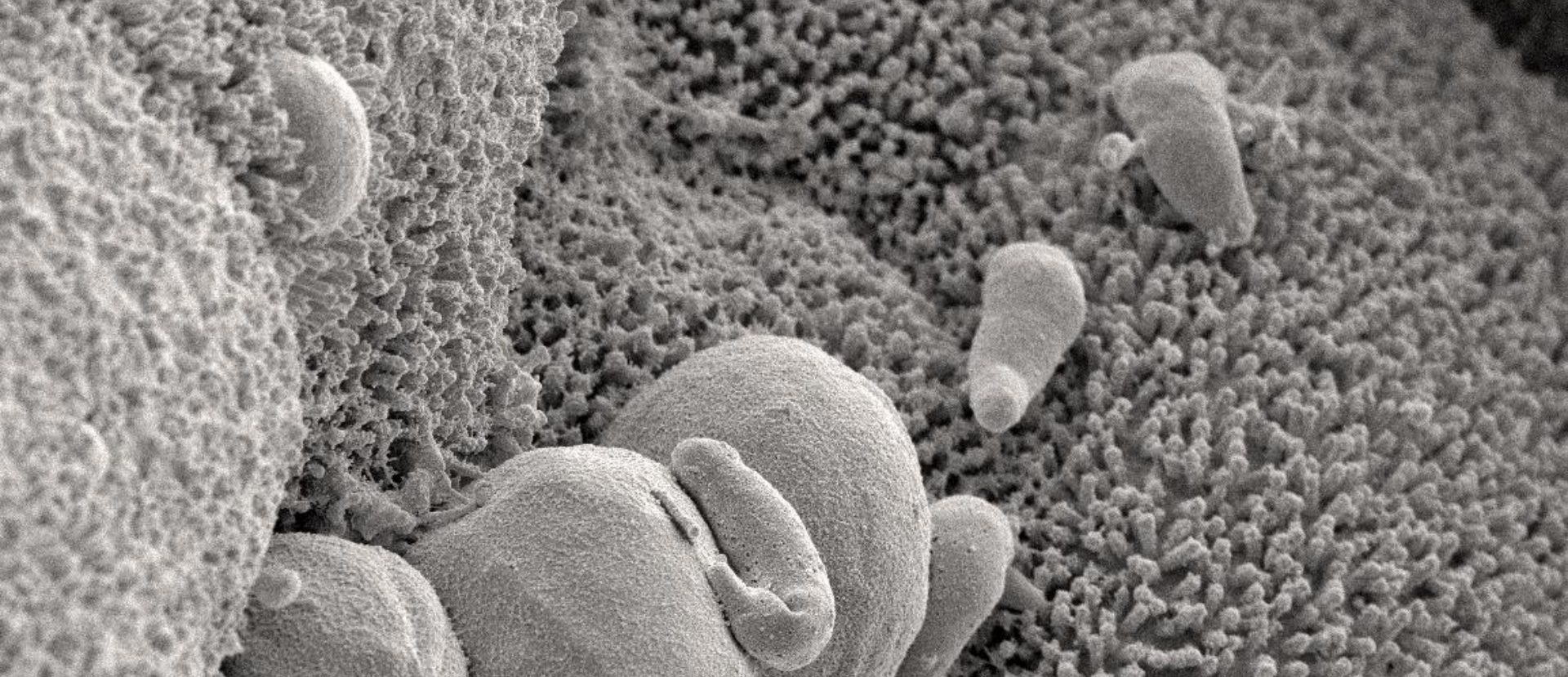


Úvod do terénní zoologie bezobratlých



Parazitičtí prvoci

Andrea Bardůnek Valigurová

andreav@sci.muni.cz

Protistologie

„Protista“ (Haeckel 1866): jednobuněčné eukaryotické organismy

Relativita jednobuněčnosti (syncytia, potravní komunity, kolonie nebo mnohoaderná plazmodia)

„Prvoci“ (Presl, 1821, sensu „Infusoria“)

Starší termíny:

„Protozoa“ (Goldfuss, 1818)

„zoon“ – heterotrofie

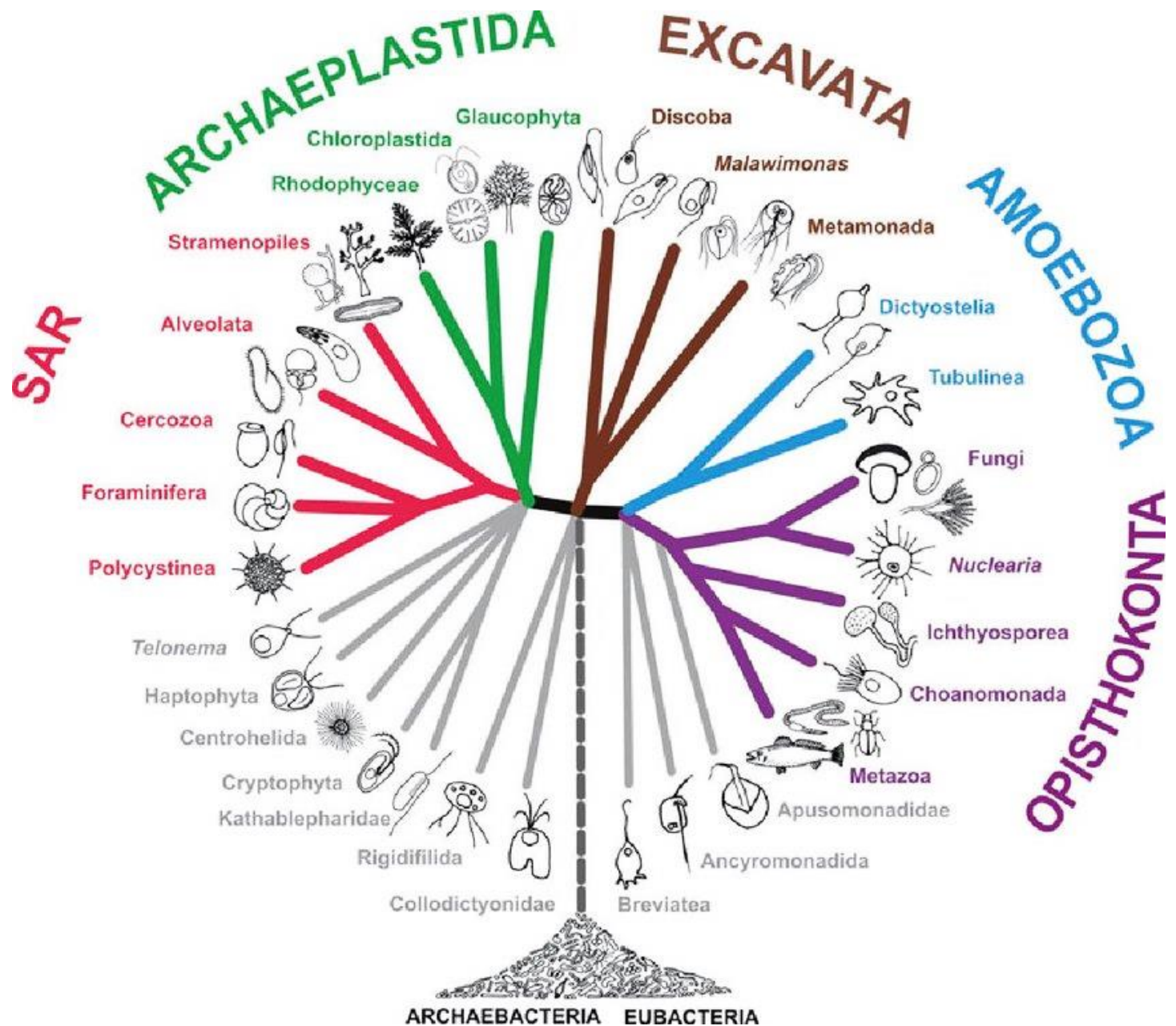
„Protophyta“ (E. Haeckel)

„Protoctista“ (Hogg, 1861; Whittaker, 1959)

„Animalcula“ (Leeuwenhoek, 1676), „Infusoria“ či „Animalcula Infusoria“ (Ledermüller, 1760-1763), „Urthiere“ (von Oken, 1805), „Animalia Microscopica“ (Bory de Saint-Vincent, 1826), „Eithiere“ či „Oozoa“ (Carus, 1832), „Archaezoa“ (Perty, 1852), „Microzoaires“ (Fromentel, 1874),

Formy protist (dřívější taxony)

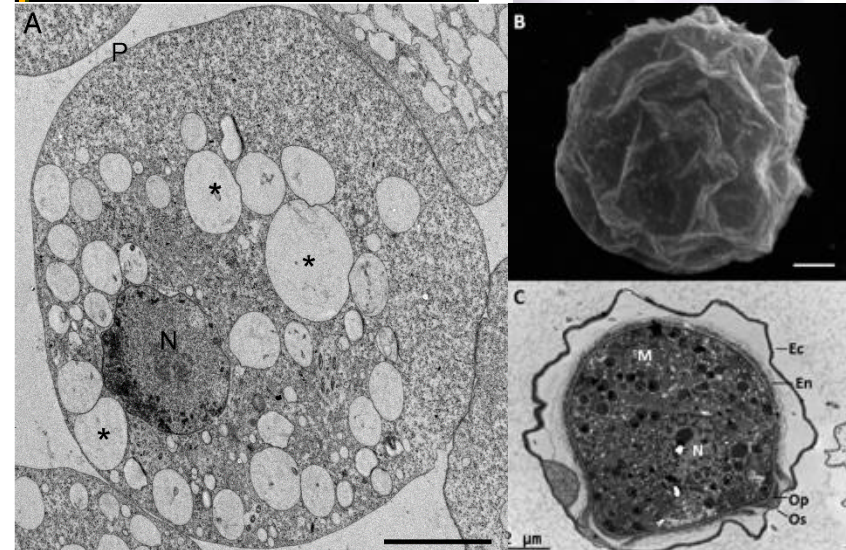
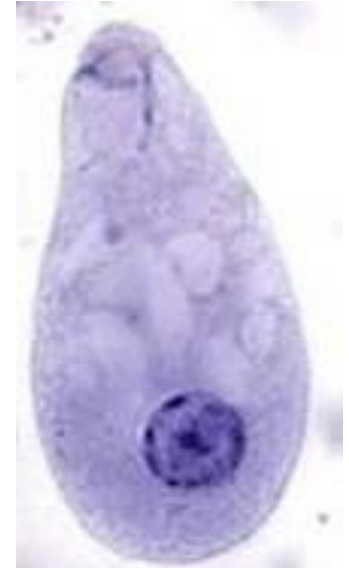
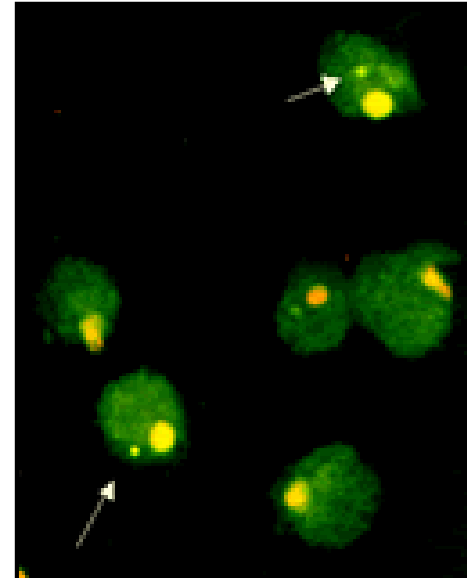
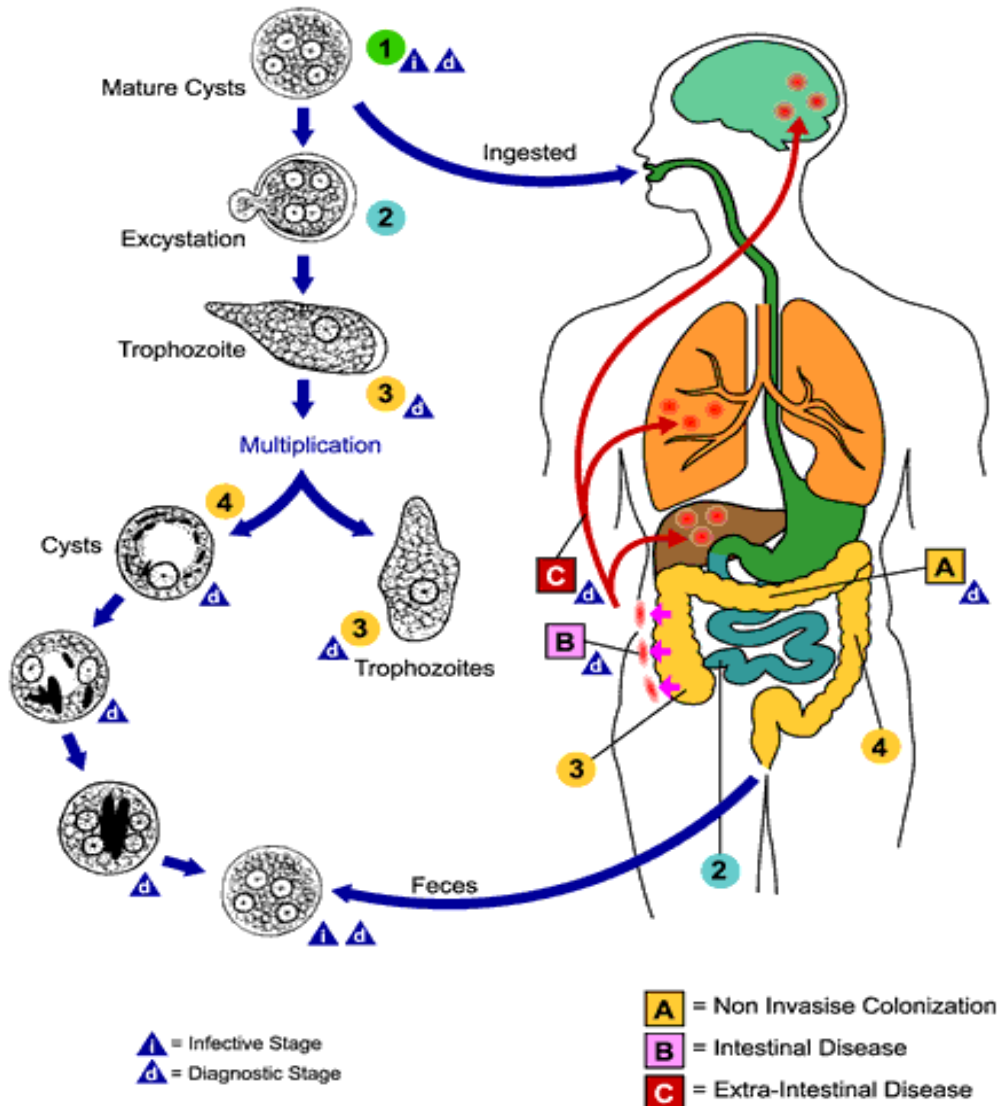
„PRVOCI“	„ŘASY“	„HOUBY“
Sarcomastigophora	Rhodophyta	Myxomycota
(Flagellata + Rhizopoda)	Chlorophyta	Plasmodiophoromycota
Sporozoa	Chromophyta	Labyrinthulomycota
Cnidosporidia	Euglenophyta	Oomycota
Ciliata	Chlorarachniophyta	Hyphochytriomycota
	Dinophyta	Chytridiomycota
	Cryptophyta	Eumycota



Klasifikace eukaryotů podle Adl et al. 2012: J. Eukaryot. Microbiol. 59 (5)

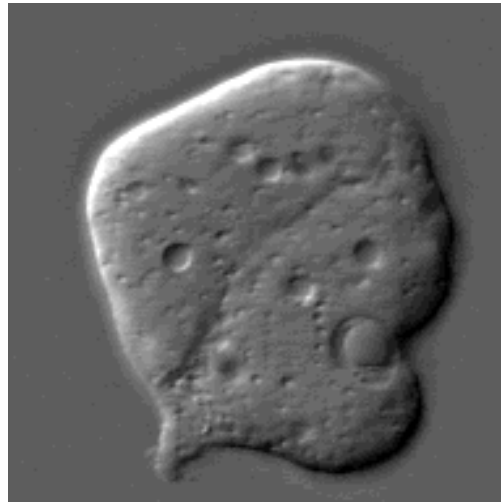
Amoebozoa – Archamoebae - Entamoebidae

Entamoeba histolytica



Entamoeba histolytica

- kosmopolitní původce střevní a mimostřevní amébozy
- forma minuta = neškodný komenzál (tvoří cysty); f. magna = invazivní patogen (netvoří cysty)
- rozšíření v rozvojových zemích kvůli špatné hygieně a teplému/vlhkému klimatu
- hlavním hostitelem je člověk ⇒ měňavková úplavice, může způsobit onemocnění jater
- vzácně mohou být infikováni i psi, kočky a hlodavci,
- chybí mezihostitel i zvířecí rezervoár
- přenos odolnými cystami fekálně-orální cestou, člověk – člověk, při sexuálním styku, alimentární cestou - fekálním znečištěním potravin a vody



Trofozoit

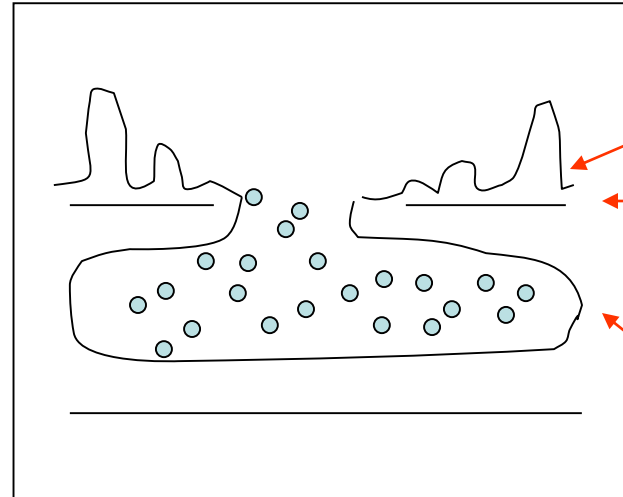
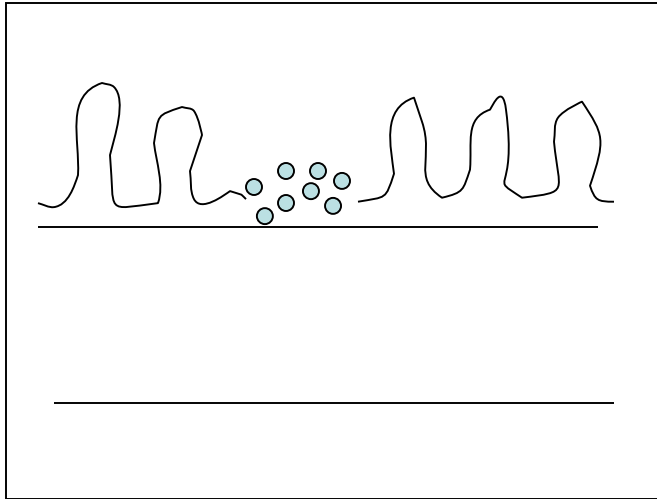
- 10-60 μm
- rozlišitelná endo- a ektoplasma (granuloplasma a hyaloplasma)
- erupivní lobopodie
- ve vakuolách bakterie, erytrocyty



Cysta

- odolnost k chloraci vody
- 10-20 μm
- 1-4 jádra
- v mladých cystách glykogenová vakuola
- během zrání - chromidie

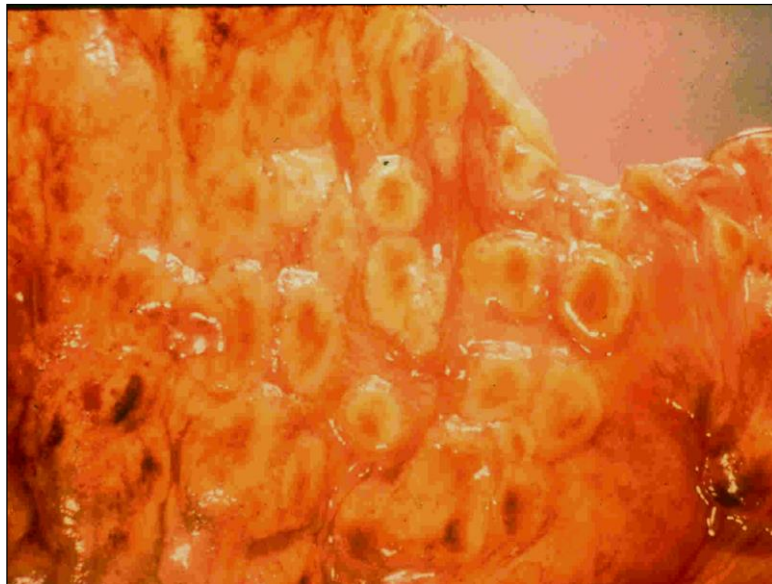
Invaze střevní stěny



mukosa

muscularis
mucosae

submukosa



„flask ulcer“

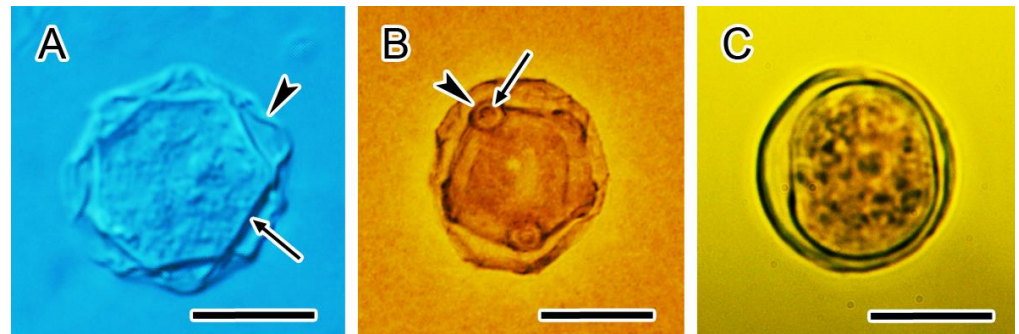
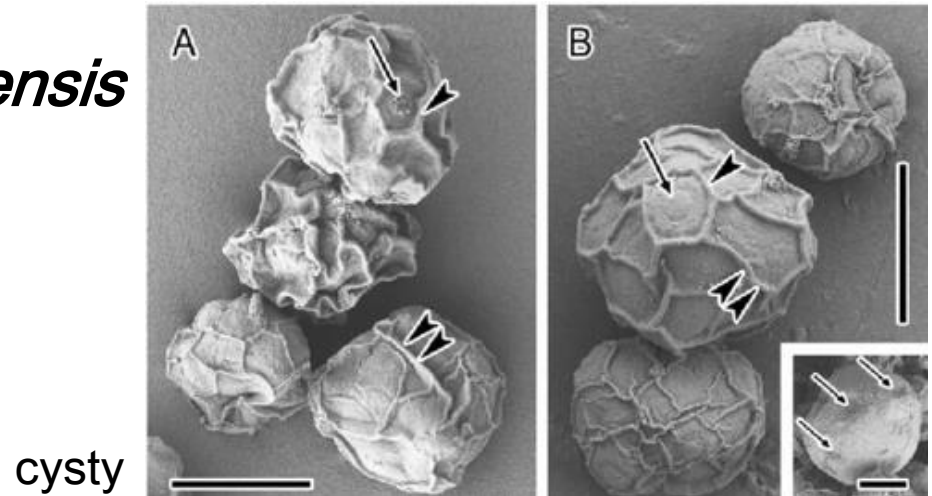
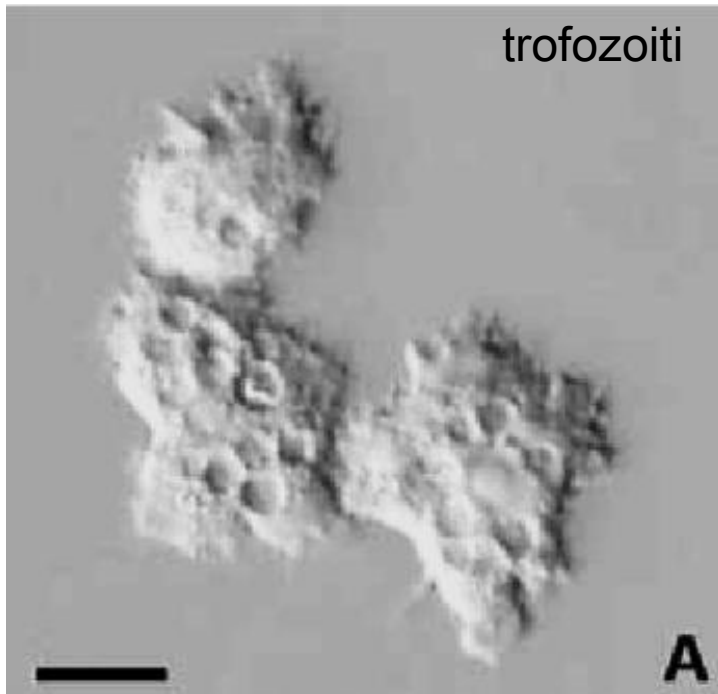
- pokud napadne střevní sliznici, způsobuje střevní amébozu
- invazivní kmeny mohou proniknout do tkání a způsobit extraintestinální amébozu

Amoebozoa – Discosea – Longamoebia - Centramoebida

Acanthamoeba spp.

