

PARAZITÉ Z BLÍZKA

Mgr. Kateřina Mikešová, UK v Praze, PřF, katedra učitelství a didaktiky biologie

METODICKÉ POKYNY

Cíle

Na konci cvičení žák:

- uvede alespoň 3 druhy motolic
- popíše a vysvětlí dvouhostitelský a tříhostitelský životní cyklus motolic
- zakreslí a charakterizuje jednotlivá životní stádia motolic na základě vlastního pozorování pod mikroskopem
- zakreslí a popíše vnější stavbu (morfologii) vybraných typů motolic
- pozoruje a zakreslí hemocyty, vysvětlí jejich funkci

Opěrné pojmy

motolice, životní cyklus, definitivní hostitel, mezihostitel, fototaxe, geotaxe

Materiál

úkol 1: vodní plži (nejlépe plovatka bahenní (*Lymnaea stagnalis*) nebo jiní zástupci čeledi plovatkovití (Lymnaeidae)) vylučující cercárie motolic

Jak materiál zajistit

1. Larvy motolic: Plovatka bahenní je jedním z našich nejhojnějších a největších druhů vodních plžů, vyskytujícími se ve stojatých vodách (zejména rybníky), který je velmi často nakažen larvami motolic. Infikované plže nalezneme jen na lokalitě, kde se zároveň vyskytují i vodní ptáci, zejména z řádu vrubozobých (důležité pro dokončení cyklu parazita). Sběr provádíme ručně s pomocí sítky z vodní vegetace (nejčastěji) nebo vodní hladiny. Infikovaní jsou pouze starší a tedy větší jedinci, parazit růst ještě podporuje (tzn. infikovaní jedinci jsou často větší než zdraví plži). Plže přenášíme v plastové nádobce s minimem vody (jedná se o plicnaté plže, kteří dýchají atmosférický kyslík a bez vody se tedy nějakou dobu obejdou). Po příchodu na pracoviště plže vyšetříme – do průhledných nádobek (nejlépe skleněných) nalijeme odstátou vodu, vložíme plže a postavíme pod zdroj světla (stačí lampička). Pokud je plž nakažen, začnou cercárie vyplouvat do vnějšího prostředí. Pokud plž cercárie ani za hodinu nevylučuje, pak buď není nakažen, nebo je v tzv. prepatentní periodě (nakažen je, ale cercárie se ještě nevyvinuly). Nejlépe a nejčastěji vylučují nakažení plži sebraní od konce května do konce října. Nákaza je doživotní.

Nakažené plže lze pro účely laboratorních cvičení krátkodobě přechovávat v plastových kádinkách, dlouhodobě pak v klasickém akváriu se vzduchováním. Jako krmivo se osvědčil hlávkový salát.

V zimních a jarních měsících je možné získat laboratorní plže *Lymnaea stagnalis* nakažené ptačími krevničkami (schistosomami) rodu *Trichobilharzia* z chovů katedry parazitologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Pro více informací kontaktujte Dr. L. Mikeše (mikes@natur.cuni.cz).

Při manipulaci s plži vždy používejte ochranné rukavice!!

Pomůcky

úkol 1: binokulární lupa, mikroskop, kádinky, lampičky, Pasteurova pipeta, ochranné rukavice, podložní a krycí skla, tužka, hodinová skla, Erlenmeyrovy baňky, alizarin, lithium karmin, 70% etanol

Instrukce k bezpečnosti práce

Upozorněte žáky na dodržování bezpečnosti práce během laboratorního cvičení, především při manipulaci s živými cercáriemi. Vždy používejte ochranné rukavice. Ačkoliv ptačí schistosomy nemohou člověka ohrozit na zdraví, ani na životě, je zapotřebí dbát na to, aby nedošlo k dlouhodobému kontaktu kůže nebo sliznic s vodou, v níž se vyskytují cercárie (např. ponoření ruky do vody, náhodné vypití). Při delším kontaktu s cercáriemi může dojít ke vzniku nepříjemné vyrážky. V případě náhodného krátkodobého kontaktu lze nejspíše zamezit jejich proniknutí do kůže omytím postižené části těla teplou vodou a mýdlem.

