

Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Katedra parazitologie



Molekulární diagnostika motolice velké (*Fascioloides magna*)

Bakalářská práce

Veronika Siegelová

Školitel: RNDr. Martin Kašný, Ph.D.

Konzultantka: RNDr. Ivica Král'ová-Hromadová, CSc.

Praha 2010

Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Martinovi Kašnému, Ph.D. za cenné informace, připomínky, odbornou pomoc a trpělivost při vypracování mé bakalářské práce. Moje díky patří také RNDr. Ivici Kráľové-Hromadové, CSc., MVDr. Evě Bazsalovicsově, Ing. Pavlu Holečkovi a samozřejmě mojí rodině.

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně, na základě uvedené literatury.

V Praze dne 29. 4. 2010

.....
Veronika Siegelová

Obsah

1. Abstrakt	4
2. Úvod	5
3. Charakteristika <i>Fascioloides magna</i> a komparativních modelů	6
3.1. Životní cyklus.....	7
3.2. Komparativní modely.....	9
3.2.1. Hlavní diferenciační znaky <i>F. magna</i> a dalších druhů motolic.....	9
4. Možnosti diagnostiky infekce <i>F. magna</i>	12
4.1. Postupy a metody v diagnostice intravitální přímé.....	13
4.1.1. Sběr koprologického materiálu volně v přírodě.....	13
4.1.2. Získávání koprologického materiálu od konkrétních jedinců.....	14
4.1.3. Zpracování koprologického materiálu.....	15
4.1.4. Mikroskopické vyšetření.....	16
4.2. Postupy a metody v diagnostice intravitální nepřímé.....	16
4.2.1. Izolace DNA.....	16
4.2.2. Molekulárně diagnostické markery.....	19
4.2.3. Analytické molekulárně diagnostické metody.....	24
5. Závěr	28
6. Použitá literatura	29
Příloha:	
Mapování rozšíření <i>Fascioloides magna</i>	36

1. Abstrakt

Fascioloides magna (motolice velká) je veterinárně významný endoparazitický helmint parazitující u řady obratlovců (primárně přežvýkavců), který svým hostitelům může působit vážné zdravotní problémy, jež často vedou až k jejich smrti. Místem definitivní lokalizace dospělců *F. magna* je jaterní tkáň hostitele, kde v pseudocystách dlouhodobě přežívají a produkují vajíčka. Vajíčka odchází z pseudocyst přes žlučovody do střeva a následně opouští tělo hostitele společně s trusem. Diagnostika fascioloidózy je doposud založena především na postmortálním vyšetření jater uhynulých hostitelů. Vhodnou alternativou mohou být některé přímé a nepřímé metody intravitální diagnostiky. S využitím těchto metod lze parazitózu prokázat buď na základě přímého nálezu vajíček v koprologickém materiálu hostitele - mikroskopicky, nebo nepřímo po izolaci parazitární DNA a následné PCR - molekulárně. Molekulárně diagnostické metody rovněž umožňují spolehlivé odlišení nákazy *F. magna* od dalších případných trematodóz (působených např. *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Paramphistomum cervi*).

Klíčová slova:

Trematoda, motolice, *Fascioloides magna*, diagnostika, molekulární techniky, koprologické vyšetření, izolace DNA, PCR, molekulární markery, ITS1, ITS2

Abstract

Fascioloides magna (giant liver fluke) is veterinary important endoparasitic helminth parasitizing in a number of vertebrate species (primarily in ruminants), causing them severe health problems, often leading to death. The *F. magna* adults are mostly localized in the liver tissue of the definitive hosts, where they survive in pseudocysts for a long time and produce eggs. The eggs are released from the pseudocysts via the bile ducts into the gut and then leave the host's body together with faeces. Up to now, the diagnostics of fascioloidosis is primarily based on the dissection of the host's liver. The direct and indirect intravital diagnostic methods could represent an appropriate alternative. Using the intravital diagnostic methods, the parasitosis can be revealed either directly (microscopically) – by discovering the eggs in the host's faeces or indirectly (molecularly) – by isolation of the parasite's DNA and the subsequent PCR. The molecular diagnostic methods also allow the reliable differentiation of *F. magna* infection from the other eventual trematodosis (caused by e.g. *Fasciola hepatica*, *Dicrocoelium dendriticum*, *Paramphistomum cervi*).

Key words:

Trematodes, fluke, *Fascioloides magna*, diagnostic, molecular technics, coprological examination, DNA isolation, PCR, molecular markers, ITS1, ITS2

2. Úvod

Fascioloides magna (Bassi, 1875) je endoparazitický helmint rodu *Fascioloides* (Ward, 1917), řadící se do čeledi *Fasciolidae*, třídy Trematoda, podtřídy Digenea. Český název pro *F. magna* není zcela ustálen, vedle názvu motolice velká se používá i označení motolice obrovská ("giant liver fluke", "large American fluke" či "deer fluke").

Přestože fascioloidóza patří mezi veterinárně významné parazitózy v Evropě i České republice, tak je této problematice, včetně možností diagnostiky a léčby, věnována minimální pozornost.

Cílem této práce je především zhodnocení teoretických možností využití mikroskopických a molekulárních metod pro intravitální diagnostiku *F. magna* a diferenciaci fascioloidózy od jiných trematodóz.

V této práci jsem si vytyčila tyto dílčí cíle:

- A. Utřídit dostupnou literaturu týkající se molekulární diagnostiky *Fascioloides magna*, blízké příbuzné motolice *Fasciola hepatica* (Linné, 1758), dále *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819), *Paramphistomum cervi* (Fischoeder, 1901) a případně dalších parazitárních organismů.**
- B. Na základě literárních údajů navrhnout vhodné metody sběru a zpracování koprologických vzorků (izolace vajíček a DNA *F. magna*, *F. hepatica*, *D. dendriticum*, *P. cervi*).**
- C. Pokusit se definovat využitelnost (výhody/omezení) mikroskopických a molekulárních metod pro diagnostiku *F. magna* z koprologického materiálu.**

3. Charakteristika *Fascioloides magna* a komparativních modelů

Životní cyklus *F. magna* zahrnuje dva hostitele – plže a savce (Swales 1935, 1936). Spektrum mezihostitelů i definitivních hostitelů je poměrně široké a liší se v závislosti na oblasti výskytu *F. magna*. V Severní Americe, kde je *F. magna* původní, jsou nejčastějšími mezihostiteli vodní plži z čeledi *Lymnaeidae* (např. *Lymnaea bulimoides techella*, *L. caperata*, *L. modicella*), v Evropě, kam byla *F. magna* introdukována v 19. století, je to hlavně *Galba truntacula* (bahnatka malá) ze stejné čeledi (Erhardová-Kotrlá 1968a, Foreyt a Todd 1978, Dunkel a kol. 1996, Galaktionov a Dobrovolskij 2003). Mezi možné mezihostitele se v Evropě řadí také *Lymnaea palustris*, *Omphiscola glabra* a *Radix peregra*, jejichž vnímavost k nákaze *F. magna* byla prokázána experimentálně (Faltýnková a kol. 2006, Rondelaud a kol. 2006, Dreyfuss a kol. 2007). Definitivními hostiteli *F. magna* jsou nejčastěji přežvýkavci. Členíme je na 3 základní typy: specifické definitivní hostitele (SDH), nespecifické definitivní hostitele (NDH) a hostitele netypické (aberantní, NH) (Swales 1935, 1936, Pybus 2001, Poláková 2009 Bc. práce). Mezi SDH řadíme většinu druhů z čeledi *Cervidae* (jelenovití). Na území Evropy jsou to především *Cervus elaphus* (jelen lesní), *Dama dama* (daněk evropský) a *Capreolus capreolus* (srnec obecný) (Erhardová-Kotrlá 1971, Novobilský a kol. 2007). Místem definitivní lokalizace *F. magna* je jaterní parenchym SDH, kam migrují juvenilní motolice. Dostanou-li se v játrech do blízkého kontaktu minimálně dvě juvenilní motolice, přestávají migrovat a jaterní tkáň hostitele kolem nich začíná tvořit fibrózní pseudocystu (Swales 1935, Foreyt a kol. 1976). V SDH *F. magna* dokončuje vývojový cyklus a následně dospělé motolice začínají produkovat infekceschopná vajíčka (Erhardová-Kotrlá 1971, Novobilský 2007). Vajíčka z pseudocysty ve velkém množství odcházejí kanálky, kterými jsou pseudocysty napojené na žlučovody, dostávají se do tenkého střeva a jsou vylučovány společně s trusem (Foreyt 1996). Pseudocysty obsahují kromě dospělých motolic a velkého množství vajíček také typickou tmavohnědou tekutinu, vznikající jako důsledek vylučování metabolitů z trávení krve a žluče (hematin a bilirubin), které probíhá ve střevě juvenilních i dospělých motolic (Swales 1935, Pybus 2001, Chroust a Chroustová 2004, Novobilský a kol. 2007). Výjimečně mohou juvenilní motolice napadat kromě jater i jiné orgány hostitele, například plíce, ledviny, páteřní kanál. V těchto případech však nedochází k tvorbě pseudocyst a motolice brzy hynou (Erhardová-Kotrlá 1971, Pybus 2001).

V NDH jsou juvenilní motolice schopné migrovat až do jater, kde se opět tvoří pseudocysty, které však nejsou propojeny se žlučovody, vajíčka nemohou odcházet do střeva

a průběh kompletního životního cyklu parazita je tedy znemožněn (Swales 1935, 1936). NDH v České republice mohou být zejména *Bos taurus* (tur domácí) a *Sus scrofa* (prase divoké), příležitostně *Alces alces* (los evropský) (Swales 1936, Pybus 2001). Následkem migrace juvenilních stádií parazita a tvorby pseudocyst kolem dospělých motolic dochází v případě SDH a NDH často k výrazné degeneraci jaterního parenchymu doprovázené zvětšením jater (Pybus 2001, Novobilský a kol. 2007).

V těle NH juvenilní motolice trvale migrují, čímž hostiteli způsobují rozsáhlá poškození orgánů a tkání (Swales 1936). Mezi NH patří zejména zástupci malých turovitých přežvýkavců, např. *Ovis aries* (ovce domácí) a *Capra hircus* (koza domácí) (Swales 1935, Erhardová-Kotrlá a Blažek 1970, Foreyt a Todd 1976, 1978, Novobilský 2007).

Rozsah patogenního působení *F. magna* závisí především na typu (SDH, NDH, NH) a druhu infikovaného hostitele. Některé druhy spárkaté zvěře, jako např. *Cervus elaphus* (SDH), jsou vůči fascioloidóze odolnější, a i "silná" nákaza (200 ks dospělců *F. magna*) u nich může dlouhodobě probíhat bez zjevných příznaků, zatímco např. pro *Capreolus capreolus* (SDH) může být i "mírná" nákaza (5-10 ks dospělců *F. magna*) fatální (Záhoř 1965, ústní sdělení doc. MVDr. Dušana Rajskeho CSc., 2007, Technická univerzita ve Zvoleni, Slovenská republika). Infekci *F. magna* často provází také další negativní příznaky, kterými mohou být úbytek celkové hmotnosti hostitele a např. i snížení kvality paroží (Erhardová-Kotrlá 1971).

Kromě stabilních ohnisek fascioloidózy v rámci České republiky (hlavně na území jižních Čech) (Ulrich 1930, Erhardová-Kotrlá 1971, Novobilský a kol. 2007) se objevují stále nové lokality s výskytem *F. magna*. Z hlediska postupujícího šíření nákazy *F. magna* představuje vážný epizootologický problém nejen pro volně žijící zvěř, ale také pro oborová a hospodářská zvířata chovaná v ohrožených oblastech (Špakulová a kol. 2003). Jeden ze směrů našeho výzkumu, týkající se monitoringu *F. magna*, geografické šíření nákazy potvrzuje, a to i proto, že léčba (rafoxanidem a mebendazolem tj. Rafendazol premix) je u divoké zvěře v ČR často neefektivní (Novobilský 2007).

