

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Morfologická analýza vajíček tasemnic řádu
Diphylobothriidea**



Diplomová práce

Bc. Kateřina Leštinová

Školitel: RNDr. Roman Kuchta, PhD.

České Budějovice 2014

Diplomová práce:

Leštinová K., 2014: Morfologická analýza vajíček tasemnic řádu Diphyllbothriidea. [Morphological analysis of the tapeworms eggs of the order Diphyllbothriidea. Mgr. Thesis, in Czech.] - 90 p, Faculty of Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The order Diphyllbothriidea is a unique group of tapeworms in terms of the wide spectrum of definitive hosts involving all groups of tetrapods including man. They are almost globally distributed in both freshwater and marine ecosystems, but there are also terrestrial species. It is very difficult to identify species of diphyllbothriid cestodes to the species level. Morphology of the eggs might represent a new method in the differential diagnosis of these parasites. Besides the size and shape of the eggs, the structure of egg surface might play a significant role in the determination of different taxa. For the analysis of these characteristics Scanning Electron Microscopy (SEM) was used. Experimental infections in hamsters and man were done.

Acknowledgment: The study was supported by the Grant Agency of the Czech Republic (project No. P506/12/1632).

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Místo, datum.

Podpis studenta

V Českých Budějovicích 25. 4. 2014

.....
Bc. Kateřina Leštinová

Velice ráda bych poděkovala zejména svému školiteli Romanu Kuchotvi a profesoru Tomáši Scholzovi za možnost pracovat v Laboratoři helmintologie, za odborné vedení, podporu a trpělivost při vypracovávání této práce. Mé díky patří také Martině Borovkové, Blance Škoríkové a celému týmu Laboratoře helmintologie za pomoc, podporu a příjemnou atmosféru v laboratoři. Dále bych chtěla poděkovat Daně Květoňové za pomoc s čerstvým materiálem, Jirkovi Peterkovi za pomoc s experimentem na Hydrobiologickém ústavu a celému týmu Laboratoře elektronové mikroskopie za pomoc při práci na skenovacím elektronovém mikroskopu. V neposlední řadě bych velice ráda poděkovala svým rodičům za umožnění studia a velkou trpělivost.

Děkuji

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. CÍLE PRÁCE.....	2
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1. Tasemnice (Cestoda)	3
3.2. Diphyllbothriidea Kuchta, Scholz, Brabec & Bray, 2008	6
3.2.1. Diphyllbothriidea jako parazité člověka.....	10
3.2.1.1. Rod <i>Diphyllbothrium</i> Cobbold, 1858	11
3.2.1.2. Rod <i>Diplogonoporus</i> Lönnberg 1892.....	20
3.2.1.3. Rod <i>Spirometra</i> Faust, Campbell a Kellogg, 1929.....	21
3.3. Vajíčka diphyllbothriidů.....	24
3.3.1. Formování a vývoj vajíčka	26
3.3.2. Morfometrie a struktura povrchu vajíček Diphyllbothriidů	28
3.3.3. Vývoj vajíček.....	35
4. MATERIÁL A METODY	38
4.1. Studium fixovaného materiálu.....	38
4.1.1. Studium morfometrie vajíček	38
4.1.2. Studium povrchu vajíček	39
4.2. Materiál a metody pro studium vývojových cyklů.....	41
4.2.1. Experimentální nákazy	41
5. VÝSLEDKY.....	45
5.1. Morfometrická analýza vajíček	45
5.1.1. Mořští zástupci rodů <i>Diphyllbothrium</i> a <i>Diplogonoporus</i>	49
5.1.2. Sladkovodní a anadromní zástupci rodu <i>Diphyllbothrium</i>	50
5.1.3. Druhy známé z člověka	51
5.1.4. Vnitrodruhová variabilita vajíček <i>D. latum</i> a <i>D. pacificum</i>	53
5.1.5. Morfometrická analýza ostatních zástupců diphyllbothriidů	55
5.2. Skenovací elektronová mikroskopie.....	57
5.2.1. Povrch vajíček mořských zástupců rodu <i>Diphyllbothrium</i>	57
5.2.2. Povrch vajíček sladkovodních a anadromních zástupců rodu <i>Diphyllbothrium</i>	61
5.2.3. Povrch vajíček tasemnic ostatních zástupců diphyllbothriidů.....	63
5.3. Experimentální nákazy	64
5.3.1. Vývoj vajíček z experimentální nákazy křečků.....	64
5.3.2. Vývoj vajíček z experimentální nákazy dobrovolníka	64
6. DISKUZE.....	68
6.1. Morfometrická analýza vajíček	68
6.2. Morfologická analýza povrchu vajíček	70
6.3. Experimentální nákazy	73
7. ZÁVĚR.....	75
8. POUŽITÁ LITERATURA	76
9. PŘÍLOHA	

1. ÚVOD

Tasemnice (Platyhelminthes: Neodermata) jsou bezobratlí živočichové, dokonale přizpůsobení k parazitickému způsobu života. Tito cizopasníci byli nalezeni u všech skupin obratlovců včetně člověka (Khalil a kol. 1994). Z hlediska veterinární i humánní medicíny se v některých případech jedná o důležité patogeny. Ve většině případů dospělé tasemnice nezpůsobují závažné patologické problémy, ačkoli jejich přítomnost je jistě nežádoucí. Pokud ale u člověka parazituje tasemnice ve stadiu larvy (např. tasemnice rodu *Spirometra*), může se jednat o velice závažné onemocnění (Kuchta a kol. 2014).

Jedním z onemocnění působených tasemnicemi je difylobotrióza, jejíž původcem jsou někteří zástupci rodu *Diphyllobothrium* Cobbold, 1858. Ačkoli difylobotrióza sama o sobě není životu nebezpečná, s 20 miliony lidských případů je považována za nejdůležitější a nejrozšířenější cestodózu přenášenou rybami (Scholz a kol. 2009).

Tasemnice rodu *Diphyllobothrium* jsou rozšířeny kosmopolitně, zejména pak v chladných vodách Severní a Jižní polokoule. Těmito tasemnicemi se člověk může nakazit při konzumaci syrových nebo nedostatečně tepelně upravených ryb, které figurují jako druhý mezipositel těchto tasemnic. Difylobotrióza je ve většině případů asymptomatická, ačkoli byly pozorovány vážnější komplikace jako například anemie (von Bonsdorff 1977; Scholz a kol. 2009).

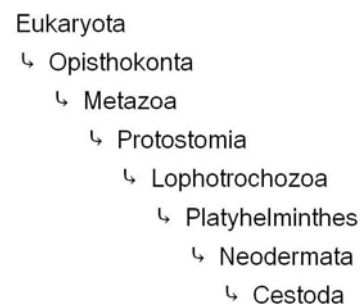
2. CÍLE PRÁCE

1. Získání všech dostupných literárních údajů týkajících se morfologie a morfometrie vajíček diphyllbothriidních tasemnic.
2. Morfometrická analýza vajíček vybraných zástupců řádu Diphyllbothriidea.
3. Srovnání ultrastruktury povrchu vybraných zástupců řádu Diphyllbothriidea pomocí skenovací elektronové mikroskopie.
4. Kultivace získaných živých vajíček a vývojový cyklus *Diphyllbothrium latum* L.
5. Shrnutí získaných údajů a posouzení využitelnosti vajíček diphyllbothriidů v diagnostice.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

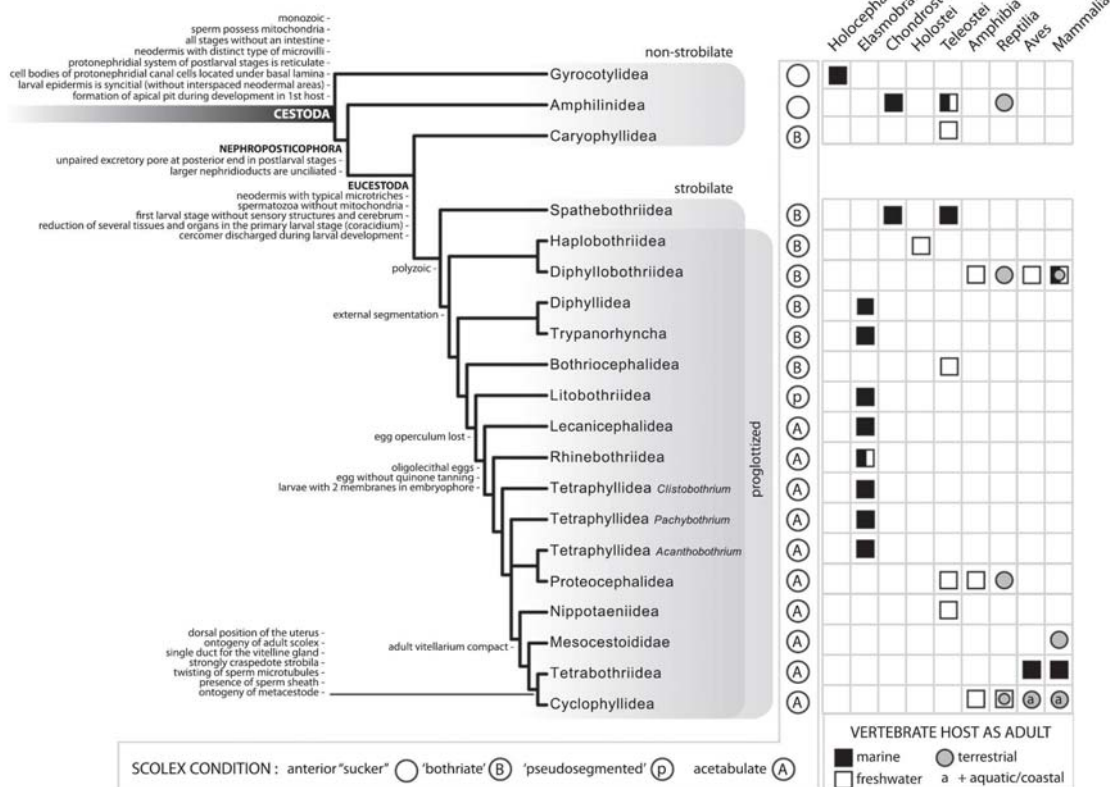
3.1. Tasemnice (Cestoda)

Tasemnice jsou výhradně parazitickou skupinou helmintů. Taxonomicky se řadí do skupiny Platyhelminthes (Metazoa: Lophotrochozoa) (Obr. 3.1.). Najdeme mezi nimi řadu veterinárně i medicínsky významných zástupců. Cestoda se dělí na dvě skupiny: Cestodaria, kam patří dva primitivní řády Amphilinidea a Gyrocotylidea, a Eucestoda (pravé tasemnice) (Khalil a kol. 1994).



