednorázově gumové rukavice

Koncentrační metody (k získání vajíček helmintů a oocyst kokcií z infikovaného trusu obratlovců) jsou specifické vyšetřovací techniky, které umožňují ze vzorku trusu zkoncentrovat oocysty, vajíčka či larvy tak, že je možné diagnostifikovat i ojedinělé invaze parazitů nebo malý počet parazitických původců. Koncentrační metody lze rozdělit do dvou velkých skupin:

- Flotační metody – využívají se k laboratorní diagnostice vajíček hlístic a oocyst prvoků
- Sedimentační metody – vhodné k laboratorní diagnostice vajíček motolic.

Při vlastním zpracování vzorků infikovaného trusu obratlovců (ovce, pes) byla použita pouze flotační metoda. Následující popis je zaměřen jen na tuto metodu, speciálně na Brezovu flotační metodu.

Podstata flotačních metod

Vajíčka hlístic a oocysty kokcií jsou ve vodě těžší, neboť jejich specifická hmotnost (hustota) je vyšší než 1,0. Když je vzorek trusu suspendován v roztoku, který má hustotu vyšší než hmotnost vajíček hlístic či oocyst kokcií, tyto parazitární útvary vyplavou k povrchu. K diagnostice vajíček helmintů a oocyst prvoků jsou tedy využívány roztoky s hustotou v rozmezí 1,10 – 1,20. Dle hodnoty specifické hmotnosti (hustoty) se rozlišuje mnoho druhů flotačních roztoků. Pro diagnostiku parazitárních útvarů (vajíčka, oocysty) v této práci byly využity následující flotační roztoky:

- Füllebornův flotační roztok – nasycený roztok chloridu sodného o specifické hmotnosti (hustotě) 1,19 – 1,20
- Brezův flotační roztok – nasycený roztok síranu hořečnatého nebo thiosíranu sodného o specifické hmotnosti (hustotě) 1,30

Příprava nasycených flotačních roztoků

Předchází vlastnímu vyšetření vzorků infikovaného trusu. K přípravě flotačních nasycených roztoků je potřeba mít k dispozici dehydratované chemikálie (chlorid sodný – NaCl, síran hořečnatý – $MgSO_4$, thiosíran sodný – $Na_2S_2O_3$).

1) Příprava Füllebornova flotačního roztoku – na digitálních vahách odvážíme 35 gramů bezvodého chloridu sodného – NaCl a rozpustíme v kádince do 100 ml teplé destilované

vody, necháme dokonale rozpustit za občasného míchání a poté slijeme do zásobní plastové lahve.

2) Příprava Brezova flotačního roztoku – bezvodý síran hořečnatý a destilovanou vodu v poměru 3:1 rozpustíme v kádince za občasného míchání, po dokonalém rozpuštění přelijeme do zásobní plastové lahve.

Obě zásobní lahve s nasycenými flotačními roztoky popíšeme lihovým fixem.

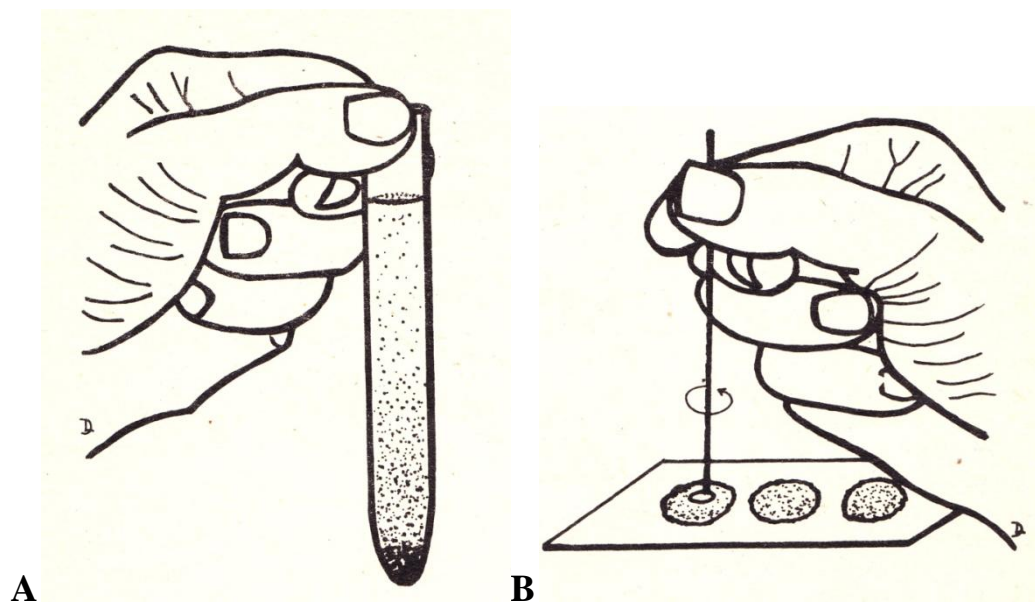
Vlastní vyšetření vzorků infikovaného trusu dle Brezovy flotační metody

Vlastní laboratorní vyšetření a diagnostika infikovaného trusu obratlovců zahrnuje několik fází, které je nutno dodržovat v následujícím sledu:

- 1) Přibližně 2 gramy čerstvého nebo fixovaného trusu (4% roztoku formaldehydu – CH_2O) velikosti vlašského ořechu rozmělníme a rozmícháme s destilovanou vodou ve třecí misce s tloučkem.
- 2) Pokud vzorek trusu obsahuje velké a hrubé částice (především ve stolici koní a přežvýkavců), je potřeba homogenizovaný vzorek trusu přefiltrovat přes sítko z plastové hmoty nebo gázu položenou přes kádinku.
- 3) Lihovým fixem očísujeme kónické zkumavky (nejlépe plastové) a naplníme je přefiltrovanou suspenzí trusu do výše 1 cm od horního okraje kónické zkumavky.
- 4) Naplněné zkumavky vložíme do centrifugy a provedeme centrifugaci při 2000 otáčkách/minutu po dobu 2 – 3 minut.
- 5) Po vyjmutí zkumavek z centrifugy pozorujeme usazený tmavý sediment na dně zkumavky a světlejší supernatant, který rázně slijeme do předem připravené odpadní nádoby s dezinfekčním roztokem (chloramin – NH_2Cl , SAVO).
- 6) Do předem připravené stříčky nalijeme nasycený flotační roztok ze zásobní lahve, pomocí skleněné tyčinky rozmícháme sediment na dně zkumavky s trochou nasyceného flotačního roztoku a doplníme nasyceným flotačním roztokem ze stříčky do výše 1 cm od horního okraje zkumavky.
- 7) Zkumavky se vzorkem zředěným nasyceným flotačním roztokem opět vložíme do centrifugy a flotujeme při 2000 otáčkách/minutu po dobu 2 – 3 minut.
- 8) Zkumavky velmi opatrně vyjmeme z centrifugy, aby nedošlo k porušení povrchové blanky a uložíme je do stojánku na pracovním stolku.
- 9) Pomocí vyšetřovací kličky (lze použít jednorázovou plastovou nebo s drátěným očkem) se lehce dotkneme povrchové blanky ve zkumavce a kličkou provedeme

krouživý pohyb na dobře vyčištěném a odmaštěném podložním skle na ploše 1 x 1 cm²; pokud použijeme kličku s drátěným očkem, je nutné drátěné oko před vlastním vyšetřením vyžít v plameni plynového kahanu, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku z předchozího vyšetření; místo vyšetřovací kličky lze použít také jednorázovou plastovou pipetu (viz obr. 17).

10) Zhotovený nativní preparát (vytvořený dle metodiky v kapitole 3.1.1.) pozorujeme pod mikroskopem od nejmenšího (100x) po největší (600x) zvětšení.



Obr. 17: A – zkumavka naplněná do výše 1 cm od horního okraje; B – krouživý pohyb pomocí vyšetřovací kličky na podložním skle (převzato a upraveno z publikace Lukešová, 1990)

3.6. Mikroskopování a fotografování získaných druh

Nativní mikroskopické preparáty byly prohlíženy mikroskopem postupně od nejmenšího zvětšení 100 x až po zvětšení 600 x a fotografovány.

Trvalé obarvené mikroskopické preparáty byly pozorovány pomocí imerze (cedrový olej) a imerzního objektivu při zvětšení 1000 x a následně byly objekty vyfotografovány.

Trvalé nebarvené preparáty ektoparazitů *Ctenocephalides felis*, *Ixodes ricinus*, *Lipoptena cervi*, *Varroa destructor* zalité v kanadském balzámu byly pozorovány pod binolupou (determinační znaky u blechy kočičí – ktenidia prohlíženy i pod mikroskopem při zvětšení 100x) a poté byly pořízeny níže uvedené snímky.

4. PRAKTICKÁ ČÁST

Shromažďování parazitologického materiálu a zpracování vzorků do podoby mikroskopických vzorků probíhalo v letech 2010 – 2012. Během tohoto období se mi podařilo nashromáždit poměrně široké spektrum parazitických zástupců ze všech hlavních parazitologických podoborů:

1. Protozoologie (parazitičtí prvoci) – 8 druhů
2. Helmintologie (parazitičtí helminti) – 4 druhy
3. Lékařská entomologie – 4 druhy

Výsledky byly zpracovány kvalitativně ve třech různých formách:

První zpracování je formou přehledných tabulek získaných parazitických prvoků (*P r o t o z o a*), helmintů (*H e l m i n t h e s*) a členovců (*A r t h r o p o d a*).

Druhé kvalitativní zpracování představuje formu soupisu přesného systematického zařazení jednotlivých druhů získaných parazitických organismů.

Třetí zpracování výsledků parazitologického výzkumu je popsáno formou vypracovaných laboratorních postupů z hlediska zpracování parazitologického materiálu a přípravy mikroskopických preparátů dočasných i trvalých. Tyto laboratorní postupy ve formě řešených laboratorních protokolů jsou určeny jako příručky a návody pro vyučující, ale i žáky základních škol a studenty středních škol v rámci rozšířené výuky biologie nebo povinně volitelných seminářů z biologie.

4.1. Kvalitativní vyhodnocení formou tabulek

Tabulka č. 1: Přehled získaných druhů prvoků

Vědecký (latinský) název	Český název	Hostitel	Infikovaný orgán, zdroj infekce	Postavení v ekosystému
<i>Cryptobia helicis</i>		hlemýžď zahradní (<i>Helix pomatia</i>)	receptaculum seminis	endoparazit, komenzál
<i>Eimeria spp.</i>	kokcidie	ovce	infikovaný trus	endoparazit
<i>Gregarina blattarum</i>	hromadinka švábí	šváb velkokřídlý (<i>Archimandrita tessellata</i>)	trávicí trubice	endoparazit, komenzál
<i>Gregarina cuneata</i>		larvy potemníka moučného (<i>Tenebrio molitor</i>)	trávicí trubice	endoparazit, komenzál
<i>Gregarina polymorpha</i>		larvy potemníka moučného (<i>Tenebrio molitor</i>)	trávicí trubice	endoparazit, komenzál
<i>Leptomonas pyrrocoris</i>		ruměnice pospolná (<i>Pyrrocoris apterus</i>)	trávicí trubice	endoparazit, komenzál
<i>Lophomonas blattarum</i>	brvitka švábí	šváb pestrý (<i>Eublaberus distantis</i>)	trávicí trubice (zadní oddíl)	mutualismus
<i>Monocystis lumbrici</i> (syn. <i>M. agilis</i>)	hromadinka žížalí	žížala obecná (<i>Lumbricus terrestris</i>)	semenné vajíčky	endoparazit, komenzál

Tabulka č. 2: Přehled získaných druhů helmintů

Vědecký (latinský) název	Český název	Hostitel	Infikovaný orgán, zdroj infekce	Postavení v ekosystému
<i>Oesophagostomum spp.</i>	zubovka	ovce	infikovaný trus	endoparazit
čeled' <i>Thelastomatidae</i>		nymfy a imaga švába velkokřídleho (<i>Arcimandrita tessellata</i>)	trávicí trubice švába	endoparazit, komenzál
<i>Toxocara canis</i>	škrkavka psi	pes	Infikovaný trus	endoparazit
<i>Trichuris ovis</i>	tenkohlavec ovčí	ovce	infikovaný trus	endoparazit

Tabulka č. 3: Přehled získaných druhů členovců

Vědecký (latinský) název	Český název	Hostitel	Infikovaný orgán, zdroj infekce	Postavení v ekosystému
<i>Ctenocephalides felis</i>	blecha kočičí	kočka	srst kočky	ektoparazit
<i>Ixodes ricinus</i>	klíště obecné	člověk, pes	kůže psa, člověka	ektoparazit
<i>Lipoptena cervi</i>	kloš jelení	člověk, pes	srst psa, kůže člověka	ektoparazit
<i>Varroa destructor</i>	včelík zhoubný (kleštík včelí)	včela medonosná (<i>Apis mellifera</i>)	včelí plástve	ektoparazit

4.2. Systematické zařazení získaných druhů

Systematické zařazení jednotlivých druhů parazitů je značně problematické, zejména u parazitických prvoků, neboť se jedná o nesnadno definovatelnou skupinu eukaryotických organismů (Horák a Volf, 2007). Problematika nejasného systematického zařazení těchto organismů je dána zejména nedávným nástupem molekulárně – fylogenetických metod. Tato éra molekulární fylogenetiky umožňuje hlubší a přesnější vhled do evoluční historie organismů a také pochopení jejich vývojových vztahů (Horák a Volf, 2007).

Právě nástup metod molekulární fylogenetiky je příčinou nejednotnosti v zařazení organismů do systému u jednotlivých autorů různých odborných publikací. Někteří autoři se snaží organismy zařazovat dle nejnovějších poznatků molekulární fylogenetiky, zatímco jiní zůstávají věrni tradičnímu pojetí systému organismů. Z tohoto důvodu jsou v této kapitole uvedena vždy dvě různá systematická zařazení organismů dle různého pojetí systému jednotlivých autorů.

4.2.1. Systematické zařazení získaných druhů prvoků

Získaní prvoci byli zařazeni do systému jednak dle publikace Horák a Volf, 2007, který reflektuje změny názorů a soudobé teorie na evoluci eukaryotických organismů a přizpůsobení formálního systému novým poznatkům molekulární fylogenetiky. Dle pojetí této publikace prvoci (*Protozoa*) jako systematická či fylogenetická jednotka neexistují a většina eukaryotických organismů je rozdělena do 6 velkých skupin

(„supergroups“, „megagroups“, „říše“). Druhé zařazení parazitických prvoků je dle publikace Sedlák, 2002, kde autor uvádí spíše tradiční systém eukaryotických organismů.

1. *Cryptobia helicis*

Horák a Volf, 2007		Sedlák, 2002	
Skupina („říše“)	<i>Excavata</i>	Říše	prvoci (<i>Protozoa</i>)
Kmen	<i>Euglenozoa</i>	Kmen	<i>Euglenozoa</i>
Třída	<i>Kinetoplastea</i>	Třída	bičivky (<i>Kinetoplastidea</i>)
Řád	<i>Bodonida</i>	Řád	<i>Bodonida</i>
Rod	<i>Cryptobia</i>	Rod	neuveden

2. *Gregarina blattarum* (hromadinka švábová), *Gregarina cuneata*, *Gregarina polymorpha*

Horák a Volf, 2007		Sedlák, 2002	
Skupina („říše“)	<i>Chromalveolata</i>	Říše	prvoci (<i>Protozoa</i>)
Kmen	<i>Apicomplexa</i>	Kmen	výtrusovci (<i>Apicomplexa</i>)
Třída	<i>Gregarinea</i>	Třída	<i>Gregarinidea</i>
Řád	<i>Eugregarinida</i> (<i>Septatina</i>)	Řád	neuveden

3. *Eimeria* spp. - kokcidie

Horák a Volf, 2007		Sedlák, 2002	
Skupina („říše“)	<i>Chromalveolata</i>	Říše	prvoci (<i>Protozoa</i>)
Kmen	<i>Apicomplexa</i>	Kmen	výtrusovci (<i>Apicomplexa</i>)
Třída	<i>Coccidea</i>	Třída	kokcidie (<i>Coccidea</i>)
Řád	<i>Eimeriida</i>	Řád	neuveden
Čeď	<i>Eimeriidae</i>	Čeď	neuveden
Rod	<i>Eimeria</i>	Rod	neuveden

4. *Leptomonas pyrrocoris*

	Horák a Volf, 2007		Sedlák, 2002
Skupina („říše“)	<i>Excavata</i>	Říše	prvoci (<i>Protozoa</i>)
Kmen	<i>Euglenozoa</i>	Kmen	<i>Euglenozoa</i>
Třída	<i>Kinetoplastea</i>	Třída	bičivky (<i>Kinetoplastidea</i>)
Řád	<i>Trypanosomatida</i>	Řád	trypanosomy (<i>Trypanosomatida</i>)
Rod	<i>Leptomonas</i>	Rod	neuveden

5. *Lophomonas blattarum* – brvitka švábová

	Horák a Volf, 2007		Sedlák, 2002
Skupina („říše“)	<i>Excavata</i>	Říše	prvoci (<i>Protozoa</i>)
Kmen	<i>Parabasala</i>	Kmen	<i>Parabasala</i>
Třída	neuvedena	Třída	brvitky (<i>Hypermastigotea</i>)
Řád	<i>Trichonymphida</i>	Řád	neuveden
Rod	<i>Lophomonas</i>	Rod	neuveden

6. *Monocystis lumbrici* (syn. *Monocystis agilis*) – hromadinka žížalí

	Horák a Volf, 2007		Sedlák, 2002
Skupina („říše“)	<i>Chromalveolata</i>	Říše	prvoci (<i>Protozoa</i>)
Kmen	<i>Apicomplexa</i>	Kmen	výtrusovci (<i>Apicomplexa</i>)
Třída	<i>Gregarinaea</i>	Třída	<i>Gregarinidea</i>
Řád	<i>Eugregarinida</i> (<i>Aseptatina</i>)	Řád	neuveden

4.2.2. Systematické zařazení získaných druhů helmintů

Termín helminti je souhrnným označením pro nepříbuzné, avšak pro praktické účely některých vědních disciplín (včetně parazitologie) sdružované skupiny organismů. V případě parazitologických učebnic a publikací je pojmem helmint označován pouze organismus parazitující jen v určité fázi ontogenetického vývoje v obratlovcích (Horák a Volf, 2007).

Pro přesné zařazení získaných druhů do systému byly, stejně jako u parazitujících prvoků, použity dvě různé publikace z důvodu odlišného pojetí systému jednotlivých autorů. U parazitujícího druhu hlístice v trávicím traktu švába velkokřídlého

(*Archimandrita tessellata*) patřící do čeledi *Thelastomatidae* byla pro přesné systematické zařazení použita internetová mezinárodní encyklopedie rostlin, hub a živočichů BioLib (internetový zdroj (2)), neboť v tištěných publikacích tato čeleď nebyla zmiňována.

1. *Oesophagostomum* spp. (zubovka)

	Horák a Scholz, 1998		Sedlák, 2002
Kmen	<i>Nemathelminthes</i>	Kmen	hlístice (<i>Nematoda</i>)
Třída	hlístice (<i>Nematoda</i>)	Třída	<i>Secernentea</i> (<i>Phasmida</i>)
Podtřída	<i>Secernentea</i> (<i>Phasmidea</i>)	Podtřída	neuveдена
Řád	<i>Strongylida</i>	Řád	měchovci (<i>Strongylida</i>)
Podřád	<i>Strongyloidea</i>	Podřád	neuveđen
Čeleď	<i>Oesophagostomidae</i>	Čeleď	neuveдена
Rod	<i>Oesophagostomum</i>	Rod	neuveđen

2. čeleď *Thelastomatidae* (dle internetového zdroje (2))

Kmen: *Nematoda*

Třída: *Secernentea*

Řád: *Oxyurida*

Čeleď: *Thelastomatidae*

3. *Toxocara canis* (škrkavka psí)

	Horák a Scholz, 1998		Sedlák, 2002
Kmen	oblovci (<i>Nemathelminthes</i>)	Kmen	hlístice (<i>Nematoda</i>)
Třída	hlístice (<i>Nematoda</i>)	Třída	<i>Secernentea</i> (<i>Phasmida</i>)
Podtřída	<i>Secernentea</i> (<i>Phasmidea</i>)	Podtřída	neuveдена
Řád	škrkavky (<i>Ascarida</i>)	Řád	škrkavice (<i>Ascaridida</i>)
Čeleď	<i>Ascaridae</i>	Čeleď	neuveдена
Rod	<i>Toxocara</i>	Rod	neuveđen

4. *Trichuris ovis* (tenkohlavec ovčí)

Horák a Scholz, 1998		Sedlák, 2002	
Kmen	oblovci (<i>Nemathelminthes</i>)	Kmen	hlístice (<i>Nematoda</i>)
Třída	hlístice (<i>Nematoda</i>)	Třída	<i>Adenophorea</i> (<i>Aphasmida</i>)
Podtřída	<i>Adenophorea</i> (<i>Aphasmidea</i>)	Podtřída	neuveдена
Řád	<i>Enoplida</i>	Řád	nitkovci (<i>Trichocephalida</i>)
Nadčeleď	kapilárie (<i>Trichuroidea</i>)	Nadčeleď	neuveдена
Rod	<i>Trichuris</i>	Rod	neuveден

4.2.3. Systematické zařazení získaných druhů členovců

Parazitické druhy členovců byly získány ze dvou tříd – roztoči (*Acarina*) a hmyz (*Insecta*). I v případě přesného systematického zařazení získaných parazitických členovců byly použity dvě různé publikace dle odlišného pojetí taxonomických kategorií jednotlivých autorů.

