

MAGISTERSKÁ DIPLOMOVÁ PRÁCE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH



Endogenní vývoj králičí kokciémie *Eimeria exigua*

Vypracovala: Bc. Alena Jelínková

Vedoucí práce: RNDr. Michal Pakandl, CSc

České Budějovice, 2008

Jelínková, A., 2008: Endogenní vývoj králičí kokciémie *Eimeria exigua*. [Study of endogenous development the rabbit coccidium *Eimeria exigua*. Mgr.Thesis, in Czech] – 41 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: The endogenous development of the rabbit coccidium *Eimeria exigua* was studied by light and electron microscopy in coccidia-free rabbits.

Tato práce je součástí řešení projektu financovaného grantem GAČR Reg. č. 524/05/2328 a BC AVČR v.v.i., 260220518.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 8b, v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě - v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne

Jelínková Alena

Ráda bych poděkovala především svému školiteli RNDr. Michalovi Pakandlovi, CSc. za odborné vedení, trpělivost a čas, který mi věnoval při této práci.

Děkuji také všem, kteří se jakkoli podíleli na této práci, zejména svým rodičům a blízkým přátelům za jejich morální podporu a vynaložené úsilí.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	2
2.1. Rod <i>Eimeria</i>	2
2.2. Ultrastruktura.....	2
2.3. Životní cyklus.....	2
2.3.1. Excystace	3
2.3.2. Merogonie.....	3
2.3.3. Gamogonie.....	5
2.3.4. Formování stěn oocyst.....	6
2.3.5. Sporogonie.....	6
2.4. Hostitelská specifita.....	6
2.5. Patogenita.....	7
2.6. Prevence.....	8
2.7. Endogenní vývoj 11 druhů králičích kokcií.....	9
2.7.1. <i>Eimeria stiedai</i> (Clindemann, 1865) Kisskalt a Hartmann, 1907.....	9
2.7.2. <i>Eimeria perforans</i> (Leuckart, 1879) Sluiter a Swellengrebel, 1912.....	10
2.7.3. <i>Eimeria magna</i> Pérard, 1925.....	10
2.7.4. <i>Eimeria media</i> Kessel, 1929.....	11
2.7.5. <i>Eimeria irresidua</i> Kessel a Jankiewicz, 1931.....	11
2.7.6. <i>Eimeria piriformis</i> Kotlán a Pospesch, 1934.....	12
2.7.7. <i>Eimeria exigua</i> Jakimoff, 1934.....	12
2.7.8. <i>Eimeria flavescens</i> Marotel a Guilhon, 1941.....	13
2.7.9. <i>Eimeria coecicola</i> Chejsin, 1947.....	13
2.7.10. <i>Eimeria intestinalis</i> Chejsin, 1948.....	14
2.7.11. <i>Eimeria vej dovskyi</i> Pakandl, 1988.....	15
3. MATERIÁL A METODY.....	16
3.1. Hostitelský organismus.....	16
3.2. Parazit – <i>Eimeria exigua</i>	16
3.3. Sběr a purifikace oocyst.....	16
3.4. Sporulace.....	17
3.5. Inokulace králíků.....	17
3.6. Histologie.....	18

3.7. Transmisní elektronová mikroskopie.....	18
4. VÝSLEDKY.....	20
4.1. Endogenní vývoj <i>Eimeria exigua</i>	20
4.1.1. Přehled asexuálních generací.....	20
4.1.2. Gamogonie.....	21
4.1.3. Oocysty.....	21
5. DISKUZE.....	23
6. ZÁVĚR.....	26
7. LITERATURA.....	27
8. PŘÍLOHA.....	32

1. ÚVOD

U králíka domácího (*Oryctolagus cuniculus*) bylo dosud platně popsáno 11 druhů kokcií. U deseti druhů: *Eimeria stiedai*, *E. perforans*, *E. magna*, *E. media*, *E. irresidua*, *E. piriformis*, *E. flavescens*, *E. coecicola*, *E. intestinalis*, *E. vejnovskyi* byl jedním nebo více autory popsán jejich životní cyklus. U *E. exigua* byla popsána morfologie oocyst, doba sporulace, míra patogenity, ale endogenní vývoj této kokcií dosud charakterizován nebyl.

Cílem této práce je studium endogenního vývoje *E. exigua*: lokalizace, morfologie a ultrastruktura endogenních stádií a jejich časová souslednost včetně určení počtu asexuálních generací.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Rod *Eimeria*

Rod *Eimeria* patří do kmene nazvaného Levinem (1973) Apicomplexa. Tento monofyletický kmen zahrnuje organismy adaptované na vnitro(epi)buněčný způsob života. Členy této velké heterogenní skupiny spojuje přítomnost unikátního tzv. apikálního komplexu, což je soubor organel nacházejících se v přední části nepohlavních stádií, sporozoitů a merozoitů. Apikální komplex je u různých skupin více či méně vyvinut a umožňuje těmto parazitům průnik do hostitelských buněk.

2.2. Ultrastruktura

Apikální komplex je tvořen funkčně odlišnými organelami: mezi tzv. skeletární patří prekonodiální prstence, konoid, polární prstence, subpelikulární mikrotubuly. Povrch sporozoitů a merozoitů je složen ze tří membrán a nazývá se pelikula. Vnější membrána je souvislá a obklopuje celou buňku, zatímco další dvě membrány nejsou přítomny v oblasti polárních prstenců a cytostomu. Na předním pólu z prstence vycházejí podélné mikrotubuly, které jsou uloženy pod pelikulou. U merozoitů *Eimeria stiedai* a *E. perforans* se nachází 24 mikrotubulů (Scholtyssek a Piekarski 1965) u *E. intestinalis* 24-30 mikrotubulů (Chejsin a Snigirevskaja 1965) a u *E. magna* 26 mikrotubulů (Sénaud a Černá 1969). Konoid se skládá ze spirálně stočených fibril a má tvar komolého kužele. V přední části konoidu se nachází prekonodiální kruhy. Sekretorickou funkcí se vyznačují rhoptrie a mikronemy procházející konoidem a ústící v přední části buňky. Dalšími sekretorickými organelami jsou denzní granula, které upravují prostředí a povrch parazitoforní vakuoly. V cytoplasmě se také vyskytují amylopektinová granula, lipidické inkluze, mitochondrie, Golgiho aparát, endoplasmatické retikulum a jádro s jadérkem. U eimerií byla objevena jako u řady jiných protist organela ohraničená čtyřmi membránami, která byla nazvána apikoplast.

2.3. Životní cyklus

Vývojové cykly apikomplex se odehrávají v jednom i více hostitelích. *Toxoplasma*, *Plasmodium* a *Sarcocystis* jsou nejznámější heteroxenní parazité, kteří potřebují k dokončení svého vývoje jak definitivního hostitele tak i mezihostitele, ve kterém uskutečňuje část svého vývoje. Rod *Eimeria* patří mezi monoxenní kokcidie vyvíjející se pouze v jednom hostiteli. Zpravidla jsou přísně hostitelsky specifické. Ve vývojovém

cyklu monoxenních kokcií se část vývoje odehrává ve vnějším prostředí, kde dochází ke sporulaci oocyst (sporogonii) a druhá část v hostiteli, kdy po uvolnění a vniknutí sporozoitů do vhodných tkání následuje nepohlavní množení (merogonie) a poté pohlavní množení (gamogonie). U apikomplex diploidní část cyklu začíná oplozením makrogamety a končí sporulací oocysty. Proto všechna stádia kromě oplodněné makrogamety (zygoty) jsou haploidní (Cornelissen a kol. 1984).

2.3.1. Excystace

Po pozření oocysty hostitelem dochází ve střevě k uvolnění infekčních sporozoitů, excystaci. Tento proces je nespecifický, k excystaci může dojít i v hostiteli cizím, kde ale nedochází k uskutečnění celého životního cyklu parazita. Excystace zahrnuje dva základní stimuly (Fernando 1990). Prvním stimulem je oxid uhličitý a redukční prostředí. Druhým je trypsin rozpouštějící stědovo tělísko a žlučové soli ovlivňující pohyblivost sporozoitů. Studium sporozoitů různých druhů eimerií v buněčných kulturách ukázalo, že sporozoiti snadno a rychle vstupují a vystupují z buněk a že zpravidla proces penetrace je ukončen během několika sekund (Kelley a Hamond 1970). K excystaci může dojít za vhodných podmínek také in vitro. Stěna oocyst některých králičích kokcií může být rozpuštěna inkubací oocyst v médiu obsahujícím 0,002M L-cystein a nasyceným oxidem uhličitým při 39°C (Coudert 1995), většinou se stěny oocyst mechanicky naruší. Velmi důležité je také pH v rozmezí 7,5-8,5 (Hibbert a kol. 1969). Po uvolnění ze sporocyst vnikají sporozoiti do buněk střevní tkáně. Cesta, kterou se sporozoiti dostávají na místa kde probíhá další část endogenního vývoje není ještě dostatečně objasněna. Dürr (1972) objevil sporozoity *E. stiedai* v mezenterických lymfatických uzlinách (MLN) a v kostní dřeni. Sporozoiti *Eimeria coecicola* byli detekováni ve slezině a MLN (Pakandl a kol. 2006). Při extraintestinální migraci byli sporozoiti *Eimeria coecicola* odhaleni v B a T lymfocytech (Renaux a kol. 2001).

2.3.2. Merogonie

Po vstupu sporozoita do buňky nastává nepohlavní množení parazita. Asexuální množení kokcií probíhá v buňkách hostitele v parazitoforní vakuole vznikající z plasmalemy hostitelské buňky. Sporozoit, který vnikl do hostitelské buňky, se mění v meronta. Při množení parazita dochází k opakované resorbci organel apikálního komplexu a jejich znovuvytvoření v dceřiných merozoitech. Meronti se postupně zvětšují, velikost a doba jejich růstu dosahuje velkých rozdílů jak mezi různými druhy tak i mezi

různými generacemi téhož druhu. Existují 2 základní typy merogonie: endomerogonie a ektomerogonie (Hamond 1973).

