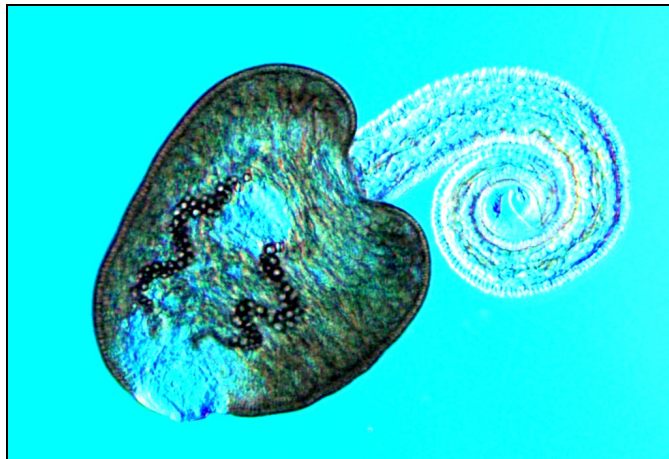


Magisterská diplomová práce  
Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích



# **Biologie a výskyt larválních stádií motolice obrovské (*Fascioloides magna*) v České republice**

**Bc. Eva HORÁČKOVÁ**



Vedoucí práce: Prof. RNDr. Tomáš Scholz, CSc.

České Budějovice, duben 2007

## **Magisterská diplomová práce**

Horáčková, E., 2007: Biologie a výskyt larválních stádií motolice obrovské (*Fascioloides magna*) v České republice. [Biology and occurrence of larval stages of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*). Mgr. Thesis, in Czech] – 53 pp., Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Anotace:**

The ability of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*) to expand the spectrum of its potential intermediate hosts, especially to use the aquatic snail *Radix peregra*, was investigated. Rediae and cercariae of *F. magna* were found in 20 out of 1,328 *Galba truncatula* and 5 out of 4,921 *R. peregra* snails from two localities in Western and Central Bohemia. The susceptibility of *R. peregra* to the *F. magna* infection was confirmed by finding larval stages of the parasite. Fully formed (mature) cercariae, as well as mother and daughter rediae, were obtained from 130 *R. peregra* snails challenged with miracidia of *F. magna*. The first mother rediae were recovered 35 days post infection, whereas cercariae were found 119 days p.i. The infection was successful only in small *R. peregra* snails (shell height 1–8 mm). The 1,940 bp long region of the 18S rRNA gene of *F. magna* from the Czech Republic was sequenced. Its comparison with that of *F. hepatica* revealed a rather low interspecific sequence variation (0.9 %). A phylogenetic analysis has shown monophyly of the Fasciolidae and a separate position of *F. magna* among fasciolids, which supports the validity of the genus *Fascioloides*.

Prohlašuji, že jsem uvedenou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

17. 4. 2007

.....

**Poděkování:**

Především bych chtěla poděkovat Tomáši Scholzovi a Aničce Faltýnkové za odborné vedení a cenné rady. Dále Martině Borovkové, Blance Škoríkové, Adamovi Novobilskému, Lence Kabláskové, Olegovi Ditrichovi, Aleši Horákovi, Tomáši Chrudimskému, Ivici Králové-Hromadové, Martě Špakulové, Davidovi Bínovi, Katce Huňové, Lence Hirtové, Martině Wijové, Alči Kociánové, Romanovi Kuchtovi, MVDr. Mikitkovi, MVDr. Papajovi, MVDr Machatému, paní Šnajdové, panu Kolárovi ze správy obory Zahradka, panu Řehořovi ze správy Poněšické obory. Můj dík patří samozřejmě také mým rodičům a sestře za jejich podporu a porozumění po celou dobu mého studia.

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	5
<b>2. Cíle práce</b> .....	7
<b>3. Literární přehled</b> .....	8
3.1. Systematické zařazení .....	8
3.2. Zeměpisné rozšíření .....	8
3.2.1. Evropa a další kontinenty .....	8
3.2.2. Česká republika .....	9
3.3. Vývojový cyklus.....	9
3.3.1. Vývoj v mezihostiteli .....	10
3.3.2. Spektrum mezihostitelů .....	10
3.3.3. Taxonomie plžů rodu <i>Radix</i> .....	11
3.4. Molekulární charakterizace .....	12
3.5. Diagnostika .....	12
3.5.1. Diferenciace <i>F. magna</i> od jiných jaterních motolic .....	12
3.5.2. Přímé diagnostické metody .....	13
3.5.3. Nepřímé diagnostické metody .....	13
<b>4. Metodika</b> .....	15
4.1. Přehled lokalit .....	15
4.1.1. Obora Zahrádka .....	15
4.1.2. Poněšická obora .....	16
4.1.3. Vojenský výcvikový prostor (VVP) Boletice .....	18
4.1.4. Vojenský výcvikový prostor (VVP) Jince .....	19
4.1.5. Okolí Třeboně .....	20
4.1.6. Obora Aglaia .....	20
4.1.7. Zámecký park Blatná .....	21
4.1.8. Okolí Nových Hradů .....	23
4.2. Sběr a vyšetření měkkýšů .....	23
4.3. Experimentální nákazy .....	26
4.4. Molekulární metody .....	27
4.4.1. Biologický materiál .....	27
4.4.2. Izolace DNA .....	27
4.4.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	27

4.4.4. Agarózová elektroforéza.....	28
4.4.5. Izolace DNA z gelu.....	28
4.4.6. Sekvenování .....	28
4.4.7. Analýza sekvencí.....	29
<b>5. Výsledky</b> .....	<b>30</b>
5.1. Výskyt vývojových stádií motolic v meziphostitelích na sledovaných lokalitách.....	30
5.1.1. Popisy nalezených larválních stádií motolice <i>Fascioloides magna</i> .....	35
5.2. Experimentální nákazy .....	37
5.3. Molekulární charakterizace .....	39
<b>6. Diskuse</b> .....	<b>41</b>
6.1. Výskyt larválních stádií <i>Fascioloides magna</i> .....	41
6.2. Experimentální nákazy .....	42
6.3. Molekulární charakterizace .....	45
<b>7. Závěr</b> .....	<b>47</b>
<b>8. Literatura</b> .....	<b>48</b>
<b>9. Příloha</b> .....	<b>53</b>

# 1. Úvod

Motolice obrovská (*Fascioloides magna* (Bassi, 1875)) cizopasí v jaterním parenchymu volně žijících a hospodářských zvířat. Je původcem onemocnění přežvýkavců i spárkaté zvěře zvaného fascioloidóza. Jedná se o veterinárně významného parazita, a to především kvůli jeho značné patogenitě (Kassai 1999).

Tato původem severoamerická motolice je v současné době i ve svém původním areálu považována za jednoho z nejzávažnějších parazitů spárkaté zvěře. V Evropě, kam byla motolice obrovská zavlečena v 19. století, se kromě stabilních ohnisek objevují stále nové lokality s jejím výskytem. Proto tento parazit představuje vážný epizootologický problém nejen pro volně žijící zvěř, ale také pro hospodářská zvířata chovaná v ohrožených oblastech (Špakulová et al. 2003). Jelikož se jedná o nejvíce patogenní motolici vyskytující se v naší republice a v Evropě vůbec, je problematika fascioloidózy stále aktuální i u nás. V 60. letech bylo popsáno několik lokalit s výskytem motolice obrovské, především v jižních a středních Čechách (Erhardová-Kotrlá 1968). Recentní výzkumy prokázaly rozšíření tohoto parazita i na území západních Čech (Novobilský et al. 2006).

Ve spolupráci s vědeckými pracovníky a doktorandy Ústavu parazitologie Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně (B. Koudela, D. Modrý, L. Hirtová, A. Novobilský) bylo v roce 2003 zahájeno studium některých aspektů epizootologie a biologie motolice obrovské v oboře Zahrádka v Sedlišti u Nepomuku, kde existuje ohnisko akutní fascioloidózy. Údaje o výskytu larválních stádií motolice ze zmíněné lokality a dalších ohnisek výskytu v jižních Čechách byly prezentovány v bakalářské práci „Vybrané aspekty biologie motolice obrovské (*Fascioloides magna*)“ obhájené v roce 2004 (Horáčková 2004). Předkládaná práce navazuje na předchozí studium a zaměřuje se především na získání nových poznatků o biologii a výskytu larválních stádií motolice obrovské. Část výsledků této práce byla publikována (viz příloha, publikace č. 1). Můj podíl na této publikaci zahrnuje většinu terénních odběrů a následné vyšetření měkkýšů a rovněž velkou část experimentálních nákaz.

Současné nálezy motolice *F. magna* u definitivních hostitelů v Maďarsku, Rakousku a Chorvatsku (Majoros a Sztojkov 1994, Marinculić et al. 2002, Ursprung 2002) naznačují, že areál motolice obrovské se stále rozšiřuje. Tato expanze motolice obrovské vyvolává otázku možného rozšíření dosud velmi úzkého spektra jejich mezihostitelů v Evropě, kde byla jako jediný přirozený mezihostitel doposud zjištěna pouze bahnatka malá (*Galba truncatula*) (Erhardová-Kotrlá 1968). Úspěšné experimentální nákazy plovatky druhu *Lymnaea palustris*

(Chroustová 1978, 1979), nález cercárií v uchatce toulavé (*Radix peregra*) na dvou lokalitách v západních a středních Čechách (Faltýnková et al. 2003, 2006) a úspěšné experimentální nákazy plže druhu *Omphiscola glabra* (Rondelaud et al., 2006) naznačují schopnost *F. magna* adaptovat se i v Evropě na širší spektrum mezihostitelů, stejně jako je tomu v Severní Americe. Je tedy důležité sledovat výskyt larválních stádií motolice obrovské v přirozených mezihostitelích v přírodě, ale rovněž experimentálně ověřit možnost vývoje tohoto parazita v potenciálních mezihostitelích, kteří se vyskytují sympatricky s bahnatkou malou.

S vývojem nových molekulárně-diagnostických metod je důležité znát nejen biologii parazita, ale také získat co nejvíce údajů o jeho molekulárních charakteristikách, zvláště jedná-li se o parazita s veterinárním významem.

Některé ze získaných poznatků již byly publikovány ve vědeckých časopisech (viz. příloha - publikace č. 1 a 2).

Předkládaná práce měla cíle uvedené v následující kapitole.

## 2. Cíle práce:

1. Zjistit údaje o současném výskytu larválních stádií motolice obrovské (*Fascioloides magna*) v meziphostitelích v České republice.
2. Pomocí experimentálních nálezů potenciálních meziphostitelů (plži rodu *Radix*) prokázat či vyvrátit možnost vývoje motolice obrovské v těchto měkkýších.
3. Získat kompletní nukleotidovou sekvenci malé (18S) podjednotky genu pro rRNA druhu *Fascioloides magna* a porovnat ji se sekvencemi vybraných zástupců digenetických motolic, především zástupců čeledi Fasciolidae.



## 3. Literární přehled

### 3.1. Systematické zařazení

Motolice obrovská patří podle současného systému do kmene Platyhelminthes, třídy Trematoda, podtřídy Digenea a čeledi Fasciolidae. Je řazena do rodu *Fascioloides* Ward, 1917.

### 3.2. Zeměpisné rozšíření

#### 3.2.1. Evropa a další kontinenty

Motolice obrovská se původně vyskytovala pouze v Severní Americe, kde je rozšířená především v severovýchodní části USA, v jižní Kanadě v oblasti Velkých jezer, na Labradorském poloostrově, podél Mexického zálivu, řeky Mississippi a na severozápadním pobřeží státu Washington. K hlavním hostitelům zde patří jelenec viržinský (*Odocoileus virginianus*), jelen wapiti (*Cervus elaphus canadensis*) a sob karibu (*Rangifer tarandus caribou*) (Swales 1935, Pybus 2001). Do Evropy byla zavlečena v 2. polovině 19. století spolu s jelenem wapiti a jelencem viržinským, kteří byli dováženi do parků, zoologických zahrad a obor (Erhardová-Kotrlá 1971). Přes svůj severoamerický původ byl parazit poprvé popsán Bassim (1875), který jej našel u jelenů v královském parku blízko Turína, kam byli importováni jeleni wapiti. Nákaza jelenů vedla k úhynu napadených zvířat.

Do dnešní doby je známo 8 evropských států, odkud byl hlášen výskyt motolice obrovské. Známé jsou nálezy z Německa (Salomon 1932), Polska (Slusarski 1955), Španělska (Almarza 1935), Rakouska (Pfeiffer 1983), Slovenska - první nález v roce 1988 (Rajský et al. 1994) a v nedávné době také z Maďarska (Majoros a Sztojkov 1994) a Chorvatska (Marinculić et al. 2002). Současné údaje naznačují centrum výskytu motolice především v povodí Dunaje ve střední Evropě (Ursprung et al. 2002, 2003, 2006).

Ojedinelé nálezy motolice *F. magna* pocházejí i z jiných kontinentů, ale ve všech případech se jednalo o infikovaná zvířata importovaná z USA nebo Kanady. V Jižní Africe a Austrálii byl popsán nález parazita u importovaného skotu (Boomker a Dale-Kuys 1977, Arundel a Hamir 1982) a na Kubě u importovaného jelena wapiti (Lorenzo et al. 1989).

### 3.2.2. Česká republika

Na území dnešní České republiky byla motolice obrovská poprvé zjištěna již v letech 1927-1930 Sprehnem, ale nálezy nebyly publikovány (Erhardová-Kotrlá 1968). V dalších letech byla *F. magna* sporadicky nacházena u jelenů lesních (*Cervus elaphus*) a srnců obecných (*Capreolus capreolus*) v různých částech republiky (Kotrlý a Páv 1959, Erhardová-Kotrlá 1971). Teprve v 60. letech minulého století došlo k výraznému rozšíření motolice u spárkaté zvěře a vytvoření permanentních ohnisek v České republice. Parazit byl zjištěn v jižních Čechách, kde se vyskytoval v oblasti Třeboňska, Novohradských hor a okolí, Českobudějovicka a v okolí Bechyně. Rovněž byl nalezen ve středních Čechách na území Milevska, Písecka, Příbramska a Rožmitálska (oblast Brd a Hřebenů) (Erhardová-Kotrlá 1971). Současný nález motolice na Šumavě (oblasti Křemelné, Železné Rudy a Prášil) naznačuje rozšiřování areálu výskytu této motolice (Novobilský et al. 2006).

### 3.3. Vývojový cyklus

Motolice obrovská má, stejně jako ostatní motolice, relativně složitý dvouhostitelský vývojový cyklus. Spektrum mezihostitelů i definitivních hostitelů je poměrně široké, přičemž se výrazně liší druhové spektrum v Severní Americe a v Evropě (Erhardová-Kotrlá 1968).

Ve vajíčkách, která se dostávají do vnějšího prostředí spolu s trusem, se za vhodných teplotních podmínek a v dostatečně vlhkém prostředí po 4-7 týdnech vyvine obrvené miracidium, které po opuštění operkulárního vajíčka vyhledává mezihostitele a aktivně do něj proniká. Nenajde-li vhodného mezihostitele, hyne do 16-20 hodin (Yamaguti 1975).