Obr. 3.1. Systematické zařazení tasemnic (Cestoda).

Nejnovější fylogenetické analýzy prokázaly existenci 16 řádů pravých tasemnic (Obr. 3.2.), kterými jsou: Caryophyllidea, Spathebothriidea, Haplobothriidea, Diphyllbothriidea, Diphyllidea, Trypanorhyncha, Bothriocephalidea, Lipobothriidea, Lecanicephalidea, Cathetocephalidea, Rhinebothriidea, Onchoproteocephalidea, Phyllobothriidea, Nippotaeniidea, Tetrabothriidea, Cyclophyllidea (Waeschenbach a kol. 2012; Caira a Littlewood 2013).



Obr. 3.2. Fylogenetická analýza tasemnic na základě mtDNA (mtAlIAA+Isr+ssrDNA). Znázorňuje morfologické a vývojové znaky: typ scolexu, obratlovčí hostitel a jeho prostředí (Waeschenbach a kol. 2012).

Tito cizopasníci jsou mimořádně adaptováni k parazitickému způsobu života. Unikátní adaptační změny se týkají jejich morfologie, ultrastruktury, fyziologie, biochemie, ekologie a životních cyklů (Roberts a Janovy 2009; Adl a kol. 2012; Giribet 2008).

U většiny eucestod můžeme pozorovat typické rozdělení těla na scolex (hlavičku, přední část) a strobilu (zbytek těla), která je u většiny zástupců segmentovaná. Co se tvaru a velikosti těla týče, je zde velká variabilita. Délka těla může být od několika mikrometrů až do několika desítek metrů. Neuvěřitelná je i rozmanitost tvaru scolexů a přichycovacích orgánů. Existuje celá škála typů přichycovacích struktur, jako jsou přísavky, přísavné rýhy, chapadélka či háčky a jejich různé kombinace, které jsou charakteristické pro jednotlivé řády (Khalil a kol. 1994; Caira a Littlewood 2013). Za scolexem se nachází tzv. krček – úzká, nediferenciovaná oblast, odkud vyrůstají nové segmenty (Roberts a Janovy 2009).

Pro tasemnice je charakteristická absence střeva. Trávicí funkci přebírá specializovaný povrch těla, tzv. tegument. Zde dochází k molekulárnímu a iontovému transportu aminokyselin, sacharidů, nukleotidů, lipidů, vitaminů a nukleových kyselin (Caira a Littlewood 2013). Vnější povrch tegumentu je pokryt mikrotrichy, výběžky připomínající střevní mikrovilli, které zvětšují povrch těla, čímž dochází k účinnější absorpci živin a lepší adhezi ve střevě definitivního hostitele. Mikrotrichy jsou unikátní strukturou, která se vyskytuje pouze u tasemnic (Chervy 2009). Mikrotrichy byly nalezeny u všech doposud studovaných zástupců. Můžeme je rozdělit do dvou základních skupin podle jejich tvaru. Tenkým typem mikrotrichů jsou tzv. filitrichy (průměr je méně než 200 nm) a širším typem jsou spinitrichy (průměr je více než 200 nm). Filitrichy se dále dělí do tří skupin podle délky. Mohou být na bázi také zdvojené. Spinitrichy jsou daleko více tvarově variabilní, doposud bylo popsáno 25 typů (Chervy 2009).

Většina eucestod se v dospělosti vyskytuje v trávicím traktu obratlovců. Výjimku tvoří například tasemnice *Tetragonoporus calyptocephalus* Skrjabin, 1961 (Diphyllobothriidea), která parazituje ve žlučovodech vorvaně obrovského (*Physeter macrocephalus* L.) (Delyamure a kol. 1985). Další výjimku tvoří tasemnice, které jsou schopné dospět i v bezobratlém mezihostiteli (= progeneze) jako je: *Archigetes* spp. (Caryophyllidea) parazitující v coelomové dutině sladkovodních máloštětinatců (Annelida) či zástupci řádu Spathebothriidea žijící v hemocoelu různonožců (Crustacea) (Beveridge 2001).

Většina tasemnic má nepřímé neboli heteroxenní vývojový cyklus. Výjimku tvoří tasemnice rodu *Archigetes* Leuckart, 1878 a *Hymenolepis nana* (von Siebold, 1852) s alternativním přímým vývojovým cyklem. Ostatní zástupci mají jednoho či dva

mezihostitele. Příkladem dvojhositelského cyklu jsou například lidské tasemnice *Taenia saginata* (Goeze, 1782) a *Taenia solium* L. Mezihostitelem těchto tasemnic je hovězí dobytek nebo prasata a k jejich nákaze vajíčky dochází perorální cestou, kde ve střevě se z vajíčka uvolňuje onkosféra, která penetruje skrz stěnu střeva a krevním řečištěm putuje do svaloviny, kde se vyvíjí v tzv. boubel (*cysticercus bovis* u *T. saginata* a *cysticercus cellulosae* u *T. solium*). Definitivní hostitel se nakazí opět perorální cestou, pozřením syrového nebo špatně tepelně upraveného masa s cysticerky. Příkladem trojhositelského vývojového cyklu jsou například tasemnice řádu Diphyllbothriidea (viz. kap. 3.2.) (Beveridge 2001).

Tasemnice jsou oviparní. Vajíčka jsou vylučována do vnějšího prostředí se stolicí z definitivního hostitele samostatně (anapolyze) a nebo s jedním nebo více odškrcenými články (apolyze) (Khalil a kol. 1994).

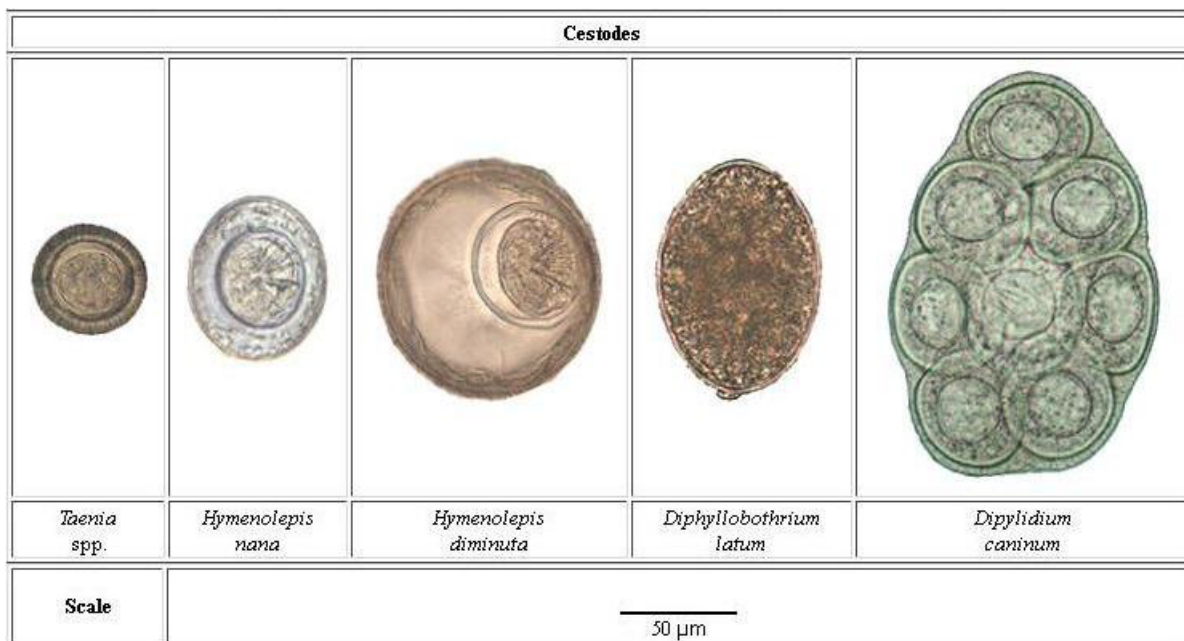
Tasemnice patří stejně jako některé ploštěnky a všichni Neodermata do skupiny Neophora, kde můžeme pozorovat charakteristický, mezi živočichy unikátní vývoj vajíček. Tímto jevem je rozdělení samičí zárodečné linie na oocyty a vitelocyty, které se musí spojit před fertilizací. Vitelocyty neboli žlutkové buňky jsou produkovány žlutkovými trsy (vitelline follicles nebo vitelarium) a obsahují zásobní látky (žloutek) a materiál na skořápku. Vitelocyty pak postupně obklopují oocyt neboli vaječnou buňku a celý tento útvar je po fertilizaci obalen kapsulí. Zygota se tak vyvíjí z oplozeného oocytu, který je obalen vrstvou z vitelocytu (Conn a Świdorski 2008).

U tasemnic a motolic se vyvíjí zárodečné obaly, které mohou sloužit k ochraně vyvíjejícího se embrya – larvy (Conn a Świdorski 2008).

Podle množství žloutku se vajíčka dají rozdělit do třech skupin: 1) oligolecitální vajíčka, která obsahují malé množství žloutku a mají mikroskopické rozměry (např. vajíčka savců vyjma ptakořitných); 2) mezolecitální vajíčka větších rozměrů (2-3 mm) a s větším množstvím žloutku; a 3) polylecitální makroskopická vajíčka s vysokým obsahem žloutku. Vajíčka tasemnic jsou polylecitální.