Jako první můžeme uvést endomerogonii, při níž formování dceřiných merozoitů probíhá uvnitř mateřské buňky. Tento způsob množení byl původně objeven v meziphostitelích *Toxoplasma gondii* (Goldman a kol. 1958) a byl nazván endodyogonie. Jde o jev, kdy uvnitř mateřské buňky se začnou formovat dva dceřinní jedinci ještě před resorbcí původních organel mateřského organismu. Druhý typ endomerogonie popsal ve střevním epitelu koček u *Toxoplasma gondii* (Piekarski a kol. 1971) a nazval ho endopolygonie. Endopolygonie se liší od výše popsané endodyogonie v množství merozoitů vznikajících uvnitř merontů. V tomto případě dochází k několikanásobnému dělení jader a ke vzniku více merozoitů.

Druhý způsob formování dceřiných merozoitů se nazývá ektomerogonie. Při ektomerogonii dochází nejprve k vstřebání původních organel mateřské buňky a poté k několikanásobnému dělení jádra. Dále se v kontaktu s buněčnou stěnou začínají formovat jednojaderní merozoiti, kteří jsou při svém vzniku vysouváni do parazitoformní vakuoly. U kokcií rodu *Eimeria* je tento typ množení nejrozšířenějším způsobem asexuálního množení.

V některých případech zůstávají organely typické pro sporozoity zachovány a dojde k dělení jader. Tyto jaderné formy bývají nazývány jako „sporozoit-like schizont“. Schizonti podobní sporozoitům byli popsány u králíčích kokcií *Eimeria stiedai* (Černá a Sénaud 1971) a u *Eimeria magna* (Speer a kol. 1973).

Meronti obsahující vícejaderné merozoity jsou označovány jako typ A. Meronti typu A jsou typičtí pro králíčí kokcie a zpravidla vytváří méně merozoitů. Meronti typu B dávají vznik mnoha štíhlým jednojaderným merozoitům. Meronti typu A se vyskytují v menší míře než meronti typu B a zpravidla vytvářejí méně merozoitů. Dva typy merontů byly nalezeny u desíti druhů rodu *Eimeria* vyskytující se u králíků. *Eimeria stiedai* (Pellérdy a Dürr 1970), *Eimeria perforans* (Streun a kol. 1979), *Eimeria intestinalis* (Pellérdy 1953, Licois a kol. 1992), *Eimeria coecicola* (Pakandl a kol. 1996a), *Eimeria magna* (Ryley a Robinson 1976, Pakandl a kol., 1996b), *Eimeria media* (Rutherford 1943, Pellérdy a Babos 1953, Pakandl a kol. 1996c), *Eimeria vej dovskyi* (Pakandl a Coudert 1999), *Eimeria flavescens* (Norton a kol. 1979, Pakandl 2003), *Eimeria piriformis* (Pakandl a Jelínková 2006).

Streunová a kol. (1979) navrhli hypotézu, která předpokládá sexuální determinaci endogenních vývojových stádií (sporozoitů, merontů i merozoitů). Předpokládali, že první

generace merontů typu A dává vznik druhé generaci merontů typu A a nakonec mikrogamontům. A stejně tak, že poslední generace merontů typu B vytvářejí makrogamonty. Počet mikrogamontů u kokcií je mnohem menší než počet makrogamontů, což je v souladu s tím, že počet merontů typu A je nižší než merontů B. Tato teorie je v rozporu s faktem, že patentní infekce byla způsobena i jediným sporozoitem (Shirley a Harvey 1996). Sexuální determinace nepohlavních stádií není dosud dostatečně vysvětlena.

2.3.3. Gamogonie

Každý druh má charakteristický počet generací, přičemž samčí pohlavní buňky mikrogametocyty a samičí makrogametocyty se vyvíjí z generace poslední.

Scholtyseck a Spiecker (1964) popsal mechanismus diferenciaci samčích pohlavních buněk u *Eimeria perforans*. Hamond a kol. (1967) se zabývali také strukturou mikrogamontů *E. perforans* a dále *E. stiedai*. Vývoj mikrogamet může být rozdělen do dvou fází: fáze růstové a fáze diferenciaci. Pro první fázi je typický růst mikrogametocytů, během kterého dochází k dělení jádra. Tato jádra jsou lokalizována na periférii buňky a každé je asociováno s tubulární mitochondrií. Mezi každým jádrem a povrchem mikrogametocytu, jsou lokalizované párové centrioly. Nezralý mikrogamont se postupně vysouvá směrem do parazitoformní vakuoly. Při zrání mikrogamet se jejich jádro protahuje a mikrogamety se oddělují od mateřského mikrogametocytu. Ve zralém mikrogamontu se nachází protáhlé jádro, mitochondrie, v přední části je kryt perforatoriem, z pod kterého vychází dva bičíky.

U králíčích kokcií byla ultrastruktura samičích pohlavních stádií popsána u *Eimeria intestinalis* (Snigirevskaja 1968, 1969), *Eimeria perforans* a *Eimeria stiedai* (Scholtyseck a kol. 1966). U makrogamontů neprobíhá mnohonásobné dělení jádra, ale dochází zde k obrovskému zvětšení buňky. Tento růst je především spojen s tvorbou rezervních granulí glykogenového a lipidového charakteru. Druhy rodu *Eimeria* mají obvykle dva typy granul známé jako tělíška formující stěnu oocyst (wall-forming bodies) 1. a 2. typu, které se podílejí na tvorbě dvouvrstevné stěny oocyst. Tělíška prvního typu jsou homogenní, sférická až elipsoidní, mají obvykle periferní lokalizaci a vyskytují se později než tělíška typu 2. U *Eimeria intestinalis* a *E. perforans* jsou obklopeny vrstvou podobnou membráně, která je občas u *E. perforans* zjizvená. Tělíška druhého typu mají houbovitou strukturu (Scholtyseck 1962), jsou přítomna dříve než tělíška formující stěnu oocysty.

Zralý mikrogamet opouští hostitelskou buňku, poté penetruje jinou hostitelskou buňku, ve které se nachází makrogamet. Nakonec dochází k jejich splynutí.

2.3.4. Formování stěn oocyst

Stěny oocyst se začínají formovat krátce po oplodnění makrogamety. Tělíska formující stěny oocyst typu 1 dávají vznik vnější vrstvě stěny oocyst, zatímco tělíska typu 2 jsou zodpovědná za vytváření vnitřní vrstvy oocystární stěny. Po vytvoření stěny se oocysty dostávají z hostitelské buňky a poté s výkaly do vnějšího prostředí.

2.3.5. Sporogonie

U oocyst rodu *Eimeria* probíhá sporulace ve vnějším prostředí mimo tělo hostitele. Pro úspěšnou sporulaci musí být splněny dvě základní podmínky: přítomnost kyslíku a teplota. Na počátku sporulace je téměř celá oocysta vyplněna protoplasmatickým obsahem, ten kondenzuje a vzniká kulovitý útvar sporont. Následují dvě po sobě jdoucí dělení jádra, po kterém se rozdělí cytoplasma a zformují se čtyři sporoblasty. Část původní cytoplasmy může v oocystách přetrvávat ve formě tzv. reziduálního tělíska. Sporoblasty jsou nejprve kulatého tvaru poté se začnou prodlužovat a na jednom konci začne vznikat Stiedovo tělísko. Poté se uvnitř každého sporoblastu začnou formovat dva sporozoiti a také je zde přítomno reziduální tělísko sporocyst (Hamond 1973).

Délka sporulace je druhově specifická a záleží při ní především na teplotě. Oocysta, která je vystavená příliš vysoké nebo naopak nízké teplotě, je ve většině případů poškozená. Optimální teplota pro sporulaci králičích oocyst je 26°C, teplota vyšší než 28°C snižuje především životnost oocyst (Coudert a kol. 1995).

2.4. Hostitelská specifita

Hostitelská specifita kokcií je posuzována z hlediska schopnosti uskutečnění endogenního vývoje v hostiteli, který je ukončen produkcí oocyst. Druhy rodu *Eimeria* jsou považovány za monoxenní a stenoxenní parazity, mají nejen vysokou hostitelskou specifitu, ale i v daném hostiteli napadají specifické typy buněk, specifických tkání nebo orgánů (Fernando 1990). Avšak tato charakteristika nemůže být pokládána za absolutní, například *Eimeria chinchillae* může svůj vývojový cyklus uskutečnit jak v činčilách, kde byla poprvé popsána, tak v některých jiných hlodavcích (de Vos, A.J. 1970). Druhy rodu *Eimeria* jsou v převážně většině parazitě střevního epitelu, existují však druhy, pro které je typický vývoj v jiných buňkách a orgánech. Králičí kokcie *Eimeria stiedai* se vyvíjí v epitelu žlučových a *Eimeria truncata* v tubulárním epitelu ledvin hus.

2.5. Patogenita

Kokcidióza se u zvířat žijících volně v přírodě vyskytuje pouze ojediněle. Ve větší míře je spojena s oslabenou imunitou hostitele, která může být zapříčiněna jinými patogeny či stresem. Kokcidie způsobují velké ztráty ve velkochovných zařízeních, kde dochází k obrovské koncentraci zvířat v malém prostoru. Ke vzniku kokcidiózy přispívá mnoho faktorů: druh parazita, infekční dávka, interakce mezi druhy, interakce s jinými patogeny, věk, stres a výživa.

Důležitým faktorem je druh parazita, protože některé druhy jsou více patogenní než jiné. U králíčích kokcidií patří k nepatogenním *E. coecicola* k lehce patogenním *E. perforans*, *E. exigua* a *E. vej dovskyi*. Králíci napadeni těmito druhy nejev í žádné známky nemoci nebo u nich dochází k mírnému poklesu růstu. Při napadení patogenními kokcidiemi *E. media*, *E. magna*, *E. piriformis* a *E. ir residua* se u králíků objevuje průjem, pokles růstu a mortalita závis ejší na množství pozř ených oocyst. Vysoce patogenní kokcidi e *E. intestinalis* a *E. flavescens* způsobují silné průjmy, velký pokles růstu a mají vysokou mortalitu. Patogenita *E. stiedai* je závislá na dávkách oocyst, při infekčních dávkách $> 1 \times 10^5$ se objeví ztráta váhy a mortalita (Coudert 1995).