V mezihostiteli dochází k asexuálnímu množení parazita. Výsledkem tohoto množení je produkce cercárií, které aktivně opouštějí měkkýše a encystují se na povrchu rostlin jako tzv. adoleskáríe. Tato vývojová stádia přežívají ve vlhkém prostředí 2-2,5 měsíce. V suchém prostředí naopak hynou do 18 dní (Erhardová-Kotrlá 1968).

Definitivní hostitel se nakazí pozřením vegetace s adoleskáriemi. V jeho trávicím traktu se adoleskáríe uvolňuje z ochranných obalů a proniká střevní stěnou do jater, kde pomalu roste a vyvíjí se v dospělce. Po dosažení dospělosti (3-5 měsíců) začne motolice uvolňovat vajíčka, která se společně se žlučí dostávají do žlučvodů a postupně zaživacím traktem ven z těla hostitele (Erhardová-Kotrlá 1971).

### 3.3.1. Vývoj v mezihostiteli

Vývoj v plži trvá asi 42-44 dní v laboratorních podmínkách, zatímco v přírodě až 75 dní. První infekce plžů se objevují obvykle v květnu nebo, v případě dlouhé zimy, v červnu. Jednotlivá vývojová stadia motolice obrovské mohou v mezihostiteli i přezimovat (Erhardová-Kotrlá 1968).

Po odhození brv se miracidia mění v těle plže ve sporocystu. Sporocysty se vyskytují nejčastěji v plášti, plášťové dutině, noze, kolem zažívacího ústrojí, v bílkovinných žlázách a plicním vaku. Sporocysta roste a formují se v ní mateřské rédie (nejvýše 4-6 kusů, zpravidla ale jen jedna). Mezi 8.-15. dnem od nákazy plže se mateřská rédie prudkým pohybem uvolní ze sporocysty, která následně odumírá (Erhardová-Kotrlá 1968).

Mateřské rédie cestují tkáněmi plžů. Nejčastěji jsou nalézány v ledvinách, plicních vacích, samičích pohlavních orgánech a kolem řitního otvoru. Uvnitř jejich těla se tvoří dceřiné rédie, které opouštějí mateřskou rédiu 30.-32. den od napadení plže. Jedna mateřská rédie obsahuje 4, někdy až 6 dceřiných rédií (Erhardová 1961).

V dceřiných rédiích se ze zárodečných buněk tvoří cercárie (zpravidla 6-10 zárodků). Všechny zárodky však obvykle nedozrávají. Cercárie opouštějí dceřiné rédie a migrují do hepatopankreatu a pohlavních orgánů plže, kde dokončují svůj vývoj. Aktivními pohyby plže jsou pak vytlačovány do vnějšího prostředí. Za 10-20 min dochází k jejich encystaci na rostlinách, kamenech či na vodní hladině (Swales 1935, Erhardová 1961).

### 3.3.2. Spektrum mezihostitelů

Mezihostitelé motolice *F. magna* patří do čeledi Lymnaeidae (Rondelaud et al. 2006). Tato čeleď představuje jednu z nejvýznamnějších skupin vodních měkkýšů, neboť řada druhů hraje roli jako mezihostitel medicínsky i veterinárně významných druhů motolic, ale i hlístic (Bargues et al. 2001).

Na americkém kontinentě bylo dosud zjištěno následujících 10 druhů měkkýšů, kteří mohou sloužit jako mezihostitelé motolice *F. magna*: druhy *Lymnaea bulimoides techella*, *L. caperata*, *L. modicella*, *L. parva* a *L. palustris nuttalliana* byly popsány jako přirození mezihostitelé, zatímco plži *L. columela*, *L. ferruginea*, *L. palustris*, *L. stagnalis* a *L. umbrosa* byli infikováni experimentálně (Dunkel et al. 1996).

V podmínkách Evropy je spektrum mezihostitelů odlišné, jediným dosud zjištěným mezihostitelem v přírodních podmínkách je bahnatka malá (*Galba truncatula*) (Erhardová-Kotrlá 1968). Plže druhů *Radix peregra* a *R. ovata* se sice podařilo experimentálně infikovat

miracidii *F. magna*, avšak vývoj parazita se zastavil ve stádiu mateřských rédií (Erhardová-Kotrlá 1968). Nákazami plže *R.peregra* se zabývali recentně i Faltýnková et al (2006), kteří zaznamenali vývoj *F. magna* v těle měkkýše až do stádia plně vyvinutých cercárií. Další druhy, u kterých byly prováděny experimentální nákazy Erhardovou-Kotrlou (1968), tj. *Lymnaea palustris*, *Physa acuta*, *Succinella oblonga* a *Succinea putris*, se nepodařilo nakazit vůbec. U dvou z 507 jedinců plže *L. stagnalis* miracidia úspěšně pronikla do tkání meziphostitele, ale vývoj proběhl jen do stádia sporocysty (Erhardová-Kotrlá 1968).

Naproti tomu Chroustová (1978, 1979) úspěšně infikovala mladé plže druhu *L. palustris*. Ze 725 pokusných plžů přežilo infekci 400 a v 172 jedincích (tj. u 43%) proběhl kompletní vývoj motolice *F. magna*. Infekceschopnost uvolněných metacercárií z těchto plžů autorka potvrdila následnou infekcí morčat. Tyto výsledky naznačují, že by tento plž mohl sloužit jako meziphostitel *F. magna* i v přirozených podmínkách. Nákaza *L. palustris* v přírodních podmínkách ovšem doposud zaznamenána nebyla, a to ani v oblastech kolem Dunaje u Vídně, kde je *F. magna* běžně rozšířena v populaci jelenů evropských a *L. palustris* se zde hojně vyskytuje (Ursprung et al. 2003).

Rondelaud et al. (2006) experimentálně infikovali vodního plže *Omphiscola glabra*, u kterého byl rovněž potvrzen kompletní vývoj až do spontánního uvolnění cercárií. Tento plž se však vyskytuje pouze v západní Evropě, kde *F. magna* nebyla doposud nalezena.

V přírodních podmínkách byly rédie a cercárie motolice obrovské nalezeny také u plže *Radix peregra* (v 6 plžích z 7277 vyšetřených) Faltýnková et al. (2006). Tento nález naznačuje možnou adaptaci parazita na tento druh měkkýše.

Jelikož spektrum druhů meziphostitelů Severní Ameriky je výrazně širší než v Evropě, předpokládá se, že další druhy měkkýšů čeledi Lymnaeidae by se mohly postupně stát vhodnými meziphostiteli pro vývoj *F. magna* v Evropě (Rondelaud et al. 2006). Vyřešení otázky případných dalších meziphostitelů motolice obrovské v České republice lze považovat za významné také z hlediska epizootologie fascioloidózy, neboť případná adaptace parazita na nové druhy měkkýšů by mohla přispět k jeho dalšímu rozšíření ve střední Evropě.

### 3.3.3. Taxonomie plžů rodu *Radix*

Podle nejnovější studie (Bargues et al. 2001), založené na analýze DNA (úseku ITS2 ribozomální RNA), můžeme rozlišit 6 platných druhů rodu *Radix*: *R. ampla*, *R. auricularia*, *R. labiata*, *R. lagotis*, *R. peregra* (= *R. balthica* a = *R. ovata*) a *Radix* sp. V České republice je uváděn výskyt druhů *R. auricularia*, *R. labiata* a *R. lagotis* (Bargues et al. 2001). Vzorok měkkýšů druhu *R. ampla* pocházející z České republiky nebyly ve zmiňované studii zahrnuty.

Výskyt ve střední Evropě dříve uváděného druhu *R. peregra* se omezuje jen na západní Evropu (Island, Francie, Španělsko, Nizozemsko) (Bargues et al. 2001).

Podle délky ITS2 sekvencí autoři usuzují, že rod *Radix*, spolu s rodem *Galba*, patří mezi nejstarší taxony. Výsledná fylogenetická analýza příslušných sekvencí ukazuje na blízkou příbuznost obou rodů, přičemž nejodvozenějším druhem je *R. auricularia*.

### 3.4. Molekulární charakterizace

Podle nejnovější studie Olsona et al. (2003) se jeví na základě studia kompletních sekvencí genů pro malou i velkou ribozomální podjednotku (18S a 28S) rRNA vybraných zástupců jednotlivých čeledí digenetických motolic jako nejpříbuznější k čeledi Fasciolidae čeleď Echinostomatidae a dále čeledi Philophthalmidae, Psilostomatidae a Cyclocoelidae.

Dosud byly uveřejněny pouze dvě DNA sekvence motolice obrovské. Adlar et al. (1993) získal úplnou sekvenci ITS2 úseku vzorku amerického klonu motolice *F. magna*. Částečnou sekvencí ITS2 spolu se sekvencí 5.8S úseku evropského klonu *F. magna* se podařilo získat Hoerwegovi et al. (2006).

Recentně byly získány kompletní sekvence úseků ITS1, ITS2 a dvou mitochondriálních genů - podjednotky 1 cytochrom c oxidázy (cox1) a nikotinamid dehydrogenázy (nad1) (Králová-Hromadová et al. submitted).

### 3.5. Diagnostika

Pro efektivní diagnózu, účinnou léčbu a kontrolu parazitárního onemocnění je nezbytné znát druhovou příslušnost parazita. Pro klinickou praxi je zásadní vyvinout jednoduchou a snadno reprodukovatelnou metodu identifikace parazita.

#### 3.5.1. Diferenciace *F. magna* od jiných jaterních motolic

Typickým diferenciačním znakem odlišujícím druh *F. magna* od ostatních jaterních motolic je nápadně větší rozměr těla. Morfologicky je možno *F. magna* odlišit od druhů *Fasciola gigantica* a *F. hepatica*, které se nacházejí ve žlučovodech nebo žlučovém měchýři, absencí hlavového výběžku – kónu na předním konci těla. Dalším rozlišovacím znakem je poloha varlat. U druhu *F. hepatica* leží varlata jedno za druhým, zatímco motolice *F. magna*

má varlata uložena vedle sebe. Hlavním diferenciacním znakem rodů *Fascioloides* a *Fasciola* je však uložení žlutkových trsů. U rodu *Fascioloides* jsou žlutkové trsy pouze na ventrální straně, zatímco rod *Fasciola* je má jak na ventrální, tak na dorzální straně těla (Špakulová et al. 2003).

Odlišná je také lokalizace juvenilních jedinců. Zatímco druh *F. hepatica* a další z jaterních motolic, motolice kopinatá (*Dicrocoelium dendriticum* – čeleď Dicrocoeliidae) jsou nacházeny ve žlučových cestách, *F. magna* je lokalizována přímo v jaterním parenchymu (Erhardová-Kotrlá 1971).

### 3.5.2. Přímé diagnostické metody

Přímé diagnostické metody jsou založeny jednak na diagnostice dospělců a vajíček jimi produkovaných, jednak na přítomnosti larválních stádií v mezihostitelích.

Nejčastěji používanou metodou, která je nejdostupnější a nejméně finančně nákladná, je koprologické vyšetření trusu definitivních hostitelů. Metoda spočívá v nálezů vajíček v trusu sedimentační metodou. Nevýhodou této metody je však značná podobnost vajíček s vajíčky motolice *F. hepatica*, jež se nedají odlišit s naprostou jistotou.

Spolehlivá je metoda patoanatomického vyšetření definitivního hostitele s přímým nálezem motolice v jaterním parenchymu nebo případně i v jiných orgánech. Typickým znakem je přítomnost hnědočerného pigmentu na povrchu i v parenchymu jater, a také v dalších orgánech břišní dutiny. Tento pigment se nevyskytuje u žádného jiného druhu motolic. Stejně tak přítomnost fibrózních kapsul v játrech s dospělými motolicemi a tmavou tekutinou s vajíčky je pro *F. magna* patognomická.

Dalším způsobem je diagnostika vývojových stádií motolice v mezihostiteli. Tato metoda je založena na morfologické determinaci cercarií uvolněných z plže, případně rédií. Cercarie *F. magna* jsou gymnocefalního typu stejně jako *F. hepatica*. Stavbu těla všech larválních stádií *F. magna* popsali detailně Erhardová-Kotrlá (1971) a Swales (1935). Nevýhodou této metody je však její nejednoznačnost. Jednotlivá vývojová stádia motolic *F. magna* a *F. hepatica* jsou totiž značně morfologicky podobná.

### 3.5.3. Nepřímé diagnostické metody

V současnosti se k diagnostice parazitóz stále častěji používají metody založené na imunologických a molekulárně-biologických principech. Jedná se o biochemické,

hematologické, imunologické a molekulární metody. Mezi hlavní přístupy patří imunologické vyšetření krve, genetická analýza izoenzymů a analýza DNA.

Blair a McManus (1989) se pokusili rozlišit jednotlivé druhy motolic čeledi Fasciolidae (*F. hepatica*, *F. gigantica* a *F. magna*) na základě specifických restričních míst pro restriční endonukleázy. U *F. hepatica* bylo sledováno 18 restričních míst, zatímco u zbývajících dvou druhů 17. U každého z výše jmenovaných druhů motolic nebyla pozorována více než 2 specifická restriční místa.

Vzájemné porovnání na základě analýzy sekvencí ITS2 umožnilo kvantifikovat mezidruhové a mezirodové rozdíly fasciolidních motolic. Zatímco *F. hepatica* a *F. gigantica* se lišily v 2,8% sekvencí, rozdíl mezi *F. hepatica* a *F. magna* byl 13,2% (Adlard et al. 1993).

Jelikož na morfologické úrovni (především u vývojových stádií) je často těžké rozlišit motolici *F. hepatica* od *F. magna*, bylo věnováno značné úsilí vývoji dostatečně citlivé a informativní metody rozlišující mezi výše zmíněnými druhy.

