



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

**Fakulta biomedicínského inženýrství
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**

Jaterní motolice – možnosti diagnostiky a predikce výskytu

Liver Flukes – Diagnostics and Prediction of Occurrence

Bakalářská práce

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: Mgr. Roman Leontovyč

Odborný konzultant: RNDr. Martin Kašný Ph.D.

Monika Ježková

Kladno, květen 2016

Z a d á n í b a k a l á ř s k é p r á c e

Student: **Monika Ježková**
Obor: Zdravotní laborant
Téma: **Jaterní motolice - možnosti diagnostiky a predikce výskytu**
Téma anglicky: Liver Flukes - Diagnostics and Prediction of Occurrence

Zásady pro vypracování:

Zástupci jaterních motolic čeledi fasciolidae patří z hlediska veterinární a humánní medicíny mezi původce významných parazitárních onemocnění v mnoha oblastech celého světa. Negativní dopady trematodóz působené jednotlivými druhy této čeledi spočívají v ohrožení zdraví člověka, ale také v masových nákazách hospodářských zvířat a s tím spojenými finančními ztrátami.

V navržené práci by měly být utříděny dostupné údaje související s diagnostikou a predikcí výskytu trematodóz, se zaměřením na fasciolózu a fascioloidózu.

V rámci praktické části bakalářské práce si studentka osvojí postupy základních metod souvisejících s diagnostikou trematodóz a pokusí se definovat možnosti využití dat geografického informačního systému pro predikci výskytu fasciolidních motolic v různých oblastech České republiky.

Seznam odborné literatury:

- [1] DUCHEYNE, Els, Johannes CHARLIER, Jozef VERCRUYSE, Laura RINALDI, Annibale BIGGERI, Janina DEMELER, Christina BRANDT, Theo de WAAL, Nikolaos SELEMENTAS, Johan HÖGLUND, Jaroslav KABA, Slawomir J. KOWALCZYK and Guy HENDRICK, Modelling the spatial distribution of Fasciola hepatica in dairy cattle in Europe, Geospatial Health, číslo vol. 9, nr. 2, 2015, p. 261-270 s., ISSN 1827-1987
[2] NOVOBILSKÝ, Adam, Jakub NOVÁK, Camilla BJÖRKMAN and Johan HÖGLUND, Impact of meteorological and environmental factors on the spatial distribution of Fasciola hepatica in beef cattle herds in Sweden, BMC Veterinary Research [online]. , ročník 2015, číslo 128, 1-9 [cit. 2015-10-29]. , Přístupné z: <http://link.springer.com/article/10.1186%2Fs12917-015-0447-0#>, ISSN 1746-6148

zadání platné do: 30.09.2017

Vedoucí: Mgr. Roman Leontovč

Konzultant: RNDr. Martin Kašný, Ph.D.


.....
vedoucí katedry / pracoviště


.....
děkan

V Kladně dne 22.02.2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci s názvem Jaterní motolice – možnosti diagnostiky a predikce výskytu vypracovala samostatně a použila k tomu úplný výčet citací použitých pramenů, které uvádím v seznamu přiloženém k bakalářské práci.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 Zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Kladně dne 20. 5. 2016

.....

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé práce Mgr. Romanu Leontovyčovi za cenné rady a připomínky. Mé poděkování patří také odbornému konzultantovi RNDr. Martinu Kašnému, Ph.D. za umožnění spolupráce s Katedrou parazitologie Přírodovědecké fakulty UK v Praze. Především oběma děkuji za trpělivost při konzultacích a práci v laboratoři.

Abstrakt

Motolice parazitující v játrech způsobují závažná onemocnění lidí i zvířat po celém světě. Mezi medicínsky a veterinárně nejvýznamnější patří zástupci čeledí Fasciolidae, Opistorchiidae a Dicrocoelidae. Zástupci jednotlivých čeledí s celosvětovým rozšířením, např. *Fasciola hepatica*, nebo vázaní na určitou oblast, např. *Clonorchis sinensis*, způsobují závažná onemocnění lidí a jsou důvodem milionových ztrát v chovech hospodářských zvířat. Významní zástupci čeledi Fasciolidae, *F. hepatica* a *F. magna*, se vyskytují i na území České republiky, kde parazitují u hospodářských zvířat i divoké zvěře. Tyto motolice mají obdobný životní cyklus skládající se z mezihostitele, plže z čeledi Lymnaeidae, a definitivního hostitele. Možnost přenosu nákazy z volně žijících zvířat na dobytek a hojný výskyt mezihostitelských plžů značně komplikuje kontrolu těchto helmintóz. V současnosti se ke sledování motolicečnosti využívá celá řada diagnostických metod a nově také prediktivní modely výskytu na základě ekologických a geografických dat (geografický informační systém). Teoretická část této práce shrnuje základní informace o nejvýznamnějších zástupcích motolic parazitujících v játrech, jejich diagnostice a léčbě se zaměřením na jedince vyskytující se na našem území. V praktické části byly aplikovány molekulárně biologické a imunologické metody pro diagnostiku motolic v rámci projektů Helmintologické laboratoře Přírodovědecké fakulty UK. Za účelem zjištění nákazy fasciolidními motolicemi byly provedeny dva experimenty. Koprologické vyšetření a následná molekulární analýza u zubrů (*Bison bisonus*) importovaných do České republiky a imunologické vyšetření pomocí metod ELISA a imunoblot u beranů experimentálně infikovaných *F. hepatica*. U zubrů byla mikroskopickým vyšetřením prokázána nákaza motolicemi, která měla být následně blíže určena molekulární analýzou. Prostřednictvím molekulární analýzy se nepodařilo určit duh motolice. U experimentálně infikovaných beranů byla potvrzena zvyšující se hladina protilátek IgG, jako odpověď na infekci *F. hepatica*, a tím potvrzena úspěšná experimentální infekce. Práce navíc zahrnuje molekulární analýzu vývojových stadií ptačích motolic z čeledi Schistosomatidae způsobujících cercáriovou dermatitidu, určující méně běžné druhy motolic na území České republiky. Významné je také prokázání infekce *Trichobilharzia regenti* u labutě jako definitivního hostitele.

Klíčová slova: Jaterní motolice, *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna*, PCR, DNA, ELISA, koprologie, diagnostika

Abstract

Liver infecting flukes are causatives of the serious diseases of humans and animals worldwide. In terms of veterinary and medical importance, members of families of Fasciolidae, Opisthorchiidae and Dicrocoelidae are considered as the most important. Worldwide distributed representatives such as *Fasciola hepatica* as well as representatives with local occurrence e.g *Clonorchis sinensis* causing serious diseases of humans and animals and are responsible for million dollar losses in livestock breeding. Highly pathogenic members of the family Fasciolidae *F. hepatica* and *F. magna* are widely distributed also in Czech Republic, infecting domestic and wild ruminants. *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* possess similar lifecycle comprising the intermediate host – snails of the family Lymnaeidae and definitive host. Control of these helminthoses is complicated by transmission from wild ruminants to livestock as well as the wide distribution of the intermediate hosts. Currently the number of diagnostic methods is used for monitoring of trematodosis as well as the new predictive approaches based on ecological and geographical data (geographical information system). The theoretical part summarizes the basic information about the most important representatives of liver flukes, their diagnosis and treatment with special focus on representatives occurring in the Czech Republic. In experimental part, molecular and immunological methods have been applied within the projects of Helminthological laboratory, Faculty of Science, Charles University in Prague. To detect infection by fasciolid flukes, two experiments have been performed. Coprological examination of bison (*Bison bisonus*) revealed the infection of one sample by trematodes, however molecular determination of the parasite failed due to failure of the basic principles of the molecular analysis. Successful experimental infection of lambs with *F. hepatica*, have been confirmed by immunological methods (Elisa, Immunoblot) showing increasing IgG antibodies. Molecular determination of developmental stages of bird schistosomes causing cercarial dermatitis in Czech Republic confirmed infection of rare species of schistosomes in Czech Republic. In addition unique infection of the swan by *Trichobilharzia regenti* have been confirmed.

Key words: Liver flukes, *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna*, PCR, DNA, ELISA, coprology, diagnostics

Obsah

1	ÚVOD	9
2	SOUČASNÝ STAV	10
2.1	NEJVÝZNAMNĚJŠÍ ZÁSTUPCI JATERNÍCH MOTOLIC	10
2.1.1	Čeleď Dicrocoeliidae	11
2.1.2	Čeleď Opisthorchidae	12
2.1.3	Čeleď Fasciolidae	13
2.2	FASCIOLIDNÍ MOTOLICE V EVROPĚ	15
2.2.1	<i>Fasciola hepatica</i>	16
2.2.2	<i>Fascioloides magna</i>	18
2.3	PRŮBĚH NÁKAZY	20
2.4	DIAGNOSTICKÉ METODY JATERNÍCH MOTOLIC	21
2.4.1	Pitva	21
2.4.2	Biochemické vyšetření	22
2.4.3	Hematologické vyšetření	23
2.4.4	Imunologické vyšetření	23
2.4.5	Koprologie	26
2.4.6	Molekulární analýza	26
2.5	LÉČBA	28
2.6	PREDIKCE TREMATODÓZ	29
2.6.1	Rizika spojená s výskytem a nákazou motolic	29
2.6.2	Geografický informační systém	29
2.6.3	Opatření proti výskytu motolic	32
3	CÍLE PRÁCE	33
4	MATERIÁL A METODIKA	34
4.1	KOPROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ	34
4.2	MOLEKULÁRNÍ ANALÝZA	35
4.2.1	Experiment 1: Molekulární diagnostika ptačích motolic způsobujících cerkáriovou dermatitidu na koupalištích v ČR	35
4.2.2	Experiment 2: Diagnostika fasciolidních motolic v koprologickém materiálu importovaných zubrů (VP Ralsko)	37
4.3	IMUNOLOGICKÁ DIAGNOSTIKA	39
5	VÝSLEDKY	42
5.1	KOPROLOGIE	42
5.2	MOLEKULÁRNÍ ANALÝZA	43
5.2.2	Experiment 1: Molekulární diagnostika ptačích motolic způsobujících cerkáriovou dermatitidu na koupalištích v ČR	43

5.2.1	Experiment 2: Diagnostika fasciolidních motolic v koprologickém materiálu importovaných zubrů (VP Ralsko).....	46
5.3	IMUNOLOGIE	47
6	DISKUZE	50
7	ZÁVĚR	56
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	57
	SEZNAM OBRAZOVÝCH PŘÍLOH	74
	SEZNAM TABULEK A GRAFŮ.....	75
	SEZNAM ZKRATEK	76

1 Úvod

Jaterní motolice jsou endoparazitě obratlovců postihující játra a žlučové cesty. Mají složitý vývojový cyklus skládající se z jednoho či více mezihostitelů a definitivního hostitele (Volf, 2007). Mezi motolicemi existuje mnoho druhů parazitujících v játrech, z nichž některé jsou typické pro danou oblast (*Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*) a jiné se vyskytují po celém světě (*Fasciola hepatica*). Kromě zvířat mohou jaterní motolice infikovat i člověka. Odhaduje se, že fasciolidní motolice postihují více než 17 milionů lidí po celém světě a finanční ztráty činí až 3 000 000 \$ (Almeida, 2003; Mas-Coma, 2009).

Tato práce se věnuje především veterinárně a medicínsky významným druhům jaterních motolic se zaměřením na motolice vyskytující se na evropském kontinentu, tzn. *Fasciola hepatica* a *Fascioloides magna*. *Fasciola hepatica* je kosmopolitní parazit, který může kromě domácích přežvýkavců infikovat i člověka a způsobovat tak onemocnění – fasciolózu. Člověk se může nakazit např. konzumací rostlin obsahujících přichycená infekční stadia motolic (metacerkárie) (Kaufmann, 1996). *Fascioloides magna* je parazitem především volně žijících přežvýkavců, původem ze Severní Ameriky. V důsledku společné pastvy však může postihovat i domácí dobytek (Erhardová-Kotrlá, 1971). Vzhledem k tomu, že *F. hepatica* a *F. magna* jsou v České republice zaznamenávány stále častěji, má smysl sledovat rizikové faktory, které k výskytu přispívají, např. vyšší úhrn srážek apod. Některé z těchto faktorů lze dlouhodobě monitorovat a korelovat s ověřenými záznamy výskytu motolic. Následně je možné tvořit prediktivní modely předpovídající výskyt motolic a umožňující přijetí preventivních opatření (Novobilský, 2007b; McCann, 2010).

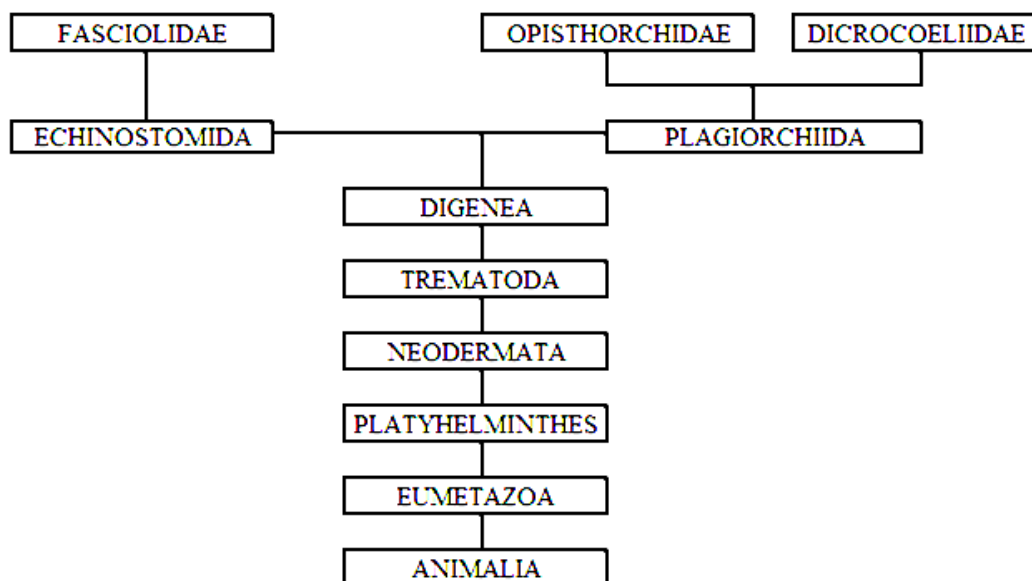
Literární rešerše shrnuje základní informace o morfologii, životních cyklech, patogenitě a výskytu vybraných druhů jaterních motolic. Dále zahrnuje dosavadní poznatky z oblasti léčby a diagnostiky se zaměřením na molekulárně-biologické a imunologické metody. Experimentální část práce zahrnuje aplikaci diagnostických metod v rámci projektů Helmintologické laboratoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

Hlavním cílem bakalářské práce bylo utřídění dostupných údajů souvisejících s diagnostikou a predikcí výskytu trematodóz se zaměřením na fasciolózu a fascioloidózu. Cíle jsou podrobněji rozebrány v samostatné kapitole.

2 Současný stav

2.1 Nejvýznamnější zástupci jaterních motolic

Jaterní motolice, zejména tři čeledí (Dicrocoeliidae, Opisthorchidae a Fasciolidae – taxonomické zařazení, viz obrázek 1), se vyskytují téměř po celém světě (Jíra, 1998). V některých oblastech způsobují značné ekonomické ztráty u hospodářských zvířat a je dokumentováno také množství nálezů člověka s následnými zdravotními komplikacemi (např. cholangiokarcinom, anémie, poškození jater, ikterus). Obecně se jedná o parazity trávicího traktu savců, kteří ke svému vývoji potřebují jednoho nebo více mezihostitelů. Dospělci jsou lokalizováni v jaterní tkáni nebo žlučovodech (Volf, 2007; Jíra, 1998).



Obrázek 1 - Taxonomické zařazení nejvýznamnějších čeledí jaterních motolic. Říše: Animalia, Podříše: Eumetazoa, Kmen: Platyhelminthes, Podkmen: Neodermata, Třída: Trematoda, Podtřída: Digenea, Řád: Plagiorchiida, Echinostomida, Čeleď: Dicrocoeliidae, Opisthorchidae, Fasciolidae (Manga-González, 2014)

2.1.1 Čeleď *Dicrocoeliidae*

Početná skupina motolic zahrnující více než 400 druhů. Jsou to parazité různých druhů obojživelníků, plazů, ptáků a savců. Veterinárně a medicínsky významná je motolice *Dicrocoelium dendriticum* (motolice kopinatá), jejíž základní charakteristika je shrnuta v tabulce 1 (Manga-González, 2014).

Tabulka 1 - Základní charakteristika motolice *Dicrocoelium dendriticum*: velikost, výskyt, meziphostitelé, definitivní hostitelé, lokalizace a příznaky (Jíra, 1998; Votava, 2003; Beck, 2015)

<i>DICROCOELIUM DENDRITICUM</i>	
Velikost	5–15 x 1,5–2,5 mm
Výskyt	Evropa (Rack, 2004; Ondriska, 1989) Afrika (Ofori, 2015) některé části Severní Ameriky (Goater, 2007; Colwell, 2010) Saudská Arábie (Albogami, 2015) Japonsko (Ohtori, 2014)
Meziphostitelé	1. plž z rodu např. <i>Zebrina</i> , <i>Theba</i> a <i>Helicella</i> 2. mravenec z rodu <i>Formica</i> , <i>Tetramorium</i> a <i>Cataglyphis</i>
Definitivní hostitelé	ovce, koza, skot, muflon, člověk
Lokalizace	žlučové cesty, žlučník
Příznaky onemocnění	zvracení, průjem, zácpa, bolesti v oblasti jater a slinivky

Vývojový cyklus *D. Dendriticum* je trojhostitelský, zahrnuje dva meziphostitele (suchozemského plže a mravence) a definitivního hostitele (přežvýkavce, člověka). Vajíčka produkovaná dospělou motolicí se uvolňují s trusem definitivního hostitele do vnějšího prostředí, kde jsou požitena plžem. Uvnitř plže se z vajíčka uvolní miracidia (larvální stadia), která se zde vyvíjí ze sporocysty do stadia redie a následně cercárie. Plž vylučuje sliz obsahující cercárie, tento sliz je požit mravencem, ve kterém cercárie encystují na infekční stadia pro definitivního hostitele (metacercárie).

Některé cercárie migrují do nervové soustavy mravence a mění jeho přirozené chování. Infikovaný mravenec v důsledku poškození nervové soustavy setrvává na vegetaci, se kterou je pozřen definitivním hostitelem. Metacercárie se uvolňují v duodenu definitivního hostitele, migrují do jater a následně putují do žlučových cest. Zde dospívají, přijímají potravu a znovu produkují vajíčka (Jíra, 1998).

2.1.2 Čeleď Opisthorchidae

Do této čeledi patří menší motolice parazitující zejména u ptáků a savců. Dva nejvýznamnější druhy, které ročně nakazí miliony lidí, jsou *Clonorchis sinensis* (motolice žlučová) a *Opisthorchis viverrini* (motolice thajská) (King, 2001). Obě jsou klasifikovány jako karcinogeny I. třídy způsobující cholangiokarcinom. Zásadní roli při tvorbě cholangiokarcinomu má mechanické poškození epitelu žlučových cest motolicemi, důsledkem čehož vzniká zánět a infekce. Dále je to také toxický efekt exkrementně-sekrecčních produktů (ES), tzn. látek produkovaných dospělými motolicemi. K tvorbě tohoto karcinomu může přispívat také přežívání motolic v lidském organismu až 26 let (Bouvard, 2009; Hong, 2012; Sripa, 2012). Základní charakteristika těchto motolic je uvedena v tabulce 2.