Závažnost onemocnění je závislá na množství pozř ených oocyst. Vysoké jednorázové dávky oocyst vedou k těžšímu průběhu nemoci (Norton a kol. 1979). Pokud je infekční dávka rozdělena do dávek menších a je podávána v rozmezí několika dnů nebo týdnů, je průběh onemocnění způsobený daným druhem kokcidi e mírnější, než když je stejné množství oocyst podáno v jedné dávce. Jestliže dva druhy kokcidií napadají stejnou část střeva, kompetují spolu a výsledný patogenní efekt je stejný jako při napadení pouze jednou kokcidií. Pokud je ale hostitel napadený kokcidiemi parazitujícími v odlišných částech střeva následky pro hostitele mohou být víc než dvojnásobné. Stres je dalším velmi důležitým faktorem, který snižuje rezistenci organismu proti kokcidióze. Stres může být zapříčiněn: změnami ve výživě, dlouhým transportem, kdy zvíře trpí žízní či hladem, nízkou nebo vysokou teplotou nebo současným výskytem jiné infekce (Gregory 1990).

Kokcidi e napadající enterocyty klků způsobují poškození střevní sliznice, která regeneruje rychle, protože kmenové buňky v kryptách nejsou poškozeny. Kokcidi e, které uskutečňují svůj vývoj v kryptách mohou zapříčinit zničení kmenových buněk, takže regenerace epitelu je pak velmi obtížná. Tento proces byl popsán u *E. flavescens* (Gregory a Catchpole 1986). Typické histopatologické změny jsou: zánětlivý infiltrát, hyperplazie epitelu, ztráta enterocytů a vaskulární změny. Změny v tkáni zapříčiněné sporozoity jsou obvykle minimální, protože počet sporozoitů je obvykle nižší než u dalších vývojových

stádií. Naproti tomu obrovský počet merontů může být zodpovědný za hypertrofii, zblednutí mukózy a její krvácení. U většiny kokcií jsou v jejich endogenním vývoji nejvíce patogenní sexuální stadia, pravděpodobně proto, že jsou nejvíce početná. Nahromadění gamonti mohou navíc zapříčinit i erozi sliznice a nekrózu tkáně (Gregory 1990).

2.6. Prevence

Dosud je hlavním způsobem prevence králičí kokcidiózy používání antikokcidik. Mezi nejvíce používaná patří salinomycin, Lerbek a robenidin, která jsou přidávána do krmných směsí. Do pitné vody se u nás přidává Sulfacox, jehož léčivá složka sulfadimidin patří mezi nejstarší používaná antikokcidika. S podáváním antikokcidik je spojena řada nevýhod: vznik resistance, jejich toxicita, rezidua v mase zvířat a kontaminace životního prostředí.

Další možností je použití živé vakcíny obsahující virulentní kmeny. Ta má ale také své nevýhody. Je velmi důležité důsledně kontrolovat dávkování, protože zde může nastat možnost, že parazit způsobí onemocnění zvířeti, které bylo nedostatečně imunizováno (Shirley a Long 1990).

Velmi dobrou možností je vakcinace živými oslabenými liniemi kokcií. Oslabená linie se liší od původního kmene zkrácením prepatentní periody, ztrátou nebo redukcí počtu asexuálních generací, snížením reprodukčního potenciálu a virulence. Navzdory tomu oslabená linie parazitů vyvolávají imunitní odpověď, která může hostitele ochránit před napadením virulentními kmeny.

Oslabenou linii *E. intestinalis* odvodili Licois a kol. (1990). Prepatentní perioda byla zkrácena z 215 na 144 hodin. U oslabené linie se nevyskytovala třetí generace merontů, zatímco první, druhá a čtvrtá generace se vyvíjela normálně. Další králičí kokcií, u které byla získána oslabená linie, je *E. media*. Prepatentní perioda byla zkrácena ze 108 na 72 hodin (Licois a kol. 1994). Endogenní vývoj této kokcie byl studován Pakandlem a kol. (1996c). Byla zaznamenána absence poslední třetí generace merontů. Licois a kol. (1995) odvodili také oslabenou linii další králičí kokcie *E. magna*. Zde byla prepatentní perioda zkrácena ze 154 na 108 hodin. Studium endogenního vývoje prokázalo nepřítomnost merontů čtvrté generace Pakandl a kol. (1996b). Oslabenou linii *E. coecicola* získal Coudert a kol. (1995). Prepatentní perioda byla zkrácena o 3,5 dne a to z 9,5 na 5,5 dne. Endogenní vývoj oslabené linie této kokcie nebyl studován. Také u *E. flavescens* byla získána a dále charakterizována oslabená linie tohoto druhu (Pakandl 2005). Absence dvou generací merontů druhé (nebo třetí) a čtvrté je charakteristická pro

tuto linii. Prepatentní perioda byla zkrácena z 201 na 139,5 hodiny. Dosud posledním kdo se věnoval získání a poté popisu endogenního vývoje oslabené linie králičí kokcié byli Pakandl a Jelínková (2006). Původní kmen *E. piriformis* s prepatentní dobou 194 hodin zahrnoval čtyři generace merontů. Oproti tomu oslabená linie této kokcié byla kratší o 24 hodin a vyskytovali se u ní pouze první tři generace merontů.

Oslabené linie se liší od původních kmenů též ultrastrukturou sporocyst. Touto problematikou se zabýval Pakandl a kol. (2001) u druhů *E. media*, *E. magna*, *E. intestinalis* a později také Pakandl a Jelínková (2006) u *E. piriformis*. Sporocysty oslabených linií se lišily od původního kmene velikostí, tvarem nebo umístěním refraktilního tělíska .

2.7. Endogenní vývoj 11 druhů králičích kokcií

U králíků bylo dosud izolováno a platně popsáno 11 druhů kokcií. Deset z nich parazituje ve střevech králíků: *Eimeria coecicola*, *E. exigua*, *E. flavescens*, *E. intestinalis*, *E. irresidua*, *E. magna*, *E. media*, *E. perforans*, *E. piriformis*, *E. vej dovskyi* a pouze *E. stiedai* v epitelu žlučvodů. Tyto druhy mohou být odlišeny na základě několika kritérií: velikosti a morfologii oocyst, patogenity, lokalizaci endogenních stádií v určitém segmentu střeva nebo v určitých partiích sliznice, makroskopických lézí, počtu asexuálních generací a prepatentní periody.

2.7.1. *Eimeria stiedai* (Clindemann, 1865) Kisskalt a Hartmann, 1907

E. stiedai má mírně oválné oocysty, mikropyle je téměř nepatrné. Reziduální tělísko oocyst (RTO) je tvořeno pouze několika granuly. Oocysty měří 36,9x19,9 μm . Sporocysty všech králičích kokcií obsahují refraktilní tělísko sporocyst (Coudert a kol. 1995).

Endogenním vývojem této kokcié se zabýval Owen (1970). Sporozoiti byli zaznamenáni již 12 hodin po inokulaci (h.p.i.) v mezenterických lymfatických uzlinách a po 24 h.p.i. v kostní dřeni. V játrech byli sporozoiti pozorováni první až pátý den po inokulaci (d.p.i.) Pellérdy a Dürr (1970). Popsal šest generací merontů, které vytvářely dva typy merozoitů. První generace merontů byla objevena druhý a třetí d.p.i. a nacházela se na bázi epitelových buněk žlučvodů. Další generace se nacházely také v epitelu žlučvodů, ale blíže lumen. Druhá generace merontů byla přítomna pátý, třetí generace šestý, čtvrtá generace osmý d.p.i. Pátá a šestá generace byla popsána 11 d.p.i. Meronti poslední generace byli nejpočetnější. Meronti typu A dávali vznik 10 mnohojaderným merozoitům, meronti typu B vytvářeli až 40 jednojaderných merozoitů. Mladí gamonti byli pozorováni 12 d.p.i.

2.7.2. *Eimeria perforans* (Leuckart, 1879) Sluiter a Swellengrebel, 1912

E. perforans a *E. exigua* jsou králičí kokciemie, jejichž oocysty nemají mikropyle. Oocysty *E. perforans* jsou oválného tvaru, obsahují malé RTO a dosahují velikosti 22,2x13,9 μm . Délka sporulace je 22 h při optimální teplotě a prepatentní perioda 5 dní (Coudert a kol. 1995).

Rutherford (1943) popsal dvě generace této kokciemie, které se vyvíjí v duodenu a jejunu. Opět zaznamenal dva typy merontů v obou generacích. První generace se objevila 4 d.p.i. a druhá o den později. Meronti typu A vytvářeli u obou generací 2-8 merozoitů. Meronti typu B vytvářeli v první generaci 8-32 a v druhé 16-32 merozoitů. Streun a kol. (1979) jako další charakterizovali životní cyklus *Eimeria perforans* za pomoci světelné i elektronové mikroskopie. Nejvíce napadeny byly epitelální buňky duodena, parazit se občas vyskytoval v jejunu a ileu, nikdy ale nebyl nalezen v jiných částech střeva. Již 24 h.p.i. bylo možno rozeznat dva typy merontů. Meronti prvního typu vytvářeli 12-24 štíhlých jednojaderných merozoitů narozdíl od merontů druhého typu, kteří dávali vznik 2-8 tlustým mnohjaderným merozoitům. 72 h.p.i se začali objevovat meronti druhé generace, nejčastěji pozorováni byli meronti obsahující 20-36 relativně malých jednojaderných merozoitů. Méně častí byli meronti s většími mnohjadernými merozoity. Gamonti se vyskytovali v intervalu 96-108 h.p.i. Ultrastrukturu sexuálních stádií *E. perforans* studovali Scholtyseck (1962), Scholtyseck a kol. (1966) a Hammond a kol. (1967).

2.7.3. *Eimeria magna* Pérard, 1925

Prepatentní perioda, tj. doba od nakažení až do vyloučení prvních oocyst, je u *E. magna* 6,5 dne. Tyto oocysty jsou vejčitého tvaru s mikropyle, okolo kterého je patrná límečkovitá struktura. V oocystách se nachází velké RTO. Průměrná velikost oocyst je 36,3-24,1 μm . Délka sporulace při 26°C je 46 hodin (Coudert 1995).

Endogenní část vývojového cyklu byla popsána Chejsinem (1940, 1967) a Rutherfordem (1943), kteří pozorovali oba typy merontů v epitelu jejunu a méně často ilea. Podle Chejsina (1967) se v střevním epitelu vyvíjí 4 generace na rozdíl od Rutherforda (1943), který popsal pouze 2 generace. Pět generací uvádějí Ryley a Robinson (1976), kteří rovněž pozorovali vícejaderné merozoity. Následně se za pomoci elektronové mikroskopie věnoval studiu endogenního cyklu původní a oslabené linie Pakandl a kol. (1996a). Asexuální stadia byla lokalizována především v jejunu a ileu, méně často v duodenu. Meronti prvních třech generací se vyvíjeli v epitelových buňkách klků, kdežto meronti

čtvrté generace a gamonti se nalézali spíše v bazálních částech klků a v kryptách. Pouze u merozoitů první generace se objevovala refraktilní tělíska.