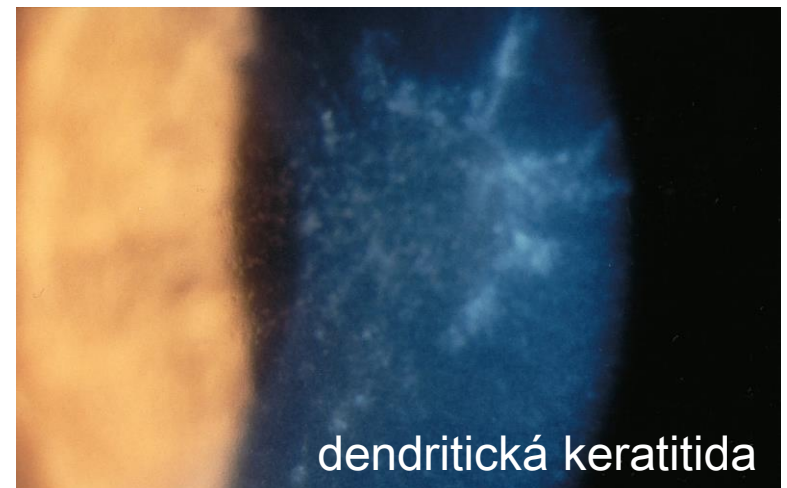
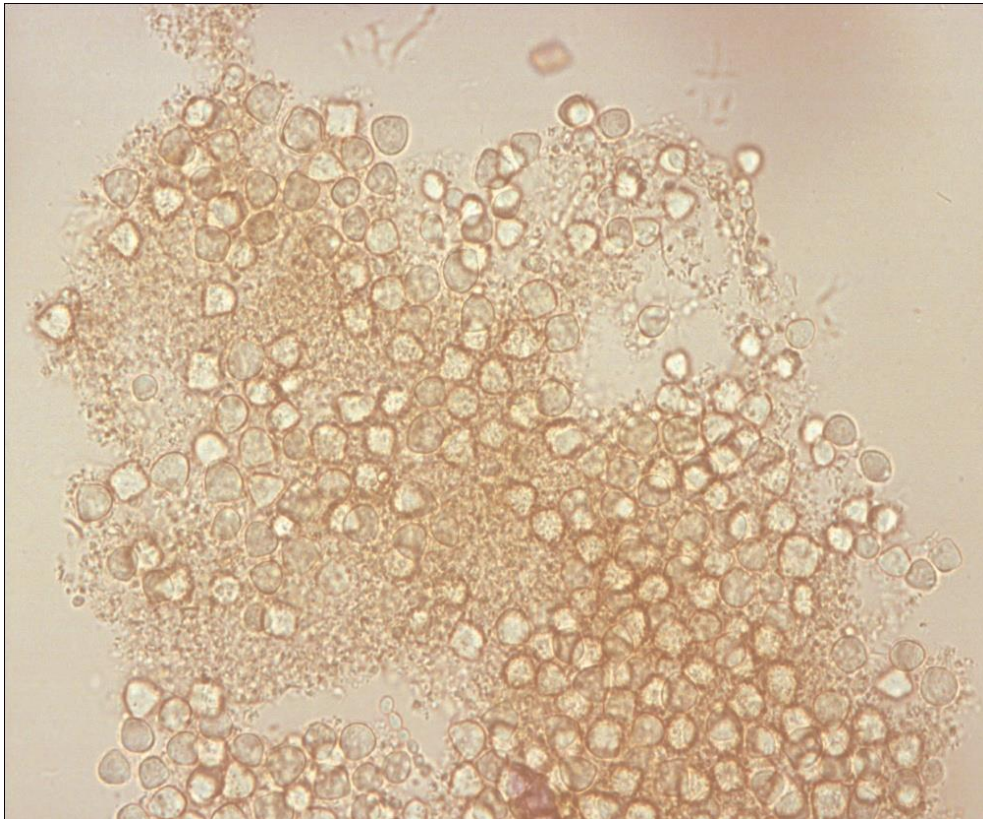
- oportunní paraziti
- amfizoické měňavky s kosmopolitním výskytem ve vodě, v půdě, ve vzduchu
- trofozoiti cca 25-55 μm , pseudopodie s výběžky – acanthopodie
- netvoří bičíkatá stádia
- silnostěnné cysty \Rightarrow dvě vrstvy-vnější svrstělá ektocysta, vnitřní hvězdicovitě zvlněná endocysta

A. lugdunensis



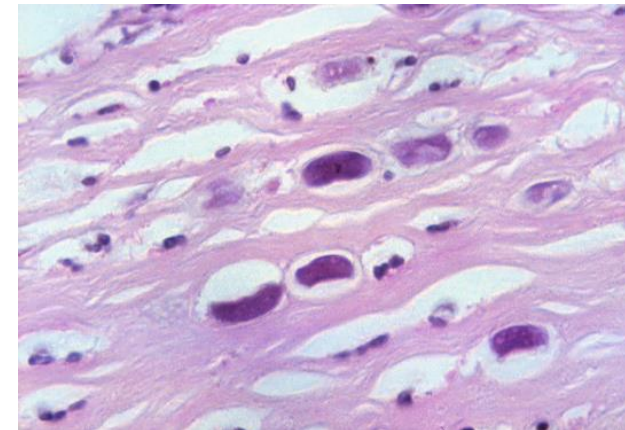
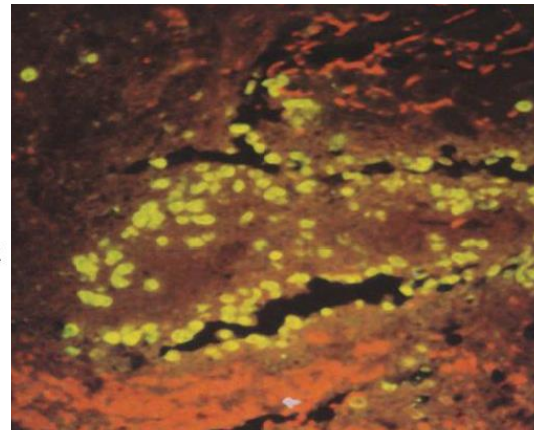
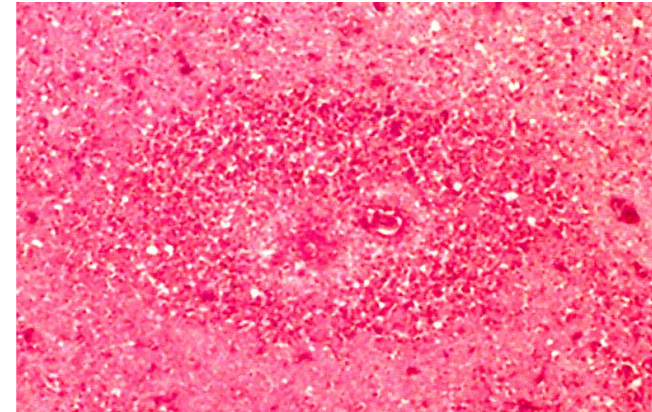
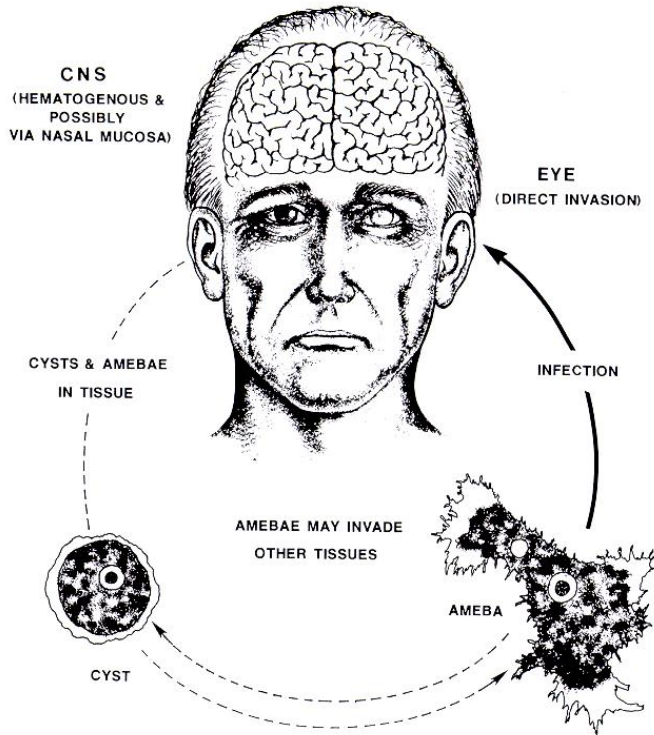
Acantamébová keratitida (AK)

- nebolestivá chronická infekce rohovky → ohrožení zraku
- rizikové faktory: kontaktní čočky (80%), poranění oka (20%)
- trofozoiti ve stromatu rohovky encystují (cysty)
- léčba obtížná



Granulomatózní amébová encefalitida (GAE)

- objev Culbertsonem (1957) v kultuře buněk opičích ledvin pro kultivaci polio vakcíny
⇒ *A. culbertsoni*
- první případy u lidí v 70. letech 20. století, 135 případů do roku 1998
- chronické onemocnění (týdny-měsíce)
- u oslabených jedinců - při autoimunitních onemocněních, nádorových onemocněních, AIDS, diabetes, alkoholismus
- infekce vdechnutím nebo kůží → hematogenní rozsev
- chronický ložiskový zánět mozku (nekrotická ložiska)
- bolest hlavy, křeče, strnutí šíje, apatie až smrt



Excavata - Discoba - Discicristata - Heterolobosea

Naegleria fowleri

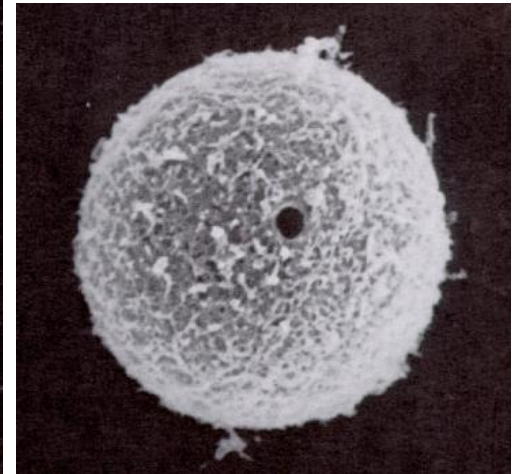
- jednojaderná améba 15-30 μm
- kosmopolit, výskyt v průmyslově oteplených vodách a v bazénech
- roste až do teploty 45 °C, optimálně při 37 °C
- široká laločnatá pseudopodie, amébostronie – trogocytóza
- stádia: bičíkovec (2 bičíky), améby, cysty sférické a dvouvrstevné
- při snížení osmotického tlaku → tvorba bičíkatých stádií



améboidní trofozoit



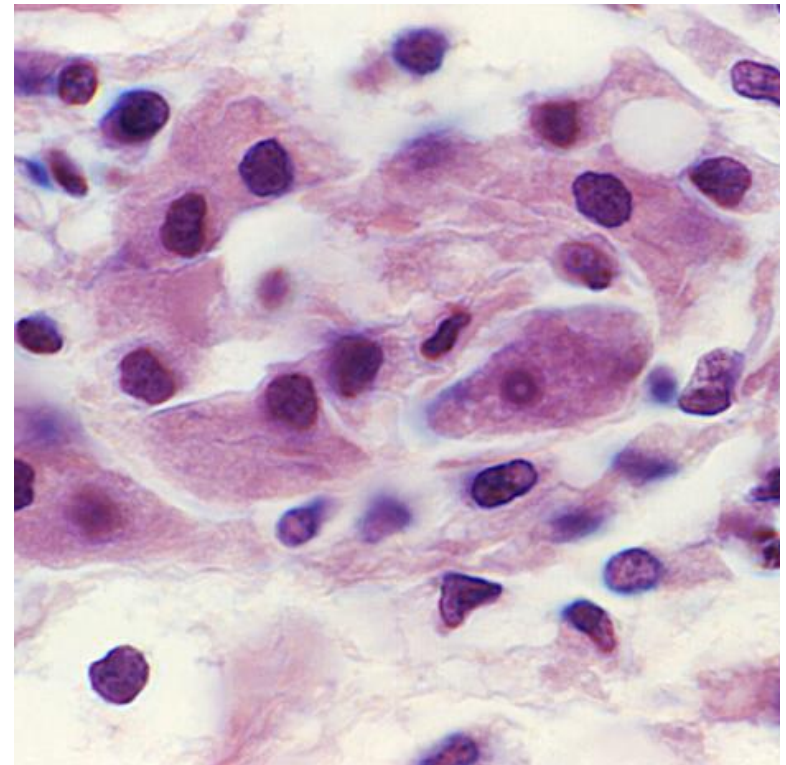
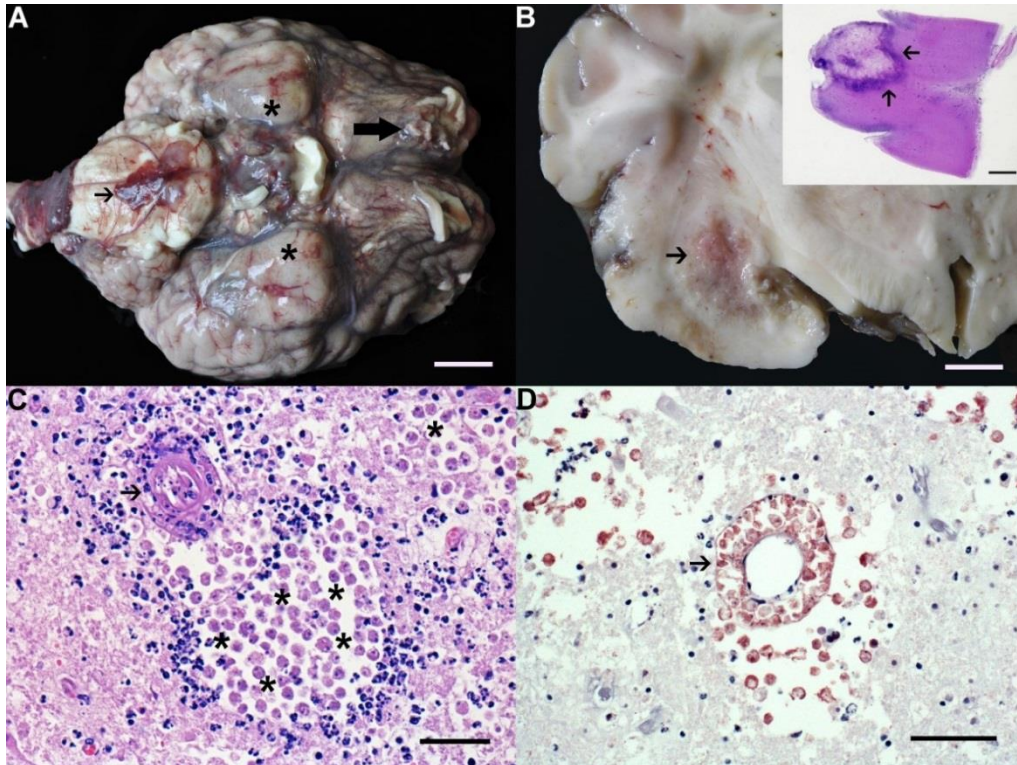
bičíkovec



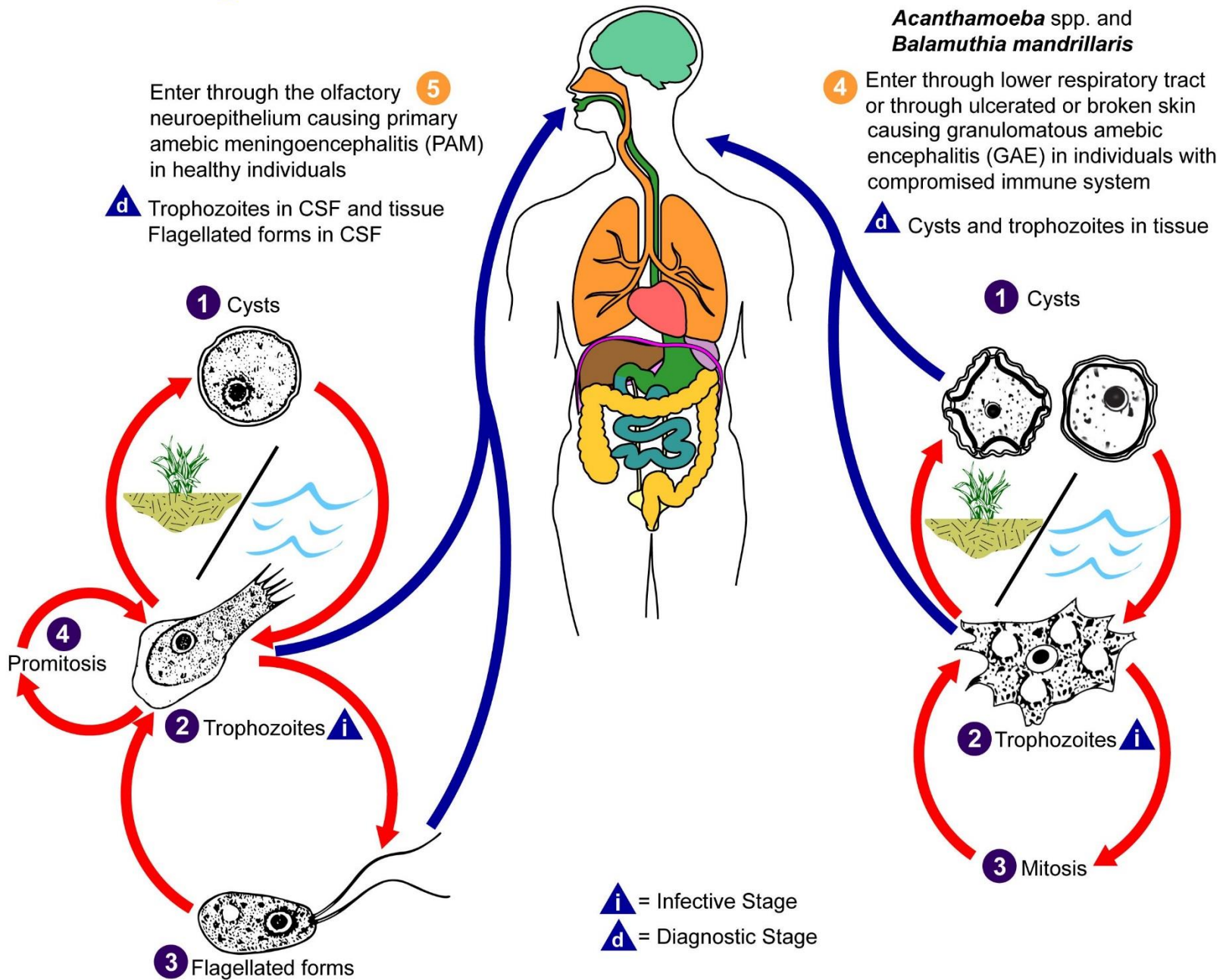
cysta

Primární amébová encefalitida (PAME)

- améboidní trofozoit proniká čichovou sliznicí do mozku – bulbus olfactorius → akutní zánět mozku (průběh fulminantní - velmi prudce, superakutně probíhající, s dramatickými příznaky) → bolest hlavy, horečka, meningeální příznaky, bezvědomí → úmrtí za 3 –7 dnů
- intravitální diagnostika obtížná; vyšetření mozkomíšního moku - pohyb améb, barvení trichromem, kultivace 1,5% agar + *Aerobacter aerogenes*
- léčba málo úspěšná



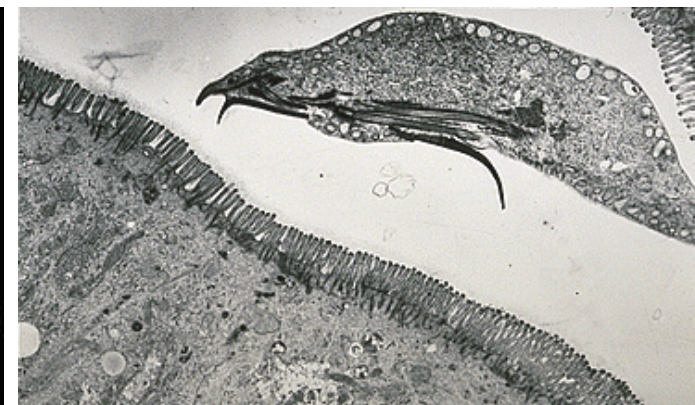
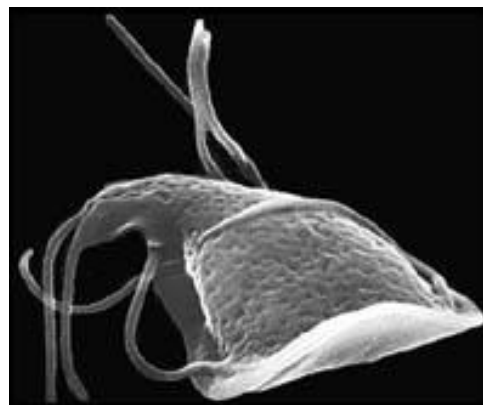
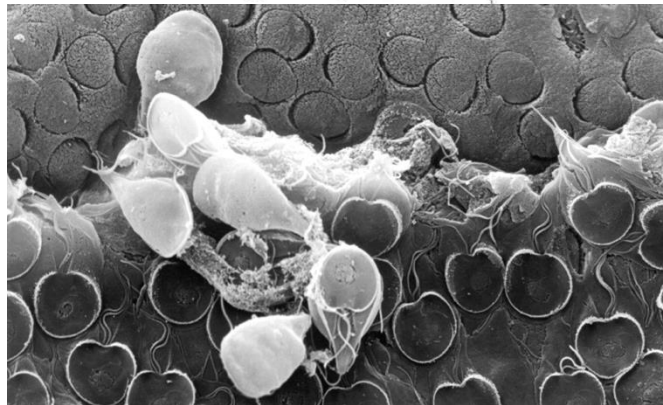
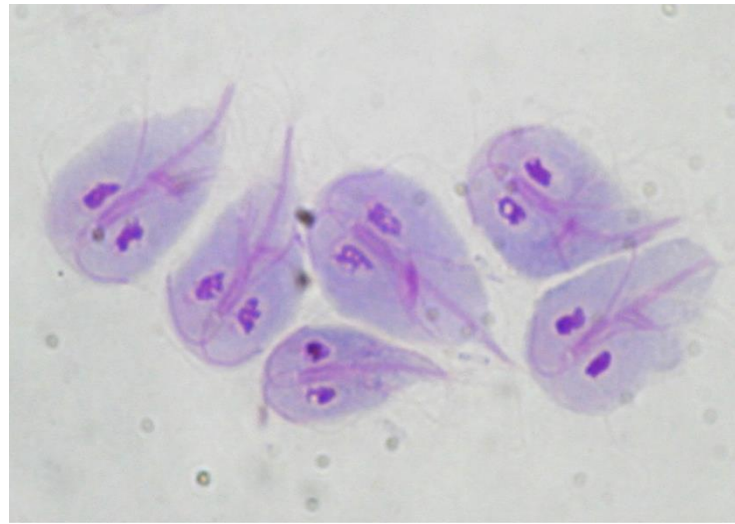
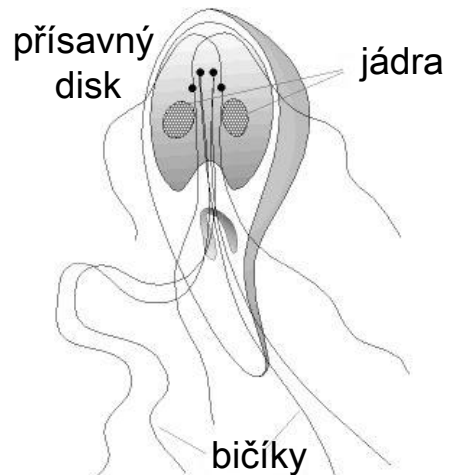
Free-Living Amebic Infections



Excavata - Metamonada - Fornicata - Diplomonadida

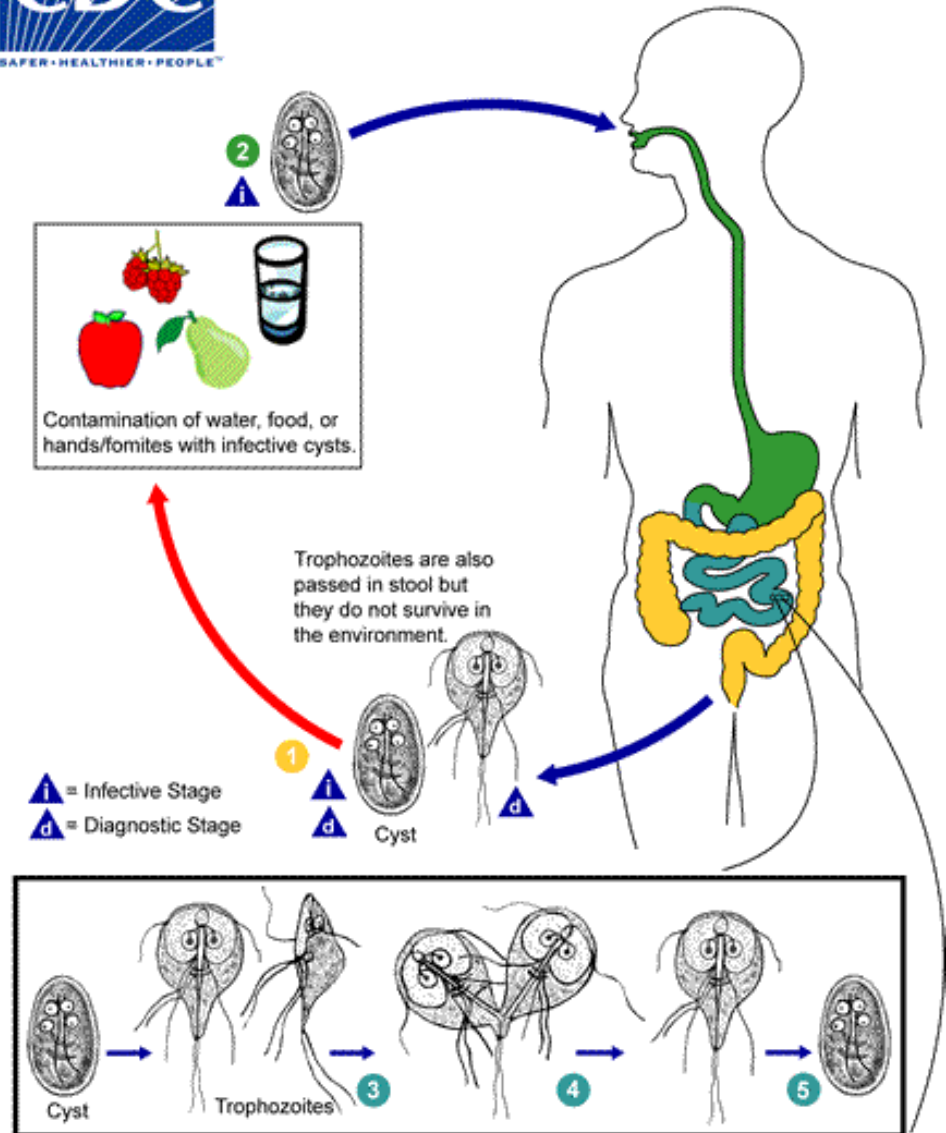
Giardia intestinalis

- přichycení na stěně tenkého střeva pomocí přísavného disku → porucha vstřebávání sacharidů a tuků v duodenu → steatorrhea (přítomnost tuků ve stolici)
- nekrvavý průjem mastného vzhledu s hlenem, bolesti břicha, nevolnost, zvracení
- lidská a zvířecí giardióza - epidemie zejména ve vyspělých zemích s imunologicky naivní populací (např. USA)



Životní cyklus *G. intestinalis*

1. Cysty i trofozoiti ve stolici (diagnostické stádia). Odolné 4-jaderné cysty přežívají měsíce ve studené vodě (přežijí i chlorování).
2. K infekci dochází po požití cyst ve vodě, potravě nebo fekálně-orální cestou. Inkubační doba 1-3 týdny.
3. Excystace v duodenu → uvolnění 2 trofozoitů z každé cysty.
4. Trofozoiti (v tenkém střevě, žlučovodech, žlučníku) se množí podélným binárním dělením a zůstávají v proximální části tenkého střeva - volné nebo přichycené na sliznici.
5. Při přechodu do tlustého střeva dochází k encystaci. Cysty ve stolici jsou infekční → možný přenos z člověka na člověka.