1. *Ctenocephalides felis* (blecha kočičí)

Horák a Volf, 2007		Sedlák, 2002	
Kmen	členovci (<i>Arthropoda</i>)	Kmen	<i>Arthropoda</i>
Podkmen	neuveден	Podkmen	šestinoží (<i>Hexapoda</i>)
Třída	hmyz (<i>Insecta</i>)	Třída	jednočelistní, hmyz (<i>Ectognatha</i> , <i>Insecta</i>)
Podtřída	neuveдена	Podtřída	křídlatí (<i>Pterygota</i>)
Kohorta	neuveдена	Kohorta	<i>Holometabola</i>
Řád	<i>Siphonaptera</i> (syn. <i>Aphaniptera</i>)	Řád	blechy (<i>Siphonaptera</i>)

2. *Ixodes ricinus* (klíště obecné)

Horák a Volf, 2007		Sedlák, 2002	
Kmen	členovci (<i>Arthropoda</i>)	Kmen	<i>Arthropoda</i>
Podkmen	neuveден	Podkmen	<i>Chelicerata</i>
Třída	klepátkatci (<i>Chelicerata</i>)	Třída	pavoukovci (<i>Arachnida</i>)
Řád	roztoči (<i>Acarina</i>)	Řád	<i>Acari</i> (<i>Acarina</i>)
Podřád	<i>Metastigmata</i> (<i>Ixodida</i>)	Podřád	klíšťata (<i>Ixodida</i> , <i>Metastigmata</i>)
Čeleď	klíšťovití (<i>Ixodidae</i>)	Čeleď	neuveдена
Rod	<i>Ixodes</i>	Rod	neuveден

3. *Lipoptena cervi* (kloš jelení)

Horák a Volf, 2007		Sedlák, 2002	
Kmen	členovci (<i>Arthropoda</i>)	Kmen	<i>Arthropoda</i>
Podkmen	neuveden	Podkmen	šestinozí (<i>Hexapoda</i>)
Třída	hmyz (<i>Insecta</i>)	Třída	jednočelistní, hmyz (<i>Ectognatha</i> , <i>Insecta</i>)
Podtřída	neuvedena	Podtřída	křídlatí (<i>Pterygota</i>)
Kohorta	neuvedena	Kohorta	<i>Holometabola</i>
Řád	dvoukřídlí (<i>Diptera</i>)	Řád	dvoukřídlí (<i>Diptera</i>)
Podřád	krátkorozí (<i>Brachycera</i>)	Podřád	krátkorozí (<i>Brachycera</i>)
Čeď	klošovíti (<i>Hippoboscidae</i>)	Čeď	neuvedena

4. *Varroa destructor* (kleštík včelí, včelík zhoubný)

Horák a Volf, 2007		Sedlák, 2002	
Kmen	členovci (<i>Arthropoda</i>)	Kmen	<i>Arthropoda</i>
Podkmen	neuveden	Podkmen	<i>Chelicerata</i>
Třída	klepítkatci (<i>Chelicerata</i>)	Třída	pavoukovci (<i>Arachnida</i>)
Řád	roztoči (<i>Acarina</i>)	Řád	<i>Acari</i> (<i>Acarina</i>)
Podřád	<i>Mesostigmata</i> (<i>Gamasida</i>)	Podřád	čmelíkovci (<i>Gamasida</i> , <i>Mesostigmata</i>)
Čeď	<i>Varroidae</i>	Čeď	neuvedena
Rod	<i>Varroa</i>	Rod	neuveden

4.3. Výsledky ve formě laboratorních protokolů

V tomto oddílu praktické části jsou kvalitativní výsledky zpracovány formou řešených laboratorních protokolů, které jsou určeny jako didaktické příručky a studijní materiály pro vyučující a studenty základních a středních škol s rozšiřující výukou biologie. Laboratorní protokoly jsou rozděleny do tří hlavních systematických oddílů:

1. Parazitičtí prvoci (*Protozoa*)
2. Parazitičtí helminti (*Helminthes*)
3. Parazitičtí členovci (*Arthropoda*)

Každý z výše uvedených tematických celků obsahuje 2 – 4 vypracované laboratorní protokoly. V každém tematickém celku jsou rovněž uvedeny možnosti, jaké další příbuzné parazitické organismy by bylo možné využít pro laboratorní cvičení.

Dle tohoto členění laboratorních cvičení do tří tematických celků je možné jednotlivá cvičení zařadit v rámci probírané skupiny živočichů dle rámcového vzdělávacího

programu popřípadě školního vzdělávacího programu. Jako předlohu pro tvorbu a strukturu laboratorních protokolů jsem použila publikace těchto autorů: Dobroruková, Storchová a Cílek, 1998; Bumerl et al., 2006.

4.3.1. Tématický celek parazitických prvoci

K tomuto tematickému celku byly vytvořeny čtyři laboratorní protokoly na základě získaných parazitických prvoků ze tří různých kmenů říše *P r o t o z o a*: *A p i c o m p l e x a* (druhy *Eimeria spp.*, *Gregarina blattarum*, *Gregarina cuneata*, *Gregarina polymorpha*, *Monocystis lumbrici*), *E u g l e n o z o a* (druhy *Leptomonas pyrrhocoris*, *Cryptobia helicis*), *P a r a b a s a l a* (druh *Lophomonas blattarum*).

4.3.1.1. Laboratorní protokol č. 1

Vypracoval(a):

Datum:

Téma: PARAZITIČTÍ PRVOCI z kmene *Euglenozoa* – *Cryptobia helicis*,
Leptomonas pyrrhocoris

Cíle:

- 1) Seznámit se s morfologickou a anatomickou stavbou parazitických prvoků z kmene *Euglenozoa*.
- 2) Poznat postavení typických organel pro třídu *Kinetoplastea* (kinetoplast, jádro, bazální tělísko, bičíky, cytostom, popřípadě glykosom) a seznámit se s jejich anatomickou stavbou.
- 3) Zdokonalit se v tvorbě totálních nativních preparátů a naučit se barvit suché roztěry metodou Giemsa-Romanowského a zhotovovat trvalé preparáty.

Teoretický úvod:

Leptomonas pyrrhocoris je prvok z parazitologicky významné třídy *Kinetoplastea*. Hojně se vyskytuje v trávicí trubici ploštice (podřád *Heteroptera*, čeleď *Pyrrhocoridae*) ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*). *Leptomonas pyrrhocoris* je jednohostitelská (monogenetická) trypanosomatida, u které se vyskytují pouze promastigitní a amastigotní stadia v podobě tenkostěnných cyst. Má pouze jeden bičík (u některých forem tvoří ondulující membránu). Z původního druhého bičíku je zachováno bazální tělísko.

Cryptobia helicis je také prvok ze třídy *Kinetoplastea*, který žije v receptaculum seminis (zásobním váčku, semenné schránce) hlemýždě zahradního (*Helix pomatia*) – kmen *Mollusca*, třída *Gastropoda*, podtřída *Pulmonata*. Charakteristickým znakem jsou dva heterodynamické bičíky – přední a zpětný (vlečný), který je u rodu *Cryptobia* přirostlý k povrchu buňky, aniž by tvořil ondulující membránu. Na konci buňky zpětný bičík pokračuje jako volný vlečný bičík.

Úkol 1: Vypreparujte trávicí trubici z ploštice ruměnice pospolné a zásobní váčky (receptaculum seminis) z hlemýždě zahradního.

Úkol 2: Zhotovte dočasný nativní preparát z obsahu trávicí trubice ruměnice pospolné a z roztlaků zásobních váček hlemýždě zahradního a pozorujte výše uvedené parazitické prvoky pod mikroskopem pod různými zvětšeními.

Úkol 3: Popište a zakreslete tvar těla pozorovaných prvoků a organely, které jste pozorovali v nativním preparátu, případně další životní funkce, které jste v nativním preparátu pozorovali (pohyb, trávení, vylučování, rozmnožování, atd.).

Úkol 4: Zhotovte trvalé preparáty parazitických prvoků *Leptomonas pyr rhocoris* a *Cryptobia heli cis* barvené metodou Giemsy – Romanowského.

Úkol 5: Pozorujte a zakreslete trvalý obarvený preparát *Leptomonas pyr rhocoris* a *Cryptobia heli cis* zvětšený 1000x pomocí imerzního objektivu. Zvláštní pozornost věnujte odlišnému zbarvení cytoplasmy a buněčných organel.

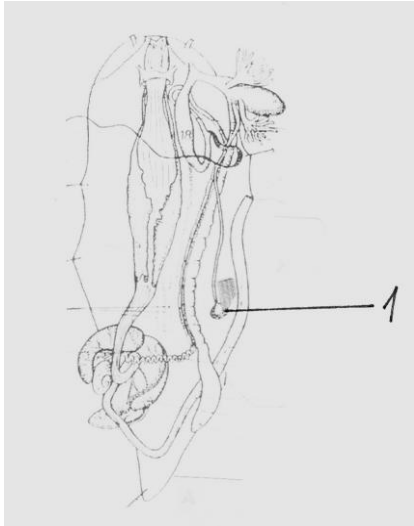
Materiál a pomůcky:

Živé ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) – dospělí jedinci i nymfy, živí hlemýždi zahradní (*Helix pomatia*), preparační (pítevní) miska, preparační jehla, pinzeta, nůžky, jednorázová plastová pipeta, gumové jednorázové rukavice, podložní a krycí skla, fyziologický roztok (0,9 g chloridu sodného – NaCl rozpuštěného ve 100 ml destilované vody), vlákna vaty, roztok želatiny (1 g želatiny rozpuštěný ve 100 ml teplé vody), proužky filtračního papíru, azbestová deska, plynový kahan, zápalky, čistý benzín nebo chloroform, methanol k fixaci suchých roztěrů, barvicí můstek nebo skleněné kyvety opatřené drážkami, zředěný roztok Giemsova barviva převařenou destilovanou v poměru 1:10, mikroskop a potřeby k mikroskopování, imerzní olej (cedrový olej), imerzní objektiv, měkký hadřík

Postup:

A) Pinzetou uchopte živou ruměnici pospolnou a pomocí nůžek nebo pinzety ji oddělte hlavu od zbytku těla. Pomocí preparační jehly, pinzety a nůžek vypreparujte z těla ruměnice pospolné trávicí trubici.

B) Velkou širokohrdlou lahev naplňte po okraj převařenou vodou a vložte do ní živé hlemýžďe zahradní a zavičkujte ji. Takto proveďte usmrcení plže, které trvá přibližně 20 – 24 hodin. Poté po částech opatrně odstraňte pomocí pinzety ulitu. Plže připevněte pomocí špendlíků k voskovému dnu pítevní misky a objekt přelijte vodou. Pomocí nůžek, pinzety a preparační jehly vypreparujte zásobní váček (receptaculum seminis), kde by se měli nacházet cizopasní prvoci *Cryptobia heli cis* (obr. 18).



Obr. 18: Vnitřní orgány hlemýždě zahradního (*Helix pomatia*): 1 – zásobní váček (receptaculum seminis), (převzato a upraveno dle Buchara, 1993)

Zhotovení dočasných nativních preparátů:

Na dobře vyčištěná a odmaštěná podložní sklíčka kápněte jednorázovou plastovou pipetou kapku předem připraveného fyziologického roztoku.

A) Na první podložní sklíčko s kapkou fyziologického roztoku vymačkejte část obsahu trávicí trubice ruměnice pospolné.

B) Na druhé podložní sklíčko s kapkou fyziologického roztoku rozetřete pomocí preparační jehly část obsahu zásobního váčku hlemýždě zahradního.

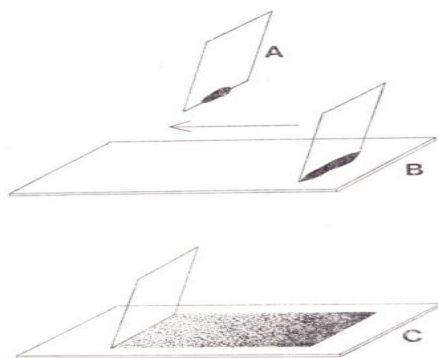
Potom přikápněte pipetou připravený roztok želatiny nebo vložte několik vláken vaty pro zpomalení pohybu bičíkovců *Leptomonas pyrrocoris* a *Cryptobia helicis*. Lehce přikryjte krycím sklíčkem, aby pod ním nebyly vzduchové bubliny a ze stran opatrně odsajte proužky filtračního papíru přebytečný fyziologický roztok. Takto získáte nativní dočasné preparáty cizopasných prvoků ze třídy *Kinetoplastea*.

C) Dočasný nativní preparát položte na stolek mikroskopu, upevněte jej svorkami a pozorujte. Pod krycím sklíčkem najděte místo, kde je soustředěno nejvíce parazitických prvoků, a zaostřete pomocí makrošroubu a mikrošroubu. Prohlížejte postupně od nejmenšího po největší zvětšení.

Zhotovení trvalých preparátů a jejich barvení metodou Giemsy – Romanowského:

Naprosto čistá a hlavně odmaštěná podložní a krycí sklíčka mírně vyžítáme na azbestové desce přímým plamenem plynového kahanu. Potom opakujeme stejný postup jako při zhotovení nativního dočasného preparátu (viz předchozí body). Krycím sklem

přejedeme po podložním skle s kapkou kultury obsahující endoparazitické prvoky *Leptomonas pyrrocoris* nebo *Cryptobia helicis* (obr. 19).

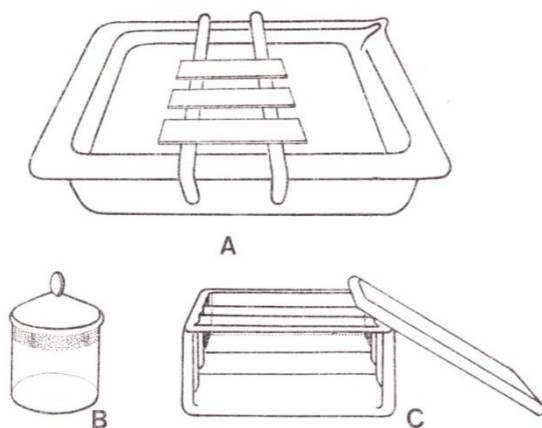


Obr. 19: Zhotovení suchého roztěru z kultury obsahující prvoky: A – krycí sklo s kapkou kultury prvoků, B – roztáhnutí kapky s kulturou prvoků po hraně krycího skla po přiložení k podložnímu sklu, C – rozetření kapky kultury s prvoky do tenké vrstvy posunutím krycího skla (převzato a upraveno dle Jírovce, 1977)

A) Nátěr nechte na vzduchu zaschnout, čímž provedete první fixaci.

B) Na suchý nátěr nakapejte metanol a nechte alespoň 3 minuty působit. Poté opatrně osušte filtračním papírem a nechte opět zaschnout. Tímto způsobem provedete druhou fixaci.

C) Suché nátěry obarvete zředěným roztokem Giemsova barviva v poměru 1:10 na barvicím můstku nebo ve skleněných kyvetách opatřených drážkou po dobu 30 minut (obr. 20).



Obr. 20: Nádoby k barvení mikroskopických preparátů: A – barvicí můstek, B – nádobka k provádění nátěrů na krycích sklíčkách, C – skleněná kyveta opatřená drážkami (převzato a upraveno dle Jírovce, 1977)

D) Nátěr opláchněte destilovanou vodou, jemně osušte filtračním papírem a nechte na vzduchu zaschnout.

E) Trvalé obarvené preparáty cizopasných prvoků *Leptomonas pyrrocoris* a *Cryptobia helicis* pozorujte pod mikroskopem při zvětšení 1000x . Na podložní sklo s obarvenou kulturou *Leptomonas pyrrocoris* nebo *Cryptobia helicis* v místě pozorování přeneste malou kapku imerzního oleje. Nastavte imerzní objektiv a hrubým posunem sesouvejte tubus dolů až se téměř dotknete čelní čočkou objektivu krycího sklíčka. Dívejte se ze strany. Při nejnižší poloze objektivu se dívejte do okuláru a opatrně posouvejte hrubým posunem nahoru. Nikdy se nedívejte do mikroskopu, jestliže posouváte směrem dolů – pracovní vzdálenost silně zvětšujících objektivů je velmi malá a trvalý preparát byste mohli prorazit a objektiv poškodit.

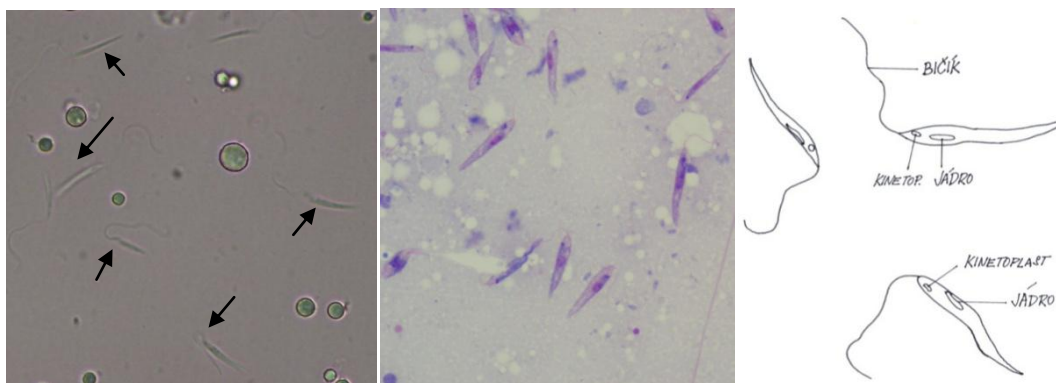
Po skončení pozorování trvalého obarveného preparátu pečlivě očistěte čelo objektivu a trvalý preparát měkkým hadříkem namočeným v benzínu. Nenechávejte imerzní olej zaschnout, protože potom se velmi špatně čistí.

Vypracování:

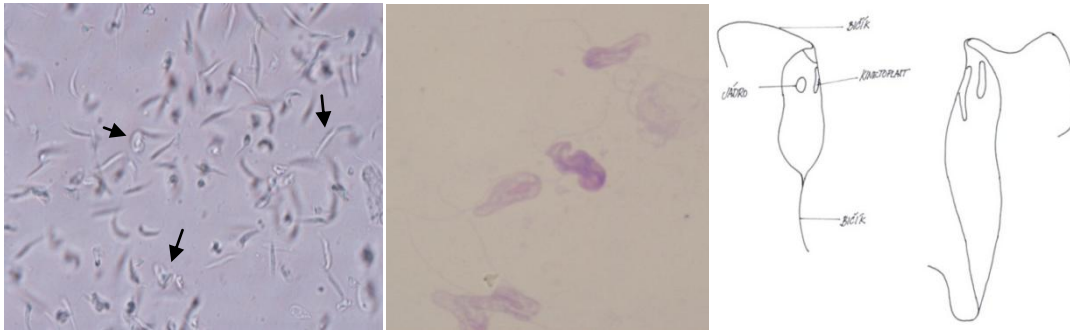
- 1) Nákres a popis tvaru těla pozorovaných endoparazitických prvoků v nativním a trvalém mikroskopickém preparátu
- 2) Nákres a popis buněčných organel *Leptomonas pyrrocoris* a *Cryptobia helicis* (jádro, bičík, kinetoplast, cytostom, cytoplasma, apod.)
- 3) Srovnání obou endoparazitických prvoků

Řešení:

Leptomonas pyrrocoris (nativní preparát – trvalý obarvený preparát – nákres)



Cryptobia helicis (nativní preparát – trvalý obarvený preparát – nákres)



Závěr:

Odpovězte celou větou na následující otázky:

1. Jaká dvě stádia a v jaké podobě se vyskytují u cizopasného prvoka *Leptomonas pyrrhocatoris*.
2. Jaký je hlavní rozdíl v morfologické stavbě mezi druhem *Leptomonas pyrrhocatoris* a *Cryptobia helicis*.
3. Jaký je jednotící znak příslušníků třídy *Kinetoplastea*, kam patří pozorované druhy *Leptomonas pyrrhocatoris* a *Cryptobia helicis*.