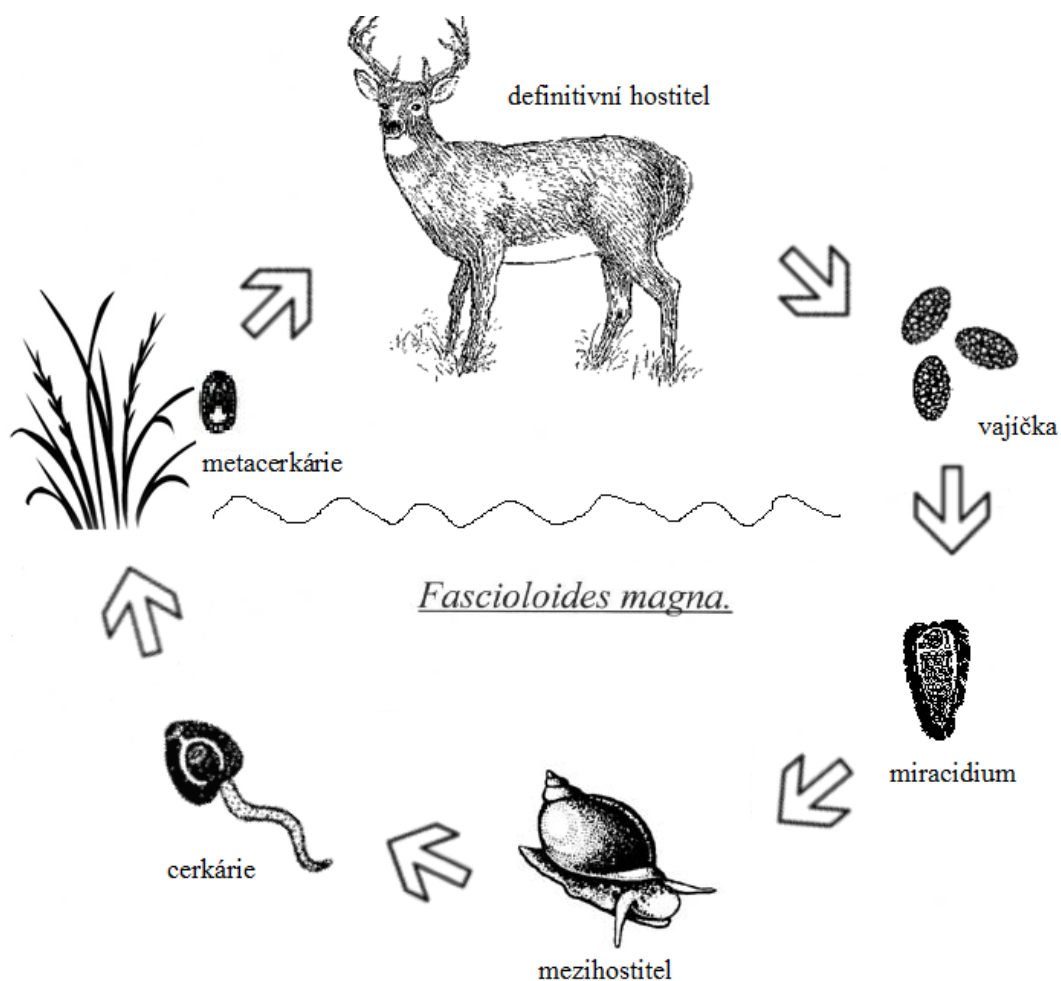
Přestože *F. magna* působí v populacích zvěře významné škody, je celosvětově problematice diagnostiky fascioloidózy věnována prozatím nedostatečná pozornost.

3.1 Životní cyklus *F. magna* (Obr. 1)

Za vhodných teplotních podmínek se ve vajíčku po 4-7 týdnech vyvine obrvená larva (miracidium), která ho opouští operkulátním otvorem, aktivně vyhledává mezihostitele a

proniká do něj. Nenalezne-li vhodného mezihostitele, tak hyne do 16-20 hodin (Yamaguti 1975). Miracidia, která proniknou do plže, odlučují povrchovou vrstvu ciliárních destiček a jejich tělo dále kryje povrchové syncitium (tegument, neodermis). V plži vzniká další vývojové larvální stádium (sporocysta). Sporocysty obsahují zárodečné buňky, které dávají vzniknout jedné až šesti mateřským rediím, ze kterých se vyvíjí redie dceřiné (Erhardová-Kotrlá 1968a, Novobilský 2007). Výsledkem tohoto asexuálního množení je produkce larválních stádií (cerkárií), které aktivně opouštějí mezihostitelského plže. Ve vnějším prostředí se cercárie encystují na pevném podkladu (např. vegetaci), čímž vzniká stádium metacerkárie (Swales 1935, Erhardová 1971, Galaktionov a Dobrovolskij 2003). Metacerkárie mohou přežít ve vlhkém prostředí až 2,5 měsíce (Erhardová-Kotrlá 1968b). Definitivní hostitel se nakazí pozřením vegetace s metacerkáriemi. V tenkém střevě se metacerkárie uvolňují z ochranných obalů, transformují se na juvenilní motolice, které migrují střevní stěnou a dalšími tkáněmi až do jater, kde v pseudocystách pomalu rostou a vyvíjí se v dospělce, čímž se životní cyklus uzavírá.

Obr. 1. Životní cyklus *Fascioloides magna*



3.2 Komparativní modely

Za účelem ověření využitelnosti molekulárních metod pro diagnostiku fascioloidózy byly vybrány komparativní modely motolic, jejichž výskyt se v rámci České republiky překrývá s výskytem *F. magna*, které mohou podobně parazitovat jak u volně žijících, tak i hospodářských zvířat, a jejichž vajíčka jsou na základě koprologického vyšetření a následného mikroskopického pozorování obtížně rozlišitelná (Hood a kol. 1997, Pybus 2001, Novobilský a kol. 2007). Mezi tyto modely byly zařazeny; *Fasciola hepatica* (motolice jaterní, čeleď *Fasciolidae*) – blízcě příbuzná *F. magna*, *Dicrocoelium dendriticum* (motolice kopinatá, čeleď *Dicrocoeliidae*) a *Paramphistomum cervi* (motolice jelení, čeleď *Paramphistomidae*).

3.2.1 Hlavní morfologické (diferenciační) znaky *F. magna* a komparativních druhů motolic (Obr. 2 a Obr. 3)

Na základě morfologie lze dospělé *F. magna* snadno odlišit od komparativních modelů *F. hepatica*, *D. dendriticum* a *P. cervi*. Dospělé motolice *F. magna*, přežívající v jaterních pseudocystách SDH, dosahují rozměrů 25-100 x 20-35 mm (Erhardová-Kotrlá 1971, Pybus 2001, Chroust a Chroustová 2004, Novobilský 2007). Tělo dospělců je pokryto tegumentem červenohnědé barvy (Jones a kol. 2001, Pybus 2001, Novobilský 2007). Svým vzhledem je *F. magna* nejvíce podobná *F. hepatica* ze stejné čeledi *Fasciolidae*. Hlavními diferenciačními znaky jsou; odlišné rozměry dospělých jedinců, absence hlavového výběžku na předním konci těla v případě *F. magna*, odlišné uložení vitelárií a varlat. U rodu *Fascioloides* jsou vitelária uložena pouze na ventrální straně, zatímco rod *Fasciola* je má jak na ventrální, tak i na dorzální straně těla. Varlata má *F. magna* umístěna vedle sebe, na rozdíl od *F. hepatica*, která je má umístěna za sebou (Kearn 1998, Jones a kol. 2001, Špakulová a kol. 2003).

Důležitým diagnostickým znakem nákazy je v případě všech čtyř výše uvedených druhů motolic důkaz přítomnosti vajíček v trusu SDH při koprologickém vyšetření. Vajíčka *F. magna*, *F. hepatica* a *P. cervi* si jsou velmi podobná nejen svým tvarem, ale i rozměry. *F. magna* produkuje oválná, žlutohnědá operkulární vajíčka o rozměrech 120-185 μm \times 70-90 μm (Erhardová-Kotrlá 1971, Pybus 2001, Špakulová a kol. 2003). Obsah vajíčka je stejně jako v případě *F. hepatica*, *D. dendriticum* a *P. cervi* vyplněn četnými žlutkovými granulemi (Bonita a Taira 1996, Valero a kol. 2009).

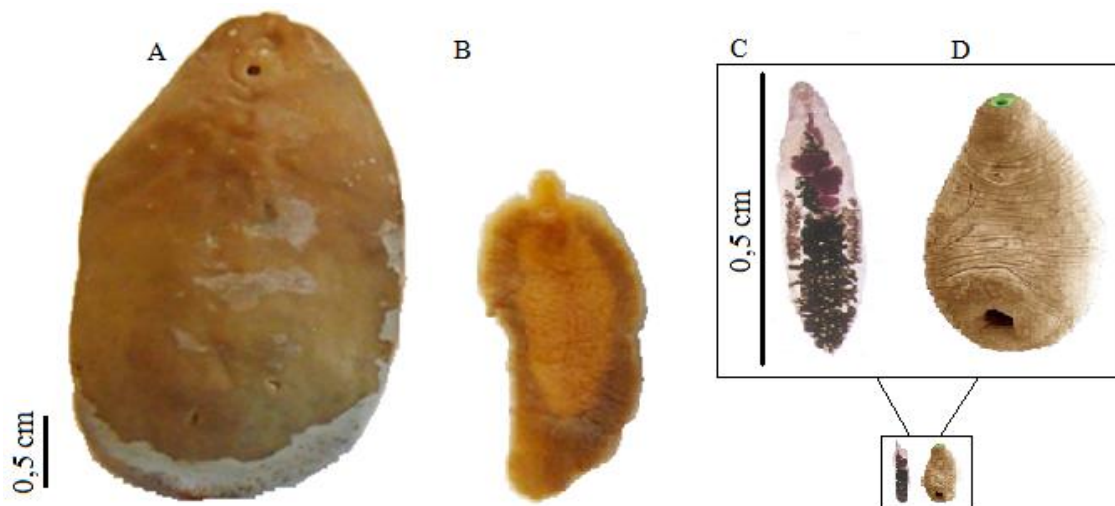
Fasciola hepatica: Místem definitivní lokalizace této motolice jsou nejčastěji žlučovody ovcí, skotu a dalších savců (včetně člověka), juvenilní motolice můžeme však nalézt i přímo

v jaterním parenchymu. Dospělci dosahují rozměrů 20-40 x 8-13 mm, tělo má šedohnědou až zelenohnědou barvu. Na předním konci těla je zřetelný hlavový výběžek. Vajíčko *F. hepatica* je oválného tvaru, žlutohnědé barvy, o velikosti 128–142 μm x 68–82 μm (Erhardová-Kotrlá 1971, Pybus 2001). Na jednom pólu je opatřené operkulem (Pybus 2001, Valero a kol. 2009).

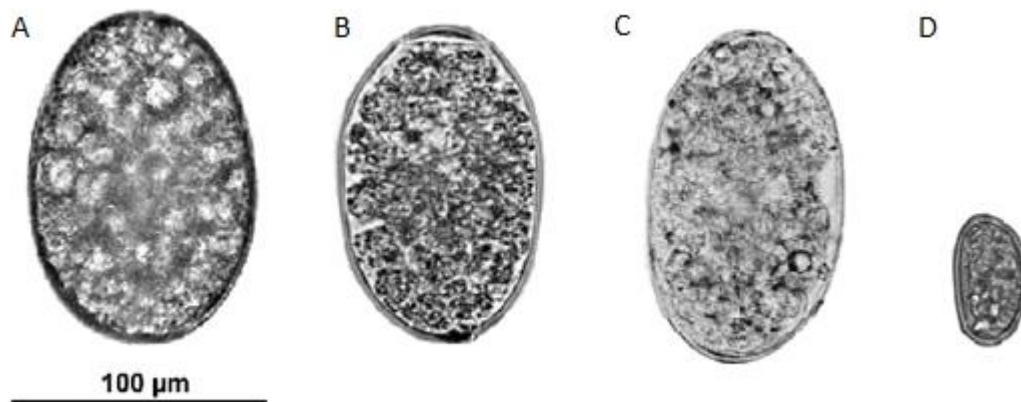
Dicrocoelium dendriticum: Tato motolice parazituje především u přežvýkavců (nejčastěji u *Ovis musimon* a *O. aries*), ale může napadat i ostatní savce, výjimečně i člověka (Mapes 1951, Erhardová-Kotrlá 1971, Nilsson 1971, Cengiz a kol. 2010). Dospělí jedinci přežívají ve žlučovodech, žlučníku a ve slinivce (Pybus 2001, Ducháček a Lamka 2003). Tělo *D. dendriticum* dosahuje rozměrů 8-10 x 1,5-3 mm, má kopinatý tvar a jejím tělním pokryvem prosvítají zřetelně všechny orgány (Erhardová-Kotrlá 1971). Operkulární, asymetricky oválná, tmavě hnědá vajíčka *D. dendriticum* o rozměrech 36-45 μm x 20-30 μm jsou nápadně menší a odlišná od *F. magna*, *F. hepatica* a *P. cervi*. (Mapes 1951).