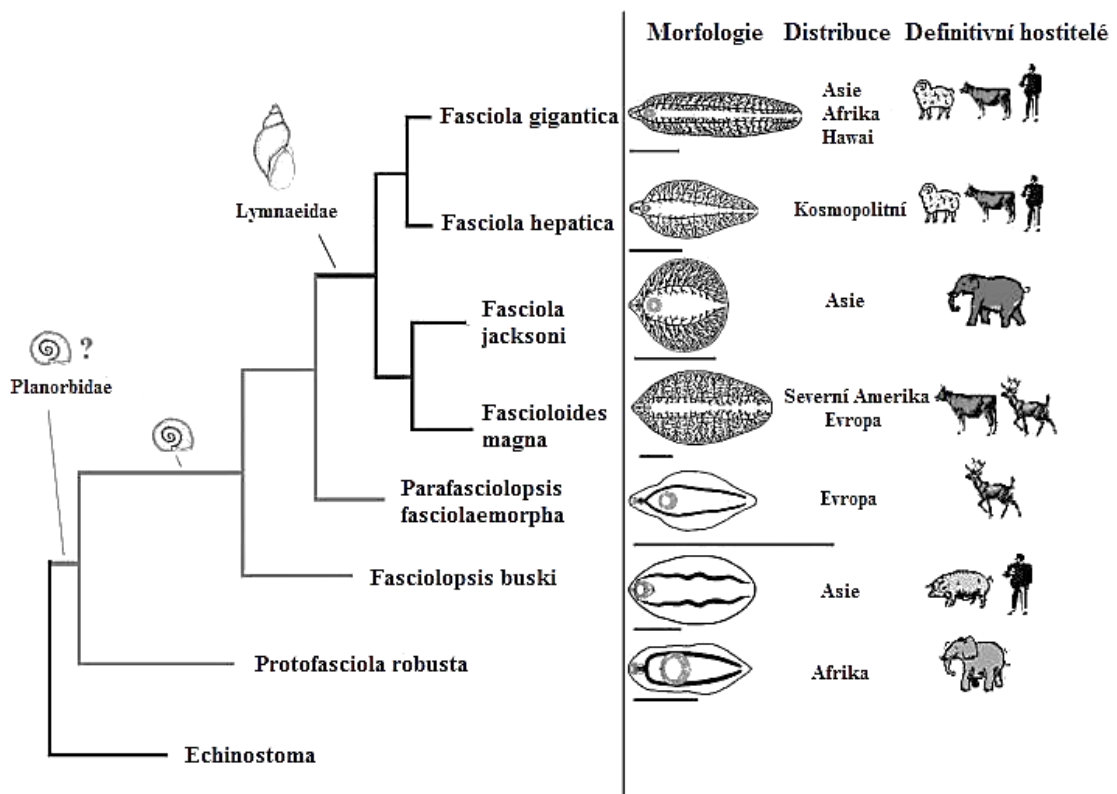
Tabulka 2 – Základní charakteristika motolic *Clonorchis sinensis* a *Opisthorchis viverrini*: velikost, výskyt, mezihostitelé, definitivní hostitelé, lokalizace a příznaky (Jíra, 1998; Votava, 2003, Volf, 2007)

	<i>CLONORCHIS SINENSIS</i>	<i>OPISTHORCHIS VIVERRINI</i>
Velikost	15 x 4 mm	8 x 2 mm
Výskyt	Jihovýchodní Asie, Japonsko, Jižní Korea (Qian, 2012; Sithithaworn, 2012)	Jihovýchodní Asie (Sithithaworn, 2012)
Mezihostitelé	1. plž z rodu <i>Bithynia</i> , <i>Melania</i> 2. ryba z čeledi Cyprinidae	1. plž z rodu <i>Bithynia</i> a <i>Lymnaea</i> 2. ryba z čeledi Cyprinidae
Definitivní hostitelé	člověk, kočka, pes, potkan, prase	člověk, pes, kočka, prase, cibetka
Lokalizace	žlučovod, žlučové cesty	žlučové cesty
Příznaky onemocnění	zvětšení a bolest jater, únava, ztráta hmotnosti, zvracení, průjmy, žlučové kameny (komplikací je karcinom jater)	

Vývojový cyklus obou motolic je prakticky stejný. Zahrnuje dva mezihostitele (vodní plž a ryba) a definitivního hostitele (člověk, masožraví savci). Dospělá motolice ve žlučových cestách produkuje vajíčka, která jsou uvolňována trusem do vnějšího prostředí a pozřena vodním plžem. Cerkárie uvolněná z plže plave ve vodě, kde vyhledává vhodnou rybu, jejíž kůži penetruje. Ve svalovině se opouzdří (encystuje) na další vývojové stadium, tj. metacerkárie. Konečným hostitelem jsou zejména masožraví savci i člověk, kteří se mohou nakazit konzumací syrových ryb (Bouvard, 2009; Jíra, 1998).

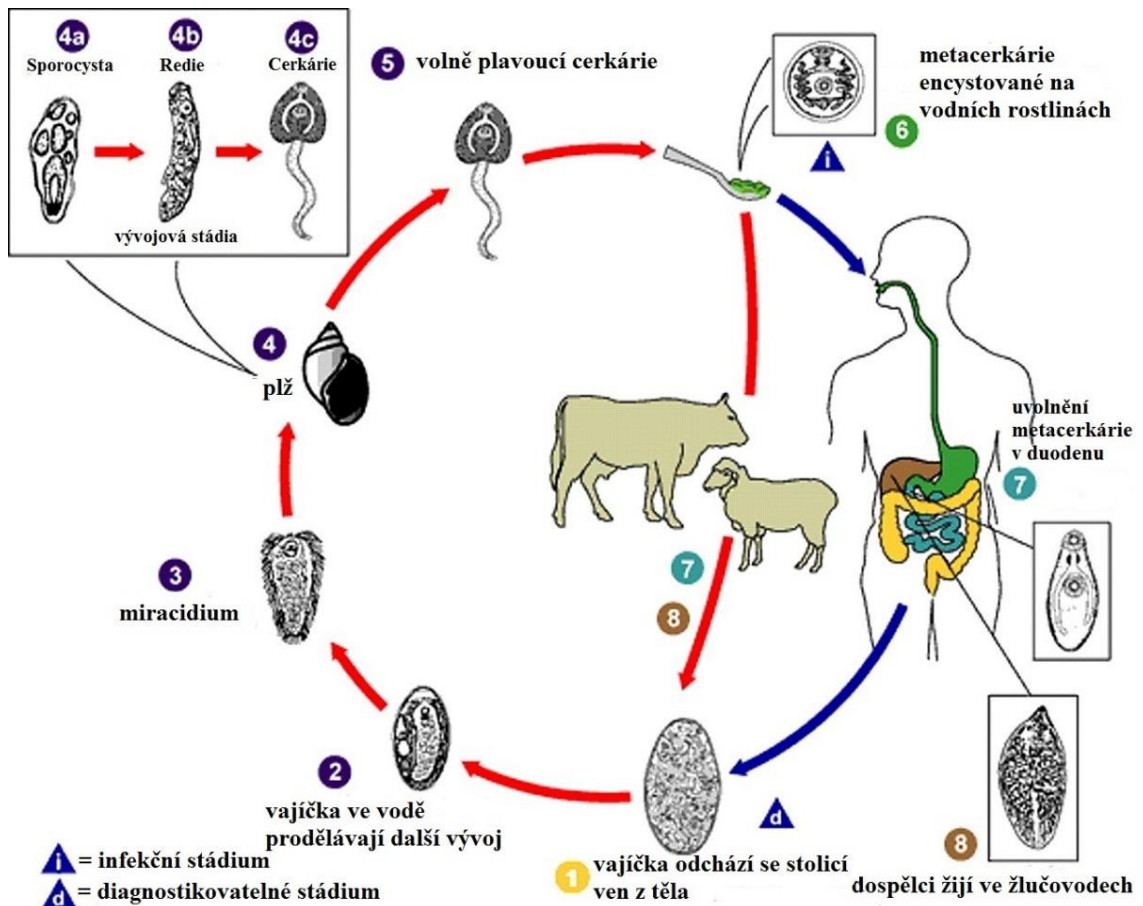
2.1.3 Čeleď Fasciolidae

Do této čeledi patří velké motolice parazitující u savců (především přežvýkavci). Mezi veterinárně a medicínsky nejvýznamnější druhy patří *F. hepatica*, *Fasciola gigantica* a *Fascioloides magna*. Přehled fasciolidních motolic, jejich hostitelů a oblasti výskytu shrnuje obrázek 2.



Obrázek 2 - Fylogenetické vztahy fasciolidních motolic (*Fasciola buski* a *Echinostoma* patří mezi motolice střevní, kterým se tato práce nevěnuje), jejich, morfologie, definitivní hostitelé a geografická distribuce (Lotfy, 2008)

Životní cyklus fasciolidních motolic je dvouhostitelský, zahrnuje tedy mezihostitele a definitivního hostitele. Příkladem může být životní cyklus *F. hepatica* (obrázek 3).



Obrázek 3 - Životní cyklus *Fasciola hepatica* (CDC, 2013)

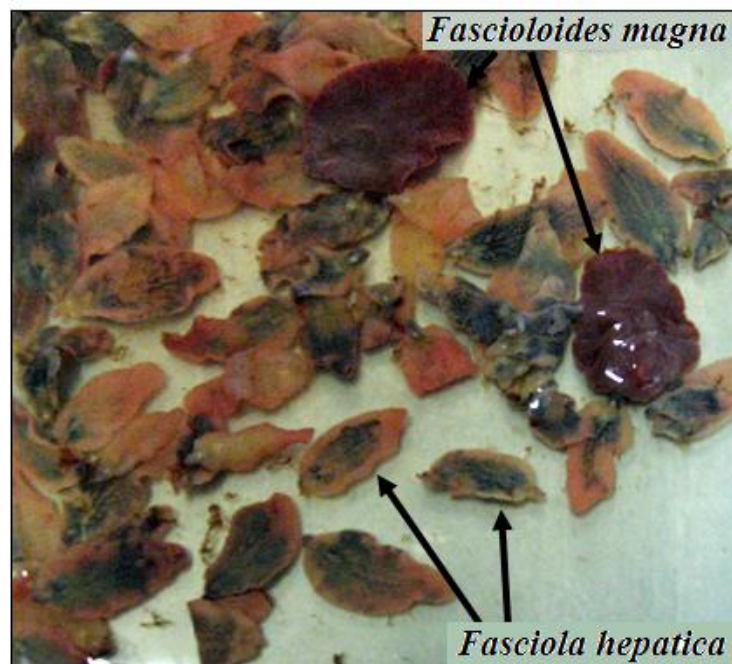
Dospělé motolice jsou lokalizovány ve žlučovodech, kde produkují vajíčka, která se spolu s trusem uvolňují do vnějšího prostředí. Pro vývoj potřebují vhodnou teplotu a vodní prostředí, ve kterém ve vajíčku dochází k embryonaci a vytvoření miracidia (první larvální stadium). Miracidium aktivně hledá mezihostitele (plže z čeledi Lymnaeidae) a proniká do něj. V mezihostiteli se z miracidia vyvine mateřská sporocysta, která dává vzniknout mateřským rediím, ty pak samostatně migrují do orgánových soustav plže a produkují dceřiné redie, uvnitř kterých se ze zárodečných buněk formují cercárie. Cercárie opouští mezihostitele a dostává se do vodního prostředí, kde se může usazovat na vodních rostlinách.

Přilnutím na vodní rostlinu se opouzdří (encystují) na metacerkárie (infekční stadia). Metacerkárie na vegetaci jsou pozřeny definitivním hostitelem a putují do trávicího traktu. Poté se z nich uvolní mladá motolice, která putuje z tenkého střeva do jater. *Fasciola hepatica* dospívá ve žlučovodech, kde dochází k příjmu potravy, rozmnožování a následnému vylučování vajíček (Pybus, 2001).

Významným zástupcem této čeledi v tropických oblastech je *F. gigantica*, jejíž velikost je 75 x 3-12 mm. Mezi rizikové oblasti, kde je prevalence u zvířat větší než 50 % a u člověka činí 19 %, patří např. Egypt (Grabner, 2014).

2.2 Fasciolidní motolice v Evropě

Tato práce se zaměřuje zejména na druhy vyskytující se v Evropě a v České republice, tedy *F. magna* a *F. hepatica* (viz obrázek 4).



Obrázek 4 - *Fascioloides magna* a *Fasciola hepatica*: Jedinci získaní pitvou jater nakaženého býka plemene Highland (foto Tomáš Siegel)

2.2.1 *Fasciola hepatica*

Základní údaje o *F. hepatica* shrnuje tabulka 3.

Tabulka 3 - Základní informace o *Fasciola hepatica*: velikost, výskyt, mezihostitelé, definitivní hostitelé, lokalizace, příznaky onemocnění (Jíra, 1998)

FASCIOLA HEPATICA	
Velikost	20-30 x 8-13 mm
Výskyt	kosmopolitní
Mezihostitelé	plž z čeledi Lymnaeidae, (<i>Galba truncatula</i> , <i>L. columella</i> , <i>L. humilis</i> nebo rod <i>Fossaria</i> , či <i>Stagnicola</i>)
Definitivní hostitelé	přežvýkavci (skot, ovce, jelenovítí), prase, člověk
Lokalizace	žlučové cesty
Příznaky onemocnění	zvracení, průjem, ikterus, cholelithiáza, eozinofilie, leukocytóza, jaterní cirhóza

Výskyt

- největší prevalence u člověka v některých částech Jižní Ameriky – Peru, Ekvádor a Bolívie (např. oblast Altiplano mezi jezerem Titicaca a údolím města La Paz, kde je prevalence velmi vysoká – 72-100%) a to i přes vysokou nadmořskou výšku 3800–4100 m. n. m. (Fuentes, 2001)
- výskyt *F. hepatica* v Evropě, viz obrázek 5



Obrázek 5 - Rozšíření *Fasciola hepatica* v Evropě (2000 - 2016): Portugalsko (Santos, 2012), Španělsko (Mezo, 2008), Francie (Ménard, 2001), Belgie (Bennema, 2009), Švýcarsko (Rapsch, 2006), Itálie (Rinaldi, 2015), Nizozemsko (Moll, 2000), Německo (Kuerpick, 2012), Rakousko (Kudlacek, 2012), ČR (Chroust, 2006), Slovinsko (Vengust, 2003b), Chorvatsko (Matanović, 2007), Bosna a Hercegovina (Hodžić, 2013), Albánie (Xhemollari, 2012), Srbsko (Pavlović, 2014), Řecko (Teofanova, 2011), Bulharsko (Teofanova, 2011), Rumunsko (Gabrielli, 2014), Ukrajina (Morozova, 2004), Polsko (Kiziewicz, 2013), Bělorusko (Semyenova, 2006), Švédsko (Novobilský, 2015), Dánsko (Olsen, 2015), Velká Británie (Charlier, 2014), Irsko (Bloemhoff, 2015)

2.2.2 *Fascioloides magna*

Základní údaje o *F. magna* poskytuje tabulka 4.

Tabulka 4 - Základní informace o *Fascioloides magna*: velikost, výskyt, mezihostitelé, definitivní hostitelé, lokalizace a příznaky (Pybus, 2001; Erhardová-Kotrlá, 1971; Leontovyč, 2014)

FASCIOLOIDES MAGNA	
Velikost	4-100 x 20-35 mm
Výskyt	Severní Amerika, Evropa
Mezihostitelé	plž z čeledi Lymnaeidae, v Evropě (<i>Galba truncatula</i> , <i>Radix labiata</i>), v Severní Americe (<i>Fossaria parva</i> , <i>F. modicella</i> , <i>Stagnicola palustris nuttalliana</i>)
Definitivní hostitelé	<ul style="list-style-type: none">• specifíční – např. jelen lesní (<i>Cervus elaphus</i>), daněk evropský (<i>Dama dama</i>), srnec obecný (<i>Capreolus capreolus</i>), jelen wapiti (<i>C. canadensis</i>), jelenec běloocasý (<i>Odocoileus virginianus</i>), karibu (<i>Rangifer tarandus</i>)• nesespecifíční (např. skot, lama, kůň),• netypičtí (např. ovce, koza)
Lokalizace	jaterní parenchym
Příznaky onemocnění	úbytek hmotnosti, eozinofilie, poškození jater

Výskyt

- Severní Amerika a Evropa (Pybus, 2001), v důsledku dovozu zvířat zaznamenána také v některých částech Afriky (Boomker, 1977) a Austrálie (Arundel, 1982)
- na evropském kontinentu byla *F. magna* zaznamenána poprvé v Itálii (Bassi, 1875) a později i v řadě dalších evropských zemích (viz obrázek 6)
- v České republice tuto motolici podrobně studovala v 60. letech 20. století Erhardová-Kotrlá, která identifikovala čtyři hlavní oblasti výskytu *F. magna* (1. Českobudějovicko a Třeboňsko, 2. Písecko a Milevsko, 3. Příbramsko a Rožmitálsko, 4. Novohradské hory a okolí) (Erhardová-Kotrlá, 1971), v těchto oblastech byl v roce 2002 proveden další průzkum a následná léčba (Chroustová, 2004)

- v posledních letech byla *F. magna* objevena u skotu pocházejícího z biofarmy v jižních Čechách (Leontovyč, 2014) nebo v obci Obecnice na Příbramsku (Kašný, 2012), jsou hlášena i další místa výskytu, například na jihozápadě u hranic s Německem, na severu u polských hranic nebo v blízkosti Karviné (Kašný, 2012)



Obrázek 6 - Rozšíření *Fascioloides magna* v Evropě: Itálie (Bassi 1875), ČR (Erhardová-Kotrlá, 1971), Chorvatsko (Marinculić, 2002), Rakousko (Ursprung, 2006), Maďarsko (Majoros, 1994), Srbsko (Trailović, 2016), Slovensko (Rajský, 2002), Polsko (Pyziel, 2014), Německo (Plötz, 2015), Slovinsko (Vengust, 2003a)

Patogenita

Projevy a průběh infekce závisí na mnoha faktorech (věk, zdravotní stav hostitele aj.). Jedním z nejdůležitějších je typ definitivního hostitele. Například jelen lesní může dlouho odolávat nákaze i přes vysoký počet parazitujících motolic, u srnce je tomu naopak. Při infekci dochází prvotně k poškození jaterního parenchymu vlivem migrace juvenilních stadií motolic. Dospělé motolice indukují tvorbu pseudocyst, ve kterých se vyskytují nejčastěji v párech a živí se krví. Na povrchu i uvnitř jater, ale také na plicích nebo mízních uzlinách, můžeme v důsledku parazitace rozeznat tmavý

pigment (hematin) vznikající jako vedlejší produkt při trávení krve (Chroustová, 2004; Pybus, 2001; Erhardová-Kotrlá, 1971).

U hostitelů definitivních specifických je pseudocysta propojena se žlučovody a díky tomu pak mohou být vajíčka uvolňována do vnějšího prostředí (např. u jelena se mohou objevit příznaky jako je úbytek hmotnosti, či snížená kvalita paroží) (Erhardová-Kotrlá, 1971; Pybus, 2001; Leontovyč, 2014).

U hostitelů definitivních nespecifických (neboli dead-end host) je pseudocysta silně opouzdřena, díky čemuž jsou žlučovody neprůchodné a vajíčka i tmavý pigment se hromadí v pseudocystě (k šíření motolice nedochází). Často dochází k těžkému poškození jater, nebo až k úhynu jedince. Příznaky byly studovány vzácně např. u experimentálně infikovaného skotu či morčat, kde byla pozorována zvýšená hladina eozinofilů, ztráta hmotnosti a zvýšené hladiny některých jaterních enzymů (AST, GMT) (Pybus, 2001; Leontovyč, 2014).