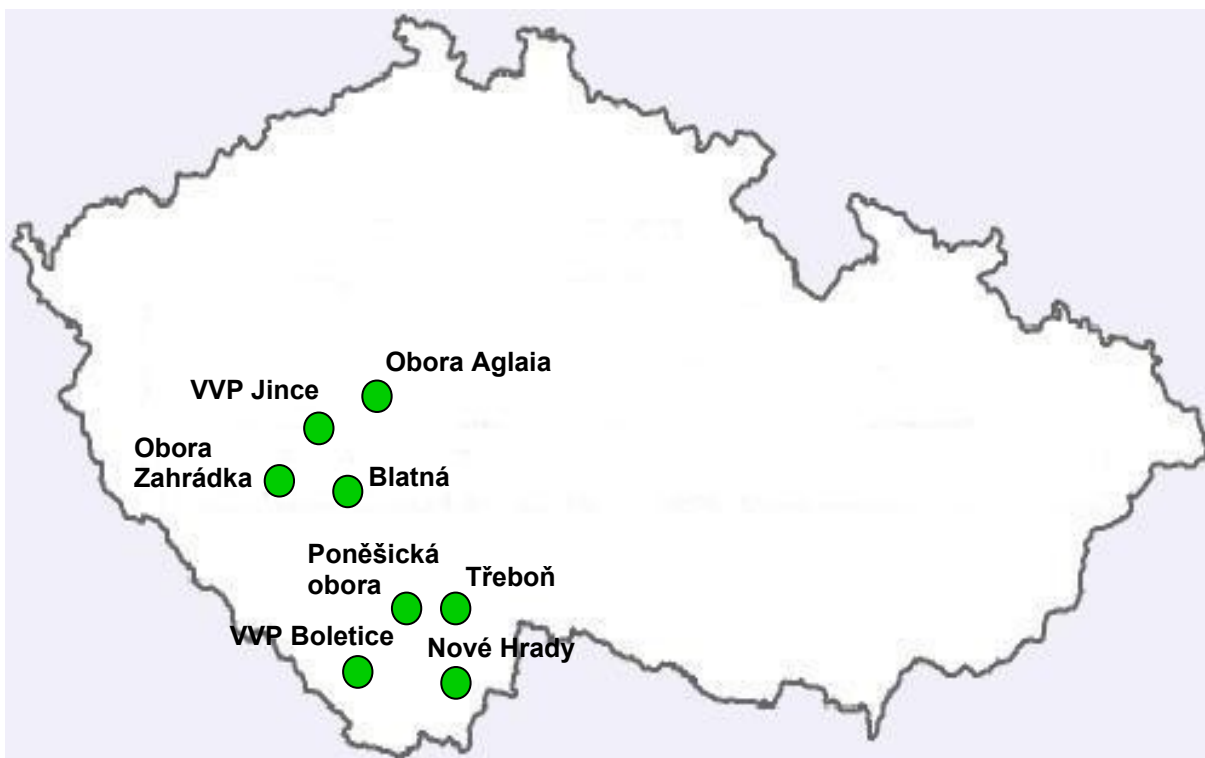
Rognlie et al. (1994) vyrobili DNA sondu, využívající reverzní polymerázovou řetězovou reakci (RT-PCR), vážící se na malou ribozomální podjednotku rRNA genu motolice *F. hepatica*, která však nebyla druhově specifická, neboť se vážala i na DNA motolice obrovské. Sondu specificky rozpoznávající pouze druh *F. hepatica* se podařilo vyvinout Kaplanovi et al. (1995). Jedná se o fragment (124 bazí) repetitivní DNA, který hybridizuje specificky s DNA motolice jaterní, nikoliv však DNA *F. magna* nebo DNA nebo meziphostitele. Vysokou citlivost této metody ověřili autoři i v praxi. Během dvouleté studie se jim podařilo prokázat 100% senzitivitu (metoda byla schopna detekovat i jediné miracidium *F. hepatica*) a více než 99% specificitu.

## 4. Metodika

### 4.1. Přehled lokalit

Studované lokality (mapa č.1) vybrané pro sběr měkkýšů se nacházejí v středních, jižních a západních Čechách. Jedná se lokality, u kterých byl potvrzen výskyt dospělců motolice *Fascioloides magna* (Novobilský et al. 2006).

Mapa č. 1. Přehled lokalit sběru měkkýšů.



#### 4.1.1. Obora Zahradka

Obora patří Lesům města Rokycan. Nachází se v západních Čechách u obce Sedliště, okres Plzeň-jih, v předhůří Brd, v nadmořské výšce 570 m. Její rozloha činí 40 ha. Převažuje zde smíšený les tvořený smrkem (*Picea abies*) a bukem (*Fagus silvatica*), který se střídá s lesními pastvinami. Oborou protékají dva potůčky hloubky do 30 cm, které ani v letním období nevysychají (obr. 1). Navíc oborou prochází menší odvodňovací kanál, který je při nedostatku srážek vyschlý. Vodoteče se ve svém průběhu větví a vytváří několik slepých ramen a dva malé rybníky. V celé oboře převládají vlhká, zastíněná místa. V oboře jsou od



roku 1994 chování daňci skvrnití (*Dama dama*). Současný stav zvěře je 5 kusů a od roku 2006 přibližně 30 kusů muflonů (*Ovis musimon*). Průměrná prevalence výskytu motolice obrovské u definitivních hostitelů je 85% (Novobilský et al. 2006). Byli zde nalezeni měkkýši 4 druhů.

**Obr. 1.** Obora Zahrádka – jeden ze dvou potoků protékající oborou.



#### **4.1.2. Poněšická obora**

Poněšická obora leží v Budějovické pánvi, na pravém břehu Vltavy, severně od Hluboké nad Vltavou. Zaujímá rozlohu 1960 ha a její průměrná nadmořská výška je 550 m. Lesní porost je převážně smíšený. Převládá zde buk lesní, dub letní (*Quercus robur*) a z jehličnanů dominují hlavně smrkové porosty. Zalesněné plochy se střídají s kultivovanými loukami (obr. 2) a lesními pastvinami.

Oborou protékají dva větší potoky, Bedrná (středem obory od severu k jihu) a Libochová (v dolním konci obory, východo-západně), v jejichž okolí se často vyskytují bažiny a slepá ramena sloužící ke kalištění zvěře. Dalšími vodními zdroji jsou Starý rybník (v jižní části obory), několik jezírek a řada malých potůčků po celé oboře (obr. 3).

Stav zvěře v současné době je 150 kusů jelení a kolem 100 kusů srnčí zvěře.

Byly zde nalezeny 4 druhy měkkýšů.

**Obr. 2.** Poněšická obora – jedna z luk sloužících k dokrmování zvěře.



**Obr. 3.** Poněšická obora – pramen Černého potoka (typická lokalita výskytu plže *Radix peregra*).



#### 4.1.3. Vojenský výcvikový prostor (VVP) Boletice

VVP Boletice se nachází v jižních Čechách, jihovýchodně od města Český Krumlov. Převážnou část území o rozloze 22 000 ha zaujímají jehličnaté lesy, které se střídají s loukami a pastvinami, často značně podmáčenými (obr. 4). Průměrná nadmořská výška je 700 m. Vodními zdroji jsou četné potoky a vodní nádrže soužící často jako vojenské cvičební plochy.

Měkkýši byli nalézáni převážně v blízkosti pramenišť potoků, v kalištích a loužích na podmáčených loukách či v okolí vodních nádrží.

Celkem zde bylo nalezeno 7 druhů měkkýšů.

**Obr. 4.** VVP Boletice – podmáčená louka.



#### 4.1.4. Vojenský výcvikový prostor (VVP) Jince

VVP Jince je poměrně rozsáhlé území o rozloze 26 000 ha zaujímající velkou část Brdské vrchoviny. Průměrná nadmořská výška je 700 m. Jedná se o z velké části zalesněné území s převahou jehličnanů (především smrku – 60% a borovice (*Pinus sylvestris*) – 30%). Četné jsou malé i větší vodní plochy (obr. 5), potoky a odvodňovací kanály a podmáčené louky. Lokality, na kterých byli sbíráni měkkýši, se většinou nacházely v blízkosti větších vodních ploch (slepá ramena, přítoky, odtoky) nebo se jednalo o vlhká místa v lesním porostu – prameniště, kaliště.

Byly zde nalezeny 3 druhy měkkýšů.

**Obr. 5.** VVP Jince – jedna z četných vodních ploch.



#### 4.1.5. Okolí Třeboně

Navštívené lokality jihovýchodně od města Třeboně se nacházejí v nadmořské výšce kolem 440 m. Jedná se o menší rybníky, potoky vytékající z rybníků či stoky a tůň v jejich okolí. Pro celou oblast je typický hojný výskyt močálů a bažin, které se střídají s poměrně hustým lesním porostem, kde převažují listnaté stromy s hojným vlhkomilným travním podrostem (obr. 6).

Na těchto lokalitách bylo nalezeno celkem 8 druhů měkkýšů.

**Obr. 6.** Okolí Třeboně – hustý lesní porost.



#### 4.1.6. Obora Aglaia

Obora se nachází ve středních Čechách jižně od hlavního města Prahy. Byla založena v 70. letech minulého století. Na rozloze 521 ha jsou chováni jelenci viržinskí, jejichž chov má na Dobříšsku dlouholetou tradici. První dovozy této zvěře ze Severní Ameriky jsou datovány do 50. let 19. století. Současný stav zvěře je přibližně 55 kusů. V oboře se střídají louky a

pastviny s lesním porostem (obr. 7), tvořeným převážně listnatými stromy s převahou dubu. Oborou protékají dva menší potoky. Dalšími vodními zdroji jsou malé rybníčky.

Celkem zde byly nalezeny 3 druhy měkkýšů.

**Obr. 7.** Obora Aglaia – pastvina.



#### **4.1.7. Zámecký park Blatná**

Jedná se o oboru – park o rozloze přibližně 40 ha, náležející k zámku Blatná. Jsou zde chováni daňci skvrnití v počtu asi 20 kusů. Vodními zdroji je soustava rybníků bohatě porostlých vodní vegetací obklopující téměř celý areál zámku a část parku. Parkem dále protékají dva menší potoky (obr. 8). Pro případné zachycení většího množství srážek je v celém areálu parku vybudována síť kamenných odvodňovacích kanálů. Listnaté lesní porosty se zde střídají s travnatými pastvinami (obr. 9). Lokalita se nachází v nadmořské výšce 500 m. Byly zde nalezeny 3 druhy měkkýšů.

**Obr. 8.** Zámecký park Blatná – jeden z potoků protékající oborou.



**Obr. 9.** Zámecký park Blatná – pastvina s pasoucími se daňky skvrnitými.



#### 4.1.8. Okolí Nových Hradů

Lokality v okolí Nových Hradů se nacházejí v nadmořské výšce kolem 480 m. Pro celé území je charakteristický výskyt mnoha rybníků a potoků, které jsou vzájemně propojené; převažuje zde lesní porost, a to jak smíšený, tak smrkový les. Měkkýši byli sbíráni na následujících lokalitách:

Dobrá Voda – potoky v lese západně od obce Jakule nedaleko závodu na výrobu pitné vody Dobrá Voda s bahnito-písčítým dnem o hloubce do 20 cm.

Jakule – potok severovýchodně od obce Jakule (naproti pile), z části zastíněný, s travnatými břehy. Dno je hlinito-písčité, hloubka do 20 cm.

Kapinus – Oborský rybník – strouha u Oborského rybníku u pštrosí farmy s bohatou vodní vegetací, z části zastíněná. Její hloubka dosahuje až 100 cm.

Byňov – podmáčená louka přiléhající k Byňovskému rybníku.

Na těchto lokalitách byli nalezeni měkkýši 7 druhů.

#### 4.2. Sběr a vyšetření měkkýšů

Měkkýši byli sbíráni od července roku 2004 do srpna roku 2006. Celkem bylo nasbíráno 6826 jedinců 14 druhů (tabulka 1). Jelikož druhové určení měkkýšů rodu *Radix* (především rozlišení druhů *R. labiata* (Rossmassler, 1835), *R. lagotis* (Schrank, 1803) a *R. peregra* (Müller, 1774)) na našem území je stále nejasné (řešením tohoto problému se zabývají studenti PřF UK), budu v této práci, z důvodu zachování kontinuity a souladu s ostatními autory, užívat pro měkkýše rodu *Radix* (s výjimkou *R. auricularia*, dobře odlišitelného na základě morfologie ulity) souhrnné pojmenování *Radix peregra*.

Měkkýši byli sbíráni ručně z bahnitého dna, kamenů a volně plovoucích rostlin, případně byli z rostlin seškrabováni cedníkem. Převážování byli v plastových nádobkách a v laboratoři byli následně umístěni do kádinek nebo lékovek s odstátou vodou. Přes noc byli měkkýši nasvíceni stolní lampou kvůli stimulaci pozitivně fototaktických cercárií (vyplouvací metoda).

Vyplavané cercárie byly pozorovány pod světelným mikroskopem (Olympus BX51). Část cercárií byla fixována horkým 4% roztokem formaldehydu pro další morfologické studium a měření, část byla fixována čistým alkoholem pro následné molekulární studium.

Pro zjištění všech vývojových stádií byli všichni měkkýši pitváni pod binokulární lupou. Zjištěná vývojová stadia byla izolována, poté pozorována ve světelném mikroskopu a část fixována 4% horkým roztokem formaldehydu nebo čistým alkoholem. Morfologie všech



larválních stádií byla studována na dočasných preparátech a na fixovaných jedincích. Pomocí kreslicího zařízení byly zhotoveny jejich nákresy. Fotografie larválních stádií byly zhotoveny pomocí digitální kamery Olympus DP70 a programu Quick PHOTO MICRO 2.1. (PROMICRA) Měření byla prováděna na fixovaných jedincích; měřeno bylo vždy 20 jedinců, rozměry jsou uvedeny v mikrometrech.

**Tabulka 1.** Přehled počtu měkkýšů na jednotlivých lokalitách.

Čeď	Druh měkkýše	Obora Zahrádka	Poněšická obora	VVP Boletice	VVP Jince	Okolí Třeboně	Okolí Nových Hradů	Obora Aglaia	Blatná	Celkem
Lymnaeidae	<i>Galba truncatula</i> (Müller, 1774)	442	83	637	108	11	1	46		<b>1328</b>
	<i>Lymnaea stagnalis</i> (Linnaeus, 1758)			52		1	6			<b>59</b>
	<i>Radix ampla</i> (Hartmann, 1841)								12	<b>12</b>
	<i>Radix auricularia</i> (Linnaeus, 1758)	5	13			6				<b>24</b>
	<i>Radix peregra</i> (Müller, 1774)	969	2465	924	467	1	9	68	18	<b>4921</b>
	<i>Stagnicola palustris</i> (Müller, 1774)						6			<b>6</b>
Planorbidae	<i>Anisus leucostomus</i> (Miller, 1813)			30						<b>30</b>
	<i>Bathyomphalus contortus</i> (Linnaeus, 1758)					65				<b>65</b>
	<i>Gyraulus albus</i> (Müller, 1774)	10	12	44				27		<b>93</b>
	<i>Planorbarius corneus</i> (Linnaeus, 1758)			2			8			<b>10</b>
	<i>Segmentina nitida</i> (Müller, 1774)					4				<b>4</b>
Physidae	<i>Physa acuta</i> (Draparnaud, 1805)					57				<b>57</b>
	<i>Physa fontinalis</i> (Linnaeus, 1758)						16			<b>16</b>
Sphaeriidae	<i>Pisidium casertanum</i> (Poli, 1791)			30	6	155	9		1	<b>201</b>

### 4.3. Experimentální nákazy

Vajíčka motolice obrovské použita k experimentálním nálezům byla získána pitvou jater dvou odstřelených kusů jelení zvěře ve VVP Jince. V říjnu 2004 se jednalo o jelena evropského odstřeleného nedaleko obce Jince a na podzim roku 2005 o laň jelena evropského odstřelenou na území náležící k obci Mirošov. Vajíčka byla zbavena zbytků jaterní tkáně opakovaným propláchnutím odstátou vodou. Vajíčka byla následně kultivována v Petriho miskách o průměru 7,5 cm s odstátou vodovodní vodou při laboratorní teplotě 22-26°C. Výška sloupce vody kolísala mezi 1-1,5 cm. Voda byla pravidelně vyměňována.