2.7.4. *Eimeria media* Kessel, 1929

Eimeria media je králičí kokcídie s nejkratší prepatentní periodou a její vývoj trvá 4,5 dne. Její oocysty jsou oválného až vejčitého tvaru. Mají středně velké až velké RTO a mikropyle pyramidovitého tvaru. Oocysty vysporulují při 26°C za 35h. Průměrná velikost oocyst dosahuje rozměrů 31,5 x 17,0 μm (Coudert a kol. 1995).

Rutherfordem (1943) pozoroval stejně jako u ostatních druhů dvě generace merontů obou typů v epitelu celého tenkého střeva. Pátý a šestý den zaznamenal výskyt prvních makrogamontů a mikrogamontů. Na rozdíl od Rutherforda Pellérdy a Babos (1953) pozorovali tři generace merontů, kteří uskutečnili svůj vývoj v epitelu sliznice tenkého střeva a to převážně ve střední a zadní třetině. Tento vývoj je dokončen subepitelálně a pozdější stádia mohou být lokalizována i v tlustém střevě. Dalším, kdo věnoval pozornost životnímu cyklu *E. media*, byl Pakandl (1988). V epitelu tenkého střeva především v duodenu a jejunu byla lokalizována všechna stádia. Všechny generace včetně gamogonie se nacházely ve vrcholcích nebo stěnách klků. Pakandl (1996b) zaznamenal tři generace merontů, z nichž každá dávala vznik merontům obou typů. První meronti se začali vyskytovat 24 h.p.i., druhá generace byla přítomná 40 h.p.i a třetí 76 h.p.i. Sexuální stádia se vyvíjela 96 h.p.i.

2.7.5. *Eimeria irresidua* Kessel a Jankiewicz, 1931

U *E. irresidua* je prepatentní perioda dlouhá 9 dní. Oocysty sporulují při teplotě 26°C 50 hodin a jsou oválného nebo soudkovitého tvaru se širokým mikropyle. Průměrná velikost oocyst, které neobsahují RTO, je 39,2x23,1 μm (Coudert a kol. 1995).

Druhem *Eimeria irresidua* se nezávisle na sobě zabývali (Rutherford 1943), Chejsin (1972) a Norton a kol. (1979). Podle Rutherforda (1943) zahrnoval endogenní vývoj dvě generace merontů. První generace byla přítomná 6 dní po inokulaci, druhá byla zaznamenána o tři dny déle. V obou generacích se nacházeli meronti dvou typů. Menší meronti typu A, dávali vznik malému počtu merozoitů a nacházeli se v epitelu klků tenkého střeva. Větší meronti typu B obsahovali více merozoitů a vyvíjeli se subepitelálně. Chejsin (1972) našel první generaci 3 dni po inokulaci (d.p.i.), druhou 4 d.p.i., třetí 5 d.p.i. a čtvrtou generaci 7 d.p.i. V jejunu a ileu byl lokalizován endogenní vývoj *E. irresidua* (Norton a kol. 1979). První generace byla poprvé zaznamenána v kryptáchu 72 h.p.i. Po 24

h se objevila v lamina propria druhá generace. Třetí a čtvrtá generace se nacházela v epitelu tenkého střeva. Gamonti byli nalezeni 163 h.p.i jak v epitelu tak v lamina propria jejunu a ilea. V duodenu a tlustém střevě se žádná stádia parazita nevyskytovala.

2.7.6. *Eimeria piriformis* Kotlán a Pospesch, 1934

Devítidenní prepatentní perioda, často asymetrické oocysty hruškovitého tvaru s nápadným mikropyle nepřítomnost RTO a velikost 29,5x18,1 µm jsou charakteristiké pro *Eimeria piriformis* (Coudert a kol. 1995).

Donedávna jediným, kdo se zabýval životním cyklem *Eimeria piriformis*, byl Chejsin (1948). Zaznamenal tři generace, které se vyvíjí v kryptách ve slepém střevě, kolonu a v červovitém přívěsku. Výskyt merontů první generace byl poprvé zjištěn pátý den po inokulaci. Tato generace dávala vznik 15 až 25 štíhlým merozoitům. Naproti tomu meronti druhé generace byli početní a vytvářeli mnoho silných merozoitů. Poslední třetí generace se objevovala 9. den po inokulaci. Dalším kdo popsal endogenní vývoj *E. piriformis* v tenkém střevě a oocysty s RTO byl Pellérdy (1953). Z morfologie oocyst a lokalizace endogenního vývoje lze vyvodit, že Pellérdy (1953) popisoval životní cyklus *Eimeria intestinalis*. V nedávné době se zabývali biologií kokcií *Eimeria piriformis* za použití elektronové mikroskopie Pakandl a Jelínková (2006). V jejich práci byly popsány čtyři generace merontů, tato stádia byla včetně gamogonie pozorována v proximální části kolonu až po *fusus coli*. Pro všechny čtyři generace byl charakteristický výskyt dvou typů merontů. Sporozoiti a první generace merontů byli nalezeni 80 h.p.i. Oba typy merontů první i třetí generace vytvářely dva merozoity, merozoiti typu A obsahovali ve většině případů dvě jádra, kdežto merozoiti typu B byli jednojaderní. Pro meronty druhé a čtvrté generace byl typický vysoký počet jednojaderných merozoitů. Meronti typu A dávali vznik opět dvěma merozoitům uvnitř kterých se nacházelo 4-10 jader. Vývoj gamontů probíhal od 160 h.p.i.

2.7.7. *Eimeria exigua* Jakimoff, 1934

Yakimoff (1934) poprvé popsal králíččí kokcií s nejmenšími oocystami, které byly kulaté s průměrnou velikostí 14,5x12,7 µm a postrádaly mikropyle. Vysporulované oocysty neobsahovaly RTO.

Dlouho byl tento druh považován za neplatný, nejčastěji za synonymum *E. perforans* (Chejsin 1967).

Coudert a kol. (1995) zaznamenali u druhu *E. exigua* sedmidenní prepatentní dobu. Popisovali sférické až subsférické oocysty, které neměly mikropyle ani RTO a dosahovaly průměrné velikosti 15,1x14,0 µm. Při teplotě 26°C oocysty vysporulovaly za 17 h.

Grès a kol. (2000) popsali oocysty, kulatého až mírně oválného tvaru bez RTO a mikropyle s velikostí 13,7x12,8 µm, které byly vylučovány divokými králíky. V tenkém střevě tohoto králíka byla nalezena endogenní stádia uvnitř jader epitelových buněk, převážně ve vrchních částech klků. Jednalo se ale o spontánně nakažená zvířata vylučující oocysty *E. exigua*, jejichž výskyt byl spojen s endogenními stádii nacházejícími se uvnitř jádra.

2.7.8. *Eimeria flavescens* Marotel a Guilhon, 1941

Prepatentní perioda je u *E. flavescens* devět dní. Sporulace při 26°C trvá 48 hodin. Oocysty *E. flavescens* jsou vejčitého tvaru s velkým mikropyle na širším konci, bez RTO a s průměrnou velikostí 30x20 µm (Coudert a kol. 1995).

Touto vysoce patogenní kokcidií se zabývali Norton a kol. (1979). Po 24 hodinách se začali objevovat první sporozoiti v proximální části klků jejunu a ilea, ale již 48 h.p.i. se naprostá většina nacházela v kryptách. Pouze první generace, která se vyvíjela 72 h.p.i. v epitelových buňkách při bázi klků byla lokalizována v jejunu a ileu. Odlišnou lokalizaci měli meronti 2., 3. a 4. generace, kteří se nacházeli v epitelu tlustého střeva a poslední pátá generace společně s gamogonií vyskytující se v kryptách v téže části střeva. Zaznamenali také málopočetné mnohojaderné meronty. Biologie této eimerie byla také popsána Pakandlem a kol. (2003). První generace byla zaznamenána v duodenu a jejunu 80-96 h.p.i., následující čtyři generace a gamogonie byly objeveny ve stejných částech střeva jako ve studii Nortona a kol. (1979). V každé generaci se objevovaly oba typy merontů. V druhé, třetí a čtvrté generaci byli více zastoupeni meronti typu B. V páté generaci byl poměr merontů typu B:A 6,3:1 a poměr makrogamontů a mikrogamontů 5,81:1.

2.7.9. *Eimeria coecicola* Cheissin, 1947

Nepatogenní druh *Eimeria coecicola* s prepatentní periodou 9 dní má oválné oocysty s průměrnou velikostí 34,5x19,7 µm, které vysporulují za 60 hodin při optimální teplotě 26°C. Oocysty mají mikropyle s límečkovitou strukturou a uvnitř je poměrně malé RTO (Coudert 1995).

Endogenní vývoj *E. coecicola* byl studován Cheissinem (1947, 1967). První meronty zaznamenal šest dní po inokulaci v ileu ve vzdálenosti do 15 cm od ileocekální

valvy. Již sedmý den byli objeveni ve slepém střevě a červovitém výběžku mladí gamonti a 9 den hostitel vylučoval první oocysty. Pakandl a kol. (1993) se zabývali migrací sporozoitů a první generací merontů. V epitelových buňkách klků a v intraepiteliálních lymfocytech (IEL) duodena a ilea byli sporozoiti pozorováni až do 32 h.p.i. Později se nacházeli v lymfocytech lamina propria a po 48 h.p.i. v lymfoidních buňkách třech odlišných částí střeva (červovitého přívěsku, *sacculus rotundus* a Peyerových placích). Také první generace měla stejnou lokalizaci a nacházela se uvnitř lymfocytů nebo M-buněk 64 h.p.i. Následně se druhou, třetí, čtvrtou merogonií a gamogonií se zabýval Pakandl a kol. (1996a). Všechna stádia se nacházela v epitelových buňkách především při bázi dómů ve stejných částech střeva jako meronti první generace. Oba typy merontů byli nalezeny až ve 3. a 4. generaci. Zatímco ve třetí generaci byl počet merozoitů typu A i B vyrovnaný, ve čtvrté generaci merozoiti typu B jasně převládali. První gamonti se vyskytovali 160 h.p.i., mnohojaderní mikrogamonti byli méně početní než makrogamonti.