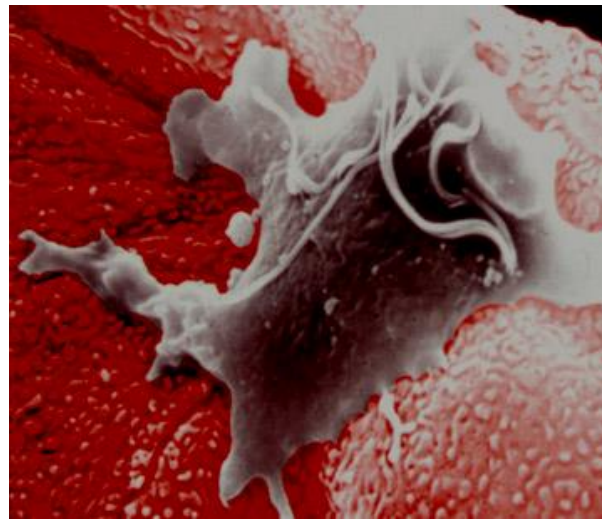


Excavata - Metamonada - Parabasalia – Trichomonadida

- převážné neškodní komezálkové střev obratlovců a hmyzu
- několik parazitických druhů

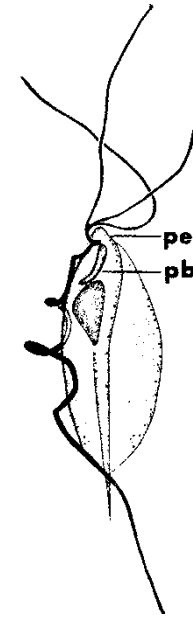
Trichomonas vaginalis

- lidská urogenitální trichomoniáza (trichomonóza) – kosmopolitní rozšíření; trichomonádová kolpitida běžné populace žen se vyskytuje v 1–2 %
- většina mužů a 50% žen jsou „přenašeči“
- časté onemocnění v méně rozvinutých zemích

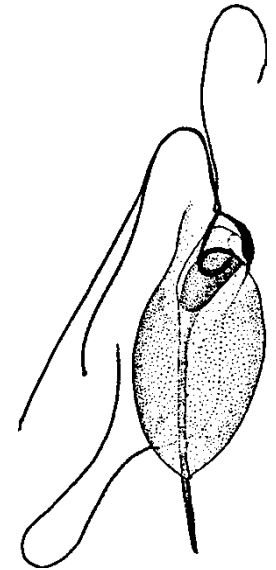


améboidní forma na poševní sliznici

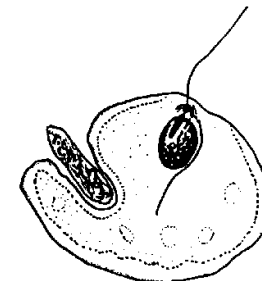
Tritrichomonas foetus



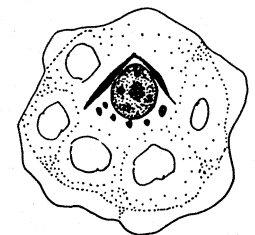
Monocercomonas



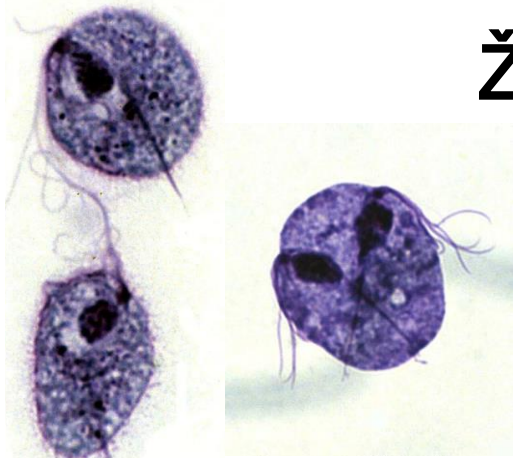
Histomonas



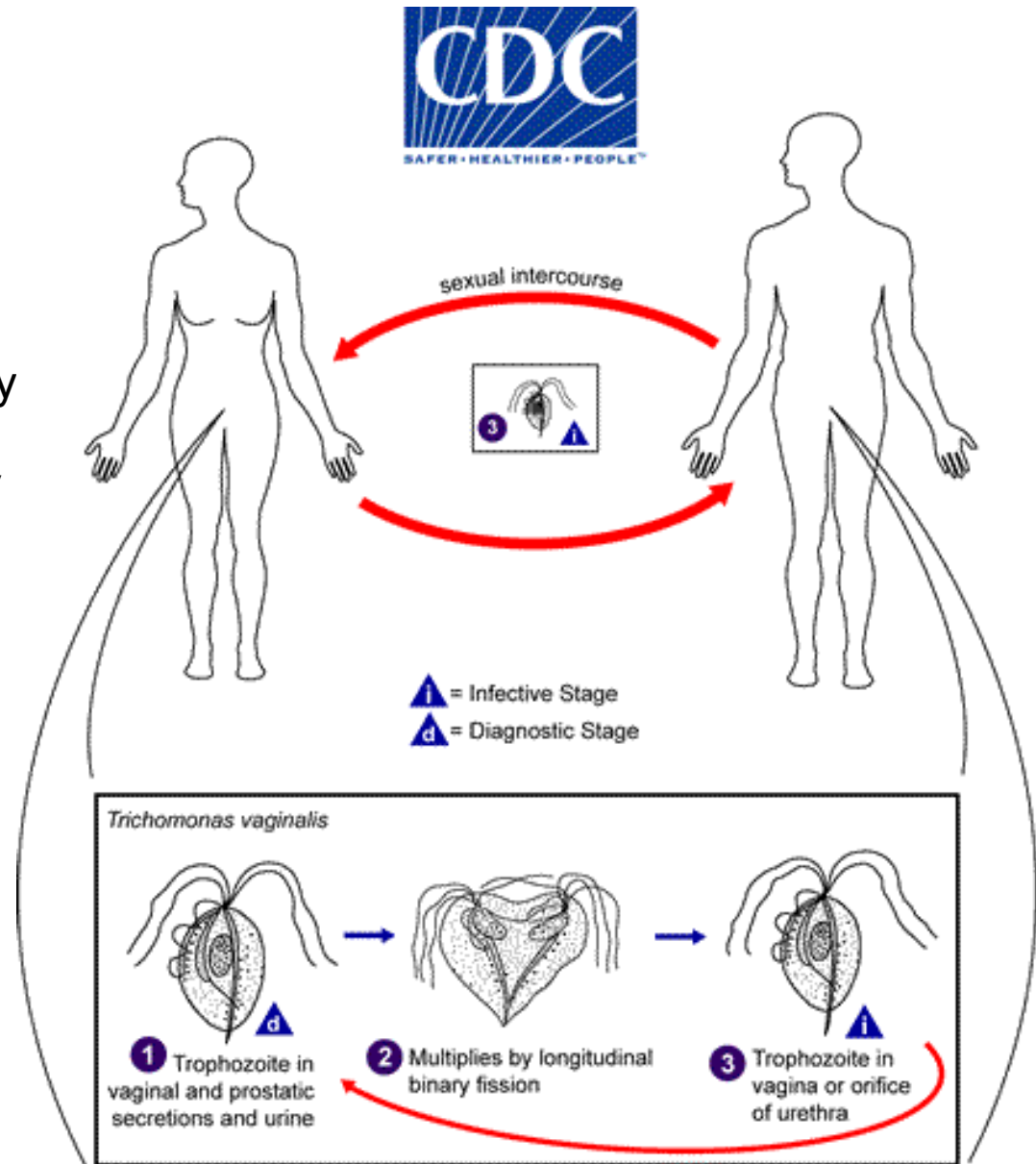
Dientamoeba



Životní cyklus *T. vaginalis*



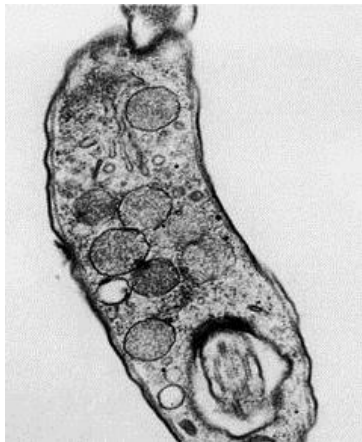
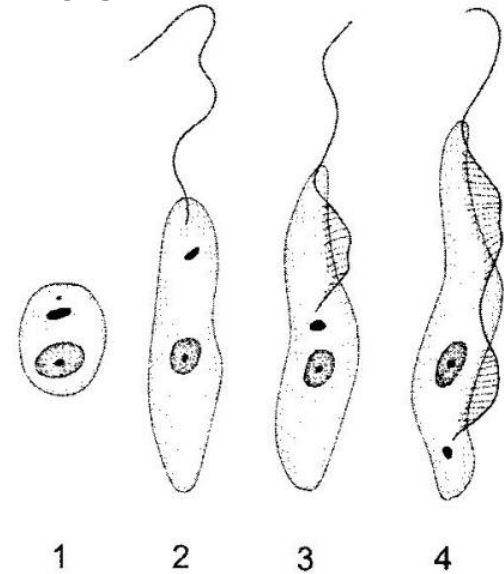
- parazituje v ženském dolním genitálním traktu – záněty vagíny a děložního hrdla, pěnovitý výtok, ↑ vnímavost k infekci HIV
- žije také v močové trubici a prostatě mužů, ale jen vzácně tady způsobuje onemocnění - zánět prostaty a nadvarlat až sterilita
- množí se podélným binárním dělením
- přenos pohlavním stykem - infekčním stádiem je trofozoit
- zdá se, že parazit nemá cystickou formu a ve vnějším prostředí nepřežívá dobře



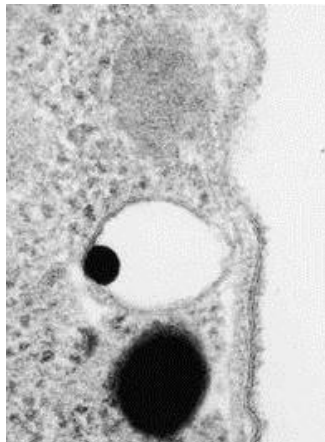
Excavata - Discoba - Discicristata – Euglenozoa

Kinetoplastea - Trypanosomatida

- 1 bičík
- výhradně parazitické druhy – jednohostitelské (*Crithidia*, *Leptomonas*), dvouhostitelské (*Trypanosoma*, *Leishmania*)
- během životního cyklu tvoří různé formy (morfy) lišící se polohou jádra, kinetoplastu a bičíku → amastigot (1), promastigot (2), epimastigot (3) a trypomastigot (4)
- specializované orgány

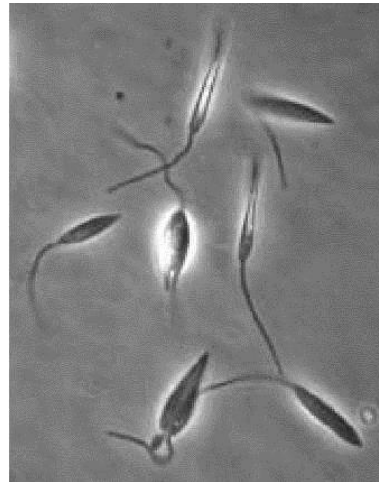


glykosomy

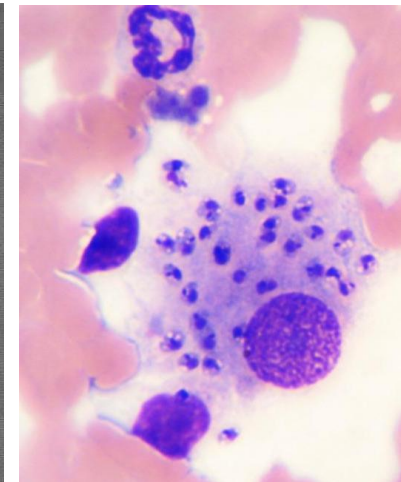


acidokalcisomy

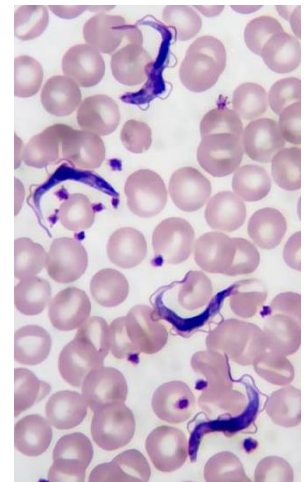
Leptomonas



Leishmania



Trypanosoma



Trypanosoma spp.

- více než 300 druhů u všech tříd obratlovců
- přenos: dvoukřídlý hmyz, ploštice, pijavky, upíři
- i kontaminativní přenos



Stercoraria (stercus = trus)

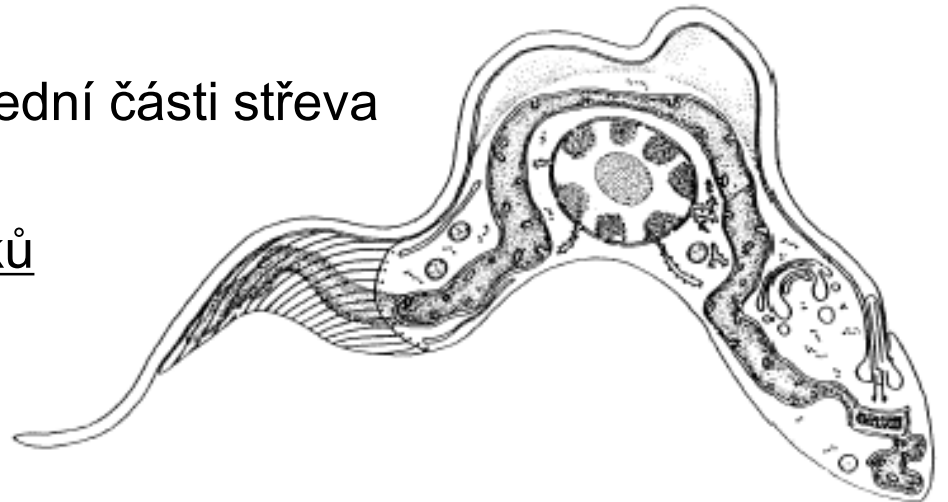
- vývoj v přenašeči ukončen v zadní části střeva

Salivaria (saliva = slina)

- přenašeč - vývoj ukončen v přední části střeva

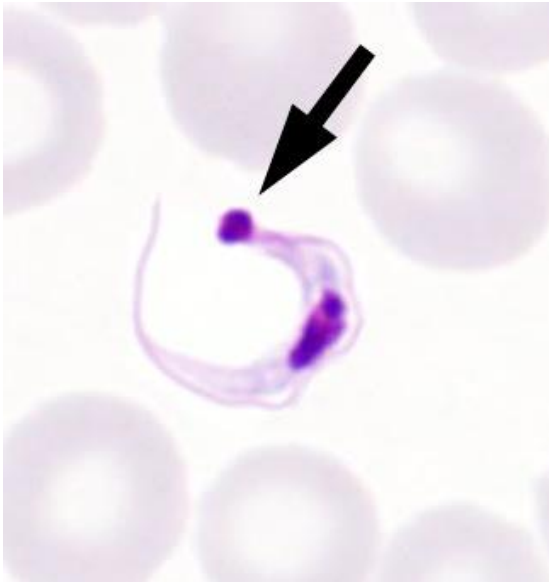
Trypanosomy z ryb a obojživelníků

- proboscis pijavek



Stercoraria

Trypanosoma cruzi



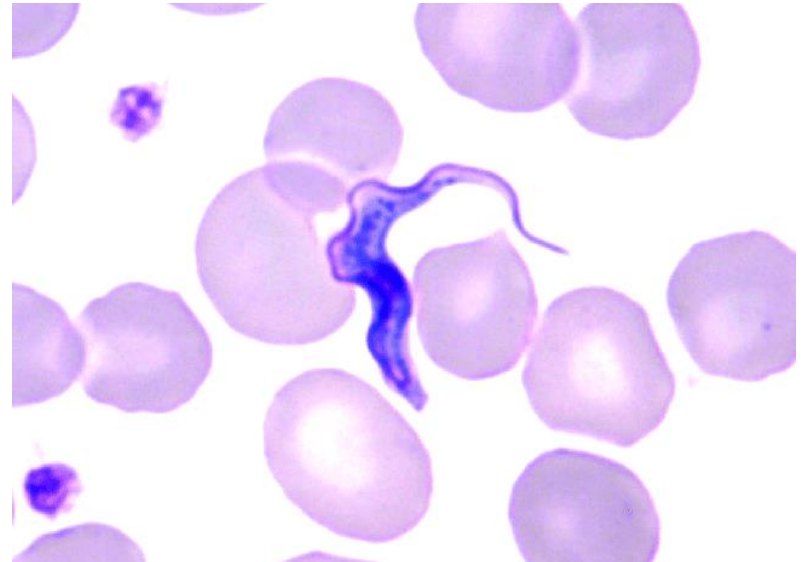
Salivaria

Trypanosoma brucei



Původci onemocnění

- lidská spavá nemoc - africká trypanozomiáza
- přenos bodalkou tse-tse, 100-300 tisíc nemocných, 5000 ročně umírá
- trypanosomy pronikají do mozku a mozkomíšního moku → bolesti hlavy, mozkové příznaky, poruchy spánku a postupující kachektizace → neléčení až smrt
- ❑ západní forma: *Trypanosoma brucei gambiense*, přenašeč *Glossina palpalis* → chronická onemocnění, letargie typická pro pozdější fáze
- ❑ východní forma: (*T. b. rhodesiense*), přenašeč *G. morsitans* → rychle probíhající forma, smrt do několika týdnů



Životní cyklus *T. brucei*



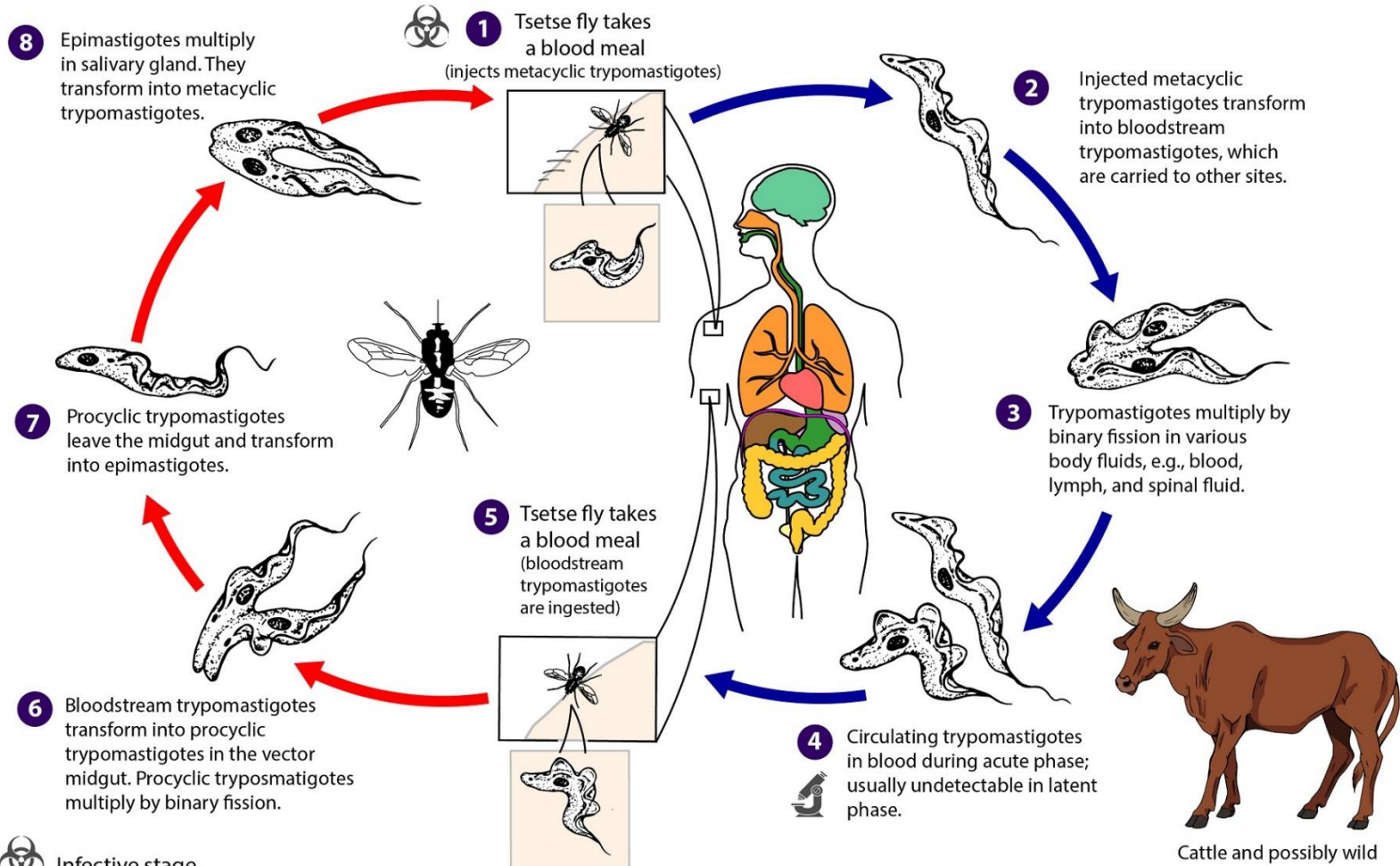
African Trypanosomiasis



Trypanosoma brucei gambiense & *Trypanosoma brucei rhodesiense*



Tsetse Fly Stages

Mammalian Stages



 Infective stage
 Diagnostic stage

Cattle and possibly wild ungulates are reservoirs for *T. b. rhodesiense*.