K experimentálním nálezům byli použiti měkkýši druhu *Radix peregra* (Müller, 1774) (celkem 1457 kusů) a jako kontrolní skupina plži *Galba truncatula* (Müller, 1774) (21 kusů). Plži *R. peregra* pocházeli z Poněšické obory a z laboratorního chovu, měkkýši *G. truncatula* z lokalit VVP Boletice. Všichni měkkýši použiti k nálezům byli prosti přirozené nákazy. Dospělí jedinci druhu *G. truncatula* byli vyšetřeni na přítomnost cercárií motolic vyplouvací metodou, zatímco u jedinců druhu *R. peregra* byla absence přirozené nákazy zaručena stářím, resp. původem jedinců (k nálezům byli použiti pouze jedinci vylíhlí v laboratoři).

K pokusům byli použiti dospělí i juvenilní jedinci plže *R. peregra* (tabulka 2). U druhu *G. truncatula* se jednalo převážně o dospělé jedince velikosti 3-7 mm.

Vylíhlá, volně plovoucí miracidia motolice obrovské byla přenesena (v počtu 3-40 miracidii/měkkýše) Pasteurovou pipetou do Petriho misky o průměru 2 cm s odstátou vodou a následně k nim byli přidáni měkkýši. Po 1-5 hodinách byli měkkýši přeneseni do označených kádinek s odstátou vodou a udržováni v teplotě 17°C. Měkkýši byli pravidelně krmeni listy hlávkového salátu a byla jim pravidelně vyměňována voda.

Pro zjištění úspěšnosti nákazy byli plži vyšetřeni vyplouvací metodou. Následně byli všichni přeživší měkkýši vypitváni (viz tabulka 2). Nalezená vývojová stádia byla pozorována pod světelným mikroskopem, případně prokreslena pomocí kreslicího zařízení a fixována čistým alkoholem či 4% horkým roztokem formaldehydu.

**Tabulka 2.** Přehled měkkýšů experimentálně nakažených miracidii motolice *Fascioloides magna*.

Druh měkkýše	Počet použitých měkkýšů	Velikost (mm)	Infekční dávka (miracidia)	Doba expozice (hodiny)	Pitva (dny po nákaze)
<i>Radix peregra</i>	29	1,5-15	10-40	1	54, 70, 116
<i>Radix peregra</i>	222	1-6	3-5	2-5	35-131
<i>Radix peregra</i>	1206	1-8	3	2-3	118-235
<i>Galba truncatula</i>	21	3-7	3	2	37, 105, 113

#### 4.4. Molekulární metody

##### 4.4.1. Biologický materiál

K analýze byla použita genomová DNA izolovaná z dospělého druhu *Fascioloides magna*. Motolice byla získána z jater experimentálně nakažené kozy domácí (*Capra hircus*).

##### 4.4.2. Izolace DNA

K izolaci DNA byl použit vzorek fixovaný v 96% etanolu. Po vysušení (12 hodin při 37°C) byla celková DNA extrahována pomocí komerčního kitu JETQUICK Tissue DNA Spin Kit firmy GENOMED dle návodu výrobce.

##### 4.4.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Gen kódující RNA malé ribozomální podjednotky (18S) byl amplifikován metodou PCR za použití následujících primerů: 18S-E forward

5' - CCGAATTCGTCGACAACCTGGTTGATCCTGCCAGT - 3' a Worm-B reverse

5' - CTTGTTACGACTTTTACTTCC - 3' (Littlewood a Olson 2001). Celkem 25 µl reakční směsi připravené do 0,5 ml eppendorfek obsahovalo 2,5 µl 10x Taq PCR pufru (Top-Bio), 1 µl 2,5 mM DTP (Top-Bio), 0,5 µl (koncentrace 100 pmol/µl) forward a 0,5 µl (koncentrace 100 pmol/µl) reverse primeru, 0,2 µl Taq DNA polymerázy (Top-Bio), 2 µl genomové DNA a 18,3 µl sterilní bidestilované vody.

Amplifikace genu byla prováděna v přístroji T3 Thermocycler (Biomera) za následujících podmínek: počáteční denaturace při 95°C trvala 5 minut a byla následována 30 cykly 94° C (1 min), 54°C (1 min), 72°C (2 min). Závěrečná elongace trvala 10 minut při 72°C.

#### 4.4.4. Agarózová elektroforéza

PCR produkty byly rozděleny na 1% agarózovém gelu (Sambrook et al. 2001). Gel byl připraven rozmícháním agarózy v 0,5 x TAE pufru (242 TRIS; 57,1 ml kyseliny octové; 100 ml 0,5 M EDTA; 1000 ml vody; pH = 8,0) a rozvařením v mikrovlnné troubě. Po ochlazení zhruba na 50°C byl nalit do připravené formy s vloženým hřebenem a ponechán přibližně 20 minut tuhnout. Ztuhlý gel byl vložen do elektroforetického tanku a přelit puftrem (0,5 x TAE). Do vzniklých jamek bylo nanášeno 25 µl vzorku. Pro odečtení velikosti produktu byl použit marker 2-Log DNA Ladder (New England Biolabs, Inc.). Elektroforéza probíhala při napětí 70 V po dobu 35-45 minut. Přítomnost produktu byla detekována na UV transiluminátoru (TFX-35.M Viber Lourmat). Fotodokumentace gelů byla pořizována pomocí digitální kamery a počítačového programu Kodak Digital Science 1D.

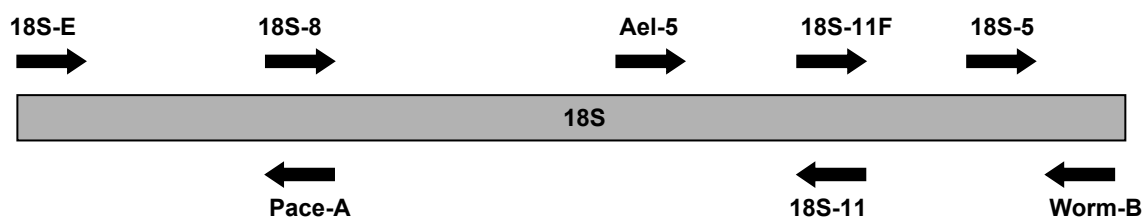
#### 4.4.5. Izolace DNA z gelu

Požadovaný PCR produkt byl vyříznut z gelu pomocí skalpelu. DNA byla z gelu izolována pomocí komerčního kitu QIAquick Gel Extraction Kit firmy QIAGEN dle návodu výrobce.

#### 4.4.6. Sekvenování

Vybraný úsek DNA byl sekvenován pomocí automatického sekvenátoru CEQ<sup>TM</sup> 8000 (Beckman Coulter) v Laboratoři genomiky Biologického centra AV ČR. Pro sekvenování byly použity oligonukleotidové primery 18S-E forward, Worm-B reverse a vnitřní primery 18S-8, Ael-5, 18S-11F, 18S-5, 18S-11 a Pace-A převzaté z práce Littlewooda a Olsona (2001). Primery byly vybrány tak, aby získané sekvence pokryly celý gen v obou směrech (obr. 10).

**Obr. 10.** Schéma pořadí primerů.



Sekvenační reakční směs obsahovala 6  $\mu$ l 2,5x sekvenačního pufru, 2  $\mu$ l směsi nukleotidů DTCS, 1  $\mu$ l primeru (koncentrace 100 pmol/ $\mu$ l), 5  $\mu$ l DNA a byla doplněna sterilní bidestilovanou vodou do objemu 20  $\mu$ l. Sekvenční reakce byla prováděna na přístroji T3 Thermocycler (Biometra) za následujících podmínek: 96°C (20 s), 54°C (20 s), 60°C (4 min). Tento cyklus byl během reakce zopakován třicetkrát.

Před vlastním sekvenováním byly k reakční směsi přidány 2  $\mu$ l 100 mM EDTA a následně byla celá směs přečištěna Sephadexem.

#### 4.4.7. Analýza sekvencí

Kontrolní identifikace sekvencí byla provedena pomocí databáze NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Fragменты byly kompletovány v programu SeqMan (DNASar), zatímco alignment byl vytvořen pomocí programu Clustal W (Thompson et al. 1994) a následně editován pomocí BioEdit (Hall 1999).

Jako nejvhodnější substituční model byl na základě hodnoty Akaike Information Criterion (AIC) pomocí MODELTESTu (Posada and Crandall 1998) vybrán General time-reversible (Waddell and Steel 1997) model s gamma distribucí v 8 kategoriích (GTR+ $\Gamma_8$ +I) a invarianty. Na základě parametrů navržených MODELTESTem byl metodou maximální věrohodnosti (maximum likelihood, ML) v programu PAUP\* 4.10b (Swofford 1998) zkonstruován fylogram s maximální hodnotou logLk. Bootstrapová podpora jednotlivých větví byla vypočtena na základě 1000 opakování metodou ML (PhyML, výše uvedený model) a maximální parsimonie (MP, PAUP\* 4.10b) za použití heuristického algoritmu TBR a náhodného přidávání sekvencí. Údaje o všech použitých sekvencích získaných z Genové banky (GenBank) jsou shrnuty v tabulce 3.

**Tabulka 3.** Sekvence 18S rDNA získané z Genové banky a použité v této práci.

Čeleď	Druh	Číslo v genové bance
Fasciolidae	<i>Fasciola hepatica</i>	AJ004969
	<i>Fasciola gigantica</i>	AJ011942
	<i>Fasciolopsis buski</i>	L06668
Echinostomatidae	<i>Echinostoma caproni</i>	L06567
	<i>Echinostoma revolutum</i>	AY222132
	<i>Drepanocephalus spathans</i>	AY245762
	<i>Euparyphium melis</i>	AY222131
	<i>Mesorchis denticulatus</i>	AY245768
	<i>Paryphostomum radiatum</i>	AY245708
	<i>Petasiger phalacrocoracis</i>	AY245709
	<i>Microparyphium</i> sp.	AY245758
Psilostomatidae	<i>Psilochasmus oxyurus</i>	AY222135

## 5. Výsledky

### 5.1. Výskyt vývojových stádií motolic v mezihostitelích na sledovaných lokalitách

Larvální stádia motolice *Fascioloides magna* byla nalezena na dvou z osmi sledovaných lokalit. V oboře Zahradka byly nalezeny rédie a cercárie motolice *F. magna* ve 20 plžích *Galba truncatula* (4,5%). Redie *F. magna* byly nalezeny u 2 plžů *R. peregra* (0,2%) (tabulka 7). Ve VVP Jince byly nalezeny současně rédie a cercárie *F. magna* u 3 plžů druhu *R. peregra* (1,4%) (tabulka 5).

Na sledovaných lokalitách bylo kromě vývojových stádií *F. magna* nalezeno celkem dalších 15 druhů motolic v 328 (4,8%) měkkýších 9 druhů. Nejčastějšími druhy byly *Plagiorchis neomidis* Brendow, 1970 (2,9%) a *Haplometra cylindracea* (Zeder, 1800) (1,0%).

Nákresy larválních stádií motolic, u nichž bylo možné získat údaje o jejich morfologii, jsou na obrázcích 11 a 12. U dalších druhů byl jejich počet příliš nízký nebo byly vzhledem k úhynu mezihostitele ve špatném stavu.

Největší druhová bohatost motolic byla zaznamenána na lokalitách VVP Boletice a VVP Jince (tabulky 4, 5), kde byly nakaženy 3, resp. 2 druhy měkkýšů 6 druhy rédií a cercárií. V Poněšické oboře bylo nalezeno 5 druhů cercárií (tabulka 6), stejně jako v oboře Zahradka (tabulka 7). Na lokalitách v okolí Nových Hradů, v okolí Třeboně a v oboře Aglaia byla zaznamenána nákaza 2 druhy motolic (tabulky 8-10). V zámeckém parku Blatná nebyla nalezena žádná vývojová stádia motolic.

**Tabulka 4.** Přehled výskytu larválních stádií motolic ve VVP Boletice.

Druh motolice	Vývojové stádium	Mezihostitel	Vyšetřených	Nakažených	Prevalence (%)
<i>Australapatemon minor</i> Yamaguti, 1933	cercárie	<i>Gyraulus albus</i>	44	1	2,3
<i>Asymphylogora</i> sp. 1	rédie	<i>Radix peregra</i>	924	3	0,3
<i>Haplometra cylindracea</i> (Zeder, 1800)	cercárie	<i>Galba truncatula</i>	637	2	0,3
	rédie	<i>Galba truncatula</i>	637	1	0,2
<i>Notocotylus</i> sp.	cercárie	<i>Galba truncatula</i>	637	1	0,2
<i>Paramphistomum</i> sp.	rédie	<i>Gyraulus albus</i>	44	2	4,6
<i>Plagiorchis neomidis</i> Brendow, 1970	cercárie	<i>Radix peregra</i>	924	12	1,3
	rédie	<i>Radix peregra</i>	924	1	0,1
<b>Celkem</b>			<b>1718</b>	<b>23</b>	<b>1,3</b>

**Tabulka 5.** Přehled výskytu larválních stádií motolic ve VVP Jince.

Druh motolice	Vývojové stádium	Mezihostitel	Vyšetřených	Nakažených	Prevalence (%)
<i>Austalapatemon burti</i> (Miller, 1923)	cerkárie	<i>Radix peregra</i>	367	1	0,3
<i>Fascioloides magna</i> (Bassi, 1875)	rédié+cerkárie	<i>Radix peregra</i>	367	3	0,8
<i>Haplometra cylindracea</i> (Zeder, 1800)	cerkárie	<i>Galba truncatula</i>	108	6	5,6
	cerkárie	<i>Radix peregra</i>	367	19	5,2
<i>Echinoparyphium recurvatum</i> (Linstow, 1873)	cerkárie	<i>Radix peregra</i>	367	15	4,1
	metacerkárie	<i>Radix peregra</i>	367	1	0,3
<i>Plagiorchis neomidis</i> Brendow, 1970	cerkárie	<i>Radix peregra</i>	367	54	14,7
	metacerkárie	<i>Radix peregra</i>	367	5	1,4
<i>Trichobilharzia regenti</i> Horák, Kolářová et Dvořák, 1998	cerkárie	<i>Radix peregra</i>	367	1	0,3
<b>Celkem</b>			<b>481</b>	<b>105</b>	<b>21,8</b>

**Tabulka 6.** Přehled výskytu larválních stádií motolic v Poněšické oboře.

Druh motolice	Vývojové stádium	Mezihostitel	Vyšetřených	Nakažených	Prevalence (%)
<i>Echinostoma revolutum</i> (Frölich, 1802)	cerkárie	<i>Radix auricularia</i>	13	2	15,4
<i>Haematoloechus</i> sp. ( <i>variegatus?</i> )	cerkárie	<i>Gyraulus albus</i>	12	3	25,0
<i>Haplometra cylindracea</i> (Zeder, 1800)	cerkárie	<i>Radix peregra</i>	2465	7	0,3
<i>Plagiorchis neomidis</i> Brendow, 1970	cerkárie	<i>Radix peregra</i>	2465	72	2,9
<i>Trichobilharzia franki</i> Müller a Kimming, 1994	cerkárie	<i>Radix auricularia</i>	13	2	15,4
<b>Celkem</b>			<b>2573</b>	<b>86</b>	<b>3,3</b>