Řešení:

1. U prvoka *Leptomonas pyrrhocatoris* se vyskytuje stadium amastigotní (leishmaniová forma) – ve formě tenkostěnných cyst a stadium promastigotní (leptomonádová forma).
2. *Leptomonas pyrrhocatoris* má jeden bičík, *Cryptobia helicis* má dva bičíky (přední a zpětný).
3. Jednotícím znakem příslušníků třídy *Kinetoplastea* je přítomnost kinetoplastu – úsek mitochondrie, ve které je nahromaděno velké množství DNA.

Klíčová slova:

kinetoplast, bazální tělísko, jádro, bičík, glykosom, cytosom, ruměnice pospolná (*Pyrrhocatoris apterus*), *Leptomonas pyrrhocatoris*, amastigot, promastigot, hlemýžď zahradní (*Helix pomatia*), *Cryptobia helicis*, receptaculum seminis, promastigotní stadium, amastigotní stadium, monogenetická (jednohostitelská)

Možnosti pozorování dalších podobných parazitických prvoků:

Trvalé preparáty druhu *Trypanosoma brucei brucei* nebo zástupců rodu *Leishmania*.

4.3.1.2. Laboratorní protokol č. 2

Vypracoval(a):

Datum:

Téma: PARAZITIČTÍ PRVOCI z kmene *Apicomplexa* (výtrusovci) – *Gregarina blattarum*, *Gregarina cuneata*, *Gregarina polymorpha*, *Monocystis lumbrici* (syn. *M. agilis*)

Cíle:

- 1) Seznámit se s morfologickou a anatomickou stavbou parazitických prvoků z kmene *Apicomplexa*
- 2) Porozumět složitým vývojovým (životním) cyklům jednotlivých zástupců třídy *Gregarinea*
- 3) Zdokonalit se v tvorbě totálních nativních preparátů a naučit se barvit suché roztěry metodou Giemsa-Romanovského a zhotovovat trvalé preparáty.

Teoretický úvod:

Gregariny (hromadinky) jsou zástupci kmene *Apicomplexa* (výtrusovci), který je jedním z největších kmenů parazitických protist. Obsahuje veterinárně i medicínsky závažné parazitické druhy. Typickým znakem kmene *Apicomplexa* jsou velmi složité vývojové cykly se 3 rozmnožovacími fázemi životního cyklu: 1) merogonie (schizogonie), 2) gametogonie, 3) sporogonie. Gregariny z třídy *Gregarinea* parazitují v trávicím traktu či tělní dutině bezobratlých. *Gregarina polymorpha* a *Gregarina cuneata* jsou druhy z řádu *Eugregarinida* žijící ve střevě larev potemníka moučného (*Tenebrio molitor*). Hromadinka švábí (*Gregarina blattarum*) žije ve střevě švábů.

Hromadinka žížalí - *Monocystis lumbrici* (syn. *Monocystis agilis*) patří podobně jako předchozí druhy gregarin do nejpočetnějšího řádu *Eugregarinida* kmene *Apicomplexa*. Oproti předchozím druhům gregarin však nemá septa v buňce trofozoitu (skupina *Aspetatina*). Přichycení k buňce zajišťuje přední část zoitu, která je modifikována do jednoduchého váčku, tzv. mukronu. *Monocystis lumbrici* je častým parazitem v semenných váčcích žížaly obecné (*Lumbricus terrestris*).

Materiál a pomůcky: živé larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*) – „mouční červi“, živé nymfy i imaga švába pestrého (*Eublaberus distantis*) nebo švába velkokřídlého (*Archimandrita tessellata*), živá žížala obecná (*Lumbricus terrestris*),

preparační (pítevní) miska, preparační jehla, pinzeta, nůžky, špendlíky, jednorázová plastová pipeta, gumové jednorázové rukavice, podložní a krycí skla, fyziologický roztok, proužky filtračního papíru, čistý benzín, binokulární lupa, mikroskop a potřeby k mikroskopování, imerzní olej (cedrový olej), imerzní objektiv, měkký hadřík

Úkol 1: Vypreparujte trávicí trubici nymfy popř. imaga švába pestrého (*Eublaberus distantis*) nebo švába velkokřídleho (*Archimandrita tessellata*)

Úkol 2: Vypreparujte trávicí trubici z těla larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*).

Úkol 3: Vypreparujte semenné vajíčky z těla žížaly obecné (*Lumbricus terrestris*).

Úkol 3: Zhotovte dočasný nativní preparát z obsahu trávicí trubice nymfy švába pestrého (*Eublaberus distantis*) nebo švába velkokřídleho (*Archimandrita tessellata*)

Úkol 4: Zhotovte dočasný nativní preparát z obsahu trávicí trubice larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor*)

Úkol 5: Zhotovte dočasný nativní preparát ze semenných vajíček žížaly obecné (*Lumbricus terrestris*).

Úkol 6: Pozorujte nativní preparáty hromadinky švábové (*Gregarina blattarum*) pod mikroskopem pod různými zvětšeními.

Úkol 7: Pozorujte nativní preparáty *Gregarina cuneata* a *Gregarina polymorpha* pod mikroskopem pod různými zvětšeními.

Úkol 8: Pozorujte nativní preparát hromadinky žížalí (*Monocystis lumbrici*) pod mikroskopem pod různými zvětšeními.

Úkol 7: Popište tvar těla pozorovaných prvoků a orgány, které jste pozorovali v nativním preparátu, případně další životní funkce, které jste v nativním preparátu pozorovali (trávení, vylučování, rozmnožování, atd.).

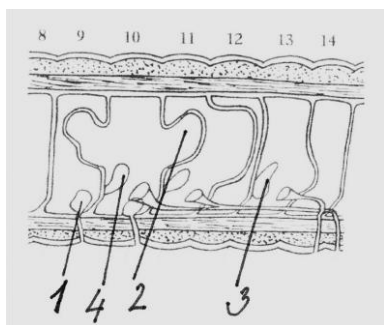
Úkol 8: Pozorujte trvalé obarvené preparáty hromadinek (barvené metodou Giemsa – Romanowského) zvětšené 1000x pomocí imerzního oleje a imerzního objektivu.

Úkol 9: Popište pohyb pozorovaných prvoků.

Postup:

- 1) Vezměte pinzetou nymfu živého švába a nůžkami mu ustříhnete hlavičku. Pomocí preparační jehly, pinzety a nůžek vypreparujte z těla švába trávicí trubici.
- 2) Pomocí pinzety uchopte středně velkou larvu potemníka moučného (*Tenebrio molitor*), nůžkami ji odstříhnete hlavičku.

- 3) Vezměte čerstvě usmrcenou žížalu obecnou (*Lumbricus terrestris*) a připevněte její před a zad pomocí špendlíků k preparační misce. Pomocí pinzety, preparační jehly, skalpelu (nebo žiletky) vypreparujte semenné kanálky z těla žížaly. Na 10. a 11. článku jsou dva páry varlat přecházející v semenné vajíčky, první pár vystupuje z přepážky mezi 9. a 10. článkem, druhý pár mezi 10. a 11. článkem a třetí mezi 11. a 12. článkem (obr. 21). Abyste přesně vedly řez v místech zmíněných článků, je nutno provádět pitvu pod binokulární lupou.



Obr. 21: Vyústění pohlavního ústrojí na podélném řezu žížaly v 9. – 15 článku: 1 – receptaculum seminis, 2 – semenný váček, 3 – vaječník, 4 – varle, 8-14 – články (převzato a upraveno dle Buchara, 1995)

- 4) Na dobře vyčištěné a odmaštěné podložní skličko kápněte pipetou kapku fyziologického roztoku a vymačkejte vnitřní obsah trávicí trubice švába a na další vnitřní obsah trávicí trubice moučného červa nebo rozmačkané semenné vajíčky žížaly. Lehce přikryjte krycím sklíčkem a ze stran opatrně odsajte proužky filtračního papíru přebytečný fyziologický roztok.
- 5) Dočasný nativní preparát položte na stolek mikroskopu, upevněte jej svorkami a pozorujte. Pod krycím sklíčkem najděte místo, kde je soustředěno nejvíce hromádek (gregarin) a zaostřete pomocí makrošroubu a mikrošroubu. Prohlížejte postupně od nemenšího (100x) po největší zvětšení (600x).
- 6) Trvalý obarvený preparát hromádky švábové (*Gregarina blattarum*), *Gregarina cuneata* a *Gregarina polymorpha* (postup viz kapitola 3.2.1.1.) pozorujte pod mikroskopem 1000x zvětšený. Na podložní sklo s obarvenou kulturou hromádek v místě pozorování přeneste malou kapku imerzního oleje. Nastavte imerzní objektiv a hrubým posunem sesouvejte tubus dolů až se téměř dotknete čelní čočkou objektivu krycího sklíčka. Dívejte se ze strany. Při nejnižší poloze objektivu se dívejte do okuláru a opatrně posouvejte hrubým posunem nahoru. Nikdy se

nedívejte do mikroskopu, jestliže posouváte směrem dolů – pracovní vzdálenost silně zvětšujících objektivů je velmi malá a trvalý preparát byste mohli prorazit a objektiv poškodit.

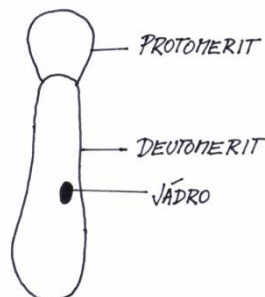
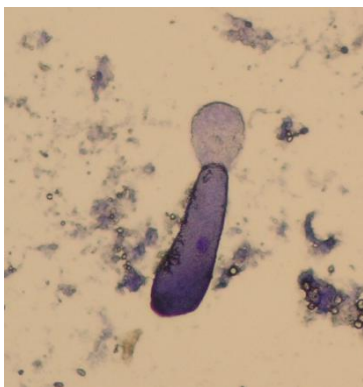
- 7) Po skončení pozorování trvalého obarveného preparátu pečlivě očistěte čelo objektivu a trvalý preparát měkkým hadříkem namočeným v benzínu. Nenechávejte imerzní olej zaschnout, protože potom se velmi špatně čistí.

Vypracování:

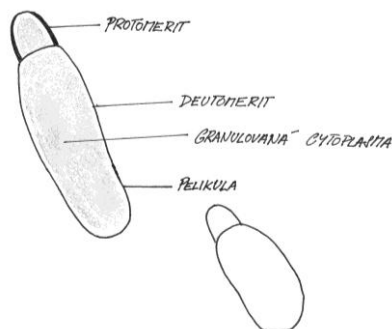
- 1) Nákres a popis tvaru těla pozorovaných endoparazitických prvoků v nativním nebo trvalém mikroskopickém preparátu
- 2) Popis jednotlivých částí buňky trofozoitu (epimerit, protomerit, deutomerit) u hromadinek ze skupiny *Septatina* a skupiny *Aseptatina*, zakreslení jádra a granulované cytoplasmy
- 3) Srovnání rozdílné stavby buňky trofozoitu hromadinek ze střeva švábů a larev potměníka moučného oproti hromadinkám v semenných váčcích žížaly obecné

Řešení:

Gregarina cuneata (trvalý obarvený preparát – nákres)



Gregarina polymorpha (dočasný nativní preparát – nákres)



Monocystis lumbrici – syn. *M. agilis* (dočasný nativní preparát – nákres)



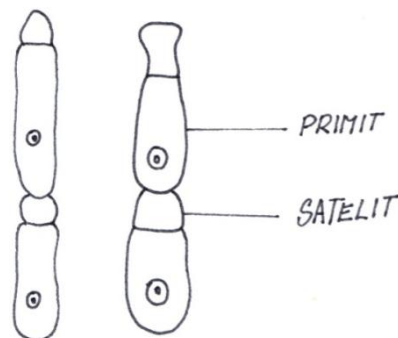
Závěr:

Odpovězte celou větou na následující otázky:

- 1) Co je to trofozoit?
- 2) Vyjmenujte všechny fáze vývojového (životního) cyklu kmene *Apicomplexa*. Která fáze rozmnožovacího cyklu není přítomna u řádu *Eugregarinida*, kam patří všechny pozorované hromadinky?
- 3) Co je to syzygie? (nákres + popis)
- 4) K čemu slouží apikální komplex, podle kterého je nazván celý kmen výtrusovců (*Apicomplexa*)?

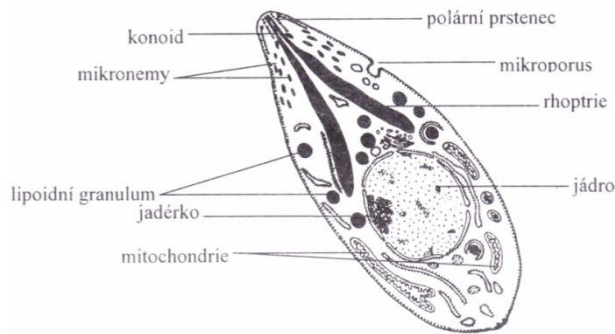
Řešení:

- 1) Trofozoit je vegetativní vývojové stadium gregarin, který žije vtlačen přední částí své buňky do různě hluboké prohlubně v buňce hostitele. V podstatě se jedná o obrovsky zvětšený sporozoit.
- 2) sporogonie, merogonie (syn. schizogonie), gametogonie; U pozorovaných druhů hromadinek z řádu *Eugregarinida* neexistuje merogonie (schizogonie ve vegetativní fázi vývoje
- 3)



Syzygie je přikládání uvolněných trofozoitů (tzv. gamonti – předsexuální stadia) k sobě ve dvojicích.

4) Apikální komplex je soubor několika organel na předním pólu zoitů (sporozoitů, merozoitů), kterým umožňuje částečný či úplný průnik do tkání či buněk hostitele.



Obr. 22: Schéma zoitu (převzato dle Chroust, 1998)

Klíčová slova:

vývojový (životní cyklus), merogonie, schizogonie, gametogonie, sporogonie, epimerit, protomerit, deutomerit, syzygie, primit, satelit, *Septatina*, *Asseptatina*, výtrusovci, mukron, trofozoit, gamont, sporozoit, gametocysta, hromadinka švábí (*Gregarina blattarum*), *G. cuneata*, *G. polymorpha*, hromadinka žížalí – *Monocystis lumbrici* (*M. agilis*)

Možnosti pozorování dalších podobných parazitických prvoků:

Gregarina steini nebo *Steinina ovalis*, které se také mohou vyskytovat v trávicí trubici larev potemníka moučného (*Tenebrio molitor*).

4.3.1.3. Laboratorní protokol č. 3

Vypracoval(a):

Datum:

Téma: PARAZITIČTÍ PRVOCI z kmene *Apicomplexa* (výtrusovci) – třída *Coccidea* (kokcidie) – oocysty kokcidie rodu *Eimeria* z infikovaného trusu ovce

Cíle:

- 1) Seznámit se s morfologickou a anatomickou stavbou oocyst kokcií rodu *Eimeria* z kmene *Apicomplexa*
- 2) Porozumět rozdílům ve vývojovém (životním) cyklu mezi třídami *Gregarina* a *Coccidea*
- 3) Naučit se používat a pracovat s určovacími klíči

Teoretický úvod:

Třída *Coccidea* (kokcidie), do které patří i pozorovaný druh z rodu *Eimeria* jsou velmi početnou skupinou obligátně vnitrobuněčných (intracelulárních) jednobuněčných parazitů obratlovců bezobratlých živočichů. V infekčních stádiích kokcií, tzv. zoitech jsou přítomny buňky apikálního komplexu, a proto kokcidie patří do kmene *Apicomplexa* podobně různé druhy gregarin pozorované v předchozí kapitole. Na rozdíl od třídy *Gregarina* infekční stadia kokcií (zoiti) nemají epimerit ani mukron. Vývojový (životní) cyklus kokcií rodu *Eimeria* (obligátně monoxenních zástupců) obsahuje všechny tři fáze rozmnožování na rozdíl od řádu *Eugregarinida*, kam patří druhy hromadinek z předchozího laboratorního protokolu. Zástupci rodu *Eimeria*, kam patří pozorovaný druh kokcidie v tomto laboratorním cvičení *Eimeria ovinivalis* (syn. *E. ninakohlyakimovae*) z infikovaného trusu ovce jsou typičtí oocystami se 4 sporocystami, z nichž každá obsahuje 2 sporozoity.

Materiál a pomůcky: čerstvý nebo fixovaný (v 4% roztoku formaldehydu – CH₂O) infikovaný trus ovce, třecí miska s tloučkem, plastové sítko, jednorázové plastové pipety nebo vyšetřovací kličky, centrifuga, konické zkumavky a stojan na zkumavky, kádinky, skleněná tyčinka, laboratorní lžička, podložní a krycí skla, destilovaná voda, stříčka, zásobní plastové lahve, zásobní roztok bezvodého síranu hořečnatého – MgSO₄ nebo chloridu sodného – NaCl, digitální váhy, filtrační papír, lihový fix, jednorázové gumové rukavice, odpadní nádobka s desinfekčním roztokem (chloramin – NH₂Cl, SAVO)

Úkol 1: Připravte nasycené flotační roztoky z dehydratovaných chemikálií do zásobních lahví

Úkol 2: Koprologickými flotačními vyšetřovacími metodami diagnostikujte oocysty kokcií rodu *Eimeria* v infikovaném trusu ovce

Úkol 3: Zhotovte dočasný mikroskopický preparát z vyflotovaného vzorku infikovaného trusu ovce

Úkol 4: Pozorujte dočasné mikroskopické preparáty obsahující oocysty kokcií rodu *Eimeria* pod mikroskopem od nejmenšího (100x) po největší zvětšení (600x)

Úkol 5: Popište tvar oocysty pozorovaného druhu kokcie *Eimeria spp.*, popř. tvar a počet sporocyst a sporozoitů, jsou-li vysporulované

Úkol 6: Dle určovacího klíče (např. Černá, 1983 nebo Chroust, 1998) determinujte dle určovacích znaků (např. velikost a tvar oocysty, přítomnost mikropyle či mikropylové čepičky) o jaký druh kokcie rodu *Eimeria* se jedná

Postup:

1) Příprava Füllebornova a Brezova nasyceného flotačního roztoku

Připravte si dvě zásobní lahve o objemu jeden litr, digitální váhy na odvážení dehydratovaného chloridu sodného, síranu hořečnatého, popř. thiosíranu sodného, stříčku s destilovanou vodou

A) Füllebornův nasycený flotační roztok

- na digitálních vahách navažte 35 g chloridu sodného – NaCl (kuchyňská sůl) a dokonale rozpusťte v 100 ml teplé destilované vody za občasného míchání skleněnou tyčinkou; takto připravený nasycený roztok slijte do zásobní lahve a popište lihovým fixem

B) Brezův nasycený flotační roztok

- rozpusťte dehydratovaný síran hořečnatý – MgSO₄ (popř. thiosíran sodný – Na₂S₂O₃) v destilované vodě v poměru 3:1 (dehydratovaná sůl : destilovaná voda) za občasného míchání skleněnou tyčinkou, dokud není sůl dokonale rozpuštěna; takto připravený nasycený roztok slijte do zásobní lahve a popište lihovým fixem

2) Zpracování infikovaného trusu ovce Brezovou flotační metodou

A) cca 2 g čerstvého nebo fixovaného (v 4% roztoku formaldehydu – CH₂O) infikovaného trusu ovce rozmělněte s trochou destilované vody ve třecí misce

s tloučkem a potom skleněnou tyčinkou nebo laboratorní lžičkou dokonale rozmíchejte do podoby suspenze

B) obsahuje-li trus hrubé a velké částice, homogenizovaný vzorek trusu přefiltrujte přes plastové sítko, popř. přes gázu položenou na kádince

C) předem připravené kónické zkumavky (nejlépe plastové) popište lihovým fixem a naplňte je přefiltrovanou suspenzí vzorku trusu do výše jednoho cm od horního okraje

D) naplněné zkumavky vložte do centrifugy a centrifugujte při 2000 otáčkách po dobu 2 – 3 minut

E) zkumavky vyjměte z centrifugy, pozorujte tmavý sediment usazený na dně zkumavky a světlejší supernatant, který rázně slijte do připravené odpadní nádoby s desinfekčním roztokem (chloramin – NH₂Cl, SAVO)

F) stříčkou s nasyceným flotačním roztokem (Brezův nebo Füllebornův) přidejte k sedimentu na dvě zkumavky trochu nasyceného flotačního roztoku a skleněnou tyčinkou nebo špejlí dokonale rozmíchejte sediment s nasyceným roztokem, poté doplňte zkumavku nasyceným flotačním roztokem ze stříčky do výše jednoho cm od horního okraje zkumavky

G) zkumavky opět umístěte do centrifugy a flotujte při 2000 otáčkách po dobu 2 – 3 minut a poté ji s velkou opatrností vyjměte z centrifugy, aby nebyla porušena povrchová blanka (obsahuje vyflotované oocysty kokcií) a umístíme do stojánku na pracovním stolku

3) Zhotovení dočasného mikroskopického preparátu oocyst kokcií z vyflotovaného roztoku trusu

A) pomocí jednorázové plastové vyšetřovací klíčky nebo pipety se lehce dotkněte povrchové blanky ve zkumavce

B) vyšetřovací klíčkou nebo jednorázovou pipetou proveďte po okraji podložního skla krouživý pohyb na ploše cca 1x1 cm², zbylou plochu podložního skla využijte k opakovanému roztěru vzorku trusu

C) opatrně přiložte krycí sklíčko a pozorujte pod mikroskopem od nejmenšího (100x) po největší (600x) zvětšení

Vypracování:

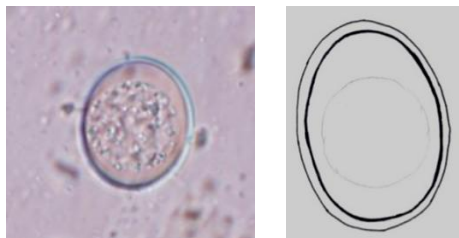
1) Nákres a popis tvaru oocyst kokcií rodu *Eimeria*

2) Popis jednotlivých částí oocysty kokcidie – sporocysty, sporozoity, mikropyle, apod.