2.7.10. *Eimeria intestinalis* Cheissin, 1948

Prepatentní perioda trávající 8,5 dne a oocysty hruškovitého tvaru s velkým RTO jsou charakteristické pro *E. intestinalis*. Jejich průměrná velikost je 26,7x18,9 μm a doba sporulace 60 h při 26°C (Coudert a kol. 1995).

V klcích tenkého střeva se vyskytují 3 asexuální generace, naproti tomu gamogonie byla pozorována i ve střevě tlustém. Až ve druhé generaci se objevovali merozoiti obou typů (Chejsin 1948). Z Pellérdyho (1953) práce charakterizující endogenní vývoj *E. piriformis* v tenkém střevě a oocysty s velkým RTO bylo zřejmé, že popisoval jiný druh kokciédie a to *E. intestinalis*. Byli zaznamenány 2 generace merontů typu A i B. První meronti byli zaznamenáni druhý den po inokulaci. Naproti tomu čtyři generace merontů u nichž meronti prvních tří generací obsahují jednojaderné i mnohojaderné merozoity, kdežto u merontů čtvrté generace byli nalezeni pouze jednojaderní merozoiti. 36 hodin po inokulaci (h.p.i.) byli nalezeni první meronti a 168 h.p.i. první sexuální stádia. V intraepiteliálních lymfocytech se již 48 h.p.i. se vyskytovali sporozoiti. Místem endogenního vývoje byly klky a krypty tenkého střeva (Licois a kol. 1992). S pomocí elektronové mikroskopie studovala sexuální stádia také Snigirevskaja (1968, 1969).

2.7.11. *Eimeria vejnovskyi* Pakandl, 1988

Nejdelší prepatentní dobu ze střevních kokcií má *Eimeria vejnovskyi* a to 10 dní. Oocysta je vysporulovaná za 35 h při 26°C. Má vejčitý tvar, mikropyle bez límečkovité struktury, středně velké RTO a dosahuje rozměrů 31,1x17,0 µm (Coudert a kol. 1995).

Pakandl (1986) popsal dva typy oocyst u druhu *Eimeria media*. Na základě morfologie oocyst, endogenního cyklu, prepatentní periody a enzymové analýzy bylo zjištěno, že se jedná o dva samostatné druhy. Poprvé byl životní cyklus popsán Pakandlem (1988), ale pouze na úrovni světelné mikroskopie a s použitím konvenčních králíků. Endogenní vývoj zahrnoval tři generace merontů vyvíjejících se v epitelu ilea a občas také v zadní části jejunu. Výskyt první generace je soustředěn v kryptách na rozdíl od zbylých dvou generací a gamogonie nacházejících se ve stěně a vrchních částech klků. Detailnější studie (Pakandl a Coudert 1999) odhalila další dvě generace, které předcházely třem již dříve popsaným (Pakandl 1988). Sporozoiti se poprvé objevovali 36 h.p.i. a první tři generace merontů se vyvíjely v epitelu krypt. V epitelu klků byly lokalizovány jak poslední dvě generace merontů, tak gamonti.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Hostitelský organismus

V této práci byl hostitelským organismem králík domácí (*Oryctolagus cuniculus*). Při studiu endogenního vývoje kokcií bylo velmi důležité použití SPF (specific pathogen-free) králíků, kteří byli dodáni firmou AnLab s.r.o. (Praha), od nichž byla odchována mláďata.

Všichni králíci zahrnutí v této práci byli chováni v izolované místnosti vybavené HEPA filtry. Klece i ostatní vybavení bylo autoklávováno nebo vystaveno na několik hodin teplotě 70°C. Krmení a voda bylo ošetřeno stejným způsobem.

Zvířata byla odstavena ve věku 35 dní. Nejpozději pět dní před inokulací jim byla vysazena antikokcidika.

3.2. Parazit - *Eimeria exigua*

Gringoli izoloval čistou linii druhu *Eimeria exigua* v Itálii (Pakandl, ústní sdělení). Poté byl tento druh poskytnut francouzské laboratoři – INRA-BASE, Laboratoire de Pathologie du Lapin, Nouzilly, France. Zde byl tento druh charakterizován a výsledky byly uveřejněny pouze v publikaci Couderta a kol. (1995).

3.3. Sběr a purifikace oocyst

Králíci byli krmeni *ad libitum*. Krmivo ani voda neobsahovaly žádná antikokcidika. Abychom zamezili ztrátám oocyst s výkaly a eliminovali zbytky potravy v obsahu slepého střeva a žaludku, ukončili jsme krmení pevnou stravou 24 hodin před odběrem oocyst.

Králíci byli utraceni omráčením a vykrcením. Dále byl obsah slepého střeva a žaludku rozředěn v destilované vodě, poté bylo přidáno několik kapek smáčecího prostředku (tekutého mýdla) a materiál byl ponechán jednu hodinu stát.

Poté byl obsah kádinky přefiltrován přes síto o velikosti ok 200 µm, materiál zbylý v sítu byl znovu zředěn a přefiltrován. Filtrát byl stáčen 15 minut v centrifuze Multifuge 4 KR (Heraeus) při 1910 g a 18°C.

Následně byl sediment resuspendován ve směsi destilovaná voda - nasycený roztok síranu hořečnatého v poměru 1:4 a opět centrifugován.

Odebraný supernatant byl opět zředěn nejméně v trojnásobném množství destilované vody a zcentrifugován. Nakonec byl sediment ještě třikrát promyt v destilované vodě. Poté bylo množství oocyst spočítáno pomocí McMasterovy komůrky

tak, že počet oocyst ve 40 sloupcích byl vynásoben ředěním a výsledkem bylo množství oocyst na 1 ml. Nakonec byly oocysty dány do 2,5% roztoku dichromanu draselného.

3.4. Sporulace

Oocysty byly nechány sporulovat při pokojové teplotě po dobu 48 hodin na rotační třepačce. Oocysty byly v 2,5% roztoku dichromanu draselného a jejich koncentrace nepřesahovala množství 3×10^6 oocyst na 1 ml.

3.6. Inokulace králíků

Nejprve byl odebrán takový objem suspenze, který obsahoval potřebné množství oocyst. Opakovanou centrifugací byl odstraněn dichroman draselný a následně byl sediment zředěn malým množstvím vody.

Infekční dávky a čas odběru vzorků jsou shrnuty v Tab.1. Králíci byli inokulováni pomocí žaludeční sondy nebo byly malé objemy inokula podány pomocí automatické pipety do ústní dutiny.

Nejprve byli králíci inokulováni v rozmezí 18 hodin tzn. (18, 36, 54, 72, 90, 108, 126, 144, 162 h.), ale první výsledky ukázaly, že je nutné doplnit studii o další intervaly, které by objasnily především začátek endogenního vývoje *E. exigua*. Pro každý interval byli použiti 1-2 králíci (Tab.1).

Tabulka 1. Množství inokulovaných oocyst *Eimeria exigua* a čas odebírání vzorků h.p.i. = hodin po inokulaci

Odběr vzorků [h.p.i.]	1	5	10	18	24	36	48	54	72
Počet oocyst	4×10^7	4×10^7	$2,2 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	3×10^7	$1,5 \times 10^7$	3×10^7	3×10^7
									3×10^6

Odběr vzorků [h.p.i.]	76	85	90	94	103	108	126	144	162	188
Počet oocyst	3×10^7	3×10^7	6×10^6	3×10^7	$2,2 \times 10^7$	6×10^6	2×10^6	10^6	10^6	10^5
			$1,2 \times 10^6$			$1,2 \times 10^6$	4×10^5	2×10^5	2×10^5	

3.7. Histologie

Vzorky tkáně pro histologické zpracování odebírané do 72 (h.p.i.) byly z následujících částí střeva: z předního a zadního duodena, dva vzorky z předního jejunu, jeden ze středního a zadního jejunu, další z rozmezí ilea a jejunu a jeden vzorek z ilea. Pro identifikaci pozdějších generací endogenního cyklu byly vzorky odebírány z duodena, předního jejunu, dva ze střední části jejunu a ze zadního jejunu, z části na rozhraní jejunu a ilea a z předního a zadního ilea.

Materiál byl fixován 10% neutrálním formaldehydem. Dané části střeva o velikosti asi 1 cm byly po délce rozstříženy a nataženy na kousky tvrdého papíru sliznicí navrch. Tyto části střev byly poté zkrájeny na menší kousky, dány do formiček, odvodněny a převedeny do parafínu.

Vzorky byly odvodněny v následující řadě alkoholů: v 70% etanolu, 3x v 96% etanolu a 2x v 100% etanolu, v každém alkoholu byly ponechány po dobu jedné hodiny. Poté byly vloženy 2x do xylolu (nejprve po 1 h a podruhé 1,5 h).

Následovalo převedení materiálu do parafínu, 3x po 12 hodinách. Parafínové bločky byly krájeny na řezy silné 4-7 μm , které byly barveny Harrisovým hematoxylinem a eosinem.

3.8. Transmisní elektronová mikroskopie

Materiál pro elektronovou mikroskopii byl odebrán stejným způsobem jako pro histologii. Vzorky byly fixovány v modifikovaném roztoku podle Karnovského po dobu 1-12 hodin. Složení fixáže bylo následovné: 50 ml 0,2M kakodylátového pufru, 10ml 15% paraformaldehydu, 8ml 8% glutaraldehydu a 32ml destilované vody. Nakonec bylo pH fixáže upraveno na 7,2-7,4. Střevo bylo dále nakrájeno na kousky veliké maximálně 1mm³. Tyto vzorky byly dány 3x do vypíracího roztoku, což byl 0,1M kakodylátový pufr (pH 7,2-7,4) a následně po dobu 1 hodiny dofixovány 2% OsO₄ v témže pufru a opět vloženy do 0,1 M kakodylátového vypíracího roztoku na 3x 20 minut..

Odvodnění materiálu probíhalo následovně: 3x v 70% etanolu, 2x v 96% etanolu, 2x v 100% etanolu vždy po dobu 15 minut. Část materiálu byla po odvodnění uchována v butanolu.

Následovalo prosycení vzorku propylenoxidem (3x20 minut), poté směsí propylenoxid-pryskyřice v poměru 2:1, 1:1, 1:2, v každé směsi byl vzorek ponechán 1 hodinu. Nakonec byl materiál v čisté pryskyřici vložen do exikátoru. Druhý den byly vzorky označeny, zalaty do pryskyřice a ponechány polymerovat při teplotě 60°C. Byla

použita pryskyřice Spurr (Polysciences). Z takto připravených vzorků byly pomocí ultramikrotomu krájeny poloténké řezy pro světelnou mikroskopii, které byly dále barveny toluidinovou modří nebo Warmkeho polychromem. Také byly připraveny řezy ultratenké, které byly kontrastované octanem uranylu a citrátem olova a prohlíženy elektronovým mikroskopem Jeol 1010.