U netypických neboli aberantních hostitelů dochází k nadměrné migraci juvenilních motolic a tím i k těžkému poškození jaterní tkáně, krvácení nebo zánětu pobřišnice. Definitivní hostitel umírá zpravidla do šesti měsíců od nákazy. Jen zřídka tedy dochází k dospívání motolice a produkci vajíček (Pybus, 2001; Erhardová-Kotrlá, 1971; Leontovyč, 2014).

2.3 Průběh nákazy

Infekce fasciolidními motolicemi probíhá ve dvou fázích – akutní a chronické. Při požití kontaminované vody nebo potravy se do těla hostitele dostává infekční stadium motolice – metacerkárie, která putuje do gastrointestinálního traktu. Z metacerkárie se zde uvolňují juvenilní motolice, jež migrují přes stěnu tenkého střeva do jater, kde vyvolávají zánět. Motolice zanechávají svou migrací rozeznatelné stopy. V jaterním parenchymu pohloují krev hostitele, což může způsobovat např. anémii. Tato fáze se nazývá akutní a nedochází v ní k uvolňování vajíček. V chronické fázi onemocnění se dospělé motolice dostávají na místo jejich definitivní lokalizace a způsobují mechanické poškození (fibróza, kalcifikace).

2.4 Diagnostické metody jaterních motolic

V současné době se k diagnostice jaterních motolic využívá mnoho základních i moderních technik. Obecně lze metody dělit na přímé (koprologie, molekulární analýza, pitva) a nepřímé (např. průkaz protilátky proti parazitovi). Přímými metodami prokazujeme přítomnost parazita nebo jeho vývojových stadií. Metody nepřímé slouží k průkazu parametrů souvisejících s parazitární infekcí (např. průkaz protilátek proti danému parazitu). Využití diagnostických metod v akutní a chronické fázi onemocnění shrnuje tabulka 5.

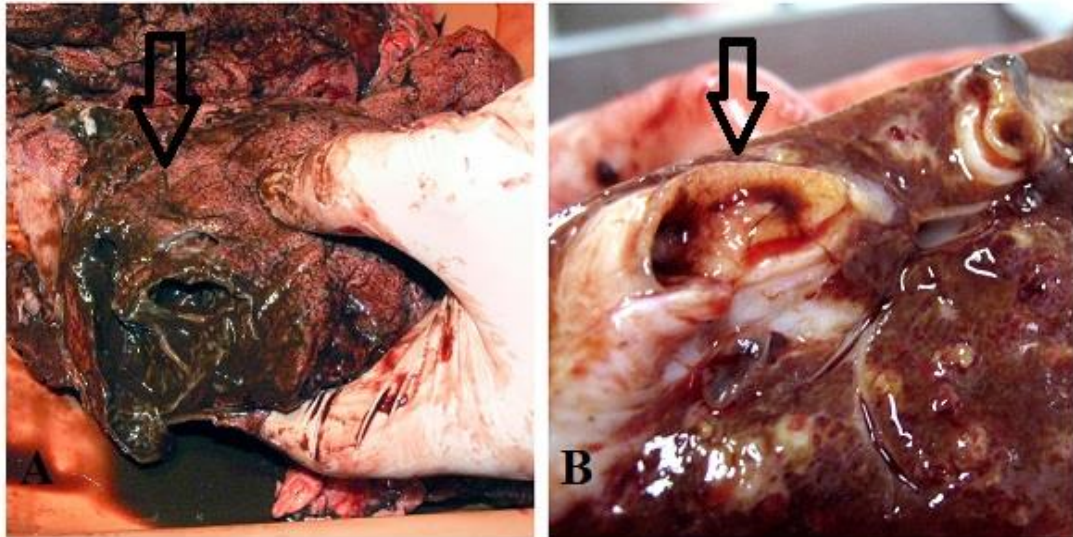
Tabulka 5 - Přehled diagnostických metod: detekce, výhody a nevýhody (Pybus, 2001; Kaufmann, 1996; Wensvoort, 1982; Novobilský, 2007a; Jira, 1998)

Metoda	Detekce parazita	Výhody	Nevýhody
Pitva	chronická fáze	přesné určení parazita	invazivní metoda
Koprologie	chronická fáze	neinvazivní metoda, jednoduchost	vajíčka motolic nelze vždy spolehlivě rozlišit, detekce až po 10. týdnu infekce
Molekulární analýza	akutní, chronická fáze	citlivost, specifita	snadná kontaminace vzorku
Biochemie	chronická fáze	jednoduchost a rychlost vyšetření	nespecifita
Hematologie	akutní, chronická fáze	jednoduchost, rychlost vyšetření	nespecifita
Imunologie	akutní, chronická fáze	citlivost, detekce v prvních týdnech infekce	omezená specifita (zkřížené reakce)

2.4.1 Pitva

Mezi nejdéle používané a nejspolehlivější diagnostické metody patří pitva infikované zvěře. Pseudocysty a juvenilní, či dospělá stadia motolic v duodenu, játrech nebo žlučovodech jsou již na první pohled patrná.

Hlavním diagnostickým znakem *F. magna* je tmavý pigment, který se nachází zejména na játrech, ale může být i na jiných orgánech břišní dutiny. Při infekci *F. hepatica* lze při pitvě pozorovat rozsáhlé kalcifikace žlučových (Kaufmann, 1996; Pybus, 2001). Obrázek 7 ukazuje infikovaná játra motolicemi *F. magna* a *F. hepatica*.



Obrázek 7 - Infikovaná játra: A – pseudocysta způsobená *Fascioloides magna*; B – kalcifikované žlučové vody v důsledku infekce *Fasciola hepatica* (fotodokumentace Katedry parazitologie PřF UK)

2.4.2 Biochemické vyšetření

Hodnoty jaterních enzymů patří mezi zastaralejší a často spíše nespolehlivé ukazatele onemocnění. Vyšší hodnoty poukazují na poškození jater, které může souviset s parazitární infekcí, ale mohou mít také jiné příčiny (hepatitida, tumor) (Dorchies, 2007). Příklady enzymů používaných při biochemickém vyšetření jako laboratorní ukazatele jaterního poškození (Racek, 2006):

- Aspartátaminotransferáza (AST) – vyskytuje se v řadě orgánů (játra, myokard, kosterní svalstvo, erytrocyty), zvýšená aktivita v séru je známkou rozpadu jaterních buněk (hepatocytů)
- Alaninaminotransferáza (ALT) – nejvíce obsažena v játrech (myokard a kosterní svalstvo – nižší aktivita), aktivita je v séru zvýšena již při malém poškození hepatocytů

- Laktátdehydrogenáza (LD) – do cirkulace je uvolněna již při malém tkáňovém poškození (játra, myokard, erythrocyty)
- Alkalická fosfatáza (ALP) – obsažena v řadě orgánů (játra, myokard, kosti, plíce), její hodnoty jsou zvýšené při mnoha onemocněních, např. virové hepatitidy nebo nádory jater
- Gamma-glutamyltransferáza (GMT) – obsažena převážně v játrech a ledvinách, zvýšené hodnoty jsou typické pro poškození hepatobiliárního traktu
- Glutamátdehydrogenáza (GMD) – nachází se v řadě orgánů (myokard, kosterní svaly, mozek), ale nejvíce specifická je pro játra (při poškození dochází k masivnímu vzestupu jejích hodnot)

2.4.3 Hematologické vyšetření

Hematologické vyšetření periferní krve může, stejně jako vyšetření biochemické, poukázat na parazitární onemocnění. Např. *F. hepatica* se při migraci do jaterní tkáně živí krví, což může být příčinou anémie (snížení hemoglobinu v krvi pod referenční mez, snížený počet erythrocytů a hematokritu), kterou lze hematologicky diagnostikovat. Nicméně anémie může mít i jiné příčiny (hemolýza, krvácení) (Jíra, 1998; Doubek, 2003). Dále lze provést vyšetření krevního obrazu, s jehož pomocí lze stanovit hladinu protilátek IgE. Tyto protilátky se u zdravých jedinců nachází pouze v nepatrném množství a zvýšené hodnoty jsou např. u alergií nebo parazitárních onemocnění (Toman, 2009).

2.4.4 Imunologické vyšetření

Imunologické metody slouží k průkazu protilátek proti danému parazitovi. Příkladem těchto metod je hemaglutinace, ELISA (Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay) a imunoblot:

- **Hemaglutinace** – navázání protilátek na antigen na erythrocytech hostitele (pokud je reakce pozitivní, dojde k vytvoření shluku erythrocytů, tzv. aglutinátu) (Bartůňková, 2005); metoda byla využita např. pro diagnostiku infekce *F. hepatica* u experimentálně infikovaného skotu (Levieux, 1992)

- **ELISA** (enzyme-linked immunosorbent assay) – metoda založená na interakci antigenu a protilátky (na antigen nebo protilátku je vždy navázán enzym, který katalyzuje přeměnu substrátu, přidaného do reakce, na barevný produkt), v laboratořích jsou dnes využívány speciální diagnostické soupravy ulehčující tuto metodu (např. SVANOVIR® *F.hepatica*-Ab ELISA od firmy Boehringer Ingelheim Svanova, BIO K 201 souprava pro detekci fasciola-antigenů nebo BIO K 211 pro detekci *F. hepatica* u skotu a ovcí od firmy Bio-X Diagnostics); kromě krve mohou být k testu využity i sliny, slzy nebo trus (Toman, 2009), příklady studií, kde byla ELISA využita, jsou shrnuty v tabulce 6
- **Imunobloting** - metoda založená na identifikaci konkrétního proteinu ve vzorku (reakce antigen-protilátka), proteiny jsou separovány elektroforézou a následně přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (přenos antigenu do pevné fáze a fixování jednotlivých frakcí), přenos může být uskutečněn difúzí nebo pomocí jednosměrného elektrického proudu (electroblotting) (Bartůňková, 2005), při diagnostice fasciolózy je tato metoda velmi přesná a umožňuje včas zahájit léčbu (Escalante, 2011); existuje řada imunoblotových souprav (např. Fasciola WB IgG, kvantitativní test pro jaterní motolice), přítomnost protilátek proti motolici je vizualizována na diagnostickém proužku modrým zbarvením (LDBIO Diagnostics: Fasciola WB IgG); modifikací je „dot blotting“ (využívá vyčištěné nativní antigeny nebo uměle připravené rekombinantní antigeny v tekuté fázi, které se nanášejí na membránu filtrací – metoda je snazší, ale nákladnější) (Bartůňková, 2005), dot-blot byl užit např. v Egyptě při diagnostice *F. gigantica* u nakažených pacientů; výsledky byly vizualizovány na membráně a podle zbarvení mohla být určena pozitivita, či negativita (Kamel, 2013)

Tabulka 6 - Možnosti využití ELISA testu pro detekci protilátek proti fasciolidním motolicím v krvi, trusu a mléku u experimentálně i přirozeně infikované zvěře a příklady jednotlivých studií

<p>Detekce protilátek v krvi (reakce na přítomnost exkrečně sekrečních produktů motolic)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • diagnostika skotu na jatkách na přítomnost protilátek proti fasciolidním druhům ve Vietnamu, citlivost metody zde byla 86,1 % a specifita 70 % (Anderson, 1999) • detekce protilátek proti <i>F. hepatica</i> v séru u experimentálně i přirozeně infikovaného skotu, diagnostická citlivost byla 98% a specifita testu ELISA byla 96% (Salimi-Bejestani, 2005a) • sledování humorální imunitní odpovědi experimentálně infikovaných koz na přítomnost <i>F. magna</i> a <i>F. hepatica</i>, metoda ELISA se ukázala být velmi citlivá, ale nespecifická pro rozlišení těchto druhů (Novobilský, 2007a)
<p>Detekce antigenu <i>F. hepatica</i> v trusu</p>
<ul style="list-style-type: none"> • detekce copro-antigenů <i>F. hepatica</i> ve výkalech experimentálně infikovaném skotu – tento kvantitativní test je mnohem citlivější než mikroskopické vyšetření trusu, je rychlý snadno proveditelný a užitečný pro větší množství vzorků (Abdel-Rahman, 1998) • detekce copro-antigenů za použití monoklonální protilátky MM3 – diagnostika <i>F. hepatica</i> u experimentálně infikovaných ovcí a přirozeně infikovaného skotu, metoda je spolehlivá, vysoce citlivá a usnadňuje včasnou diagnózu (Mezo, 2004)
<p>Detekce protilátek v mléku</p>
<ul style="list-style-type: none"> • diagnostika <i>F. hepatica</i> ve vzorcích mléka měla v této studii 92% citlivost a 88% specifitu (hladina protilátek v mléku koreluje s hladinou protilátek v séru, proto je toto stanovení vhodné jako alternativa pro stanovení v séru) (Salimi-Bejestani, 2007) • diagnostika jaterních motolic v Rakousku pomocí ELISA v hromadné nádrži mléka také vykazovala pozitivní korelace s hladinou protilátek v séru, a proto byla prokázána jako užitečný kontrolní diagnostický nástroj (Duscher, 2011) • testování protilátek proti <i>F. hepatica</i> pomocí ELISA ve vzorku odebraného ze směsné nádrže mléka v Německu (Kuerpick, 2013) • detekce protilátek, proti <i>F. hepatica</i>, ELISA použitá na vzorek odebraný z hromadné nádrže mléka v Irsku, studie prokázala, že 78 % skotu na farmách, bylo vystaveno jaterní motolici (Selemetas, 2015)

2.4.5 Koprologie

Koprologické vyšetření je mikroskopické vyšetření vajíček ve stolici (Jíra, 1998). Vyšetření je šetrné a jednoduché. Nevýhodou je, že vajíčka v trusu je možné prokázat až 10 týdnů po infekci. Pro jaterní motolice se nejčastěji využívá sedimentační metoda, při níž vajíčka parazita klesají na dno zkumavky díky své specifické hmotnosti. Optimální množství vzorku pro koprologické vyšetření je 10 g. Určení konkrétního druhu motolice není vždy jednoznačné, např. vajíčka *F. magna*, *F. hepatica* a *F. gigantica* nelze morfologicky spolehlivě rozlišit (Kaufmann, 1996).

2.4.6 Molekulární analýza

Molekulární analýza slouží k identifikaci segmentu DNA parazita ve vzorku. Metody molekulární biologie jsou vysoce citlivé a spolehlivé (Tavares, 2011). Nejprve je nutné provést izolaci DNA, která bude sloužit jako matrice pro amplifikaci konkrétního úseku. Izolaci je možné provést z vajíček motolic ve stolici, je však potřeba rozrušit stěnu vajíčka (např. homogenizace pomocí ultrazvuku nebo keramických kuliček) (Harmon, 2006).

Pomocí fenol-chloroformové extrakce můžeme izolovat DNA z tkáně parazita (Capuano, 2007). Principem je rozdělení složek směsi do několika fází, přičemž fáze obsahující DNA se odsaje a uchová k další analýze (Šmarda, 2005). V současnosti je nejužívanější metodou izolace adsorpce DNA na silikátový povrch. Prvním krokem je lyze buněk (uvolnění DNA), následuje vazba DNA na silikátový povrch kolonky. Třetím krokem je opakované propláchnutí navázané DNA promývacím roztokem a poslední krok je uvolnění čisté DNA z kolonky pomocí elučního pufru (Zvárová, 2012). Po izolaci DNA následuje amplifikace konkrétního úseku.

Hlavní metoda amplifikace DNA je PCR (polymerázová řetězová reakce) a její modifikace (Tavares, 2011). PCR je založena na replikaci úseku DNA. Principem je opakovaná řízená denaturace dvouvláknové DNA a následná renaturace jednovláknové DNA se specifickými oligonukleotidy (primery), které jsou v reakční směsi v nadbytku a slouží pak dále pro syntézu nového řetězce. Amplifikace probíhá v opakujících se cyklech, které mají tři základní kroky – denaturace (zahřátí DNA a rozpad vodíkových můstků), hybridizace (dosednutí primerů) a elongace (syntéza nového řetězce) (Šmarda,

2005). Existuje také řada modifikací, které se využívají v parazitologii (Tavares, 2011). Nejznámější jsou:

- Real time-PCR – amplifikace sledovaného úseku DNA v reálném čase (lze ho sledovat v každém cyklu reakce), reakce využívá fluorescenčních barviv (aplikace do vzorku), vzniklý signál je přímo úměrný množství vzniklého PCR produktu; hlavní výhodou Real time-PCR je kvantifikace počátečního množství DNA/RNA (Šmarda, 2005)
- LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) – velmi citlivá metoda využívající čtyř specifických primerů speciálně navržených pro rozlišení šesti různých sekvencí genu, jednoduchá a dostupná i pro menší laboratoře; z důvodu izotermického průběhu reakce není potřeba nákladného přístrojového vybavení (thermocycler) (Notomi, 2000); technika může mít velký potenciál pro detekci fasciolidních druhů (je desetkrát citlivější než ostatní modifikace PCR) (Ai, 2010)
- PCR-RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) – využívána pro diferenciaci některých fasciolidních motolic (McGarr, 2007), využívá krátkých primerů o délce 8 – 12 nukleotidů s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA, které nasedají na více místech DNA, výsledkem je amplifikace velkého množství krátkých fragmentů DNA; metoda se využívá např. pro taxonomické studie, produkty PCR-RAPD se využívají např. pro přípravu hybridizačních sond (Šmarda, 2005)
- PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) – metoda, při které jsou amplifikované produkty štěpeny restriční endonukleázou a následně analyzovány elektroforézou (Šmarda, 2005); mezi *F. hepatica* a *F. gigantica* tato metoda sledovala několik odchylek mezi sekvencemi nukleotidů (Marcilla, 2002)
- HRM (High resolution melting) – metoda sloužící k detekci mutací a polymorfismů, založená na rozpadu dvouvláknové DNA, která je fluorescenčně značena (rozpad vláken DNA závisí na počtu vodíkových můstků, tzn. na poměru párů bází a je zaznamenáván se snižující se intenzitou fluorescenčního záření) (Gundry, 2003; Wittwer, 2009)

2.5 Léčba

K léčbě fasciolózy a fascioloidózy se užívají antihelmintika podávaná nejčastěji perorální formou (krmné směsi) a výjimečně injekčně. Lékem první volby proti většině motolic je praziquantel, ale proti fasciolidním druhům je tento lék neúčinný (Chai, 2013). Hlavní antihelmintikum je tedy triklabendazol, který účinkuje na juvenilní i dospělá stadia motolic (Fang, 2014). V posledních letech však stoupá rezistence vůči léčivům a vývoj nových preparátů nedosahuje požadovaných výsledků a účinků (Fairweather, 1999). Příklady léčivých přípravků shrnuje tabulka číslo 7. I když bylo dosaženo jistého pokroku, účinná vakcína proti fasciolidním motolicím stále neexistuje. Hlavními kandidáty na výrobu vakcín by mohly být antigeny nacházející se na povrchu migrujících motolic (Toet, 2014; Turner, 2016). U skotu, jemuž byla podána očkovací látka založená na rekombinantním katepsinu L1, bylo při porážce prokázáno snížení parazitární zátěže (Golden, 2010).