**Tabulka 7.** Přehled výskytu larválních stádií motolic v oboře Zahrádka.

Druh motolice	Vývojové stádium	Mezihostitel	Vyšetřených	Nakažených	Prevalence (%)
<i>Echinoparyphium recurvatum</i> (Linstow, 1873)	cerkárie	<i>Radix peregra</i>	969	1	0,1
<i>Fascioloides magna</i> (Bassi, 1875)	rédié	<i>Radix peregra</i>	969	2	0,2
	rédié	<i>Galba truncatula</i>	442	18	4,1
	rédié+cerkárie	<i>Galba truncatula</i>	442	2	0,5
<i>Haplometra cylindracea</i> (Zeder, 1800)	cerkárie	<i>Galba truncatula</i>	442	10	2,3
	cerkárie	<i>Radix peregra</i>	969	23	2,4
<i>Paryphostomum</i> sp.	rédié	<i>Radix peregra</i>	969	2	0,2
<i>Plagiorchis neomidis</i> Brendow, 1970	cerkárie	<i>Radix peregra</i>	969	52	5,4
	metacerkárie	<i>Radix peregra</i>	969	1	0,1
<b>Celkem</b>			<b>1426</b>	<b>121</b>	<b>8,5</b>



**Tabulka 8.** Přehled výskytu larválních stádií motolic v okolí Nových Hradů.

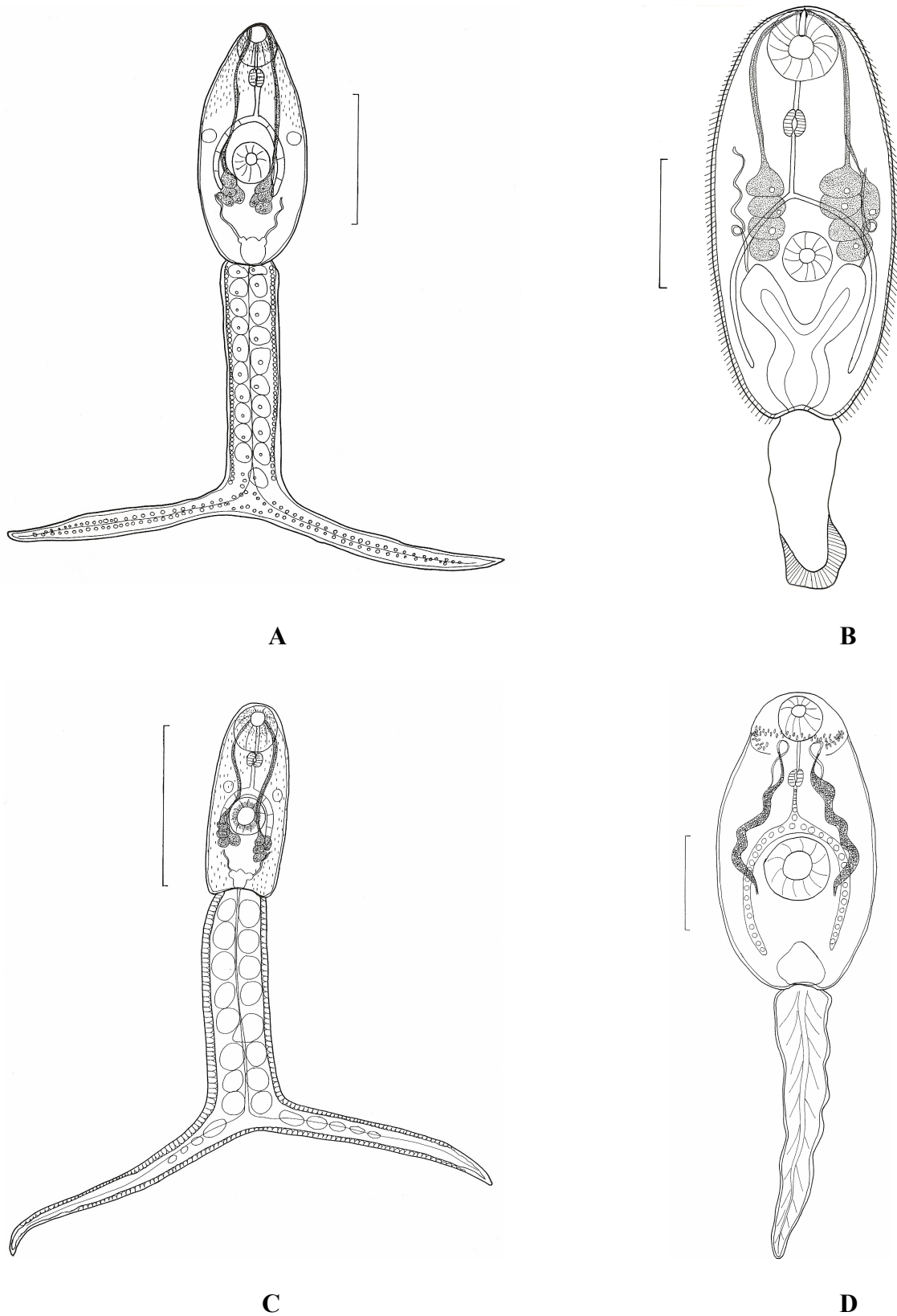
Druh motolice	Vývojové stádium	Mezihostitel	Vyšetřených	Nakažených	Prevalence (%)
<i>Notocotylus attenuatus</i> (Rudolphi, 1809)	cerkárie	<i>Stagnicola palustris</i>	6	1	16,7
	rédie	<i>Lymnaea stagnalis</i>	6	1	16,7
<i>Notocotylus</i> sp.	rédie	<i>Physa fontinalis</i>	16	1	6,3
<b>Celkem</b>			<b>56</b>	<b>3</b>	<b>5,4</b>

**Tabulka 9.** Přehled výskytu larválních stádií motolic v okolí Třeboně.

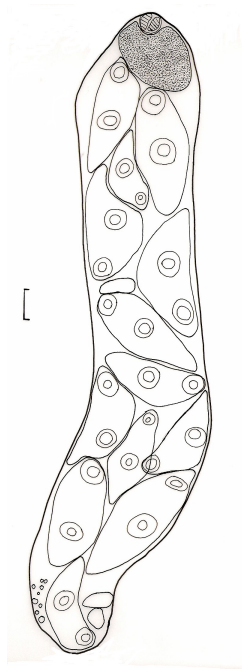
Druh motolice	Vývojové stádium	Mezihostitel	Vyšetřených	Nakažených	Prevalence (%)
<i>Haematoloechus</i> sp. ( <i>variegatus</i> ?)	cerkárie	<i>Bathymophalus contortus</i>	65	1	1,5
<i>Paramphistomum</i> sp.	rédie+cerkárie	<i>Physa acuta</i>	57	1	1,8
<b>Celkem</b>			<b>294</b>	<b>2</b>	<b>0,7</b>

**Tabulka 10.** Přehled výskytu larválních stádií motolic v oboře Aglaia.

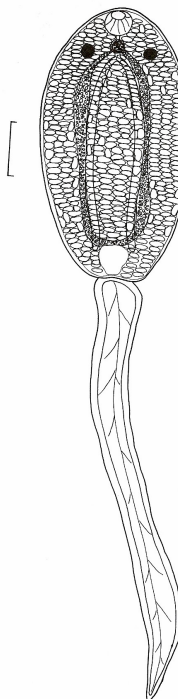
Druh motolice	Vývojové stádium	Mezihostitel	Vyšetřených	Nakažených	Prevalence (%)
<i>Australapatemon burti</i> (Miller, 1923)	cerkárie	<i>Gyraulus albus</i>	27	1	3,7
<i>Haplometra cylindracea</i> (Zeder, 1800)	cerkárie	<i>Galba truncatula</i>	46	1	2,2
	cerkárie	<i>Radix peregra</i>	68	1	1,5
<b>Celkem</b>			<b>142</b>	<b>3</b>	<b>2,1</b>



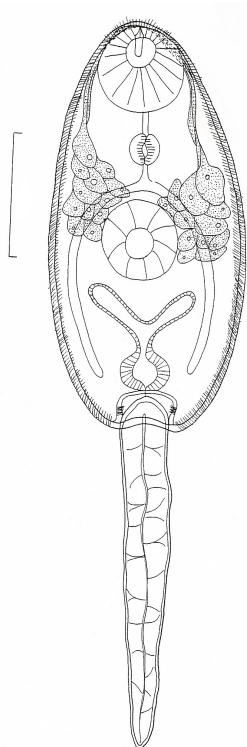
**Obr. 11.** **A** – *Australapatemon burti* (*Radix peregra*, VVP Jince), **B** – *Haematoloechus* sp. (*variegatus*?) (*Gyraulus albus*, Poněšická obora), **C** – *Australapatemon minor* (*Gyraulus albus*, VVP Boletice), **D** – *Echinoparyphium recurvatum* (*Radix peregra*, VVP Jince), měřítko 100  $\mu$ m.



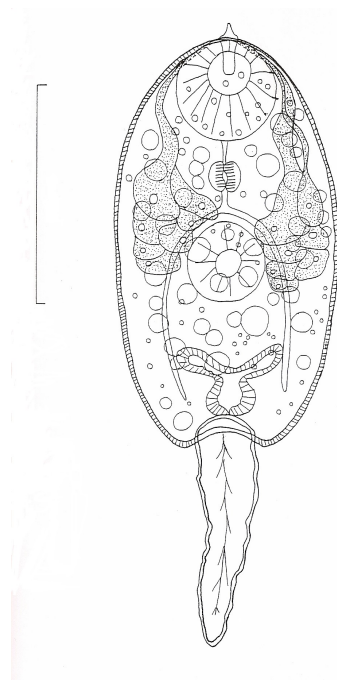
**A**



**B**



**C**



**D**

**Obr. 12.** **A** – *Asymphyrodora* sp.1 (*Radix peregra*, VVP Boletice), **B** – *Notocotylus attenuatus* (*Lymnaea stagnalis*, okolí Nových Hradů), **C** – *Haplometra cylindracea* (*Radix peregra*, obora Zahrádka), **D** – *Plagiorchis neomidis* (*Radix peregra*, Poněšická obora), měřítko 100  $\mu$ m.

### 5.1.1. Popisy nalezených larválních stádií motolice *Fascioloides magna*

**Rédie *Fascioloides magna*** (Bassi, 1875) (obr.13)

Mezihostitelé: *Galba truncatula* (1,4%)

*Radix peregra* (0,04%)

Morfologie: Tělo rédií je protáhlého tvaru. V přední části se nachází výrazný svalnatý hltan (u dceřiných rédií menších rozměrů). Za ním je (u mateřských rédií) dobře patrný kruhový límec. Střevo je vakovité, slepě zakončené, dosahující do třetiny až poloviny těla rédie. Obsah střeva má nazelenalou barvu. V zadní části těla se nachází dvojice lokomočních výběžků. Tělo rédie obsahuje zárodečné koule nebo již vyvinuté cercárie (dceřiné rédie) s dobře viditelnými tmavými cystogenními buňkami.

Poznámka: Morfologie rédií se shoduje s popisy uvedenými v práci Erhardové-Kotrlé (1971).

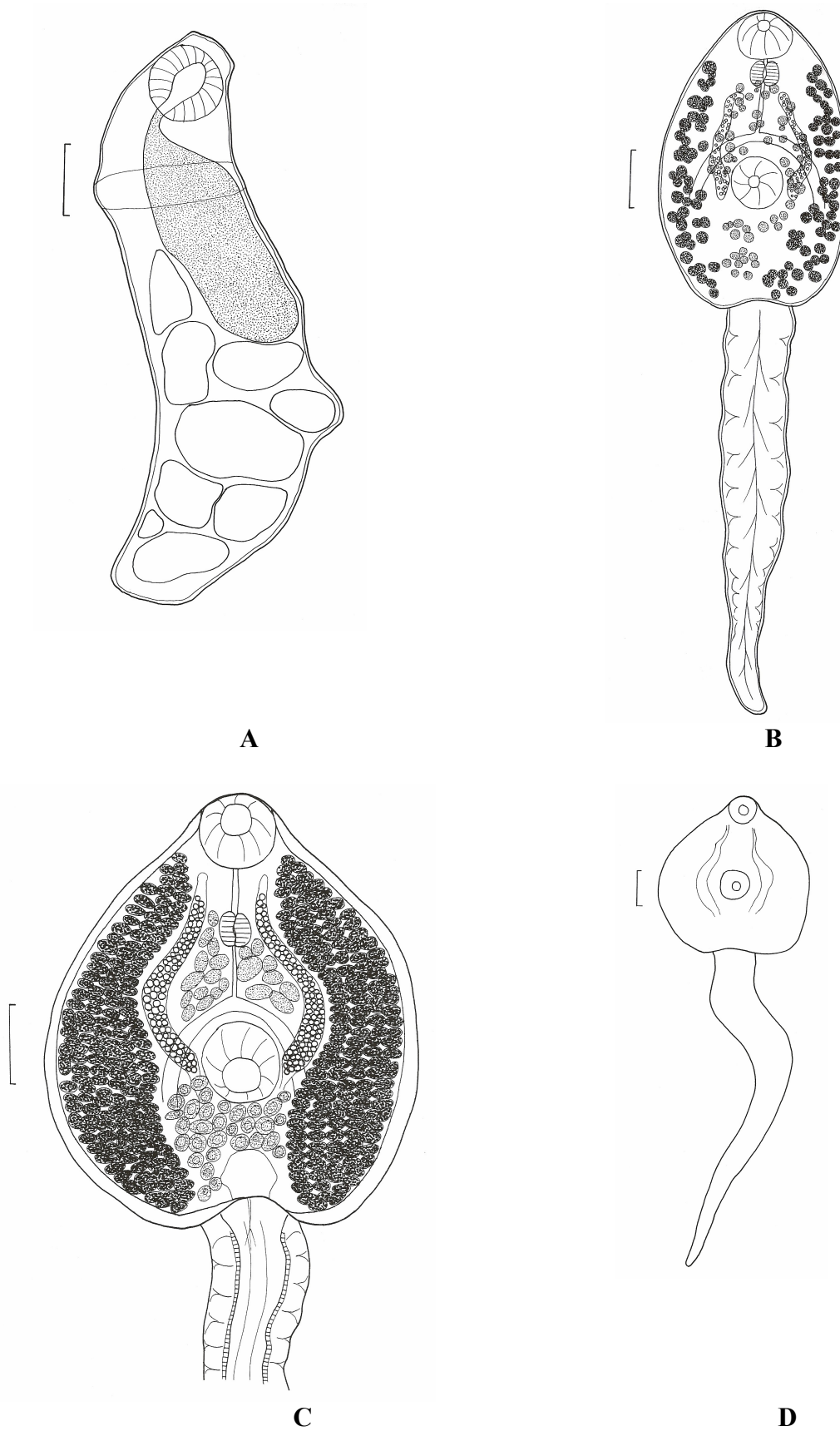
**Cercárie *Fascioloides magna*** (Bassi, 1875) (obr. 13)

Mezihostitelé: *Galba truncatula* (0,2%)

*Radix peregra* (0,06%)

Morfologie: Tělo cercárie protáhle kulovité, 195-304 (242) dlouhé, 188-276 (227) široké. Očásek delší než tělo, 791-956 (832) dlouhý, 42-78 (63) široký. Ústní přísavka menší než břišní, průměr 42-66 (55). Břišní přísavka ve středu těla, průměr 43-74 (53). Předhltan krátký, hltan svalnatý, jícen krátký, před břišní přísavkou se rozděluje na dvě slepé střevní větve, které nejsou kvůli přítomnosti četných žláz vidět. Exkretční měchýř dvoudílný, kulovitý; součástí exkretčního systému laterální sběrné kanály, od ústní k břišní přísavce naplněné nápadnými světlolomnými granuly. Základy pohlavních orgánů, tmavě zbarvené buňky mezi hltanem a břišní přísavkou, mezi břišní přísavkou a koncem těla tmavě zbarvené buňky neznámého určení. Po stranách těla tmavě zbarvené cystogenní žlázové buňky.