3) Srovnání pozorované oocysty *Eimeria ovinivalis* s jinými druhy oocyst rodu *Eimeria* cizopasnících u ovcí dle určovacích klíčů (Černá, 1983; Chroust, 1998)

Řešení:

Eimeria ovinivalis (syn. *E. ninakohlyakimovae*), dočasný preparát – nákres



Závěr:

Odpovězte celou větou na následující otázky:

- 1) Co je to oocysta?
- 2) Vysvětlete proces sporulace
- 3) Co to znamená, že kokcidie rodu *Eimeria* jsou obligátní intracelulární parazité?
- 4) Do které třídy řadíme kokcidie rodu *Eimeria*?

Řešení:

- 1) Oocysta je konečné infekční a exogenní stadium poslední fáze vývojového (životního) cyklu kokcidií, kterou nazýváme sporogonie.
- 2) Sporulace je proces přeměny jednobuněčného sporontu na zralou, infekce schopnou oocystu.
- 3) Zástupci kokcidií rodu *Eimeria* jsou zpravidla (obvykle) nitrobuněční cizopasníci.
- 4) Kokcidie rodu *Eimeria* řadíme do třídy *Coccidea*.

Klíčová slova:

vývojový (životní cyklus), merogonie, schizogonie, gametogonie, sporogonie, excitace, oocysta, sporocysta, sporozoit, mikropyle, kokcidie, *Eimeria*, sporulace, monoxenní (jednohostitelská), flotace, koprologické metody, Brezův flotační roztok, Füllebornův flotační roztok

Možnosti pozorování dalších podobných parazitických prvoků:

Kokcidie rodu *Eimeria* z trusu králíka, slepice, psa, apod.; trvalé preparáty vícehostitelské (heteroxenní, dixenní) kokcidie *Toxoplasma gondii*.

4.3.1.4. Laboratorní protokol č. 4

Vypracoval(a):

Datum:

Téma: SYMBIOTIČTÍ PRVOCI z kmene *P a r a b a s a l a* – brvitka švábová (*Lophomonas blattarum*)

Cíle:

- 1) Seznámit se s morfologickou a anatomickou stavbou parazitických prvoků z kmene *P a r a b a s a l a*
- 2) Objasnit rozdíl mezi trofickými vztahy: parazitismus x komenzálismus x mutualismus
- 3) Zdokonalit se v tvorbě totálních nativních preparátů a naučit se barvit suché roztěry dle Giemsky – Romanovského a zhotovit trvalé preparáty.

Teoretický úvod:

Brvitka švábová (*Lophomonas blattarum*) je zástupcem řádu *T r i c h o n y m p h i d a*. Zástupci tohoto řádu z kmene *P a r a b a s a l a* žijí výhradně v trávicí trubici nižších švábů a dřevokazných švábů. Jsou specializováni na trávení celulózy (v trávicím traktu termita či švába pohlcují celé kousky celulózy) velkým množstvím bičíků (až tisíce), výraznému zvětšení buňky a velkými parabazálními aparáty (váčkovité aparáty ležící vždy poblíž bičíků) a přítomností symbiotických bakterií ve svých buňkách. Vztah těchto prvoků žijících výlučně ve střevě termitů a švábů má mutualistickou povahu spolusoužití. Druh (*Lophomonas blattarum*) žije v zadním oddíle trávicího traktu švábů.

Materiál a pomůcky: živý šváb pestrý (*Eublaberus distantis*) nebo šváb velkokřídý (*Archimandrita tessellata*) – imaga i nymfy, preparační (pitevní) miska, preparační jehla, pinzeta, nůžky, jednorázová plastová pipeta, gumové jednorázové rukavice, podložní a krycí skla, fyziologický roztok (0,9 g chloridu sodného – NaCl rozpuštěného ve 100 ml destilované vody), vlákna vaty, roztok želatiny (1 g želatiny rozpuštěný ve 100 ml teplé vody), proužky filtračního papíru, azbestová deska, plynový kahan, zápalky, čistý benzín nebo chloroform, methanol k fixaci suchých roztěrů, barvicí můstek nebo skleněné kyvety opatřené drážkami, zředěný roztok Giemsova barviva převařenou destilovanou v poměru 1:10, mikroskop a potřeby k mikroskopování, imerzní olej (cedrový olej), imerzní objektiv, měkký hadřík

Úkol 1: Vypreparujte trávicí trubici nymfy nebo imaga švába pestrého (*Eublaberus distanti*) nebo švába velkokřídleho (*Archimandrita tessellata*)

Úkol 2: Zhotovte dočasný nativní preparát z obsahu trávicí trubice švába a pozorujte výše uvedené symbiotické prvky pod mikroskopem pod různými zvětšeními.

Úkol 3: Popište a zakreslete tvar těla pozorovaných prvků a organely, které jste pozorovali v nativním preparátu, případně další životní funkce, které jste v nativním preparátu pozorovali (pohyb, trávení, vylučování, rozmnožování, atd.).

Úkol 4: Zhotovte trvalé preparáty symbiotického prvoka *Lophomonas blattarum* barvené metodou Giemsy-Romanovského.

Úkol 5: Pozorujte a zakreslete trvalý obarvený preparát brvitky švábové *Lophomonas blattarum* zvětšený 1000x pomocí imerzního oleje a imerzního objektivu. Zvláštní pozornost věnujte odlišnému zbarvení cytoplazmy a buněčných organel

Postup:

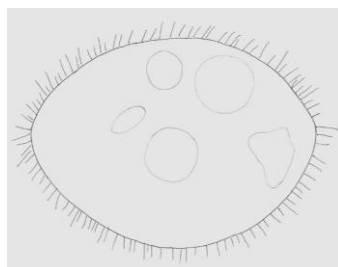
Vypreparování trávicí trubice švába a zhotovení nativních dočasných preparátů i trvalých preparátů včetně jejich barvení metodou Giemsy – Romanovského dle postupů v kapitolách 4.3.1.1. a 4.3.1.2.

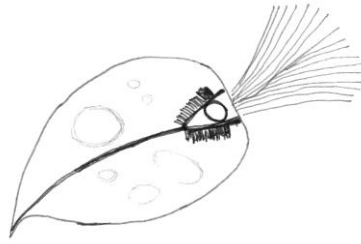
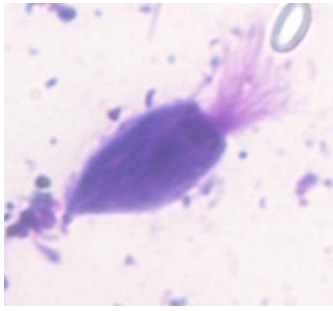
Vypracování:

- 1) Nákres a popis tvaru těla pozorovaných endoparazitických prvků v nativním a trvalém mikroskopickém preparátu
- 2) Nákres a popis buněčných organel brvitky švábové (*Lophomonas blattarum*) – jádro, bičíky, parabasální aparát, axostyl – opěrná tyčinka procházející středem těla
- 3) Vysvětlit rozdíl mezi mutualismem, komenzálismem a parazitismem

Řešení:

Lophomonas blattarum (nativní preparát – nákres; trvalý obarvený preparát – nákres)





Závěr:

Odpovězte celou větou na následující otázky:

1. Jak je brvitka švábová – *Lophomonas blattarum* přizpůsobena trávení celulózy ve střevě švábů?
2. Jakým způsobem se vyživuje brvitka švábová – *Lophomonas blattarum*?
3. Vysvětlete pojmy: axostyl, parabasální aparát

Řešení:

1. Brvitka švábová – *Lophomonas blattarum* má výrazně zvětšenou buňku, zmnožený počet bičíků a symbiotické bakterie ve svých buňkách, které jim pomáhají natrávit celulózu.
2. Brvitka švábová – *Lophomonas blattarum* se vyživuje výhradně osmoticky.
3. Axostyl a parabasální aparát jsou specializované orgány v buňce brvitky švábové (*Lophomonas blattarum*). Axostyl je oporná tyčinka procházející středem těla, parabasální aparát je váčkovitý útvar, někdy hodně protáhlý až vláknitý, někdy spirálně zatočený nebo pohárkovitý. Obtížně se zachovává při běžných barvicích a fixačních metodách.

Klíčová slova:

symbióza, mutualismus, komenzálismus, parazitismus, axostyl, parabasální aparát, jádro, bičík, *Parabasal*, brvitka švábová – *Lophomonas blattarum*, osmóza

Možnosti pozorování dalších podobných parazitických prvoků:

Trvalé obarvené preparáty bičenky poševní (*Trichomonas vaginalis*) a dalších druhů z řádu *Trichomonadida*.

4.3.2. Tématický celek parazitičtí helminti

K tématickému celku parazitičtí helminti byl vytvořen pouze jeden laboratorní protokol, neboť všechny získání helminti jsou z kmene obličných hlístů (*Nemat helminthes*), konkrétně jde o zástupce ze třídy hlístice (*Nematoda*). Tento tématický celek zahrnuje 3 druhy hlístic získaných z infikovaného trusu ovce a psa v podobě vajíček parazitických hlístic (zubovka – *Oesophagostomum spp.*, škrkavka psí – *Toxocara canis*, tenkohlavec ovčí – *Trichuris ovis*) a jeden druh parazitické hlístice z čeledi *Thelastomatidae*, která byla získána z tělní dutiny švába velkokřídleho (*Archimandrita tessellata*) a jednalo se o dospělé i vajíčka.

4.3.2.1. Laboratorní protokol

Vypracoval(a):

Datum:

Téma: PARAZITIČTÍ HELMINTI ze třídy *N e m a t o d a* – zubovka (*Oesophagostomum spp.*), škrkavka psí (*Toxocara canis*), tenkohlavec ovčí (*Trichuris ovis*), čeled' *T h e l a s t o m a t i d a e*

Cíle:

- 1) Seznámit se s morfologickou a anatomickou stavbou parazitických helmintů ze třídy *N e m a t o d a* (hlístice)
- 2) Správně používat pojmy: geohelminť vs. biohelminť; paratenický vs. definitivní hostitel
- 3) Naučit se používat koprologické flotační metody při zpravování infikovaných vzorků trusu obratlovců
- 4) Zdokonalit se v tvorbě dočasných mikroskopických preparátů

Teoretický úvod:

Třída *N e m a t o d a* (hlístice) zahrnuje druhy volně žijící i parazitické. Jejich tělo je obligátně protáhlé, nesegmentované, pokryté mnohvrstevnatou kutikulou, která je vylučována z hypodermis (epidermis) a má funkci vnějšího skeletu (exoskeletu). Jsou gonochoristi (odděleného pohlaví) s trubicovitými pohlavními orgány. Některé druhy jsou geohelminťi (přímý vývojový cyklus), jiné druhy jsou biohelminťi (nepřímý vývojový cyklus). U většiny parazitických hlístic dochází k 4 svlékáním, po posledním svlékání vzniká juvenilní hlístice, která pohlavně dospívá. K nákaze definitivního hostitele dochází buď perorálně (požitím vajíčka či larev s kontaminovanou potravou) nebo perkutánně (invazní larvy aktivně pronikají povrchem těla). U některých geohelminťů hrají důležitou roli tzv. parateničtí hostitelé, kteří jsou často nejdůležitějším zdrojem nákazy definitivních hostitelů.

- zubovka (*Oesophagostomum spp.*) – běžní parazité tlustého střeva prasat, dobytka, primátů a hlodavců z řádu *S t r o n g y l i d a*, u zvířat působí silná průjmovitá onemocnění, poruchy trávení vedoucí i k úhynům zvířat; tenkostěnná vajíčka diagnostikovaná v infikovaném trusu ovce
- škrkavka psí (*Toxocara canis*) – druh z řádu *A s c a r i d i d a* parazitující u psovitých šelem, larvy tohoto druhu prodělávají tzv. somatickou migraci (část

z nich nedokončí svůj vývoj a enkapsuluje se v různých tkáních hostitele, u člověka způsobuje tzv. larvální toxokarózu; vajíčka diagnostikována v infikovaném trusu psa

- tenkohlavec ovčí (*Trichuris ovis*) – druh z řádu *Enoplida* parazitující u ovcí, kterým způsobuje těžké průjmy, typická je přední tenká hlavová část, která je zanořená ve sliznici tlustého střeva hostitele a do lumen (vniřní část každého dutého orgánu) střeva vyčnívající silnější zadečkové části tenkohlavců; silnostěnná odolná vajíčka citrónového tvaru se dvěma pólovými zátkami diagnostikována v infikovaném trusu ovce
- čeled' *Thelastomatae* – drobné hlístice žijící v tělní dutině a střevě švába velkokřídlého (*Archimandrita tessellata*) z řádu *Oxyurida*; dospělé hlístice a jejich vajíčka, identifikován šváb velkokřídlý (*Archimandrita tessellata*)

Materiál a pomůcky: čerstvý nebo fixovaný (ve 4% roztoku formaldehydu – CH_2O) infikovaný trus ovce a psa, živá nymfa nebo dospělec švába velkokřídlého (*Archimandrita tessellata*), preparační (pítevní) miska, preparační jehla, fyziologický roztok (0,9 g chloridu sodného – NaCl rozpuštěného ve 100 ml destilované vody), nůžky, skalpel, třecí miska s tloučkem, plastové sítko, jednorázové plastové pipety nebo vyšetřovací kličky, centrifuga, konické zkumavky a stojan na zkumavky, kádinky, skleněná tyčinka, laboratorní lžička, podložní a krycí skla, destilovaná voda, stříčka, zásobní plastové lahve, zásobní roztok bezvodého síranu hořečnatého nebo chloridu sodného, digitální váhy, filtrační papír, lihový fix, jednorázově gumové rukavice, odpadní nádobka s desinfekčním roztokem (chloramin – NH_2Cl , SAVO)

Úkol 1: Připravte nasycené flotační roztoky z dehydratovaných chemikálií do připravených zásobních lahví

Úkol 2: Koprologickými flotačními vyšetřovacími metodami diagnostikujte vajíčka výše uvedených parazitických helmintů

Úkol 3: Zhotovte dočasný mikroskopický preparát z vyflotovaného vzorku infikovaného trusu ovce a psa

Úkol 4: Pozorujte dočasné mikroskopické preparáty obsahující vajíčka výše uvedených parazitických helmintů pod mikroskopem od nejmenšího (100x) po největší zvětšení

Úkol 5: Popište tvary jednotlivých vajíček v infikovaném trusu ovce a psa

Úkol 6: Proved'te pitvu živé nymfy nebo dospělé švába velkokřídleho (*Archimandrita tessellata*)

Úkol 7: Zhotovte dočasné nativní preparáty s obsahu trávicí trubice nebo tělní dutiny švába velkokřídleho (*Archimandrita tessellata*)

Úkol 8: Pozorujte tvar drobných hlístic a jejich vajíček

Postup:

Vyšetření infikovaného vzorku trusu ovce a psa koprologickými a flotačními metodami včetně zhotovení dočasných preparátů z vyflotovaných vajíček parazitických druhů hlístic dle postupu v kapitole 4.3.1.3. Pitva švába a zhotovení dočasného nativního preparátu dle postupu v kapitole 4.3.1.2.

Vypracování:

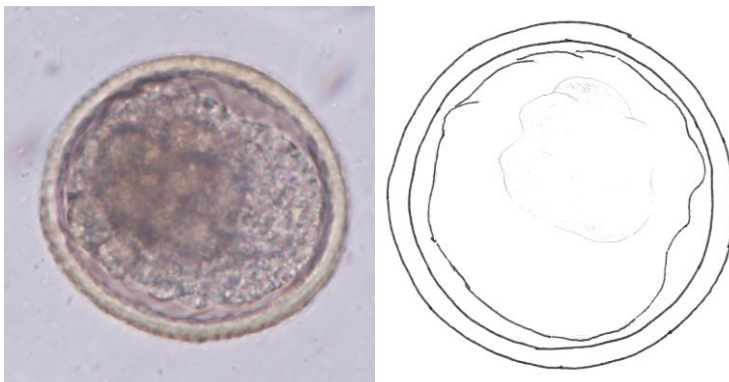
- 1) Nákres a popis tvaru vajíček získaných druhů hlístic z infikovaného vzorku trusu ovce a psa
- 2) Nákres a popis drobných hlístic a jejich vajíček z trávicí trubice a tělní dutiny švába velkokřídleho (*Archimandrita tessellata*)

Řešení:

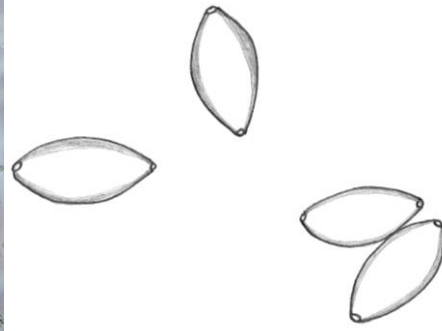
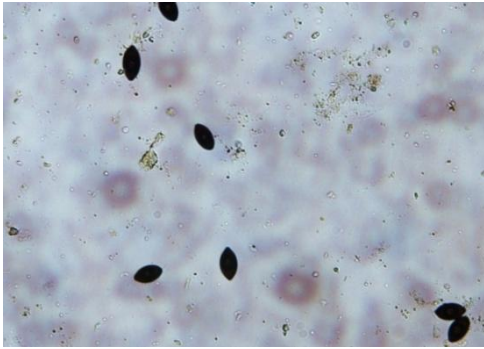
Oesophagostomum spp.



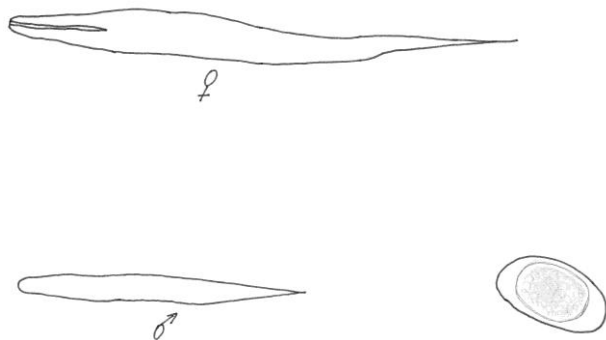
Toxocara canis



Trichuris ovis



čeleď *Thelastomatidae*



Závěr:

Odpovězte celou větou na následující otázky:

1. Vyjmenujte některé parazitické helminty z třídy *Nematoda* způsobující závažná onemocnění u člověka.
2. Vysvětlete pojem paratenický hostitel.
3. Jaký je rozdíl mezi geohelmintem a biohelmintem?

Řešení:

1. Mezi parazitické zástupce hlístic, které způsobují závažná onemocnění u člověka patří např. tenkohlavec lidský (*Trichuris trichina*), svalovec stočený (*Trichinella spiralis*), škrkavka dětská (*Ascaris lumbricoides*), roup dětský (*Enterobius vermicularis*), apod.
2. Paratenický (rezervoárový) hostitel je organismus, jenž stojí mimo vývojový cyklus parazita. Parazit se v tomto hostiteli nijak nevyvíjí a v podstatě čeká na to, až se dostane do definitivního hostitele. Paratenický hostitel usnadňuje parazitu přenos do definitivního hostitele nebo chrání parazita před nepříznivým prostředím.