Ve vajíčku se vyvíjí první larva. K vývoji dochází uvnitř vajíčka buď ještě v mateřské tasemnici anebo až ve vnějším prostředí. U skupin Gyrocotyliidea a Amphilinidea se toto stádium nazývá lykofora (dekant) s 10-ti embryonálními háčky, zatímco u eucestod se jí říká onkosféra (hexakant) s 6-ti embryonálními háčky (Chervy 2002; Conn a Świdorski 2008).

Vajíčka některých tasemnic se od sebe dají rozlišit velikostí a tvarem, jak je patrné na příkladu vybraných zástupců parazitujících u člověka (Obr. 3.3).



Obr. 3.3. Variabilita tvaru a velikosti vajíček tasemnic parazitujících u člověka. (převzato z: <http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/MorphologyTables.htm>)

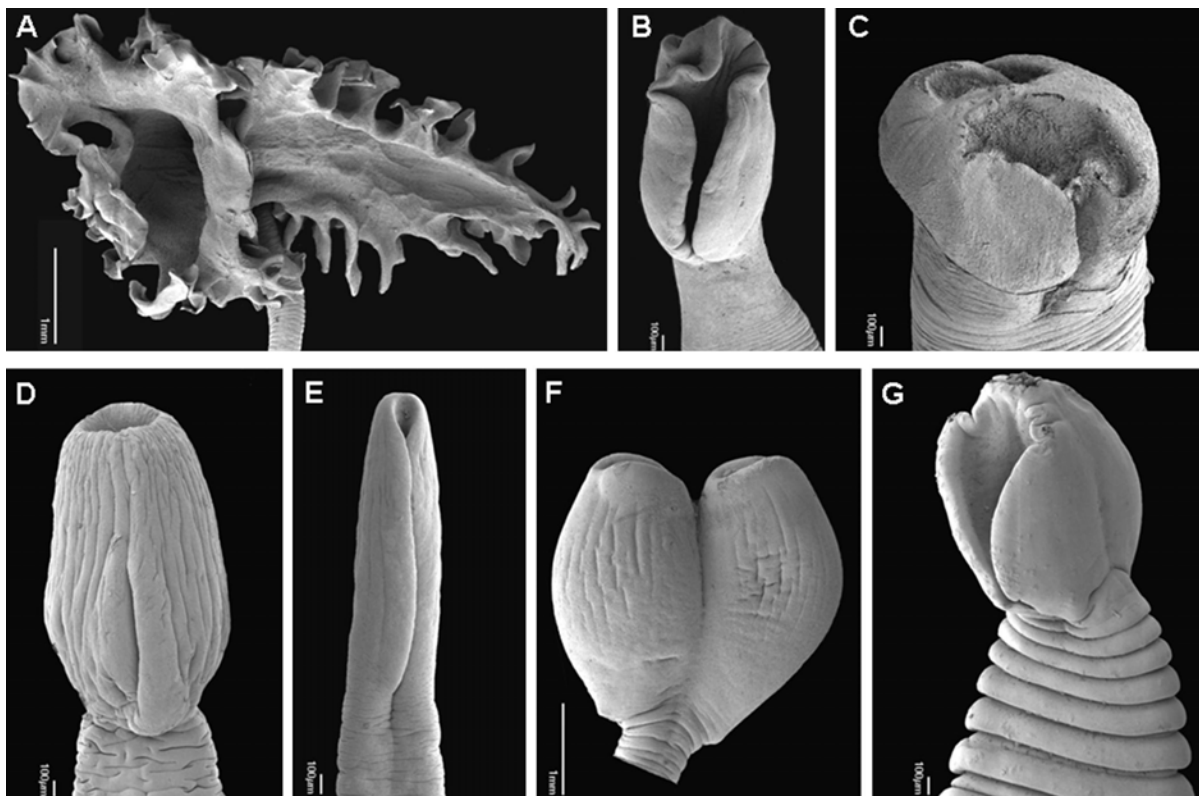
3.2. Diphyllbothriidea Kuchta, Scholz, Brabec & Bray, 2008

Řád Diphyllbothriidea byl vyčleněn z parafyletické skupiny Pseudophyllidea na základě morfologických a molekulárních údajů (Kuchta a kol. 2008).

Jsou to převážně velké, polyzoické tasemnice (mají segmentované tělo) s anapolytickými proglotidami - vajíčka jsou uvolňována samostatně z uteriniho póru a vylučována spolu se stolicí. Absence segmentace je vzácná (například u rodu *Ligula* Bloch, 1782) (Khalil a kol. 1994). Strobila je dorzoventrálně zploštělá a proglotidy jsou většinou širší než delší. Skolex je tvořen dvěma bothriemi (přísavnými rýhami), které mohou být v některých případech modifikovány (Obr. 3.4.). Tvar skolexu je však u většiny zástupců jednoduchého oválného tvaru bez apikálního disku (s výjimkou zástupců rodu *Tetragonoporus* Skryabin, 1961) (Obr. 3.4., 3.5.). Skolex nikdy není vyzbrojen háčky či jinými přichycovacími orgány. Za skolexem se zpravidla nachází krček (Khalil a kol. 1994).

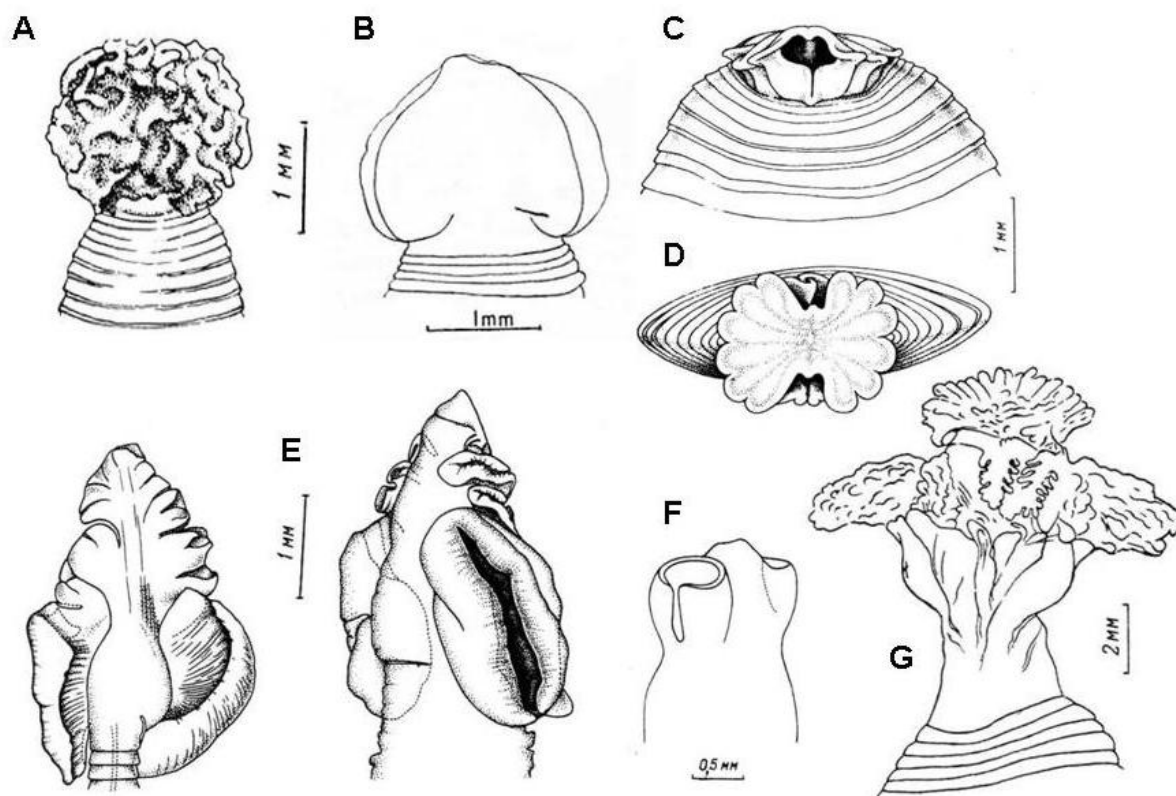
Diphyllbothriidi se mohou rozměrově velice lišit. Nejčastěji dosahují 1–2 m. Nejmenšími jedinci jsou *Diphyllbothrium wilsoni* (Shiple, 1907) či *D. minutus* Andersen, 1987 dosahující délky pouze několik milimetrů (Andersen 1987; Maltsev 2000). Na druhou stranu do této skupiny patří největší tasemnice, *Tetragonoporus calyptocephalus* Skryabin, 1961 parazitující ve žlučovodech vorvaňů (*Physeter catodon* L.), která dosahuje více než

30 m a může mít až 45 000 článků a každý s 4–14 pohlavními komplexy. Reprodukční schopnost těchto tasemnic je naprosto ohromující (Yurakhno 1992).



Obr. 3.4. Variabilita scolexů tasemnic řádu Diphyllbothriidea (mikrofotografie ze scanovacího elektronového mikroskopu, originál). **A** – *Duthiersia expansa* Perrier, 1873 z *Varanus salvator*, Vietnam; **B** – *Diphyllbothrium pacificum* (Nybelin, 1931) z *Callorhynchus ursinus*, Aljaška; **C** – *Glandicephalus perfoliatus* (Railliet & Henry, 1912) z *Leptonycholes weddelli*, Antarktida; **D** – *Scyphocephalus bisulcatus* Riggenbach, 1898 z *Varanus salvator*, Vietnam; **E** – *Diphyllbothrium latum* (L.) z *Mesocricetus aureus* (experimentální nákaza), Itálie; **F** – *Bothridium pithonis* Blainville, 1824 z *Xenopeltis unicolor*, Vietnam; **G** – *Diplogonoporus tetrapterus* (Siebold, 1848) z *Callorhynchus ursinus*, Aljaška.