Tabulka 7 - Příklady léčiv užívaných proti motolicím: účinná látka, způsob podání, využití na druh zvíře a účinek (Fairweather, 1999; Lacey, 1988)

Přípravek	Účinná látka	Způsob podání	Využití	Účinek
Flukiver	Closantel	perorálně, subkutánně	ovce, skot	narušení oxidativní fosforylace a spastická paralýza motolic (vysoce účinné proti dospělým motolicím a dobře účinné i na motolice staré 6 – 8 týdnů)
Seponver	Closantel	perorálně	ovce, skot	
Supaverm	Closantel + mebendazol	perorálně	ovce	
Ranizole	Rafoxanid + ivermektin + levamisol	perorálně	ovce, koza	
Rafendazol premix	Rafoxanid + mebendazol	perorálně	daněk, jelen, srnec, muflon, kamzík	
Valbazen	Albendazol	perorálně	skot, ovce, koza	narušují proces tvorby mikrotubulů, tím že vyvolávají jejich depolymerizaci
Fasinex 10%	Triklabendazol	perorálně	ovce, skot	narušení glykolytického metabolismu motolic
Flukiver	Clorsulon + ivermektin	subkutánně	skot	
Seponver	Clorsulon + ivermektin	subkutánně	skot	

2.6 Predikce trematodóz

Pro dlouhodobou predikci výskytu některých druhů motolic, včetně jaterních, je zapotřebí identifikovat rizikové faktory a stanovit možnosti provedení různých opatření (Fox, 2012).

2.6.1 Rizika spojená s výskytem a nákazou motolic

Riziko nákazy motolicemi zvyšují zejména klimatické podmínky (teplota a srážky) vhodné pro vývoj motolice a život mezipřehoditele (plže). Vyšší prevalenci a distribuci fasciolidních motolic zaznamenáváme v oblastech, kde se průměrná roční teplota pohybuje v rozpětí 10–25°C (Freitas, 2014). Plži se vyskytují hlavně v bažinách a stojatých i tekoucích vodách (Kuerpick, 2013). Pro dobytek proto představují riziko pastviny, na kterých se nacházejí vodní plochy, nebo sem mají přístup volně žijící přežvýkavci, kteří mohou kontaminovat prostředí svým trusem (Howell, 2015; McCann, 2010; Foreyt, 1976). Motolice se mohou také přizpůsobovat novým podmínkám, např. *F. hepatica* vyskytující se zejména v nížinách se může přizpůsobit i vyšším nadmořským výškám 3800–4100 m. n. m. (oblast Altiplano) (Mas-Coma, 2001). U motolic z čeledi Opisthorchidae představuje hlavní riziko konzumace syrových ryb (mezipřehoditelé), které jsou v některých zemích tradičním pokrmem (Dang, 2008), nízká informovanost o nákaze (Sithithaworn, 2012) nebo hygiena. Příkladem mohou být některé oblasti v Číně, kde jsou toalety postaveny v blízkosti rybníků. Pokud je tedy člověk nakažen motolicí dostávají se vajíčka do vnějšího prostředí výkaly a blízký rybník je vhodný pro jejich vývoj (Lun, 2005). Na základě rizikových faktorů je poté možno vytvořit prediktivní modely sloužící ke sledování výskytu onemocnění.

2.6.2 Geografický informační systém

V posledních letech se k mapování motolic využívají různé prediktivní modely založené na klimatických datech (Howell, 2015). Roku 2000 vznikl plán, který si kladl za cíl vytvořit celosvětovou síť spolupracujících zdravotnických a vědeckých pracovníků za účelem rozvoje počítačových modelů umožňujících predefinovat oblasti s výskytem onemocnění. Jedním z nástrojů, s jejichž pomocí je možné tyto modely generovat je geografický informační systém (Malone, 2001).

Geografický informační systém (GIS) je počítačový informační systém sloužící k získávání, analýze, modelování a vizualizaci dat (Tuček, 1998). V současné době se využívá mimo jiné k mapování v oblasti zemědělství, životního prostředí nebo ke sledování chorob a předvídání možného nebezpečí (Fuentes, 2001). Důležitá je i souvislost GIS a jiných počítačových systémů (CAM, DPZ, NDVI) poskytujících data, která jsou informačním systémem zpracovávána.

- CAM (počítačová kartografie) – sběr a zobrazování kartografických a geografických dat
- DPZ (dálkový průzkum Země) – uchovávání a zpracovávání digitálních leteckých a vesmírných snímků (Tuček, 1998)
- NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) – výskyt živé vegetace v určité oblasti

V posledním desetiletí uplatnění GIS v parazitologii a veterinární medicíně vzrostlo, protože umožňuje propojit vliv prostředí a šíření nemoci, čímž se pro toto použití stává unikátním (Lyseen, 2014). Pro mapování rizika fasciolózy lze vytipovat oblasti dle různých kritérií, jako jsou vodní plochy, charakter půdy, výskyt dobytka (Tum, 2004).

Predikce výskytu motolic pomocí GIS analýzy byla provedena již v několika státech. V dubnu 2000 byl sestaven plán pro vytvoření celosvětové sítě spolupracujících zdravotníků a vědců. Model by měl kontrolovat nemoci přenášené plži (Malone, 2001). Studie predikce výskytu motolic dosahují pozitivních výsledků s pomocí GIS.

Jedna ze studií byla provedena např. v Německu, kde je průměrná roční teplota 2–8 °C a roční úhrn srážek 789 mm. Cílem této studie bylo vyhodnotit séroprevalenci *F. hepatica* u dojnic. Vzorky z hromadné nádrže mléka byly odebrány ze všech spolkových zemí Německa a vyšetřeny pomocí ELISA. Výsledky vyšetření napomohly při sledování různých prostorových faktorů (GIS), které by mohly ovlivnit výskyt fasciolózy. Pro GIS analýzu bylo třeba zaznamenat poštovní směrovací číslo farmy, ve které byl vzorek odebrán, hustotu dobytka, klimatická data, využívaný typ půdy a vodní útvary nacházející se na farmě. Průměrná séroprevalence v Německu byla 23,6 %. V jednotlivých regionech se séroprevalence lišila v závislosti na geografickém rozložení (např. ve Šlesvicku-Holštýnsku byla prevalence nejvyšší, což může souviset s tím, že se jedná o pobřežní stát s větší vlhkostí půdy). Zjištěné rizikové faktory pro výskyt

F. hepatica byly např. množství dobytka v jednotlivých farmách, výskyt vodních ploch, nadmořská výška (Kuerpick, 2013). Oproti jiným studiím (Bennema, 2009) neměla v Německu teplota a srážky na výskyt *F. hepatica* významný vliv. Zásadním problémem vyplývajícím z této studie je, že na mnoha farmách není fasciolóza včas rozpoznána a většinou není ani léčena z důvodu vysokých nákladů na léčbu (Kuerpick, 2013).

GIS analýza pro predikci výskytu motolic byla použita také v Etiopii, kde odhalila, že nejvyšší prevalence *F. gigantica* je v západní části nilského povodí a také, že riziko infekce *F. hepatica* klesá s klesající nadmořskou výškou (u *F. gigantica* je tomu naopak) (Asrat, 2007).

Další průzkum byl proveden ve Švédsku s cílem identifikovat oblasti výskytu *F. hepatica* a charakterizovat rizikové faktory. U skotu na farmách byly odebrány vzorky krve. Hladina protilátek ve vzorku byla stanovena pomocí ELISA. Farmy byly identifikovány pomocí poštovního směrovacího čísla (s výjimkou cca 12 %). Stádo, ve kterém byl diagnostikován alespoň jeden pozitivní vzorek, bylo označeno jako séropozitivní. Celková séroprevalence byla 9,5 % (nejvyšší na jihu Švédska). Získané údaje odhalily souvislost výskytu *F. hepatica* s množstvím srážek a teplotou, ale žádné další faktory s významnější korelací s výskytem fasciolózy nebyly identifikovány (Novobilský, 2015).

GIS analýza byla využita také pro identifikaci výskytu *O. viverrini* v Thajsku. Různým věkovým skupinám obyvatel byly odebrány vzorky stolice, které byly mikroskopicky vyšetřeny. Vyšetření odhalilo přítomnost *O. viverrini* v 20,4 % vzorků, přičemž nejvyšší prevalence byla na venkově u obyvatel ve věku 50–59 let. Většina pracovala v zemědělství. Studie odhalila, že některé skupiny obyvatel jsou k infekci náchylnější. S vyšší prevalencí souvisí např. nižší vzdělání a nízké povědomí ohledně kontaminované potravy (Wattanayingcharoenchaia, 2011). Dále GIS analýza odhalila vysokou prevalenci soustředující se v oblasti podél údolí řeky Mekong. Rozdílné prevalence v povodí řek mohou být vysvětleny odlišnými stravovacími návyky obyvatel. Prevalence byla vyšší v oblastech s nižší nadmořskou výškou a tam, kde se nacházela půda s vyšším obsahem vody (Wang, 2013).

2.6.3 Opatření proti výskytu motolic

Základem je správná diagnostika a účinná terapie. Erhardová-Kotrlá zaznamenala v 60. letech 20. století v České republice oblasti s vysokou prevalencí *F. magna*. Během let 2002–2004 bylo v těchto oblastech znovu provedeno vyšetření pro zhodnocení současného stavu výskytu. Prevalence v těchto oblastech byla 56,2 %, a proto bylo přistoupeno k léčbě přípravkem Rafendazol premix, díky němuž prevalence klesla (Chroustová, 2004). Jednotlivá opatření lze rozdělit na fyzikální, chemické a biologické.

- fyzikální – odvodňování a vysoušení pastvin (Charlier, 2011)
- chemické – použití moluskocidů (hubení plžů) je v současnosti diskutabilní, přípravek Frescon (účinná látka N-tritylmorfolin) byl užit pro kontrolu infekce *F. hepatica* u ovcí, již při jedné aplikaci dosáhla účinnost 90 %, ale při použití moluskocidů dochází také k poškození ekosystému; alternativou jsou moluskocidy z rostlinných extraktů (Hammami, 2011; Crossland, 1976)
- biologické – introdukce plžů, kteří eliminují výskyt mezihostitelského plže nebo vysazení přirozeného predátora; např. zavedením plžů *Zonitoides nitidus* a *Oxychilus draparnaudi* došlo k eliminaci *Galba truncatula* (mezihostitel fasciolidních motolic) již po jednom roce (Rondelaud, 2006)

3 Cíle práce

1. Shrnutí základních informací souvisejících s morfologií, životními cykly a patogenitou vybraných druhů jaterních motolic. Zvláště pak informace o predikci výskytu motolic se zaměřením na využití geografického informačního systému.
2. Souhrn dosavadních poznatků z oblasti léčby a diagnostiky se zaměřením na molekulární a imunologické metody.
3. Aplikace diagnostických metod v rámci projektů Helmintologické laboratoře Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, včetně osvojení základních technik užívaných pro parazitologické vyšetření (koprologie, molekulární analýza, sérologie).

4 Materiál a metodika

V rámci praktické části předkládané práce byly zpracovány vzorky tří studií související s projekty Helmintologické laboratoře Přf UK, při kterých byly využity koprologické, imunologické a molekulární analýzy.

1. Diagnostika motolic čeledí Fasciolidae a Paramphistomidae v koprologickém materiálu importovaných zubrů (VP Ralsko) a následná molekulární determinace.
2. Molekulární diagnostika ptačích motolic způsobujících cercáriovou dermatitidu na koupalištích v ČR (osvojení laboratorní metody).
3. Sledování protilátkové odpovědi experimentálně nakažených beranů motolicí *F. hepatica*.

4.1 Koprologické vyšetření

Materiál ke koprologickému vyšetření na přítomnost motolic *F. magna*, *F. hepatica* a *P. cervi*, byl získán z trusu volně žijící zvěře. Vzorky trusu byly uchovány v lednici a použity ke zpracování. Čtyři vzorky pocházely od zubrů (*Bison bisonus*) z roku 2015 vyskytujících se v oblasti bývalého vojenského prostoru Ralsko (import z Bělověžského pralesa, Polsko). Další dva vzorky trusu pocházely z roku 2013 z jelenů lesních (*Cervus elaphus*) chovaných v oboře Točná v Brdech.

Všechny vzorky trusu byly zpracovány sedimentační metodou, která využívá specifické hmotnosti vajíček motolic sedimentujících na dno nádoby. Byl odebrán vzorek trusu o velikosti vlašského ořechu (10 g), který byl poté rozmělněn s vodou přes síto do skleněné nádoby a zbaven tak nestrávených zbytků potravy. Suspenze se nechala 10 minut odstát a vzniklý sediment byl použit pro mikroskopické vyšetření (Olympus CX 21). Z každého vzorku byly zhotoveny celkem čtyři nativní mikroskopické preparáty. Při pozitivním nálezů vajíček motolic byl odebrán vzorek sedimentu do 1,5 ml polypropylenové zkumavky pro molekulární analýzu. Pozitivní nález vajíček motolic byl dokumentován na mikroskopu BX 51 (Olympus) se snímací kamerou DP 70 (Olympus) pomocí softwaru DP Controller (Olympus).

4.2 Molekulární analýza

V experimentu 1 byla analyzována různá vývojová stadia ptačích motolic (dospělci, vajíčka, miracidia) pocházející z uhynulých labutí. Materiálem pro molekulární analýzu v rámci experimentu 2 byly vzorky trusu s nálezem vajíček motolic.

4.2.1 Experiment 1: Molekulární diagnostika ptačích motolic způsobujících cercáriovou dermatitidu na koupalištích v ČR

V rámci osvojení si vybavení laboratoře byla molekulární diagnostika realizována nejdříve se vzorky ptačích schistosom (*T. regenti* a *T. szidati*) jejichž životní cykly jsou v helmintologické laboratoři dlouhodobě zavedeny.

Materiál znázorňuje tabulka 8. Na základě morfologie, lokalizace a definitivního hostitele bylo předpokládáno, že vzorky budou obsahovat motolice čeledi Schistosomatidae. Monitoring výskytu ptačích motolic z čeledi Schistosomatidae na koupalištích v ČR je součástí výzkumu Helmintologické laboratoře PřF UK, který započal v roce 2013. Jedná se o sledování druhového složení ptačích motolic na vybraných veřejných koupalištích s výskytem cercáriové dermatitidy. Toto onemocnění je na území ČR vyvoláno především motolicemi z rodu *Trichobilharzia*. U člověka dochází při opakované nákaze k tvorbě kožních puchýřů a skvrn v důsledku penetrujících cercárií do kůže, kde jsou likvidovány imunitním systémem a nejsou schopné dalšího vývoje (Jíra 1998).

Tabulka 8 - Materiál pro diagnostiku ptačích motolic: výskyt, datum odběru, zkoumaný parazit

Číslo vzorku	Zdroj	Lokalita	Materiál	Datum odběru
1	Labuť III	Berounka	vejce (seškrab ze střeva)	7. 1. 2016
2			červ ve sliznici	
3	Labuť 853	Senecký rybník	vejce (seškrab ze střeva)	2. 3. 2016
4			červ ve sliznici	
5			vejce (seškrab ze střeva)	
6			červ z cévy	
7	Labuť 738	Plzeňsko	vejce (seškrab ze střeva)	3. 3. 2016
8			červ ve sliznici	

9	Labuť 850	Bolevecký rybník	miracidia v trusu	2. 2. 2016
10	Labuť	Praha-Barrandov	vejce (nosní sliznice)	25. 2. 2016
11			červ (nosní sliznice)	
12	Labuť	Plzeňsko	vejce (seškrab ze střeva)	20. 1. 2016
13			vejce (seškrab ze střeva)	
14			červ (ve střevní sliznici)	
15	Labuť 836	Ejpvovice	vejce (seškrab ze střeva)	6. 1. 2016
16			vejce (seškrab ze střeva)	

Izolace DNA

DNA ze vzorků fixovaných v 96% molekulárním etanolu byla izolována pomocí izolačního kitu Exgene tissue SV mini (GeneAll), dle přiloženého protokolu. Koncentrace a čistota izolované DNA byla měřena na spektrofotometru ND-1000 (NanoDrop®).

PCR

Celkový objem reakční směsi byl 50 µl, její složení shrnuje tabulka číslo 9. Jako marker pro molekulární analýzu byl užit úsek ITS-1, ITS-2 a 5.8 S region rDNA. Primery užití k PCR reakci byly – its5Trem (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') a its4Trem (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (Dvořák, 2002). Součástí reakce byla také pozitivní a negativní kontrola. Pozitivní kontrola obsahovala izolovanou DNA z cercárií *Trichobilharzia szidati* a *T. regenti*.

Tabulka 9 - Reakční směs pro PCR reakci při diagnostice ptačích motolic

Reakční směs	
REDTaq® ReadyMix (Sigma-Aldrich)	25 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
Destilovaná H ₂ O	13 µl
Izolovaná DNA	10 µl

Program cycleru: počáteční denaturace 95°C 5 min; 35 x (denaturace 95°C 1 min, annealing 50°C 45 s, elongace 72°C 2 min), terminální elongace 72°C 10 min, chlazení 4°C (Dvořák, 2002).

Gelová elektroforéza

Nejprve byl připraven 1,5% agarosový gel, pro vizualizaci bylo přidáno barvivo SYBR Green I (Invitrogen). Roztok byl nalit do elektroforetické vany s hřebenem. Do první jamky gelu byl vždy nanesen velikostní standard GeneRuler mix (ThermoFisher Scientific). Do ostatních jamek byly nanесeny vzorky získané z PCR. Elektroforéza probíhala při napětí 120 V.

Vyhodnocení sekvenace

Získané sekvence byly upraveny v programu Chromas ze softwarového balíku DNASTAR[®] (Lasergene). Sekvence primerů byly odstraněny a sekvenační chyby opraveny. Upravené sekvence byly srovnány s databází NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), pro předběžné zjištění druhu motolic.

4.2.2 Experiment 2: Diagnostika fasciolidních motolic v koprologickém materiálu importovaných zubrů (VP Ralsko)

Izolace DNA

Ze sedimentu koprologického vyšetření byla izolována DNA pomocí izolačního kitu QIAamp[®] DNA Stool mini kit (QIAGEN). Byl označen jako nejvhodnější volba k izolaci DNA z trusu (Sieglová 2012). Při izolaci se postupovalo dle přiloženého protokolu. Vzhledem k nízkému počtu vajíček ve vzorku byla DNA eluována do menšího objemu (50 µl), než uvádí protokol (200 µl). Koncentrace a čistota izolované DNA byla měřena spektrofotometrem ND-1000 (NanoDrop[®]). DNA byla izolována také z negativních vzorků trusu, ke kterým byla přidána vajíčka *F. magna*, *F. hepatica* a směsný vzorek s *F. magna* i *F. hepatica*. Tyto vzorky představovaly pozitivní kontrolu izolace DNA.

PCR

Jako marker (specifická nukleotidová sekvence) pro molekulární analýzu byl užit ITS-2 (Internal Transcribed Spacer) region ribozomální DNA o velikosti 364 bp, podle kterého můžeme rozeznat jednotlivé druhy motolic. Na základě odlišností

v sekvenci ITS-2 byly pro různé druhy motolic navrženy a použity specifické primery (forward a reverse) znázorněné v tabulce 10 (Králová-Hromadová, 2008). Celkový objem reakční směsi (tabulka 11) pro PCR reakci byl 25 µl. Izolovaná DNA a H₂O byly doplněny na základě naměřené koncentrace. Jednotlivé vzorky byly testovány na přítomnost *F. hepatica*, *F. magna*, *P. Cervi*, jejichž vajíčka jsou morfologicky nerozlišitelná. Jako pozitivní kontrola byly použity vzorky trusu, k nimž byla přidána vajíčka motolic *F. magna* a *F. hepatica* (kontrola izolace DNA). Další pozitivní kontrolu představovala DNA izolovaná přímo z červů (*F. magna*, *F. hepatica*, *P. cervi*). Tato kontrola hodnotila průběh PCR reakce.