Barvení penetračních žláz provádí vždy pedagog, žáci dostanou až obarvené cercárie.

Časová náročnost

85 min. Počet úloh je možné přizpůsobit časovým podmínkám a schopnostem studentů.

Literatura

Mikeš L.: Simplified determination key: Cercariae. 1st Workshop on bird schistosomes and cercarial dermatitis, 10th- 14th September 2001, Dolní Věstonice, Czech Republic
Volf P., Horák P. a kol.: Paraziti a jejich biologie. Triton, 2007, 1. vydání, ISBN: 978–80-7387–008-9

LARVY MOTOLIC

Motolice jsou výhradně endoparazité obratlovců, včetně člověka. Mají složité vývojové cykly zahrnující jednoho i více mezipostitelů a střídání pohlavního i nepohlavního rozmnožování. Velké množství larválních stádií, vzniklých z jednoho vajíčka, umožňuje parazitům namnožit se do velkého množství a získat tak šanci infikovat definitivního hostitele, což se povede jen zlomku z nich. Nejlépe pozorovatelná jsou volně pohyblivá stádia, zejména cercárie, které jsou vylučovány vodními plži.

Úkol 1.1: Životní stádia motolic (5 minut)

Popište životní cyklus libovolné motolice, označte mezipostitele a definitivního hostitele

Životní stádia motolic ve vývojovém cyklu: dospělec – miracidium – mateřská sporocysta – dceřinná sporocysta nebo redie – cercárie – metacercárie (v případě tří a vícehostitelského cyklu) – schistosomula - dospělec

např. **krevnička močová** (*Schistosoma haematobium*): dvouhostitelský cyklus, mezihostitelem plž (*Bulinus* sp.). Cerkárie aktivně vyhledává a proniká do definitivního hostitele např. člověk.

Motolice jaterní (*Fasciola hepatica*): dvouhostitelský cyklus, mezihostitelem plž (např. *Galba* sp.). Cerkárie se encystují na vegetaci, s kterou jsou pozřeny definitivním hostitelem např. jelenovití a turovití savci).

Motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum*): tříhostitelský cyklus, mezihostitelem suchozemský plž, 2. mezihostitelem mravenec, který je pozřen definitivním hostitelem např. ovce.

Úkol 1.2: Pohyb cercárií (15 minut)

Cerkárie jsou volně pohyblivá životní stádia motolic. Pohyb cercárií jednotlivých druhů motolic má jak znaky společné, tak rozdílné, na jejichž základě můžeme jednotlivé typy cercárií odlišit. Pozorujte živé cercárie nejprve v kádince a poté pod binokulární lupou, popište způsob jejich pohybu.

Postup: cercárie nejprve pozorujeme v kádince (pohyb bez stimulu, otřes, světlo). Následně z kádinky, ve které je umístěn infikovaný plž odeberte Pasteurovo pipetou vzorek vody s cercáriemi. Vzorek dejte na Petriho misku a pozorujte pod binokulární lupou na největší zvětšení.

Cerkárie se volně pohybují ve vodním sloupci, případně jsou přisáté ke stěně skleničky. Při otřesu plavou směrem nahoru k vodní hladině (negativní geotaxe), při působení světlem plavou k jeho zdroji (pozitivní fototaxe).

Po přemístění cercárií na Petriho misku cercárie buď volně plavou, nebo se přisají ke stěně a následně se pomalu pohybují (smršťování a natahování, zapojení ústní a břišní přísavky) případně sebou nepřisáté cercárie rychle kmitají a vytvářejí dojem pohybujícího se klubíčka.

Úkol 1.3: Morfologie a určování cercárií (20 minut)

Cerkárie jednotlivých druhů motolic se od sebe liší morfologií. Jejich vnější vzhled je natolik typický a odlišný od dospělců, že byly dlouho považovány za samostatné druhy. Vaším úkolem je určit (podle obrázku č. 1) typ cercárie vyskytující se ve Vašem vzorku. Zakreslete a popište tělní stavbu s využitím následujících pojmů (použijte pojmenování jen těch struktur, které vlastní vaše cercárie): ústní přísavka, břišní přísavka, tělíčko, ocásek, furka (rozdvojený konec ocásku), stylet (bodcovitý útvar v ústní přísavce), oční skvrny, ostnitý límec (v přední části tělíčka).