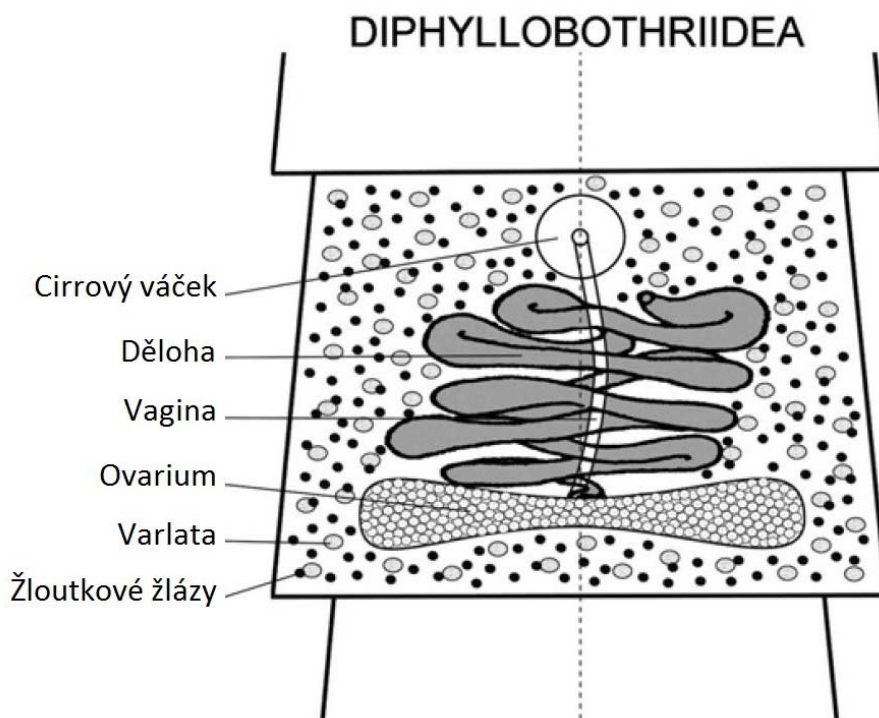
Exkreceční soustava se u většiny Diphyllbothriidů skládá ze dvou párů hlavních kanálů (dorzální a ventrální), nacházejících se většinou v medulárním, vzácně v kortikálním parenchymu. Dorzální pár kanálů je zpravidla užší, zatímco ventrální pár je širší. Výjimku tvoří například rod *Tetragonoporus* Skriabin, 1961, u kterých je exkreceční soustava tvořena spleťovou sítí kanálů, které se různě větví a vedou pouze v medulárním parenchymu. U tasemnic rodu *Baylisia* Markowski, 1952 se exkreceční kanály rozkládají pouze v kortikálním parenchymu (Yurakhno 1992).



Obr. 3.5. Variabilita scolexů tasemnic řádu Diphyllbothriidea (perokresby, převzato z Delaymure 1985, Markowski 1952a, b). **A** – *Plicobothrium golbicephalae* Rausch a Margolis, 1969 z *Globicephala melaena*; **B** – *Diphyllbothrium cordatum* Leuckart, 1863 z *Erignathus barbatus*; **C**, **D** – *Tetragonoporus calyptocephalus* (Skriabin, 1961) z *Physeter macrocephalus*; **E** – *Pyramicocephalus phocarum* (Fabricius, 1780) z *Erignathus barbatus*; **F** – *Baylisia baylisi* Markowski, 1952 z *Lobodon carcinophagus*; **G** – *Baylisiella tecta* (Linstow, 1892) z *Mirounga leonina*.

Pohlavní soustava je uložena v každém dospělém segmentu a u některých zástupců může být i zmnožena na dvě sady vedle sebe (*Diplogonoporus* Lönnberg, 1892), nebo mohou být zcela výjimečně mnohonásobně zmnoženy na 14 pohlavních komplexů v jednom článku (*Tetragonoporus*) či mohou být zmnoženy v podélném směru až na 307 pohlavních komplexů (*Baylisia*) (Yurakhno 1992). Samčí pohlavní soustava je tvořena mnohočetnými varlaty (testes), stočenými chámovody (sperm ducts) a oválným vnějším semenným váčkem (external seminal vesicle – ESV), který je napojen na oválný cirrový vak. Tvar, velikost a pozice těchto dvou orgánů je důležitým systematickým znakem (Delaymure a kol. 1985; Kamo 1999). Cirrus je neozbrojen a spolu s vaginou často vyúsťuje do společného pohlavního atria (genitál pore) antero-mediálně na ventrální straně segmentu nad děložním pórem. U rodu *Spirometra* vyúsťuje cirrus a vagina odděleně. Samičí pohlavní soustavu tvoří medulární vaječník (ovarium), který je uložen v zadní části segmentu. Žloutkové trsy jsou rozptýleny v téměř celé kortikální vrstvě s výjimkou oblasti kolem pohlavních komplexů.

Děloha je trubicovitá, stočena a v gravidních segmentech zabírá značnou část prostoru segmentu. Ústí na ventrální straně děložním pórem (uterine pore), který je uložen za pohlavním atriem (Obr. 3.6). Vajíčka jsou tlustostěnná, často opatřena víčkem (operkulovaná) a z definitivního hostitele vycházejí spolu se stolicí nerozrýhovaná (Kuchta a kol. 2008).



Obr. 3.6. Schématický nákres článku tasemnic řádu Diphyllobothriidea (Kuchta a kol. 2008, upraveno).

Životní cyklus těchto tasemnic je většinou tříhostitelský. Ze zralého vajíčka se ve vodě uvolňuje volně plovoucí obrvená larva – koracidium, které musí být pozřeno prvním mezihostitelem. Druhá larva – procerkoid se vyvíjí v tělní dutině buchanky. Třetí larvou je plerocerkoid, který se vyvíjí v obratlovcích (viz kap. 3.2.1.1.). Dospělci parazitují ve střevě tetrapodů, nejčastěji mořských savců (Obr. 3.7.) (Kuchta a kol. 2008). Dvouhostitelský cyklus je znám pouze u *Cephalochlamys namaquensis* (Cohn, 1906), který má pouze jednoho mezihostitele, buchanku *Thermocyclops infrequens* (Kiefer) a definitivního mezihostitele, kterým jsou africké žáby (Thurston 1967).

Současné fylogenetické studie na základě molekulárních údajů naznačují, že některé rody (např. *Diphyllobothrium*) jsou parafyletické a jiné rody jsou zřejmě neplatné (např. *Diplogonoporus*). Jedním z důkazů parafylie je blízká příbuznost *Diplogonoporus*

balaenopterae Lönnberg, 1892 s typovým druhem rodu *Diphyllbothrium*, *D. stemmacephalum* (Cobbold, 1858) (Arizono a kol. 2008; Yamasaki a kol. 2012).

Řád Diphyllbothriidea je v současnosti dělen na 3 čeledě (Kuchta a kol. 2008):

- **Cephalochlamyidae** Yamaguti, 1959 – parazité afrických žab:

Cephalochlamys Blanchard, 1908 – typový rod

Paracephalochlamys Jackson & Tinsley, 2001.

- **Scyphocephalidae** Freze, 1974 – parazité plazů Asie, Afriky, Austrálie a Jižní Ameriky:

Scyphocephalus Riggenbach, 1898 – typový rod

Bothridium Blainville, 1824

Duthiersia Perrier, 1873

- **Diphyllbothridae** Lühe, 1910 – parazité ptáků a savců:

Diphyllbothrium Cobbold, 1858 – typový rod

Baylisia Markowski, 1952

Baylisiella Markowski, 1952

Diplogonoporus Lönnberg, 1892

Flexobothrium Yurakhno, 1979

Glandicephalus Fuhrmann, 1921

Ligula Bloch, 1782

Plicobothrium Rausch & Margolis, 1969

Pyramicocephalus Monticelli, 1890

Schistocephalus Creplin, 1829

Spirometra Faust, Campbell & Kellogg, 1929

Tetragonoporus Skriabin, 1961

3.2.1. Diphyllbothriidea jako parazité člověka

Tasemnice tohoto řádu se mohou vyskytovat také u člověka a to jak ve formě dospělců ve střevě, tak ve formě plerocercoidů v tkáních a tělních dutinách. Doposud byli u člověka zaznamenáni zástupci tří rodů – *Diphyllbothrium*, *Spirometra* a *Diplogonoporus*. Zástupci rodů *Schistocephalus*, *Ligula* a *Pyramicocephalus* byly u člověka nalezeny pouze sporadicky (Ashford a Crewe 2003).

3.2.1.1. Rod *Diphyllobothrium* Cobbold, 1858

U tasemnic tohoto rodu nacházíme v segmentu zpravidla jednu sadu pohlavních orgánů, která ústí dvěma póry – děložním otvorem a za ním pohlavním atriem. Výjimkou je například druh *Diphyllobothrium stemmacephalum* z delfínů, ve kterém byly v některých segmentech nalezeny i dvě sady pohlavních komplexů (Yamane a kol. 1981). Další charakteristikou je tvar dělohy, která svými mnohočetnými těsně k sobě přimknutými kličkami tvoří tzv. rozetku (Kuchta a kol. 2008; Scholz a kol. 2009). Definitivním hostitelem tasemnic rodu *Diphyllobothrium* jsou rybožraví obratlovci (především mořští savci a rybožraví ptáci) (Tab. 3.1.) (Kamo 1999; Scholz a kol. 2009).

Rod byl navržen Cobboldem v roce 1858 pro druh *Diphyllobothrium stemmacephalum* Cobbold, 1858 nalezený u sviňuchy obecné, *Phocaena phocaena* (L.). Taxonomie rodu je velmi složitá. Je založena na morfologii dospělců, která je mezi zástupci celého řádu Diphyllobothriidea velmi podobná a morfologické znaky jsou často velmi variabilní a mezi jednotlivými druhy se překrývají (Cobbold, 1858; Vik, 1964; Andersen, 1971; Scholz a kol. 2009).