4. VÝSLEDKY

4.1. Endogenní vývoj *Eimeria exigua*

Během endogenního vývoje *Eimeria exigua* se vytváří čtyři generace merontů. Meronti první generace byli velmi málo početní, což omezovalo možnost jejich studia pomocí elektronové mikroskopie a nebyli u nich rozlišeni meronti dvou typů. S využitím světelného mikroskopu byli zaznamenáni meronti obsahující vždy 2 merozoity. Dva typy merontů a merozoitů byly zaznamenány v 2., 3. a 4. generaci. Meronti typu A byli menší než meronti typu B a dávali vznik malému počtu tlustých merozoitů, kteří byli obvykle dvoujaderní. Meronti typu B obsahovali větší počet štíhlejších jednojaderných merozoitů. Merozoiti typu B se formovali při povrchu merontů procesem zvaným ektomerogonie (obr. 1). Naproti tomu dceřinní merozoiti u merontů typu A vznikali uvnitř merozoitů procesem zvaným endomerogonie (obr. 2). Meronti typu A byli během endogenního vývoje méně frekventovaní než meronti typu B a jejich zastoupení se v průběhu vývoje snižovalo. Lokalizace všech čtyř generací včetně gamogonie byla v tenkém střevě. Tato endogenní stádia se vyskytovala pouze v epitelu ve vrcholcích a středních partiích klků (obr. 17). Endogenní vývoj *Eimeria exigua* je shrnut v Tabulce 2.

4.1.1. Přehled asexuálních generací

1. generace

První generace merontů byla poprvé zaznamenána 72-90 h.p.i. Pouze tato generace se rozvíjela v přední části tenkého střeva a to od duodena až po střední jejunum ve středních partiích klků. Meronti této generace dosahovali malých rozměrů 3,5x4,6 μm , byli téměř kulatého tvaru a dávali vznik vždy dvěma širokým merozoitům (obr. 13, 14).

2. generace

V epitelových buňkách vrchních částí klků od předního jejunum až po konec ilea se nacházeli meronti druhé generace (obr. 15, 16). Tato generace byla nalezena 90-108 h.p.i. a zahrnovala meronty dvou typů. Meronti typu A byli menší než meronti typu B a vždy obsahovali dva dvoujaderné merozoity (obr. 3). Jejich průměrná velikost byla 3,6x4,8 μm . Meronti typu B dávající vznik jednojaderným merozoitům dosahovali průměrné velikosti 4,2x6,4 μm . Uvnitř merontů typu B se nacházelo 3-7 merozoitů (obr. 4).

3. generace

Meronti třetí generace (obr. 17) byli přítomni v epitelových buňkách klků jejunum a ilea 126 h.p.i. V této době byl zaznamenán velký nárůst počtu merontů, což ukazuje na

novou generaci. Opět byly nalezeny dva typy merontů. Tvar, velikost a počet merozoitů se v obou typech výrazně lišil. Průměrná velikost merontů typu A vytvářejících dva až čtyři dvoujaderné merozoity byla $4 \times 5,5 \mu\text{m}$ (obr. 5). Meronti typu B dosahovali ve třetí generaci největších rozměrů $5,6 \times 9,6 \mu\text{m}$ a byli protáhlého oválného tvaru. Meronti typu B dávali vznik 4-16 merozoitům (obr. 6).

4. generace

144 h.p.i. byla čtvrtá generace merontů (obr. 18) objevena v zadní části jejunu a ileu. V této generaci se vyskytovaly dva typy merontů. Dva tlustí dvoujaderní merozoiti byli pozorováni uvnitř merontů typu A (obr. 7). Meronti typu B byli narozdíl od předchozí generace menší ($5,6 \times 8 \mu\text{m}$) a dávali vznik 4-13 merozoitům, kteří obsahovali pouze jedno jádro (obr. 8). V tuto dobu se začali objevovat také mladí gamonti (obr. 18).

4.1.2. Gamogonie

Mladí gamonti byli přítomni 144-162 h.p.i. (obr. 19, 20). Tato stádia měla stejnou lokalizaci jako poslední asexuální generace.

Nejmladší makro- i mikrogamonti obsahovali jedno jádro a byli od sebe navzájem nerozlišitelní. Mladí mikrogamonti byli kulatého až mírně oválného tvaru a vyskytoval se u nich menší počet jader umístěných na periferii buňky (obr. 10). Zralí mikrogamonti byli zaznamenáni 188 h.p.i. (obr. 12).

162 h.p.i. byli také identifikováni mladí makrogamonti sférického tvaru v jejichž cytoplasmě se nacházelo jedno jádro (obr. 9). U zralých makrogamet 188 h.p.i. bylo pozorováno jedno jádro s nápadným jadérkem, které bylo umístěno ve středu buňky (obr. 23). V cytoplasmě bylo velké množství amylopektinových granul. Dále byla pozorována tělíska formující stěnu oocyst dvou typů, která byla méně početná v porovnání s ostatními druhy králičích kokcií. Tělíska prvního typu byla menší a více elektrondenzní než tělíska druhého typu. Dalším rozdílem je umístění těchto tělísek v buňce. Tělíska prvního typu se vyskytují na periferii, kdežto tělíska druhého typu leží volně v cytoplasmě (obr. 11).

4.1.3. Oocysty

188 hodin po inokulaci byly ve střevním epitelu nalezeny tenkostěnné oocysty.

Tabulka 2. Endogenní vývoj *Eimeria exigua*

	h.p.i.	Velikost merontů	Počet merozoitů	Počet jader	Lokalizace
1. generace					
Meronti	72-90	3,5 x 4,6 μm	2	*	duodenum - jejunum
2. generace					
Meronti typu A	90-108	3,6 x 4,8 μm	2	2	jejunum - ileum
Meronti typu B		4,2 x 6,4 μm	3-7	1	
3. generace					
Meronti typ A	126	4 x 5,5 μm	2-4	2	jejunum - ileum
Meronti typ B		5,6 x 9,6 μm	4-16	1	
4. generace					
Meronti typ A	144	4,5 x 5,7 μm	2	2	ileum
Meronti typ B		5,6 x 8 μm	4-13	1	
Gamonti					
Makrogamonti	144-188	5,4 x 7,1 μm	-	-	ileum
Mikrogamonti		5,2 x 6,8 μm	-	-	

* počet jader nebyl zjištěn

5. DISKUZE

Poprvé popsal druh *Eimeria exigua* Yakimoff (1934) na základě morfologie oocyst, které byly kulatého až mírně oválného tvaru. Stěna oocyst byla hladká a postrádala mikropyle. Ve vysporulovaných oocystách se neobjevovalo reziduální tělísko. Jejich průměrná velikost byla 14,5x12,7 µm. Endogenní vývoj nebyl studován.

Oocysty některých kokcií parazitujících u králíků i u zajíců se podobají tvarem i velikostí a proto byla *E. exigua* nejprve považována za kokcií, která dokáže uskutečnit svůj životní cyklus jak v králíkovi tak v zajíci. Pellérdy (1956) a pozdější autoři považují kokcií králíků a zajíců za samostatné druhy. Platí to i pro *E. hungarica*, která se morfologií oocyst podobá *E. exigua*.

Některými autory byl ovšem druh *E. exigua* považován za neplatný, nejčastěji za synonymum *E. perforans* (Chejsin 1967). K tomuto tvrzení nejspíš přispěla podobnost oocyst obou druhů a poměrně vzácný výskyt této kokcií.

Coudert a kol. (1995) se věnovali studiu všech jedenácti platných druhů králíčních kokcií. U *E. exigua* trvala prepatentní perioda 7 dní, doba sporulace při 26°C byla 17 hodin a endogenní vývoj probíhal v ileu. Dále byla zjištěna slabá patogenita tohoto druhu. Velikost oocyst se pohybovala v rozmezí 10-18x11-16 µm.

Dále byly sférické až subsférické oocysty bez mikropyle a reziduálního tělíska pozorovány ve Francii u králíka divokého (Grès a kol. 2000). U králíka vylučující tyto oocysty byly provedeny seškraby ze střevní sliznice, ve kterých byla nalezena endogenní stádia parazita vyskytující se uvnitř jader hostitelských buněk. Endogenní stádia přítomná v jádře byla přiřazena k vylučovaným oocystám a tedy považována za stádia *E. exigua*.

V této práci byl životní cyklus studován s využitím čistého kmene parazita *E. exigua*, SPF králíků a s pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Výsledky ukázaly, že žádná stádia nebyla lokalizována uvnitř jádra. Proto lze usuzovat, že v případě studie Grès a kol. (2000) se může jednat o dosud nepopsaného parazita.

První meronti u *E. exigua* byli v epitelu klků tenkého střeva pozorováni až 72 h.p.i. Pozdní výskyt prvních merontů byl také popsán Pakandlem a kol. (2003) u *E. flavescens*, u které se první generace objevovala 80 h.p.i., u *E. piriformis* (Pakandl a Jelínková 2006) u níž byli první meronti přítomni také až 80 h.p.i. a u *E. irresidua*, u které se meronti první generace vyskytovali 72 h.p.i. (Norton a kol. 1979). Tato prodleva může souviset s dlouhou migrační fází, během níž sporozoitů migrují z místa excystace do místa vývoje první asexuální generace. Teoreticky může během této fáze docházet i k merogonii, v obou

případech pak předpokládáme extraintestinální lokalizaci parazita. Vzhledem k místům a intervalům odběru v našich pokusech lze vyloučit přítomnost parazita ve střevě, ale nikoliv mimo střevo. Průkaz extraintestinálních stádií by vyžadoval použití jiných velmi náročných metod.