Postup: pod lupou odeberte ze vzorku několik cercárií (stačí 2 – 4), kápněte je na podložní sklíčko a přikryjte sklíčkem krycím. Preparát pozorujte pod mikroskopem na

největší možné zvětšení (ideálně 100x, při použití imerzního oleje, ale lze i při zvětšení 40x).

Použití laboratorní plži nakažení ptačí krevničkou rodu *Trichobilharzia*. Furkocerkárie:

a) tělo: světločivné pigmentové skvrny, ústní a břišní přísavka. b) ocásek: furka.

Alternativně lze nasbírat plže v přírodě. Před konáním praktik zjistíme, co plži vylučují (nejčastější typy cercárií jsou echinostomy, xiphidiocerkárie, furkocerkárie). Pokud mají furkocerkárie zahnutý ocásek o 90⁰, jedná se o rod *Diplostomum*, pokud jsou přítomné oční skvrny pak o rod *Trichobilharzia* (vzhled a stavba cercárií viz. obrázek 1). Studenty pak rozdělíme do skupin, každá skupina má svůj vzorek, cílem je determinovat cercárie dle přiloženého obrázku.

Úkol 1.4.: Barvení penetračních žláz cercárií (25 minut)

K aktivnímu průniku do definitivního hostitele pomáhá cercáriím obsah dvou typů žlázek umístěných uvnitř těla. Tyto žlázy obsahují různé proteolytické enzymy usnadňující průnik do tkání hostitele. Žlázy se dají obarvit histologickými barvami. Vaším úkolem je pozorovat obarvené cercárie resp. jejich žlázy (dvěma typy barviv) pod mikroskopem, zakreslit a na základě pozorování rozhodnout, které žlázy jsou circumacetabulární (umístěné kolem břišní přísavky) a které postacetabulární (umístěné za břišní přísavkou).

Postup: na barvení circumacetabulárních žláz použijeme alizarin, postacetabulární žlázy obarvíme lithium karmínem.

a) barvení alizarinem: alizarin připravíme jako nasycený vodný roztok povařením, poté ředíme vodou na cca 2% roztok. Circumacetabulární žlázy barvíme přikápnutím roztoku alizarinu k živým cercáriím (použít hodinové sklo), barvíme cca 3 minuty, následně přeneseme na podložní sklo a pozorujeme zaživa.

b) barvení lithium karmínem: roztok lithium karmínu připravíme ze 100ml nasyceného vodného roztoku uhličitanu lithného za laboratorní teploty, ve kterém následně rozpustíme 2,5g karmínu. Postacetabulární žlázy barvíme u cercárií fixovaných v 70% etanolu (cercárie nalijeme do hodinového skla, přidáme nadbytek etanolu a 2 minuty fixujeme. Poté nadbytečnou kapalinu odsajeme pipetou a přidáme roztok lithium karmínu, barvíme cca 3 minuty).

Obrázek 2: Zobrazení penetračních žláz cercárií. Růžově znázorněny circumacetabulární, zeleně postacetabulární žlázy. (Ligasová et al. 2011: Secretory glands in cercaria of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti* - ultrastructural characterization, 3-D modelling, volume and pH estimations. Parasites&Vectors 4:162, upraveno)



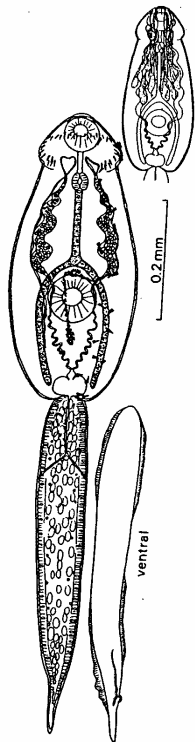
Úkol 1.5: Hemocyty, obránci plžů (20 min.)