Chagasova choroba - americká trypanosomiáza

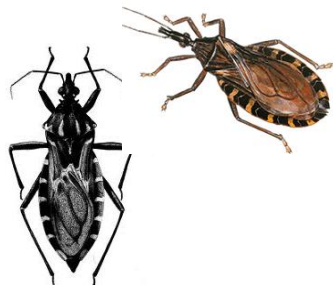
- přenašeči jsou ploštice z podčeledi Triatominae - přenos pouze tehdy když během kousnutí defekují; přenos krví (transfúze, transplantace, těhotenství)
- inkubační doba 1-6 týdnů, lokální reakce v místě vpichu a v 1/2 případů se objeví infekce v blízkosti očí, zvětšení mízních uzlin v místě infekce
- po 2-4 týdnech akutní fáze - zaplavení organismu parazity ⇒ horečka, dušnost, bolesti břicha, zvětšení srdce či hromadění tekutin na tváři a na nohou
- latentní fáze trvá i několik let → chronické onemocnění srdce, malformace na střevě (odumírání gangliových buněk - poruchy peristaltiky), bez léčby smrt



Leishmanióza - přenos bodavým hmyzem rodu *Phlebotomus* a *Lutzomyia*

- ❑ viscerální leishmanióza (kala azar - černá horečka): komplex druhů *Leishmania d. donovani*, *L. d. chagasi* a *L. d. infantum*
- ❑ kožní leishmanióza: *L. tropica*, *L. aethiopica* a *L. major* (Starý svět) a *L. mexicana*, *L. brasiliensis* a *L. peruviana* (Nový svět).
- ❑ mukokutánní leishmanióza (Espundia): *L. brasiliensis*

Životní cyklus *T. cruzi*



Triatomine Bug Stages

1 Triatomine bug takes a blood meal (passes metacyclic trypomastigotes in feces, trypomastigotes enter bite wound or mucosal membranes, such as the conjunctiva)

Metacyclic trypomastigotes in hindgut

8

Multiply in midgut

7

Epimastigotes in midgut

6



5 Triatomine bug takes a blood meal (trypomastigotes ingested)



Human Stages

2 Metacyclic trypomastigotes penetrate various cells at bite wound site. Inside cells they transform into amastigotes.



3 Amastigotes multiply by binary fission in cells of infected tissues.

Trypomastigotes can infect other cells and transform into intracellular amastigotes in new infection sites. Clinical manifestations can result from this infective cycle.



4 Intracellular amastigotes transform into trypomastigotes, then burst out of the cell and enter the bloodstream.

i = Infective Stage

d = Diagnostic Stage

Nejvýznamnější vektorů:

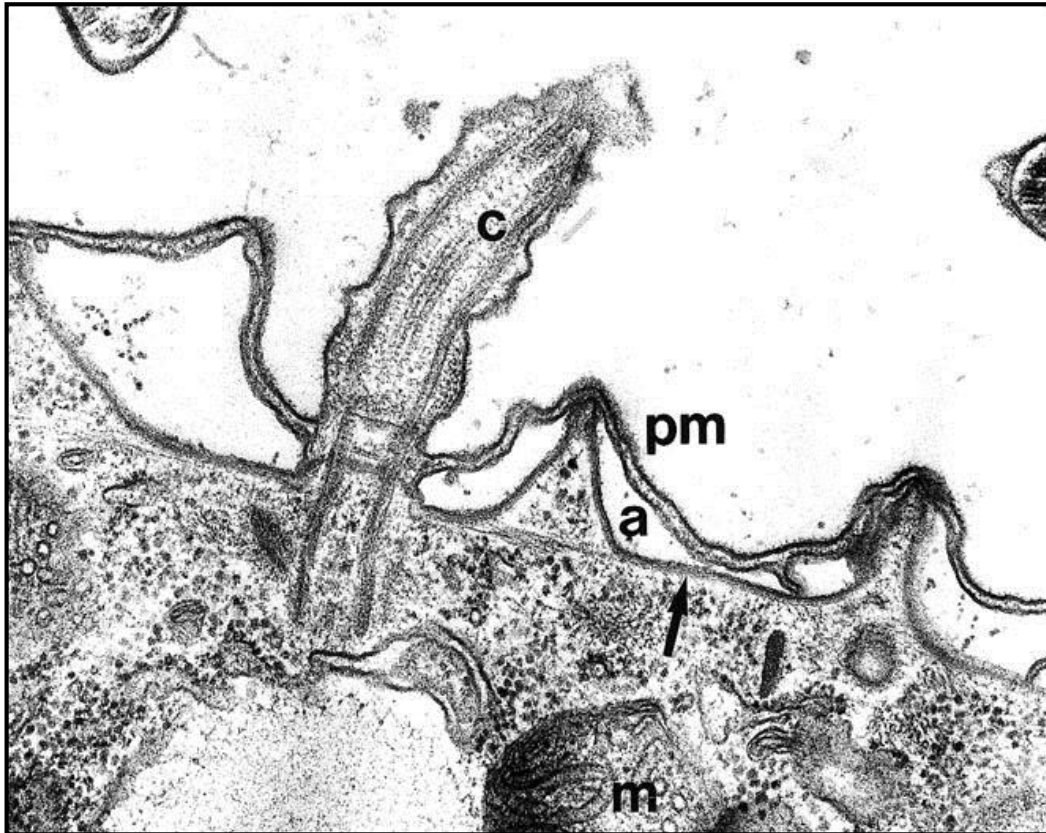
Triatoma infestans

Triatoma dimidiata

Rhodnius prolixus

Panstrongylus megistus

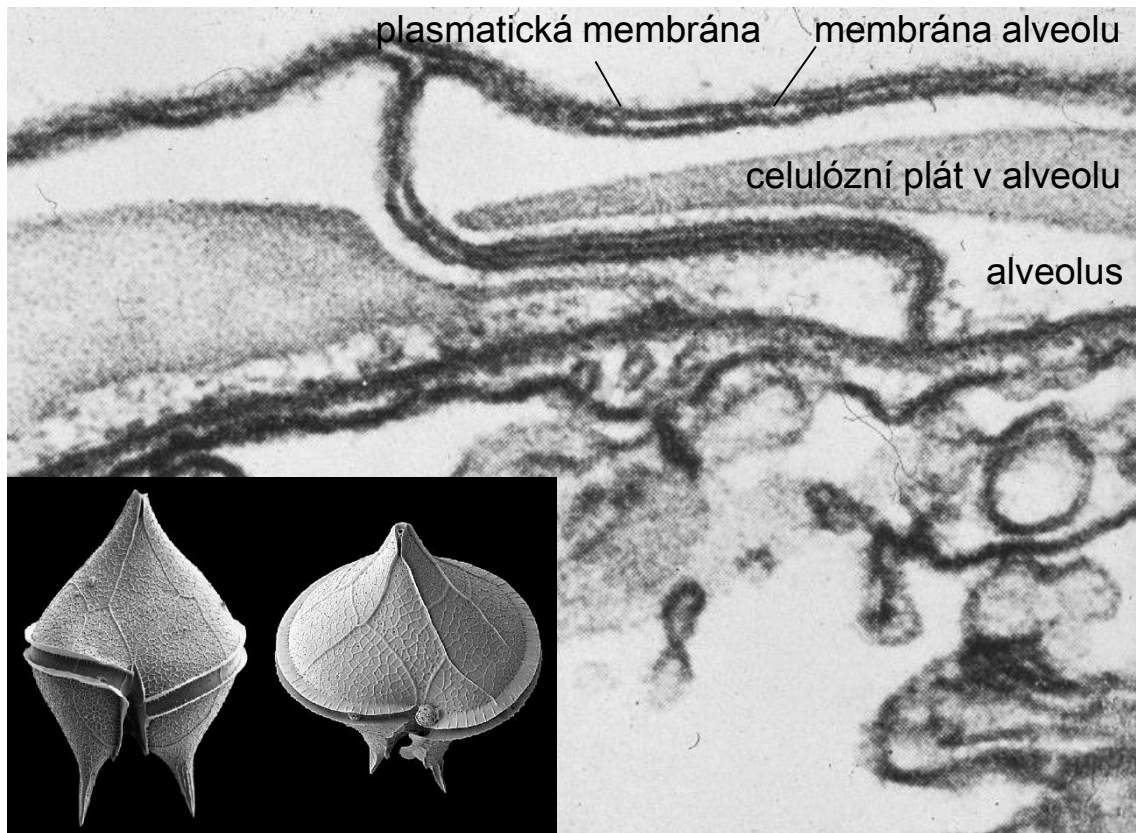
Alveolata



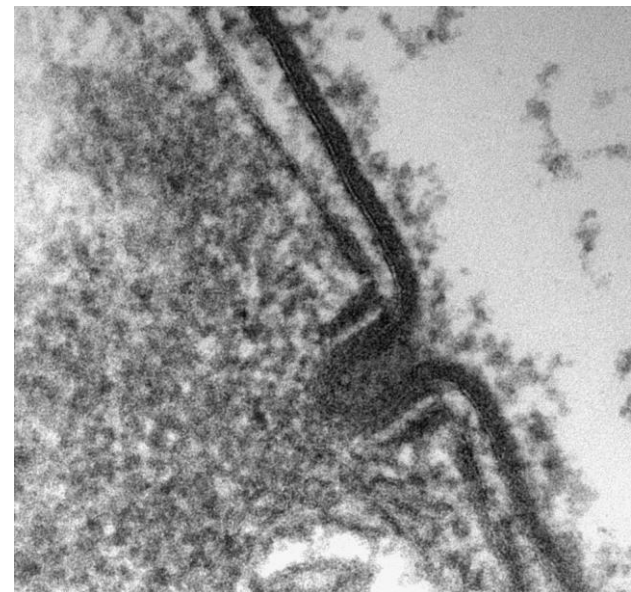
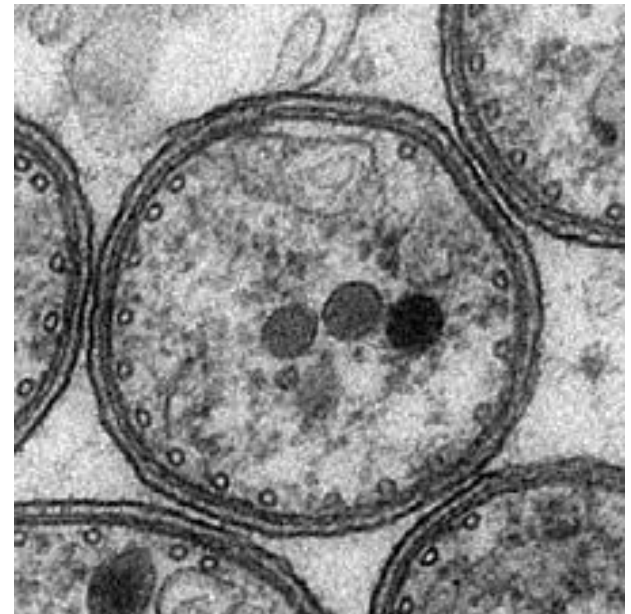
Tetrahymena (Ciliophora)

- společný znak - kortikální alveoly
- ovlivňují stabilitu povrchu buňky – zajišťují pružnost a zároveň pevnost → Alveolata nepotřebují těžké schránky, často velcí dravci
- alveoly nejsou nikdy celistvé - mikropóry u výtrusovců
- u různých alveolát různé utváření alveolů

- **alveoly** - měchýřky pod povrchem
- lokalizace pod plazmatickou membránou



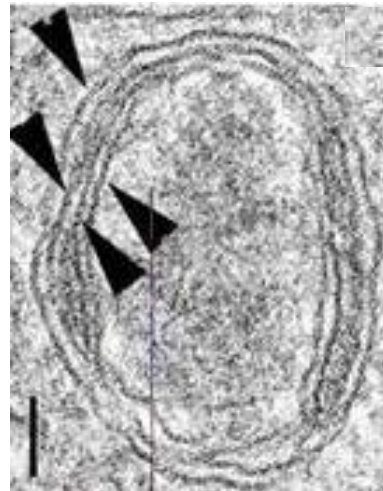
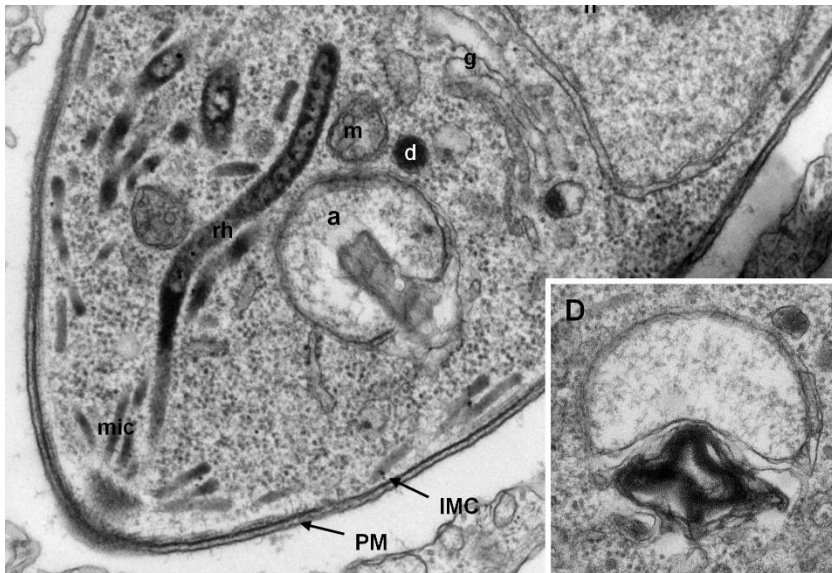
alveoly obrněnek - často obsahují celulózové pláty



Apicomplexa - jeden nebo několik alveolů

„Myzozoa“

- myzocytóza - narušení povrchu buňky kořisti a následné vysávání cytoplasmy
- tubulární krysty
- plastid u některých zástupců - sekundární červený plastid

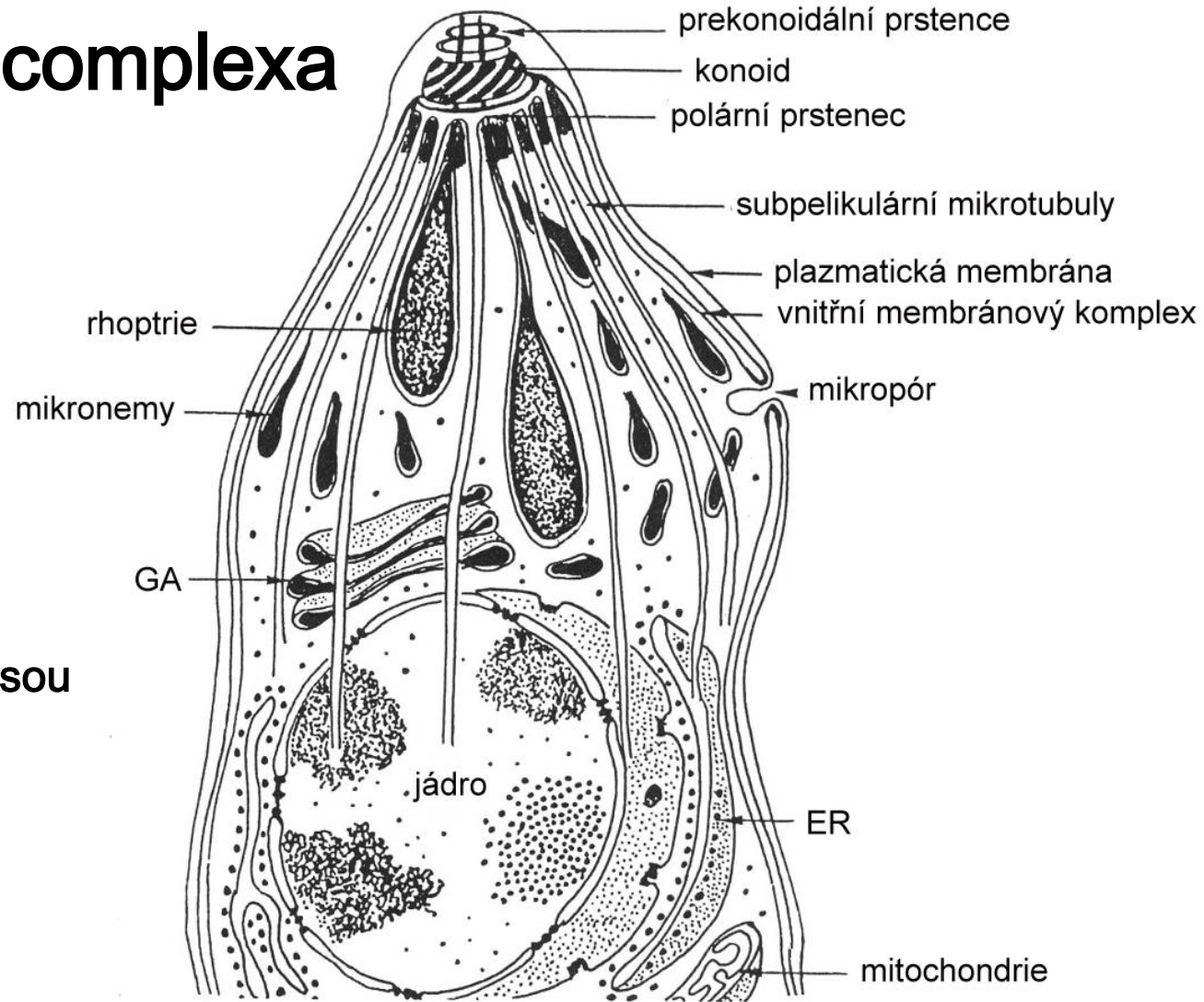


obrněnka *Amphidinium testudo* s chloroplasty



apicoplast u Apicomplexa - organela plastidového původu

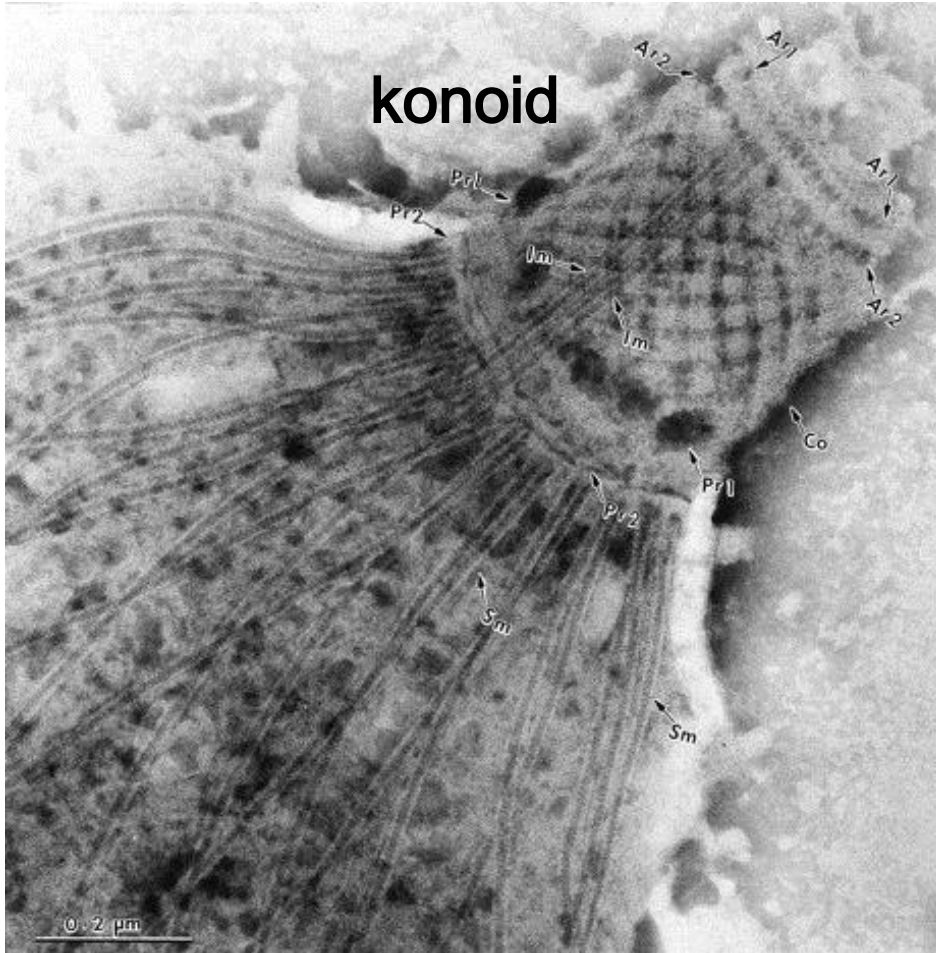
Alveolata - Apicomplexa



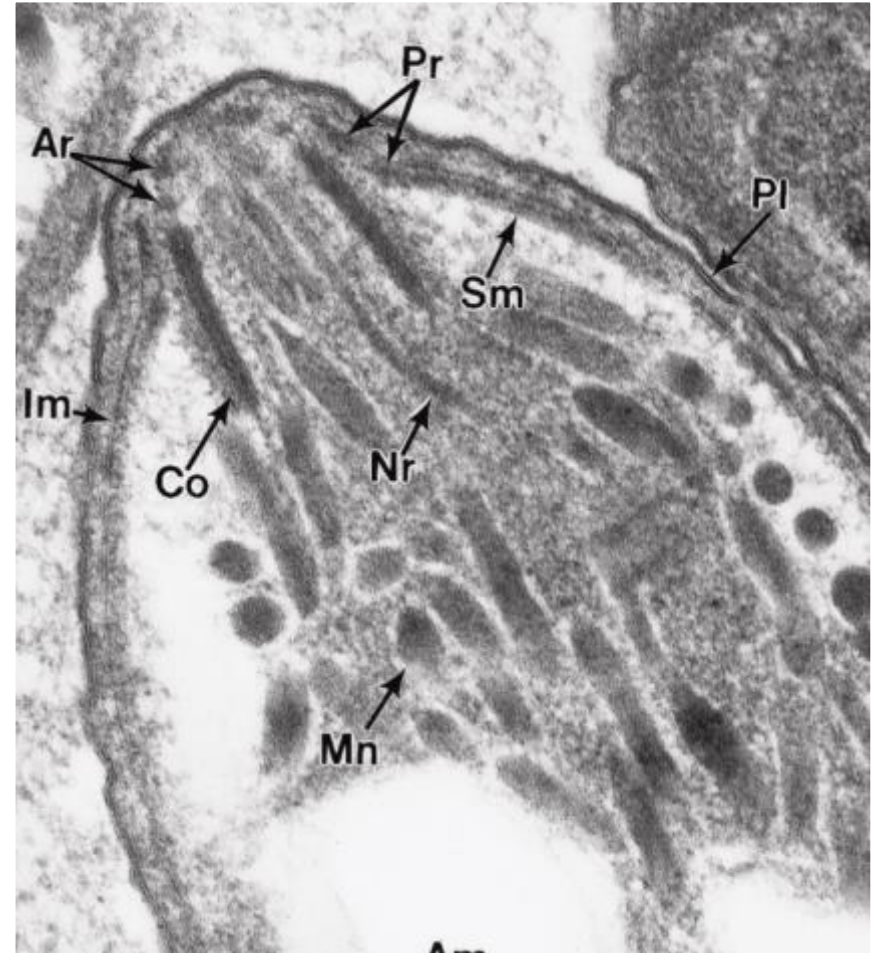
Všechna Apicomplexa jsou parazitická !!!!

- základní charakteristika – přítomnost **apikálního komplexu** organel u invazivního stadia (zoitu)
- uzavřený konoid
- tento složitý aparát slouží k průniku do hostitelské buňky, k ukotvení parazita a k následné tvorbě parazitoformní vakuoly u intracelulárních nebo parazitoformní vakuoly u epicelulárních zástupců

Apikální konec buňky (apex) zoitu



tachyzoit *Toxoplasma gondii*



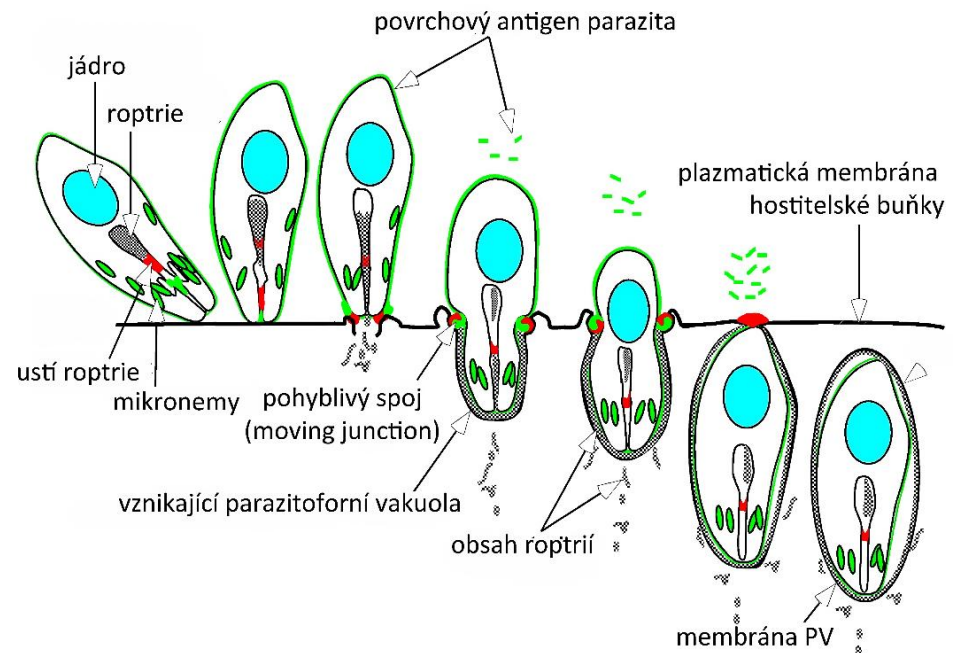
bradyzoit *T. gondii*

Průnik zoitu do hostitelské buňky



T. gondii pronikající do hostitelské buňky

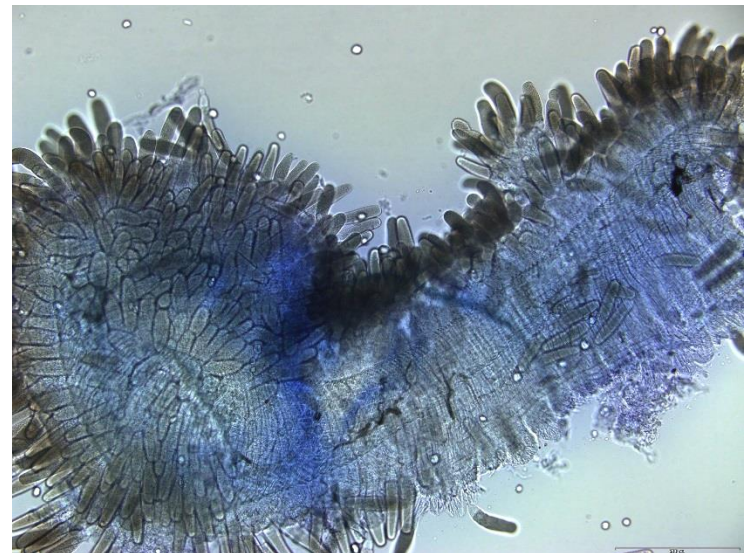
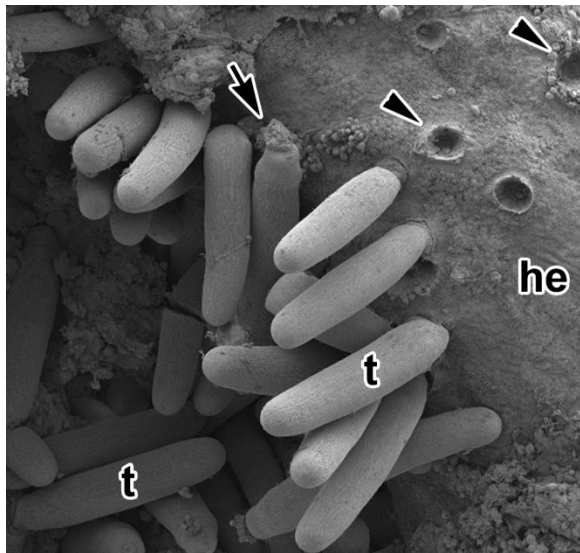
- Sekvence po sobě rychle následujících procesů:
1. Uchycení zoitu na povrch hostitelské buňky;
 2. orientace zoitu a zahájení rozrušování povrchu hostitelské buňky;
 3. průnik do buňky, obsah rhoptrií a mikronem se vylévá → část materiálu se inkorporuje do membrány vznikající parazitoforní vakuoly;
 4. pokračující průnik, odhození antigenního povrchu zoitu;
 5. dotvoření parazitoforní vakuoly.