Rod *Diphyllobothrium* se podle dostupných molekulárních dat ukazuje jako polyfyletický (Yamasaki a kol. 2012; Kuchta a kol. 2013). Toto již bylo naznačeno i na základě morfologických údajů (Wardle a kol. 1974; Andersen 1987). Podle Korniyushina (2009) by tento rod měl být rozdělený na minimálně dva samostatné rody a to rod *Diphyllobothrium* s typovým druhem *D. stemmacephalum*, a rod *Dibothriocephalus* navržený již Lühem v roce 1899 pro *D. latum* a další v té době známé převážně sladkovodní zástupce (Korniyushin 2009).

Pro rozpory mezi morfologickými a molekulárními údaji, vyžaduje celý řád revizi. Doposud bylo do rodu *Diphyllobothrium* zařazeno a popsáno více než 100 druhů, ale pouze 34 z nich bylo zatím uznáno jako platné druhy (Tab. 3.1.) (Kamo, 1999; Kuchta, 2007).

Tab. 3.1. Platné druhy tasemnic rodu *Diphyllobothrium* Cobbold, 1858 (rozdělení podle typu životního cyklu).

Druh Autor	Druhý mezihostitel	Definitivní hostitel	Rozšíření	Reference
Sladkovodní zástupci				
<i>D. colymbi</i> ¹ Yamaguti, 1951	není znám	potáplice (<i>Colymbus stellatus</i>)	Japonsko	Kamo 1999
<i>D. dalliae</i> * Rausch, 1956	dálie (<i>Dallia pectoralis</i>) siven (<i>Salvenius malma</i>)	racek (<i>Larus argentatus</i> , <i>L. glaucescens</i>) pes (<i>Canis familiaris</i>) liška (<i>Alopex lagopus</i>)	Aljaška, Rusko (Dálný východ)	Rausch 1956, Hilliard 1960, Kamo 1999
<i>D. dendriticum</i> * (Nitzsch, 1824)	sladkovodní ryby ²	rybožraví ptáci ³ savci člověk (<i>Homo sapiens</i>)	cirkumpolární areál	Kamo 1999; Semenas a kol., 2001; Kuchta a kol., 2013
<i>D. ditremum</i> (Creplin, 1825)	sladkovodní ryby ⁴	rybožraví ptáci ⁵	cirkumpolární areál	Dörücü 1995; Kamo 1999
<i>D. latum</i> * (Linnaeus, 1758)	štika (<i>Esox lucius</i>) okoun (<i>Perca flavescens</i> , <i>P. fluviatilis</i>) mník (<i>Lota lota</i>) ježdíček (<i>Gymnocephalus cernuus</i>) candát (<i>Sander vitreus</i> , <i>S. canadensis</i>)	medvěd (<i>Ursus</i> spp.) pes (<i>Canis familiaris</i>) liška (<i>Vulpes vulpes</i>) kočka (<i>Felis catus</i>) vydra (<i>Lutra lutra</i>)	cirkumboreáln í areál	Delyamure a kol., 1985; Kamo 1999; Kuchta a kol., 2013
<i>D. vogeli</i> Kuhlow, 1953	koljuška (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	morčák <i>Mergus merganser</i>) racek (<i>Larus argentatus</i> , <i>L. ridibundus</i>)	Evropa	Kamo 1999; Kuhlow 1953;
Anadromní zástupci				
<i>D. alascense</i> * Rausch a Williamson, 1958	mník (<i>Lota lota</i>) koruška (<i>Osmerus mordax</i>)	pes (<i>Canis familiaris</i>)	Aljaška	Kamo 1999; Scholz a kol., 2009

Tab. 3.1. Pokračování

Druh Autor	Druhý mezipřenositel	Definitivní hostitel	Rozšíření	Reference
<i>D. nihonkaiense</i> * Yamane, Kamo, Bylund a Wikgren, 1986	lososovití (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i> , <i>O. keta</i> , <i>O. masou</i> , <i>O. nerka</i> , <i>Parahucho perryi</i>)	medvědovití – Ursidae	sever Tichého oceánu Aljaška (Kodiak Island)	Kamo 1999; Scholz a kol., 2009; Kuchta a kol., 2014 Kamo 1999; Scholz a kol., 2009
<i>D. ursi</i> * Rausch, 1954	losos (<i>Oncorhynchus nerka</i>)	medvědovití – Ursidae		
Mořští zástupci				
<i>D. cameroni</i> * Rausch, 1969	není znám	tuleň (<i>Monachus schauinslandi</i>)	Tichý oceán (Havaj)	Kamo 1999; Scholz a kol., 2009
<i>D. cordatum</i> * Leuckart, 1863	není znám	tuleň (<i>Erignathus barbatus</i> , <i>Phoca groenlandica</i>) mrož (<i>Odobenus rosmarus</i>) pes (<i>Canis familiaris</i>)	cirkumpolární areál	Kamo 1999; Andersen 1987
<i>D. elegans</i> (Krabbe, 1868)	není znám	čepcol (<i>Cystophora cristata</i>) tuleň (<i>Monachus monachus</i> , <i>Phoca vitulina</i>)	cirkumpolární areál	Kamo 1999; Andersen 1987
<i>D. fayi</i> Rausch, 2005	není znám	mrož (<i>Odobenus rosmarus</i>)	Aljaška	Rausch 2005
<i>D. fuhrmani</i> Hsü 1935	není znám	sviňucha (<i>Neophocaena phocaenoides</i>) plískavice (<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>)	Tichý oceán	Shirouzu a kol., 1999 Kamo 1999
<i>D. gondo</i> Yamaguti, 1942	není znám	kulohlavec (<i>Globicephala macrorhynchus</i>)	Japonsko	Kamo 1999
<i>D. hians</i> * (Diesing, 1850)	není znám	tuleň (<i>Erignathus barbatus</i> , <i>Histiophoca fasciata</i> , <i>Monachus monachus</i> , <i>Phoca vitulina</i> , <i>Pusa hispida</i>)	cirkumpolární areál	Kamo 1999; Andersen 1987

Tab. 3.1. Pokračování

Druh Autor	Druhý mezipřihostitel	Definitivní hostitel	Rozšíření	Reference
<i>D. lanceolatum</i> * (Krabbe, 1865)	síh (<i>Coregonus sardinella</i>)	tuleň (<i>Erignathus barbatus</i> , <i>Histiophoca fasciata</i> , <i>Phoca vitulina</i> , <i>Pusa hispida</i>) lachtan (<i>Callorhinus ursinus</i>) sviňucha (<i>Phocaena phocaena</i>) běluha (<i>Delphinapterus leucas</i>) pes (<i>Canis familiaris</i>)	cirkumpolární areál	Kamo 1999; Andersen 1987; Scholz a kol., 2009
<i>D. lashleyi</i> (Leiper a Atkinson, 1914)	není znám	tuleň (<i>Leptonychotes weddellii</i>)	Antarktida	Kamo 1999
<i>D. lobodoni</i> Yurakhno a Matsev, 1994	není znám	tuleň (<i>Lobodon carcinophagus</i>)	Antarktida	Kamo 1999
<i>D. macroovatum</i> Yurakhno, 1973	není znám	plejtvákovec (<i>Eschrichtius gibbosus</i>) plejtvák (<i>Balaenoptera acutorostrata</i>)	sever Tichého oceánu	Yurakhno 1973; Kamo 1999
<i>D. minutus</i> Andersen, 1978	není znám	tuleň (<i>Monachus schauinslandi</i>)	Tichý oceán (Havaj)	Kamo 1999
<i>D. orcini</i> * Hatsushika a Shiruzu, 1990	není znám	kostka dravá (<i>Orcinus orca</i>)	Tichý oceán	Nakazawa a kol., 1992; Kamo 1999; Kifune a kol., 2000
<i>D. pacificum</i> * (Nybelin, 1931)	mořské ryby jižního pacifiku ⁶	lachtan (<i>Callorhinus ursinus</i> , <i>Eumetopias jubata</i> , <i>Neophoca cinicera</i> , <i>Otaria byronia</i> , <i>Zalophus californianus</i>)	jižní Tichý oceán, Japonsko	Kamo 1999; Kuchta a kol., 2014
<i>D. phocarum</i> Delamure, Kurochkin a Skriabin, 1964	není znám	tuleň (<i>Pusa caspica</i>)	Kaspické moře	Delyamure a kol. 1985; Kamo 1999
<i>D. polyrugosum</i> Delamure a Skriabin, 1966	není znám	kostka (<i>Orcinus orca</i>)	Antarktida	Delyamure a kol. 1985; Kamo 1999

Tab. 3.1. Pokračování

Druh Autor	Druhý mezihostitel	Definitivní hostitel	Rozšíření	Reference
<i>D. pterocephalum</i> Delamure a Skriabin, 1967	není znám	čepcol (<i>Cystophora cristata</i>)	Atlantský oceán	Delyamure a kol. 1985; Kamo 1999
<i>D. quadratum</i> (Linstow, 1892)	není znám	tuleň (<i>Hydrurga leptonyx</i>)	Antarktida	Delyamure a kol. 1985; Kamo 1999
<i>D. rauschi</i> Andersen, 1978	není znám	tuleň (<i>Monachus schauinslandi</i>)	Tichý Oceán (Havaj)	Delyamure a kol. 1985; Kamo 1999
<i>D. roemeri</i> (Zschokke, 1903)	není znám	mrož (<i>Odobenus rosmarus</i>)	Atlantský oceán	Delyamure a kol. 1985; Kamo 1999
<i>D. scoticum</i> * (Rennie a Reid, 1912)	není znám	tuleň (<i>Hydrurga leptonyx</i>)	cirkumpolární areál	Kamo 1999
<i>D. skriabini</i> Yurakhno a Maltsev, 1993	není znám	tuleň (<i>Erignathus barbatus</i>)	Beringovo moře	Kamo 1999
<i>D. stemmacephalum</i> * (Cobbold, 1858)	není znám	delfín (<i>Tursiops truncatus</i> , <i>Grampus griseus</i>) sviňucha (<i>Phocaena phocaena</i>)	cirkumpolární areál	Kamo 1999; Andersen 1987; Yamane a kol., 1981
<i>D. wilsoni</i> (Shiple, 1907)	není znám	tuleň (<i>Ommatophoca rossi</i> , <i>Leptonychotes weddellii</i> , <i>Hydrurga leptonyx</i>)	Antarktida	Kamo 1999; Maltsev 2000

Rozdělení do skupin podle druhého mezihostitele – ryby.