Paramphistomum cervi: Na rozdíl od výše uvedených motolic je tento helmint řazen mezi parazity gastrointestinálního traktu. Juvenilní stádia se nachází ve dvanáctníku a slezu, kde po dobu 6-8 týdnů dospívají, zatímco dospělé jedince nalezneme nejčastěji v bachoru nebo v jednotlivých částech předžaludků přežvýkavců (Erhardová-Kotrlá 1971). Dospělé motolice dosahují velikosti 10-15 x 2-5 mm a produkují operkulární vajíčka o rozměrech 114-176 μm x 73x100 μm (Olsen a kol. 1962, Burgu 1981).

Obr. 2. Dospělci: A – *Fascioloides magna*, B – *Fasciola hepatica*, C – *Dicrocoelium dendriticum* (foto Parasitologia veterinaria, www.jcastella.uab.cat), D – *Paramphistomum cervi* (foto Kaufmann, www.wurmkur-tiere.de).



Obr. 3. Vajíčka: A – *Fascioloides magna*, B – *Fasciola hepatica* (foto Janssen, www.rvc.ac.uk), C – *Patamphistomum cervi* (foto Janssen, www.rvc.ac.uk), D – *Dicrocoelium dendriticum* (foto Calvo and Pini, www.cdfound.to.it).

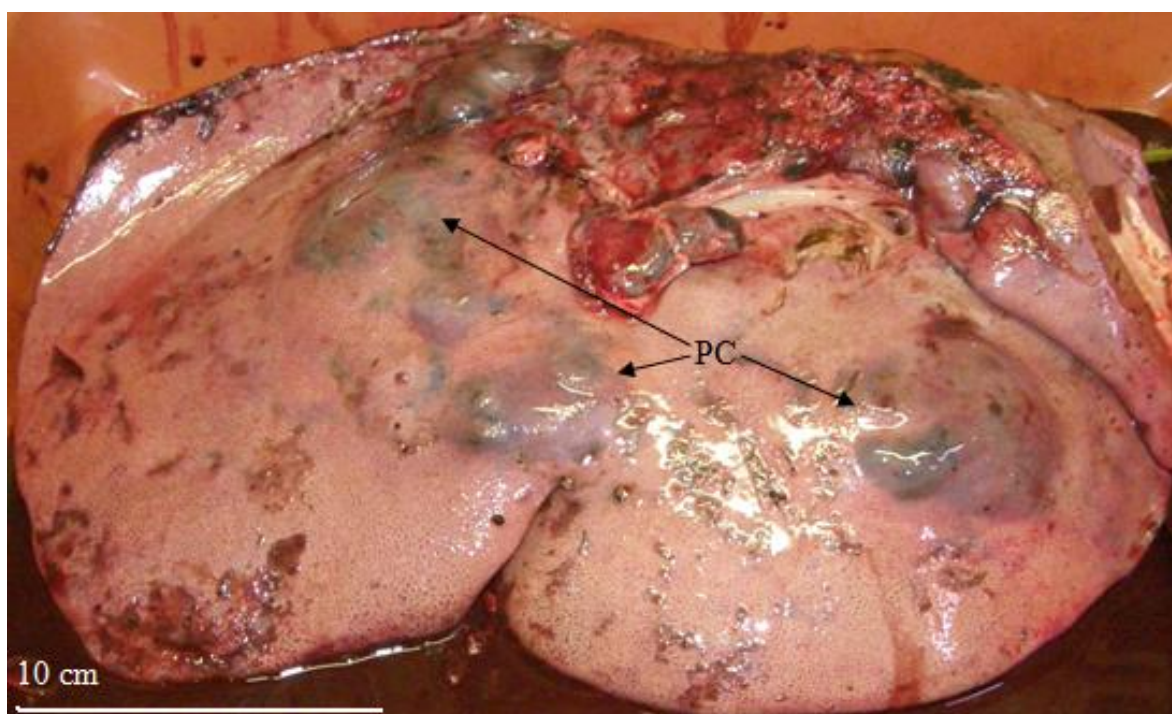


4. Možnosti diagnostiky infekce *F. magna*

Diagnostika *F. magna* je u SDH doposud založena zejména na postmortálním patologicko-morfologickém vyšetření jater odlovených či uhynulých jedinců a na často "anonymním" intravitálním mikroskopickém vyšetření vzorku trusu (tj. z náhodně odebraného vzorku trusu, který nelze přiřadit ke konkrétnímu jedinci). Pro nasazení efektivní léčby fascioloidózy by však bylo vhodné *F. magna* diagnostikovat intravitálně "neanonymně" (tj. ze vzorku trusu, který lze přiřadit ke konkrétnímu jedinci), přičemž spolehlivý a specifický diagnostický test nebyl zatím vyvinut.

Nejspolehlivější metodou pro zachycení infekce *F. magna* je pato-anatomické vyšetření definitivního hostitele s přímým nálezem pseudocyst a motolic v jaterním parenchymu (Pybus 2001, Horáčková 2007 diplomová práce). Jaterní pseudocysty jsou často dobře viditelné a rozeznatelné už při prvním ohledání jaterní tkáně (Obr. 4). Kromě přímého nálezu živých či mrtvých motolic je důležitým diagnostickým znakem výskyt tmavého zabarvení, pigmentu, na povrchu i uvnitř orgánů břišní a hrudní dutiny, nejčastěji však právě na játrech (Swales 1935). Při infekcích definitivních hostitelů dalšími druhy motolic, vyskytujících se v České republice (*F. hepatica*, *D. dendriticum*, *P. cervi*), tyto patologické změny nastávají výjimečně (Chroust a Chroustová 2004).

Obr. 4. Játra *Cervus elaphus* poškozená v důsledku infekce *F. magna* (foto Kašný). PC; pseudocysta.



Přestože jsou intravitální diagnostické metody pro některé z komparativních modelů zahrnutých v této práci (*F. hepatica* a *D. dendriticum*) běžně používány v klinické praxi, v diagnostice infekce *F. magna* jednoduchá, spolehlivá a snadno reprodukovatelná intravitální metoda zatím chybí (Strauss a kol. 1999, Ubeira a kol. 1999, Broglia a kol. 2009). K intravitální diagnostice *F. magna* se využívají jak metody přímé, tak nepřímé. Přímé diagnostické metody jsou založeny na zachycení vajíček *F. magna* při koprologickém vyšetření. Mezi nepřímé diagnostické metody, dosud nevyužívané pro zaznamenání nákazy *F. magna*, řadíme např. metody biochemické, hematologické, imunologické a molekulární (Qureshi a kol. 1995, Olson a Tkach 2005, Horáčková 2007 diplomová práce, Novobilský a kol. 2007).

4.1 Postupy a metody v diagnostice intravitální přímé

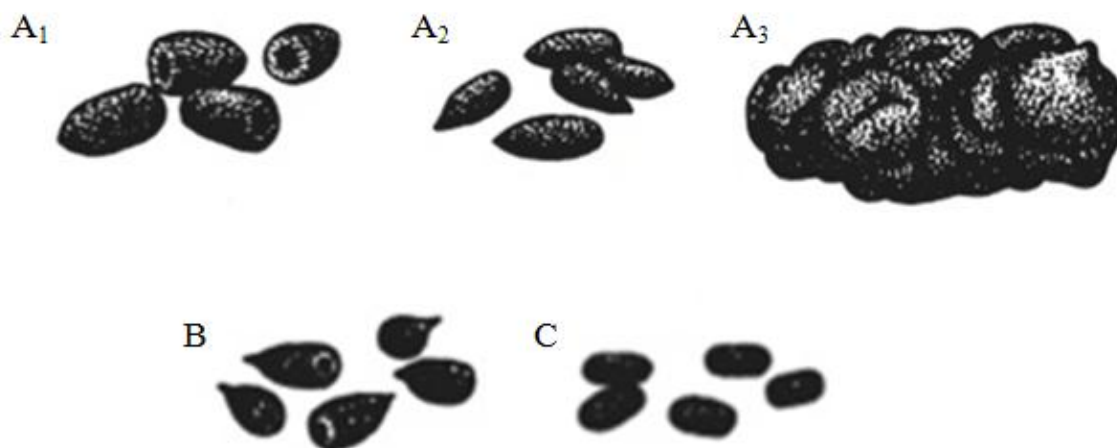
Mezi přímé metody diagnostiky fascioloidóz řadíme především nález vajíček v trusu hostitele. Zatímco ve vzorku trusu SDH je možné nalézt vajíčka *F. magna*, u NDH nejsou pseudocysty propojeny žlučovody se střevem a vylučování vajíček do vnějšího prostředí je znemožněno. U NH juvenilní motolice *F. magna* neustále migrují a nedospívají do stádia, kdy by mohly vajíčka produkovat.

4.1.1 Sběr koprologického materiálu volně v přírodě

Materiál pro účely koprologického vyšetření se odebírá na lokalitách, kde se pohybuje potenciálně nakažená zvěř (SDH). Konkrétními místy ideálními pro odběr trusu je okolí krmných zařízení nebo migrační stezky, tj. místa zvýšené koncentrace zvěře. Vhodným obdobím pro sběr trusu jsou z těchto důvodů zimní měsíce se stabilní sněhovou pokrývkou. Navíc trus jednotlivých druhů SDH odebraný v zimním období lze spolehlivě rozlišit (Obr. 5). Vzorky trusu je pak možné uchovávat v chladu (do 4°C) nebo zamražené (-20°C) až po dobu několika měsíců, aniž by vajíčka motolic přítomná v trusu degradovala. Metoda náhodného ("anonymního") sběru koprologického materiálu má však tu nevýhodu, že nelze přiřadit určitý vzorek ke konkrétnímu jedinci. Pokud je vzorek trusu pozitivní z hlediska přítomnosti vajíček, tak lze usuzovat, že je nakaženo více jedinců z populace vyskytující se v oblasti, odkud vzorek pochází. *Cervus elaphus*, *Dama dama* i *Capreolus capreolus* jsou totiž stádová zvířata. Stádo se chodí pást většinou společně a pro všechny jedince tak existuje

podobná pravděpodobnost, že se v místě výskytu metacerkárií *F. magna* nakazí (ústní sdělení Ing. Adam Jirsa, Správa NP Šumava).

Obr. 5. Trus specifických definitivních hostitelů: $A_{1,2,3}$ – *Cervus elaphus* (A_1 ; samec, A_2 ; samice, A_3 ; letní trus), B – *Dama dama*, C – *Capreolus capreolus* (www.freewebs.com/ivanhoracek/PDF/PNS-8.pdf).



4.1.2 Získávání koprologického materiálu od konkrétních jedinců

Odběr trusu z konkrétního ("neanonymního") jedince je realizovatelný prostřednictvím přímého pozorování nebo imobilizace jedince. Zatímco odběr na základě přímého pozorování stále přináší riziko zaměnění vzorku, je původ vzorku odebraného z imobilizovaného jedince nezpochybnitelný. Odběr trusu imobilizovanému jedinci je pro nás možný zejména díky telemonitorovacímu projektu, který probíhá v NP Šumava (www.npsumava.cz), s jehož správou je náš výzkumný tým v kontaktu. V rámci tohoto projektu pracovníci NP Šumava dlouhodobě značí jelení a srnčí zvěř obojkem s integrovaným GPS-přijímačem, který umožňuje sledovat její přesný pohyb a aktivitu (obojky jsou vybaveny dvěma pravoúhle orientovanými senzory, které reagují na zrychlení a registrují pohyby zvířete). Před nasazením obojku či jeho výměnou je jedinec vždy nejdříve imobilizován narkotizační střelou a při této příležitosti je možné odebrat i vzorek trusu. Vedení NP Šumava vyjádřilo ochotu podílet se tímto způsobem na monitoringu fascioloidózy a jejího případného vlivu na nakažené jedince. Od této spolupráce si v budoucnu slibujeme především možnost sledovat vliv nákazy na aktivitu konkrétního jedince a jeho migraci dokumentující případné šíření parazita na další lokality.