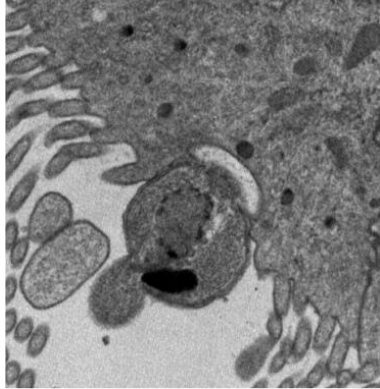
Conoidasida - Gregarinasina Eugregarinorida

- parazitují trávicí trakt, gonády a tělní dutiny různých bezobratlých
- většinou monoxenní paraziti, relativně velké rozměry
- většinou extracelulární vývoj + epicelulární lokalizace vegetativního stadia
- pelikula tvoří podélní epicytární záhyby → klouzavý pohyb
- infekční oocysta s 8 sporozoity
- aseptátní a septátní (epimerit, protomerit a deutomerit) formy trofozoitů

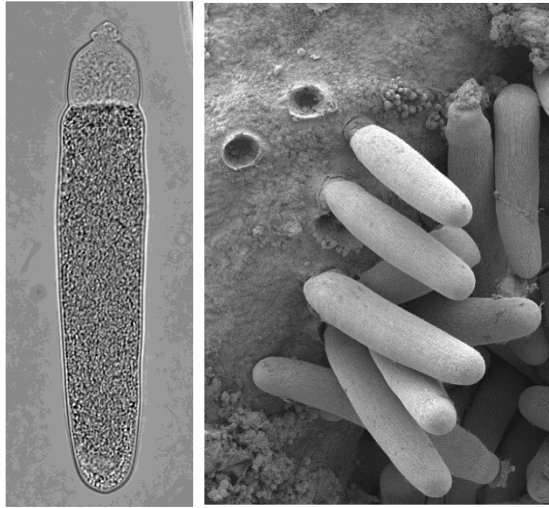
Gregarina polymorpha



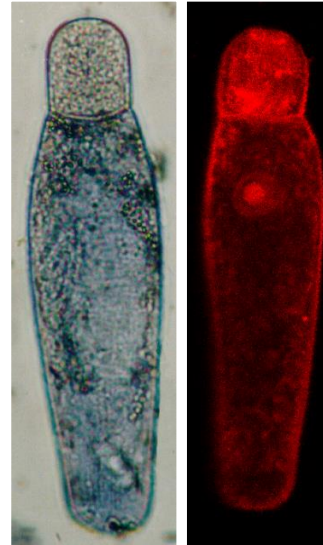
raný trofozoit



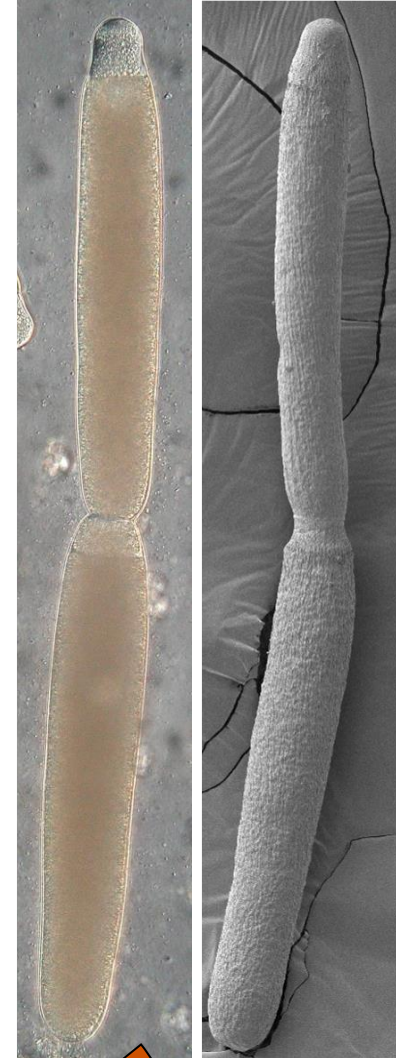
trofozoiti



soliterní gamonti



gamonti - syzygie



Životní cyklus *G. polymorpha* ve střevě larvy potemníka (*Tenebrio molitor*)

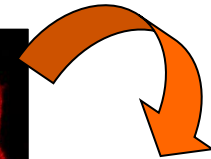
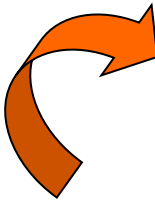
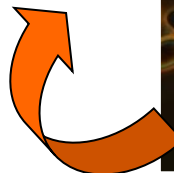
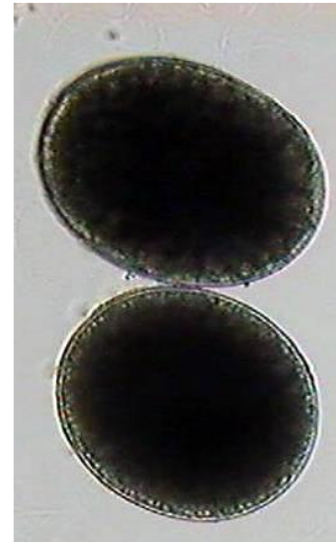
sporozoit



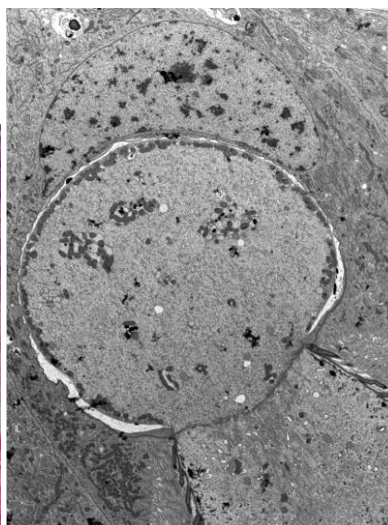
oocysty v řetízkách



gametocysty



jednoduchý epimerit

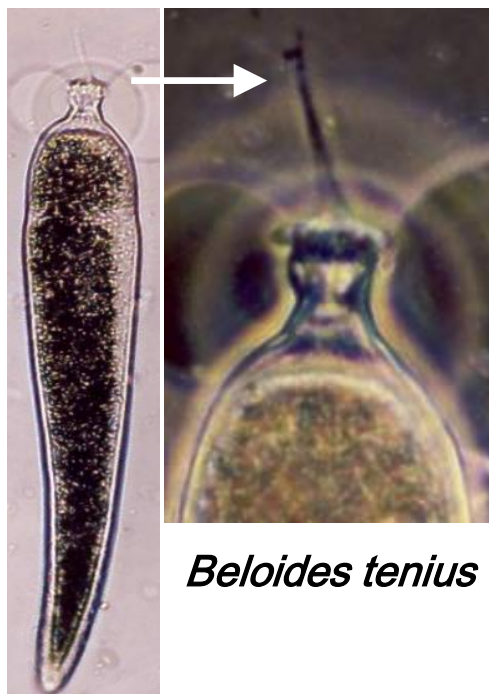


Gegarina garnhami

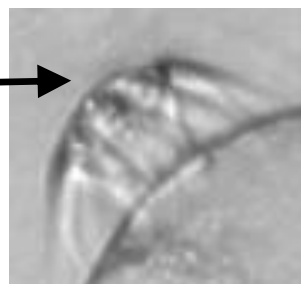


G. steini

komplikovaný epimerit

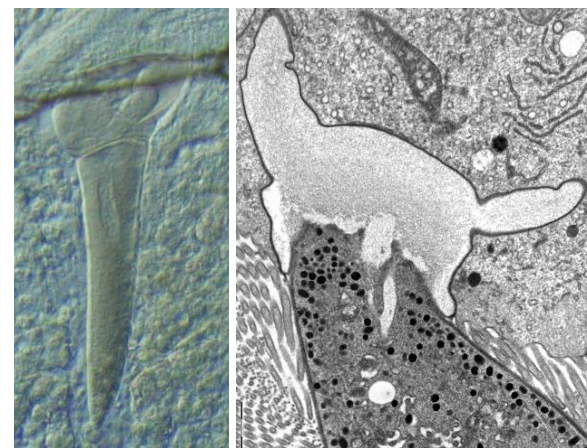


Beloides tenius



Actinocephalus dujardini

modifikovaný protomerit



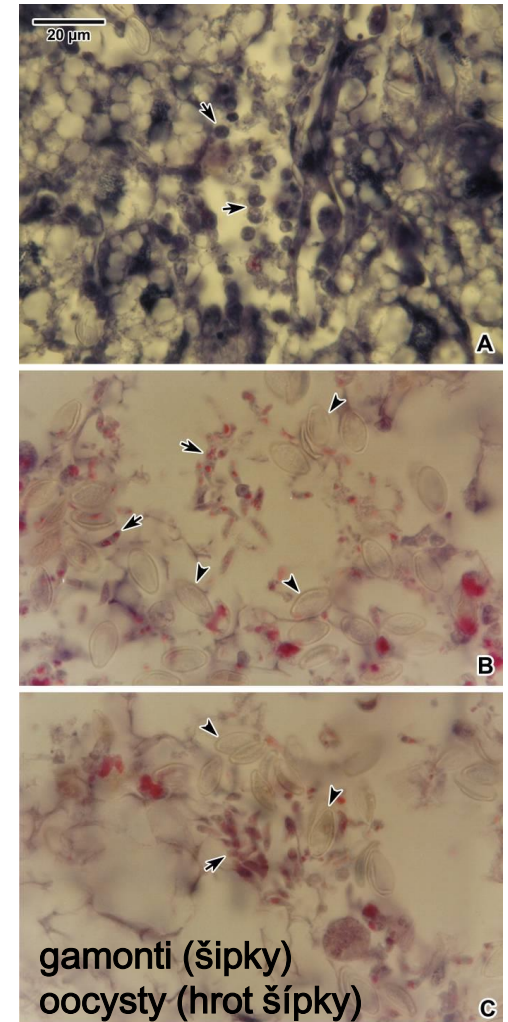
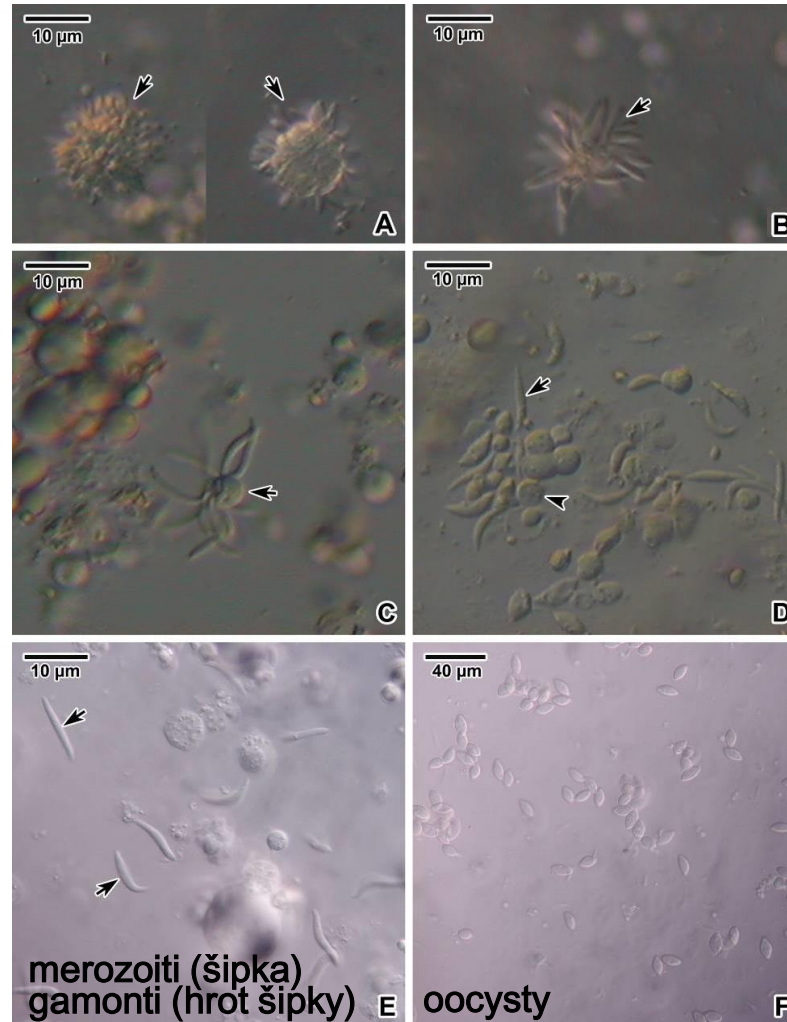
Bothriopsides histrio

Neogregarinida

- přítomnost merogonie
- převážné intracelulární vývoj v tukovém tělese a Malpighiho žlázách hmyzu
- značná patologie až destrukce napadených orgánů

Mattesia dispersa

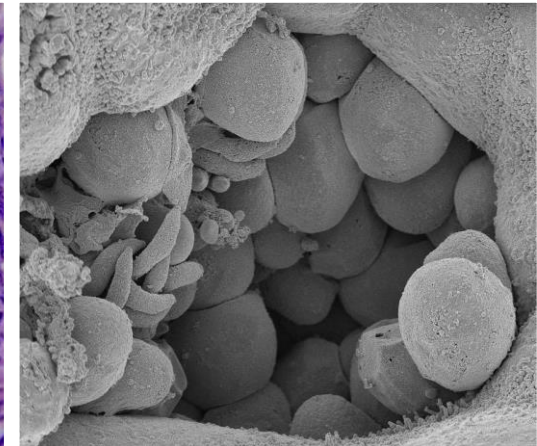
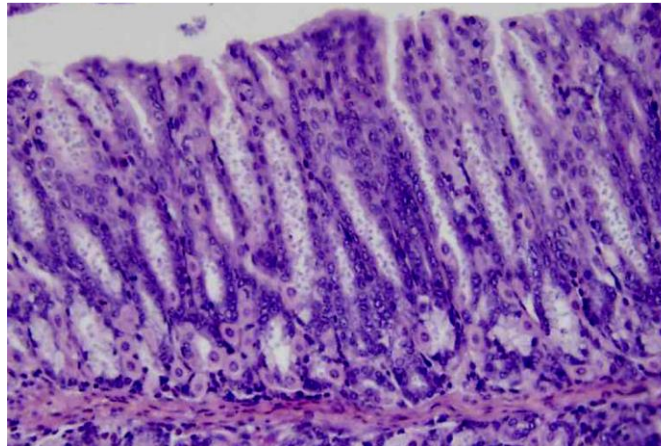
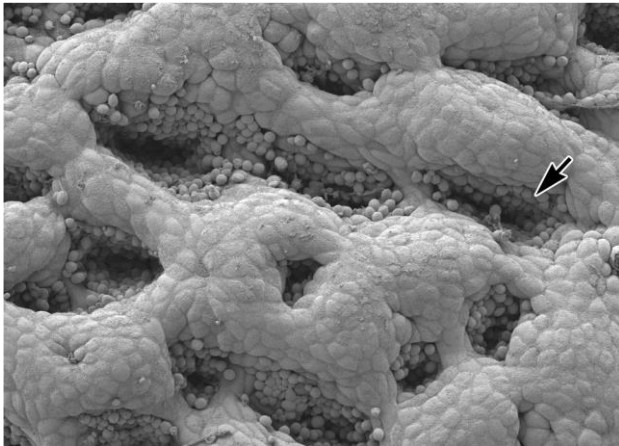
- intracelulární parazit tukového tělesa larev *Ephestia kuehniella*
- autoinfekce oocystami
- na konci vývinu parazita larvy zrudnou, jsou letargické a nepřijímají potravu → smrt

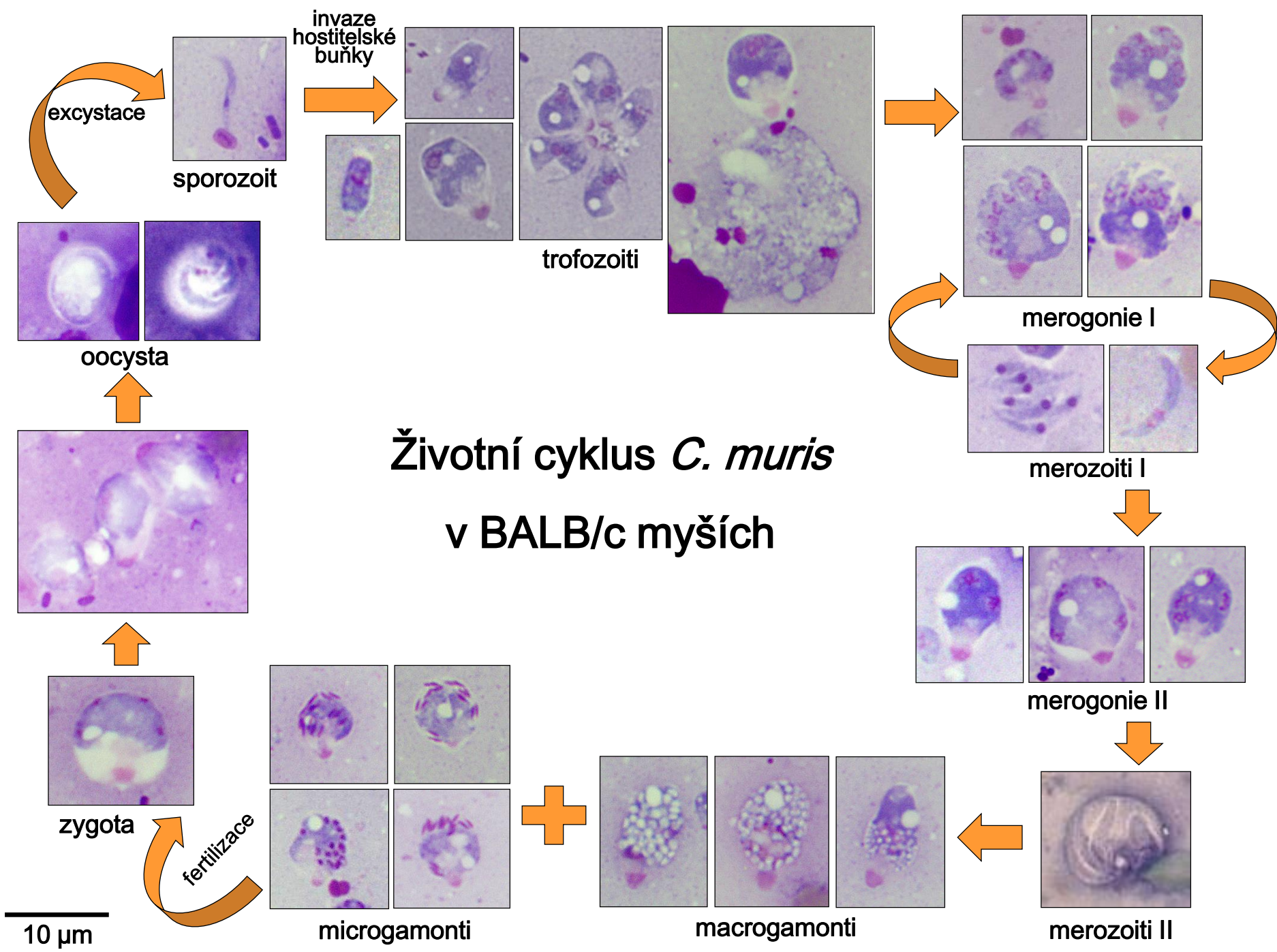


Conoidasida - *Cryptosporidium*

- parazité gastrointestinálního a dýchacího traktu člověka i zvířat → původci průjemových onemocnění savců a onemocnění dýchacího aparátu ptáků
- přenos požitím sporulovaných oocyst se 4 sporozoity (bez sporocysty)
- monoxenní cyklus; vývoj endogenních stadií je epicelulární v parazitoforním vaku hostitelského původu, obvykle na mikrovilárním povrchu epitelových buněk
- autoinfekce (ve střevě)
- nekrvavé vodnaté průjmy: u imunokompetentních jedinců infekce spontánně vymizí, u imunodeficitních (oportunní parazité, AIDS) → dehydratace až smrt
- ojedinělé případy nebo větší či menší epidemie u lidí
- významná je kryptosporidióza telat
- léčba neefektivní

Cryptosporidium muris



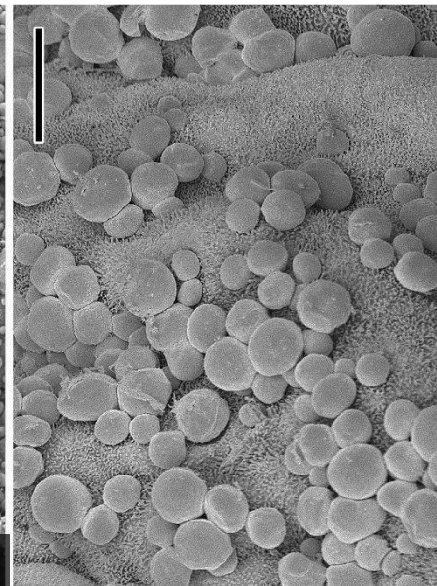
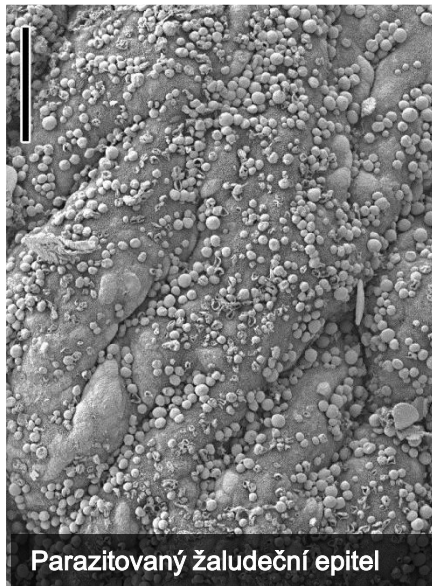
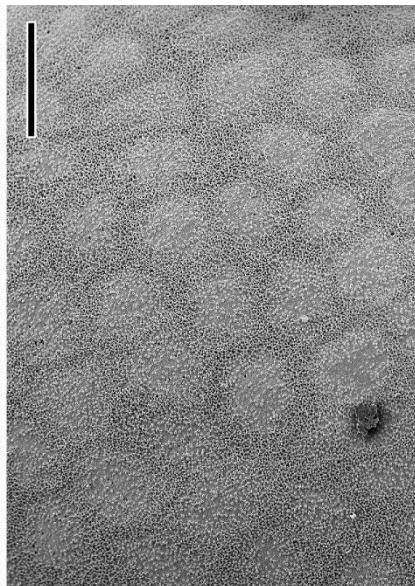
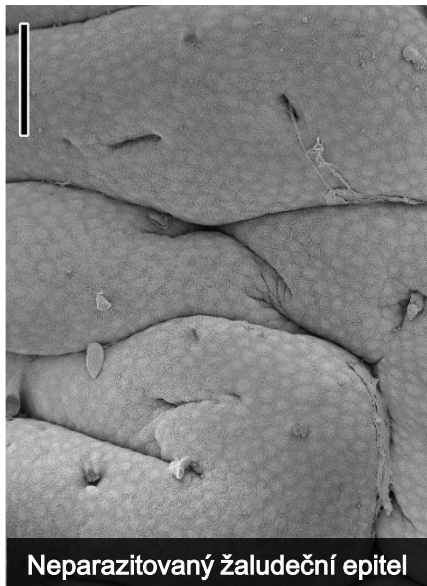
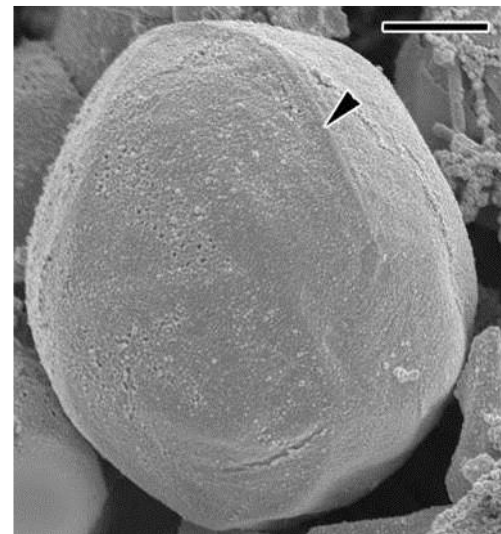
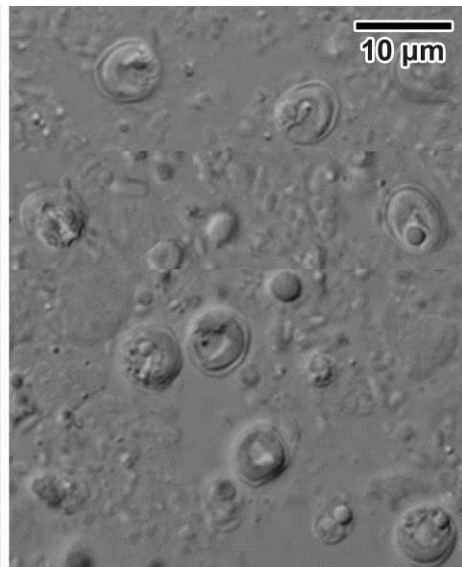
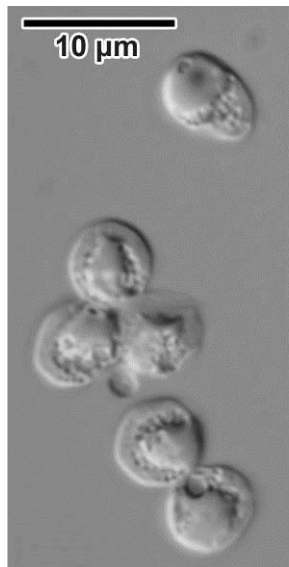