E. exigua vytváří dva typy merontů. Meronti typu B dávají vznik více jednojaderným merozoitům, kteří vznikají procesem zvaným ektomerogonie. Pro králičí kokcídie jsou typičtí merozoiti, kteří obsahují více jader. Tito merozoiti se formují uvnitř merontů typu A procesem zvaným endomerogonie. Meronti obou typů byli popsáni i u ostatních druhů králičích kokcidií kromě *Eimeria irresidua*, která nebyla studována pomocí elektronové mikroskopie: *Eimeria stiedai* (Pellérdy a Dürr 1970), *Eimeria perforans* (Streun a kol. 1979), *Eimeria intestinalis* (Pellérdy 1953), (Licois a kol. 1992), *Eimeria coecicola* (Pakandl a kol. 1996a), *Eimeria magna* (Ryley a Robinson 1976, Pakandl a kol., 1996b), *Eimeria media* (Rutherford 1943, Pellérdy a Babos 1953, Pakandl a kol. 1996c), *Eimeria vej dovskyi* (Pakandl a Coudert 1999), *Eimeria flavescens* (Norton, Catchpole a Joyner 1979, Pakandl 2003), *Eimeria piriformis* (Pakandl a Jelínková 2006).

Coudert a kol. (1995) po studiu patogenity králičích kokcidií zařadili druh *E. exigua* spolu s dalšími druhy *E. coecicola*, *E. perforans* a *E. vej dovskyi* mezi kokcídie nepatogenní nebo lehce patogenní. Patogenita úzce souvisí s lokalizací endogenních stádií. Endogenní stádia nepatogenních a lehce patogenních králičích kokcidií *E. perforans* a *E. exigua* se vyskytují v epitelu klků tenkého střeva, v případě *E. coecicola* na povrchu sliznice červovitého přívěsku slepého střeva a Sacculus rotundus. První až třetí generace merontů *E. vej dovskyi* se sice nachází v kryptách ilea, ale množství parazitujících stádií není v přirozených podmínkách tak velké jako v případě posledních dvou generací merontů a gamogonie. Tato stádia se již vyskytují v epitelu klků. Naproti tomu u kokcidií považovaných za vysoce patogenní probíhá převážná většina endogenního cyklu v kryptách, v případě *E. intestinalis* tenkého střeva a u *E. flavescens* tlustého střeva. To patrně souvisí s tím, že zde dochází k dělení a vzniku nových epitelových buněk, a jsou-li napadeny tyto buňky, je regenerace epitelu velmi obtížná.

U oocyst *E. exigua* je známo, že mají krátkou životnost (Coudert a kol. 1995). Ta může souviset s faktem, že stěna oocyst tohoto druhu je tenčí a proto i méně odolná než stěna oocyst ostatních králičích kokcidií. Za vytvoření stěny oocysty jsou zodpovědná tělíška formující stěnu oocysty (wall-forming bodies), která se formují již v makrogamontech. Uvnitř makrogamontů *E. exigua* se nacházelo méně tělíšek formující stěnu oocysty prvního i druhého typu ve srovnání s ostatními druhy kokcidií vyskytujících

se u králíků. To může souviset s tím, že stěna oocyst je relativně tenká a zřejmě i málo odolná.

Pro *E. exigua* jsou charakteristické oocysty velmi malých rozměrů. Ovšem i endogenní stádia dosahovala nejmenších velikostí ve srovnání s ostatními druhy králičích kokcií. V endogenním vývoji *E. exigua* se objevovaly čtyři asexuální generace. Třetí generace merontů byla největší a jejich průměrná velikost byla pouze 5,6x9,6 μm .

E. exigua byla dosud poslední králičí kokcií, u které nebyl popsán endogenní vývoj. Znalosti o vývojových cyklech králičích kokcií jsou touto prací završeny.

6. ZÁVĚR

Endogenní vývoj kokcié *Eimeria exigua* parazitující u králíka (*Oryctolagus cuniculus*) byl studován na úrovni světelné i elektronové mikroskopie s použitím SPF (specific pathogen-free) králíků a čistého kmene druhu *Eimeria exigua*.

Endogenní vývoj nepohlavních i pohlavních stádií této kokcié byl lokalizován v tenkém střevě v epitelu klků. První generace se narodil od zbytku cyklu se vyskytovala především v přední části tenkého střeva. Meronti této generace byli nalezeni ve středních částech klků v epitelu duodena a jejunu. Následující tři generace a gamogonie byly přítomny v epitelu vrchních partií klků od předního jejunu až po zadní ileum s největší koncentrací v distální části tenkého střeva..

První generace merontů byla zaznamenána 72-90 hodin po inokulaci (h.p.i.). Tato generace vytvářela velmi malé meronty pouze se dvěma merozoity. Meronti druhé generace se objevovali 90-108 h.p.i. Uvnitř merontů typu A vznikali dva merozoiti, u nichž byla pozorována dvě jádra. Meronti typu B dávali vznik 4-7 jednojaderným merozoitům. 126 h.p.i. byla zaznamenána třetí generace merontů obou typů. Meronti typu A vytvářeli 2-4 dvoujaderné merozoity a uvnitř merontů typu B vznikalo 4-16 štíhlých merozoitů s jedním jádrem. Meronti typu A dávající vznik dvoum dvoujaderným merozoitům a meronti typu B s 4-12 jednojadernými merozoity se vyskytovali ve čtvrté generaci 144 h.p.i. V průběhu vývoje klesal počet merontů typu A. První mladí gamonti byli přítomni již 144 h.p.i. a mnoho dospělých bylo zaznamenáno 162 h.p.i. Oocysty byly v epitelu střeva 188 h.p.i.

7. LITERATURA

- CORNELISSEN A. W., OVERDULVE J. P., VAN DER PLOEQ M. (1984). Determination of nuclear DNA of five eucoccidian parasites, *Isospora (Toxoplasma gondii)*, *Sarcocystis cruzi*, *Eimeria tenella*, *E. acervulina* and *Plasmodium berghei*, with special reference to gametogenesis and meiosis in *I. (T.) gondii*. *Parasitology*. 88: 531-553.
- COUDERT P., LICOIS D., DROUET-VIARD F. (1995). *Eimeria* species and strains of the rabbits. In: Eckert J., Braun R., Shirley M.W., Coudert P., 1995. Guidelines on techniques in coccidiosis research. European Commission, Directorate-General XII, Science, Research and Development Environment Research Programme, s. 52-71.
- ČERNÁ Ž., SÉNAUD J., (1971). Some peculiarities of the fine structure of merozoites of *Eimeria stiedai*. *Folia parasitol.* 18: 177-178.
- DE VOS A. J. (1970). Studies on the host range of *Eimeria chinchillae* De Vos & Van der Westhuizen, 1968, Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 37: 29-36.
- DÚRR U. (1972). Life cycle of *Eimeria stiedai*. *Acta Vet. Sci. Hung.* 22: 101-103.
- FERNANDO M. A. (1990). *Eimeria*: Infections of the intestine. In: Long P.L. (Ed), *Coccidiosis of man and domestic animals*. CRC Press, London, s. 63-75.
- GOLDMAN M., CARVER R. K. a SULZER A. J. (1958). Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. *J. Parasitol.* 44: 161-171.
- GREGORY M. W. (1990). Pathology of Coccidial infections. In: Long P.L. (Ed), *Coccidiosis of man and domestic animals*. CRC Press, London, s. 235-261.
- GREGORY M. W. a CATCHPOLE J. (1986). Coccidiosis in rabbits: the pathology of *Eimeria flavescens* infection. *Int. J. Parasitol.* 16: 131-145.
- GRÈS V., MARCHANDEAU S., LANDAU I. (2000). The biology and epidemiology of *Eimeria exigua*, a parasite of wild rabbits invading the host cell nucleus. *Parassitologia*. 42: 219-225.
- HAMMOND, D. M. (1973). Life cycles and development of coccidia. In: Hammond D. M., *The Coccidia*. University Park Press, Baltimore and Butterworth & Co., pp. 45-79.
- HAMMOND D. M., SCHOLTYSECK E. a MINER M. L. (1967). The fine structure of mikrogametocytes of *Eimeria perforans*, *E. stiedai*, *E. bovis* and *E. auburnensis*. *J. Parasitol.* 53: 235-247.
- HIBBERT L. E., HAMMOND D. M. a SIMMONS J. R. (1969). The effects of pH, buffers, bile and bile acids on excystation of sporozoites of various *Eimeria* species. *J. protozool.* 16: 441-444.

- CHEJSIN E. M. (1940). Coccidiosis of rabbits III. The developmental cycle of *Eimeria magna*. Uch. Zap. Len. God. Ped. Inst. Gertsena. 30: 65-91.
- CHEJSIN E. M. (1947). Novyj vid kišečnoj kokcidii krolika *Eimeria coecicola*. Dokl. Akad. Nauk SSSR. 55: 181-183.
- CHEJSIN E. M. (1948). Razvitije dvuch kišečnych kokcidij krolika. Uč. Zap. Karelo - Finsk Univ. 3: 179-187.
- CHEJSIN E. M. (1967). Žiznennyje cikly kokcidij domašnych životnych. Izdat. Nauka, Leningrad.
- CHEJSIN E.M. (1972). Life cycles of coccidia of domestic animals, (ed. K.S. Todd Jr). London: Heinemann.
- CHEJSIN E. M., SNIGIREVSKAJA E. S. (1965). Some new data on the fine structure of the merozoites of *Eimeria intestinalis* (Sporozoa, Eimeriidae). Protistologica 1: 121-128.
- KELLY G. L., HAMOND D. M. (1970). Development of *Eimeria ninakohlyakimovae* from sheep in cell cultures. J. Protozool. 17: 340-349.
- LEVINE N. D.(1973). Protozoan parasites of domestic animals and of man. 2nd ed. Burgess , Mineapolis, Minesota, s.406.
- LICOIS D., COUDERT P., BOIVIN M., DROUET-VIARD F., PROVOT F. (1990). Selection and charakterization of a precocious line of *Eimeria intestinalis*, an intestinal rabbit coccidium. Parasitol. Res. 76: 192-198.
- LICOIS D., COUDERT P., BAHAGIA S., ROSSI G. L. (1992). Characterisation of *Eimeria* species in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): endogenous development of *Eimeria intestinalis* Cheissin, 1948. J. Parasitol. 78: 1041- 1046.
- LICOIS D., COUDERT P., DROUET-VIARD F., BOIVIN M. (1994). *Eimeria media*: selection and charakterisation of a precocious line. Parasitol. Res. 80: 48-52.
- LICOIS D., COUDERT P., DROUET-VIARD F.,BOIVIN M. (1995). *Eimeria magna*: pathogenicity, immunogenicity and selection of a precocious line. Vet. Parasitol. 60: 27-35.
- NORTON C. C., CATCHPOLE J., JOYNER L. (1979). Redescriptions of *Eimeria irresidua* Kessel & Jankiewicz, 1931 and *E. flavescens* Marotel & Guilhon, 1941 from the domestic rabbit. Parasitology 79: 231-248.
- OWEN D. (1970). Life cycle of *Eimeria stiedai*. Nature 227: 304.
- PAKANDL M. (1986). Two morphological types of oocyst of rabbit coccidium *Eimeria media* Kessel, 1929. Folia Parasitol. 33: 297-300.