4.1.3. Zpracování koprologického materiálu

Před vlastním mikroskopickým vyšetřením i před aplikací molekulárně diagnostických metod je nutné odebraný koprologický materiál vhodně zpracovat. Zatímco zpracování koprologického materiálu se pro účely mikroskopického vyšetření omezuje pouze na základní koncentrační metody, je příprava výchozího vzorku (tj. izolované parazitární DNA) pro molekulárně diagnostickou analýzu metodologicky náročnější.

Sedimentační metoda: Tato metoda využívá gravitace a hustoty roztoku k tomu, aby se vajíčka motolic koncentrovala - sedimentovala na dně nádoby. Trus se rozmíchá s vodou, zcedí se přes sítko, čímž se oddělí větší zbytky potravy (zachytávají se v sítku) od menších částí s vajíčky. Suspenze se nechá odstát, aby mohla vajíčka sedimentovat. Po 5 minutách se ze dna nádoby pipetou odebere několik kapek vzorku, který se nanese na podložní sklíčko, přikryje krycím sklíčkem a prohlíží v optickém mikroskopu při zvětšení 100 - 400x (Thienpont a kol. 1980, Anh a kol. 2008).

Pokud se s využitím sedimentační metody nepodaří vajíčka zachytit, doporučuje se zopakovat koncentraci vajíček metodou flotační.

Flotační metoda: Metoda se často využívá k celkovému parazitologickému vyšetření trusu na přítomnost parazitárních útvarů helmintózního původu, včetně vajíček motolic (Yılmaz a Gödekmerdan 2004). Je založena na principu flotačních roztoků, které mají vyšší specifickou hmotnost než vajíčka. Při zpracování vzorku trusu touto metodou se vajíčka vyplaví na povrch obsahu zkumavky a zkoncentrují se v povrchové blance. Jako flotační médium se používá například thiosíranový nebo Sheatherův roztok (roztok cukru o specifické hmotnosti 1,15 g/cm³). Vzorek trusu se navlhčí několika kapkami vody, důkladně rozmělní a poté se rozmíchá v dalším množství vody. Suspenze se zcedí přes jemné sítko nebo gázu a centrifuguje se 2 minuty při nízkých otáčkách (70 g). K sedimentu se pak přidá několik mililitrů vody a smíchá se s flotačním roztokem tak, aby hladina dosahovala těsně pod okraj zkumavky a vzorek se centrifuguje (300 g, 5 min). Po centrifugaci se opatrně dolije flotační roztok do zkumavky tak, aby bylo možné na meniskus tekutiny přiložit krycí sklíčko, na kterém vajíčka ulpí. Krycí sklíčko pak přiložíme na podložní sklíčko a mikroskopujeme, opět při zvětšení 100 - 400x (Faust a kol. 1938, 1939, Wobeser 1985).

4.1.4 Mikroskopické vyšetření

Intravitální diagnostika fascioloidózy je doposud závislá pouze na mikroskopickém vyšetření a klasifikaci vajíček v koprologickém materiálu SDH (Wobeser a kol. 1985, Foreyt 1996, Mas-Coma a kol. 1999). Vajíčka *F. magna* jsou však nesnadno odlišitelná od vajíček *F. hepatica* a *P. cervi*, případně *D. dendriticum* (Kaufmann 1996, Pybus 2001, Kráľová-Hromadová a kol. 2008). Navíc jednotlivé druhy hostitelů motolic (zejména *F. magna* i *F. hepatica*) mohou mít vliv jak na morfologii dospělců, tak i vajíček (změna velikosti i tvaru vajíčka), což ještě více komplikuje možnost mikroskopické diferenciaci (Valero a kol. 2001, Valero a kol. 2009). Obtížná diferenciaci vajíček jednotlivých druhů motolic je velkou nevýhodou mikroskopického vyšetření. Na druhou stranu, nespornou výhodou mikroskopického vyšetření je časová nenáročnost a nízké finanční náklady. Výsledky mikroskopického vyšetření je vhodné potvrdit nepřímými, avšak vysoce selektivními diagnostickými metodami, např. molekulárně.

4.2 Postupy a metody v diagnostice intravitální nepřímé

Molekulární metody jsou v parazitologii často využívány pro identifikaci a diferenciaci jednotlivých parazitárních organismů, včetně motolic (Kráľová-Hromadová a kol. 2008, Lotfy a kol. 2008). Těmito metodami je teoreticky možné diagnostikovat nákazu *F. magna*, *F. hepatica*, *P. cervi* a *D. dendriticum* např. na základě průkazu přítomnosti DNA pocházející z vajíček motolic v trusu SDH. Níže uvedené molekulární metody vždy kombinují metody izolace parazitární DNA a jejího využití pro identifikaci nákazy pomocí např. druhově specifických primerů a PCR.

4.2.1 Izolace DNA

Nukleové kyseliny jsou přítomny v jádře a v různých buněčných kompartmentech (např. mitochondrie, plastidy). Na základě zvolené metody je možné izolovat DNA z konkrétního kompartmentu nebo z celé buňky. Při izolaci DNA je třeba volit vhodnou metodu v závislosti na typu buněk, ze kterých má být DNA izolována, požadované čistotě a množství finální DNA. Existuje mnoho různých metod purifikace DNA, ale jejich základní rysy jsou společné. Pro získání obsahu vnitřního prostředí buňky je třeba rozrušit (zlyzovat) cytoplasmatickou membránu například slabými neiontovými detergenty (Alberts a kol. 1998, Šmarda a kol. 2008). Za účelem degradace a odstranění proteinů z buněčných lyzátů se vzorek inkubuje, např. s proteinázou K.

Mezi nejpoužívanější metody izolace DNA patří metody založená na fenol-chloroformové extrakci a metody využívající absorpce DNA na silikátových membránách.

Izolace DNA z dospělců fenol-chloroformovou metodou: Hlavním principem metody je nemísitelnost organického rozpouštědla (chloroformu) s vodným roztokem buněčného lyzátu, takže se směs, obsahující vzorek, po důkladném protřepání rozdělí na dvě fáze – horní vodnou fází obsahující DNA a dolní fenol-chloroformovou s vysráženými proteiny a dalšími zbytky tkáně (Alberts a kol. 1998, Šmarda a kol. 2008).

Vstupní materiál pro izolaci DNA (např. část dospělé motolice *F. magna*) je nutné nejprve homogenizovat ve vodném prostředí (pufru) s obsahem tensidu (např. dodecylsírán sodný, SDS), který rozpouští buněčné membrány. Lýza buněk a degradace proteinů je zajištěna inkubací vzorku s proteinázou K a dithiothreitem. Proteiny je pak možné vysrážet protřepáním v přítomnosti roztoku fenolu a chloroformu. Po protřepání se roztok centrifuguje pro dokonalé oddělení fází (na rozhraní mezi fázemi se objeví bílý prstenec sražených proteinů). Horní vodná fáze obsahující DNA je přenesena do nové čisté zkumavky. Protože i stopové zbytky fenolu mohou interferovat s PCR, je nutné vzorek nakonec přečistit protřepáním se samotným chloroformem. Z přečištěného vodného roztoku je možné DNA dále vysrážet přidáním 3M roztoku octanu sodného a koncentrovaného etanolu, čímž je po centrifugaci získán pelet (precipitát) DNA přítomný na dně zkumavky. Promytím peletu izolované DNA 70% etanolem jsou odstraněny soli. Po odebrání a odpaření zbytkového etanolu lze DNA rozpustit ve vodě, a takto upravenou uchovat při -20°C, či dále využít (Sambrook a kol. 1989, Capuano a kol. 2007).

Izolace DNA z dospělců pomocí komerčních kitů: Izolace DNA pomocí většiny komerčních kitů (např. QIAamp DNA mini kit, QIAGEN) je založena na procesu absorpce DNA na silikátové membrány v izolačních kolonkách, následném promytí a eluci DNA. Nespornou výhodou komerčních izolačních kitů je časová a uživatelská nenáročnost, naopak nevýhodou může být vyšší pořizovací cena kitu.

Izolace DNA z vajíček v koprologickém materiálu: Výhodou izolace DNA z koprologického materiálu je relativně rychlá časová proveditelnost (několik hodin) a možnost její realizace v každé základně molekulárně vybavené laboratoři. Metoda izolace parazitární DNA z koprologického materiálu a následné PCR zatím nepatří k rutinním diagnostickým

metodám, její využití ve vědecko-výzkumné oblasti však stoupá (Verma 2003, Tang a kol. 2008).

Izolaci DNA z komplexního koprologického vzorku znesnadňuje zejména velké množství nečistot, žlučových solí a polyfenolických příměsí, které je nutné před započítím izolace DNA co nejvíce eliminovat (Deuter a kol. 1995, Verma a kol. 2003). Pro odstranění nečistot se používají absorpční činidla jako např. InhibitEX matrix (QIAGEN). Předčištěný vstupní materiál je často nezbytné ještě dále zpracovat. V případě izolace DNA z vajíček motolic přítomných v koprologickém vzorku (*F. magna*, *F. hepatica*, *D. dendriticum* a *P. cervi*) je např. nutné rozrušit stěny vajíček (např. přidáním detergentu či mechanickou homogenizací), aby pak mohlo dojít i k degradaci proteinů (např. inkubací předčištěného vstupního materiálu v 70°C, po dobu 10 min za přítomnosti proteinázy K). V dalších krocích je nutné DNA přečistit a zkoncentrovat. Výsledkem takové izolace je pak získání nejen parazitární DNA pocházející z vajíček motolic, ale i DNA z jiných organismů či jejich zbytků přítomných v koprologickém materiálu.

Přestože se tyto metody izolace DNA teprve rozvíjejí, tak již byla publikována řada prací zabývajících se izolací DNA mnoha druhů parazitárních organismů ze směsných (koprologických) vzorků. Zatímco samotná izolace DNA je v dostupných pracech popisována podobně, postupy přečištění, zkoncentrování a další úpravy vzorků před samotnou izolací se liší. Deuter a kol. (1995) např. testoval čtyři typy absorpční matrix (inaktivní BSA - bovine serum albumin, celulózu, bramborový škrob a bramborovou moučku), které by mohly absorbovat nečistoty (např. žlučové soli) a odstranit je během extrakce lidské chromozomové DNA. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s DNA získanou po absorpci nečistot bramborovou moučkou. Blank a kol. (2009) předčišťoval vstupní materiál pro izolaci DNA z vajíček *Schistosoma mansoni*. Trus s vajíčky *S. mansoni* byl nejdříve zhomogenizován v přebytku 2 % roztoku NaCl a zcezen přes jemná sítká o velikostech ok 420 µm až 50 µm, přičemž v posledním sítku s nejmenšími oky se vajíčka *S. mansoni* (100 x 70 µm) zachytila. Poté byly vzorky přečištěny vzestupnou řadou 10%-70% Percoll roztoku. Po závěrečné centrifugaci se na dně zkumavky vytvořil pelet s vajíčky, který byl opět promyt v 2% NaCl. DNA z vajíček byla dále izolována běžným postupem vhodným pro izolaci DNA z koprologického materiálu. Müller a kol. (2007) popsal rychlou metodu izolace DNA z vajíček motolic čeledi Opisthorchiidae (*Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, *O. felineus*), rovněž bez použití složitých chemikálií. Trus byl inkubován ve 2 ml mikrozkuhavce s 2% roztokem Triton X-100 a 25 mM KOH. Suspenze byla centrifugována a sediment byl třikrát promyt roztokem 2% Triton X-100 a 25 mM KOH. K sedimentu s vajíčky byl přidán roztok

sacharózy/KCl o hustotě 1.39 g/ml. Během následné centrifugace byla vajíčka rozptýlena v roztoku a oddělena od ostatních sedimentujících částí koprologického materiálu. Supernatant obsahující vajíčka byl přenesen do nové 2 ml mikrozkušavky a byl doplněn vodou až po okraj a opět centrifugován. Přidáním vody se snížila hustota roztoku a vajíčka sedimentovala ke dnu. Tímto způsobem předčištěná vajíčka byla homogenizována a směs centrifugována. Supernatant byl následně ještě povařen ve vodní lázni pro inaktivaci hydrolytických enzymů obsažených v trusu. Takto upravený vzorek byl již přímo použit v PCR reakci jako templát. Bylo zjištěno, že touto metodou je možné amplifikovat DNA z jednoho vajíčka na 0,1 g vzorku trusu. [Dyachenko a kol. \(2008\)](#) izoloval vajíčka tasemnic (*Echinococcus multilocularis*, *E. granulosus* a *Taenia* spp.) z trusu psů. Vajíčka tasemnic byla zkoncentrována standardní flotační metodou, promyta 0,9% roztokem NaCl a centrifugována. Suspenze vajíček byla smíchána s 25 1M KOH a 1M dithiotreitol a inkubována (65°C, 10 min), čímž bylo dosaženo zlyzování vajíček. Zásaditý lyzát byl zneutralizován přidáním 2 M Tris-HCl (pH 8.3) a 10 M HCl. K suspenzi byl přidán extrakční pufr guanidinium thiokyanátu a vzorek byl opět inkubován. Poté byl přidán 100% EtOH a křemičitá suspenze. Vzorek byl dále inkubován, centrifugován, následně opět promyt guanidinium thiokyanátovým pufrem a dvakrát 70% EtOH. Poté byl supernatant odstraněn a k peletu byl po vysušení přidán TE pufr (10mM Tris, 1mM EDTA). Takto izolovaná DNA byla použita pro PCR amplifikaci.