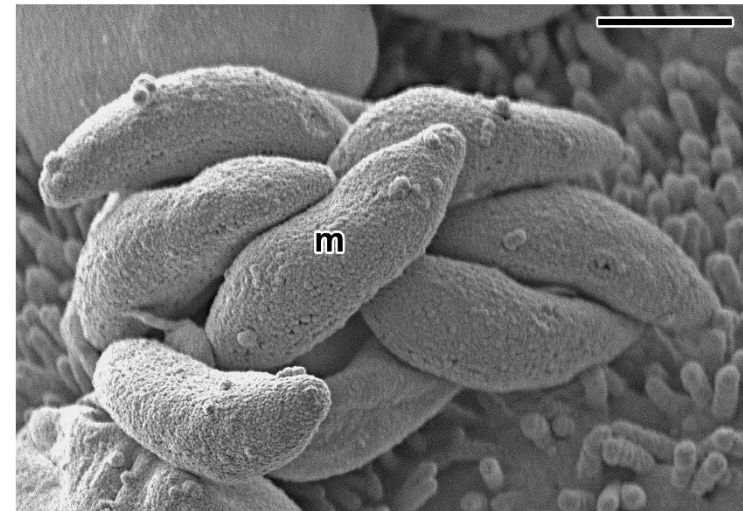
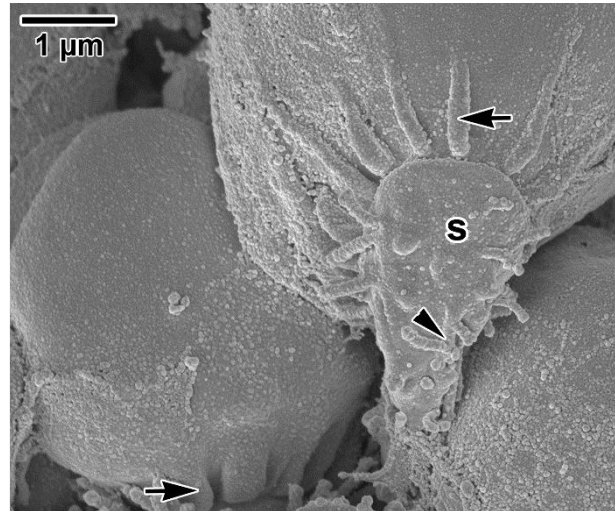
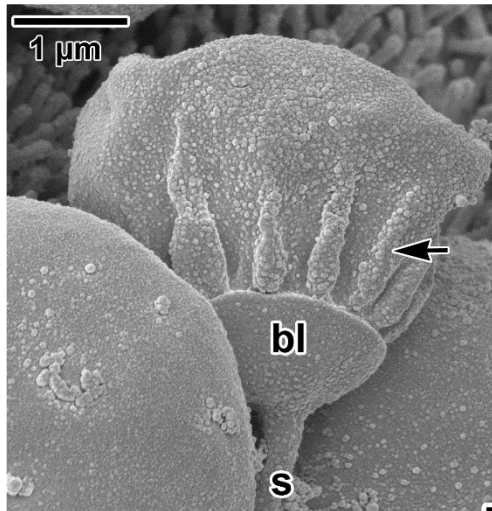
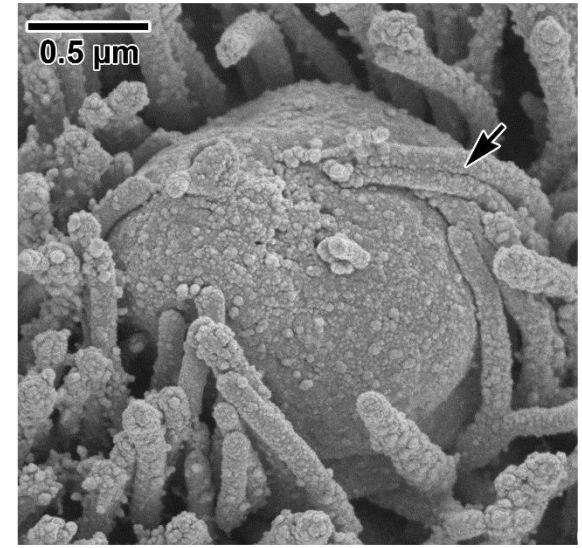
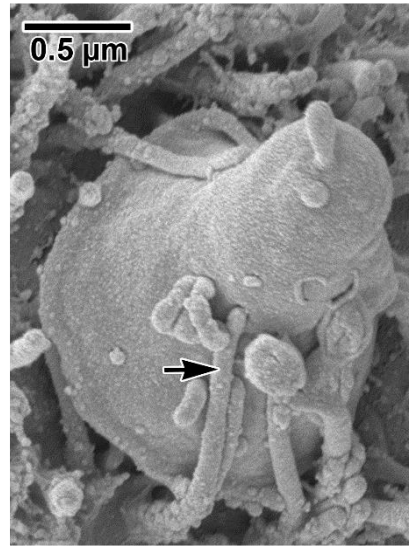
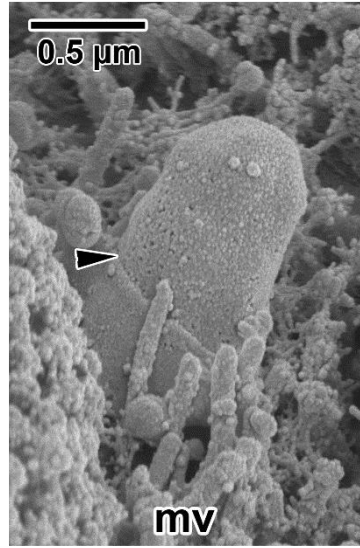
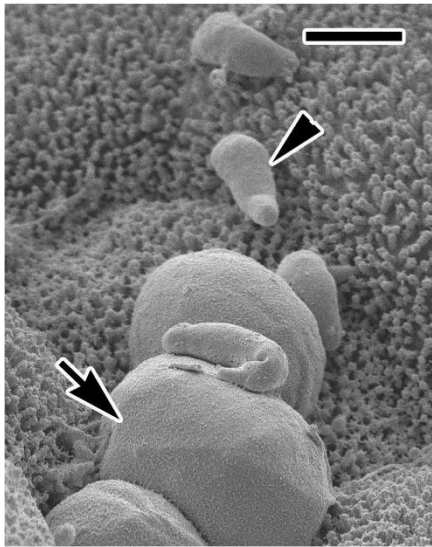
Životní cyklus *C. muris* v BALB/c myších

New species of *Cryptosporidium* Tyzzer, 1907 (Apicomplexa) from amphibian host: morphology, biology and phylogeny

➔ *Cryptosporidium fragile*

Miloslav Jirků^{1,2}, Andrea Valigurová³, Břetislav Koudela^{1,2}, Jaroslav Křížek², David Modrý^{1,2} and Jan Šlapeta⁴



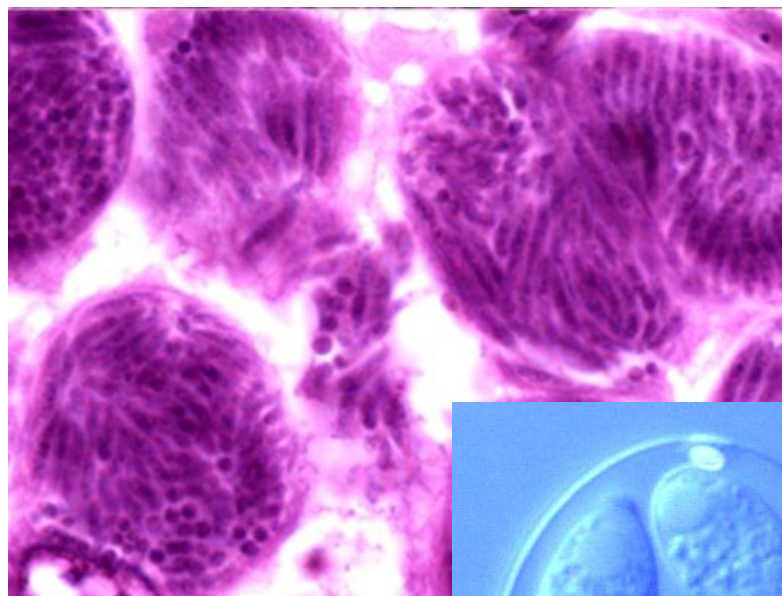
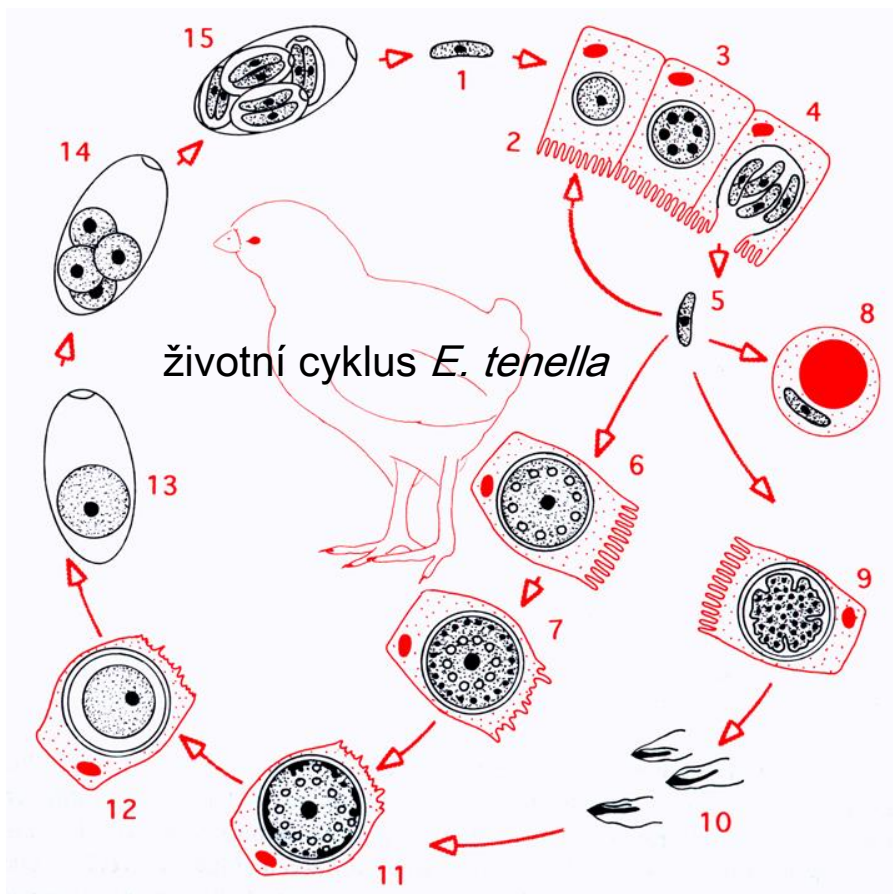


žabí žaludeční buňky parazitované *C. fragile* mohou vytvářet tzv. „stopky“

Conoidasida – Coccidia - Eimeriorina

- jednohostitelští paraziti
- napadají většinou střevní epitel - kokcidióza ⇒ narušení resorpce živin, dehydratace organismu, ztráta krve, zvýšená vnímavost k jiným patogenům, úhyn
- veterinárně významní paraziti chovů slepic a králíků (napadají játra)

Eimeria tenella

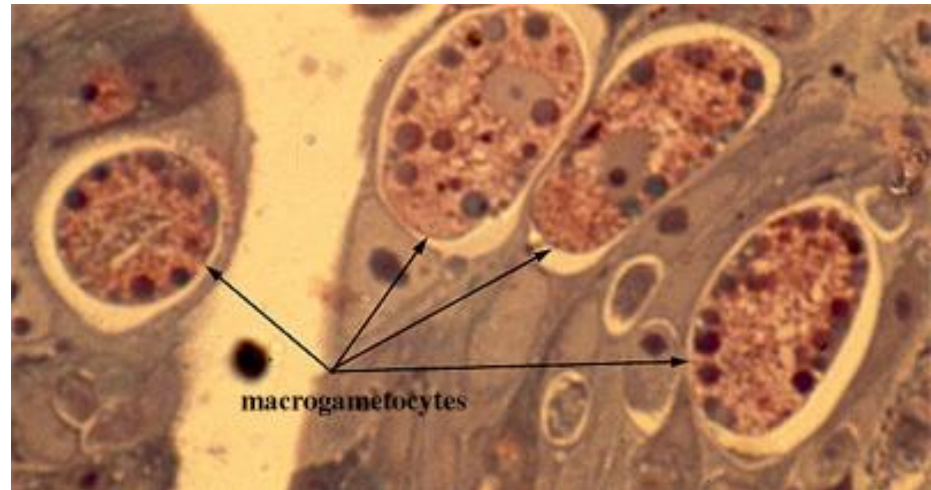
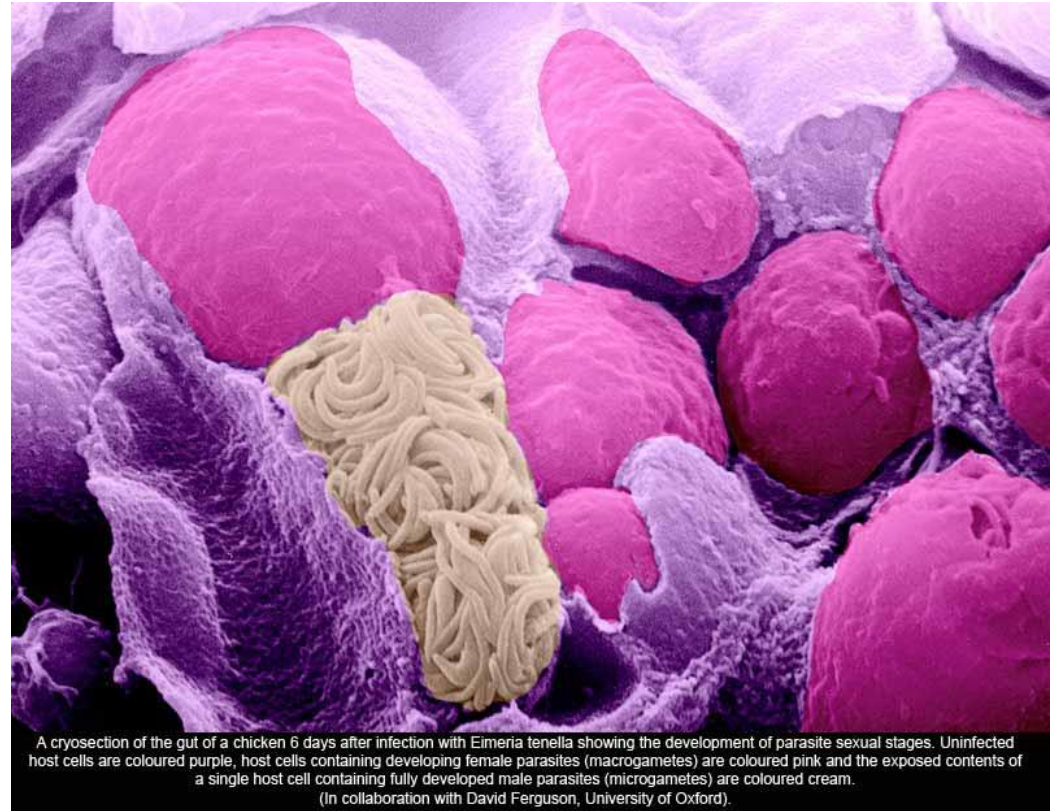


merozoiti ve střevě



oocysta *E. tenella* ze slepic

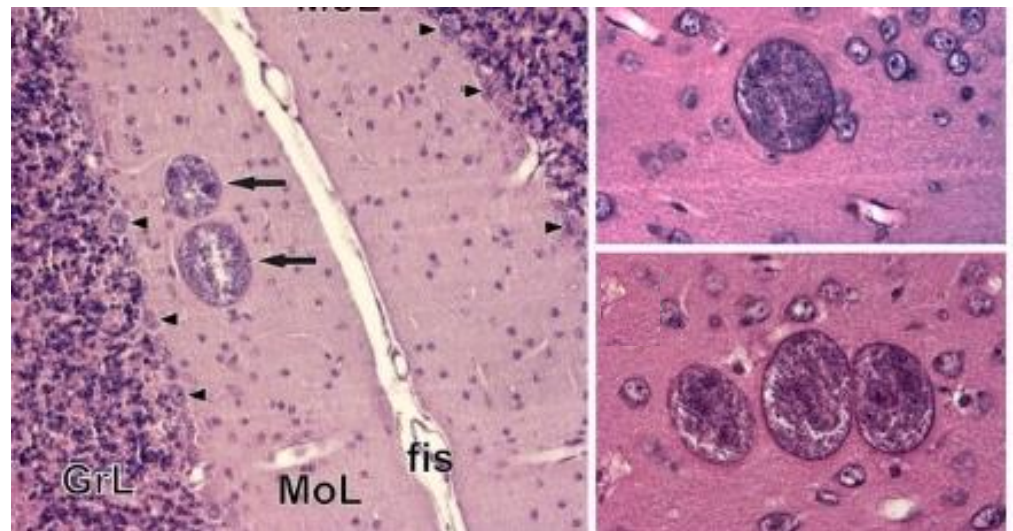
Vývojová stádia *E. tenella*



Toxoplasma gondii

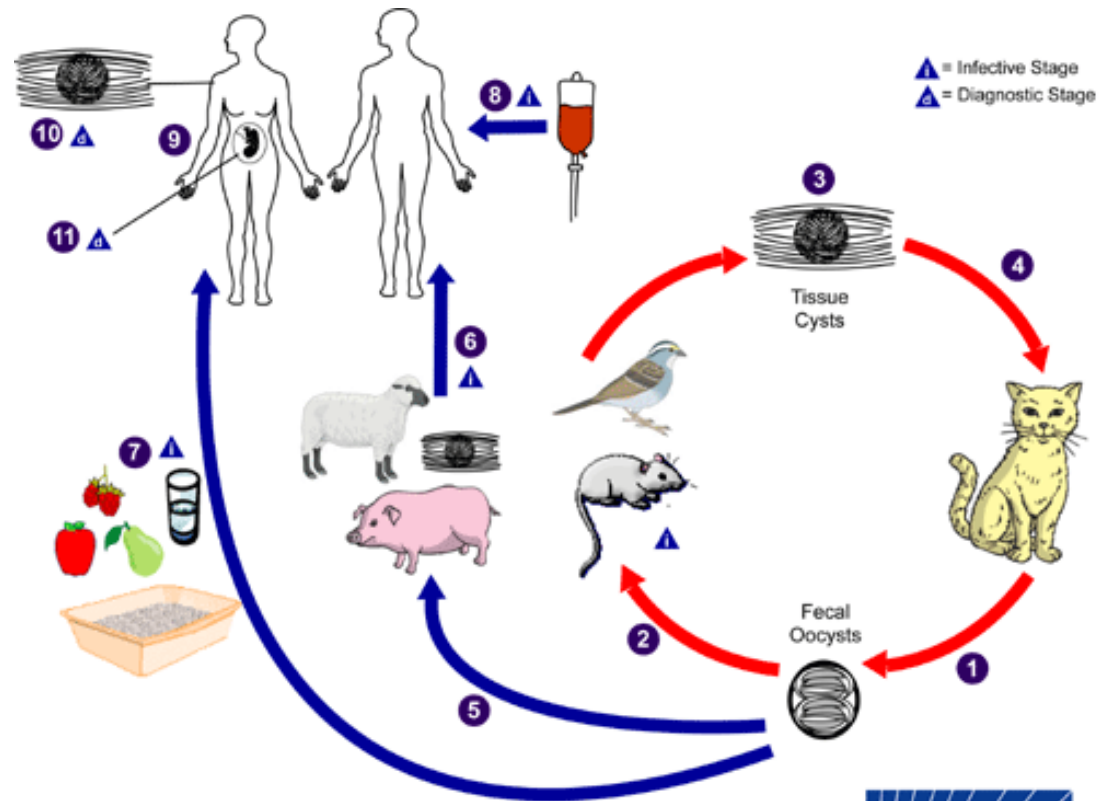
- dvouhostitelští intracelulární paraziti
- kočka (Felidae – jediní známí definitivní hostitelé) – myš a mnoho jiných meziphostitelů včetně **člověka** (u nás cca 30 %)
- zdroj nákazy - nedostatečně tepelně upravené maso nebo potraviny kontaminované trusem nakažených koček, krevní transfúzí a transplantací orgánů, transplacentárně od matky k plodu
- původce onemocnění zvaného **toxoplazmóza** - u člověka průběh podobný chřipce
➔ po odeznění akutní fáze přežívá ve formě tkáňových cyst až do konce života
- **ovlivnění hostitele** - např. zpomalení reakční doby
- infekce během těhotenství – kongenitální toxoplazmóza, těžké poškození plodu
- v ČR nakažena asi 1/3 populace, jinde (např. Francie) téměř 90% populace

tkáňové cysty v mozku chronicky infikovaných myší



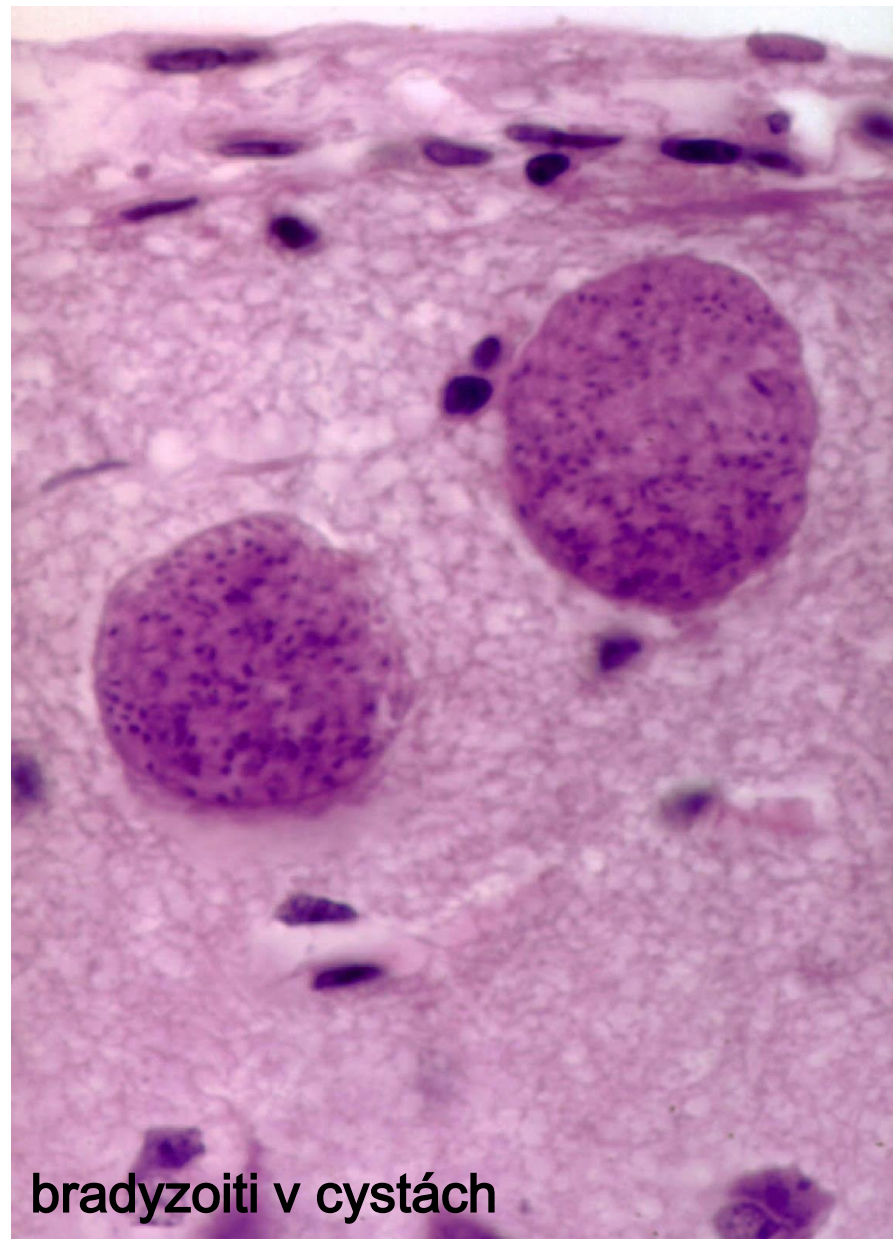
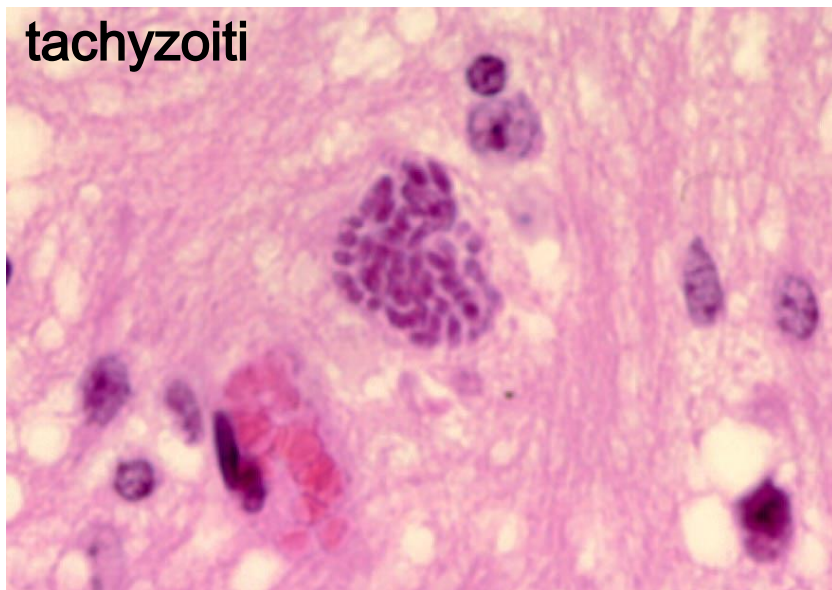
Životní cyklus *T. gondii*