* - druhy nalezené u člověka

¹ - nejspíše synonymum *D. ditremum*

² - Abyssocottidae, Atherinopsidae, Balitoridae, Comephoridae, Cottidae, Cottocomephoridae, Gadidae, Galaxiidae, Gasterosteidae, Osmeridae, Percichthyidae, Salmonidae

³ - Accipitridae, Alcidae, Corvidae, Gaviidae, Laridae, Pandionidae, Pelecanidae, Podicipedidae, Sternidae

⁴ - Abyssocottidae, Comephoridae, Cottocomephoridae, Gasterosteidae, Lotidae, Nemacheilidae, Osmeridae, Salmonidae

⁵ - potáplice (*Gavia* spp.), potápka (*Podiceps* spp.), kormorán (*Phalacrocorax* spp.), volavka (*Ardea cinerea*), polák (*Aythya marila*), raci (*Larus* spp., *Rissa tridactyla*), rybák (*Sterna hirundo*)

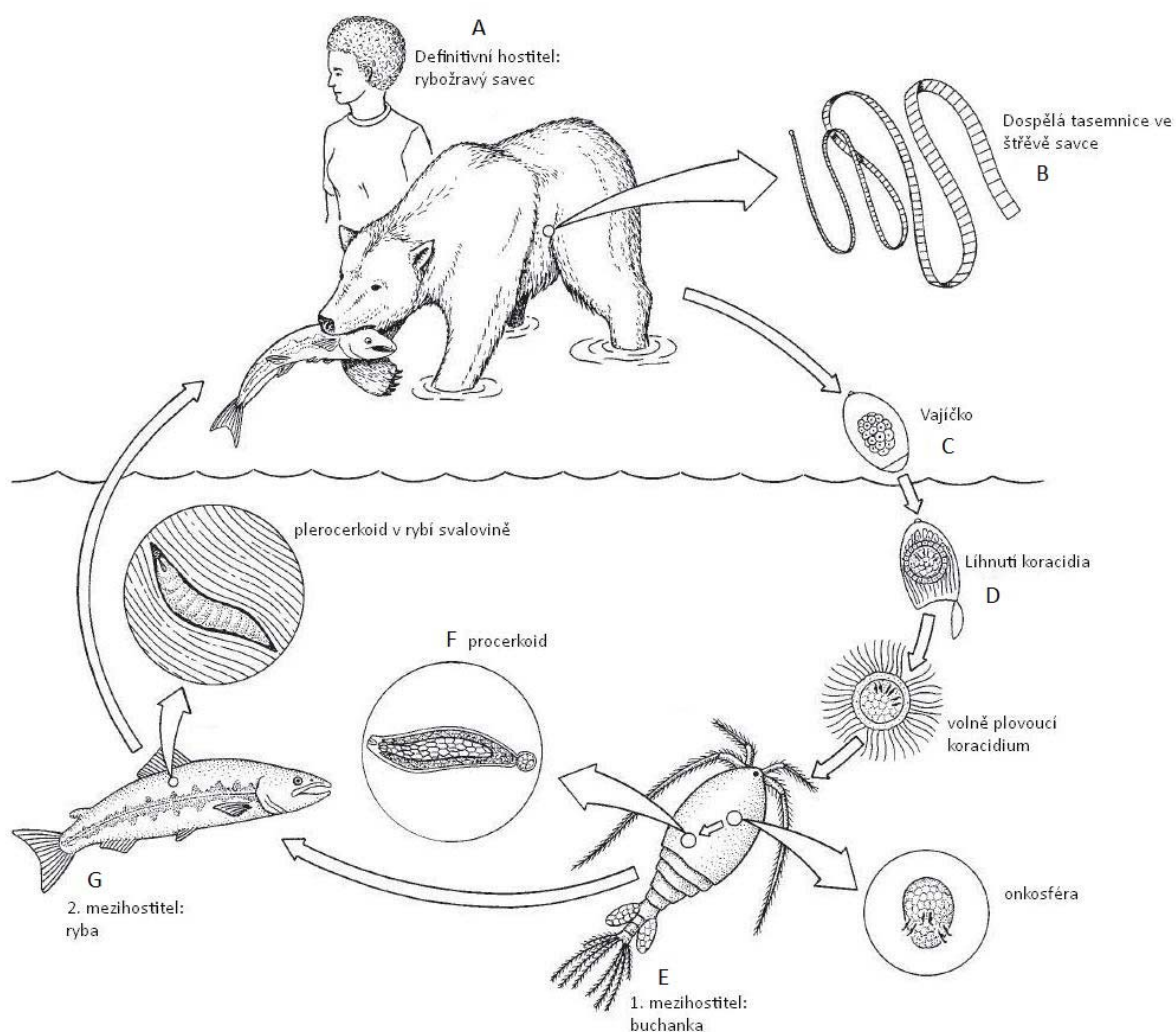
⁶ - *Sciaena deliciosa*, *Paralonchurus peruanus*, *Serirolella violacea*, *Trachinotus paitensis*, *Ariopsis seemanni*, *Paralichthys adspersus*

Životní cyklus tasemnic rodu *Diphyllobothrium*:

Oválná vajíčka s víčkem (operkulem) jsou 40 až 90 μm dlouhá a 30 až 60 μm široká a jsou z definitivního hostitele vylučována se stolicí. Pro další vývoj vajíčka je nutné, aby se dostalo do vody, kde se, v rozmezí od jednoho do několika týdnů, v závislosti na teplotě a světle, líhne obrvená larva – koracidium. V přední části vajíčka, kde se nachází operkulum, dojde k otevření vajíčka a koracidium se uvolňuje do vody. Koracidium má kulovitý tvar a těsně po vylíhnutí měří zhruba 50 μm v průměru. Aktivně plave pomocí cilií a ve vodě dojde ke zdvojnásobení jeho velikosti. Pod vnější vrstvou s ciliemi (brvami), nazývané embryofor (cca 10–30 μm tlusté), je uložena onkosféra s šesti embryonálními háčky. Koracidium má anaerobní metabolismus a během svého vývoje čerpá živiny uložené v embryoforu (Smyth a McManus, 1989; Conn a Świderski 2008; Scholz a kol. 2009).

Volně plovoucí koracidium svým pohybem láká prvního mezihostitele, kterým je korýš – klanonožec. Prvním mezihostitelem u sladkovodních a brakických druhů jsou nejčastěji klanonožci z řádu Diaptomidae (rody: *Acanthodiaptomus* Kiefer, 1932, *Arctodiaptomus* Kiefer, 1932, *Diaptomus* Westwood, 1836 nebo *Eudiaptomus* Kiefer, 1932), z řádu Calanoida (*Eurytemora* Giesbrecht, 1881 nebo *Boeckella* de Guerne & Richard, 1889), z řádu Cyclopidae (rody *Cyclops* O.F. Müller, 1776 a *Mesocyclops* G.O. Sars, 1914) (Vik, 1964; Eguchi, 1973; Torres a kol. 1980; Guttowa, 1961). U mořských zástupců, u kterých nejsou životní cykly příliš známé, je to například *Acartia clausi* Giesbrecht, 1889 z řádu Acartiidae (Hatsushika a kol. 1974). Jakmile se koracidium dostane do střeva prvního mezihostitele, při kontaktu s žaludečními sekrety, dojde k morfologické změně. Koracidium ztrácí brvy a embryofor se rozpadá a na jeho místě vzniká neoderm (Smyth a McManus 1989). Dojde k uvolnění onkosféry, která se přichycuje na stěnu střeva pomocí svých 6 embryonálních háčků, penetruje do tělní dutiny buchanky, kde přijímá živiny z hemolymfy. Onkosféra roste a mění se na procerkoid, který je na zadním konci opatřen cercomerem, ocasním přívěškem s šesti embryonálními háčky. Procerkoid je zhruba po dvou týdnech infekční pro dalšího mezihostitele, ve kterém pokračuje další vývoj (další larvální stadium) (Smyth a McManus 1989; Conn 2000). U buchank zřejmě dochází k ovlivnění jejich parazitem. Hůře se pohybují, mají tak sníženou schopnost uniknout predátorovi a jsou tak snadněji uloveny druhým mezihostitelem – rybou. tento jev byl pozorován u *Cyclops strenuus abyssorum* (Pasternak a kol. 1995). Po pozření infikované buchanky se ve střevě ryby procerkoid uvolní z buchanky. Procerkoid zůstává ve střevě nebo častěji penetruje stěnou střeva do břišní dutiny a na místo své lokalizace (stěna střeva,

žaludek, tělní dutina nebo svalovina), kde absorbuje potřebné živiny a mění se v plerocerkoid, klidové larvální stádium, které může být volně nebo encystované v pseudocystě. Zralý plerocerkoid může být dlouhý jen pár milimetrů nebo i několik centimetrů. Ve frontální části plerocerkoidu je již zformovaný skolex s přísavnou rýhou. K přenosu do definitivního hostitele dochází alimentární cestou, ve kterém se plerocerkoid začne ve střevě vyvíjet v dospělé. Růst je velmi rychlý. Během 7 až 14 dnů začne dospělá tasemnice produkovat vajíčka (Bonsdorff a Bylund 1982; Scholz a kol. 2009)



Obr. 3.7. Životní cyklus tasemnice *Diphyllobothrium latum*.