3. Geohelminté mají přímé vývojové (životní) cykly bez mezihostitele, biohelminté mají nepřímé vývojové (životní) cykly za účasti mezihostitele.

Klíčová slova:

geohelminť, biohelminť, paratenický (rezervoárový) hostitel, definitivní hostitel, mezihostitel, vývojový (životní) cyklus, larvální toxokaróza, hlístice (*Nematoda*), koprologické metody, flotační metody

Možnosti pozorování dalších podobných parazitických helmintů:

Parazitičtí helminti ze tříd *Cestoda* (tasemnice) a *Trematoda* (motolice).

4.3.3. Tématický celek parazitičtí členovci

K tomuto tématickému celku byly vytvořeny dva laboratorní protokoly na základě získaných ektoparazitických druhů z kmene *A r t h r o p o d a*, kteří byli zástupci tříd klepítkatci (*C h e l i c e r a t a*) – klíště obecné (*Ixodes ricinus*) a kleštík včelí (*Varroa destructor*) a hmyz (*I n s e c t a*) – blecha kočičí (*Ctenocephalides felis*) a kloš jelení (*Lipoptena cervi*).

4.3.3.1. Laboratorní protokol č. 1

Vypracoval(a):

Datum:

Téma: PARAZITICHTÍ ČLENOVCI ze třídy klepítkatci (*Chelicerata*) – klíště obecné (*Ixodes ricinus*) a kleštík včelí (*Varroa destructor*)

Cíle:

- 1) Seznámit se s morfologickou stavbou parazitických členovců ze třídy klepítkatci (*Chelicerata*)
- 2) Poznat některá nebezpečná onemocnění přenášené parazitickými členovci z řádu roztoči (*Acarina*)
- 3) Naučit se zhotovovat trvalé preparáty drobných členovců zapuštěním do montovacího media (kanadského balzámu)

Teoretický úvod:

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) i kleštík včelí (*Varroa destructor*) jsou zástupci řádu *Acarina*, který patří do třídy klepítkatci (*Chelicerata*). Ústní orgány roztočů jsou opatřeny klepítky (chelicery), které jsou u většiny parazitických zástupců roztočů přeměněny na ozubené nebo bodcovité útvary sloužící k sání krve a tělních tekutin jejich hostitelů (např. hypostom u klíštěte obecného). Gnathosoma je přední (ústní) část, která nese ústní končetiny a slouží hlavně k příjmu potravy. Idiosoma je zadní část těla, na které jsou umístěny končetiny, popřípadě i oči (jsou-li přítomny). Roztoči (*Acarina*) dýchají vzdušnicemi, které ústí na povrch těla otvory, tzv. stigmaty. Dle převládajícího charakteru stigmat rozdělujeme zástupce řádu *Acarina* do čtyř podřádů: *Astigmata* (chybí stigmata, drobné druhy roztočů dýchající celým povrchem těla), *Prostigmata* (stigmata vyúsťují na gnathostoma), *Mesostigmata* (stigmata vyúsťují na bocích podél vkloubení 2. – 4. páru končetin) a *Metastigmata* (stigmata vyúsťují za 4. párem nohou). Druhy řádu *Acarina* jsou gonochoristi (odděleného pohlaví). Vývoj probíhá následujícím způsobem: 1. vajíčko, 2. šestinohá larva, 3. osminohá larva, 4. imago (dospělec) – po jednom nebo několika svlékání.

Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) je nejznámějším a nejrozšířenějším druhem čeledi *Ixodidae* z řádu *Acarina*. Ke svému vývojovému cyklu potřebuje obvykle tři různé hostitele – tříhostitelský vývojový cyklus, který může trvat i několik let. Klíště

obecné se vyskytuje ve volné přírodě na většině území ČR. Vyskytuje se zejména v nížinách a pahorkatinách. Krev sají na hostitelích pouze samičky, které jsou schopny při sání mnohonásobně zvětšit svůj povrch a získat tak dostatek potravy pro tvorbu vajíček.

Kleštík včelí (*Varroa destructor*) je poměrně velký (asi 1,5 mm), robustní a světle hnědě zbarvený roztoč. Je původcem nebezpečného onemocnění včel, tzv. varroázy, neboť saje hemolymfu u kukel i dospělých včel. Dříve byla včelstva napadená deštíkem včelím povinně likvidována spálením, dnes se do napadených včelích úlů aplikují různé akaricidní látky.

Materiál a pomůcky: klíště obecné, včelí plástve obsahující kleštíka včelího, 96% alkohol – ethanolu (C_2H_5OH), xylen (dimethylbenzen), kanadský balzám, podložní a krycí skla, pinzeta, skleněná tyčinka, Petriho miska, mikroskop, binokulární lupa, čistý benzín

Úkol 1: Pozorujte klíště obecné přisáté na hostiteli

Úkol 2: Pozorujte uhynulé kleštíky včelí ve včelích plástvích získaných od včelařů

Úkol 3: Odvodněte klíště obecné a kleštíka včelího v 96% ethanolu a xylenu

Úkol 4: Zhotovte trvalý preparát klíštěte obecného a kleštíka včelího zamontováním do kanadského balzámu

Úkol 5: Pozorované ektoparazity zakreslete a popište stavbu těla

Postup:

- 1) Ektoparazity nejprve odvodněte 2 – 3x v 96% ethanolu (C_2H_5OH) a poté v xylenu (dimethylbenzenu).
- 2) Na dobře vyčištěné a odmaštěné podložní sklo kápněte kapku kanadského balzámu (pokud je příliš hustý, lze jej ředit xylenem).
- 3) Do kapky kanadského balzámu vložte odvodněného ektoparazita a oparně přikryjte krycím sklem. Abyste zabránili vzniku vzduchových bublin, je dobré nejprve krycí sklo smočit v xylenu.
- 4) Zhotovený trvalý preparát pozorujte nejprve pod binokulární lupou a poté pod mikroskopem

Vypracování:

- 1) Nákres a popis tvaru těla pozorovaných ektoparazitických roztočů v trvalém mikroskopickém preparátu

2) Popis částí těla u klíštěte obecného a kleštíka včelího (gnathosoma, idiosoma, scutum, hypostom)

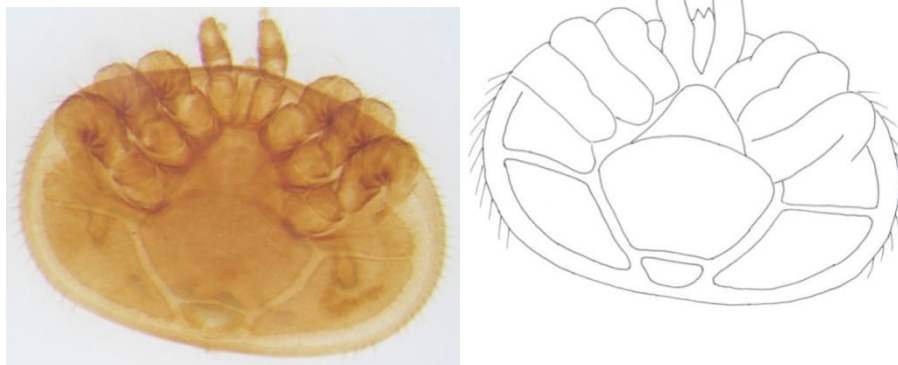
3) Vysvětlit rozdíl mezi podřádem *Metastigmata* (*Ixodida*), kam patří klíště obecné a podřádem *Mesostigmata* (*Gamasida*), kam patří kleštík včelí

Řešení:

Ixodes ricinus (trvalý preparát – nákres)



Varroa destructor (trvalý preparát – nákres)



Závěr:

Odpovězte celou větou na následující otázky:

1. Jaká závažná onemocnění přenáší klíště obecné?
2. V jakých lesích se u nás vyskytují klíšťata?
3. Co je to varroóza?

Řešení:

1. Klíště obecné (*Ixodes ricinus*) přenáší např. klíšťovou meningoencefalitidu (virové onemocnění) nebo lymeskou boreliózu (původcem je bakterie *Borrelia burgdorferi*).
2. Klíšťata se na našem území vyskytují zejména v listnatých a smíšených lesích s křovinatým podrostem, především v nížinách a pahorkatinách.
3. Varroáza je onemocnění včel, které způsobuje roztoč kleštík včelí (*Varroa destructor*) sáním hemolymfy u dospělých včel i jejich kukel.

Klíčová slova:

tříhostitelský vývojový cyklus, scutum, hypostom, idiosoma, gnathostom, gonochoristé, varroáza, klíšťová meningoencefalitida, lymeská borelióza, Acarina, kanadský balzám, stigmata

Možnosti pozorování dalších podobných parazitických roztočů:

Trvalé preparáty klíšťáka holubího (*Argas reflexus*), čmelíka kuřího (*Dermanyssus gallinae*), trudníka tukového (*Demodex folliculorum*).

4.3.3.2. Laboratorní protokol č. 2

Vypracoval(a):

Datum:

Téma: PARAZITIČTÍ ČLENOVCI ze třídy hmyz (*I n s e c t a*) – blecha kočičí (*Ctenocephalides felis*) a kloš jelení (*Lipoptena cervi*)

Cíle:

- 1) Seznámit se s morfologickou stavbou parazitických členovců ze třídy hmyz (*I n s e c t a*) a jejich přizpůsobení parazitickému způsobu života
- 2) Poznat rozdíly mezi proměnou dokonalou a proměnou nedokonalou v rámci zástupců třídy *I n s e c t a*
- 3) Naučit se zhotovovat trvalé preparáty drobných členovců zapuštěním do montovacího media (kanadského balzámu)

Teoretický úvod:

Třída hmyz (*I n s e c t a*) je nejpočetnější a nejvíce diferencovanou taxonomickou jednotkou živočišné říše. Z tohoto důvodu zde můžeme nalézt i velké množství parazitických druhů. V této laboratorní práci je věnována pozornost zástupcům hmyzu sající krev (blecha kočičí – *Ctenocephalides felis* a kloš jelení – *Lipoptena cervi*). Mezi parazitické zástupce ze třídy *I n s e c t a* patří také druhy přenášející závažná onemocnění (např. komáři – malárie – původcem *Plasmodium vivax* nebo *Plasmodium falciparum*); zákeřnice – Chagasova nemoc – původcem *Trypanosoma cruzi*). Ektoparazitické druhy hmyzu lze rozdělit dle kontaktu s hostitelem do dvou skupin: 1) permanentní – stálý kontakt s hostitelem (vši, všenky, kloši), 2) dočasní – někdy též označovány jako mikropredátoři, sání na hostiteli probíhá po časově relativně omezenou dobu a část životního cyklu se uskutečňuje mimo tělo hostitele, např. komár. Zástupci hmyzu jsou většinou gonochoristi (oddělené pohlaví), některých řádů hmyzu došlo ke vzniku tzv. partenogeneze (vývin nového jedince ze samičího vajíčka neoplozeného samčí pohlavní buňkou). Zkoumané parazitické druhy hmyzu v této laboratorní práci - blecha kočičí – *Ctenocephalides felis* a kloš jelení – *Lipoptena cervi* mají proměnu dokonalou (holometabolii), tj. vývojový cyklus zahrnuje: 1. vajíčko, 2. několik stadií (instarů) larvy, 3. kukla (pupa), 4. dospělec (imago).

Kloš jelení (*Lipoptena cervi*) je zástupcem čeledi kločovití (*H i p p o b o s c i d a*) z řádu dvoukřídlí (*D i p t e r a*). Jedná se o druh krevsajícího dvoukřídlého hmyzu, u

kterého je patrná pokročilá adaptace k životu na tělech hostitelů – značně zploštělé tělo, silná sklerotizace velmi odolná vůči mechanickému poškození. Typickým znakem klošovitých je tzv. adenotrofní viviparie, tj. samička neklade vajíčka ani malé larvy, ale své potomky si po značnou část larválního vývoje ponechává v jakémsy „děloze“, kde získávají výživu z přídatných pohlavních žláz v podobě proteinově bohaté „mléčné“ hmoty. Kloš jelení (*Lipoptena cervi*) je zvláštní tím, že po nalezení hostitele dochází ke ztrátě křídel. Někdy je kloš jelení nazýván „lojnice“ nebo „jelení moucha“. V letních a podzimních měsících kloši rodu *Lipoptena* naletují v lesích i na člověka, ale k bodnutí tohoto hostitele obvykle nedochází.

Blecha kočičí (*Ctenocephalides felis*) patří do řádu *Siphonaptera* (syn. *Aphaniptera*). Jedná se o vývojově pokročilý a sekundárně bezkřídle hmyz s proměnou dokonalou. Blechy jsou dokonale přizpůsobené cizopasnému způsobu života – sekundárně bezkřídle, aerodynamický tvar těla, delší a skákavý 3. pár nohou (umožňuje látka bílkovinné povahy resilin), silně sklerotizovaný tělní povrch, kýlovitá hlava s ktenidii (brvy a trny uspořádané v hřebínky umožňující lepší fixaci v srsti hostitele. Larvy blech jsou apodní (beznohé), žijí v hnízdech svých hostitelů, kde se živí organickým detritem nebo trusem dospělých blech.

Materiál a pomůcky: blecha kočičí (popř. blecha psí – *Ctenocephalides canis*), 96% alkohol – ethanolu (C_2H_5OH), xylen (dimethylbenzen), kanadský balzám, podložní a krycí skla, pinzeta, skleněná tyčinka, Petriho miska, mikroskop, binokulární lupa, čistý benzín, určovací klíč pro determinaci blech (např. Kolářová et al. – Images of human parasites – internetový zdroj (8)).

Úkol 1: Pozorujte blechu kočičí (blechu psí) pohybující se v srsti hostitele

Úkol 2: Pozorujte ztrátu křídel u kloše jeleního po nalezení hostitele

Úkol 3: Odvodněte blechu kočičí a kloše jeleního v 96% ethanolu a xylenu

Úkol 4: Zhotovte trvalý preparát blechy kočičí a kloše jeleního zapuštěním do kanadského balzámu

Úkol 5: Pozorované ektoparazity zakreslete a popište stavbu těla

Postup:

1) Ektoparazity nejprve odvodněte 2 – 3x v 96% ethanolu (C_2H_5OH) a poté v xylenu (dimethylbenzenu).

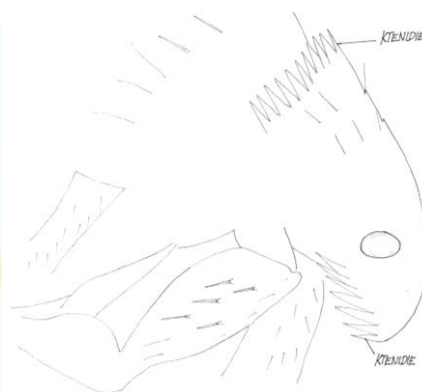
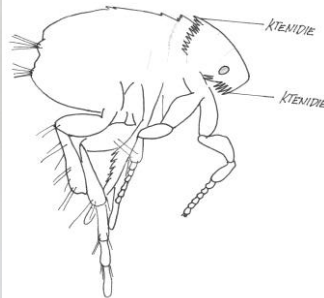
- 2) Na dobře vyčištěné a odmaštěné podložní sklo kápněte kapku kanadského balzámu (pokud je příliš hustý, lze jej ředit xylenem).
- 3) Do kapky kanadského balzámu vložte odvodněného ektoparazita a oparně přikryjte krycím sklem. Abyste zabránili vzniku vzduchových bublin, je dobré nejprve krycí sklo smočit v xylenu.
- 4) Zhotovený trvalý preparát pozorujte nejprve pod binokulární lupou a poté pod mikroskopem

Vypracování:

- 1) Nákres a popis tvaru těla pozorovaných ektoparazitických roztočů v trvalém mikroskopickém preparátu
- 2) Popis částí těla blechy kočičí nebo blechy psí a kloše jeleního
- 3) Dle určovacího klíče vyhledat hlavní determinační znaky pro rozlišení blechy psí a blechy kočičí

Řešení:

Ctenocephalides felis (trvalý preparát – nákres)



Lipoptena cervi (trvalý preparát – nákres)



Závěr:

Odpovězte celou větou na následující otázky:

1. Jaký je rozdíl mezi permanentním a dočasným ektoparazitem?
2. Jak jsou kloši přizpůsobeni životu na svém hostiteli?
3. Který druh blechy způsobil ve středověku morové epidemie?

Řešení:

1. Permanentní ektoparazité se vyznačují stálým kontaktem se svým hostitelem (kloši), dočasní ektoparazité (komár, zákeřnice) uskutečňují část svého vývoje mimo hostitele.
2. Jejich tělo je značně zploštělé a silně sklerotizované, což umožňuje odolnost vůči mechanickému poškození.
3. Morové epidemie ve středověku způsobovala blecha morová (*Xenopsylla cheopis*), které sají na tzv. rezervoárových hostitelích – hlavně na krysách, které byly infikovány bakterií *Yersinia pestis*, která je původcem moru („černá nemoc“) a poté přenášely tuto bakterii na člověka během sání krve.

Klíčová slova:

permanentní ektoparazit, dočasný ektoparazit, konidie, adenotrofní viviparie, apodní (beznohá) larva, proměna nedokonalá (hemimetabolie) vs. proměna dokonalá (holometabolie)

Možnosti pozorování dalších podobných zástupců ektoparazitického hmyzu:

Trvalé preparáty vši dětské (*Pediculus capitis*), štěnice domácí (*Cimex lectularius*), blechy slepičí (*Ceratophyllus gallinae*), blechy obecné (*Pulex irritans*), všenky ze skupiny *Mallotoga*, střečků z čeledi *Hypodermatidae* (podkožní střečci).

5. DISKUSE

Předmětem diskuse předkládané diplomové práce jsou vypracované laboratorní protokoly z laboratorních cvičení na následující témata:

1. Parazitičtí prvoci
2. Parazitičtí helminti
3. Parazitičtí členovci

Cílem je jejich využití na základních, středních, popřípadě vyšších odborných školách v rámci výuky přírodopisu, respektive biologie.

5.1. Srovnání s učebnicemi přírodopisu pro základní školy

Při porovnání s učebnicemi a publikacemi určenými pro výuku přírodopisu jsou témata a návrhy pro laboratorní cvičení, zejména ve starších publikacích (např. Vilček et al. 1994 nebo Dobroruka et al., 1997), velmi podobná. V rámci tématu prvoci převládá námět na pozorování prvoků v senném nálevu, obzvláště trepky velké, popřípadě měňavky velké. S laboratorními cvičeními na téma hlístů se v učebnicích pro základní školy téměř nesetkáváme. Co se týče členovců, většina ZŠ učebnic předkládá náměty laboratorních cvičení typu pozorování vnější stavby vybraného druhu hmyzu, nejčastěji včely nebo sarančete. Někdy jsou zmiňována pozorování již hotových trvalých preparátů částí těla hmyzu (křídlo, část vzdušnic, složené oči). Většina učebnic pro základní školy tak omezuje laboratorní cvičení poměrně obsáhlého kmene členovců jen na pozorování zástupců druhů ze třídy hmyz. Téma parazitismu a různých druhů parazitů (ektoparazitů i endoparazitů) jako námětu laboratorních cvičení v drtivé většině učebnic a publikací zcela chybí, ačkoliv v učebním textu zmiňují a popisují mnoho druhů ektoparazitů i endoparazitů ze všech tří výše zmiňovaných parazitologických disciplín (prvoci, helminti, členovci) jako např. v učebnici Maleniského, M. a kol. 2004. Tato učebnice je od ostatních učebnic přírodopisu rozdílná také tím, že neuvádí žádná ucelená témata laboratorních cvičení, ale pouze jednoduché pokusy či návody na domácí chov některých živočichů.