Poznámka: Cercárie svou morfologií odpovídá popisu Erhardové-Kotrlé (1971).



**Obr. 13.** *Fascioloides magna* **A** – materská rédie (*Radix peregra*, obora Zahrádka), **B** – nezralá cercárie (*Galba truncatula*, obora Zahrádka), **C**, **D** – zralá cercárie (*Galba truncatula*, obora Zahrádka), měřítko 100  $\mu$ m.

## 5.2. Experimentální nákazy

Oba druhy pokusných plžů byly úspěšně nakaženy miracidii motolice *Fascioloides magna*. Z celkového počtu 310 vyšetřených plžů *Radix peregra* bylo 130 (42%) plžů infikovaných, z 10 plžů *Galba truncatula* byla úspěšná nákaza pozorována u 7 (70%) plžů (tabulka 11). V *Radix peregra* se motolice vyvinula až do stádia plně vyvinutých cercárií, které byly poprvé pozorovány 119. den po nákaze. Tyto cercárie ovšem po stimulaci světlem a teplem samovolně neopouštěly tělo plže. Mateřské rédie *F. magna* byly u plžů *R. peregra* pozorovány už 35. den po nákaze. Infekce plžů *R. peregra* byla úspěšná jen u juvenilních jedinců (1-8 mm). Rovněž v plži *Galba truncatula* byly 105. den po nákaze pozorovány plně vyvinuté cercárie, které, stejně jako u plže *R. peregra*, po stimulaci světlem a teplem samovolně neopouštěly tělo plže. Pozorovaná vývojová stádia motolice *F. magna* (obr. 14) se ve své morfologii shodovala s vývojovými stádii nalezenými v mezihostitelích v přírodě.

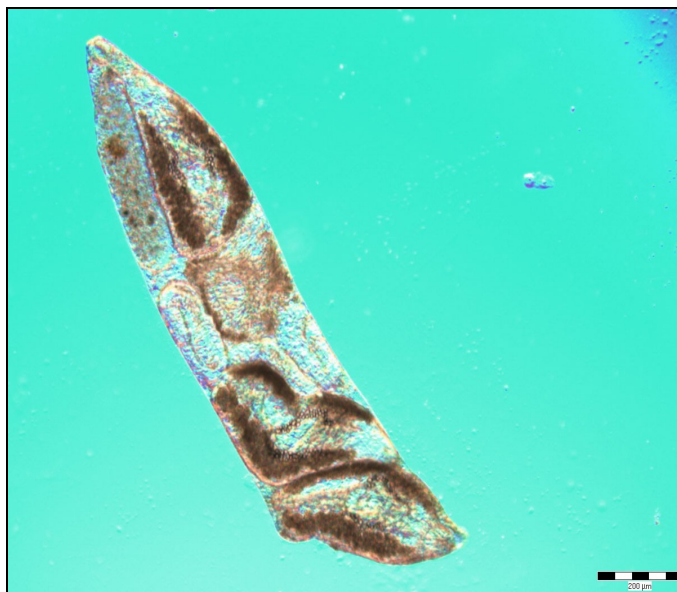
**Tabulka 11.** Výsledky experimentální nákazy měkkýšů miracidii motolice obrovské (*Fascioloides magna*).

Druh měkkýše	Velikost (mm)	Počet použitých měkkýšů	Počet vyšetřených měkkýšů	Pozitivní	Rédie	Cercárie
<i>Radix peregra</i>	1,5-15	29	28	0	-	-
<i>Radix peregra</i>	1-6	222	152	63	60	3
<i>Radix peregra</i>	1-8	1206	130	67	13	54
<i>Galba truncatula</i>	3-7	21	10	7	3	4

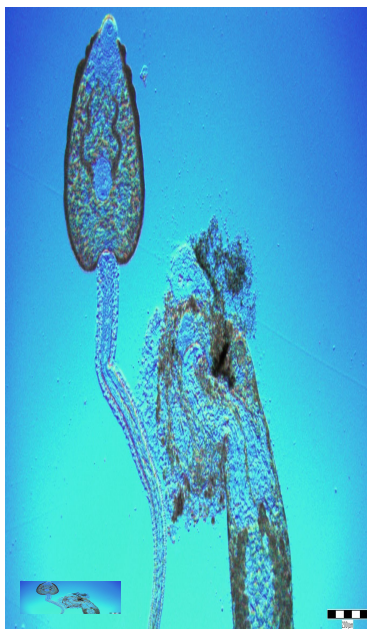
**Obr. 14.** Vývojová stádia motolice *Fascioloides magna* získaná experimentální nákazou měkkýše *Radix peregra*. **A** – mateřská rédie, **B** – dceřiná rédie s vyvinutými cercáriemi, **C** – nedospělá cercárie, **D** – dospělá cercárie.



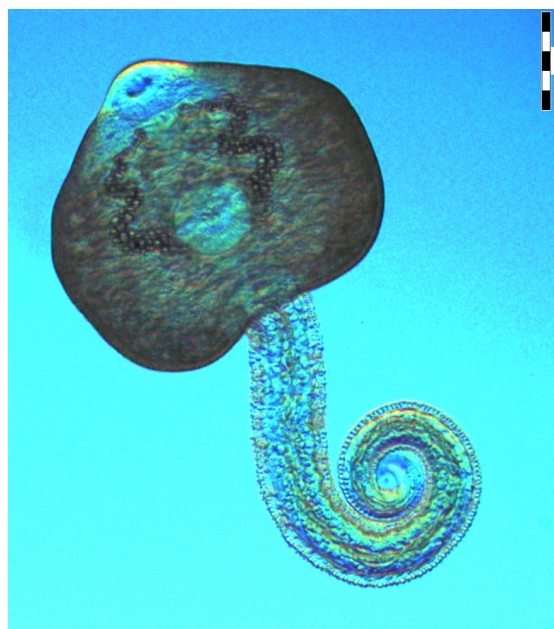
**A**



**B**



**C**



**D**

### 5.3. Molekulární charakterizace

Byl získán 1940 bp dlouhý úsek 18S rRNA genu motolice *Fascioloides magna*. Sekvence byla uložena v genové bance (GeneBank) pod číslem EF534989. Porovnáním této sekvence se sekvencí 18S rRNA genu motolice *Fasciola hepatica* (Accession No. AJ004969; Fernandez et al. 1998) byla zjištěna podobnost 99,1%. Sekvence obou druhů se lišily 2 delecemi a 15 nukleotidovým substitucemi v sekvenci *F. magna* (obr.15).

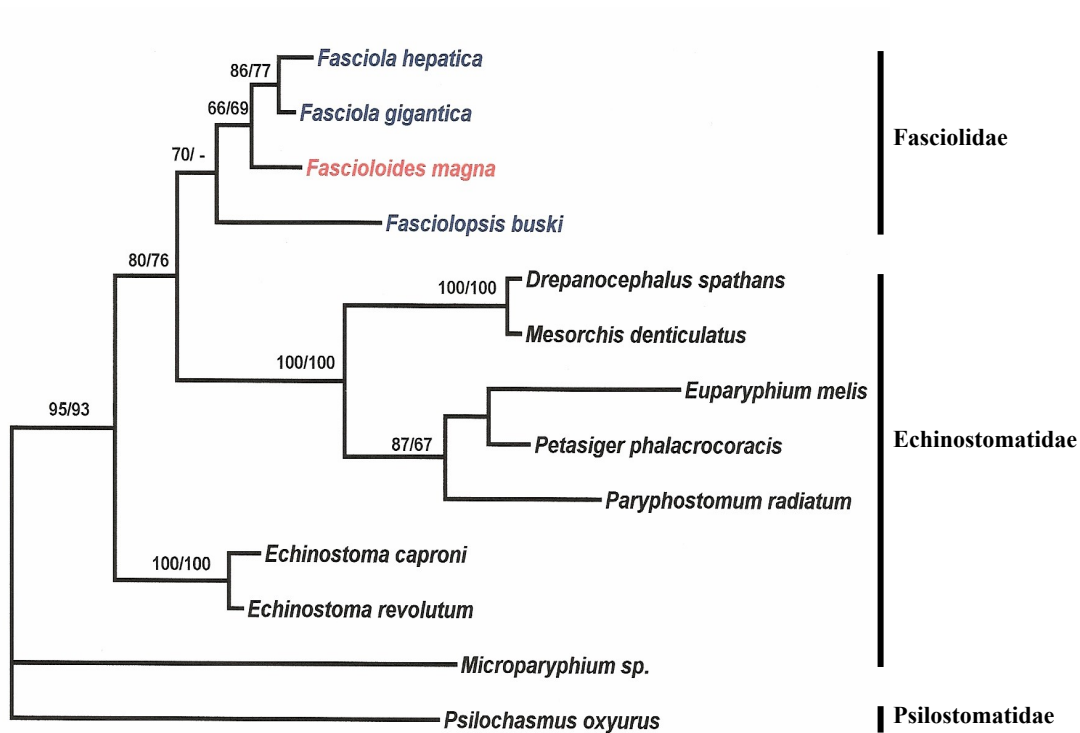
**Obr 15.** Nukleotidová divergence mezi genem 18S rRNA *Fascioloides magna* a *Fasciola hepatica*.

<b>pozice</b>	<b>14</b>	<b>167</b>	<b>291</b>	<b>330</b>	<b>616</b>	<b>684</b>	<b>691</b>	<b>772</b>	<b>773</b>
<i>F. magna</i>	-	A	C	T	A	A	C	T	C
<i>F. hepatica</i>	C	G	T	C	C	G	T	C	T
<b>pozice</b>	<b>782</b>	<b>809</b>	<b>1182</b>	<b>1234</b>	<b>1677</b>	<b>1881</b>	<b>1935</b>	<b>1936</b>	
<i>F. magna</i>	-	A	C	G	T	C	A	A	
<i>F. hepatica</i>	T	T	T	A	C	T	G	T	

Přidáním sekvencí 18S rRNA genu dalších motolic z čeledi Fasciolidae, Echinostomatidae a Psilostomatidae dostupných v Genové bance byla vytvořena matice o celkem 13 sekvencích. Jako outgroup byl zvolen druh *Psilochasmus oxyurus* z čeledi Psilostomatidae, neboť tato čeleď je podle současného systému nejodvozenější (Olson et al. 2003).

Analýzou této matice metodou maximum parsimonie (MP) byl získán kladogram, který svou topologií odpovídal kladogramu získanému analýzou matice metodou maximum likelihood (ML) (obr.16). Dle tohoto kladogramu se jeví čeleď Fasciolidae jako monofyletická. Motolice *Fascioloides magna* tvoří jasně oddělenou větev. Sesterskou skupinu tvoří zástupci rodu *Fasciola*, zatímco motolice *Fasciolopsis buski* tvoří samostatnou větev na bázi části fylogenetického stromu náležící čeledi Fasciolidae.





**Obr. 16.** Fylogenetický strom zkonstruovaný metódou maximum likelihood v programu PhyML - 50% majority consensus. Model GTR+ $\Gamma$ +I (8 kategórií). Gamma shape parametr = 2,000, podíl invariant = 0,204, likelihood logLk = -4505,44536. Bootstrap – počet opakování 1000. Hodnota bootstrapu z ML/MP.

## 6. Diskuse

### 6.1. Výskyt larválních stádií *Fascioloides magna*

Na sledovaných lokalitách bylo v letech 2004-2006 nalezeno 25 pozitivních plžů (2,0%) dvou druhů obsahující vývojová stadia motolice *F. magna*. Svou roli, v poměrně vysoké prevalenci výskytu larválních stádií motolice obrovské, zde jistě sehrál celkový počet nasbíraných měkkýšů, především plžů *Galba truncatula* (1328 ks) a *Radix peregra* (4921 ks). Ten byl výrazně vyšší, především v případě druhu *G. truncatula*, ve srovnání s rokem 2003, kdy bylo sledování na území České republiky nově zahájeno – viz. data prezentovaná v bakalářské práci „Vybrané aspekty biologie motolice obrovské (*Fascioloides magna*)“ (Horáčková 2004). Významný je také fakt, že bylo sledováno celkem 8 lokalit s častým výskytem motolice *F. magna* u zvěře (Novobilský et al. 2006).

Motolice *F. magna* byla nalezena ve dvou druzích měkkýšů, *G. truncatula* a *R. peregra*. Tyto druhy měkkýšů byly nalézány na všech sledovaných lokalitách v nejhojnějším počtu. Dle Berana (2002) patří oba tyto druhy k nejrozšířenějším vodním měkkýšům v České republice. Plže *G. truncatula* dokonce označil jako nejfrekventovanější druh v ČR vyskytující se od nejnižších do nejvyšších poloh ČR s nejčastějším výskytem v nadmořských výškách 200-300 metrů n.m., přičemž výskyt v oblastech nad 800 m.n.m. je pouze ojedinělý. Faltýnková et al. (2006) poukazují na to, že tyto plži obývají společné biotopy, přičemž populace *R. peregra* jsou oproti *G. truncatula* početnější. Tomu odpovídají i výsledky prezentované v této práci.

Nález rédií a cercarií motolice *F. magna* v plži *G. truncatula* (4,5%) pouze v oboře Zahrádka se dá vysvětlit faktem, že v této oboře je stálé ohnisko výskytu *F. magna* u definitivních hostitelů s průměrnou prevalencí 85% (Novobilský et al. 2006). Vzhledem k poměrně malé rozloze této obory a vhodným podmínkám pro výskyt měkkýšů *G. truncatula* se jedná o ideální lokalitu pro úspěšný cyklus *F. magna* a umožňuje potenciální rozšíření spektra mezihostitelů o druh *R. peregra* (Faltýnková et al. 2006). Vysokou prevalenci nákazy měkkýše *G. truncatula* motolicí *F. magna* na této lokalitě uvádí Faltýnková et al. (2003). Z celkem 75 jedinců plže *G. truncatula* nasbíraných v průběhu roku 2002 byl v 26 případech (35%) zaznamenán výskyt larválních stádií *F. magna*.