Parazitární DNA *F. magna*, *F. hepatica*, *D. dendriticum* a *P. cervi* přítomná v koprologickém materiálu pocházející především z vajíček těchto motolic bude v budoucnu izolována pomocí [QIAamp DNA Stool Mini Kitu \(QIAGEN\)](#). Výtěžnost DNA by mohla zvýšit i preinkubace trusu ve vodném prostředí (14 dní, při teplotě 25°C) až do vylihnutí miracií studovaných motolic, která je možno zkoncentrovat pod světlem, a pak pokračovat ve vlastní izolaci DNA z těchto larválních stádií ([ústní sdělení RNDr. Marty Špakulové, CSc.](#)).

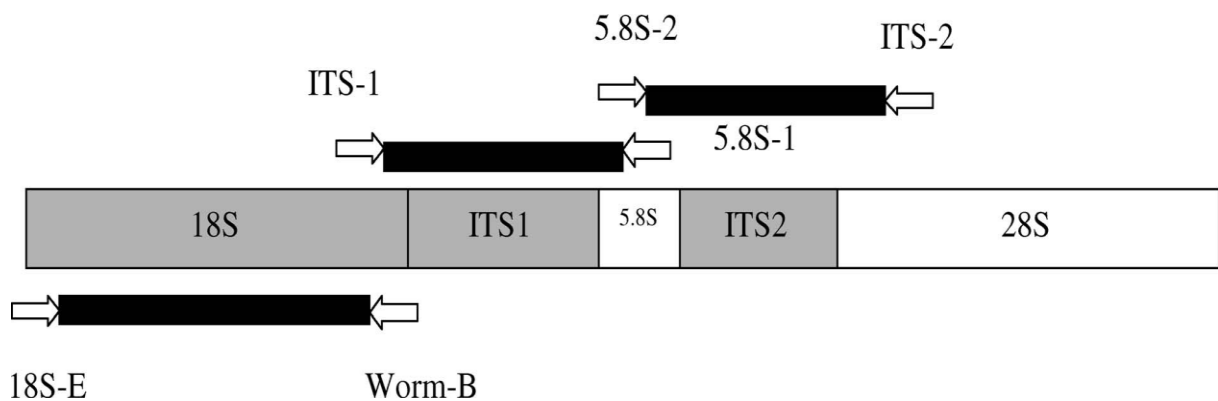
4.2.2 Molekulárně diagnostické markery

Možnost využití molekulárně diagnostických markerů je dána předpokladem existence polymorfismu na úrovni DNA jednotlivých druhů organismů. Takovými markery jsou určité specifické nukleotidové sekvence v genomu daného organismu, které mohou být variabilní jak mezi jedinci různých druhů organismů (mezidruhová variabilita), tak i mezi zástupci konkrétního druhu (vnitrodruhová variabilita), např. úseky jaderné ribozomální a mitochondriální DNA ([Nolan a Cribb 2005](#), [Semyenova a kol. 2006](#)).

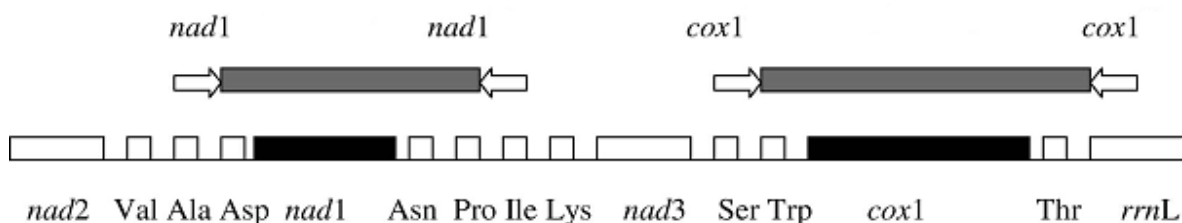
Ribozomy eukaryot se skládají ze dvou podjednotek – malé (40S) a velké (60S). Malá jaderná ribozomální podjednotka je tvořena 18S ribozomální RNA (rRNA), zatímco velká jaderná ribozomální podjednotka je tvořena 5S rRNA, 5.8S rRNA a 28S rRNA. Přepisovaný úsek ribozomální DNA (rDNA) zahrnuje několik fragmentů, které na sebe těsně navazují. Jsou to " External Transcribed Spacer" (ETS), " Interinternal Transcribed Spacer " (ITS např. ITS1 a ITS2) a regiony 18S, 5.8S a 28S (Obr. 6). Klastry rDNA kódující strukturní části ribozomů (ITS1, ITS2, 18S, 5.8S a 28S) jsou často využívány v genetických studiích (Hillis a Dixon 1991). Na jejich základě můžeme nejen identifikovat, ale i spolehlivě rozlišit jednotlivé druhy organismů (včetně motolic např. *F. magna*, *F. hepatica*, *D. dendriticum* a *P. cervi*).

Mitochondriální DNA (mtDNA) tvoří kruhovou molekulu, která nese kromě genetické informace mitochondriální rRNA a transferové RNA (tRNA), využívané při mitochondriální transkripci a translaci, také genetickou informaci pro proteiny transportního řetězce, např. Nikotinamid adenin dinukleotid dehydrogenázu (*Nad*) a Cytochrom c oxidázu (*Cox*). Mitochondriální DNA je maternálně dědičná a nepodléhá tedy rekombinačním změnám, analýzy mtDNA, které umožňují zaznamenat rozdíly v jejích sekvencích, jsou proto vhodné pro mapování vnitrodruhové variability (Hu a kol. 2004, Semyenova a kol. 2006). Na základě analýzy *cox1* a *nad1* genů kódovaných mtDNA je možné také vystopovat historicko-geografický původ populace daného druhu a případně i fylogenetické vztahy v rámci určité taxonomické skupiny.

Obr. 6. Schematický diagram jaderné ribozomální DNA (*F. magna*) (upraveno podle Kráľová-Hromadová a kol. 2008). Šedá – regiony pro které byly navrženy univerzální primery, černá - amplifikované úseky, bílé šipky - pozice pro nasedání primerů.



Obr. 7. Schematický diagram části mitochondriální DNA *F. hepatica* (upraveno podle Le a kol. 2000, Kráľová-Hromadová a kol. 2008). Černá - regiony pro které byly navrženy univerzální primery, šedá - amplifikované úseky, bílé šipky - pozice pro nasedání primerů.



ITS1 rDNA (Internal Transcribed Spacer 1): ITS1 představuje úsek jaderné ribozomální DNA (rDNA) mezi 18S a 5.8S podjednotkou (Obr. 6). Celková velikost ITS1 regionu je 430 bp. Druhově specifický fragment ITS1 *F. magna* má velikost 127 bp (Kráľová-Hromadová a kol. 2008). V databázi GenBank nalezneme *F. magna* ITS1 sekvence pod anotačními čísly (a.n. GB; [EF534987](#), [EF534988](#), [EF534990](#), [EF534991](#), Kráľová-Hromadová a kol. 2008, Benson a kol. 2008).

Kráľová-Hromadová a kol. (2008) použila univerzální primery, pomocí nichž je možné amplifikovat celý ITS1 region *F. magna* a sousedící části 18S a 5.8S podjednotek rDNA, o celkové velikosti 571 bp (Cunningham 1997). S využitím těchto primerů byly získány sekvence ITS1 z *F. magna* ze čtyř různých geografických oblastí (SR, ČR, Kanady a USA), ale jejich porovnáním nebyly nalezeny žádné odlišné nukleotidy. Itagaki a kol. (2005a,b) a Mas-Coma a kol. (2001) získali sekvence ITS1 regionu druhově příbuzné *F. hepatica* z osmi geografických oblastí. Avšak ani porovnáním těchto sekvencí nebyl zjištěn žádný vnitrodruhový polymorfismus, sekvence byly jako v případě *F. magna* 100% identické. Srovnáním ITS1 regionů obou druhů *F. magna* a *F. hepatica* byla však zjištěna mezidruhová variabilita 6,9%. Krátká oblast uvnitř regionu ITS1, kterou se lišily *F. magna* a *F. hepatica*, byla pro svou variabilitu vybrána pro navržení druhově specifických primerů (Kráľová-Hromadová a kol. 2008).

Geneticky fixované rozdíly v sekvencích ITS1 obou motolic tedy umožňují snadnou diferenciaci druhů *F. magna* a *F. hepatica* pomocí PCR s následnou sekvenací, případně PCR v kombinaci s analýzou délky restričních fragmentů (viz níže PCR-RFLP).

ITS2 rDNA (Internal Transcribed Spacer 2): ITS2 region *F. magna* o velikosti 364 bp se nachází mezi 5.8S a 28S rDNA podjednotkou (Obr. 6) a je rovněž často využíván jako marker vhodný pro druhovou diferenciaci parazitických helmintů, včetně motolic (Luton a kol. 1992, Adlar a kol. 1993, Hoste a kol. 1995, Kráľová-Hromadová a kol. 2008, Bazsalovicsová a kol. 2010).

Adlar a kol. (1993) jako první publikoval nekompletní sekvence ITS2 rDNA *F. magna* pocházející z USA a porovnal je s ITS2 regionem *F. hepatica* ze čtyř různých geografických oblastí. Srovnávané sekvence ITS2 o velikosti 239 bp se lišily ve 38 nukleotidech (tj. 13,2%). Kráľová-Hromadová a kol. (2008) amplifikovala 562 bp velký region zahrnující celý ITS2 region (a. n. GB; [EF534992](#), [EF534993](#), [EF534994](#), [EF534995](#)) a části 5.8 a 28S rDNA *F. magna* z populací vyskytujících se ve čtyřech různých geografických oblastech (SR, ČR, Kanady a USA). Amplifikované úseky ITS2 *F. magna* byly 100% shodné a získané sekvence byly identické také s ITS2 regionem *F. magna* původem z USA (a.n. GB; [EF051080](#), [EF612487](#) Bildfell kol. 2007, Lotfy a kol. 2008) a Rakouska (a.n. GB; [DQ683545](#), anotováno Hoerweg a kol. 2006).

Sekvence kompletního ITS2 regionu a části 28S a 5.8S rDNA byly získány i z druhově příbuzné *F. hepatica* pocházející z osmi geografických oblastí: Uruguaye, Austrálie, Severního Irsku (a.n. GB; [AB010974](#) a [AB207148](#), Itagaki a Tsutsumi 1998, Itagaki a kol. 2005), Španělska a Bolívie (a.n. GB; [AJ272053](#), Mas-Coma a kol. 2001), Číny a Francie (a.n. GB; [AJ557567](#), [AJ557568](#), Huang a kol. 2004) a z Rakouska (a.n. GB; [DQ683546](#), anotováno Hoerweg a kol. 2006). Srovnáním těchto sekvencí *F. hepatica* byly objeveny čtyři nukleotidové substituce na vnitrodruhové úrovni. V práci Bazsalovicsová a kol. (2010) byly porovnány další ITS2 sekvence *F. hepatica* uvedené v databázi GenBank, v nichž však nebyly objeveny žádné nové nukleotidové substituce.