Téma parazitismu a parazitických organismů je zmiňováno spíše v novějších ZŠ učebnicích a publikacích v rámci učiva o ekosystémech a trofických vztazích mezi organismy, ale přesto praktická či laboratorní cvičení na námět parazitických organismů ve většině případů chybí. Z tohoto důvodu bylo obtížné srovnání mých výsledků

zpracovaných do formy laboratorních protokolů (návodů) s jinými podobnými publikacemi. Nakonec se vhodnou ke srovnání jevila publikace „Seminář a praktikum z přírodopisu pro 2. stupeň ZŠ“ (Stoklasa, 2001), kde je problematice parazitismu a některým parazitickým organismům věnována celá kapitola včetně návrhů na praktická pozorování a laboratorní cvičení. Cíl této učebnice je shodný s cílem laboratorních protokolů uvedených v diplomové práci – seznámit žáky základních škol s biologickým významem parazitismu včetně jednoduchého rozdělení parazitů na ektoparazity a endoparazity. Autor rovněž upozorňuje, že parazity a parazitické vztahy nenacházíme jen v živočišné říši, ale i v říši rostlinné a mezi houbami. Parazitičtí zástupci ze všech říší jsou doplněni několika příklady. V obecném úvodu autor klade důraz na základní pojmy z oblasti parazitologie včetně příkladů z praxe. Všechny tyto obecné poznatky o parazitismu a parazitických organismech podobně jako Stoklasa jsem se snažila postihnout i ve své práci. Rozdíl mé práce a uvedené učebnice je v tomto ohledu především v hloubce zpracování tématu o parazitismu a parazitických organismech, neboť publikace od Stoklasy je určena pro žáky základních škol (ZŠ) a vyučujícím přírodopisu. V tomto případě je samozřejmě takovýto rámec zpracování tématu zcela dostatečný. Moje práce je v obecné charakteristice parazitismu a jednotlivých parazitických organismů mnohem podrobnější, protože se tato část mé diplomové práce (DP) věnuje odborné parazitologii pro vyšší stupně škol včetně vysokých škol. Z hlediska praktických a laboratorních cvičení se citovaná publikace zaměřuje pouze na parazitické členovce, konkrétně na parazitické roztoče (klíště obecné, čmelík kuří, včelík zhoubný) a parazitický hmyz (blecha psí, blecha kočičí, veš dětská). Tito parazitičtí členovci, které autor publikace navrhuje k pozorování, jsou téměř shodní s parazitickými členovci, které popisují a navrhuji k laboratorním cvičením ve své DP. Rozdílem je veš dětská (*Pediculus capitis*) a čmelík kuří (*Dermanyssus gallinae*), které autor popisuje a doporučuje k pozorování v praktických cvičeních z přírodopisu. V mé DP veš dětskou ani čmelíka kuřího nepopisují, jelikož tyto parazitické členovce se mně nepodařilo získat, ačkoliv s nimi bylo původně také počítáno. Místo toho jsem zařadila do laboratorních návodů zástupce třídy hmyzu kloše jeleního, který může být pro žáky ZŠ také zajímavý a snadno dostupný, neboť se s ním mohou setkat při návštěvě lesa, kde parazituje na vysoké spárkaté zvěři a může napadat i člověka. Stoklasa se ve své publikaci nejvíce věnuje klíštěti obecnému, což je z mého pohledu vcelku pochopitelné

z hlediska nebezpečí přenosu některých závažných onemocnění (lymeská borrelióza, klíšťová encefalitida). Autor podobně jako já v DP uvádí materiál a pomůcky, které žáci potřebují k praktickým cvičením a rovněž zdůrazňuje zakreslení a popis jednotlivých částí těla pozorovaných parazitických roztočů a hmyzu. Dokonce tento autor navrhuje zhotovení modelů některých zástupců parazitických členovců dle jejich charakteristických znaků. Tato myšlenka mě velmi zaujala, neboť je tak uplatněna mezipředmětová vazba přírodopis – pracovní vyučování. Žáci ZŠ si tímto způsobem lépe zapamatují charakteristické znaky parazitických členovců a zároveň procvičují zručnost a šikovnost.

Autor srovnávané publikace pro žáky ZŠ uvádí pozorování již hotových fixovaných trvalých preparátů parazitických členovců, zatímco já v laboratorních návodech naopak uvádím podrobný popis, jak si žáci mohou vyrobit trvalé preparáty sami. Samozřejmě je zhotovení takových preparátů časově náročnější, ale z didaktického hlediska daleko přínosnější, neboť žáci si trvalý preparát sami vyrobí, a tím se celé laboratorní cvičení stává daleko pestřejším a zajímavějším, protože žáci si lépe zapamatují učivo a nepochybně žáky takové laboratorní cvičení i více baví. Jmenovaná publikace vůbec nerozebírá v laboratorních cvičeních parazitické hlístice ani ostatní hlísty, což je vcelku v učebnici určené pro žáky ZŠ pochopitelné, jelikož metodika praktického zpracování koprologického materiálu není pro žáky ZŠ příliš vhodná hlavně z důvodů vysoké patogenity hlístic uvedených v mé práci. Autor se v publikaci příliš nevěnuje ani parazitickým prvokům. Navrhuje pouze tradiční praktikum na téma pozorování prvoků ze senného nálevu jako většina autorů učebnic a příruček pro základní školy. Na rozdíl od klasického pozorování trepky velké ze senného nálevu jako většina ZŠ učebnic upozorňuje i na výskyt jiných druhů prvoků v senném nálevu (např. bobovky). Autor se v laboratorním cvičení na téma prvoci soustřeďuje zejména na fyziologické děje u prvoků (příjem potravy, chemotaxi, důkaz glykogenu v cytoplasmě, apod.), čímž je toto praktikum unikátní, neboť v ostatních učebnicích pro ZŠ jsem podobné praktikum neobjevila. Toto laboratorní cvičení se liší i v porovnání s laboratorními cvičeními uvedenými v mé práci, protože jsem kladla větší důraz především na co největší druhové spektrum parazitických prvoků (i helmintů a členovců), popř. komezálů, odlišnou stavbu buňky a odlišné vývojové cykly, a tím ukázala širokou diverzitu parazitických prvoků, ale i helmintů a členovců.

5.2. Srovnání s učebnicemi biologie pro střední školy

Ve srovnání s učebnicemi pro základní školy nabízí většina učebnic a publikací pro střední školy širší spektrum návrhů laboratorních a praktických cvičení. Nicméně témata parazitismu a parazitických organismů jsou v návrzích laboratorních a praktických cvičení zmíněna spíše okrajově jako součást některého probíraného živočišného kmene.

Pro srovnání s laboratorními návody v mé diplomové práci jsem vybrala dvě středoškolské učebnice – Bumerl et al., 2006; Jelínek a Zicháček, 2002. Publikace od autora Bumerla et al., 2006 uvádí v praktické části poměrně podrobnou metodiku mikroskopování a zhotovování dočasných i trvalých preparátů včetně jejich barvení. Právě v barvení mikroskopických preparátů se tato středoškolská učebnice odlišuje od mé práce. Autor zde uvádí jednak vitální barvení prvoků neutrální červení nebo methylenovou modří. K usmrcení a zároveň fixaci a barvení prvoků Bumerl zmiňuje Lugolův roztok. Ve své DP jsem k fixaci a barvení trvalých preparátů prvoků použila metodu Giemsky – Romanowského, která je dle mého názoru jednou z nejpřesnějších a rovněž z ekonomického hlediska není náročná. Publikace Bumerla neobsahuje žádné konkrétní praktické cvičení na téma parazitických organismů. Obsahuje však poměrně obsáhlé laboratorní cvičení na téma prvoci. V porovnání s učebnicemi pro ZŠ již tato středoškolská publikace neuvádí jen prvoky ze skupiny nálevníků, které studenti mohou pozorovat v senném nálevu, ale i jiné skupiny prvoků (bičíkovci, kořenonožci). Autor publikace též neuvádí jako zdroj prvoků pouze senný nálev, ale např. také znečištěné akvárium nebo součást planktonu v rybníku či na povrchu vodních rostlin a mečů. Shodné prvky mezi touto středoškolskou učebnicí od Bumerla a mnou navržených laboratorních návodech v DP nacházím v používání klíčů k určování některých organismů. Ve svých laboratorních návodech navrhuji použití určovacího klíče v případě přesného zařazení do druhu oocyst kokcií rodu *Eimeria* u ovcí, v případě zařazení endoparazitických hlístic z trávicí a tělní dutiny švába do taxonomické jednotky na úrovni čeledi a k rozlišení determinačních znaků u blechy psí (*Ctenocephalides canis*) a blechy kočičí (*Ctenocephalides felis*). Bumerl v učebnici pro střední školy (SŠ) zmiňuje použití k určování hmyzu, rostlin a některých obratlovců. Autor uvádí přesný popis a návod k práci s různými druhy určovacích klíčů a popisuje způsoby sestavování určovacích klíčů. Práce s určovacími klíči je zejména pro studenty

SŠ nezbytná a v tomto ohledu je i tato učebnice jedinečná v porovnání s jinými středoškolskými učebnicemi, které ve většině případů návody k práci s klíči neuvádějí. V DP v laboratorních návodech pouze uvádím, které organismy je nutné určit s pomocí klíče či atlasu a který klíč jsem použila v konkrétních případech. Bumerl ve své publikaci pro SŠ vůbec nezmiňuje laboratorní cvičení na téma hlístů ani členovců, ať už parazitických nebo neparazitických druhů. V učebnici autor také přehledně uvádí, jak by měl vypadat laboratorní protokol z praktického cvičení a jeho přesnou strukturu. V podstatě jsou tyto laboratorní protokoly velmi podobné s laboratorními protokoly v mé DP. Kromě cíle, úkolů, pomůcek, postupu a vypracování včetně popsání nákresů ještě navíc uvádím oproti této publikaci také ke každému laboratornímu praktiku teoretický úvod, klíčová slova k lepší orientaci v textu a závěr formou odpovědi na otázky k problematice každé laboratorní práce.

Druhou středoškolskou učebnicí, která se mi zdála vhodná ke srovnání s mými údaji je publikace autorů Jelínek a Zicháček, 2002. Ve srovnání s předchozí učebnicí pro SŠ od Bumerla obsahuje tato učebnice mnohem více praktických cvičení z různých biologických disciplín. Na rozdíl od předešlé publikace jsou v této publikaci pro SŠ praktická cvičení přehledněji uspořádaná. Pro účely diskuse s výsledky v předkládané DP jsem se nejvíce soustředila opět na tři zoologická témata – prvoci, hlísti a ploštěnci, členovci. Publikace jmenované dvojice autorů uvádí před vlastním laboratorním cvičením vždy důležité pojmy a základní znalosti a dovednosti, které by studenti měli bezpečně znát než začnou s konkrétním laboratorním cvičením. O něco podobného jsem se snažila i já v laboratorních návodech v DP v rámci klíčových slov a teoretického úvodu k pozorovaným organismům. Autoři zmiňované publikace ještě navíc vždy uvádějí tři různé typy testů k opakování tématu před začátkem vlastní laboratorní práce. Právě v rámci těchto testů věnují autoři učebnice velký důraz na parazitické organismy, zejména parazitické prvoky a parazitické hlísty. Návrh a výběr vlastních laboratorních cvičení na téma prvoci je v učebnici obou autorů téměř shodný s laboratorním cvičením z předchozí učebnice od Bumerla. Rozdíl mezi těmito dvěma laboratorními cvičeními ve dvou různých publikacích je to, že autoři Jelínek a Zicháček uvádí na rozdíl od Bumerla přesnou strukturu laboratorního protokolu podobně jako uvádím já v navrhovaných laboratorních návodech v DP (teorie, materiál a pomůcky, postup, pozorování, apod.). Konkrétní praktické laboratorní cvičení výlučně na

parazitické prvky není uvedeno ani v této publikaci. Naopak velkou pozornost věnují autoři Jelínek a Zicháček v této učebnici pro SŠ praktickým cvičením na téma ploštěnců a hlístů včetně parazitických druhů. Právě proto je tato publikace velmi vhodná pro srovnání s mou prací, konkrétně s kapitolou parazitických helmintů. Autoři uvádějí tři praktická cvičení k pozorování parazitických hlístů, konkrétně háďátka ozbrojené a jeho vajíčka pozorované na usmrcené a rozstřihané žížale umístěné na teplé místo do tmy. Další praktické cvičení uvedené v této učebnici je věnováno háďátku řepnému a jeho cystám na postraních kořenech řepy. Poslední laboratorní cvičení se zabývá pozorováním a pitvou dospělé škrkavky včetně jejích vajíček z vypreparované dělohy. Na rozdíl od předchozích dvou laboratorních cvičení s háďátkem ozbrojeným a háďátkem řepným není ve třetím laboratorním cvičení uvedeno, kde a z jakého zdroje je samička škrkavky získána, popřípadě jak lze odlišit samičku škrkavky od samečka dle vnějších morfologických znaků. Praktická cvičení autorů této publikace na téma parazitických hlístů se značně liší od praktických cvičení navrhovaných v mé DP. V rámci zkoumání a pozorování parazitických helmintů jsem navrhla praktická cvičení na diagnostiku vajíček v infikovaném trusu obratlovců s využitím koprologických metod. Ačkoliv autoři Jelínek a Zicháček v učebním textu publikace pro střední školy věnují parazitickým členovcům (zejména roztočům) velkou pozornost, zejména v počtu druhů, žádná praktická cvičení na pozorování těchto parazitických členovců neuvádějí. Praktická cvičení na téma členovců navrhnou autoři v klasické podobě – pozorování planktonních korýšů a pozorování vnější a vnitřní stavby těla vzdušnicovců (včela, šváb). Za velmi dobrý nápad autorů Jelínka a Zicháčka považuji, že u každé laboratorní práce uvádějí časovou náročnost daného úkolu. Toto je velmi přínosné jak pro studenty, tak pro vyučující, neboť si mohou čas vyhrazený na laboratorní cvičení správně a efektivně rozvrhnout. V laboratorních návodech této diplomové práce časovou náročnost jednotlivých úkolů neuvádím.

5.3. Obecné závěry a doporučený management

Z výše uvedeného srovnání jednotlivých učebnic a příruček pro základní i střední školy plyne, že ačkoliv převážná většina autorů učebnic se o parazitismu a parazitických organismech v učebním textu zmiňuje (někdy téma parazitismu a parazitických druhů organismů autoři řeší dle mého názoru až příliš podrobně – např. Maleninský et al.,

2004; Jelínek a Zicháček, 2002), praktická nebo laboratorní cvičení na toto téma jsou vesměs ve většině učebnic pro ZŠ i SŠ spíše výjimkou.

Právě v tomto ohledu vidím laboratorní návody a cvičení navržená pro předkládanou diplomovou práci jako předlohu pro doplnění rozsahu praktických cvičení a úloh v učebnicích pro základní i střední školy.

U žáků základních škol bych navrhovala spíše jen pozorování již hotových obarvených mikroskopických preparátů prvoků (*Leptomonas pyrrhocoris*, *Lophomonas blattarum*, *Cryptobia heliis*, *Monocystis lumbrici*, *Gregarina blattarum*, *G. cuneata*, *G. polymorpha*). Trvalé preparáty parazitických roztočů a hmyzu by si mohli žáci z již usmrcených a odvodněných zástupců členovců sami vyrobit zalitím do kanadského balzámu (*Ctenocephalides felis*, *Ixodes ricinus*, *Lipoptena cervi*, *Varroa destructor*). Praktická cvičení na téma parazitických helmintů bych na základní škole raději zcela vynechala vzhledem k náročnosti zpracování a povaze materiálu.

Studenti středních škol by v rámci laboratorních cvičení z biologie mohli zpracování parazitických prvoků a členovců provádět sami včetně pitev bezobratlých živočichů (*Archimandrita tessellata*, *Eublaberus distantis*, *Helix pomatia*, *Lumbricus terrestris*, *Tenebrio molitor*). Koprologické flotační metody zpracování parazitických helmintů bych v rámci základního laboratorního cvičení na středních školách vynechala a navrhla je jen pro střední a vyšší zdravotní školy. Zhotovení dočasných i trvalých preparátů včetně barvení metodou Giemsa – Romanowského by studenti středních škol mohli provádět také samostatně, aby si dovednost zhotovování a barvení mikroskopických preparátů spolehlivě osvojili.

Laboratorní protokoly a návody na téma parazitických organismů jsem vytvořila a zařadila do diplomové práce proto, abychom si uvědomili, že nejde o to, aby se praktická cvičení z parazitologie zařadila mezi povinná a stěžejní témata na základních a středních školách, ale proto, že každý z těchto laboratorních návodů (kromě parazitických helmintů) lze zcela nenásilně zařadit do již tradičních vypracovaných (v této kapitole výše uvedených) laboratorních cvičení na základních a středních školách. Příklady vhodného zařazení některých vypracovaných laboratorních návodů do tradičních laboratorních cvičení jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Zařazení některých navrhovaných laboratorních cvičení do tradičních laboratorních cvičení uvedených v učebnicích pro ZŠ a SŠ

Tradiční laboratorní cvičení v učebnicích pro ZŠ a SŠ	Rozšíření pomocí laboratorních návodů uvedených v DP
pozorování vnější a vnitřní stavby hlemýždě zahradního	vypreparovat zásobní váčky a pozorování prvoků <i>Cryptobia helcis</i>
pozorování a pitva žížaly obecné	vypreparovat semenné váčky a pozorování prvoků <i>Monocystis lumbrici (M. agilis)</i>
pozorování vnější a vnitřní stavby členovců: a) včela medonosná b) potěmník moučný c) šváb d) ruměnice pospolná	získání a pozorování ektoparazitického roztoče a prvoků: a) <i>Varroa destructor</i> b) <i>Gregarina cuneata, G. polymorpha</i> c) <i>Lophomonas blattarum, Gregarina blattarum;</i> čeleď <i>Thelastomatidae</i> d) <i>Leptomonas pyrrhocoris</i>

6. ZÁVĚR

Výsledky této diplomové práce ukazují velikou variabilitu a zvláštnosti parazitických druhů organismů. Paraziti mají obrovský význam pro fungování přírodních ekosystémů. Kdyby na Zemi neexistoval parazitismus, vypadala by příroda úplně jinak a v mnoha směrech by byla chudší (Flegr, 2010). Studie dokládá zajímavost a šíři parazitologie jako vědní disciplíny a její možnosti uplatnění ve výuce na středních a vyšších odborných školách. Některé laboratorní práce, především týkající se ektoparazitů (blecha kočičí – *Ctenocephalides felis*, kleštík včelí – *Varroa destructor*, klíště obecné – *Ixodes ricinus*, kloš jelení – *Lipoptena cervi*) by však bylo možné využít též k demonstraci jejich stavby těla na druhém stupni základních škol i na středních školách. Zejména trvalé preparáty těchto ektoparazitů lze dobře prohlížet i v jednodušších mikroskopech, které jsou k dispozici na základních školách.

Parazitičtí a symbiotičtí prvoci (*Cryptobia helicis*, *Leptomonas pyrhoris*, *Lophomonas blattarum*, *Monocystis lumbrici* (syn. *M. agilis*, *Gregarina blattarum*, *Gregarina cuneata*, *Gregarina polymorpha*) byli nalezeny uvnitř těl (trávicí trubice, semenné vajíčky, semenné schránky) snadno dostupných bezobratlých živočichů (*Pyrhacorix apterus*, *Archimandrita tessellata*, *Eublaberus distanti*, *Lumbricus terrestris*, *Tenebrio molitor*). Také zkoumaní parazitičtí členovci – blecha kočičí (*Ctenocephalides felis*), kloš jelení (*Lipoptena cervi*) a klíště obecné (*Ixodes ricinus*) jsou velmi častými ektoparazity vyšších obratlovců včetně člověka, ale i některých bezobratlých živočichů – kleštík včelí (*Varroa destructor*) sající hemolymfu včely medonosné (*Apis mellifera*) a způsobující tak úhyn celých včelstev.

V diplomové práci byla také věnována nemalá pozornost parazitickým helmintům ze třídy *Nematoda* (*Oesophagostomum spp.*, *Toxocara canis*, *Trichuris ovis*, čeleď *Thelastomidae*), zejména diagnostice jejich vajíček v infikovaném trusu obratlovců, který byl zpracováván koprologickými flotačními metodami. Tento oddíl diplomové práce ukazuje a přibližuje odbornou a veterinární parazitologii v praxi.

Cílem mé diplomové práce je nejen přiblížit parazitologii učitelům, studentům a dětem, ale ukázat jim nové zajímavé úkoly, které se dají realizovat i v normálně vybavených středních a základních školách, a obohatit tak výuku biologie o reálné příklady parazitů, kteří jsou příbuzní jiným závažným lidským parazitům.

7. SUMMARY

Parasitology is a scientific discipline dealing with parasites, its bearers and mutual relations between the former and the latter. The main goal of the master thesis was to accumulate parasites from three basic areas of parasitology: parasitological protozoans, parasitological helminths and parasitological arthropods. The gained samples of parasites were processed into the form of native or constant microscopical sections. They were observed under the microscope or binocular glass and the extensive photographic documentation of the samples was obtained. There were investigated eight samples of protozoans, four samples of helminths and four samples of arthropods. The main goal of whole thesis was to create the laboratory instructions in the form of laboratory protocols for the extended teaching of biology on primary and high schools. The master thesis tries to outline the practical parasitology both to teachers of biology and students. It has the form of interesting exercises practicable in ordinarily equipped primary and high schools. The goal of the practical parasitology is to enrich the teaching of biology with real examples of parasites that are related to other dangerous human parasites.