Měkkýši, stejně jako ostatní bezobratlí mají svůj imunitní systém, který je založen pouze na ochranných buňkách, které se nazývají hemocyty. Vaším úkolem je hemocyty pozorovat pod mikroskopem, zakreslit a pokusit se popsat pravděpodobný způsob, jakým likvidují parazity.

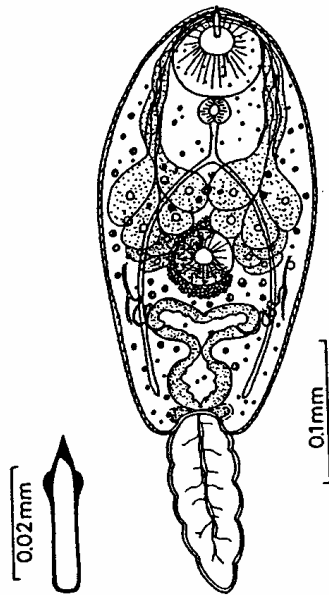
Postup: z plže odebereme hemolymfu (dráždit plže na noze, jako reakce na podnět je vypouštění hemolymfy z hemálního póru. Jedná se o neinvazivní metodu. Hemolymfu nasáváme Pasteurovo pipetou a rovnou kapeme žákům na sklíčka. Pozorujeme na co největší zvětšení, ideálně na 100x, s fázovým kontrastem a imerzí).

Hemocyty jsou buňky vnitřního obranného systému plžů. Menší cizorodé částice fagocytují, větší obklopí, naruší ochrannou membránu a vetřelce zničí (tzv. enkapsulace).

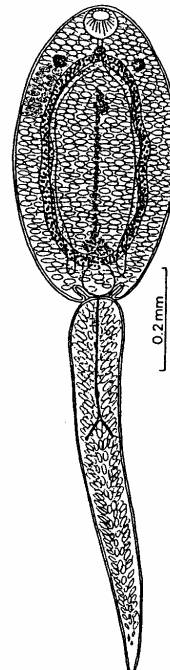
Obrázek 1 (k úkolu 1.3.): Morfologické typy cercárií (dle Mikeš L. (2001): Simplified determination key: Cercariae)



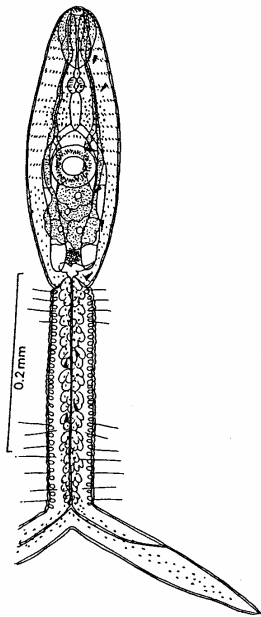
Echinostomní cercárie:
otrněný límec, např.
Echinostoma revolutum



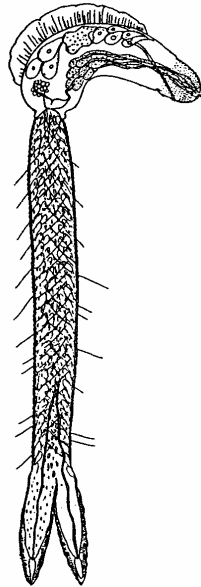
xiphidiocerkárie:
charakteristický stylet (viz.
detail) v ústní přísavce např.
Plagiorchis sp.



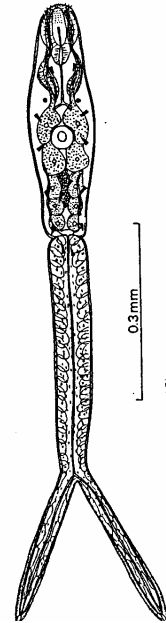
Monostomní cercárie: jen
ústní přísavka, břišní chybí
např. *Notocotylus* sp.



furkocerkárie: bez světločivných skvrn, např. *Diplostomum* sp.



furkocerkárie: s ploutevním lemem, *Sanguinicola* sp.



furkocerkárie: se světločivnými skvrnami, *Trichobilharzia* sp.