1. Nesporulované oocysty se vylučují s výkaly kočky. Oocysty se vylučují 1–2 týdny, sporulují za 1–5 dní a stávají se infekčními.
2. Mezihostitelé se nakazí požitím kontaminované půdy, vody nebo rostlin.
3. Po požití se oocysty transformují v tachyzoiti invadující nervovou a svalovou tkáň → bradyzoiti v tkáňových cystách.
4. Nákaza kočky konzumací mezihostitelů s tkáňovými cystami. Kočky se mohou nakazit i přímo požitím zralých oocyst.
5. Domácí i volně žijící zvířata se mohou nakazit tkáňovými cystami po požití zralých oocyst.
6. U lidí se tvoří tkáňové cysty, nejčastěji v kosterním svalstvu, myokardu, mozku a v očích; setrvávají i po celý život hostitele.



Vývojová stádia *T. gondii*

tachyzoiti

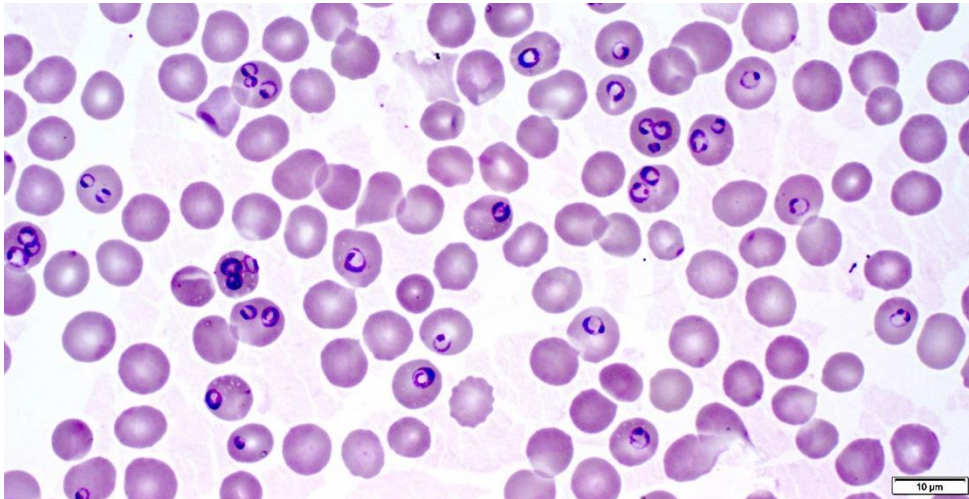


oocysty

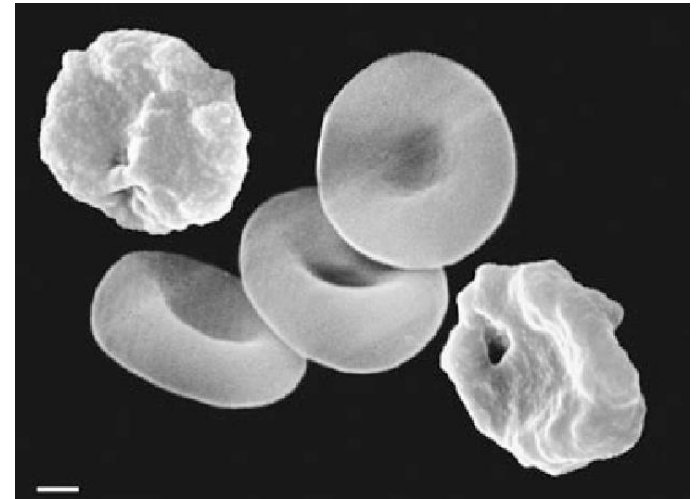
bradyzoiti v cystách

Aconoidasida - Haemospororida

- absence konoidu
- definitivním hostitelem jsou členovci
- nejvýznamnější je lidský patogen *Plasmodium*
 - ✓ 4 nejvýznamnější „lidské“ druhy
 - ✓ přenos komáry rodu *Anopheles*
 - ✓ onemocnění malárie (napadeny stamiliony lidí) → malarické záchvaty způsobeny synchronním rozpadem infikovaných krvinek

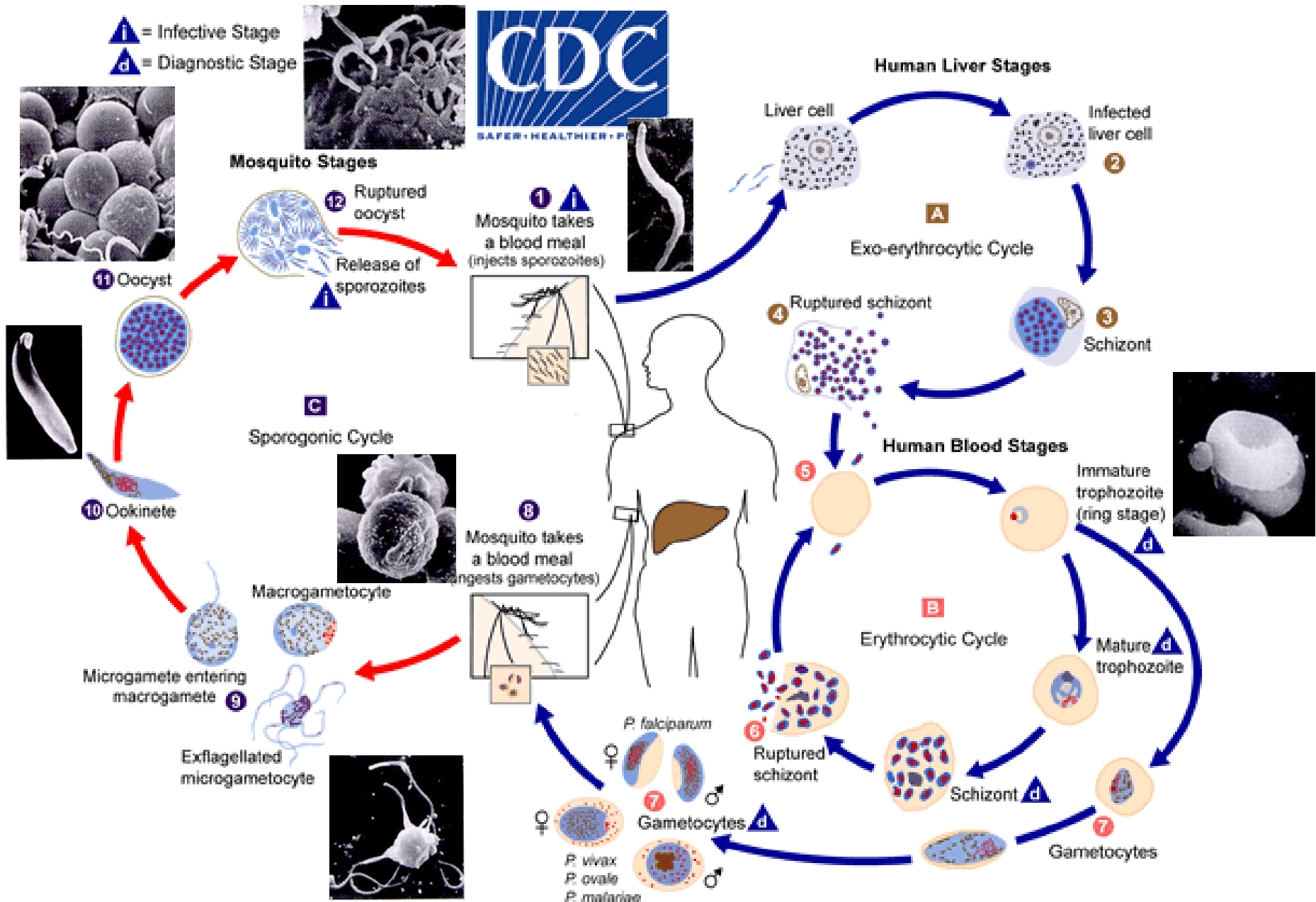


P. falciparum - krevní roztěr

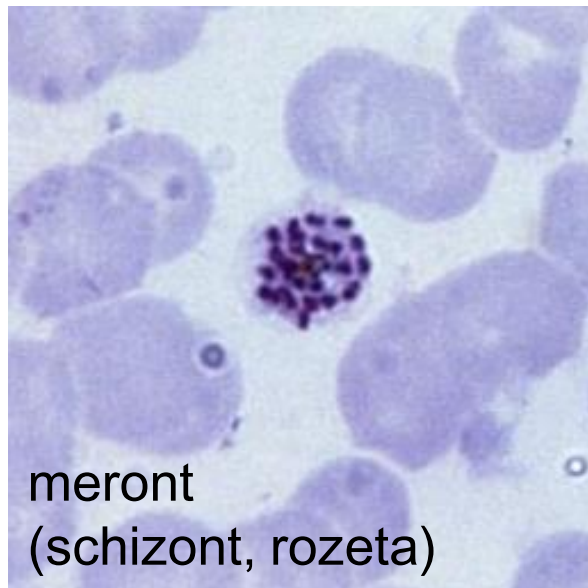
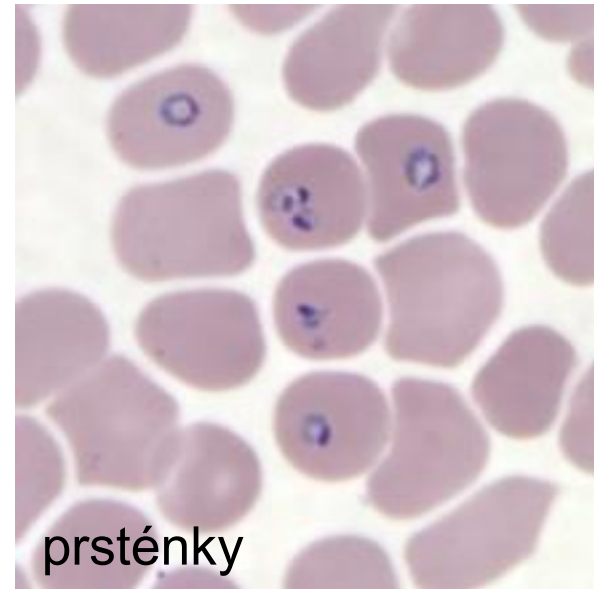


modifikace erytrocytů
infikovaných *P. falciparum*

Životní cyklus *P. falciparum*



Morfologie krevních stádií *P. falciparum*



Protistologická skupina na oddělení parazitologie

Hlavní objekty výzkumu:

- basální Apicomplexa - gregariny, kryptosporidie a nižší kokcidie (mořské)

Cíle výzkumu:

- interakce hostitel-parazit
- strategie invaze parazita a přichycení k hostitelské buňce
- analýza buněčného kortexu a pohybových elementů parazita
- funkční morfologie a ultrastruktura buňky parazita
- aplikace morfologických a imunocytochemických přístupů při studiu fylogenetických vztahů mezi ranými Apicomplexa ⇒ blízká příbuznost gregarin a kryptosporidií !!!

Metodické přístupy:

- kultivace parazitů *in vivo* a *in vitro* (buněčné kultury)
- buněčné suspenze, histologie ⇒ imunoznačení, cyto- a histochemie
- světelná a elektronová mikroskopie
- fluorescenční analýza – konfokální mikroskopie a „live cell fluorescence imaging“ pro sledování buněčných procesů
- biochemická analýza cílových proteinů, molekulárně-biologické postupy

Metody

1. Sběr materiálu vs. experimentální infekce laboratorních zvířat, kultury



např. faunistika prvoků



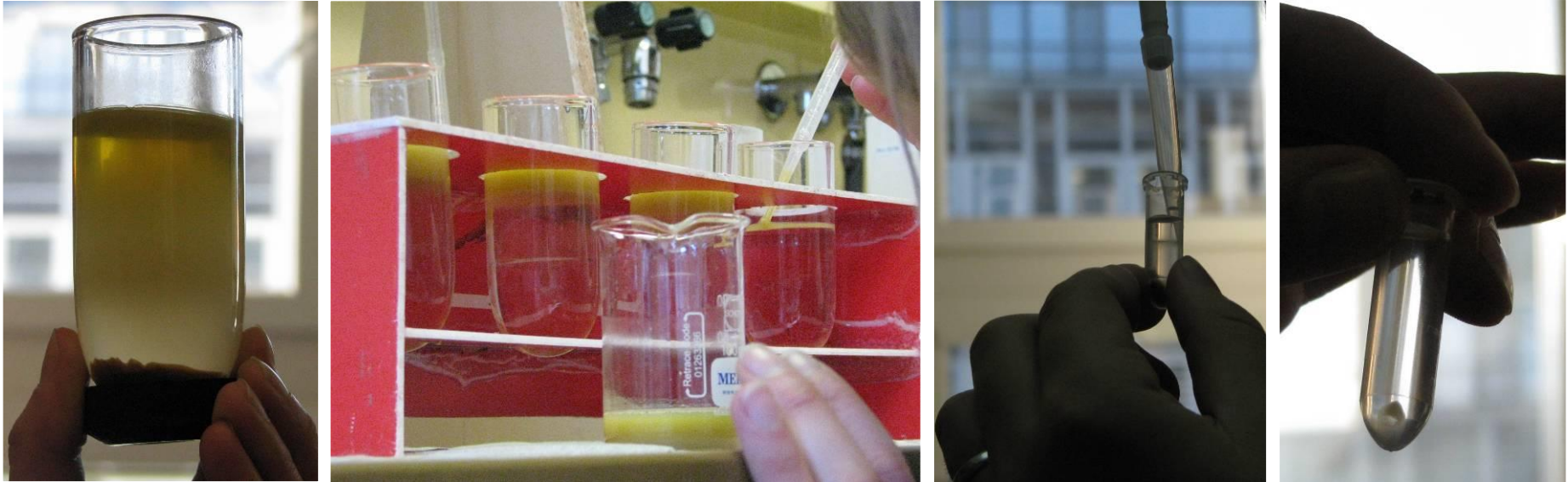
udržování parazita pro experimentální účely

2. Zpracování materiálu

- odběr materiálu (pro histologii, imunofluorescenci, EM, molekulárně - genetické studie,...)
- příprava nativních preparátů
- fixace
- příprava vlhkých nátěrů, roztlaků
- příprava řezových preparátů (poloténkové řezy, ultratenké řezy)
- barvení
- imunologické a biochemické postupy
- molekulární genetika, fylogenetická analýza

Příklad standardních parazitologických postupů

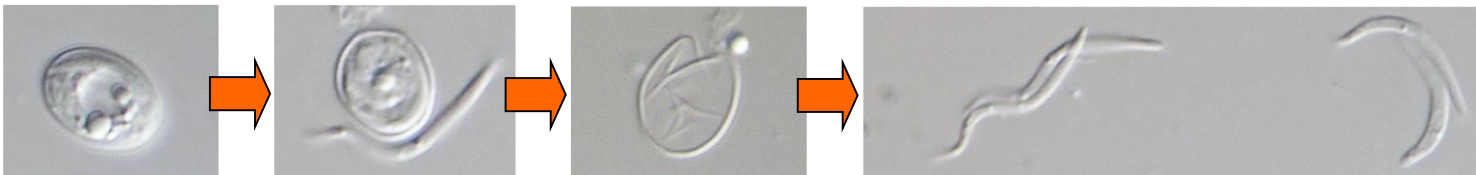
1. flotace - izolace oocyst kryptosporidií z trusu
2. purifikace oocyst



3. experimentální infekce hostitele nebo příprava materiálu pro studie *in vitro*

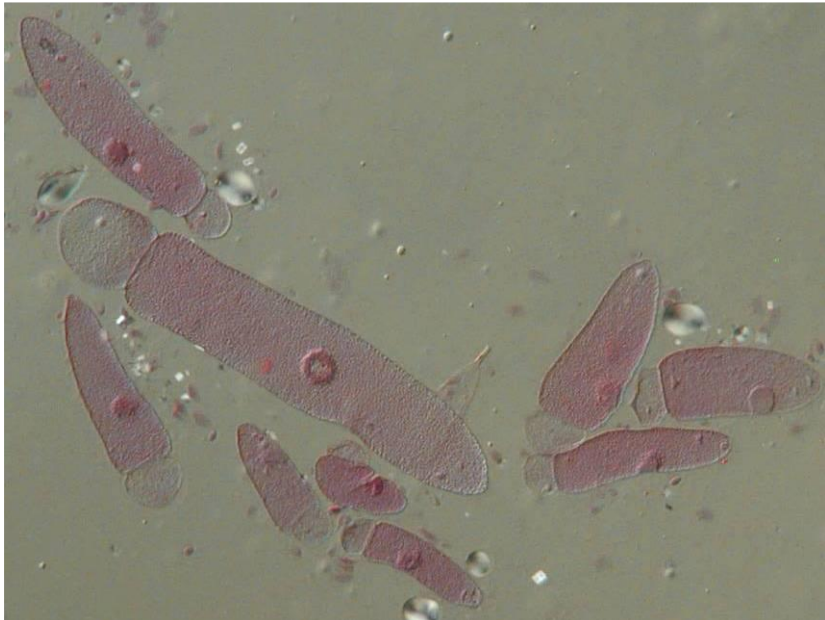
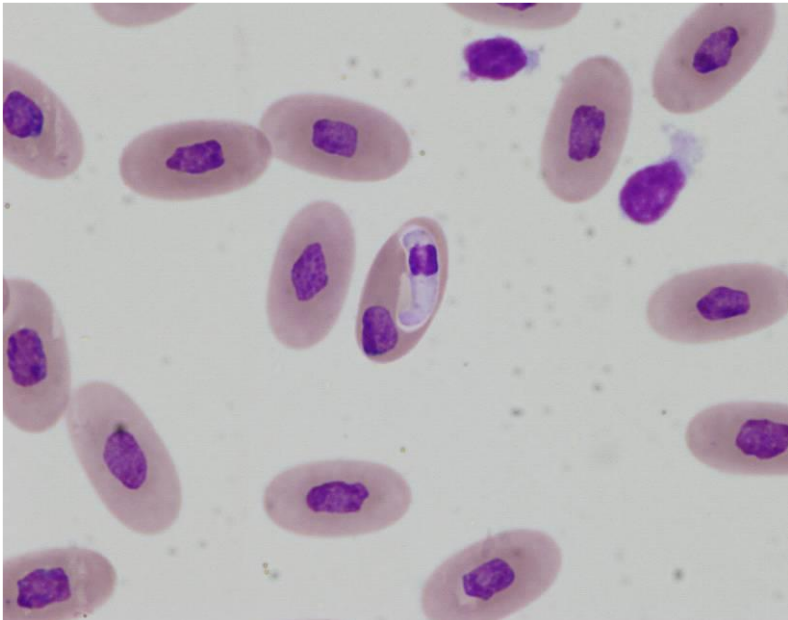
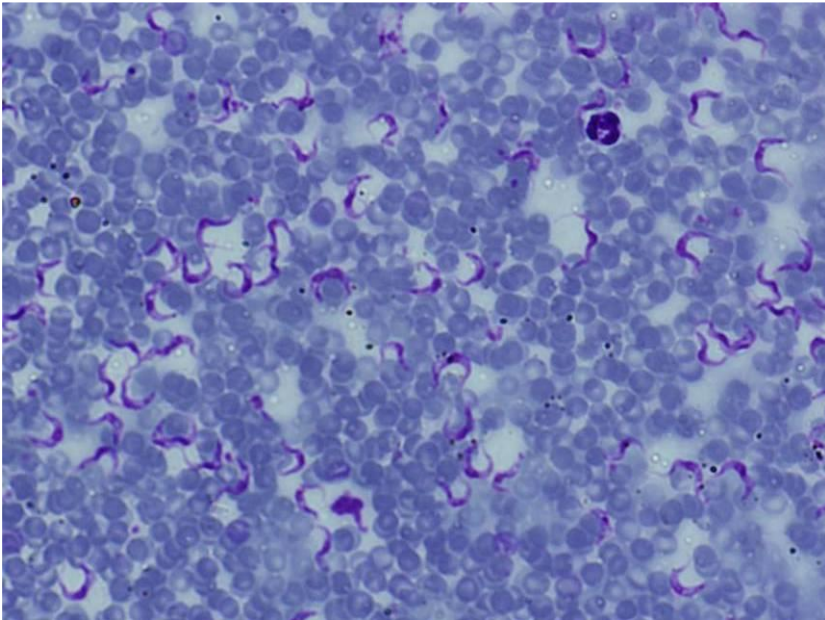
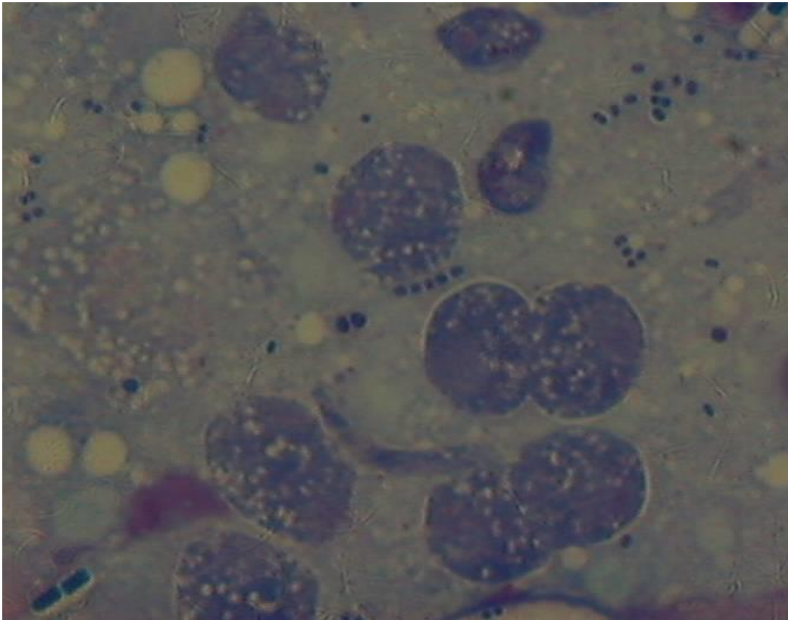
A. pro studie *in vivo* ⇒ pitva a získání materiálu z nakaženého zvířete