A – Definitivním hostitelem *D. latum* jsou rybožraví savci, včetně člověka. **B** – Dospělá tasemnice ve střevě definitivního hostitele. **C** – Vajíčka jsou uvolňována se stolicí. **D** – Vajíčka dozrávají ve vodě. Líhnou se z nich obrvená koracidia, která svým pohybem lákají buchanky. **E** – Prvním mezipostitelem jsou buchanky, které ve vodě požírají volně plovoucí koracidium. V buchance se koracidium mění na onkosféru, která se dostane do hemocoelu. **F** – V hemocoelu se onkosféra mění na procerkoid. **G** – Buchanka je pozřena rybou a ta se pak stane druhým mezipostitelem. (Roberts a Janovy 2009, upraveno)

Difylobotrióza:

Difyllobothrióza je rybami přenášená zoonóza, jejímž původcem jsou tasemnice rodu *Diphyllobothrium*. Toto onemocnění je ve většině případů asymptomatické. Mezi komplikace, které se mohou vyskytnout v souvislosti s infekcí *D. latum*, patří nejčastěji pocit slabosti a únavy, nevolnost a bolest břicha, řídká stolice až průjem a následná ztuhlost břicha, ale také zvýšená chuť na sůl (Bonsdorff 1977; Yamane a Shiwaku 2003), poruchy trávení a následná ztráta váhy nebo až anorexie (Chai a kol. 2005; Scholz a kol. 2009). Dalším symptomem může být megaloblastická anémie – způsobená nedostatkem vitamínu B12. U mladších jedinců se většinou symptomy projevují silněji než u starších. Někdy může dojít i ke zvracení (Bonsdorff 1977).

U člověka bylo nalezeno celkem 14 druhů tasemnic rodu *Diphyllobothrium*. Nejčastějším původcem je škulovec široký, *Diphyllobothrium latum* vyskytující se zejména v Evropě a Severní Americe (Scholz a kol. 2009). Druhým nejčastějším původcem je *D. nihonkaiense* Yamane, Kamo, Bylund & Wikgren, 1986 popsáný z Japonska, ale vyskytující se spolu s pacifickými lososi v Asii a Severní Americe (Yamane a Shiwaku 2003; Arizono a kol. 2009; Chen a kol. 2014). Třetím nejčastějším zástupcem je *D. pacificum* Nybelin, 1931, který se vyskytuje na Pacifickém pobřeží Jižní Ameriky (Baer a kol. 1967, Scholz a kol. 2009). Dalším původcem je arkticky rozšířený druh *D. dendriticum* (Nitzsch, 1824) (Kuchta a kol. 2013). Vzácně byli u člověka nalezeni i další zástupci (Scholz a kol. 2009) (Tab. 3.1.).

Difylobotrióza je kosmopolitně rozšířené onemocnění, i když lidské nákazy jsou obecně spojené s chladnými vodami (palearktické a nearktické oblasti, Jižní Amerika - Peru, Chile) (Kuchta a kol. 2014). Rozšíření Difylobotriózy je úzce spjato se tradicí konzumovat syrové nebo nedostatečně tepelně upravené ryby. V roce 1999 bylo odhadováno, že je difyllobotriózou celosvětově nakaženo 9 milionů lidí, zatímco novější odhad je zhruba 20 milionů lidí (Chai a kol. 2005).

Geografické rozšíření:

V Evropě je hlavním původcem difyllobotriózy *D. latum*. Známe tři hlavní endemické oblasti. 1) oblast Baltského moře (Finsko, Litva, Estonsko, Rusko). 2) oblast delty Dunaje (Rumunsko). V těchto dvou oblastech byl během posledních let zaznamenán pokles případů difyllobotriózy. Například v Estonsku se počet případů snížil o 40 % (z 750 případů v roce 1990 na - 440 případů v roce 1997) (Dupouy-Camet a Peduzzi 2004). Ve Finsku došlo také

k rapidnímu poklesu (z 20 % promoření populace v letech 1946-1947 na pouze 1,8% populace v letech 1968-1970) (Wikström 1972). 3) oblast - subalpínská jezera ve Švýcarsku, Francii a Itálii. Zde bylo zjištěno opětovné vzplanutí tohoto onemocnění, kdy v letech 1980–2002 bylo zaznamenáno 200 případů, zatímco v následujících pěti letech (2002–2007) bylo zaznamenáno až 320 případů (Scholz a kol., 2009). Lidské nákazy byly zaznamenány z Bielského jezera, jezera Morat, Ženevského jezera, Lago Maggiore, Komského jezera, jezera Iseo a z Gardského jezera (Kuchta a kol. 2014).

V Asii je difylobotrióza rozšířena v celé severní a východní části kontinentu. Drtivá většina případů difylobotriózy je z Japonska. Od roku 1970 je zde ročně hlášeno kolem 50 případů. Původně byly identifikovány jako *D. latum*, ale později se ukázalo, že jde o samostatný druh *D. nihonkaiense* (Yamane a Shiwaku 2003; Scholz a kol. 2009). Téměř padesát případů *D. nihonkaiense* bylo zaznamenáno v Jižní Koreji (Lee a kol. 2007).

V povodí velkých řek v Rusku od Uralu až po jezero Bajkal je široce rozšířeny sladkovodní druh *D. dendriticum* a v některých oblastech i *D. latum* (Kuchta a kol. 2013). Na pobřeží severního Tichého oceánu (Dálný východ) se vyskytuje druh *D. nihonkaiense*, se kterým byl synonymizován druh *D. klebanovski* Muratov & Posokhov, 1988 popsáný z delty Amuru v Rusku (Arizono a kol. 2009). V Číně bylo zaznamenáno 19 lidských nálezů popsáných jako *D. latum*. S největší pravděpodobností se však bude jednat o *D. nihonkaiense*, jak naznačují poslední studie (Chen a kol. 2014).

Difylobotrióza způsobená druhem *D. stemmacephalum* byla zaznamenána v Jižní Koreji a Japonsku. Původně byly lidské případy označovány jako *D. yonagoense* (Lee a kol. 1988; Andersen 1987) (Tab. 3.1.).

První případ nákazy tasemnicí *D. latum* v Severní Americe byl popsán v roce 1906 (Nickerson, 1906). Nejvíce záznamů pochází z oblasti Velkých jezer, Kanady a Aljašky. Mezi roky 1977 a 1981 bylo zaznamenáno až 200 případů, ale v posledních letech počet případů difylobotriózy značně klesl (Dick a kol. 2001; Scholz a kol. 2009). V roce 2008 byl zaznamenán první výskyt *D. nihonkaiense* v Severní Americe. Jednalo se o českého turistu, který v Kanadě v roce 2005 konzumoval polosyrové lososy (*Oncorhynchus nerka*) (Wicht a kol. 2008). Na Aljašce a v Kanadě bylo z člověka popsáno několik dalších zástupců: *D. alascense*, *D. dalliae*, *D. dendriticum*, *D. lanceolatum* a *D. ursi* (Tab. 3.1.).

Původním endemickým druhem na pobřeží Tichého oceánu (Chile, Peru, Ekvádor) je *D. pacificum*, mořský druh, který parazituje především u ploutvonožců (Tab. 3.1.). Předpokládá se, že do Jižní Ameriky byly zavlečeny také sladkovodní druhy *D. latum* a *D. dendriticum* (Torres a kol. 1981; Mercado a kol. 2010). Přítomnost přírodních ohnisek

D. dendriticum (ve pstruzích), na rozdíl od *D. latum*, byla prokázána i molekulárně (Kuchta a kol. 2013). Předpokládá se, že byl do Patagonie zavlečen se stěhovavými ptáky (Rybák obecný – *Sterna hirundo*, Rybák dlouhoocasý – *S. paradisea* nebo Racek vnitrozemský – *Larus pipixcan*) (Torres a kol. 1981).

První zaznamenaný případ lidské difylobotriózy v Jižní Americe byl v Argentině v roce 1911. Jednalo se o přistěhovalce z Ruska krátce po jeho příjezdu, o importovaný případ. První původní nákaza byla zaznamenána až za téměř 60 let, kdy byla v Peru poprvé zaznamenána autochtonní nákaza *D. pacificum* (Baer 1969; Semenas a Ubeda 1997; Semenas a kol. 2001). Od té doby bylo zaznamenáno více než 1000 dalších případů zejména z Peru, ale také několik z Chile a Ekvádoru (Kuchta a kol. 2014). V poslední době byly hlášeny případy difylobotriózy i v Brazílii (Rio de Janeiro, Sao Paulo). Jednalo se o téměř 50 případů zaznamenaných kolem roku 2005 jako *D. latum*, avšak bez potvrzení identity pomocí molekulárních dat. Nedávno byl jeden případ holandského turistu pravděpodobně infikovaného v Brazílii molekulárně identifikován jako *D. dendriticum* (Mercado a kol. 2010; Kuchta a kol. 2013, 2014).

Další druhy nalezené u člověka jsou označeny v tabulce 3.1.

3.2.1.2. Rod *Diplogonoporus* Lönnberg 1892

Charakteristickým znakem pro tento rod je přítomnost zpravidla dvou sad pohlavních orgánů v jednom segmentu. Odlišují se tak od tasemnic rodů *Tetragonoporus* Skriabin, 1961, u kterých se v jednom segmentu vyskytuje více sad pohlavních orgánů (Kamo, 1999). Existují ale i výjimky, jako například *Diplogonoporus balaenopterae* z plejtváka (*Balaenoptera acutorostrata*), u kterého bylo pozorováno až 5 pohlavních komplexů v jednom segmentu (Yamasaki a kol. 2012). Protože je počet sad pohlavních orgánů variabilní, nedá se tento znak považovat za dostatečně průkazný pro rodovou klasifikaci. Multiplikace pohlavních orgánů je spíše důkazem evoluční adaptace tasemnic (Yamasaki a kol. 2012).