I přes poměrně vysoký počet vyšetřených měkkýšů druhu *G. truncatula* na lokalitách VVP Boletice (637) a VVP Jince (108) nebyly zaznamenány žádné pozitivní nálezy motolice *F. magna*. Hlavním důvodem negativních nálezů bude zřejmě charakter těchto lokalit. V obou

případech se jedná o značně rozlehlá území, což vzhledem k ohniskovosti výskytu motolice v populacích mezihostitelů – tedy, že výskyt parazita je omezen na krátký čas a malý prostor, může sehrát významnou roli v nalezení motolice v plžích. Za této situace je totiž poměrně obtížné takovéto ložisko nákazy odhalit. Nízké prevalence nákazy prezentují ve své studii i Sattmann a Hörweg (2006). Z celkového počtu 10 059 plžů *G. truncatula* nasbíraných v letech 2004 a 2005 v národním parku Donau-Auen, kde se motolice *F. magna* běžně vyskytuje v populacích vysoké zvěře – prevalence 30-100% (Ursprung 2005), byly pouze 3 plži (0,03%) pozitivní.

Z dalších nálezů uvádí Erhardová-Kotrlá (1971) prevalenci nákazy motolicí *F. magna* u plžů *G. truncatula* na Příbramsku v polesí Hluboš 0,5-4,5 % a v oboře na Dobříšsku 0,3-2,5%. Celkové počty nasbíraných plžů byly ovšem poměrně vysoké. Na lokalitách v polesí Hluboš nasbírala v dubnu roku 1962 celkem 963 plžů, v oboře na Dobříšsku dokonce 1214 kusů plže *G. truncatula*. Naproti tomu na lokalitách v okolí Nových Hradů nalezla z celkového počtu 700 nasbíraných plžů *G. truncatula* larvální stádia motolice *F. magna* pouze u jednoho plže. Chroust a Chroustová (2004) uvádějí z celkového počtu 258 nasbíraných a vyšetřených plžů *G. truncatula* během let 2002 a 2003 pět pozitivních, z čehož tři plži obsahující vývojová stádia *F. magna* byli nalezeni na lokalitách v okolí Nových Hradů a dva v Poněšické oboře.

Vývojová stádia motolice *F. magna* jsem také nalezla ve třech plžích (0,06%) *Radix peregra*. Tento nález potvrzuje domněnku možného rozšíření spektra vhodných mezihostitelů motolice *F. magna* na území České republiky a Evropy vůbec. Motolice *F. magna* byla nalezena jednak v oboře Zahrádka (0,2%) a dále na jedné z lokalit ve VVP Jince (1,4%). V oboře Zahrádka se pozitivní nález motolice v plži *R. peregra* vyskytl už v roce 2002 (Faltýnková et al. 2003). Tito autoři našli cercárie *F. magna* v jednom plži (0,2%) *R. peregra*). Nález rédií a cercárií motolice *F. magna* na území VVP Jince však dokládá, že výskyt larválních stádií *F. magna* u plže *R. peregra* není vázán pouze na lokalitu Zahrádka, tedy že i vývoj motolice v tomto druhu měkkýše není specifitou pouze této, pro úspěšné dokončení vývojového cyklu motolice ideální, lokality.

## 6.2. Experimentální nákazy

Experimentální nákaza měkkýšů miracidii motolice *Fascioloides magna* byla úspěšná jak u plžů *Galba truncatula*, tak u *Radix peregra*. Vysoká (70%) úspěšnost nákazy plže *G. truncatula* odpovídá skutečnosti, že tento druh měkkýše je v podmínkách Evropy hlavním přirozeným mezihostitelem pro motolici *F. magna*. Tuto skutečnost dokládají také

experimenty provedené Erhardovou-Kotrlou (1971), která zaznamenala úspěšnost nákazy u plže *G. truncatula* v průměru 93%.

Larvální stádia motolice *F. magna* byla pozorována u 42% experimentálně nakažených plžů *R. peregra*. I když je procento nakažených měkkýšů nižší než u bahnatky malé, jedná se o poměrně vysokou úspěšnost nákazy, zejména ve srovnání s předchozími studii provedenými na tomto druhu měkkýše. Ve své bakalářské práci „Vybrané aspekty biologie motolice obrovské (*Fascioloides magna*)“ z roku 2004 jsem nezaznamenala žádného pozitivního experimentálně nakaženého plže *R. peregra*. Erhardová-Kotrlá (1971) zjistila v případě experimentální nákazy cca 42% pozitivních plžů *R. peregra*. Tento údaj však pochází z pitev provedených dva dny po infekci miracidii *F. magna*, jedná se tedy o procento invadovaných plžů, nikoli o plže, ve kterých proběhl (alespoň částečný) vývoj motolice. Prevalence nákazy plžů po 5 až 92 dnech, kdy se již vyvinuly sporocysty a rédie, byla poněkud nižší (40%).

V plži *R. peregra* se v případě mých pokusů motolice vyvinula až do stádia plně vyvinutých cercárií. Přesto, že tyto cercárie po stimulaci světlem a teplem samovolně neopouštěly tělo plže, jedná se o významné zjištění, které, vzhledem k nálezům motolice *F. magna* u plže *R. peregra* na dvou lokalitách v přírodních podmínkách, může naznačovat schopnost vývoje parazita v tomto hostiteli, tedy jeho adaptaci na další druh velice hojného mezihostitele. Schopnost vývoje motolice *F. magna* v měkkýši *R. peregra* až do stádia mateřských rédií uvádí dle svých experimentů také Erhardová-Kotrlá (1971).

Mateřské rédie motolice *F. magna* byly u plžů *R. peregra* pozorovány 35. den po nákaze, zatímco plně vyvinuté cercárie až 119. den při teplotě 17°C. Při srovnání s údaji Erhardové-Kotrlé (1971) a Swalese (1935), kteří uvádějí vývoj motolice v mezihostiteli 42-44, resp. 49-58 dní, je doba celkového vývoje motolice *F. magna* v plži *R. peregra* poměrně dlouhá. Dlouhá doba vývoje motolice v tomto druhu měkkýše zřejmě odráží fakt, že tento mezihostitel není tak vhodný jako *G. truncatula*. Erhardová-Kotrlá (1971) pozorovala u experimentálně nakaženého plže *R. peregra* mateřské rédie *F. magna* již 10. den po nákaze, ale rovněž po 92 dnech po nákaze našla mateřské rédie, ve kterých ovšem nepozorovala žádná další vývojová stádia (dceřiné rédie ani cercárie). Delší prepatentní periodu (69-77 dní), než u přirozeného mezihostitele *F. magna* v Evropě *G. truncatula*, u experimentálně nakaženého plže *Omphiscola glabra* miracidii *F. magna* uvádějí Rondelaud et al. (2006).

Celková doba vývoje motolice v mezihostiteli je rovněž dána také výživou mezihostitele. Kendall (1949), Kendall a Ollerenshaw (1963) a Belfaiza (2004) uvádějí, že špatně vyživovaní měkkýši obsahují menší množství rédií a cercárií a vývoj v těchto

měkkých trvá déle. Je možné, že listy salátu, kterými byli plži v průběhu celého experimentu krmeni, jim neposkytly dostatečný přísun živin, což mohlo zapříčinit jejich zhoršený tělesný stav, a tím i pomalejší vývoj parazita v nich. Tuto hypotézu podporuje i skutečnost, že plně vyvinuté cercárie *F. magna* byly i u experimentálně nakažených plžů *G. truncatula* pozorovány až 109. den po nákaze. Dalším možným důvodem zpomalení vývoje motolice v měkkých mohla být příliš nízká teplota prostředí (17°C), ve kterém byli měkkýši uchováni. Při této teplotě pravděpodobně dochází k poklesu metabolismu u měkkýše, a tím také ke zhoršení podmínek pro vývoj parazita v mezihostiteli a zpomalení jeho vývoje. Prodloužení doby vývoje parazita v mezihostiteli s klesající teplotou zjistili např. Roberts (1950), Davtian (1956) a Chowaniec (1961). Za kritickou teplotu, při které dochází k zastavení vývoje motolice v mezihostiteli, udává Roberts (1950) 5°C, zatímco Kendal (1951) považuje za kritickou teplotu 10°C.

Infekce plžů *R. peregra* byla úspěšná jen u juvenilních jedinců (1-8 mm). Podobných výsledků dosáhli Rondelaud et al. (2006), kterým se nepodařilo experimentálně nakazit plže *Omphiscola glabra* o velikosti 12-14 mm miracidii motolice *F. magna*, zatímco úspěšnost nákazy plžů menších než 2 mm byla téměř 63%. Úspěšné experimentální nákazy miracidii *F. magna* provedla u plže *Lymnaea palustris* Chroustová (1979). U 39% plžů zaznamenala plně vyvinuté, aktivně se pohybující cercárie. Velikost plžů použitých k nákaze byla 0,5-1,5 mm. Závislost úspěšnosti nákazy (invazeschopnosti miracidii *F. magna*) na velikosti plže studovala u *R. peregra* také Erhardová-Kotrlá (1971). Procento pozitivních plžů v případě jejích experimentů klesalo s narůstající velikostí, resp. stářím plže. Zatímco měkkýši o velikosti ulity 4 mm byli v 92% pozitivní, úspěšnost nákazy u jedinců o velikosti 15 mm byla pouze 20%.

S tímto fenoménem také souvisí vysoká mortalita juvenilních plžů vystavených miracidii. Z celkového počtu 1457 plžů *R. peregra* použitých k nákaze přežilo do doby vyšetření na přítomnost larválních stádií *F. magna* jen 310 (21%). Vysokou mortalitu (41%) juvenilních jedinců *L. palustris* nakažených miracidii *F. magna* uvádí i Chroustová (1979), stejně jako Rondelaud et al. (2006), kteří pozorovali vysokou mortalitu (73%) u juvenilních plžů *O. glabra* menších než 2 mm. Vysoká mortalita mladých jedinců vystavených nákaze miracidii *F. magna* může být způsobena vysokým počtem miracidii použitých k nákaze Rondelaud et al. (2006). Autoři pozorovali vyšší úmrtnost plžů po použití už dvou miracidii k nákaze jednoho plže.

Vnímavost juvenilních jedinců *R. peregra* vůči nákaze miracidii motolice *F. magna* by mohla být dána stavem jejich imunitního systému, který v mladém věku plže není

pravděpodobně ještě tolik vyvinut, jako je tomu u dospělých jedinců. Uvážíme-li navíc fakt, že *R. peregra* není přirozeným mezihostitelem motolice *F. magna*, která tedy není na tento druh plže doposud dostatečně adaptována, sehrává rozvoj imunitního systému plžů zřejmě klíčovou roli v úspěšnosti nebo neúspěšnosti nákazy.

### 6.3. Molekulární charakterizace

Porovnáním sekvencí 18S rRNA genu motolic *Fascioloides magna* a *Fasciola hepatica* byla zjištěna nízká interspecifická sekvenční variance (pouze 0,9%). Toto zjištění odpovídá faktu, že 18S rRNA sekvence vzdáleně příbuzných digenetických motolic vykazují nízkou variabilitu (Olson a Tkach 2005). Nízká variabilita, avšak mírně vyšší než v celém úseku 18S motolice *F. magna*, se vyskytovala ve variabilní oblasti V4 (2% sekvenční rozdílnost). I přes toto zjištění není možné, kvůli počtu a rozmištění polymorfních míst v úseku 18S, navrhnout druhově specifické markery pro případné odlišení motolic čeledi Fasciolidae. Odlišení obou druhů *F. magna* a *F. hepatica* metodou PCR-RFLP použitím speciálních restričních enzymů naopak umožňují úseky ITS1 a ITS2, recentně osekvenované Královou-Hromadovou et al. (submitted). Zde byla zjištěna interspecifická variabilita 6,9% resp. 11,3%. Adlard et al. (1993) uvádějí variabilitu v nukleotidových sekvencích ITS2 oblasti *F. magna* a *F. hepatica* 13,2%. Variabilní oblasti byly také zjištěny uvnitř mitochondriálních genů *cox1* a *nad1*. Těchto oblastí by mělo být v budoucnu využito pro populační studie *F. magna* (Králová-Hromadová et al. submitted).

Výsledky fylogenetické analýzy sekvence 18S rDNA motolice *F. magna* a dalších vybraných motolic potvrzují správnost systematického postavení motolice *F. magna* jakožto samostatného rodu v rámci čeledi Fasciolidae. Topologie mnou sestrojeného fylogramu se shoduje s odpovídající částí fylogramu vytvořeném na základě analýzy sekvencí malé ribozomální podjednotky (18S rRNA) a částečných sekvencí velké ribozomální podjednotky (D1-D3 úsek 28S rRNA genu) uveřejněných v práci Olsona et al. (2003). Zástupci čeledi Fasciolidae (*Fasciola gigantica* a *F. hepatica*) zde tvoří samostatnou vývojovou větev, přičemž sesterskou skupinou, stejně jako v této předkládané práci, jsou zástupci čeledi Echinostomatidae (*Euparyphium melis* a *Echinostoma revolutum*).

Barker et al. (1993) analyzovali hypervariabilní D1 doménu 28S rRNA genu dvanácti digenetických motolic včetně všech zástupců čeledi Fasciolidae, která je zde prezentována jako monofyletická. Ve dvou fylogramech sestrojených metodou maximální parsimonie v programu PAUP 3.0L je postavení motolice *F. magna* totožné jako ve fylogramu prezentovaném v této předkládané práci. Ve fylogramu s vyjádřenými

bootstrapovými hodnotami je ovšem motolice *F. magna* řazena jako sesterská skupina motolice *Fasciolopsis buski*. Tato větev ovšem není dostatečně silně podpořena (hodnoty bootstrapu pouze 46%). Stejně je tomu i v případě fylogramu sestrojeném metodou neighbour-joining v programu PHYLIP 3.4. I zde tvoří sesterskou skupinu motolici *F. magna* motolice *F. buski*, avšak opět s velmi slabou podporou (bootstrap 50%).

Díky poměrně silné podpoře (bootstrap 66 resp. 69%) větve vyčleňující motolici *F. magna* jako samostatnou skupinu v rámci čeledi Fasciolidae prezentované v této práci se přikláním ke správnosti tohoto postavení motolice *F. magna* v rámci fasciolidních motolic.