B. pro studie *in vitro* ⇒ excystace oocyst a získání inf. sporozoitů pro další postupy



4. fixace a následovné zpracování materiálu

Cytologický preparát



Zpracování tkání - histologie

➤ odběr

➤ fixace

➤ krájení

✓ tkáně prosycené parafínem nebo pryskyřicí

✓ zmrzlé tkáně

➤ barvení

Odběr

❖ Biopsie

- ✓ punkce (nabodnutí tělní dutiny, kloubu, orgánu nebo patologického útvaru za účelem odběr tekutiny)
- ✓ excize (vyříznutí)
- ✓ kyretáž (výškrab)
- ✓ předoperační biopsie (odběr vzorku tkáně tzv. bioptátu k následnému morfologickému vyšetření)

❖ Nekropsie

Postup:

1. oddělení vzorku - velikost tkáňového bločku max. 1 cm²
2. důkladné opláchnutí ve fyziologickém roztoku
3. vložení do fixační tekutiny - ihned po odběru !!!
4. označení vzorků

Fixace

- ❖ rychlá a šetrná denaturace bílkovin bránící autolýze tkání
- ❖ **podmínky fixace**
 - ✓ rychlost - odběr, průnik, velikost vzorku (1 cm², 1 mm²)
 - ✓ zachování struktury
 - ✓ barvitelnost
- ❖ **fixace fyzikální**
- ❖ **fixace chemická**

Fixační tekutiny

- ❖ formaldehyd (4% formaldehyd, neutrální nebo pufovaný)
- ❖ Bouinova (formaldehyd + k. pikrová)
- ❖ Zenkerova (dvojchroman draselný, sublimát, formaldehyd)
- ❖ metacarn (formaldehyd, metanol, voda)
- ❖ Davidson (glycerol, formaldehyd, etanol, voda)
- ❖ AFA (ethanol, formaldehyd, kyselina octová ledová)
- ❖ oxid osmičelý, glutaraldehyd

Parafínové řezy

- odvodnění vzestupnou etanolovou řadou
- projasnění xylenem
- prosycení parafínem
- zalití do parafínu
- krájení na mikrotomu (tloušťka řezu 4-10 μm)
- rotační nebo sáňkový mikrotom
- napínání a lepení řezů na podložní skla



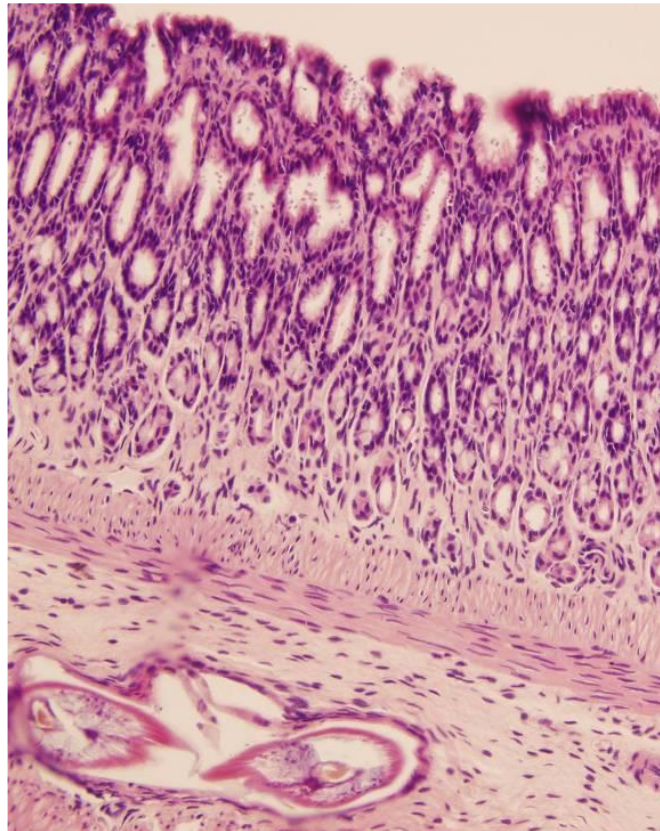
Barvení parafínových řezů HE

- odparafinování – xylen I, xylen II, 100% etanol, 96% etanol, 70% etanol, voda
- barvení hematoxylinem
- praní v tekoucí vodě do zfialovění
- barvení eosinem
- oplach ve vodě – odstranění přebytečného barviva
- odvodnění vzestupnou etanolovou řadou
- projasnění
- montování do kanadského balzámu nebo pryskyřice Damara

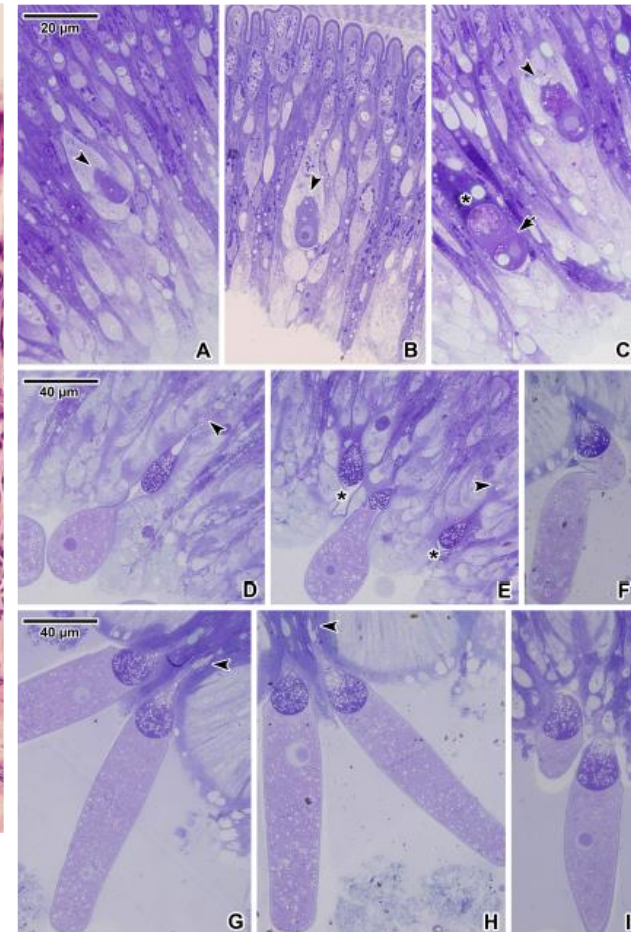
Histologické řezy



histologický řez caeca
sarančete s gregarinami
(hematoxylin-Bešťův
karmin)

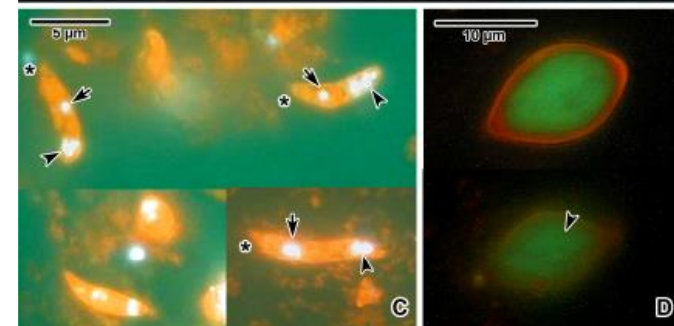
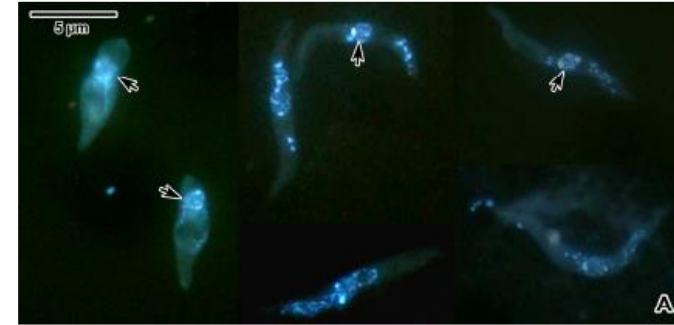
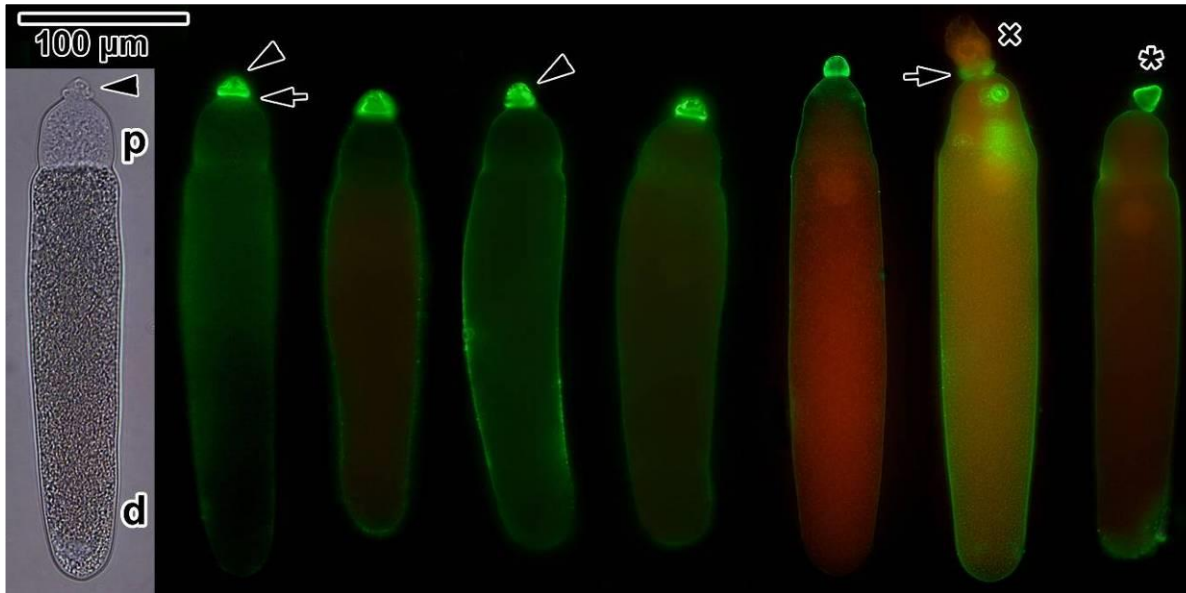


histologický řez žaludkem
ropuchy s kryptosporidiemi
(hematoxylin-eosin)



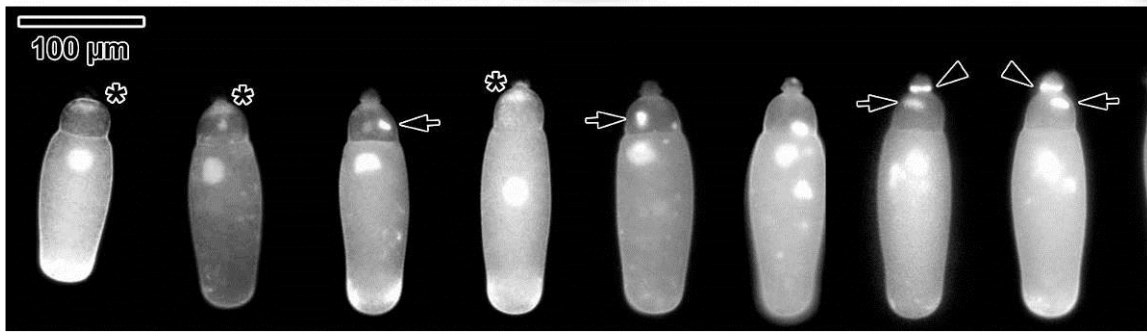
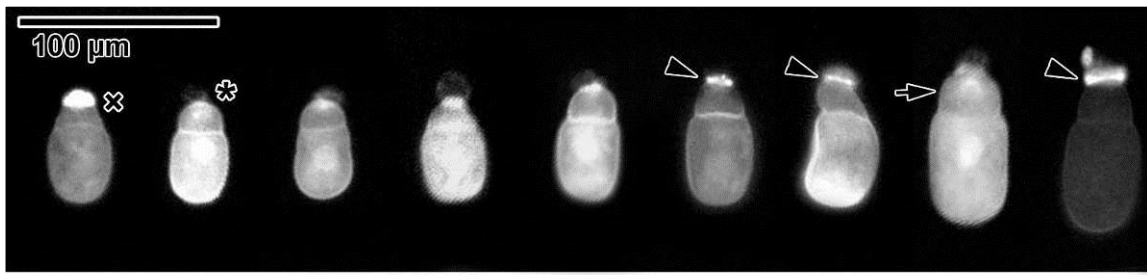
polotenký řez tkáně s
gregarinami (toluidinová
modř)

Imunoznačení, přímé značení a fluorescence



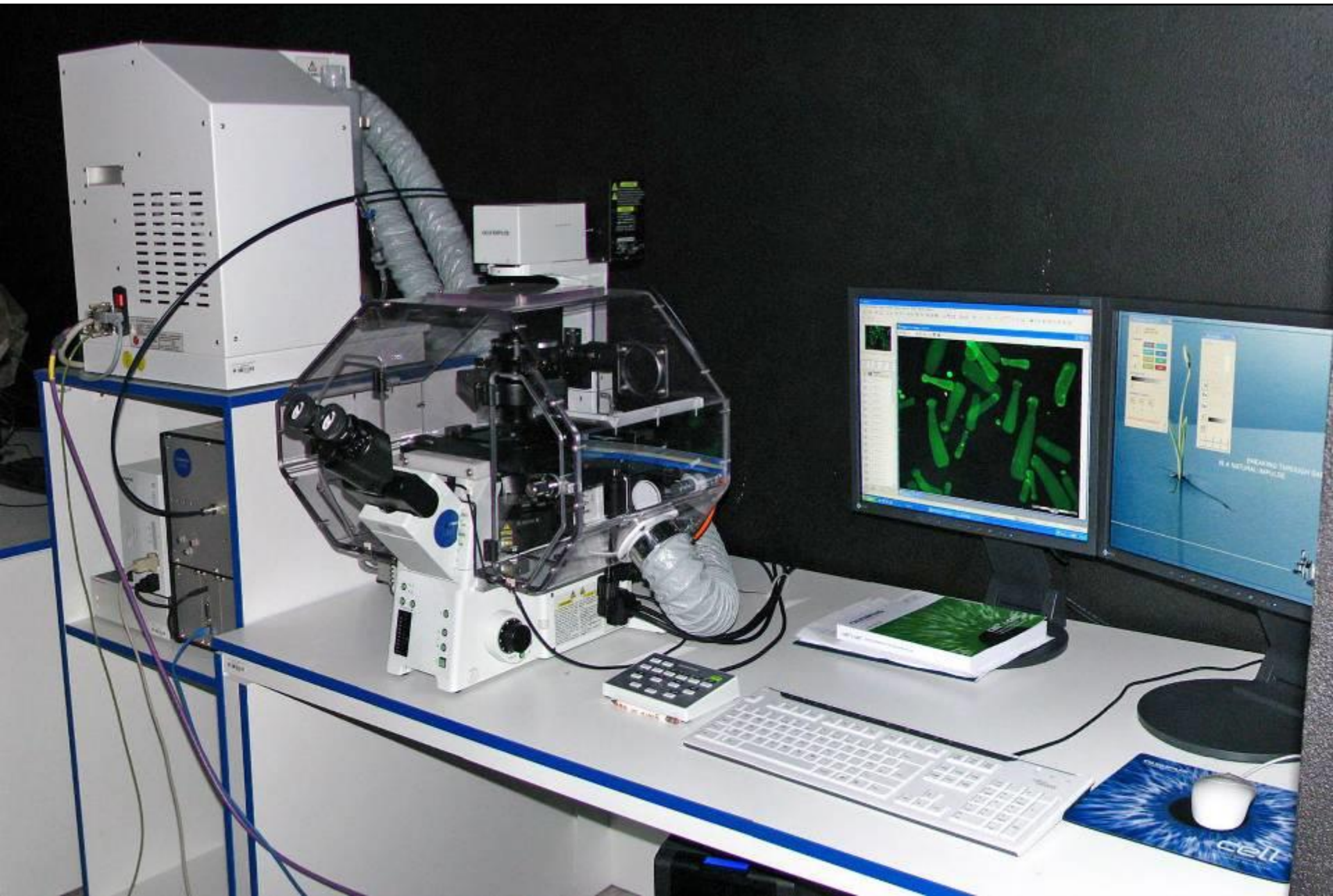
přímé značení nukleových kyselin gregarin pomocí DAPI (A,B) a akridinové oranže (C,D)

nepřímé (imuno)značení myozinu v trofozoitech



přímé značení aktinu v trofozoitech gregarin pomocí FITC-faloidinu

Olympus Cell^R - motorizovaný invertovaný mikroskop se systémem rychlé fluorescence pro sledování procesů v živých buňkách



Postupy pro elektronovou mikroskopii

Transmisní elektronová mikroskopie (TEM)

- fixace
- odvodnění
- zalévání
- krájení ultratenkých řezů
- kontrastování ultratenkých řezů
- prohlížení v TEM



Skenovací elektronová mikroskopie (SEM)

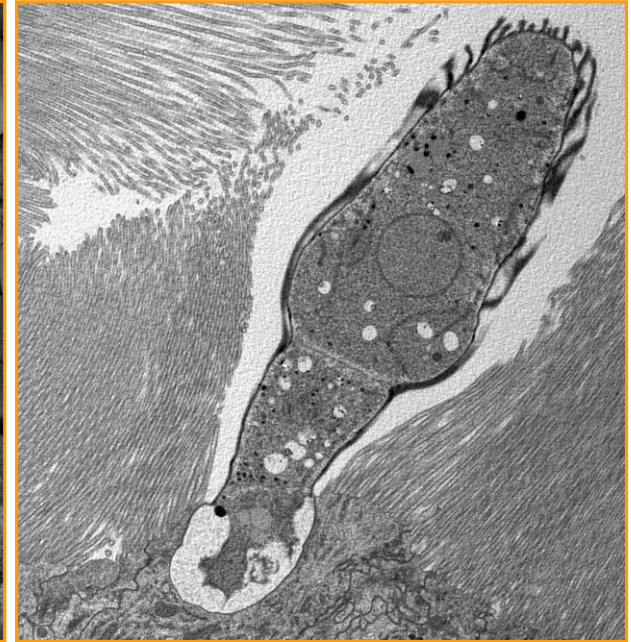
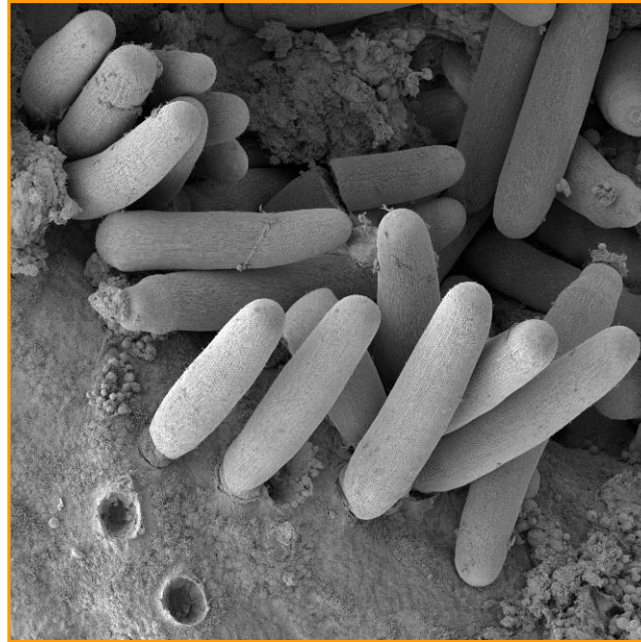
- očištění preparátu
- fixace
- odvodnění
- sušení
- lepení preparátu na terčik
- pokovení preparátu
- prohlížení v SEM

Elektronová mikroskopie

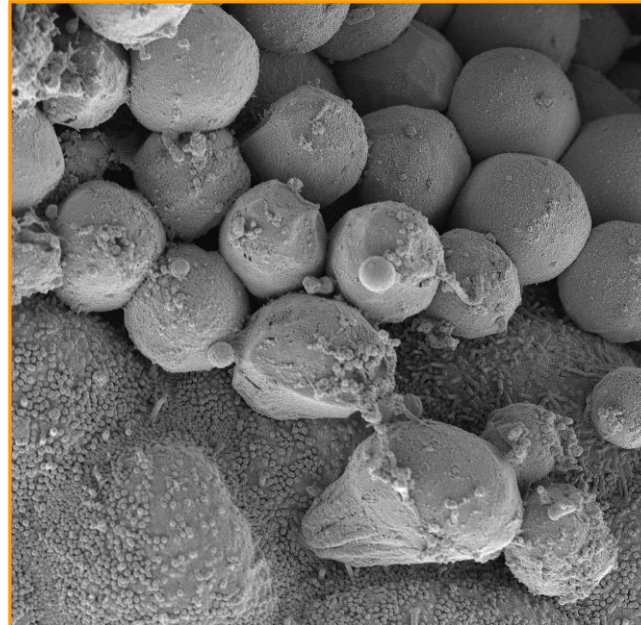
SEM

TEM

Trofozoiti eugregarin
epicelulárně přichyceni k
střevnímu epitelu hostitele
(larvy *Tenebrio molitor*)



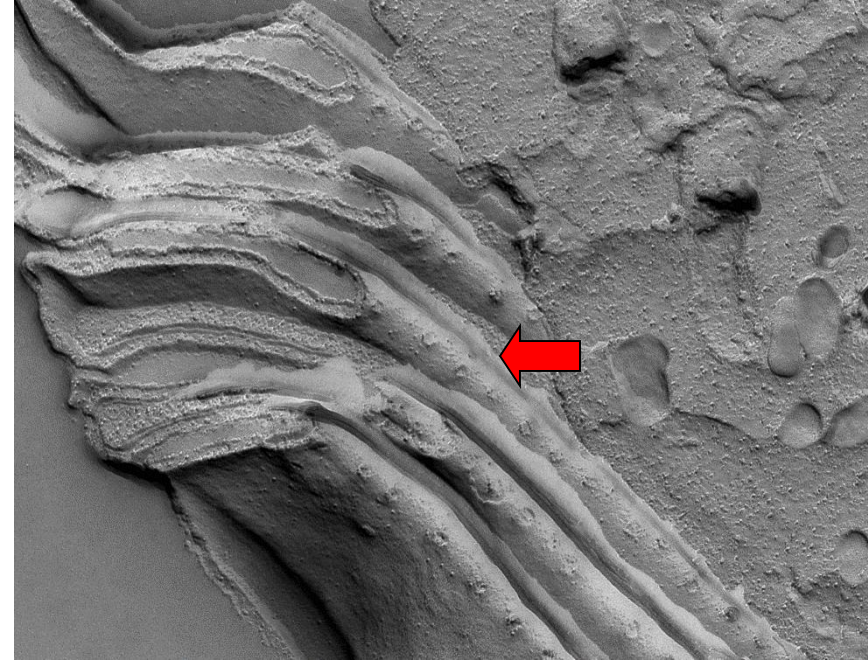
Kryptosporidie epicelulárně
přichyceny k žaludečnímu
epitelu hostitele (exp. infekce
u *Mastomys natalensis*)



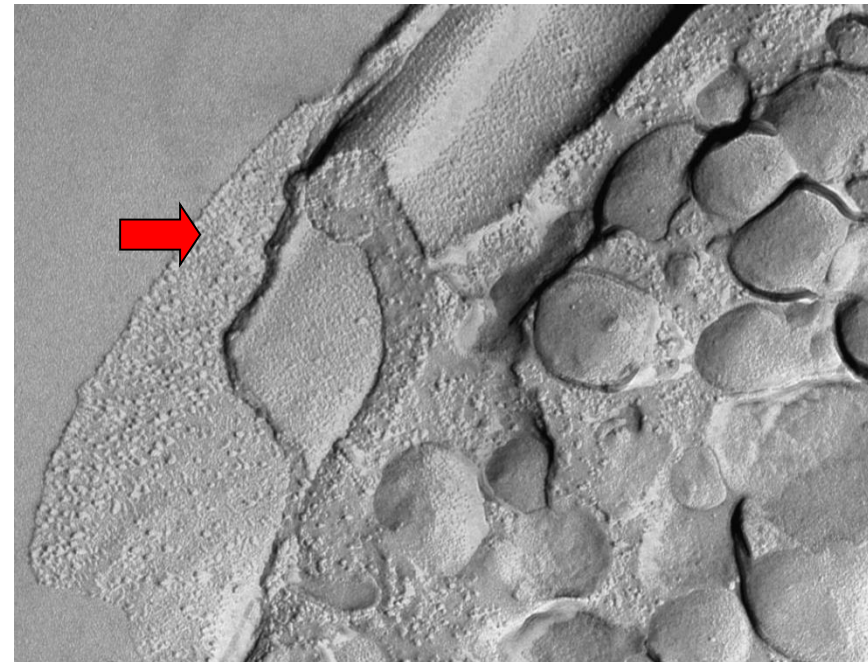
„Freeze fracture“ TEM analýza



tachyzoit *T. gondii* invadující hostitelskou buňku



pelikulární záhyby na povrchu buňky gregarin



Další důležité diagnostické metody v protistologii

Koprologické metody

➤ oocysty kokcidií, ciliata, atd.

1. Přímý nátěr

2. Koncentrační metody:

- flotační metody
- sedimentace
- kvantitativní koncentrační metoda Mc Master

3. Kvantitativní metody

- počítání v komůrce (s definovaným naředěním dle potřeby) – např. Cyrusova a Fuchs-Rosenthalova komůrka
- flotace a sedimentace standardního objemu (nepřesné díky snížené záchytnosti)

4. Barvení v koprologii