Tabulka 10 - Primery použité pro PCR reakci (Králová-Hromadová, 2008)

Druh motolice	Sekvence	Amplikon
<i>Fascioloides magna</i>	Fw: 5'-ACCAGTTATCGTTGTGTTG-3' Rev: 5'-CCGTCTTTAAACAACAG-3'	152 bp
<i>Fasciola hepatica</i>	Fw: 5'-CTTATGATTTCTGGGATAATT-3' Rev: 5'-CCGTGCTATATGAAAA-3'	112 bp
<i>Paramphistomum cervi</i>	Fw: 5'-CGCGTCTTGCTGGTAGCGCAGAC-3' Rev: 5'-GTAACAGAACACCACAGTAGGTGATCA-3'	161 bp

Tabulka 11 - Reakční směs pro PCR

Reakční směs	
REDTaq [®] ReadyMix (Sigma-Aldrich)	12,5 µl
Primer forward (dle tabulky č. 8)	0,5 µl
Primer reverse (dle tabulky č. 8)	0,5 µl
Destilovaná H ₂ O	různé množství
Izolovaná DNA	dle naměřené koncentrace

Takto připravené vzorky byly promíchány a vloženy do termocycleru C1000 (Bio-Rad). Program cycleru: počáteční denaturace 94°C 5 min; 30 x (denaturace 94°C 30 s, annealing 55°C 30 s, elongace 72°C 2 min), terminální elongace 72°C 10 min, chlazení 4°C.

Gelová elektroforéza

Postup při elektroforéze byl stejný jako u experimentu 1.

4.3 Imunologická diagnostika

Materiálem pro imunologické vyšetření byla séra z beranů experimentálně nakažených *F. hepatica* v rámci projektu Farmaceutické univerzity UK v Hradci Králové. K vyšetření byly použity negativní vzorky sér před nákazou z 22. 1. 2016 a pozitivní vzorky sér po naze z 11. 4. 2016. Berani byli označeni písmeny A, B a C. K diagnostice byly využity dvě metody - imunoblot a ELISA.

ELISA

Prvním použitým antigenem byly koncentrované a přečištěné exkrece-sekreční (ES1) produkty motolic *F. hepatica*, tzn. látky produkované dospělými motolicemi do kultivačního média (Jíra, 1998). Druhým antigenem bylo nekoncentrované nepřečištěné RPMI 1640 kultivační médium (odebrané po 6 h inkubace dospělých červů *F. hepatica*) s ES produkty (ES2). Antigen ES1 byl naředěn uhličitanovým pufrem (pH = 9,6) na výslednou koncentraci 0,6 µg na jamku. Dále byl připraven druhý antigen ES2 o neznámé koncentraci, 5 µl na jamku. Oba antigeny byly ve 100 µl uhličitanového pufru napipetovány do příslušných jamek (tabulka 12) a inkubovány přes noc. Druhý den byly z jamek vymyty nenavázané zbytky antigenu fosfátovým pufrem - PBS (0,1 M; pH = 7,2) s přídavkem 0,05% Tween (Bio-Rad). Promývání bylo provedeno třikrát po 1 min. Za účelem zamezení tvorby nespecifických vazeb, byla destička blokována roztokem 1% BSA s PBS a 1 h inkubována při pokojové teplotě. Z destičky byly poté odstraněny zbytky blokovacího roztoku a do jamek byla napipetována primární protilátka (beránčí sérum) naředěná v poměru 1:50 s PBS, celkem 100 µl (tabulka 12). Destička byla 3 hodiny inkubována při pokojové teplotě. Po inkubaci byla destička opět třikrát promyta PBS (3x1 min) a následně byla přidána sekundární protilátka (anti-sheep IgG) naředěná v poměru 1:1000 v PBS, celkem 100 µl. Inkubace probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě, destička byla opět promyta (3x1 min) a do všech jamek byl přidán TMB substrát (tetramethylbenzidin), celkem 100 µl.

Po přidání substrátu se ihned objevilo modré zbarvení. Absorbance byla měřena při 635 nm na přístroji Infinite M200 (Tecan).

Tabulka 12. Schéma ELISA experimentu (Ag_1 – antigen₁-ES1 produkt; Ag_2 – antigen₂-ES2-RPMI médium; 1_A – sérum z 11. 4. 2016; 1_B – sérum z 22. 1. 2016; 2 – sekundární protilátka)

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	beran A ($Ag_1 + 1_A + 2$)			beran B ($Ag_1 + 1_A + 2$)			beran C ($Ag_1 + 1_A + 2$)	
B	beran A ($Ag_1 + 1_B + 2$)			beran B ($Ag_1 + 1_B + 2$)			beran C ($Ag_1 + 1_B + 2$)	
C	pufr + 2							
D	pufr							
E	beran A ($Ag_2 + 1_A + 2$)			beran B ($Ag_2 + 1_A + 2$)			beran C ($Ag_2 + 1_A + 2$)	
F	beran A ($Ag_2 + 1_B + 2$)			beran B ($Ag_2 + 1_B + 2$)			beran C ($Ag_2 + 1_B + 2$)	
G	pufr + 2							
H	pufr							

Imunoblot

Nejprve byl připraven antigen (35 μ l ES1 produktů, $c = 0,7 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). Do zkumavky s antigenem bylo přidáno 15 μ l fosfátového pufru a 12 μ l vzorkového redukujícího pufru (s 50 mM DTT – dithiothreitol). Vzorek byl separován (elektroforéza) v 12% polyakrylamidovém gelu Mini Protean TGX Precast Gels (Bio-Rad) při 150 V za použití Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (Bio-Rad). Jako marker byl použit Precision Plus ProteinTM (Bio-Rad). Separované proteiny v gelu byly následně elektrotransferovány na PVDF membránu pomocí blotovacího zařízení Trans-Blot[®] TurboTM Transfer System (Bio-Rad). Membrána s proteiny byla blokována (5% odtučněné mléko, 2,5% BSA ve fosfátovém pufru s 0,05% Tween), aby nedošlo k tvorbě nespecifických vazeb. Z blokovévané membrány byly následně odříznuty standardy a zbytek obsahující antigen byl rozřezán na 12 částí. Tyto části byly přemístěny do vaničky dle tabulky 13. Do jednotlivých jamek byl přidán 1 ml séra izolovaného z experimentálně infikovaných beránků ředěného v poměru 1:100 PBS s 2,5% BSA (inkubace 1 hodinu a 30 minut). Po inkubaci byly membrány promyty PBS (3 x 5 min). Následně byla přidána sekundární protilátka (anti-sheep IgG) ředěná 1:1000 (inkubace 1 hodinu). Po inkubaci byly membrány promyty stejným způsobem jako

v předešlém kroku a poté byly membrány vyvinuty pomocí kitu Opti-4CN (Bio-Rad) až do vzniku černého zbarvení v místech reagujících proteinů, poté byla reakce zastavena přidáním destilované vody.

Tabulka 13 - Schéma imunoblotu (Ag_1 – antigen₁-ES1 produkt *F. hepatica*; 1_A – sérum z 11. 4. 2016; 1_B – sérum z 22. 1. 2016; 2 – sekundární protilátka)

1	beran A ($Ag_1 + 1_A + 2$)
2	beran A ($Ag_1 + 1_B + 2$)
3	pufr + 2
4	pufr
5	beran B ($Ag_1 + 1_A + 2$)
6	beran B ($Ag_1 + 1_B + 2$)
7	pufr + 2
8	pufr
9	beran C ($Ag_1 + 1_A + 2$)
10	beran C ($Ag_1 + 1_B + 2$)
11	pufr + 2
12	pufr

5 Výsledky

5.1 Koprologie

Mikroskopickým vyšetřením trusu byl z šesti vzorků potvrzen jeden pozitivní (vajíčko motolice v trusu zebra). Celková parazitémie byla nízká. Podařilo se zachytit pouze jedno vajíčko na 4 mikroskopických preparátech z daného vzorku (obrázek 8). Jelikož dle morfologie nelze s jistotou určit druh motolice, byla u tohoto vzorku provedena molekulární analýza.



Obrázek 8 - Vajíčko motolice z trusu zebra (dle morfologie se může jednat o *Fascioloides magna*, *Fasciola hepatica*, *Paramphistomum cervi*)

5.2 Molekulární analýza

5.2.2 Experiment 1: Molekulární diagnostika ptačích motolic způsobujících cercáriovou dermatitidu na koupalištích v ČR

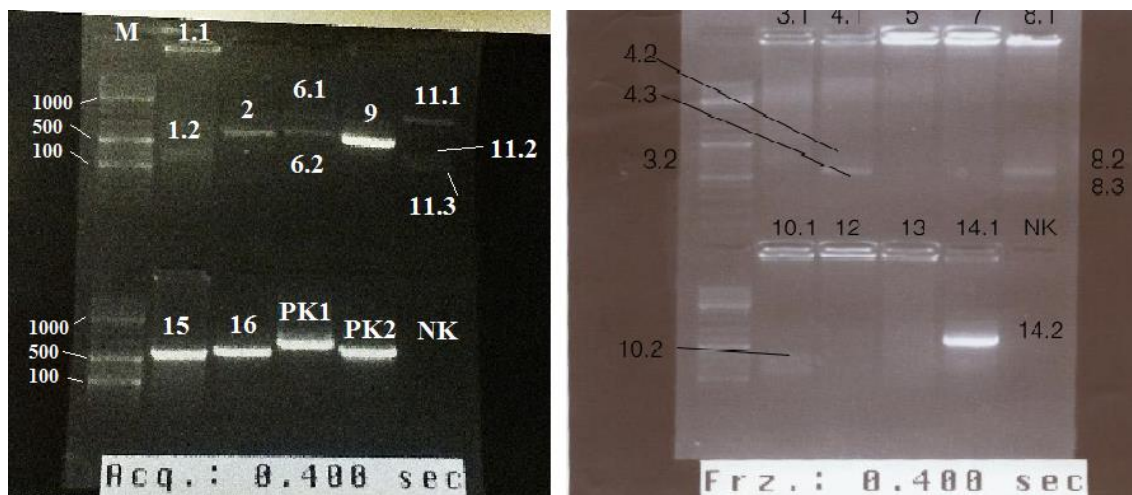
U jednotlivých vzorků byla měřena koncentrace a čistota izolované DNA. Výsledky tohoto měření shrnuje tabulka 14.

Tabulka 14- Koncentrace a čistota izolované DNA z labutích vzorků

Číslo vzorku	Koncentrace (ng/ul)	A (260/280 nm)	A (260/230 nm)
1	38,9	1,9	1,37
2	6,9	1,85	0,41
3	144,6	1,84	2,43
4	130,3	1,83	2,17
5	129,7	1,93	2,65
6	8	2,11	0,73
7	49,2	1,75	2,56
8	47,2	1,72	1,29
9	2,1	1,39	3,98
10	28,2	1,76	2,34
11	12,2	1,60	0,71
12	85,1	1,81	2,74
13	142,7	1,85	1,71
14	37,0	1,59	1,16
15	178,0	1,86	2,18
16	11,6	2,08	0,74

Gelová elektroforéza

Pomocí univerzálních primerů pro čeleď Schistosomatidae se podařilo amplifikovat požadovaný úsek DNA u některých vzorků. Dle velikosti fragmentu nelze jednoznačně určit, o jaký druh motolice se jedná. Na obrázku 9 jsou znázorněny fragmenty, které byly vyříznuty a odeslány k sekvenaci. Byly k ní odeslány i fragmenty nenacházející se ve specifické oblasti.



Obrázek 9 - Elektroforéza z izolované DNA ptačích motolic: M (marker), 1.1,1.2 (DNA – vejce seškrab ze střeva), 2 (DNA – červ ve sliznici), 3.1,3.2 (DNA – vejce seškrab ze střeva), 4.1, 4.2, 4.3 (DNA – červ ve sliznici), 5 (DNA – vejce seškrab ze střeva), 6.1, 6.2 (DNA – červ z cévy), 7 (DNA – vejce seškrab ze střeva), 8.1, 8.2, 8.3 (DNA – červ ve sliznici), 9 (DNA – miracidia v trusu), 10.1, 10.2 (DNA – vejce v nosní sliznici), 11.1, 11.2, 11.3 (DNA – červ v nosní sliznici), 12 (DNA – vejce seškrab ze střeva), 13 (DNA – vejce seškrab ze střeva), 14.1, 14.2 (DNA – červ ve střevní sliznici), 15 (DNA – vejce seškrab ze střeva), 16 (DNA – vejce seškrab ze střeva), PK1 (pozitivní kontrola *Trichobilharzia regenti*), PK2 (pozitivní kontrola *Trichobilharzia szidati*), NK (negativní kontrola)

Sekvenace

Sekvenací ampliconů o požadované velikosti byly získány DNA sekvence daného vzorku, které byly pomocí algoritmu Basic Local Alignment Search tool (BLAST) srovnány s databází NCBI. Na základě sekvence s nejvyšší podobností byl předběžně určen rod a druh motolice, tabulka 15. Pro přesné určení druhu motolic byla zapotřebí fylogenetická analýza, která přesahuje rámec této práce.

Tabulka 15 - Výsledky sekvenace DNA ptačích motolic (číslo vzorku, shoda s NCBI databází, identifikační číslo, sekvenční shoda a vstupní materiál)

Číslo vzorku	Shoda s NCBI databází	Identifikační číslo GenBank	Sekvenční shoda	Vstupní materiál
1	Ječmen (<i>Hordeum vulgare</i>)	KM217265.1	96%	vejce (seškrab ze střeva)
2	<i>Dendritobilharzia pulverulenta</i>	EF071988.1	94%	červ ve sliznici
3	<i>Dendritobilharzia pulverulenta</i>	KJ438954.1	95%	vejce (seškrab ze střeva)
	Avian schistosomatid sp. I4	JF734335.1	95%	
4	Brukev (<i>Brassica juncea</i>)	GQ202247.1	94%	červ ve sliznici
5	Neproběhla PCR			vejce (seškrab ze střeva)
6	<i>Allobilharzia visceralis</i>	EF071991.1	95%	červ z cévy
7	Neproběhla PCR			vejce (seškrab ze střeva)
8	<i>Actinomucor elegans</i>	AY492087.1	99%	červ ve sliznici
9	Avian schistosomatid sp. I4 isolate	JF734335.1	99%	miracidia v trusu
10	Uncultured fungus clone S44T_72	KU164607.1	99%	vejce (nosní sliznice)
11	<i>Trichobilharzia regenti</i>	KP271015.1	99 %	červ (nosní sliznice)
12	Neproběhla PCR			vejce (seškrab ze střeva)
13	Neproběhla PCR			vejce (seškrab ze střeva)
14	Avian schistosomatid sp. I4	JF734335.1	99%	červ (ve střevní sliznici)
	<i>Dendritobilharzia pulverulenta</i>	KJ438954.1	99%	
15	Avian schistosomatid sp. I4	JF734335.1	99%	vejce (seškrab ze střeva)
	<i>Dendritobilharzia pulverulenta</i>	KJ438954.1	99%	
16	<i>Dendritobilharzia pulverulenta</i>	EF071988.1	95%	vejce (seškrab ze střeva)

5.2.1 Experiment 2: Diagnostika fasciolidních motolic v koprologickém materiálu importovaných zubrů (VP Ralsko)

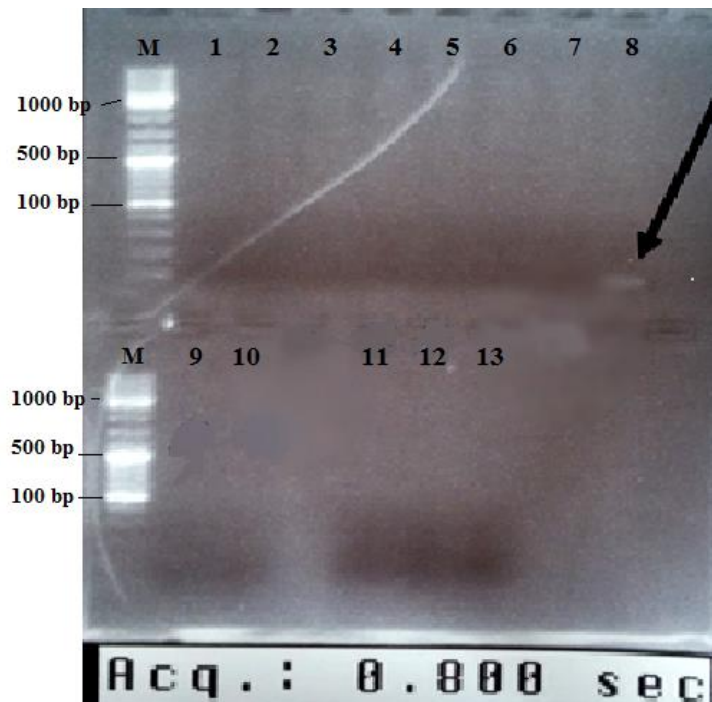
Z pozitivního vzorku trusu zubra se podařila izolovat DNA v dobré kvalitě a čistotě. Naměřenou koncentraci izolované DNA znázorňuje tabulka 16. Kromě zkoumaného vzorku byla měřena i koncentrace DNA z trusu, do kterého byla přidána vajíčka *F. magna* a *F. hepatica*. Tyto vzorky představují pozitivní kontrolu, která potvrzuje správnost izolace DNA.

Tabulka 16 - Koncentrace a čistota izolované DNA získané z koprologického materiálu

Vzorek	Koncentrace [ng/μl]	Absorbance (260/280 nm)	Absorbance (260/230 nm)
Izolovaná DNA z trusu zubra	16,70	1,45	0,67
Izolovaná DNA z trusu s <i>F. magna</i>	54,20	2,00	1,86
Izolovaná DNA z trusu s <i>F. hepatica</i>	53,20	1,99	1,90
Izolovaná DNA z trusu s <i>F. magna</i> + <i>F. hepatica</i>	49,30	1,99	1,72

Gelová elektroforéza

Pomocí PCR se nepodařilo amplifikovat sekvence DNA a to ani u pozitivních kontrol, které představovaly DNA izolovanou z dospělých motolic *F. magna*, *F. hepatica* a *P. cervi*. Na gelu byl slabě viditelný pozitivní fragment pouze u vzorku číslo 8 (tzn. pozitivní kontrola *F. magna*), ostatní fragmenty vyšly negativní. Elektroforetický gel znázorňuje obrázek 10.