- PAKANDL M. (1988). Description of *Eimeria vejnovskyi* sp.n. and redescription of *Eimeria media* Kessel, 1929 from the rabbit. *Folia Parasitol.* 35: 1-9.
- PAKANDL M. (2005). Selection of a precocious line of the rabbit coccidium *Eimeria flavescens* Marotel and Guilhon (1941) and characterisation of its endogenous cycle. *Par. Res.* 97: 150-155.
- PAKANDL M., AHMED N. EID., LICOIS D., COUDERT P. (1996b). *Eimeria magna* Pérard, 1925: study of the endogenous development of parental and precocious strains. *Veterinary Parasitology* 65: 213-222.
- PAKANDL M., COUDERT P. (1999). Life cycle of *Eimeria vejnovskyi* Pakandl, 1988: electron microscopy study. *Parasitol. Res.* 85: 850-854.
- PAKANDL M., COUDERT P., LICOIS D. (1993). Migration of sporozoites and merogony of *Eimeria coecicola* in gut-associated lymphoid tissue. *Parasitol. Res.* 79: 593-598.
- PAKANDL M., ČERNÍK F., COUDERT P. (2003). The rabbit coccidium *Eimeria flavescens* Marotel and Guilhon, 1941: an electron microscopic study of its life cycle. *Parasitol. Res.* 91: 304-311.
- PAKANDL M., GACA K., DROUET-VIARD F., COUDERT P. (1996a). *Eimeria coecicola* Cheissin 1947: endogenous development in gut-associated lymphoid tissue. *Parasitol. Res.* 82: 347-351.
- PAKANDL M., GACA K., LICOIS D., COUDERT P. (1996c). *Eimeria media* Kessel 1929: Comparative study of endogenous development between precocious and parental strains. *Vet. Res.* 27: 465-472.
- PAKANDL M., JELÍNKOVÁ A. (2006). The rabbit coccidium *Eimeria piriformis*: Selection of a precocious line and life-cycle study. *Vet. Parasitol.* 137: 351-354
- PAKANDL M., LICOIS D., COUDERT P. (2001). Electron microscopic study on sporocysts and sporozoites of parental strains and precocious lines of rabbit coccidia *Eimeria intestinalis*, *E. media* and *E. magna*. *Parasitol. Res.* 87: 63-66.
- PAKANDL M., SEWALD B., DROUET-VIARD F. (2006). Invasion of the intestinal tract by sporozoites of *Eimeria coecicola* and *Eimeria intestinalis* in naive and immune rabbits. *Parasitol. Res.* 98: 310-316.
- PELLÉRDY L. P. (1953) Beiträge zur Kenntnis der Darmkokzidiose des Kaninchens. Die endogene Entwicklung von *Eimeria piriformis*. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 3: 365-377.
- PELLÉRDY L. P. (1956). On the status of the *Eimeria* species of *Lepus europaeus* and related species. *Acta Vet.* 6: 451-467.

- PELLÉRDY L. P., BABOS S. (1953). Untersuchungen über die endogene Entwicklung sowie pathologische Bedeutung von *Eimeria media*. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 3: 173-178.
- PELLÉRDY L. P., DÜRR U. (1970). Zum endogenen Entwicklungszyklus von *Eimeria stiedai* (Lindemann, 1865; Kisskalt & Hartmann, 1907). Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 20: 227-244.
- PIEKARSKI G., PELSTER B., WITTE H. M. (1971). Endopolygenie bei *Toxoplasma gondii*. Z. Parasitenk. 36: 122-130.
- RENAUX S., DROUET-VIARD F., CHANTELOUP N. K., LE VERN Y., KERBOEUF D., PAKANDL M., COUDERT P. (2001). Tissues and cells involved in the invasion of the rabbit intestinal tract by sporozoites of *Eimeria coecicola*. Parasitol. Res. 87: 98-106.
- RUTHERFORD R. L. (1943). The life cycle of four intestinal coccidia of the domestic rabbit. J. Parasitol. 29: 10-32.
- RYLEY J. F., ROBINSON T. E. (1976). Life cycle studies with *Eimeria magna* Pérard, 1925. Z. Parasitenkd. 50: 257-275.
- SÉNAUD J., ČERNÁ Ž. (1969). Etude ultrastructurale des mérozoïtes et de la schizogonie des Coccidies (*Eimeriina*): *Eimeria magna* (Pérard, 1925) de l'intestine des Lapins et *E. tenella* (Raillet et Lucet, 1891) des caecums des poulets. J. Protozool. 16: 155-165.
- SHIRLEY M. W. and LONG P. L. (1990). Control of coccidiosis: Immunization with live vaccines. In: Long P. L. (Ed), Coccidiosis of man and domestic animals. CRC Press, London, s. 321-341.
- SHIRLEY M. W., HARVEY D. A. (1996). *Eimeria tenella*: infection with a single sporocyst gives a clonal population. Parasitology 112: 523-528.
- SCHOLTYSECK E. (1962). Elektron microscope studies on *Eimeria perforans* (Sporozoa). J. Protozool. 9: 407-414.
- SCHOLTYSECK E., HAMMOND D. M., ERNST J. V. (1966). Fine structure of the macrogametes of *Eimeria perforans*, *E. stiedai*, *E. bovis* and *E. auburnensis*. J. Parasitol. 52: 975-987.
- SCHOLTYSECK E., PIEKARSKI G. (1965). Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Merozoiten von *Eimeria stiedai* und *E. perforans* und *Toxoplasma gondii*. Zur systematischen Stellung von *T. gondii*. Z. Parasitenkd. 26: 91-115.
- SCHOLTYSECK E., SPIECKER D. (1964). Vergleichende Elektronenmikroskopische Untersuchungen An Den Entwicklungsstadien Von *Eimeria Perforans* (Sporozoa). Parasitol. Res. 24: 546-560.

- SNIGIREVSKAJA E. S. (1968). The occurrence of micropore in schizonts, microgametocytes, and macrogametes of *Eimeria intestinalis*. Acta Protozool. 5: 381-388.
- SNIGIREVSKAJA E. S. (1969). Elektron mikroskope study of the macrogametes of *Eimeria intestinalis* (Coccidia). Tsitologiya. 11: 63-73.
- SPEER C. A., HAMMOND D. M., ELSNER Y. Y., (1973). Further asexual development of *Eimeria magna* merozoites in cell cultures. J. Parasitol. 59: 613-623.
- STREUN A., COUDERT P., ROSSI G. L. (1979) Characterization of *Eimeria* species. II. Sequential morphologic study of the endogenous cycle of *Eimeria perforans* in experimentally infected rabbits. Z. Parasitenkd. 60: 37-57.
- YAKIMOFF W. L. (1934). *Eimeria exigua* n. sp., eine neue Kaninchenkokzidie, Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.131: 18-24.

8. PŘÍLOHA

Elektronogramy vývojových stádií *Eimeria exigua*. Úsečka = 2 μm .

Obr. 1. Formování merozoitů druhé generace procesem zvaným ektomerogonie, (\rightarrow) nově vznikající merozoiti. n = jádro (nukleus)

Obr. 2. Meront čtvrté generace, uvnitř kterého se formují procesem zvaným endomerogonie dceřiní merozoiti (\rightarrow).

Obr. 3. Druhá generace, meront typ A. Dvě jádra jsou přítomna v jednom merozoitu.

Obr. 4. Meront typu B druhé generace, formující jednojaderné merozoity.

Obr. 5. Třetí generace, meront typ A, merozoiti obsahující dvě jádra. (\rightarrow) vytvářející se dceřiní merozoiti.

Obr. 6. Třetí generace, meront typu B vytvářející jednojaderné merozoity.

Obr. 7. Meront typu A čtvrté generace, merozoiti obsahující dvě jádra.

Obr. 8. Meront typu B čtvrté generace obsahující jednojaderné merozoity.

Obr. 9. Nezralý makrogamont s centrálně uloženým jádrem a jadérkem. nu = jadérko (nukleolus).

Obr. 10. Mladý mikrogamont se sedmi jádry na periferii.

Obr. 11. Zralý makrogamont obsahující jádro, jadérko, tělíska formující stěnu oocysty (wall – forming bodies) typu 1 (WB1) a typu 2 (WB2) a amylopektinová granula (AG).

Obr. 12. Zralý mikrogamont vytvářející (\rightarrow) mikrogamety s bičíky (b).

Snímky histologických a polotenných řezů.

Obr. 13. (x 1050) Histologický řez barvený Harrisovým hematoxylinem a eosinem. (\rightarrow) meront první generace formující dva merozoity.

Obr. 14. (x 1050) Polotenný řez barvený toluidinovou modří, (\rightarrow) meronti první generace.

Obr. 15. (x1050) Polotenný řez barvený Warmkeho polychromem, (\rightarrow) meront druhé generace obsahující dva merozoity.

Obr. 16. (x 1050) Polotenný řez barvený Warmkeho polychromem, (\rightarrow) meront druhé generace vytvářející čtyři merozoity.

Obr. 17. (x 1050) Polotenný řez barvený toluidinovou modří, (\rightarrow) meronti třetí generace.

Obr. 18. (x 1050) Polotenný řez barvený toluidinovou modří. (\rightarrow) čtvrtá generace merontů a (\rightarrow) mladí gamonti.

Obr. 19. (x 1750) Polotekný řez barvený Warmkeho polychromem, (→) mladý mikrogamont.

Obr. 20. (x 1750) Polotekný řez barvený Warmkeho polychromem, (→) mladí makrogamonti.

Obr. 21. (x 1500) Polotekný řez barvený toluidinovou modří, (→) mikrogamont se vznikajícími mikrogametami.

Obr. 22. (x 1500) Polotekný řez barvený toluidinovou modří, (→) mikrogamont, uvnitř ketrého se začínají formovat mikrogamety.

Obr. 23. (x 1500) Polotekný řez barvený Warmkeho polychromem, (→) zralý makrogamont.

Obr. 24. (x 1530) Oocysta obsahující čtyři sporocysty.