8. LITERATURA

- BUCHAR, J. 1993. Práce ze zoologie. – *Nakladatelství Univerzity Karlovy*, 1-257. Praha.
- BUCHAR, J. 1995. Stručný přehled soustavy bezobratlých. – *Peres*, 1-192. Praha.
- BUMERL, J. ET. AL. 2006. Biologie 1 pro střední odborné školy. – *SPN*, 1-224. Praha.
- ČERNÁ, Ž. 1983. Kokcidie některých domácích a užitkových zvířat a kokcidie člověka. – *Academia*, 1-160. Praha.
- DANIEL, M. 1996. Cizopasní a hygienicky závadní členovci v životním a pracovním prostředí člověka. – *Institut postgraduálního vzdělávání*, 1-81. Praha.
- DOBROUKOVÁ, J., STORCHOVÁ, Z. A CÍLEK, V. 1998. Metodické pokyny pro učitele k učebnici Přírodopis I pro 6. ročník základní školy. Pár slov k mikrobiologii. Příloha pro zvědavé učitele. – *Scientia*, 1-64. Praha.
- FLEGR, J. 2010. Vítejte v báječném novém světě parazitů. – *Živa* **157**(5): 197-199.
- HAMPL, V. 2010. Diverzita parazitů. – *Živa* **157**(5): 200-201.
- HANÁK, V., CHVÁLA, M., LELLÁKOVÁ, F., NEDVÍDEK, J. A ROMANOVSKÝ, A. 1973. Mikroskopická a zoologická technika. – *SPN*, 1-140. Praha.
- HAUSMANN, K. A HÜLSMANN, N. 2003. Protozoologie. – *Academia*, 1-347. Praha.
- HORÁK, P. A SCHOLZ, T. 1998. Biologie helmintů. – *Nakladatelství Univerzity Karlovy*, 1-140. Praha.
- HORÁK, P. A VOLF, P. 2007. Paraziti a jejich biologie. – *Triton*, 1-318. Praha.
- CHROUST, K., LUKEŠOVÁ, D., MODRÝ, D. A SVOBODOVÁ, V. 1998. Veterinární protozoologie. – *Veterinární a farmaceutická univerzita*, 1-113. Brno.
- JELÍNEK, J. A ZICHÁČEK V. 2007. Biologie pro gymnázia. – *Nakladatelství Olomouc*, 1-576. Olomouc.
- JÍROVEC, O. 1953. Protozoologie. – *Československá akademie věd*, 1-648. Praha.
- JÍROVEC, O. ET AL. 1977. Parazitologie pro lékaře. – *Avicenum*, 1-800. Praha.
- KOUDELA, B. 2007. Užiteční tenkohlavci ze střeva prasat. – *Vesmír* **86** (11): 696-699.
- LANGROVÁ, I. ET AL. 2010. Zoologie bezobratlých. – *Česká zemědělská univerzita*, 1-162. Praha.
- LUKEŠOVÁ, D. 1990. Praktická cvičení z veterinární helmintologie. – *SPN*, 1-102. Praha.
- MALENINSKÝ, M., SMRŽ, J. A ŠKODA, B. Přírodopis pro 6. ročník. – *Nakladatelství České geografické společnosti*, 1-104. Praha

- RYŠAVÝ, B. ET AL. 1988. Základy parazitologie. – *SPN*, 1-216. Praha.
- SEDLÁK, E. 2002. Zoologie bezobratlých. – *Masarykovy univerzita*, 1-337. Brno.
- STOKLASA, J. 2001. Seminář a praktikum z přírodopisu pro 2. stupeň základní školy. – *SPN*, 1-89. Praha.
- VILČEK, F., LIŠKOVÁ, E., ALTMANN, A. A KORÁBOVÁ, A. 1994. Přírodopis pro 6. Ročník základní školy. – *Scientia*, 1-208. Praha.

Internetové zdroje:

- (1) MATIS, D. & VALIGUROVÁ, A., 2000. Gregarines (Apicomplexa, Eugregarinida) of some invertebrates of Slovakia. *Folia faunistica Slovaca* **5**: 11-22 [online]. [cit. 2012-07-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.ffs.sk/pdf/FFS-05-02-Matis-Valigurova-2000.pdf>>
- (2) *BioLib.cz* [online databáze]. [cit. 2012-07-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.biolib.cz/cz/taxon/id19894/>>
- (3) Order Oxyurida Weinland, 1858 by Khuong B. Nguyen [online databáze]. Aktualizace 19. 4. 2010. [cit. 2012-07-12]. Dostupné z WWW: <<http://entnemdept.ifas.ufl.edu/nguyen/insectnema/Insect%20nematodes%20-%20Order%20Oxyurida.html>>
- (4) Careno, R.A. & Tuhela, L. 2011. Thelastomatid Nematodes (Oxyurida: Thelastomatoidea) from the Peppered Cockroach *Archimandrita tessellata* (Insecta: Blattaria) in Costa Rica. *Comparative parasitology* **78**(1): 39-55. [online]. [cit. 2012-07-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1654/4455.1?journalCode=copa>>
- (5) *Wikipedia.org* [online databáze]. [cit. 2012-07-12]. Dostupné z WWW: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Kl%C3%AD%C5%A1t%C4%9B_obecn%C3%A9>
- (6) *celysvet.cz* [online databáze]. [cit. 2012-07-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.celysvet.cz/n1363-zajimavosti-ze-zivota-hmyzu.php>>
- (7) *effipro-virbac.com* [online]. [cit. 2012-07-12]. Dostupné z WWW: <http://www.effipro-virbac.com/sk_SK/klistata-a-blechy.html>
- (8) KOLAROVA, L., NEMECKOVA, V., ZITOVA, D. & BEDNAR, M. – Images of human parasites [online]. [cit. 2012-07-12]. Dostupné z WWW: <<http://old.lf3.cuni.cz/ustavy/mikrobiologie/parazitologie/index.html#Ctenocephalides>>

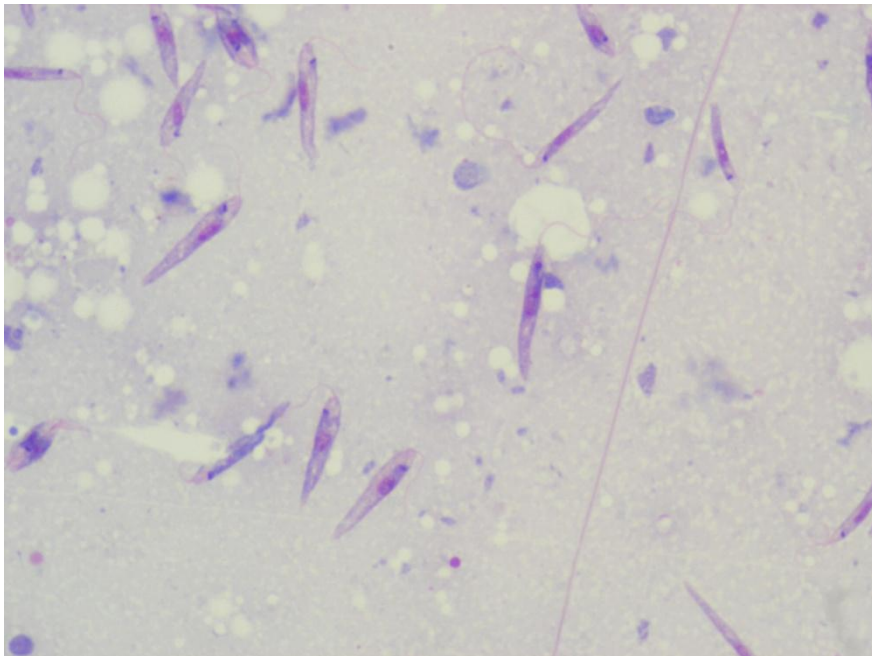
- (9) *BEAPHAR.com* [online]. [cit. 2012-07-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.beaphar.cz/psi/16-antiparazitika/9-blechy-a-kliata>>
- (10) PŘIDAL, A. 2007. Vysvětlení nomenklatury a taxonomie v čeledi Varroidae (kleštíkovití). *Včelařské noviny.cz* [online]. [cit. 2012-07-12]. Dostupné z WWW: <<http://www.vcelarskenoviny.cz/nemoci-skudci/269-vysvetleni-nomenklatury-a-taxonomie-v-celedi-varroidae-klestikoviti.html>>
- (11) *Blog.cz*, fascinovaný včelař [online]. [cit. 2012-07-12]. Dostupné z WWW: <<http://ovcspardubice.blog.cz/0810/jacobsoni-kontra-destroyer>>
- (12) *America Bee Journal 1987* [online]. [cit. 2012-07-12]. Dostupné z WWW: <http://ovcspardubice.blog.cz/0802/pohled-pod-vicko>
- (13) <http://web2.mendelu.cz/af_211_multitext/obecna_botanika/texty-ZM-zaklady_mikroskopovani.html>
- (14) *Mapy.cz* [online]. [cit. 2012-07-12]. Dostupné z WWW: <http://www.mapy.cz/#x=13.214377&y=49.415469&z=13&d=ward_11551_1&t=s&q=v%C4%9Bckovice%2C%20klatovy&qp=11.607676_48.943476_19.142425_50.568299_6&l=2>

9. PŘÍLOHY

Příloha č. 1

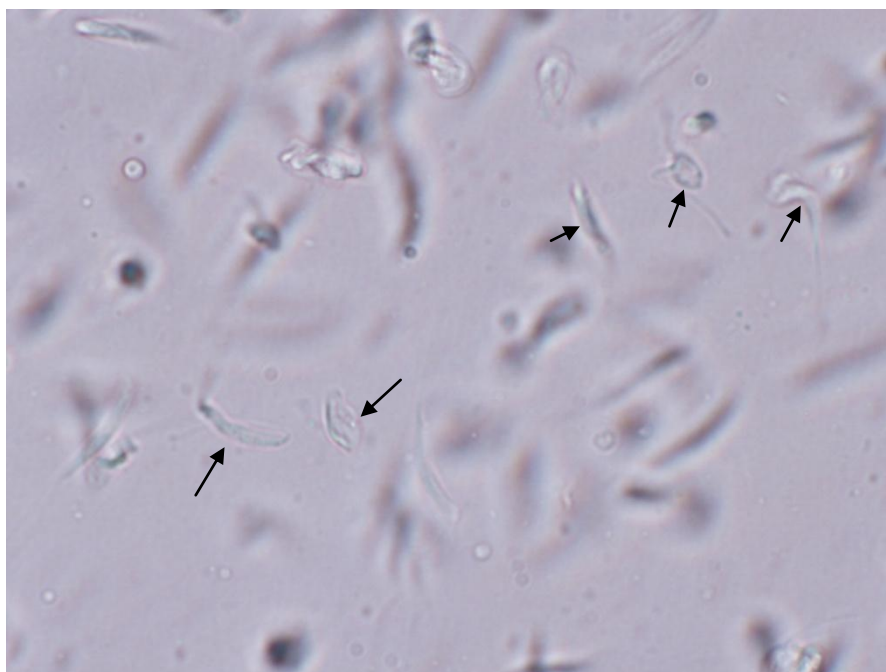


Leptomonas pyrrocoris (dočasný nativní mikroskopický preparát) – zvětšeno 600x

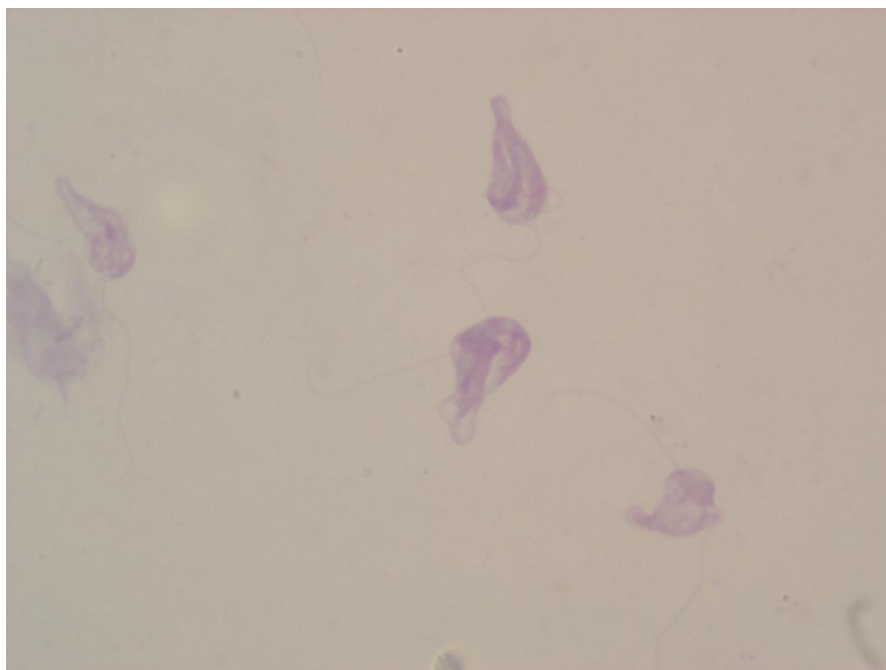


Leptomonas pyrrocoris (trvalý obarvený mikroskopický preparát) – zvětšeno 1000x

Příloha č. 2

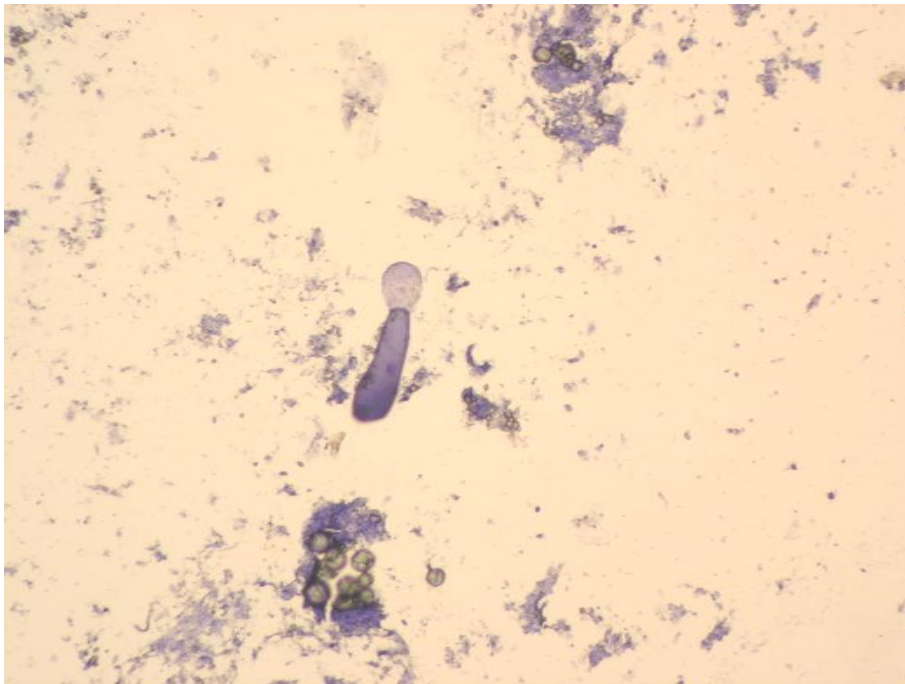


Cryptobia helicis (dočasný nativní mikroskopický preparát) – zvětšeno 600x

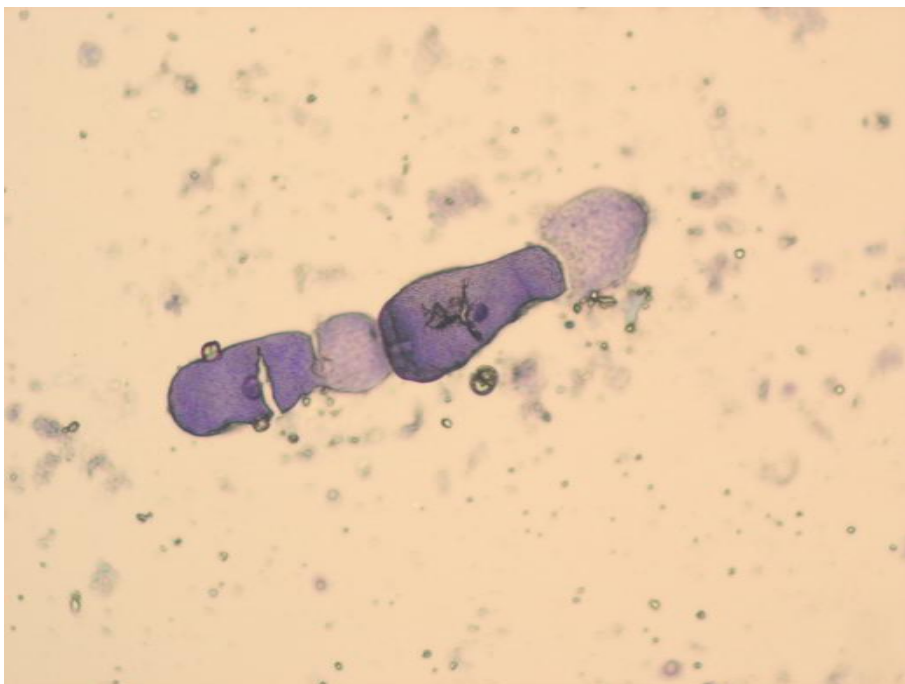


Cryptobia helicis (trvalý obarvený mikroskopický preparát) – zvětšeno 1000x

Příloha č. 3

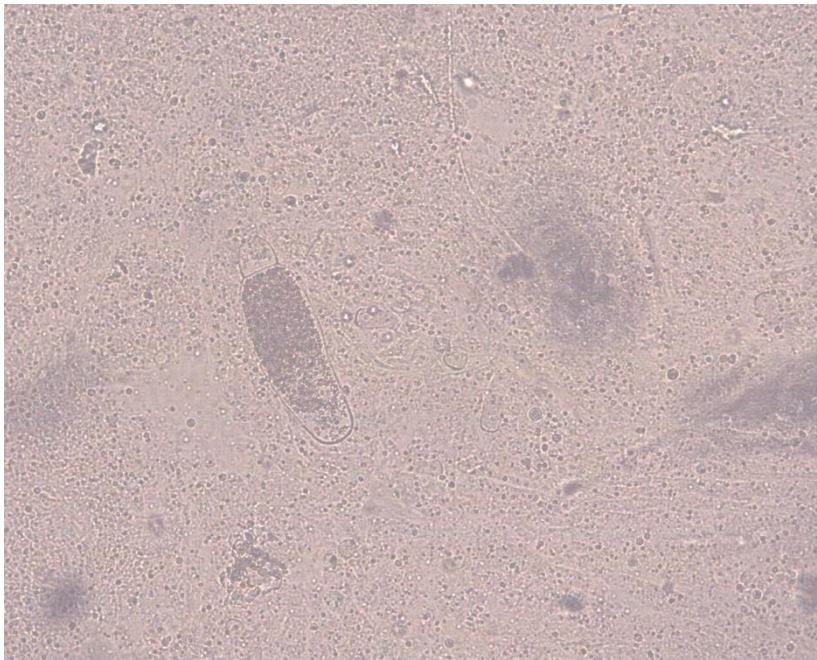


Gregarina cuneata (trvalý obarvený mikroskopický preparát) – zvětšeno 1000x



Gregarina cuneata – syzygie (trvalý obarvený mikroskopický preparát) – zvětšeno 1000x