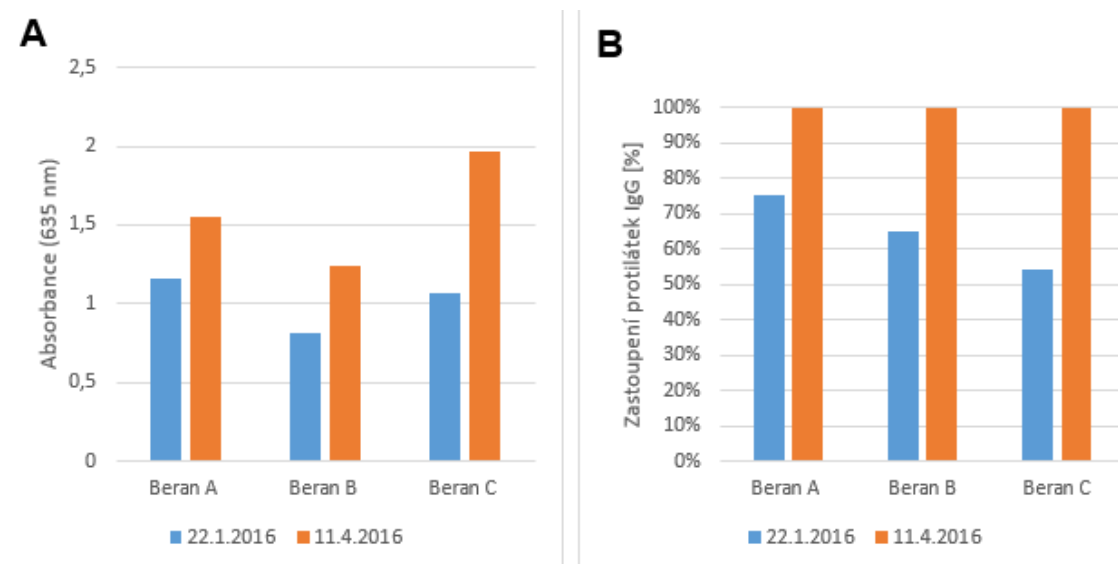


Obrázek 10 - Elektroforéza koprologických vzorků (šipkou je označen pozitivní fragment): M (marker), 1 - DNA z trusu zubra se specifickými primery pro *F. magna*, 2 - DNA z trusu zubra se specifickými primery pro *F. hepatica*, 3 - DNA z trusu zubra se specifickými primery pro *P. cervi*, 4 - pozitivní kontrola izolace DNA – DNA z trusu s přidanými vajíčky *F. magna*, 5 - pozitivní kontrola izolace DNA – DNA z trusu s přidanými vajíčky *F. hepatica*, 6 - pozitivní kontrola izolace DNA – DNA z trusu s přidanými vajíčky *F. magna* a *F. hepatica* s primery pro *F. magna*, 7 - pozitivní kontrola izolace DNA – DNA z trusu s přidanými vajíčky *F. magna* a *F. hepatica* s primery pro *F. hepatica*, 8 - pozitivní kontrola průběhu PCR – DNA z dospělého *F. magna*, 9 - pozitivní kontrola průběhu PCR – DNA z dospělého *F. hepatica*, 10 - pozitivní kontrola průběhu PCR – DNA z dospělého *P. cervi*, 11, 12, 13 (negativní kontroly)

5.3 Imunologie

ELISA

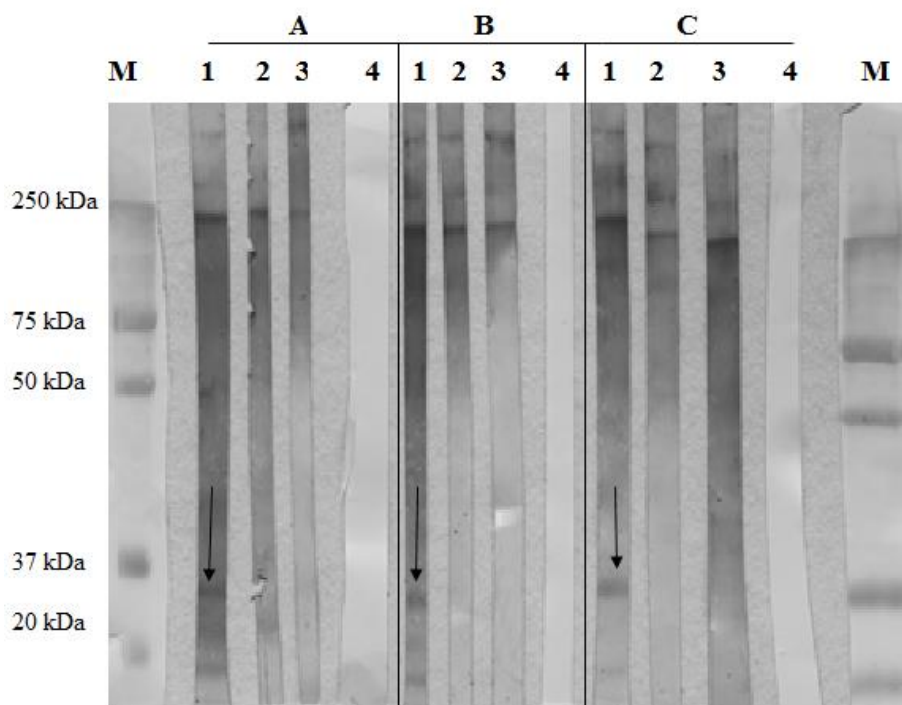
Pomocí ELISA testu byla sledována hladina protilátek IgG. Prostřednictvím spektrofotometrického měření intenzity zbarvení jednotlivých vzorků bylo prokázáno, že od 1. do 12. týdne po infekci beranů došlo k nárůstu protilátek IgG. U berana A se protilátky IgG zvýšily o 25 %, u berana B o 35 % a u berana C o 46 %. Zvýšení protilátek znázorňuje graf 1 (část A a B).



Graf 1 - Dynamika hladiny IgG v průběhu experimentální infekce *Fasciola hepatica*. A – srovnání absolutních hodnot protilátkových odpovědí ve vzorcích sér jednotlivých beranů zaznamenaných před nákazou a po nákaze; B – procentuální rozdíly mezi protilátkovými odpověďmi zaznamenanými ve vzorcích sér jednotlivých beranů před nákazou a po nákaze

Imunoblot

Pozitivní výsledek se séry experimentálně infikovaných beranů *F. hepatica* byl zaznamenán také prostřednictvím imunoblotu (obrázek 10). V případě sér beranů 12 týdnů po infekci byly dobře viditelné specifické reakce v oblastech 30 kDa (označené šipkou). Se séry beranů odebranými před infekcí, byly zaznamenány pouze nespecifické reakce např. v oblastech 250 kDa.



Obrázek 5. Imunoblot s ES antigenem *Fasciola hepatica* a séry experimentálně infikovaných beranů: M (marker), A, B, C (jednotlivý beraní), 1 (protilátky z 11. 4. 16), 2 (protilátky z 22. 1. 16), 3 (kontrola - pouze sekundární protilátka), 4 (kontrola - pufr), šipkou jsou vyznačeny specifické reakce

6 Diskuze

Hlavním cílem práce bylo shrnout poznatky o diagnostice jaterních motolic a predikci jejich výskytu, přičemž některé z těchto metod byly uplatněny v praktické části práce za účelem osvojení si vybraných základních diagnostických postupů využívaných v parazitologii, helmintologii.

V rámci osvojení si vybavení laboratoře byl nejprve proveden experiment č. 1, který se týkal diagnostiky ptačích motolic z čeledi Schistosomatidae. Tyto motolice způsobující u člověka cercáriovou dermatitidu jsou na PŘF UK předmětem dlouholetého výzkumu. Při opakované nákaze u člověka dochází k průniku cercárií do kůže, kde hynou a způsobují alergické reakce (exantém) (Jíra, 1998). Mezihostitelem těchto motolic v ČR jsou nejčastěji plži z čeledi Lymnaeidae. Definitivním hostitelem jsou vodní ptáci. Ačkoliv je známo více než 100 druhů schistosomních motolic, stále jsou hlášeny nové druhy. Dosud také není zcela známé plné spektrum mezihostitelů a definitivních hostitelů (Brant, 2013). Tento experiment byl věnován méně častým motolicím pocházejících z plžů z čeledi Planorbidae, z lokalit odkud byla hlášena cercáriová dermatitida.

Pro experiment byly použity vzorky z uhynulých labutí - seškrab ze střeva (vajíčka dospělci), nosní sliznice (vajíčka, dospělci), trus (miracidia), céva okolo tenkého střeva (dospělci). Vzorky byly nejdříve prohlíženy pod mikroskopem nebo lupou a následně molekulárně analyzovány pro určení konkrétního druhu motolice. DNA byla izolována z 16 vzorků a její koncentrace se značně lišila. Při amplifikaci DNA byly použity speciálně navržené univerzální primery, pomocí nichž je možné amplifikovat úseky ITS-1, 5.8 S a ITS-2 rDNA specifické pro čeleď Schistosomatidae. Z fotodokumentace výsledného elektroforetickém gelu bylo zřejmé, že se úsek DNA některých vzorků podařil amplifikovat. Dle velikosti fragmentů nebylo možné určit, o jaký druh motolice se jedná, a proto byly vzorky vyříznuty z gelu a odeslány do sekvenační laboratoře. Na základě podobnosti nukleotidové sekvence byl předběžně určen rod a druh motolice. U vzorku č. 3 (vejce – seškrab ze střeva) byla na základě sekvenace určena motolice *Dendritobilharzia pulverulenta*. Po elektroforéze nebyly jednotlivé amplikony odpovídající tomuto vzorku příliš viditelné. Naopak koncentrace izolované DNA byla oproti ostatním vzorkům vysoká 144,6 ng/ul. Tento fakt naznačuje, že příčinou vyšší koncentrace izolované DNA bude nejspíše kontaminace

množstvím hostitelské DNA. U vzorku č. 13 (vejce – seškrab ze střeva) byla koncentrace izolované DNA 142,7 ng/ul a PCR reakce vůbec neproběhla. *Dendritobilharzia pulverulenta* byla určena také ve vzorku č. 16 (vejce – seškrab ze střeva). Koncentrace izolované DNA sice byla jen 11,6 ng/ul, ale na elektroforetickém gelu bylo zřetelně vidět, že se DNA podařila amplifikovat. Tímto bylo potvrzeno, že měření koncentrace izolované DNA je pouze orientační a je třeba brát v potaz povahu vstupního materiálu. Sekvenační analýza odhalila i jiné druhy jako např. *Trichobilharzia regenti* (vzorek č. 11 – červ v nosní sliznici), která v labuti v ČR doposud nalezena nebyla. Jde tedy o unikátní nález. Ve vzorcích došlo také k nespecifické amplifikaci DNA, např. u ječmene (*Hordeum vulgare*), vzorku č. 1. Ječmen byl zřejmě součástí potravy labutě, a protože byl materiálem tohoto vzorku seškrab ze střeva, mohl zde být přítomen. U některých vzorků amplifikace DNA neproběhla. Nemusely obsahovat DNA zkoumaného parazita nebo byla parazitární DNA v tak malé koncentraci, že se jí nepodařilo zachytit. Důvodem mohlo být také to, že DNA byla degradovaná (ptáci byli uhynulí několik dní). Pro přesné určení druhu motolice by byla zapotřebí fylogenetická analýza, která přesahuje rámec této práce. Tento experiment souvisí s výzkumem, ve kterém byly zkoumány motolice způsobující cercáriovou dermatitidu získané z plžů z čeledi Planorbidae. Získané cercárie byly osekvenovány a dále byla provedena fylogenetická analýza (Aldhoum, 2012). K cercáriím z této studie byla v tomto experimentu pravděpodobně osekvenována další vývojová stadia.

V souvislosti s jaterními motolicemi představuje koprologické vyšetření základní neinvazivní metodu, kterou lze diagnostikovat vajíčka motolic v trusu. Nevýhoda této metody spočívá v tom, že není možné diagnostikovat nákazu v prepatentní periodě, a že jednotlivá vajíčka některých druhů motolic, běžně se vyskytujících také v České republice (*F. magna*, *F. hepatica*, *P. cervi*), nelze spolehlivě rozlišit na základě morfologie (Pybus, 2001). Rozlišení dle morfologie bylo ověřováno v experimentu č. 2: Diagnostika motolic čeledí Fasciolidae a Paramphistomidae v koprologickém materiálu importovaných zubrů (VP Ralsko).

Vzorky trusu ze zubrů (VP Ralsko) a jelenů (obora Točná v Brdech), poskytnuté helmintologickou laboratoří PřF UK, byly zkoumány na přítomnost vajíček fasciolidních motolic *F. magna*, *F. hepatica* a motolice *P. cervi*. Tyto vzorky byly zpracovány sedimentační metodou. Ze sedimentu šesti vzorků byly zhotoveny nativní

preparáty (z každého vzorku celkem čtyři). Vajíčko motolice bylo nalezeno pouze v jednom vzorku (trus zubra). Je pravděpodobné, že s větším množstvím zkoumaných preparátů by pravděpodobně vzrostl i počet nalezených vajíček. Nelze vyloučit, že v preparátech byla některá vajíčka přehlédnuta. Vajíčko z pozitivního vzorku bylo vyfoceno a změřeno, ale ani tak nebylo možné s jistotou určit, o jaký druh motolice se jedná. Z tohoto důvodu byla u vzorku provedena molekulární analýza, specifická PCR amplifikace, umožňující spolehlivou druhovou determinaci, tzn. zda byl zubr infikován motolicí *F. magna*, *F. hepatica* nebo *P. Cervi*, nebo se jednalo o smíšenou nákazu (Tavares, 2011).

Prvním krokem při molekulární analýze je izolace DNA. DNA z pozitivního vzorku byla získána pomocí izolačního kitu QIAamp® DNA Stool mini kit (QIAGEN). Na rozdíl od izolace DNA z dospělého jedince bylo u koprologického materiálu nutné nejdříve rozrušit odolnou vaječnou stěnu (Oberhauserová, 2010). DNA se podařilo izolovat v dostatečném množství a čistotě, avšak kromě DNA z vajíček motolic (minimální množství) může výsledný izolát zahrnovat i bakteriální, či rostlinnou DNA z materiálu přítomného ve vzorku (ve vzorcích byly např. sledovány živé larvy hlístic). Z důvodu prověření správného postupu byla DNA izolována také z negativních vzorků trusu, ke kterým byla uměle přidána vajíčka *F. magna*, *F. hepatica* a směsný vzorek *F. magna*, *F. hepatica* - pozitivní kontrola izolace DNA. U těchto vzorků byla naměřena výrazně vyšší koncentrace DNA. V trusu s *F. magna* 54,2 ng/ul a v trusu s *F. hepatica* 53,2 ng/ul. Koncentrace izolované DNA z trusu zubra s nalezeným vajíčkem motolice byla 16,7 ng/ul. Dalším krokem byla PCR, při které dochází k amplifikaci vybraného úseku DNA s využitím specifických primerů. Aby byl potvrzen správný průběh této reakce, byly provedeny ještě další tři kontroly – DNA izolovaná z dospělých motolic *F. magna*, *F. hepatica* a *P. Cervii* uchovaných v molekulárním etanolu (96%, 4°C). Po amplifikaci následovala gelová elektroforéza, při níž dochází k separaci DNA podle velikosti a náboje na základě pohyblivosti molekul v elektrickém poli. Z gelu bylo zřejmé, že se amplifikace nepodařila. Nebyly zaznamenány žádné amplikony predefinované velikosti. Jediný amplikon byl získán v případě pozitivní kontroly - *F. magna* DNA z dospělého, amplikon byl však pravděpodobně syntetizován ve velmi malé koncentraci, a tak nebyl dobře rozeznatelný na gelu. Příčinou mohla být např. degradace DNA ve vzorcích trusu způsobená stářím vzorku (rok 2013, 2015). Používaný materiál byl uskladněn v lednici. Pokud měla vajíčka v trusu poškozenou vaječnou stěnu, nebyla

DNA nijak chráněna a mohlo dojít k jejímu poškození. U vzorků trusu pozitivních kontrol, do nichž byla přidána čerstvá vajíčka, nelze s jistotou stanovit, zda ve všech případech byl uvnitř životaschopný zárodek, z něhož lze DNA izolovat. Životaschopnost embrya by bylo možné ověřit, např. líhnutím vajíček, což je značně zdoluhavý proces a v tomto případě nebyl realizován. Miracidium *F. magna* se z vajíčka do vnějšího prostředí dostává až okolo 28. – 31. dne. V laboratorních podmínkách lze vývoj urychlit změnou teploty, vlhkosti a světla (Erhardová-Kotrlá, 1971). Další příčinou mohlo být použití starých primerů, které pocházely už z roku 2012. Tato chyba byla však vyloučena, jelikož test byl poté proveden s novými primery a výsledek byl opět negativní se slabě viditelným fragmentem pozitivní kontroly *F. magna* (DNA z dospělé). Hlavní příčina neúspěšné amplifikace DNA z vajíček ve vzorcích trusu by mohla být v použitých chemikáliích. Základní složkou REDTaq[®] ReadyMix (Sigma-Aldrich), užívaného pro PCR reakci, je Taq polymeráza (enzym umožňující syntézu DNA). Master mix dále obsahuje např. Mg²⁺ ionty nebo dNTP (deoxi-nukleosid-trifosfáty). Neodbornou manipulací s těmito chemikáliemi mohlo v minulosti dojít k degradaci jedné či více složek reakční směsi.

Kromě molekulární diagnostiky byly provedeny také imunologické metody (ELISA, imunoblot). Materiálem pro tyto analýzy byla séra z beranů experimentálně nakažených motolicí *F. hepatica* v rámci projektu Farmaceutické univerzity UK v Hradci Králové.

K vyšetření byly použity vzorky sér tří beranů z 22. 1. 2016 (negativní) a pozitivní vzorky z 11. 4. 2016.

Metoda ELISA je založena na reakci antigenu s protilátkou, přičemž na jedno z nich je kovalentně vázán enzym. Po přidání substrátu enzym zprostředkuje jeho přeměnu na barevný produkt (Bartůňková, 2005). V tomto experimentu byly jako antigeny využity koncentrované exkrecečně-sekreční produkty motolice *F. hepatica* (ES1) o známé koncentraci a nekoncentrované, nepřečištěné kultivační médium odebrané po šestihodinové inkubaci dospělců *F. hepatica* (ES2) s neznámou koncentrací. V jamkách s navázaným antigenem ES1 nebyly zaznamenány mezi negativními a pozitivními vzorky velké rozdíly. Proteinový vzorek mohl být částečně degradován častou manipulací – rozmrazování/zmrazování. Z tohoto důvodu byl použit také vzorek ES2, u kterého sice nebyla doměřena koncentrace, ale zato by neměl být degradován. Rovněž byly zahrnuty i kontroly tzn. pufr se sekundární protilátkou představující slepý vzorek

a samotný pufr. Intenzita zbarvení byla měřena pomocí spektrofotometru při 635 nm. Metodou ELISA byla potvrzena zvyšující se hladina protilátek IgG u všech beranů, přičemž průměrné zvýšení protilátek ve 12. týdnu po infekci bylo 35 %. V dalších týdnech infekce by pravděpodobně dále docházelo ke zvýšení hladiny IgG protilátek. To je potvrzeno např. ve studii humorální imunitní odpovědi experimentálně infikovaných koz *F. magna* a *F. hepatica*. Hladina protilátek proti *F. hepatica* začala stoupat od 2. týdne po infekci a vrcholu nedosáhla ani v 17. týdnu. Tato studie také potvrdila, že ELISA je vysoce senzitivní metoda, avšak nemusí být specifická, jelikož může docházet ke zkřížené reakci mezi antigeny příbuzných druhů a séry jejich hostitelů (Novobilský, 2007a). U koz experimentálně infikovaných *F. hepatica* došlo k významnému nárůstu protilátek IgG ve 3. týdnu infekce. Nejvyšší hodnoty pak byly zaznamenány mezi 9. a 11. týdnem (Martínez-Moreno, 1999). Zvýšená hladina protilátek v 2. týdnu po infekci byla zaznamenána i v dřívější studii (Ferre, 1997). U experimentálně infikovaného skotu došlo ke zvýšení hladiny protilátek mezi 2–4 týdnem po infekci (Salimi-Bejestani, 2005b). V některých studiích provedených s fasciolidními motolicemi je u ELISA metody udávána téměř 100% specifita a senzitivita, např. při diagnostice protilátek proti *F. gigantica* (El Ridi, 2007). V jamkách, do nichž byl přidán pouze pufr, reakce neproběhla a byla zde naměřena minimální absorbance, čímž by měla být potvrzena správnost této analýzy.