Za účelem zjištění mezidruhové variability byly v práci Kráľová-Hromadová a kol. (2008) srovnány dostupné ITS2 sekvence *F. magna* s dostupnými ITS2 sekvencemi *F. hepatica*. Stupeň mezidruhové variability dosahoval 11,3-11,9%, podobně jako v práci Adlar a kol. (1993) (viz výše). Podle úseků ITS2 regionu, které vykazovaly vyšší stupeň mezidruhové variability, byly navrženy druhově specifické primery pro *F. magna* (152 bp dlouhý úsek) a *F. hepatica* (112 bp) (Tab. 1).

Bazsalovicsová a kol. (2010) získala sekvenci ITS2 regionu *P. cervi* (286 bp), ve které nebyl nalezen žádný vnitrodruhový polymorfismus (a.n. GB; [HM026462](#), v procesu anotace Bazsalovicsová a kol. 2010). Stejná autorka získala také sekvence ITS2 regionu *D. dendriticum* (241 bp), ve kterých byly v porovnání s ITS2 regionem uloženým v GenBank

odhaleny 3 polymorfni místa (a.n. GB; [DQ379986](#), Maurelli a kol. 2007, [HM026461](#), v procesu anotace Bazsalovicsová a kol. 2010). Na základě ITS2 regionů *P. cervi* a *D. dendriticum* navrhla Bazsalovicsová a kol. (2010) pro tyto motolice druhově specifické primery (Tab. 1), jejichž druhová specifita byla následně ověřena pomocí PCR analýzy.

Důkazem praktické využitelnosti molekulárních metod je např. práce Bildfell a kol. (2007), který na základě ITS2 sekvence spolehlivě určil dospělce *F. magna*, jehož nebylo možné morfologicky odlišit od *F. hepatica*. ITS2 sekvence *F. magna* byla navíc opět shodná jak s ITS2 sekvencí z *F. magna* původem z Oregonu (a.n. GB; [EF051080](#), Bildfell a kol. 2007) tak s ITS2 sekvencí *F. magna* původem z Rakouska (a.n. GB; [DQ683545](#), anotováno Hoerweg a kol. 2006).

18S rDNA (malá podjednotka ribosomální DNA): 18S je součástí ribosomálního genu, sousedí s ITS1 regionem (Obr. 6) a zahrnuje velmi konzervativní úsek rDNA.

Použitím univerzálních PCR primerů byl získán 1934 bp dlouhý úsek 18S rDNA genu *F. magna* pocházející z České republiky (a.n. GB; [EF534989](#), Králová-Hromadová a kol. 2008), který byl identický se sekvencí 18S rDNA *F. magna* z Oregonu (a.n. GB; [EF051080](#), Bildfell a kol. 2007). Porovnáním této sekvence s regionem 18S rDNA genu motolice *F. hepatica*, který sekvenoval Fernandez et al. 1998 (a.n. GB; [AJ004969](#)), byla zjištěna podobnost 99,3%. Sekvence obou druhů se lišily pouze 1 delecí a 13 substitucemi v sekvenci *F. magna* (Horáčková 2007 diplomová práce, Králová-Hromadová a kol. 2008). Na rozdíl od ITS2, tato minimální sekvenční diference (0,7%) 18S rDNA neumožňuje navrzení druhově specifických primerů, a proto nemůže být využita pro účely mezidruhového odlišení.

Cox1 mtDNA (Cytochrom c oxidáza podjednotka I):

Garey a Wostenholme (1989) charakterizovali úseky mitochondriálních genů *cox1* a *nad1*, které byly později využity pro porovnání vnitrodruhové variability *F. hepatica*. Le a kol. (2000) získal kompletní sekvenci *cox1* regionu mtDNA *F. hepatica* (a.n. GB; [AF216697](#)). Tuto sekvenci následně srovnala Králová-Hromadová a kol. (2008) s kompletním mitochondriálním genomem *Paragonimus westermani* (a.n. GB; [AF219379](#), Iwagami a kol. 2003), a na základě vysoce konzervativních oblastí v tRNA genech navrhla primery pro amplifikaci *cox1* u *F. magna*. Pomocí primerů specifických pro *cox1* region mtDNA *F. magna* byl amplifikován úsek dlouhý 1726 bp, přičemž samotná *cox1* sekvence je tvořena 1545 bp. Srovnáním *cox1* regionu *F. magna* ze tří geografických oblastí (SR, ČR, USA) (a.n.

GB; [EF534996](#), [EF534997](#), [EF534998](#), Král'ová-Hromadová a kol. 2008) bylo odhaleno 28 bodových mutací (tj. difference 1,9%). Sekvenční polymorfismus *cox1* genů mezi *F. magna* z SR a ČR a stejně tak z SR a USA byl 1%, větší sekvenční difference (1,6%) byla zaznamenána mezi *F. magna* z ČR a z USA (Král'ová-Hromadová a kol. 2008). Dva úseky, v rámci genu, s častějším výskytem mutací uvnitř *cox1* regionu byly vybrány pro další populační studie.

Nad1 mtDNA (Nikotinamid adenin dinukleotid dehydrogenáza podjednotka I): Za účelem navržení primerů pro amplifikaci regionu *nad1* mtDNA *F. magna* byl opět porovnán mitochondriální genom motolic *F. hepatica* a *P. westermani*. Výsledkem amplifikace s navrženými primery byl DNA fragment *F. magna* dlouhý 1094 bp, který zahrnuje i 903 bp dlouhý úsek *nad1* genu (Král'ová-Hromadová a kol. 2008).

Král'ová-Hromadová a kol. (2008), podobně jako v předchozích případech, porovnála *nad1* sekvence *F. magna* ze tří geografických oblastí (SR, ČR, USA) (a.n. GB; [EF534999](#), [EF535000](#), [EF535001](#)) a objevila 13 polymorfních míst (difference 1,5%). Mezi *F. magna* z ČR a SR byl na základě sekvencí *nad1* prokázán nižší stupeň polymorfismu (0,9%), než mezi *F. magna* z ČR a USA a stejně tak i z SR a USA (1%). 8 ze 13 míst s vysokým stupněm polymorfismu se nacházelo blízko 3' konce.

Nad1 (a také *cox1*) vykazuje vyšší stupeň polymorfismu (1,9-2,3%), než jaký vykazují ostatní sekvence genů *F. magna* (Král'ová-Hromadová a kol. 2008). Ke stejnému závěru dospěla i Morozova a kol. (2004), která porovnávala *cox1* a *nad1* se známými úseky genomu tří různých populací *F. hepatica*. Při výzkumu, do kterého bylo zařazeno 20 populací *F. hepatica*, byla prokázána polymorfní difference *nad1* až 4,1% (2,3%, *cox1*) (Semyenova a kol. 2006). Podobně vysoký stupeň polymorfismu se očekává i u *F. magna*, až budou do statistiky zahrnuty sekvence *nad1* a *cox1* od více jedinců *F. magna* z různých populací. Publikace týkající se tohoto tématu je momentálně ve stádiu příprav (ústní sdělení RNDr. Král'ové-Hromadové, CSc).

4.2.3 Analytické molekulárně diagnostické metody

PCR (Polymerase Chain Reaction): Principem polymerázové řetězové reakce je replikace molekuly DNA. Při PCR je tato replikace uměle navozena ve zkumavce (*in vitro*) a její průběh je kontrolován změnami teplot. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'→3' prostřednictvím DNA polymerázy (Alberts a kol. 1998, Campbell a kol. 2008, Šmarda a kol. 2008). Výsledným produktem PCR jsou pak amplikony definované velikosti, jejichž

přítomnost a přibližnou velikost (počet bazí) v reakční směsi je možné prokázat elektroforézou v agarózovém gelu. Za účelem zjištění nukleotidové sekvence je získaná DNA amplikonu sekvenována.

Syntéza druhově specifických úseků DNA (*F. magna*, *F. hepatica*, *D. dendriticum* a *P. cervi*) bude prováděna zejména pomocí specifických primerů pro ITS2 region (Tab. 1).

Tab. 1. Primery pro ITS2 region

Druh motolice a publikace	Primery pro ITS2	amplikon
<i>Fascioloides magna</i> Kráľová-Hromadová a kol. (2008)	Fw: 5'-ACCAGTTATCGTTGTGTTG-3' Rev: 5'-CCGTCTTTAAACAACAG-3'	152 bp
<i>Fasciola hepatica</i> Kráľová-Hromadová a kol. (2008)	Fw: 5'-CTTATGATTTCTGGGATAATT-3' Rev: 5'-CCGTCGCTATATGAAAA-3'	112 bp
<i>Dicrocoelium dendriticum</i> Bazsalovicsová a kol. (2010)	Fw: 5'-CCCCAGTCGGAAACGTCA-3' Rev: 5'-GATTAGAAGGCCGTATTTTCGGA-3'	176 bp
<i>Paramphistomum cervi</i> Bazsalovicsová a kol. (2010)	Fw: 5'-CGCGTCTTGCTGGTAGCGCAGAC-3' Rev: 5'-GTAACAGAACACCACAGTAGGTGATCA-3'	161 bp

PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism): Metoda zjištění polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP) je poměrně jednoduchá a dobře reprodukovatelná. Je založená na specifitě restrikčních enzymů - endonukleáz, které se od sebe liší tím, že rozpoznávají různé krátké sekvence nukleotidů a následně nukleotidovou sekvenci v tomto konkrétním místě štěpí. Podstatou metody je evolučně podmíněný vznik mutací, které vedou k vytvoření nebo ztrátě rozpoznávacích míst pro restrikční endonukleázy, nebo vznikají jako důsledek přítomnosti různého počtu repetitivních sekvencí, delecí či insercí ve specifických oblastech genomu jednotlivých druhů organismů. Prakticky je DNA získaná amplifikací pomocí PCR vystavena účinkům specifických restrikčních endonukleáz a rozdíly ve velikosti restrikčních fragmentů jsou následně detekovány rozdělením směsi pomocí gelové elektroforézy. Na základě porovnání velikosti restrikčních fragmentů pak můžeme odlišit jednotlivé druhy motolic, jejichž přítomnost ve vzorku předpokládáme. Analýza maternálně dědičné mtDNA pomocí RFLP je základem mnoha fylogenetických

studií a ověřování taxonomického členění druhu, slouží také k určování hybridních jedinců (Alberts a kol. 1998, Hulák a kol. 2006, Campbell a kol. 2008, Šmarda a kol. 2008).

S využitím metody PCR-RFLP se Blair a McManus (1989) pokusili rozlišit jednotlivé druhy motolic čeledi Fasciolidae (*F. hepatica*, *F. gigantica* a *F. magna*). U *F. hepatica* bylo vysledováno 18 restrikčních míst, zatímco u zbývajících dvou druhů 17. U každého z výše jmenovaných druhů motolic nebyla pozorována více než 2 specifická restrikční místa. Kráľová-Hromadová a kol. (2008) analyzovala metodou PCR-RFLP regiony ITS1 a ITS2 *F. magna* ze čtyř a *F. hepatica* ze dvou alopatrických populací. Analýza odhalila přítomnost odlišných restrikčních míst v ITS1 sekvenci jednotlivých populací *F. magna* a *F. hepatica*. Možnost odlišit od sebe oba druhy motolic (mezidruhová variabilita) byla tímto způsobem prokázána s využitím ITS1 regionu, není však možné od sebe odlišit motolice stejného druhu pocházejících z různých populací (vnitrodruhová variabilita). Analýzou ITS2 oblasti *F. magna* a *F. hepatica* byla rovněž odhalena odlišná specifická místa pro restrikční enzymy a také jejich neměnný počet (např. v ITS2 regionu *F. magna* dvě místa pro endonukleázu *MseI* a v ITS2 regionu *F. hepatica* pouze jedno). I s využitím ITS2 v PCR-RFLP lze však opět prokázat pouze variabilitu mezidruhovou. Také Marcilla a kol. (2002) využil PCR-RFLP analýzy pro diferenciaci druhů motolic (*F. hepatica* a *F. gigantica*). PCR-RFLP analýzu založil na sekvenci regionu 28S rDNA. Sekvence 28S obou druhů se lišily pouze několika nukleotidovými substitucemi a v rámci jednoho druhu byly vždy shodné. PCR-RFLP analýzy bylo využito také v experimentech Marcilla a kol. (2002) s celou mtDNA *F. hepatica*, *F. gigantica* a *Fasciola* sp. Rokni a kol. (2010) se pokoušel odlišit *Fasciola hepatica* a *Fasciola gigantica* analýzou PCR-RFLP na základě ITS1 regionu. Jako vhodný se ukázal restrikční enzym *TasI*. Zatímco v sekvenci ITS1 *F. gigantica* byla odhalena dvě štěpící místa pro *TasI*, v sekvenci *F. hepatica* bylo nalezeno pouze jedno. Odlišení motolic bylo však možné opět pouze na mezidruhové úrovni.