## 7. Závěr

- Larvální stádia motolice *Fascioloides magna* byla nalezena na dvou z osmi sledovaných lokalit ve dvou druzích měkkýšů. V oboře Zahrádka byly nalezeny rédie a cercárie motolice *F. magna* ve 20 plžích *Galba truncatula* (4,5%) a rédie u 2 plžů *Radix peregra* (0,2%). Ve VVP Jince byly nalezeny současně rédie a cercárie *F. magna* u 3 plžů druhu *R. peregra* (1,4%).
- Plž *R. peregra* byl úspěšně nakažen miracidii motolice *F. magna*. Z celkového počtu 310 vyšetřených plžů *R. peregra* bylo 130 (42%) plžů infikovaných. Motolice se v tomto hostiteli vyvinula až do stádia plně vyvinutých cercárií, které byly poprvé pozorovány 119. den po nákaze. Mateřské rédie *F. magna* byly pozorovány 35. den po nákaze. Infekce plžů *R. peregra* byla úspěšná jen u juvenilních jedinců (délka ulity 1-8 mm).
- Schopnost vývoje motolice *F. magna* v plži *R. peregra* byla prokázána jak nálezy z přírody, tak úspěšnými experimentálními nákazami tohoto měkkýše. Prezentované výsledky ukazují na možnost adaptace *F. magna* na nové mezihostitele v České republice.
- Byl získán 1940 bp dlouhý úsek 18S rRNA genu motolice *Fascioloides magna*. Porovnáním této sekvence se sekvencí 18S rRNA genu motolice *Fasciola hepatica* byla zjištěna podobnost 99,1%. Dle sestrojeného fylogenetického kladogramu se jeví čeleď Fasciolidae jako monofyletická. Motolice *F. magna* tvoří jasně oddělenou větev a její sesterskou skupinu tvoří zástupci rodu *Fasciola*. Na bázi fylogenetického stromu se nachází motolice *Fasciolopsis buski*.



## 8. Literatura

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

**Almarza N.** (1935): Die Leberegel des Schafes. Beschreibung neuere Arten. *Zeitschrift für Infektionen Krankheiten der Haustiere* 47: 195-202.

**Arundel J.H., Hamir A.N.** (1982): *Fascioloides magna* in cattle. *Australian Veterinary Journal* 58: 35-36.

**Bargues M.D., Vigo M., Horák P., Dvořák J., Patzner R.A., Pointier J.P., Jackiewicz M., Meier-Brook C., Mas-Coma S.** (2001): European Lymnaeidae (Mollusca: Gastropoda), intermediate hosts of trematodiasis, based on nuclear ribosomal DNA ITS-2 sequences. *Infection Genetics and Evolution* 1: 85-107.

**Barker S.C., Blair D., Garrett A.R., Cribb T.H.** (1993): Utility of D1 domain of nuclear 28S r RNA for phylogenetic inference in the Digenea. *Systematic Parasitology* 26: 181-188.

**Belfaiza M., Rondelaud D., Moncef M., Dreyfuss G.** (2004): *Fasciola hepatica*: cercarial productivity of redial generations in long-surviving *Galba truncatula*. *Journal of Helminthology* 78: 115-120.

**Beran L.** (2002): Vodní měkkýši České republiky – rozšíření a jeho změny, stanoviště, šíření, ohrožení a ochrana, červený seznam. Sborník přírodovědného klubu v Uherském Hradišti, Suppl. 10, 258 pp.

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

**Boomker J., Dale-Kuys J.C.** (1977): First report of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in South Africa. Onderstepoort. *Journal of Veterinary Research* 44: 49-51.

**Davtian E.M.** (1956): O patogennosti različných vidov fasciol i ee izmienčivosti v závisimosti ot uslovii razvitia partenogenetičeskich stadii. *Zoologicki Žurnal* 35.

**Dunkel A.M., Rognlie M.C., Johnson G.R., Knapp S.E.** (1996): Distribution of potential intermediate hosts for *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* in Montana, USA. *Veterinary Parasitology* 62: 63-70.

**Erhardová B.** (1961): Vývojový cyklus motolice obrovské *Fasciola magna* v podmínkách ČSSR. *Zoolické Listy* 10: 9-18.

**Erhardová-Kotrlá B.** (1968): *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) motolice obrovská v podmínkách ČSSR. Doktorská disertační práce, Parazitologický ústav ČSAV Praha, 190 pp.

**Erhardová-Kotrlá B.** (1971): The occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in Czechoslovakia. Academia, Praha, 155 pp.

**Faltýnková A., Hirtová L., Modrý D.** (2003): Unique occurrence of cercariae of the large American liver fluke (*Fascioloides magna*) (Digenea, Fasciolidae) in lymnaeid snails in Western Bohemia. 9<sup>th</sup> International Helmintological Symposium Helminths, helminthoses and environment, June 9-13, 2003, Stará Lesná, Slovak Republic. Abstracts of papers, p. 25.

**Faltýnková A., Horáčková E., Hirtová L., Novobilský A., Modrý D., Scholz T.** (2006): Is *Radix peregra* a new intermediate host of *Fascioloides magna* (Trematoda) in Europe? Field and experimental evidence. Acta Parasitologica 51: 87-90.

**Fernandez M., Littlewood D.T., Latorre A., Raga J.A., Rollinson D.** (1998): Phylogenetic relationships of the family Campulidae (Trematoda) based on the 18S rRNA sequences. Parasitology 117: 383-391.

**Hall T.A.** (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.

**Hoerweg C., Sattmann H., Wille-Piazzai W., Kolodziejek J., Prosl H., Joachim A.** (2006): Genetic characterization of *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* from Austria using partial ITS2-sequence data. Unpublished.

**Horáčková E.** (2004): Vybrané aspekty biologie motolice obrovské (*Fascioloides magna*). Bakalářská diplomová práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, 36 pp.

**Chowaniec W.** (1961): Influence of environment on the development of liver fluke, and the problem of superinvasion and reinvasion in the intermediate host. Acta Parasitologica Polonica 9: 463-480.

**Chroust K., Chroustová E.** (2004). Motolice obrovská (*Fascioloides magna*) u spárkaté zvěře v jihočeských lokalitách. Veterinářství 54: 296-304.

**Chroustová E.** (1978): *Lymnaea palustris* (Müller, 1774) jako další mezihostitel motolice velké *Fascioloides magna* v ČSSR. Veterinářství. 28: 130-132.

**Chroustová E.** (1979): Experimental infection of *Lymnaea palustris* snails with *Fascioloides magna*. Veterinary Parasitology 5: 57-65.

**Kaplan R.M., Dame J.B., Reddy G.R., Courtney C.H.** (1995): A repetitive DNA probe for the sensitive detection of *Fasciola hepatica* infected snail. International Journal for Parasitology 25: 601-610.

**Kassai T.** (1999): Veterinary Helminthology. Butterworth Heinemann, Oxford, Great Britain, 260 pp.

**Kendall S.B.** (1949): Nutritional factors affecting the rate of *Fasciola hepatica* in *Lymnaea truncatula*. Journal of Helminthology 23.

**Kendall S.B., McCollough F.S.** (1951): The emergence of the cercariae of *Fasciola hepatica* from the snail *Lymnaea truncatula*. *Journal of Helminthology* 25.

**Kendall S.B., Ollerenshaw C.B.** (1963): The Effect of nutrition on the growth of *Fasciola hepatica* in its snail host. *Proceedings of the Nutrition Society* 22: 41-46.

**Kotrlý A., Páv J.** (1959): Trematoda spárkaté zvířete. Sborník Československé Akademie zemědělských věd 32: 551-558.

**Králová-Hromadová I., Špakulová M., Horáčková E., Turčeková L., Novobilský A., Beck R., Koudela B., Marinculić A., Rajský D., Pybus M.** (submitted): Sequence analysis of ribosomal and mitochondrial genes of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae): intraspecific variation and differentiation from *Fasciola hepatica*.

**Littlewood D.T.J., Olson P.D.** (2001): Small subunit rDNA and the Platyhelminthes: signal, noise, conflict and compromise. In D.T.J. Littlewood and R.A. Bray (eds.), *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London 262-278 pp.

**Lorenzo M., Ramiriz P., Mendez M., Alonso M., Ramos R.** (1989): Reporte de *Fascioloides magna*, Bassi, 1875, parasitando un wapiti (*Cervus canadensis*) en Cuba. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias* 20: 263-266.

**Majoros G., Sztojkov V.** (1994): Appearance of the large American liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) (Trematoda: Fasciolata) in Hungary. *Parasitologia Hungarica* 27: 27-38.

**Maringulić A., Džakula N., Janicki Z., Hardy Z., Lucinger S., Živić T.** (2002): Appearance of American liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in Croatia a case report. *Veterinarski Arhiv* 72: 319-325.

**Novobilský A., Horáčková E., Hirtová, L., Modrý D., Koudela B.** (2006): The giant liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi 1875) in cervids in the Czech Republic and potential of its spreading to Germany. *Parasitology Research* 100: 549-553.

**Olson P.D., Cribb T.H., Tkach V.V., Bray R.A., Littlewood D.T.J.** (2003): Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *International Journal for Parasitology* 33: 733-755.

**Olson P.D., Tkach V.V.** (2005). Advances and trends in the molecular systematics of the parasitic Platyhelminthes. *Advances in Parasitology* 60: 165-243.

**Pfeiffer H.** (1983): *Fascioloides magna*; first report in Austria. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 70: 168-170.

**Posada D., Crandall K.A.** (1998): Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817-818.

**Pybus M.J.** (2001): Liver flukes in: Samuel W. M., Pybus M. J., Kocan A. A. *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. Iowa State University Press/Ames, pp. 121-149.

**Rajský D., Patus A., Bukovjan K.** (1994): Prvý nález *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) na Slovensku. Slovenský veterinársky časopis 19: 29-30.

**Roberts E.** (1950): Studies on the life cycle of *Fasciola hepatica* (Linnaeus) and of its snail host *Limnaea (Galba) truncatula* (Müller), in the field and controlled conditions in the laboratory. Annals of Tropical and Medical Parasitology 44: 162-179.

**Rognlie M.C., Dimke K.L., Knapp S.E.** (1994): Detection of *Fasciola hepatica* in infected intermediate hosts using RT-PCR. Journal of Parasitology 80: 748-755.

**Rondelaud D., Novobilský A., Vignoles P., Treuil P., Koudela B., Dreyfuss G.** (2006): First studies on the susceptibility of *Omphiscola glabra* (Gastropoda: Lymnaeidae) from central France to *Fascioloides magna*. Parasitology Research 98: 299-303.

**Salomon S.** (1932): *Fascioloides magna* bei deutschen Rotwild. Berliener und Muenchener Tierarzliche Wochenschrift 48: 627-628.

**Sambrook J., Russell D.W.** (2001): Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Third edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

**Sattmann H., Hörweg Ch.** (2006): Untersuchung zur Messung der Befallsrate der Leberegelschnecke *Galba truncatula* mit dem amerikanischen Riesenleberegel *Fascioloides magna* im Nationalpark Donau-Auen. Niederösterreichischer Landesjagdverband Wien, 39 pp.

**Slusarski W.** (1955): Studia nad europejskimi przedstawicielami przywry *Fasciola magna* (Bassi, 1875) Stiles, 1894. I. Acta Parasitologica Polonica 3: 1-59.

**Swales W.E.** (1935): The life cycle of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) the large liver fluke of ruminants, in Canada. With observation on the bionomics of the larval stages and the intermediate hosts, pathology of *Fascioloides magna* and control measures. Canadian Journal of Research 12: 177-215.

**Swofford D.L.** (1998): PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

**Špakulová M., Rajský D., Sokol J., Vodňanský M.** (2003): Cicavica obrovská (*Fascioloides magna*) významný pečeňový parazit prežúvavcov. PaRPRESS, Bratislava, 59 pp.

**Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673-4680.

**Ursprung J.** (2005): Ergebnisse Leberuntersuchungen von Rot- und Rehwild aus den Donauen im Jahre 2004. Präsentation beim 5. Symposium „Erforschung und Bekämpfung des Amerikanischen Riesenleberegels (*Fascioloides magna*)“. Niederösterreichischer Landesjagdverband.

**Ursprung J., Joachim A., Prosl H.** (2006): Epidemiology and control of the giant liver fluke, *Fascioloides magna*, in a population of wild ungulates in the Danubian wetlands east of Vienna. *Berliener und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 119: 316-323.

**Ursprung J., Juncker-von Voss M., Prosl H.** (2002): *Fascioloides magna* in Austrian red deer. Joint Annual Meeting of Parasitology 2002, Abstract C18, <http://www.dgp-nvp-2002.de/abstract/c18.htm>.

**Ursprung J., Prosl H.** (2003): *Fascioloides magna* in Austria. Proceedings of the Twelfth Helminthological Days held at Dolní Věstonice (Czech Republic), May 5-8, 2003. *Helminthologia* 40: 180.

**Waddell P.J., Steel M.A.** (1997): General time reversible distances with unequal rates across sites: Mixing gamma and inverse gaussian distributions with invariant sites. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 8: 398-414.

**Yamaguti S.** (1975): A Synoptical Review of Life Histories of Digenetic Trematodes of Vertebrates. Part I, II. Keigaku Publishing Co., Tokyo, 550 pp. + 219 plts.

## 9. Příloha

Publikace č. 1:

**Faltýnková A., Horáčková E., Hirtová L., Novobilský A., Modrý D., Scholz T.** (2006): Is *Radix peregra* a new intermediate host of *Fascioloides magna* (Trematoda) in Europe? Field and experimental evidence. *Acta Parasitologica* 51: 87-90.

### Abstract

Rediae and immature cercariae of the giant liver fluke, *Fascioloides magna*, a pathogenic and important parasite of game animals, were found in 6 out of 7,277 *Radix peregra* (Gastropoda, Lymnaeidae) from two localities in Western and Central Bohemia, Czech Republic. In one of these localities a relatively high infection of *Galba truncatula* (26 out of 76) with mature cercariae of *F. magna* was detected. *R. peregra*, which is dominant over *Galba truncatula*, has never been reported as the natural intermediate host of *F. magna*. Its potential susceptibility to *F. magna* infection was confirmed experimentally with 67 snails of *R. peregra* (out of 371) infected. The present data indicate the capability of *F. magna* to expand the spectrum of its intermediate hosts and demonstrate the potential epizootiological importance of lymnaeid snails, other than *G. truncatula*, for transmission of the parasite in Europe.

Publikace č. 2.

**Novobilský A., Horáčková E., Hirtová L., Modrý D., Koudela B.** (2006): The giant liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi 1875) in cervids in the Czech Republic and potential of its spreading to Germany. *Parasitology Research* 100: 549-553.

### Abstract

The giant liver fluke *Fascioloides magna* is an important parasite of cervids in Europe. From September 2003 to December 2005, faecal samples and livers of red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*) were investigated to determine the current distribution of the fluke in the Czech Republic. Faecal samples were collected from 20 different areas, and livers of hunted deer were dissected from each locality to confirm *F. magna* infection. The prevalence of *F. magna* in examined areas determined by coprological examination varied from 4% to 95%. Moreover, new foci of *F. magna* infection were discovered in all localities in the Šumava mountains where *F. magna* was observed; this has epizootiological importance due to the possibility of the spread of *F. magna* into the German territory (Bavaria).