Stejně vzorky séra byly testovány metodou imunoblot. Jako antigen byly využity pouze koncentrované ES1 produkty. V případě negativních sér z 22. 1. 2016 byly na membránách zřetelné reakce v oblasti 250 kDa. Jelikož v této oblasti došlo k reakci i u pozitivních vzorků a u kontrolního vzorku (pufr a sekundární protilátka), jednalo se zřejmě o nespecifické reakce sekundární protilátky s některými složkami ES1 vzorku. Specifické reakce byly zaznamenány u pozitivních vzorků v oblasti cca 30 kDa, která by mohla být specifická pro katepsin L, dříve definovaný jako jeden z dominantních exkrečně-sekrečních antigenů (Dowd, 1994). Reakce v této oblasti potvrzují i některé další studie, např. ES *F. hepatica* testované se séry přirozeně infikovaného skotu (Meshgi, 2008) nebo ES *F. hepatica* testované se séry přirozeně infikovaných ovcí (Acici, 2015), kdy byly odhaleny specifické reakce v oblastech 14, 20, 24, 27, 33, 45 a 66 kDa.

V této práci byly vyzkoušeny vybrané základní metody využívané v parazitologii, helmintologii. Některé z nich jsou v určitých případech pro diagnostiku

nedostačující např. mikroskopické vyšetření trusu za účelem druhové determinace fasciolidních motolic. Tyto komplikace však mohou napomoci řešit dobře optimalizované molekulární a imunologické metody, kterými lze potvrdit, nebo vyloučit, přítomnost DNA daného parazita ve vzorku, popř. určit přítomnost antigenu a protilátky proti určitému konkrétnímu druhu parazita. Je pravděpodobné, že tyto metody se budou v budoucnu rozvíjet a umožní vysokou míru standardizace s minimálním nárokem na zkušenosti vyšetřovatele.

7 Závěr

Prvním cílem této práce bylo shrnutí základních informací o jaterních motolicích se zaměřením na fasciolidní druhy *F. magna* a *F. hepatica*. Na základě jednotlivých studií bylo zjištěno, že motolice mohou způsobovat značné ekonomické ztráty a významně poškozovat zdraví. Shrnuté poznatky také poukazují na významnost predikčních metod, zejména na využití geografického informačního systému.

Druhým cílem bylo shrnout základní poznatky v oblasti diagnostiky a léčby. Ačkoliv existuje mnoho diagnostických metod i možností následné léčby, díky nízkému povědomí o nákaze a komplikovaným životním cyklům zůstávají jaterní motolice v mnoha zemích závažným problémem.

Třetím cílem byla aplikace diagnostických metod v rámci projektů Helminnologické laboratoře Přírodovědecké fakulty UK v Praze. V několika experimentech bylo možné vyzkoušet různé parazitologické techniky běžně užívané pro diagnostiku motolic. Výsledky experimentů jsou následující:

1. Koprologická diagnostika zubrů: Po koprologickém vyšetření bylo ve vzorku trusu zubra nalezeno a vyfoceno vajíčko motolice. U tohoto vajíčka dle morfologie nebylo možné určit druh motolice (*F. magna*, *F. hepatica*, *P. cervi*), proto bylo přistoupeno k molekulární analýze. Během molekulární analýzy však došlo k problémům s reagensy a motolice z čeledi Fasciolidae a Paramphistomidae se nepodařilo determinovat.
2. S využitím molekulárních metod bylo determinováno několik méně známých druhů ptačích motolic z čeledi Schistosomatidae, které jsou schopné infikovat ptačí a savčí hostitele i v našich podmínkách. Z výsledků sekvenční analýzy byl potvrzen unikátní nález motolice *T. regenti* u labutě v ČR. Životní cykly motolic *Dendritobilharzia pulverulenta* a *Trichobilharzia filiformis* (Avian schistosomatid sp. I4 isolate) byly doplněny o unikátní sekvenční data vajíček a miracidíí.
3. Imunologickými metodami ELISA a imunoblot byla sledována protilátková odpověď a potvrzena úspěšná experimentální infekce beránek motolicí *F. hepatica* v rámci pokusu Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

Seznam použité literatury

- ABDEL-RAHMAN, S.M., K.L. O'REILLY, J.B. MALONE. Evaluation of a diagnostic monoclonal antibody-based capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of a 26- to 28-kd *Fasciola hepatica* coproantigen in cattle. *American journal of veterinary research*. 1998, 59(5), 533-7. ISSN 0002-9645. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9582951>.
- ACICI, M. et al. Serologic detection of antibodies against *Fasciola hepatica* in sheep in the middle Black Sea region of Turkey. *Journal of microbiology, immunology, and infection*. 2015, 1684-1182(15). ISSN 1684-1182. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26303043>.
- AI, L. et al. Rapid identification and differentiation of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Veterinary parasitology*. 2010, 174(3-4), 228-33. ISSN 0304-4017. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20933335>.
- ALBOGAMI, B.M., A.H.M. KELANY, O.A. ABU-ZINADAH. Prevalence of *Dicrocoelium dendriticum* infection in sheep at Taif province, west Saudi Arabia. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 2015, 45(2), 435-42. ISSN 1110-0583. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26485864>.
- ALDHOUN, J.A. et al. Bird schistosomes in planorbid snails in the Czech Republic. *Parasitology International*. 2012, 61(2), 250-259. ISSN 1383-5769. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22079682>.
- ALMEIDA, M.S. et al. Vaccination against *Fasciola hepatica* infection using a *Schistosoma mansoni* defined recombinant antigen, Sm14. *Parasite Immunology*. 2003, 25(3), 135-137. ISSN 0141-9838. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-3024.2003.00619.x>.
- ANDERSON, N. et al. The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. *Veterinary parasitology*. 1999, 83(1), 15-24. ISSN 0304-4017. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10392764>.

- ARUNDEL, J.H., A.N. Hamir. Fascioloides magna in cattle. *Australian veterinary journal*. 1982, 58(1), 35-6. ISSN 0005-0423. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7082230>.
- ASRAT, M. et al. Evaluation of the spatial distribution of Fasciola hepatica and Fasciola gigantica using geographical information system (GIS) in the Nile River Basin, Ethiopia. *Ethiopian Veterinary Journal*. 2007, 11(2), 41-57. ISSN 1683-6324. Dostupné také z: <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/2204>.
- BARTUŇKOVÁ, J., PAULÍK, M. a kol. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Praha: Grada. 176 s. 2005. ISBN 80-247-0691-1.
- BASSI, R. Sulla cachessia ittero-verminosa, o marciaia, causata dal Distomum magnum. *Medico Vet. Torino*. 1875, 4, (4), 497–515.
- BECK, M., C.P. GOATER, D.D. COLWELL. Comparative recruitment, morphology and reproduction of a generalist trematode, Dicrocoelium dendriticum, in three species of host. *Parasitology*. 2015, 142(10), 1297-1305. ISSN 0031-1820. Dostupné také z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182015000621.
- BENNEMA, S. et al. The use of bulk-tank milk ELISAs to assess the spatial distribution of Fasciola hepatica, Ostertagia ostertagi and Dictyocaulus viviparus in dairy cattle in Flanders (Belgium). *Veterinary parasitology*. 2009 165(1-2), 51-7. ISSN 1873-2550. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19656630>.
- BLOEMHOFF, Y. et al. Determining the Prevalence and Seasonality of Fasciola hepatica in Pasture-based Dairy herds in Ireland using a Bulk Tank Milk ELISA. *Irish veterinary journal* [online]. 2015, 68(1), 16 [cit. 2016-04-04]. ISSN 2046-0481. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4495626&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- BOOMKER, J., J.C. DALE-KUYS. First report of Fascioloides magna (Bassi, 1875) in South Africa. *The Onderstepoort journal of veterinary research* [online]. 1977, 44(1), 49-52 [cit. 2016-03-02]. ISSN 2219-0635. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/614520>.

- BOUVARD, V. et al. A review of human carcinogens-Part B: biological agents. *The Lancet Oncology*. 2009, 10(4), 321-2. ISSN 1470-2045. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19350698>.
- BRANT, S. V., E.S. LOKER. Discovery-based studies of schistosome diversity stimulate new hypotheses about parasite biology. *Trends in parasitology*. 2013, 29(9), 449-59. ISSN 1471-4922. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23849836>.
- CAPUANO, F. et al. A comparison of five methods for DNA isolation from liver and rumen flukes to perform ITS-2+ amplification. *Parassitologia*. 2007, 49(1-2), 27-31. ISSN 0048-2951. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18412040>.
- Centers for Disease Control and Prevention [online]. Atlanta, 2013. Poslední změna 10. 1. 2013 [cit. 2016-02-11]. Dostupné z: <http://www.cdc.gov/parasites/fasciola/biology.html>.
- COLWELL, D.D., C.P. GOATER. *Dicrocoelium dendriticum* in cattle from Cypress Hills, Canada: Humoral response and preliminary evaluation of an ELISA. *Veterinary Parasitology*. 2010, 174(1-2), 162-165. ISSN 0304-4017. Dostupné také z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.004>.
- CROSSLAND, N.O. The effect of the molluscicide N-tritylmorpholine on transmission of *Fasciola hepatica*. *Veterinary Record* [online]. 1976, 98(3), 45-48 [cit. 2016-04-25]. ISSN 2042-7670. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/943883>.
- DANG, T.C.T. et al. Prevalence, intensity and risk factors for clonorchiasis and possible use of questionnaires to detect individuals at risk in northern Vietnam. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2008, 102(12), 1263-8. ISSN 0035-9203. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18632126>.
- DORCHIES, P. Comparison of Methods for the Veterinary Diagnosis of Liver Flukes (*Fasciola Hepatica*) in Cattle. *Veterinary Medicine*. 2007, 64(1-2), 14-19. ISSN 1843-5270. Dostupné také z: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20083151979.html>.

- DOUBEK, J. *Veterinární hematologie*. Brno: Noviko, 2003. 464 s. ISBN 80-86542-02-5.
- DOWD, A.J. et al., 1994. Purification and characterisation of a second cathepsin L proteinase secreted by the parasitic trematode *Fasciola hepatica*. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1994, 223(1), 91-8. ISSN 0014-2956. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8033913>.
- DUSCHER, R. et al. *Fasciola hepatica* - monitoring the milky way? The use of tank milk for liver fluke monitoring in dairy herds as base for treatment strategies. *Veterinary parasitology*. 2011, 178(3-4), 273-8. ISSN 0304-4017. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21334811>.
- DVOŘÁK, J. et al. Comparison of european *Trichobilharzia* species based on ITS1 and ITS2 sequences. *Parasitology* [online]. 2002, 124(3), 307-313 [cit. 2016-04-12]. ISSN 1469-8169. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11922432>.
- EL RIDI, R. et al. *Fasciola gigantica* excretory-secretory products for immunodiagnosis and prevention of sheep fasciolosis. *Veterinary parasitology*. 2007, 149(3-4), 219-28. ISSN 0304-4017. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17897786>.
- ERHARDOVÁ - KOTRLÁ, B. *The occurrence of Fascioloides magna (Bassi, 1875) in Czechoslovakia*, Praha: Academia, 1971. 155 s.
- ESCALANTE, H. et al. Estandarización de la técnica de Western blot para el diagnóstico de la fasciolosis humana utilizando antígenos de excreción-secreción de *Fasciola hepatica*. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*. 2011, 28(3), 454-461. ISSN 1726-4634. Dostupné také z: http://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342011000300008&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
- FAIRWEATHER, I., J.C. BORAY. Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *Veterinary journal*. 1999, 158(2), 81-112. ISSN 1090-0233. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10489266>.

- FANG, W. et al. Comparison between albendazole and triclabendazole against *Fasciola gigantica* in human. *Chinese journal of schistosomiasis control*. 2014, 26(1), 106-8. ISSN 1005-6661. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24800585>.
- FERRE, I., L.M. ORTEGA-MORA, F.A. ROJO-VÁSQUEZ. Serum and bile antibody responses (IgG and IgA) during subclinical *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Veterinary parasitology*. 1997, 68(3), 261-7. ISSN 0304-4017. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9066071>
- FOREYT, W.J., A.C. TODD. Development of the large American liver fluke, *Fascioloides magna*, in white-tailed deer, cattle, and sheep. *The Journal of parasitology*. 1976, 62(1), 26-32. ISSN 0022-3395. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1255380>.
- FOX, N.J. et al. Livestock Helminths in a Changing Climate: Approaches and Restrictions to Meaningful Predictions. *Animals: an open access journal from MDPI*. 2012, 2(1), 93-107. ISSN 2076-2615. Dostupné také z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4494270&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- FREITAS, D.F. et al. Bioclimatic distribution and prevalence maps for *Fasciola hepatica* in Espírito Santo State, Brazil. *The journal of venomous animals and toxins including tropical diseases* [online]. 2014, 20(1), 32 [cit. 2016-03-21]. ISSN 1678-9199. Dostupné z: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84916925476&partnerID=tZOtx3y1>.
- FUENTES, M. V., J.B. MALONE, S. MAS-COMA. Validation of a mapping and prediction model for human fasciolosis transmission in Andean very high altitude endemic areas using remote sensing data. *Acta Tropica*. 2001, 79(1), 87-95. ISSN 0001-706X. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11378145>.
- GABRIELLI, S. et al. Parasitological and molecular observations on a little family outbreak of human fasciolosis diagnosed in Italy. *The Scientific World Journal* [online]. 2014, 6, 1-5 [cit. 2016-11-04]. ISSN 1537-744X. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/417159>.

- GOATER, C.P., D.D. COLWELL. Epidemiological characteristics of an invading parasite: *Dicrocoelium dendriticum* in sympatric wapiti and beef cattle in southern Alberta, Canada. *The Journal of parasitology*. 2007, 93(3), 491-4. ISSN 0022-3395. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17626339>.
- GOLDEN, O. et al. Protection of cattle against a natural infection of *Fasciola hepatica* by vaccination with recombinant cathepsin L1 (rFhCL1). *Vaccine*. 2010, 28(34), 5551-7. ISSN 0264-410X. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20600503>.
- GRABNER, D.S. et al. Invasion biology meets parasitology: A case study of parasite spill-back with egyptian *Fasciola gigantica* in the invasive snail *Pseudosuccinea columella*. *PLoS ONE* [online]. 2014, 9(2), 1-7 [cit. 2016-03-15]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24523913>.
- GUNDRY, C.N. et al. Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. *Clinical chemistry*. 2003, 49(3), 396-406. ISSN 0009-9147. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600951>.
- HAMMAMI, H. et al. Molluscicidal activity of various solvent extracts from *Solanum nigrum* var. *villosum* L. aerial parts against *Galba truncatula*. *Parasite* [online]. 2011, 18(1), 63-70 [cit. 2016-04-25]. ISSN 1776-1042. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21395207>.
- HARMON, A.F., D.S. ZARLENGA, M.B. HILDRETH. Improved methods for isolating DNA from *Ostertagia ostertagi* eggs in cattle feces. *Veterinary parasitology*. 2006, 135(3-4), 297-302. ISSN 0304-4017. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16303253>.
- HODŽIĆ, A. et al. Influence of *Fasciola hepatica* on Serum Biochemical Parameters and Vascular and Biliary System of Sheep Liver. *Iranian journal of parasitology* [online]. 2013, 8(1), 92-8 [cit. 2016-04-26]. ISSN 1735-7020. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3655246&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- HONG, S.T., Y. FANG. Clonorchis sinensis and clonorchiasis, an update. *Parasitology International*. 2012, 61(1), 17-24. ISSN 1383-5769. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21741496>.
- HOWELL, A. et al. Epidemiology and impact of Fasciola hepatica exposure in high-yielding dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*. 2015, 121(1-2), 41-48. ISSN 0167-5877. Dostupné také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587715002123>.
- CHAI, J.-Y. Praziquantel treatment in trematode and cestode infections: an update. *Infection & chemotherapy* [online]. 2013, 45(1), 32-43 [cit. 2016-04-10]. ISSN 2093-2340. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3780935/?tool=pmcentrez>.
- CHARLIER, J. et al. Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of Fasciola hepatica in cattle. *Parasitology* [online]. 2014, 141(3), 326-35 [cit. 2016-01-03]. ISSN 1469-8161. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24229764>.
- CHARLIER, J. et al. Towards assessing fine-scale indicators for the spatial transmission risk of Fasciola hepatica in cattle. *Geospatial Health*. 2011, 5(2), 239-245. ISSN 1827-1987. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21590674>.
- CHROUST, K. Parazitózy u masných plemen skotu v marginálních oblastech a jejich tlumení. *Veterinářství*. 2006, 56(7), 430–437. ISSN 0506-8231.
- CROUSTOVÁ, E., CHROUST, K. Motolice obrovská (Fascioloides magna) u spárkaté zvěře v jihočeských lokalitách. *Veterinářství* [online]. 2004, 54(5), 296,298,300-304 [cit. 2016-02-20]. ISSN 0506-8231. Dostupné také z: <http://vetweb.cz/motolice-obrovska-fascioloides-magna-u-sparkate-zvere-v-jihoceskych-lokalitach/>.
- JÍRA, J. *Lékařská helmintologie: Helminthoparazitární nemoci*. Praha: Galén, 1998, 495 s. ISBN 80-85824-82-5.

- KAMEL, H.H., G.A. SAAD, R.M. Sarhan. Dot-blot immunoassay of *Fasciola gigantica* infection using 27 kDa and adult worm regurge antigens in Egyptian patients. *The Korean journal of parasitology* [online]. 2013, 51(2), 177-82 [cit. 2016-03-23]. ISSN 1738-0006. Dostupné z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3662060&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- KAŠNÝ, M. et al. Geographical distribution of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*) in the Czech Republic and potential risk of its further spread. *Veterinarní Medicína* [online]. 2012, 57(2), 101-109 [cit. 2016-03-15]. ISSN 0375-8427. Dostupné z: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CZ2012000407>.
- KAUFMANN, J., 1996. *Parasitic Infections of Domestic Animals: A Diagnostic Manual*. Basel: Birkhäuser, 1996. ISBN 3-7643-5115-2.
- KING, S., T. SCHOLZ. Trematodes of the family Opisthorchiidae: a minireview. *The Korean journal of parasitology* [online]. 2001, 39(3), 209-21 [cit. 2016-04-08]. ISSN 0023-4001. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2721069/?tool=pmcentrez>.
- KIZIEWICZ, B. Natural infection with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) in the European bison (*Bison bonasus*) in Białowieża National Park, Poland. *Helminthologia*. 2013, 50(3), 167-171. ISSN 0440-6605. Dostupné také z: <http://link.springer.com/article/10.2478%2Fs11687-013-0127-1>.
- KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, I. et al. 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*. 2008, 94(1), 58-67. ISSN 0022-3395. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18372622>.
- KUDLACEK, O., Y. DONMEZ, T. STOCKNER. ABC transporters of the liver fluke *Fasciola hepatica*. *BMC Pharmacology & Toxicology* [online]. 2012, 13(1), A76 [cit. 2016-04-24]. ISSN 2050-6511. Dostupný z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3506343/>.