Z výše uvedených prací vyplývá, že PCR-RFLP analýza je využitelná pro mezidruhové rozlišení jednotlivých druhů motolic, ale s jejím využitím není možné prokázat variabilitu vnitrodruhovou.

PCR-RAPD (PCR-Random Amplified Polymorphic DNA): Na rozdíl od PCR, metoda využívá jen jeden krátký oligonukleotid jako primer pro amplifikaci DNA během PCR. Vzhledem ke krátké délce primeru (cca 10-15 bp) je redukována také jeho specifita, a proto během PCR primer nasedá na různá komplementární místa v DNA. Jednotlivé druhy příbuzných organismů, jejichž přítomnost ve vzorku předpokládáme, jsou posléze odlišeny na základě

porovnání velikostí elektroforeticky separovaných amplikonů získaných v PCR podle toho, kolik a jak velkých úseků DNA bylo amplifikováno. Metoda rovněž umožňuje detekovat velké množství polymorfismů, a proto mohou být výsledky PCR-RAPD genetickými markery pro tvorbu genetických map a měření genetické vzdáleností mezi populacemi (Roosien a kol. 1993, Simpson a kol. 1993, Šmarda a kol. 2008).

McGarry a kol. (2007) provedl PCR-RAPD analýzu DNA 20 jedinců *F. hepatica* a *F. gigantea* (primer 5'-GTTCGCTCC-3') a získal fragment velký 568 bp pro *F. hepatica* (a.n. GB; AY704404) a pouze 396 bp pro *F. gigantea* (a.n. GB; AY704405). Pro pozdější PCR byly navrženy na základě RAPD analýzy dvě specifické sady primerů.

5. Závěr

Tato práce shrnuje především teoretické možnosti využití molekulárně diagnostických metod pro zachycení nákazy *F. magna* a komparativních druhů motolic. Praktické využití těchto metod bude experimentálně prověřeno během mého magisterského studia.

Jako nejvhodnější metoda získání koprologického materiálu z konkrétního jedince se zatím jeví odběr na základě přímého pozorování. Odběr trusu imobilizovanému jedinci se prozatím nepodařilo realizovat. Pro zpracování koprologického materiálu se zdá být dostatečná sedimentační metoda doplněná přímým nálezem vajíček motolic (např. *F. magna*) během mikroskopického vyšetření. Nevýhodou mikroskopického vyšetření je však nesnadná diferenciací vajíček *F. magna* zejména od vajíček motolic *F. hepatica*, *P. cervi*. Pro přesné odlišení vajíček *F. magna* od dalších motolic je proto vhodné využít molekulárních metod. Z literárních údajů vyplývá, že je možné izolovat DNA z parazitárních útvarů (vajíček motolic) přítomných v předem zpracovaném koprologickém materiálu. Pro zjištění mezidruhové variability lze využít všech pěti molekulárních markerů (ITS1, ITS2, 18S, *Cox1*, *Nad1*) ve všech třech typech molekulárních analýz (PCR, PCR-RFLP, PCR-RAPD). Přestože v budoucnu bude ověřena využitelnost většiny kombinací markerů a metod, hlavní pozornost chci zaměřit na amplifikaci ITS2 regionu pomocí PCR a srovnávání získaných nukleotidových sekvencí z jednotlivých druhů motolic (*F. magna*, *F. hepatica*, *D. dendriticum* a *P. cervi*).

Kromě výše uvedeného se ve svém magisterském studiu chci zaměřit také na zavádění kompletního životního cyklu *F. magna* v laboratorních podmínkách a ve spolupráci s vedením NP Šumava se chci pokusit vysledovat vliv nákazy *F. magna* na chování specifických definitivních hostitelů (*C. elephas* a *C. capreolus*) značených monitorovacími obojky.

6. Použitá literatura

Adlar R. D., Barker S. C., Blair D., Cribb T. H. (1993): Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of Fasciolidae (Digenea). *International Journal for Parasitology* 23, 423–425.

Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Robert K., Walter P. (1998): Základy buněčné biologie, *Gerland Publishing*, 313-346.

Anh N. T., Phuong N. T., Ha G. H., Thu L. T., Johansen M. V., Murrell D. K., Thamsborg S. M. (2008): Evaluation of techniques for detection of small trematode eggs in faeces of domestic animals. *Veterinary Parasitology* 156, 346-349.

Bazsalovicsová E., Králová-Hromadová I., Špakulová M., Reblánová M., Oberhauserová K. (2010): Determination of ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) interspecific markers in *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna*, *Dicrocoelium dendriticum* and *Paramphistomum cervi* (Trematoda), parasites of wild and domestic ruminants. *Helminthologia*, 47.

Benson D. A., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J., Wheeler D. L. (2008): GenBank. *Nucleic Acids Research* 36, 25–30.

Bildfell R. J., Whipps Ch. M., Gillin C. M., Kent M. L. (2007): DNA-based Identification of a Hepatic Trematode in an Elk Calf. *Journal of Wildlife Diseases* 43, 762-769.

Blair D. and McManus D. P. (1989): Restriction enzyme mapping of ribosomal DNA can distinguish between fasciolid (liver fluke) species. *Molecular and Biochemical Parasitology* 36, 201-208.

Blank W. A., Reis E. A. G., Thiong'o F. W., J Braghiroli. F., Santos J. M., Melo P. R. S., Guimarães I. C. S., L. K. Silva, Carmo T. M. A., Reis M. G., Blanton R. E. (2009): Direct analysis of *Schistosoma mansoni* structure using aggregated individual from laboratory strains and total fecal egg sampling. *The Journal of parasitology* 95, 881–889.

Bonita R. and Taira N. (1996): Faecal examination of *Fasciola* eggs fixed with formalin solution using the beads technique, *Veterinary Parasitology* 67, 269-273.

Brogli A., Heidrich J., Lanfranchi P., Nöckler K., Schuster R. (2009): Experimental ELISA for diagnosis of ovine dicrocoeliosis and application in a field survey. *Parasitology Research* 104, 949–953.

Burgu A. (1981): Studies on the biology of *Paramphistomum cervi* Schrank, 1790 in sheep in the district of Eskisehir Ciftelerstate farm, *Faculty of Veterinary Medicine* 28, 50-71.

Campbell A. Neil, Reece B. Jane (2008): *Biologie, Computer Press*, 1332 pp.

Capuano F., Rinaldi L., Maurelli M. P., Perugini A. G., Musella V., Cringoli G. (2007): A comparison of five methods for DNA isolation from liver and rumen flukes to perform ITS-2+ amplification. *Parasitologia* 49, 27-31.

- Cengiz Z. T., Yilmaz H., Dulger A. C., Cicek M.** (2010): Human infection with *Dicrocoelium dendriticum* in Turkey. *Annals of Saudi Medicine* 30, 159-161.
- Cunningham C. O.** (1997): Species variation within the internal transcribed spacer (ITS) region of *Gyrodactylus* (Monogenea: Gyrodactylidae) ribosomal RNA genes. *Journal of Parasitology* 83, 215–219.
- Deuter R., Peitsch S., Hertel S., Muller O.** (1995): A method for preparation of faecal DNA suitable for PCR. *Nucleic Acids Research* 23, 3800–3801.
- Dreyfuss G., Novobilský A., Vignoles P., Bellet V., Koudela B., Rondelaud D.** (2007): Prevalence and intensity of infections in the lymnaeid snail *Omphiscola glabra* experimentally infected with *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna* and *Paramphistomum daubneyi*. *Journal of Helminthology* 81, 7-12.
- Ducháček L. and Lamka J.** (2003): Dicrocoeliosis – the present state of knowledge with respect to wildlife species. *Acta Veterinaria Brno* 72, 613-626.
- Dunkel A. M., Ronglie M. C., Johnson G. R., Knapp S. E.** (1996): Distribution of potential intermediate hosts for *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* in Montana, USA. *Veterinary Parasitology* 62, 63-70.
- Dyachenko V., Beck E., Pantchev N., Bauer C.** (2008): Cost-effective method of DNA extraction from taeniid eggs. *Parasitology Research* 102, 811–813.
- Erhardová-Kotrlá B.** (1968a): *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) motolice obrovská v podmínkách ČSSR. *Doktorská disertační práce*, Parazitologický ústav ČSAV Praha, 190 pp.
- Erhardová B.** (1968b): Parthenogenesis of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) under natural conditions. *Folia Parasitologica* 15, 233-242.
- Erhardová-Kotrlá B., Blažek K.** (1970): Artificial infestation caused by the fluke *Fascioloides magna*. *Acta Veterinaria Brno* 39, 287-295.
- Erhardová - Kotrlá B.** (1971): The occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in Czechoslovakia. Prague; *Academia*, 155 pp.
- Faltýnková A., Horáčková E., Hirtová L., Novobilský A., Modrý D., Scholz T.** (2006): Is *Radix peregra* a new intermediate host of *Fascioloides magna* (Trematoda) in Europe? Field and experimental evidence. *Acta Parasitologica* 51, 87-90.
- Faust E. C., D'Antoni J. S., Odom V., Miller M. J., Peres Ch., Sawitz W., Thomen L. F., Tobie J., Walker J. H.** (1938): A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18, 169-183.
- Faust E. C., Sawitz W., Tobie J., Odom V., Peres Ch., Lincicome D. R.** (1939): Comparative efficiency of various technics for the diagnosis of protozoa and helminths in feces. *The Journal of Parasitology* 25, 241-262

- Fernandez M., Littlewood D. T., Latorre A., Raga J. A., Rollinson D.** (1998): Phylogenetic relationships of the family Campulidae (Trematoda) based on the 18S rRNA sequences. *Parasitology* 117, 383-391.
- Foreyt W. J. a Todd A. C.** (1976): Development of the large American liver fluke, *Fascioloides magna*, in white-tailed deer, cattle, and sheep. *The Journal of Parasitology* 62, 26-32.
- Foreyt J. W., Todd C. A.** (1978): Experimental infection of lymnaeid snails in Wisconsin with miracidia of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica*. *The Journal of Parasitology* 64, 1132-1134.
- Foreyt W. J.** (1996): Susceptibility of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) to experimentally induced *Fascioloides magna* infections. *Journal of Wildlife Diseases* 32, 556-559.
- Galaktionov K. V. a Dobrovolskij A. A.** (2003): The biology and evolution of Trematodes. *Kluwer academic publishers*, Dordrecht.
- Garey J. a Wolstenholme D.** (1989): Platyhelminth mitochondrial DNA: evidence for early evolutionary origin of a tRNA (serAGN) that contains a dihydrouridine arm replacement loop, and of serine-specifying AGA and AGG codons. *Journal of Molecular Evolution* 28, 374-387.
- Hillis D. M. and Dixon M.T.** (1991): Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology* 66, 411-53.
- Hood B. R., Ronglie M. C., Knapp S. E.** (1997): Fascioloidiasis in game-ranched elk from Montana. *Journal of Wildlife Diseases* 33, 882–885.
- Horáčková E.** (2007): Biologie a výskyt larválních stádií motolice obrovské (*Fascioloides magna*) v České republice. *Diplomová práce*, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 53 pp.
- Hoste H., Chiltonj N. B., Gassers R. B., Beveridge I.** (1995): Differences in the second internal transcribed spacer (Ribosomal DNA) between five species of *Trichostrongylus* (Nematoda: Trichostrongylidae). *International humal for Parmitology* 25, 75-80.
- Hu M., Chilton N. B., Gasser R. B.** (2004): The mitochondrial genomics of parasitic nematodes of socio-economic importance: Recent progress, and implications for population genetics and systematics. *Advances in Parasitology* 56, 133–212.
- Huang, W. Y., He B., Wang C. R., Zhu X. Q.** (2004): Characterisation of *Fasciola* species from Mainland China by ITS-2 ribosomal DNA sequence. *Veterinary parasitology* 120, 75-83.
- Hulák M., Kašpar V., Flajšhans M., Linhart O.** (2006): Využití molekulárních metod a DNA markerů v genetice ryb. *Bulletin VÚRH Vodňany* 42.
- Chroust K. and Chroustová E.** (2004): Motolice obrovská (*Fascioloides magna*) u spárkaté zvěře v jihočeských lokalitách. *Veterinářství*. 54, 296-304.