Příloha č. 4

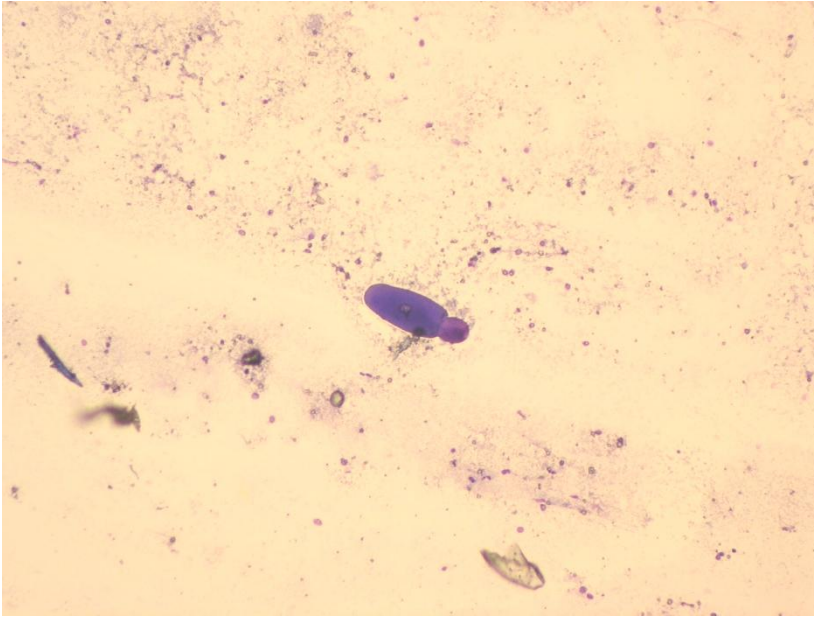


Gregarina polymorpha (dočasný nativní mikroskopický preparát) – zvětšeno 600x



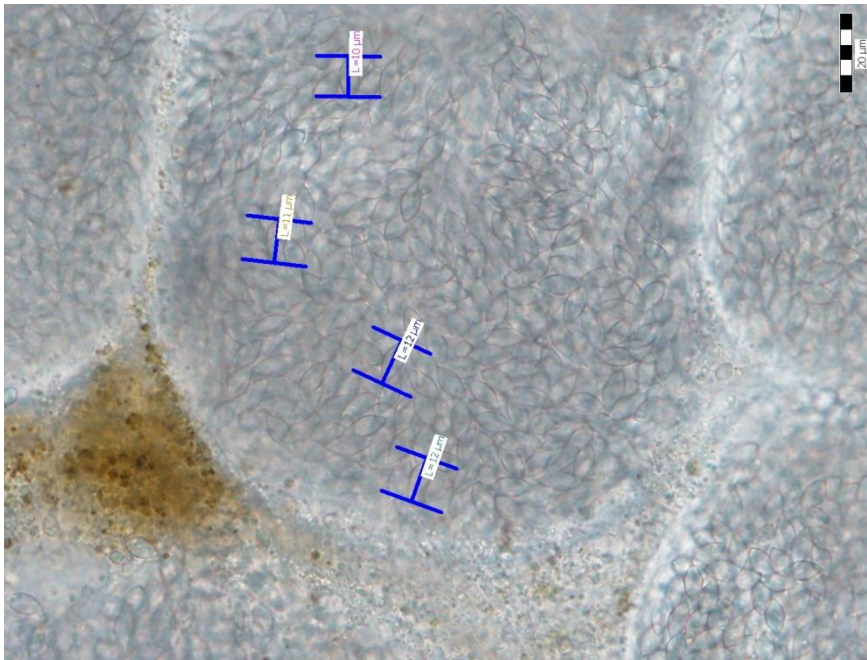
Syzygie gregarin (trvalý preparát, suchý nátěr) – zvětšeno 1000x

Příloha č. 4

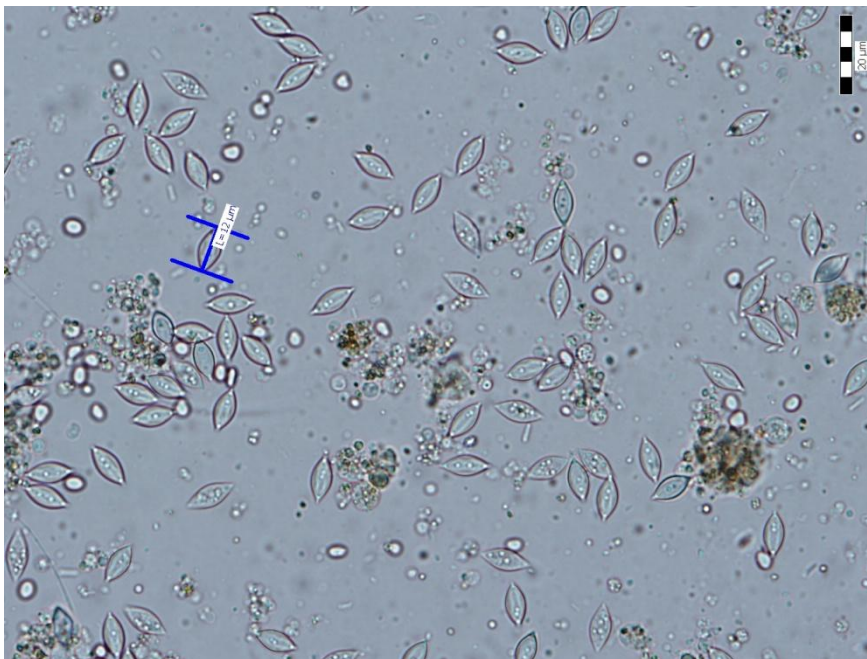


Gregarina polymorpha (trvalý obarvený mikroskopický preparát) – zvětšeno 1000x

Příloha č. 5



Monocystis lumbrici (syn. *M. agilis*) – nativní dočasný mikroskopický preparát –
zvětšeno 400x



Monocystis lumbrici (syn. *M. agilis*) – nativní dočasný mikroskopický preparát –
zvětšeno 600x

Příloha č. 6



Oocysta *Eimeria ovinivalis* (syn. *E. ninakohlyakimovae*) – dočasný mikroskopický preparát – zvětšeno 600x



Oocysta *Eimeria ovinivalis* (syn. *E. ninakohlyakimovae*) – dočasný mikroskopický preparát – zvětšeno 600x

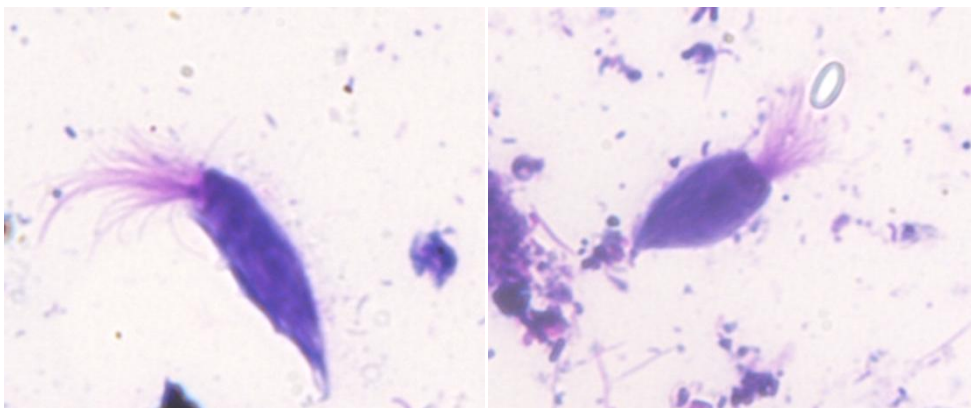
Příloha č. 7



Lophomonas blattarum (dočasný nativní preparát) – zvětšeno 400x

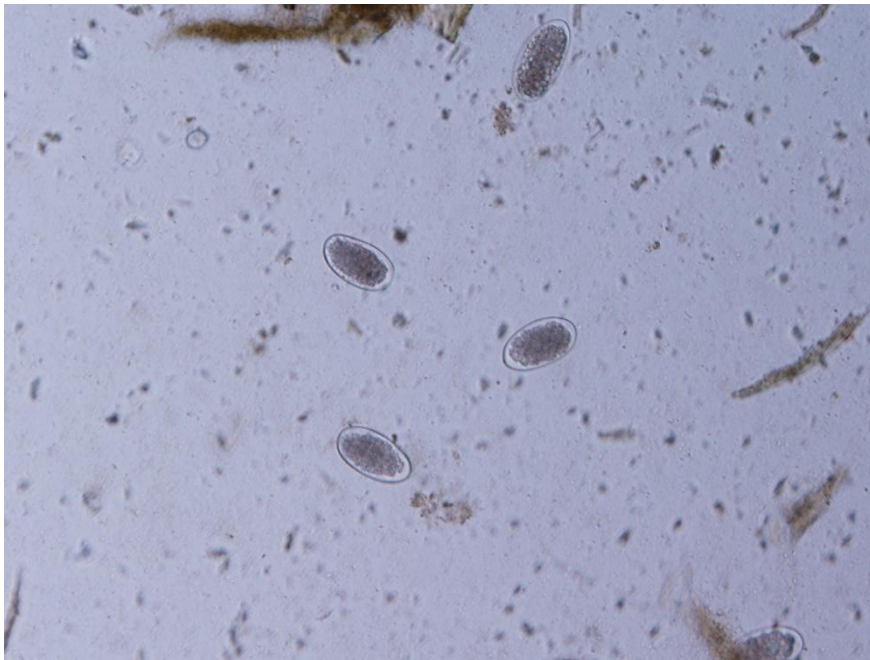


Lophomonas blattarum (dočasný nativní preparát) – zvětšeno 600x



Lophomonas blattarum (trvalý obarvený preparát) – zvětšeno 1000x

Příloha č. 8

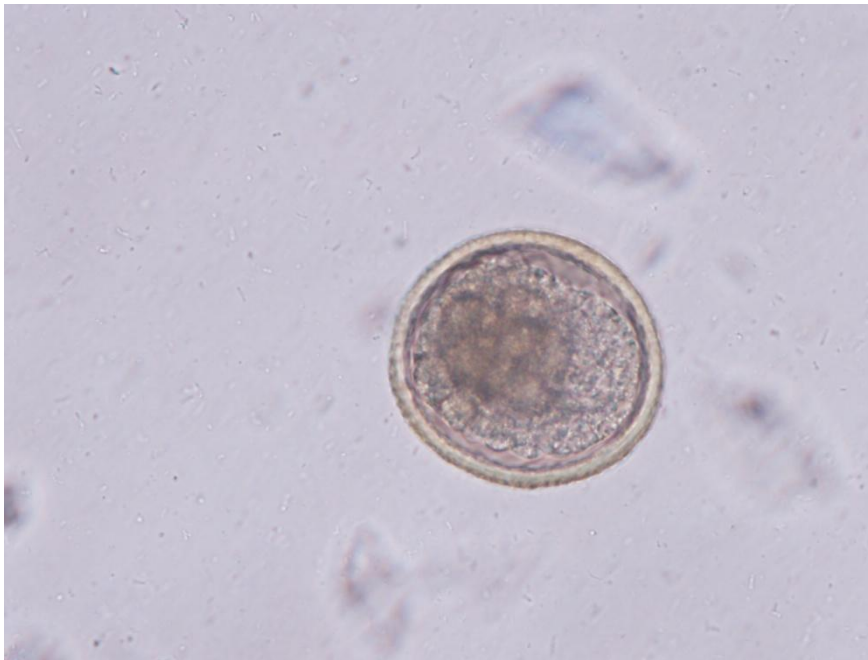


Oesophagostomum spp. – vajíčka (dočasný mikroskopický preparát) – zvětšeno 400x



Oesophagostomum spp. – vajíčko (dočasný mikroskopický preparát) – zvětšeno 600x

Příloha č. 9

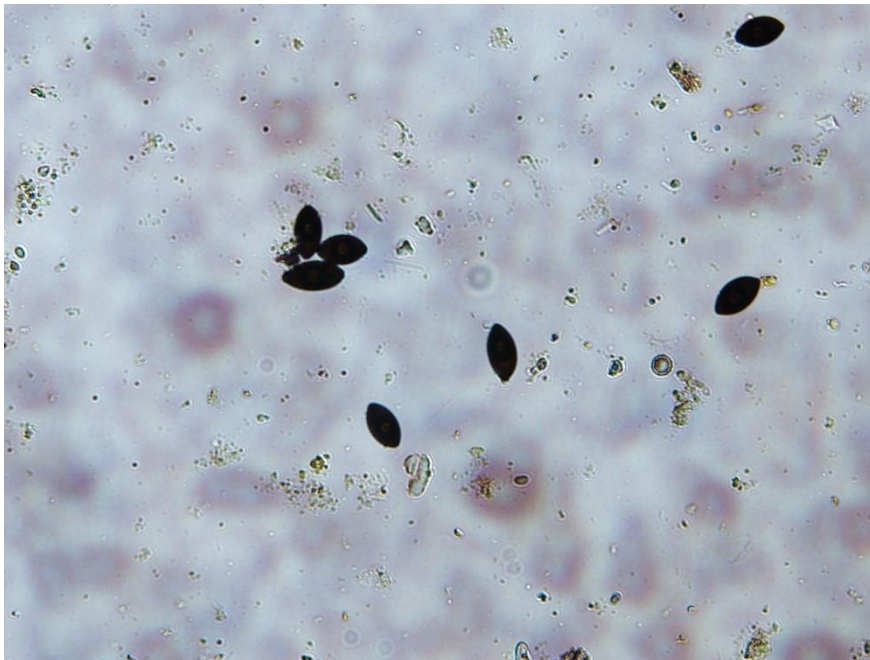


Toxocara canis – vajíčko (dočasný mikroskopický preparát) – zvětšeno 600x

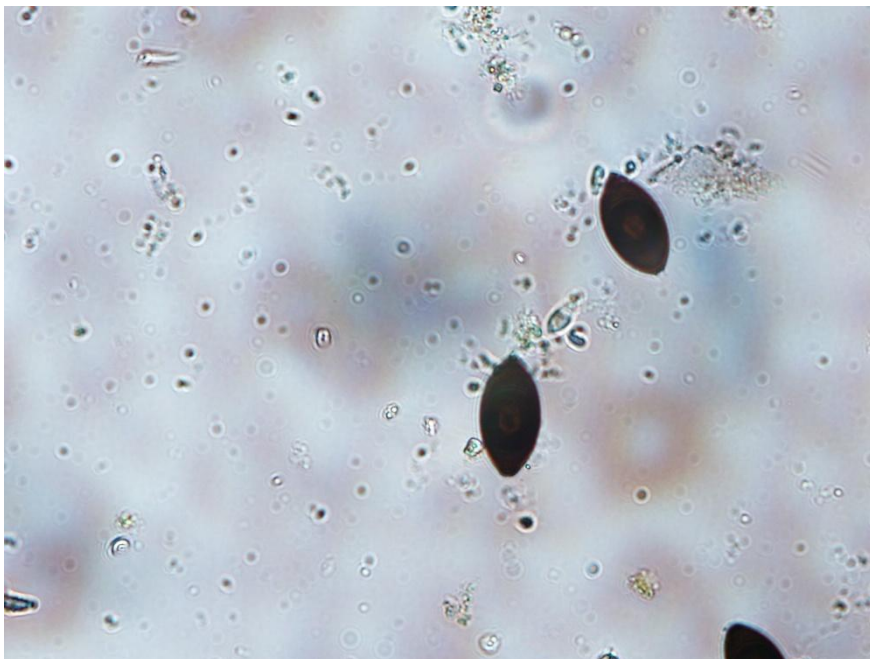


Toxocara canis – vajíčko (dočasný mikroskopický preparát) – zvětšeno 600x

Příloha č. 10



Trichuris ovis – vajíčka (dočasný mikroskopický preparát) – zvětšeno 400x

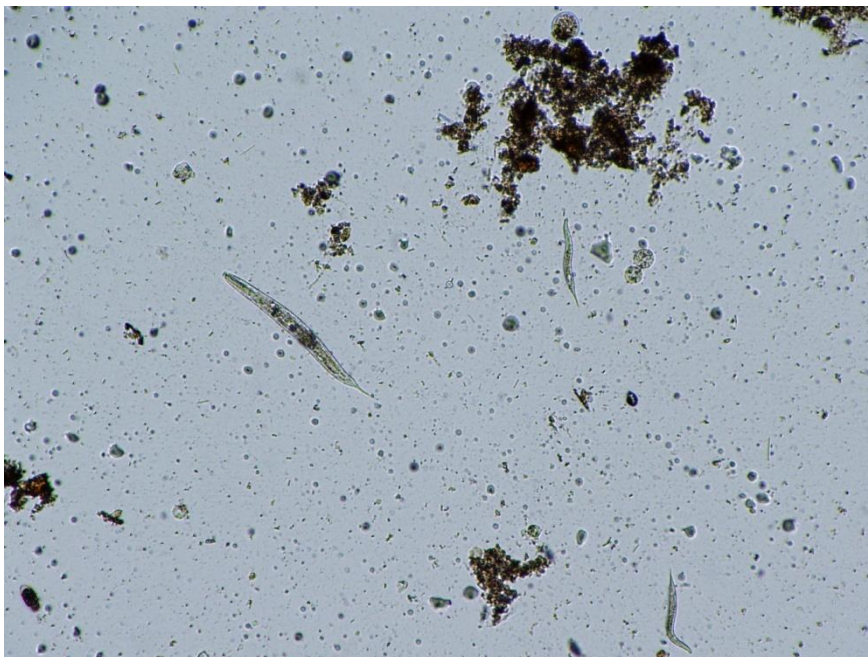


Trichuris ovis – vajíčka (dočasný mikroskopický preparát) – zvětšeno 600x

Příloha č.11

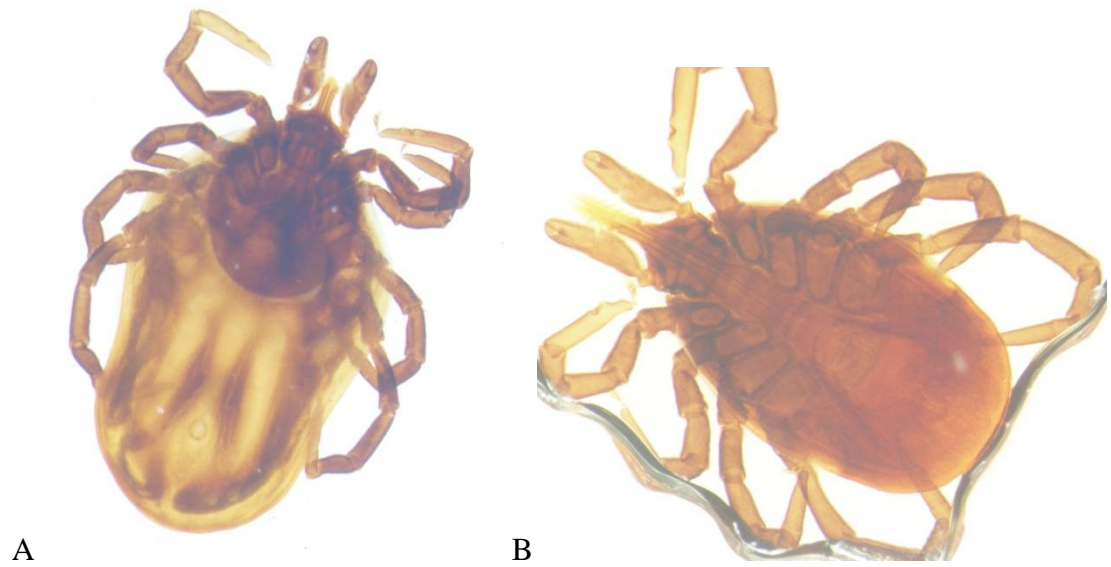


Drobné hlístice z čeledi *Thelastomatidae* (dočasný mikroskopický preparát) – zvětšeno 400x

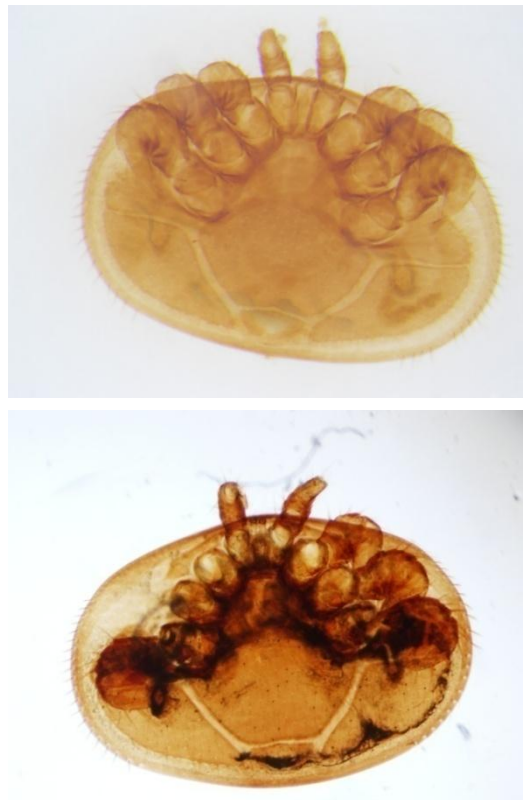


Drobné hlístice z čeledi *Thelastomatidae* (dočasný mikroskopický preparát) – zvětšeno 200x

Příloha č. 12



Ixodes ricinus ♀ - A: pohled shora, B: pohled na břišní stranu (pozorováno binolupou)



Varroa destructor – pohled z břišní strany (pozorováno binolupou)

Příloha č. 13



Ctenocephalides felis ♀ (pozorováno binolupou)



Lipoptena cervi (pozorováno binolupou)