- KUERPICK, B. et al. Seroprevalence and GIS-supported risk factor analysis of *Fasciola hepatica* infections in dairy herds in Germany. *Parasitology* [online]. 2013, 140, 1051-1060 [cit. 2016-01-20]. ISSN 1469-8161. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23743241>.
- KUERPICK, B., T. SCHNIEDER, C. STRUBE. Seasonal pattern of *Fasciola hepatica* antibodies in dairy herds in Northern Germany. *Parasitology research*. 2012, 111(3), 1085-92. ISSN 0932-0113. Dostupná také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22565401>.
- LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International journal for parasitology* [online]. 1988, 18(7), 885-936 [cit. 2016-03-21]. ISSN 1879 - 0135. Dostupný z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3066771>.
- LEONTOVYČ, R. et al. Motolice obrovská v chovu daňka evropského. *Svět myslivost*. 2012, 13(5), 22-23. ISSN 1212-8422.
- LEONTOVYČ, R. et al. Highland cattle and *Radix labiata*, the hosts of *Fascioloides magna*. *BMC veterinary research* [online]. 2014, 10, 41 [cit. 2016-04-15]. ISSN 1746-6148. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24517409>.
- LEVIEUX, D. et al. Early immunodiagnosis of bovine fascioliasis using the specific antigen f2 in a passive hemagglutination test. *Veterinary parasitology*. 1992, 44(1-2), 77-86. ISSN 0304-4017. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1279885>.
- LUN, Z.-R. et al. Clonorchiasis: a key foodborne zoonosis in China. *The Lancet. Infectious diseases*. 2005, 5(1), 31-41. ISSN 1473-3099. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620559>.
- LYSEEN, K. et al. A Review and Framework for Categorizing Current Research and Development in Health Related Geographical Information Systems (GIS) Studies. *Yearbook of medical informatics* [online]. 2014, 9(1), 110–24 [cit. 2016-04-16]. ISSN 2364-0502. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25123730>.

- MAJOROS, G., V. SZTOJKOV. Appearance of the large American liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) (Trematoda: Fasciolata) in Hungary. *Parasitologia Hungarica* [online]. 1994, 27, 27-38 [cit. 2016-04-22]. ISSN 0303-688X. Dostupné z: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19950811016.html>.
- MALONE, J.B. et al. A global network for the control of snail-borne disease using satellite surveillance and geographic information systems. *Acta Tropica*. 2001, 79(1), 7-12. ISSN 0001-706X. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11378137>.
- MARCILLA, A., M.D. BARGUES, S. MAS-COMA. A PCR-RFLP assay for the distinction between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. *Molecular and cellular probes*. 2002, 16(5), 327-33. ISSN 0890-8508. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12477436>/<http://linkinghub.elsevier.com/trieve/pii/S0890850802904299>.
- MARINCULIĆ, A. et al. Appearance of American liver fluke (*Fascioloides magna*, Bassi, 1875) in Croatia: A case report. *Veterinarski Arhiv*. 2002, 72(6), 319-325. ISSN 0372-5480. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/278030124_Appearance_of_American_liver_fluke_Fascioloides_magna_Bassi_1875_in_Croatia_-_A_case_report.
- MAS-COMA, S., I.R. FUNATSU, M.D. BARGUES. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails occurring at very high altitude in South America. *Parasitology* [online]. 2001, 123, 115-27 [cit. 2016-03-07]. ISSN 1469-8161. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11769277>.
- MAS-COMA, S., M.A. VALERO, M.D. BARGUES. *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Advances in parasitology*. 2009, 69, 41-146. ISSN 0065-308X. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622408>.
- MATANOVIĆ, K. et al. Hematological and biochemical changes in organically farmed sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitology research*. 2007, 101(6), 1657-61. ISSN 0932-0113. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17694402>

- MCCANN, C.M., M. BAYLIS, D.J.L. WILLIAMS. The development of linear regression models using environmental variables to explain the spatial distribution of *Fasciola hepatica* infection in dairy herds in England and Wales. *International journal for parasitology*. 2010, 40(9), 1021-8. ISSN 0020-7519. Dostupné také 0003-4983 z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20227416>.
- MCGARRY, J.W. et al. PCR-based differentiation of *Fasciola* species (Trematoda: Fasciolidae), using primers based on RAPD-derived sequences. *Annals of tropical medicine and parasitology*. 2007, 101(5), 415-21. ISSN 0003-4983. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550647>.
- MÉNARD, A. et al. Myocastor coypus as a reservoir host of *Fasciola hepatica* in France. *Veterinary research* [online]. 2001, 32(5), 499-508 [cit. 2016-04-24]. ISSN 1297-9716. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11592619>.
- MESHGI, B., A. ESLAMI, F. HEMMATZADEH. Determination of somatic and excretory-secretory antigens of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* using SDS-PAGE. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2008, 9(1), 77-80. ISSN 1728-1997. Dostupný také z: <https://web4.library.adelaide.edu.au/dspace/handle/2440/68638>.
- MEZO, M. et al.. An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal antibody (MM3). *Journal of Parasitology*. 2004, 90(4), 845-852. ISSN 0022-3395. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15357080>.
- MEZO, M. et al. Evaluation of the flukicide treatment policy for dairy cattle in Galicia (NW Spain). *Veterinary parasitology*. 2008, 157(3-4), 235-43. ISSN 0304-4017. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18774648>.
- MOLL, L. et al. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The netherlands. *Veterinary parasitology*. 2000, 91(1-2), 153-8. ISSN 0304-4017. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10889368>.
- MOROZOVA, E. V. et al. Polymorphism of the ND1 and CO1 mitochondrial genes in populations of liver fluke *Fasciola hepatica*. *Genetika*. 2004, 40(7), 1002-5. ISSN 0016-6758. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15458213>.

- NOTOMI, T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*. 2000, 28(12), 63. ISSN 0305-1048. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871386>.
- NOVOBILSKÝ, A., M. KAŠNÝ et al. Humoral immune responses during experimental infection with *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica* in goats and comparison of their excretory/secretory products. *Parasitology Research*. 2007a, 101(2), 357-364. ISSN 0932-0113. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17265088>.
- NOVOBILSKÝ, A., E. HORÁČKOVÁ et al. The giant liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi 1875) in cervids in the Czech Republic and potential of its spreading to Germany. *Parasitology Research*. 2007b, 100(3), 549-553. ISSN 0932-0113. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17016724>.
- NOVOBILSKÝ, A. et al. Impact of meteorological and environmental factors on the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in beef cattle herds in Sweden. *BMC veterinary research*. 2015, 11, 128. ISSN 1746-6148. Dostupný také z: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4459679&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- OBERHAUSEROVÁ, K. et al. Molecular discrimination of eggs of cervid trematodes using the Teflon (PTFE) technique for eggshell disruption. *Helminthologia*. 2010, 47(3), 147-151. ISSN 0440-6605. Dostupný také z: <http://link.springer.com/article/10.2478%2Fs11687-010-0022-y#page-1>.
- OFORI, M., I.I. BOGOCH, R.K.D. EPHRAIM. Prevalence of *Dicrocoelium dendriticum* ova in Ghanaian school children. *Journal of tropical pediatrics*. 2015, 61(3), 229-30. ISSN 0142-6338. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25828830>.
- OHTORI, M., M. AOKI, T. ITAGAKI. Distinct distribution of *Dicrocoelium dendriticum* and *D. chinensis* in Iwate Prefecture, Japan, and a new final host record for *D. chinensis*. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* [online]. 2014, 76(10), 1415-7 [cit. 2016-04-23]. ISSN 1347-7439. Dostupný z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4221179/?tool=pmcentrez>.

- OLSEN, A. et al. Prevalence, risk factors and spatial analysis of liver fluke infections in Danish cattle herds. *Parasites & vectors* [online]. 2015, 8(1), 160 [cit. 2016-04-02]. ISSN 1756-3305. Dostupný z: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-015-0773-x>.
- ONDRISKA, F. et al. A rare case of human autochthonous dicrocoeliasis in Czechoslovakia. *Bratislavské lékařské listy*. 1989, 90(6), 467-9. ISSN 0006-9248. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2765975>.
- PAVLOVIĆ, M. et al. Human case of fasciolosis in Serbia treated with triclabendazole. *Vojnosanitetski pregled*. 2014, 71(2), 202-6. ISSN 0042-8450. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24665580>.
- PLOTZ, C. et al. Fascioloides magna-epizootiology in a deer farm in Germany. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*. 2015, 128(5-6), 177-82. ISSN 0005-9366. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26054221>.
- PYBUS, M.J. Liver flukes. In: Samuel W.M. *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. 2. vydání. Iowa: Iowa State University Press, 2001. 121– 149 s.
- PYZIEL, A.M., A.W. DEMIASZKIEWICZ, I. KULIGOWSKA. Molecular identification of Fascioloides magna (Bassi, 1875) from red deer from South-Western Poland (Lower Silesian wilderness) on the basis of internal transcribed spacer 2 (ITS-2). *Polish journal of veterinary sciences*. 2014, 17(3), 523-5. ISSN 1505-1773. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25286665>.
- QIAN, M.B. et al. The global epidemiology of clonorchiasis and its relation with cholangiocarcinoma. *Infectious diseases of poverty* [online]. 2012, 1(1), 4 [cit. 2016-04-23]. ISSN Dostupná z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3710150/?tool=pmcentrez>.
- RACEK, J. *Klinická biochemie 2*. přepracované vydání. Praha: Galén, 2006, 329 s. ISBN: 80-7262-324-9.
- RACK, J., E. ADUSU, T. JELÍNEK. Human infection with Dicrocoelium dendriticum. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. 2004 (1946), 129(47), 2538-40. ISSN 0012-0472. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15543471>.

- RAJSKÝ, D. et al. Control of fascioloidosis (*Fascioloides magna* Bassi, 1875) in red deer and roe deer. *Helminthologia*. 2002, 39(2), 67–70. ISSN 0440-6605.
- RAPSCH, C. et al. Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *International journal for parasitology*. 2006, 36(10-11), 1153-8. ISSN 0020-7519. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16843470>.
- RINALDI, L. et al. Sheep and *Fasciola hepatica* in Europe: the GLOWORM experience. *Geospatial health*. 2015, 9(2), 309-17. ISSN 1827-1987. Dostupné také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25826312>.
- RONDELAUD, D. et al. The control of *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae) by the terrestrial snail *Zonitoides nitidus* on acid soils. *Biological Control*. 2006, 39(3), 290-299. ISSN 1049-9644. Dostupný také z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964406002118>.
- SALIMI-BEJESTANI, M.R. et al. Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Research in veterinary science*. 2005a, 78(2), 177-81. ISSN: 0034-5288. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15563926>.
- SALIMI-BEJESTANI, M.R., R.G. DANIEL, et al. Prevalence of *Fasciola hepatica* in dairy herds in England and Wales measured with an ELISA applied to bulk-tank milk. *The Veterinary record*. 2005b, 156(23), 729-31. ISSN 0042-4900. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15937238>.
- SALIMI-BEJESTANI, M.R. et al. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Fasciola hepatica* in milk. *Veterinary parasitology*. 2007, 149(3-4), 290-3. ISSN 0304-4017. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17826912>.
- SANTOS, T. R. M. dos. *Genetic characterization of Portuguese Fasciola hepatica isolates*. Lisboa, 2012. Disertační práce. Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa Dostupné také z: <http://docplayer.net/8253395-Genetic-characterization-of-portuguese-fasciola-hepatica-isolates.html>.

- SELEMETAS, N. et al. The effects of farm management practices on liver fluke prevalence and the current internal parasite control measures employed on Irish dairy farms. *Veterinary Parasitology*. 2015, 207(3-4), 228–240. ISSN 0304-4017. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25591405>.
- SEMYENOVA, S.K. et al. Genetic differentiation in eastern European and western Asian populations of the liver fluke, *Fasciola hepatica*, as revealed by mitochondrial nad1 and cox1 genes. *The Journal of parasitology*. 2006, 92(3), 525-30. ISSN 0022-3395. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16883995>.
- SIEGELOVÁ, V. *Molekulární diagnostika motolice obrovské (Fascioloides magna)*. Praha, 2012. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra parazitologie.
- SITHITHAWORN, P. et al. The current status of opisthorchiasis and clonorchiasis in the Mekong Basin. *Parasitology international* [online]. 2012, 61(1), 10-6 [cit. 2016-04-23]. ISSN 1873-0329. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3836690/?tool=pmcentrez>.
- SRIPA, B. et al. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini*-multiple pathways to cancer. *Trends in parasitology* [online]. 2012, 28(10), 395-407 [cit. 2016-04-23]. ISSN 1471-5007. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3682777/?tool=pmcentrez>.
- ŠMARDA, J. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN: 80-210-3841-1.
- TAVARES, R. et al. Molecular techniques for the study and diagnosis of parasite infection. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* [online]. 2011, 17(3), 239-248 [cit. 2016-04-20]. ISSN 1678-9199. Dostupný z: http://www.oalib.com/paper/866184#.VzM_RoSLTIU.
- TEOFANOVA, D. et al. Genetic diversity of liver flukes (*Fasciola hepatica*) from Eastern Europe. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2011, 11(1), 109-15. ISSN 1567-1348. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20937412>.

- TOET, H., D.M. PIEDRAFITA, T.W. SPITHILL. Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *International journal for parasitology*. 2014, 44(12), 915-27. ISSN 0020-7519. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25200351>.
- TOMAN, M. *Veterinární imunologie. 2., doplněné a aktualizované vydání*. Praha: Grada, 2009, 392 s. ISBN: 978-80-247-2464-5.
- TRAILOVIĆ, S.M., D. MARINKOVIĆ, Z. KULIŠIĆ. Diagnosis and therapy of liver fluke (*Fascioloides magna*) infection in fallow deer (*Dama Dama*) in Serbia. *Journal of wildlife diseases*. 2016, 52 (2), 319-26. ISSN 0090-3558. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26967130>.
- Tuček, J. *Geografické informační systémy: principy a praxe*. Praha: Computer Press, 1998, 424 s. CAD & GIS. ISBN 80-7226-091-X.
- TUM, S., M.L. PUOTINEN, D.B. COPEMAN. A geographic information systems model for mapping risk of fasciolosis in cattle and buffaloes in Cambodia. *Veterinary parasitology*. 2004, 122(2), 141-9. ISSN 0304-4017. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15177719>.
- TURNER, J. et al. A model to assess the efficacy of vaccines for control of liver fluke infection. *Scientific Reports* [online]. 2016, 6 [cit. 2016-03-30]. ISSN: 2045-2322. Dostupný z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27009747>.
- URSPRUNG, J., A. JOACHIM, H. PROSL. Incidence and control of the American giant liver fluke, *Fascioloides magna*, in a population of wild ungulates in the Danubian wetlands east of Vienna. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift*. 2006, 119(7-8), 316-23. ISSN 0005-9366 Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17009716>.
- VENGUST, G. Comparison of the parasitic fauna of fallow deer (*Dama dama*) from two enclosures in Slovenia. *Slovenia Veterinary Research*. 2003a, 40(1), 27-32. ISSN 1580-4003. Dostupné také z: <http://eurekamag.com/research/003/688/003688610.php>

- VENGUST, G. et al. Fasciola hepatica: effects on blood constituents and liver minerals in fallow deer (*Dama dama*). *Veterinary parasitology*. 2003b, 112(1-2), 51-61. ISSN 0304-4017.
- VOLF, P., HORÁK P. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton, 2007, 318 s. ISBN 978-80-7387-008-9.
- VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- WANG, Y.C., C.C. FENG, P. SITHITHAWORN. Environmental determinants of *Opisthorchis viverrini* prevalence in northeast Thailand. *Geospatial Health*. 2013, 8(1), 111-23. ISSN 1827-1987. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24258888>.
- WATTANAYINCHAROENCHAIA S. et al. Geographic information system of *Opisthorchis viverrini* in northeast Thailand. *Asian Biomedicine* [online]. 2011, 5(5), 687-691 [cit. 2016-04-28]. ISSN 1875-855X. Dostupný z: http://gecnet.kku.ac.th/research/i_journal/2555/1_ij2012.pdf.
- WENSVOORT, P., H.J. OVER. Cellular proliferation of bile ductules and gamma-glutamyl transpeptidase in livers and sera of young cattle following a single infection with *Fasciola hepatica*. *The Veterinary quarterly*. 1982, 4(4), 61-72. ISSN 0165-2176. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6132482>.
- WITTEWER, C.T. High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Human mutation*. 2009, 30(6), 857-9. ISSN 1059-7794. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19479960>.
- XHEMOLLARI, E., L. DHASKALI, N. PAPAANNOUN. Liver morphological changes in sheep infested fluke. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*. 2012, 1(11), 123-126. ISSN 2218-2020. Dostupný také z: <http://journals.indexcopernicus.com/abstract.php?icid=1006863>.
- MANGA-GONZÁLEZ, Y. M., M. C. FERRERAS. Dicrocoeliidae family: major species causing veterinary diseases. *Digenetic Trematodes*. 2014, 474. ISSN 0065-2598. Dostupný také z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24903372>.
- ZVÁROVÁ, J., MAZURA I. *Metody molekulární biologie a bioinformatiky*. Praha: Karolinum, 2012, 343s. ISBN 978-80-246-2150-0.

Seznam obrazových příloh

Obrázek 1 Taxonomické zařazení nejvýznamnějších čeledí jaterních motolic.....	10
Obrázek 2 Fylogenetické vztahy fasciolidních motolic.....	13
Obrázek 3 Životní cyklus <i>Fasciola hepatica</i>	14
Obrázek 4 <i>Fascioloides magna</i> a <i>Fasciola hepatica</i>	15
Obrázek 5 Rozšíření <i>Fasciola hepatica</i> v Evropě (2000-2016).....	17
Obrázek 6 Rozšíření <i>Fascioloides magna</i> v Evropě.....	19
Obrázek 7 Infikovaná játra.....	22
Obrázek 8 Vajíčko motolice z trusu zebra.....	42
Obrázek 9 Elektroforéza z izolované DNA ptačích motolic.....	44
Obrázek 10 Elektroforéza koprologických vzorků.....	47
Obrázek 11 Imunoblot s ES1 antigenem <i>Fasciola hepatica</i> a séry experimentálně infikovaných beranů.....	49

Seznam tabulek a grafů

Tabulka 1 Základní charakteristika motolice <i>Dicrocoelium dendriticum</i>	11
Tabulka 2 Základní charakteristika motolic <i>Clonorchis sinensis</i> a <i>Opisthorchis viverrini</i>	12
Tabulka 3 Základní informace o <i>Fasciola hepatica</i>	16
Tabulka 4 Základní informace o <i>Fascioloides magna</i>	18
Tabulka 5 Přehled diagnostických metod	21
Tabulka 6 Možnosti využití ELISA testu pro detekci protilátek proti fasciolidním motolicím	25
Tabulka 7 Příklady léčiv užívaných proti motolicím.....	28
Tabulka 8 Materiál pro diagnostiku ptačích motolic	35
Tabulka 9 Reakční směs pro PCR reakci při diagnostice ptačích motolic	36
Tabulka 10 Primery použité pro PCR reakci	38
Tabulka 11 Reakční směs pro PCR reakci.....	38
Tabulka 12 Schéma ELISA experimentu	40
Tabulka 13 Schéma imunoblotu	41
Tabulka 14 Koncentrace a čistota izolované DNA z labutích vzorků.....	43
Tabulka 15 Výsledky sekvenace DNA ptačích motolic	45
Tabulka 16 Koncentrace a čistota izolované DNA získané z koprologického materiálu	46
Graf 1 Dynamika hladiny IgG v průběhu experimentální infekce <i>Fasciola hepatica</i>	48

Seznam zkratek

ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartátaminotransferáza
BSA	hovězí sérový albumin
dNTP	deoxinukleotid trifosfát
DTT	dithiothreitol
ES produkty	exkrečně-sekreční produkty
ELISA	enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
GIS	geografický informační systém
GMD	glutamátdehydrogenáza
GMT	gamma-glutamyltransferáza
LD	laktátdehydrogenáza
PBS	fosfátový pufr
TMB	tetramethylbenzidin