Itagaki T., Tsutsumi K. (1998): Triploid form of *Fasciola* in Japan: genetic relationships between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* determined by ITS-2 sequence of nuclear rDNA. *International journal for parasitology* 28, 777-781.

Itagaki T., Kikawa M., Sakaguchi K., Shimo J., Terasaki K., Shibahara T., Fukuda K. (2005a): Genetic characterization of parthenogenetic *Fasciola* sp. in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. *Parasitology* 131, 679–685.

Itagaki T., Terasaki K., Shibahara T., Fukuda K. (2005b): Molecular characterization of parthenogenetic *Fasciola* sp. in Korea on the basis of DNA sequences of ribosomal ITS1 and mitochondrial ND1 gene. *Journal of Veterinary Medicine Science* 67, 1115–1118.

Iwagami M., Monroy C., Rosas M. A., Pinto M. R., Guevara A. G., Vieira J. C., Agatsuma Y., Agatsuma T. (2003): A molecular phylogeographic study based on DNA sequences from individual metacercariae of *Paragonimus mexicanus* from Guatemala and Ecuador. *Journal of Helminthology* 77, 33-38.

Jones A., Bray R. A., Gibson D. I. (2001): Keys to the trematoda, Vol. 2., *CAB International and Natural History Museum*, London, 521 pp.

Kaufmann J. (1996): Parasitic infections of domestic animals. A diagnostic manual. *Birkhäuser Basel, Boston, Berlin*, Germany 423 pp.

Kearn G. C. (1998): Parasitism and the platyhelminthes. *Chapman a Hall*. London, 544 pp.

Kráľová-Hromadová I., Špakulová M., Horáčková E., Turčeková L., Novobilský A., Beck R., Koudela B., Marinkulic A., Rajský D., Pybus M. (2008): Sequence analysis of ribosomal and mitochondrial genes of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae): intraspecific variation and differentiation from *Fasciola hepatica*. *The Journal of Parasitology* 94, 58-67.

Le T. H., Blair D., Agatsuma T., Humair P. F., Cambell N. J., Iwagami M., Littlewood D. T., Peacock B., Johnston D. A., Bartley J. (2000): Phylogenies inferred from mitochondrial gene orders: A cautionary tale from the parasitic flatworms. *Molecular and Biological Evolution* 17, 1123–1125.

Lotfy W. M., Brant S. V., DeJong R. J., Le T. H., Demiaszkiewicz A., Rajapakse R. P. V. J., Perera V. B. V. P., Laursen J. R., Loker E. S. (2008): Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79, 248-255.

Luton K., Walker D. & Blair D. (1992): Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea). *Molecular and Biochemical Parasitology* 56, 323-328.

Mapes C. R. (1951): Studies on the biology of *Dicrocoelium dendriticum* (Rudolphi, 1819) Looss, 1899 (Trematoda: Dicrocoeliidae), including its relation to the intermediate host, *Cionella lubrica* (Müller). I. A study of *Dicrocoelium dendriticum* and *Dicrocoelium* infection. *Cornell Veterinarian* 41, 382–432.

- Marcilla A., Bargues M. D., Mas-Coma S.** (2002): A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Molecular and Cellular Probes* 16, 327-33.
- Mas-Coma S., Bargues M. D., Esteban J. G.** (1999): Human Fasciolosis. In: Fasciolosis (Dalton, J. P., ed.) Wallingford, Oxon, *CAB International Publishing*, London. 411-434.
- Mas-Coma S., Funatsu I. R., Bergeus M. D.** (2001): *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology* 123, 115–127.
- Maurelli M. P., Rinaldi L., Capuano F., Perugini A. G., Veneziano V., Cringoli G.** (2007): Characterization of the 28S and the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Dicrocoelium dendriticum* and *Dicrocoelium hospes*. *Parasitology Research* 101, 1251-1255.
- McGarry J. W., Ortiz P. L., Hodkinson J. E., Goreish I., Williams D. J. L.** (2007): PCR-based differentiation of *Fasciola* species (Trematoda: Fasciolidae), using primers based on RAPD-derived sequences, *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 101, 415–421.
- Morozova E. V., Chrisanfova G. G., Arkhipov I. A., Semyenova S. K.** (2004): Polymorphism of the ND1 and CO1 mitochondrial genes in populations of liver fluke *Fasciola hepatica*. *Russian Journal of Genetics* 40, 817–820.
- Müller B., Schmidt J., Mehlhorn H.** (2007): PCR diagnosis of infections with different species of Opisthorchiidae using a rapid clean-up procedure for stool samples and specific primers. *Parasitology Research* 100, 905–909.
- Nilsson O.** (1971): The inter-relationship of endo-parasites in wild cervids (*Capreolus capreolus* L. and *Alces alces* L.) and domestic ruminants in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica* 12, 36–68.
- Nolan M. J., Cribb T. H.** (2005): The use and implications of ribosomal DNA sequencing for the discrimination of digenean species. *Advances in Parasitology* 60, 101-63.
- Novobilský A.** (2007): The giant liver fluke *Fascioloides magna* in the Czech republic: distribution, intermediate hosts, and immunodiagnosics. *Disertační práce*, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, 88 pp.
- Novobilský A., Horáčková E., Hirtová L., Modrý D., Koudela B.** (2007): The giant liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi 1875) in cervids in the Czech republic and potential of its spreading to Germany. *Parasitology Research* 100, 549-553.
- Olsen O. W.** (1962): Animal Parasites: Their Biology and Life Cycles. Minneapolis, *Burgess Publishing Company*. 346 pp.
- Olson P. D., Tkach V. V.** (2005): Advances and trends in the molecular systematics of the parasitic Platyhelminthes. *Advances in Parasitology* 60, 165–243.

- Poláková K.** (2009): Rozšíření a patogenita motolice velké (*Fascioloides magna*), *Bakalářská práce* Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, 29 pp.
- Pybus M. J.** (2001): Liver flukes. In: Samuel W. M., Pybus M. J., Kocan A. A. (eds.), *Parasitic diseases in wild mammals*, Iowa State Press, Iowa City, 394 pp.
- Qureshi T., Wagner G. G., Drave, D. L., Davis, D. S., Craig T. M.** (1995) Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis of excretory-secretory proteins of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology* 58, 357–363.
- Rokni M. B., Mirhendi H., Mizani A, Mohebbali M., Sharbatkhori M., Kia E. B., Abdoli H., Izadi S.** (2010): Identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* using a simple PCR-restriction enzyme method. *Experimental Parasitology* 124, 209–213.
- Rondelaud D., Novobilský A., Vignoles P., Treuil P., Koudela B., Dreyfuss G.** (2006): First studies on susceptibility of *Omphiscola glabra* (Gastropoda: Lymnaeidae) from central France to *Fascioloides magna*. *Parasitology Research* 98, 299-303.
- Roosien J., Van Zandvoort P. M., Folkertsma R. T., Van der Voort J. N., Goverse A., Gommers F. J., Bakker J.** (1993): Single juveniles of the potato cyst nematodes *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* differentiated by randomly amplified polymorphic DNA. *Parasitology* 107, 567-72.
- Semyenova S. K., Morozova E. V., Chrisanfova G. G., Gorokhov V. V., Arkhipov I. A., Moskvina A. S., Movsessyan S. O., Ryskov A. P.** (2006): Genetic differentiation in eastern European and western Asian populations of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial *nad1* and *cox1* genes. *Journal of Parasitology* 92, 525–530.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.** (1989): *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Simpson A. J., Dias Neto E., Steindel M., Caballero O. L., Passos L. K., Pena S. D.** (1993): The use of RAPDs for the analysis of parasites. *EXS* 67, 331-337.
- Šmarda J., Doškař J., Pantůček R., Růžičková V.** (2008): *Metody molekulární biologie*, Masarykova univerzita, Brno. 188 pp.
- Špakulová M., Rajský D., Sokol J., Vodňanský M.** (2003): Cicavica obrovská (*Fascioloides magna*) významný pečeňový parazit prežuvavcov. *Parpress*, Bratislava, 61 pp.
- Strauss W., O'Neill S. M., Parkinson M., Angles R., Dalton J. P.** (1999): Short report: Diagnosis of human fascioliasis: Detection of anticathepsin L antibodies in blood samples collected on filter paper. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 60, 746–748.
- Swales W. E.** (1935): The life cycle of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) the large liver fluke of ruminants, in Canada. With observation on the bionomics of the larval stages and the intermediate hosts, pathology of *Fascioloides magna* and control measures. *Canadian Journal of Research* 12, 177-215.

Swales W. E. (1936): Further studies on *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) Ward, 1917, as a parasite of ruminants. *Canadian Journal of Research* 14, 83-95.

Tang J. N., Zeng Z. G., Wang H. N., Yang T., Zhang P. J., Li Y. L., Zhang A. Y., Fan W. Q., Zhang Y., Yang X., Zhao S. J., Tian G. B., Zou L. K. (2008): An effective method for isolation of DNA from pig faeces and comparison of five different methods. *Journal of Microbiological Methods* 75, 432–436.

Thienpont D., Rochette F., Vanparijs O. F. J. (1980): Diagnosing Helminthiasis Through Coprological Examination. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29, 1021 pp.

Ubeira F. M., Muiño L., Valero M. A., Periago M. V., Pérez-Crespo I., Mezo M., González-Warleta M., Romarís F., Paniagua E., Cortizo S., Llovo J., Mas-Coma S. (1999): MM3-ELISA detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in preserved human stool samples. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 81, 156-62.

Ullrich K. (1930): Über das Vorkommen von seltenen oder wenig bekannten Parasiten der Säugetiere und Vogel in Bohmen und Mahren. *Prager Archiv für Tiermedizin* 10, 19–43.

Valero M. A., Darce N. A., Panova M., Mas-Coma S. (2001): Relationships between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the Northern Bolivian Altiplano hyperendemic region. *Veterinary Parasitology* 102, 85-100.

Valero M. A., Perez-Crespo I., Periago M. V., Khoubbane M. (2009): Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Tropica* 111, 150–159.

Verma S. K., Prasad K., Nagesh N., Sultana M., Singh L. (2003): Was elusive carnivore a panther? DNA typing of faeces reveals the mystery, *Forensic Science International* 137, 16-20.

Ward H. B. (1917): On the structure and classification of North American parasitic worms. *The Journal of Parasitology* 4, 1–12.

Wobeser, G., Gajadhar A. A., Hunt H. M. (1985): *Fascioloides magna*: Occurrence in Saskatchewan and distribution in Canada. *Canadian Veterinary Journal* 26, 241–244.

Yamaguti S. (1975): A Synoptical review of life histories of digenetic trematodes of vertebrates. Part I, II. *Keigaku Publishing Co.*, Tokyo, 550 pp.

Yılmaz H., Gödekmerdan A. (2004): Human fasciolosis in Van province, Turkey. *Acta Tropica* 92, 161–162

Záhoř Z. (1965): Výskyt velké motolice (*Fascioloides magna*, Bassi, 1875) u srnčí zvěře. *Veterinářství* 15, 322-324.

PŘÍLOHA

Mapování rozšíření *F. magna*

Výskyt *F. magna* v České republice byl doposud zaznamenáván jako ložiskovitý (enzootický) (Horáčková 2007 diplomová práce, Novobilský 2007, Novobilský a kol. 2007). Vzhledem k předpokladu dalšího šíření *F. magna* na nové lokality je vhodné pravidelné mapování areálů výskytu *F. magna*. Za tímto účelem jsme formou dotazníků oslovili většinu proškolených osob a prohlížitelů zvěřiny z celé ČR (cca 4000 odborníků), kteří kontrolují zdravotní stav odlovené zvěře. Získané odpovědi byly zakresleny do mapy (Obr. 8) a srovnány s dřívějším mapováním fascioloidózy Novobilským a kol. (2007) v letech 2003-2005. Z grafického zobrazení lokalit, na nichž byla parazitóza zaznamenána, je patrná tendence šíření *F. magna* na nová území, především do západních Čech.

Obr. 8. Mapa aktuálního rozšíření *F. magna* v ČR