Životní cyklus byl studován pouze u *Diplogonoporus balaenopterae*. Prvním mezihostitelem jsou korýši řádu Cyclopoida (*Oithona nana* Giesbrecht) nebo Calanoida (*Labidocera japonica* Mori) (Kamo a kol. 1973). Druhým mezihostitelem jsou zřejmě mořské ryby, například sardel (*Engraulis japonicus* Temminck a Schlegel) nebo sardinka (*Sardinops melanosticus* Temminck a Schlegel). Dospělci těchto tasemnic jsou parazité velryb a vzácně se mohou vyskytovat i u lidí nebo psů (Kamo 1999). Jediným známým druhem, který způsobuje lidskou nákazu je *Dipl. balaenopterae* Lönnberg, 1892. U člověka

byl původně popsán jako *Krabbea grandis* Blanchard, 1894 a v nedávné době byl tento druh synonymizován s *Dipl. balaenopterae* na základě molekulárních údajů (Yamasaki a kol. 2012). Tento druh běžně parazituje v tenkém střevě velryb, jako je například plejtvák malý (*Balaenoptera acutorostrata* Lacépède), plejtvák sejval (*Balaenoptera borealis* Lesson) nebo keporkak (*Megaptera novaeangliae* Borowski) (Kamo 1999; Yamasaki a kol. 2012).

První případ diplogonoporózy byl zaznamenán v roce 1894 v Japonsku jako *Bothriocephalus* sp. (Ijima a Kurimoto 1894). Drtivá většina případů pochází z Japonska, několik z Koreje, pouze dva nálezy je z Evropy a to ze Španělska (Clavel a kol. 1997; Pastor-Valle a kol. 2014). Doposud bylo zaznamenáno více než 200 případů (Scholz a kol. 2009; Kuchta a kol. 2014)

Mimo druh *Dipl. balaenopterae* bylo popsáno několik zástupců, z nichž považujeme pouze 3 za platné taxony (Tab. 3.2.) (Kamo 1999).

Tab. 3.2. Druhy tasemnic rodu *Dilogonoporus*.

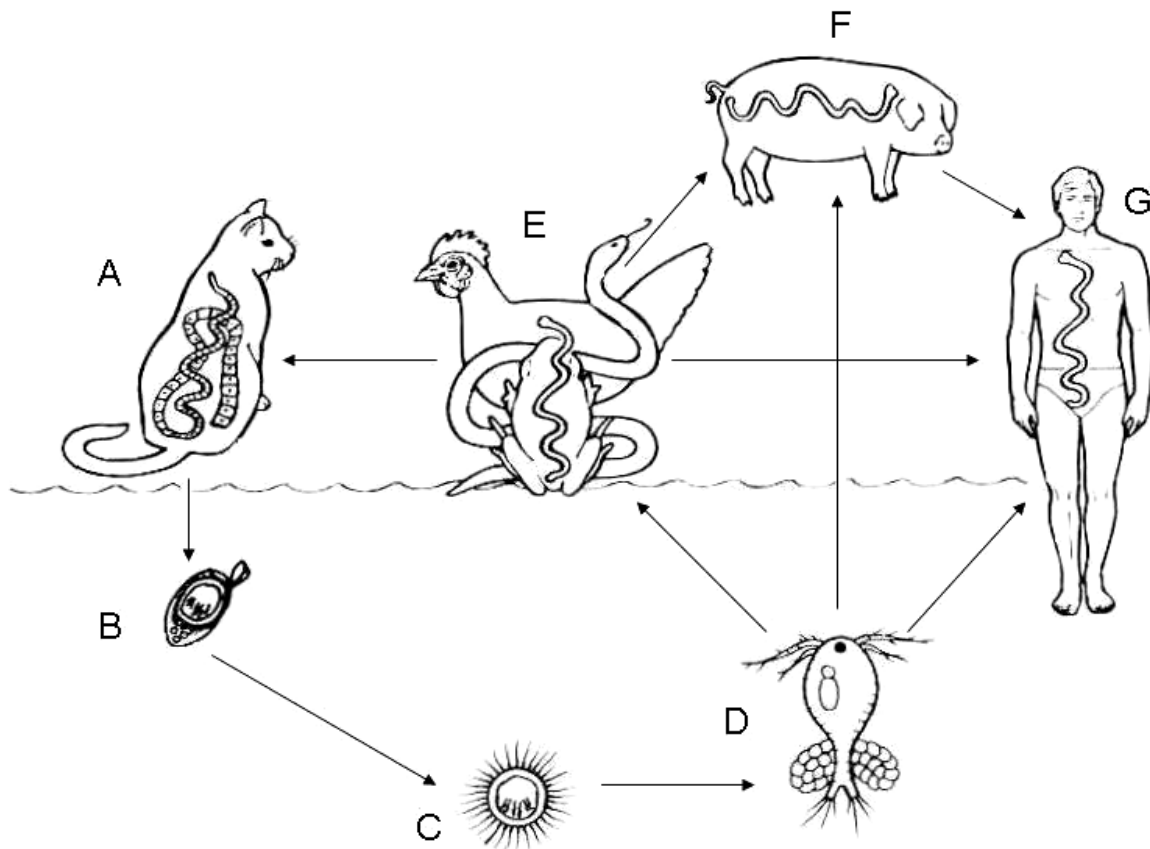
Druh Autor	Definitivní hostitel	Reference
<i>D. balaneopterae</i> * Lönnerberg 1892	plejtvák (<i>Balaenoptera acutorostrata</i> , <i>B. borealis</i> , <i>B. physalus</i> , <i>B. musculus</i>) keporkak (<i>Megaptera novaeangliae</i>)	Kamo 1999, Yamasaki et al., 2012
<i>D. tetrapterus</i> von Siebold 1848	tuleň (<i>Phoca vitulina</i> , <i>Pagophilus groenlandicus</i>), čepcol (<i>Cystophora cristata</i>), lachtan (<i>Eumetopias jubata</i> , <i>Callorhynchus ursinus</i>), norek (<i>Mustela vison</i>), vydra (<i>Enhydra lutris</i>)	Kamo 1999
<i>D. violetteae</i> Yurakhno 1986	lachtan (<i>Eumetopias jubata</i>)	Kamo 1999

* - druh nalezený u člověka

3.2.1.3. Rod *Spirometra* Faust, Campbell a Kellogg, 1929

Dospělci tasemnic rodu *Spirometra* Faust, Campbell a Kellogg, 1929 jsou parazity zejména u kočkovitých a psovitých šelem. Vyskytují se v tropických a subtropických oblastech celého světa (Daly 1981; Mueller 1974; Kuchta a kol. 2014). Rod *Spirometra* se odlišuje od rodu *Diphyllobothrium* na základě tvaru dělohy (jen několik kliček vs. mnoho neodlišitelných kliček), vyústění pohlavních orgánů (vagina a cirrus vyústíují odděleně, kap. 3.2.) a tvaru vajíček (vřetenovité vs. oválné). Dalším rozdílem je životní cyklus, ve kterém se

jako druhý mezihostitel vykytují ve čtyřnožcích, zatímco zástupci rodu *Diphyllobothrium* pouze v rybách (Mueller, 1974; Kuchta a kol. 2014).



Obr. 3.8. Schéma vývojového cyklu tasemnic rodu *Spirometra* se znázorněnými možnostmi lidské nákazy. **A** – definitivní hostitel kočka. **B** – vajíčko s operkulem. **C** – volně plovoucí koracidium. **D** – procerkoid v prvním mezihostiteli (*Cyclops* sp.). **E** – druhý mezihostitel (obojživelníci, plazi, ptáci). **F** – náhodný nebo paratenický mezihostitel (prase). **G** – člověk, jako náhodný či paratenický mezihostitel (Daly, 1981 – upraveno).

Člověk může být náhodně infikován larválními stádii tasemnic rodu *Spirometra* zvanými sparganum. Sparganóza je tedy onemocnění způsobené plerocerkoidy (sparganum) tasemnic rodu *Spirometra*, které migrují tělní dutinou a tělními orgány (Lee a kol. 1984; Min 1990). Bylo zaznamenáno také 13 případů střevní spirometrózy způsobené dospělcem rodu *Spirometra* v Koreji a v Japonsku (Lee a kol. 1984; Min 1990; Kuchta a kol. 2014).

Celosvětově bylo zaznamenáno více než 1600 lidských případů sparganózy (Qui a Qui 2009; Kuchta a kol. 2014). Nejvíce případů je zaznamenáno v Jihovýchodní Asii, kde je zřejmě hlavním původcem sparganózy *Spirometra erinaceieuropaei* Rudolphi, 1819. Nejvíce případů (více než 1000) pochází z Číny, odkud byl popsán první lidský případ Cobboldem (1883) jako *Ligula mansoni*. Vysoký počet případů byl zaznamenán také

v Japonsku (400), v Koreji (119) a v Thajsku (52) (Cobbold 1883; Min 1990; Kamo 2003; Anantaphruti a kol. 2011; Li a kol. 2011; Kuchta a kol. 2014).

Z Evropy, kde je původcem zřejmě také *S. erinaceieuropaei*, je známo pouze 9 případů (2 z České republiky, 2 z Francie a 5 případů z Itálie) (Pampiglione a kol. 2003; Reháč a kol. 2006; Kuchta a kol. 2013).

V Severní Americe byla lidská sparganóza popsána hlavně na jihovýchodním pobřeží Atlantiku a na pobřeží Mexického zálivu. Bylo popsáno více než 70 případů a jako původce je zde uváděna *Spirometra mansonoides* Mueller, 1935. První případ byl popsán v roce 1908 na Floridě. Následovaly další případy v jižní a střední části USA (Texas, Alabama, Tennessee, Mississippi, Georgia, Oklahoma, Missouri, Louisiana) (Mueller a kol. 1963; Swartzwelder a kol. 1964). Několik případů je známo také ze Střední Ameriky a Karibiku (Swartzwelder a kol. 1964; Kuchta a kol. 2014).

V Jižní Americe bylo zaznamenáno 16 případů a původce je zde zřejmě také *S. erinaceieuropaei*, nebo *S. mansonoides* (Kron a kol. 1991; Chung a kol. 2012).

V Africe bylo zaznamenáno celkem 30 případů a jako původce byly označeny druhy *S. theileri* (Baer, 1925) nebo *S. prestoriensis* (Baer, 1925), které byly v minulosti chybně označovány jako *S. mansoni* nebo *S. erinacei*. Africké druhy, na rozdíl od *S. erinaceieuropaei* či *S. mansonoides*, mají v životním cyklu velké savce, jako jsou například antilopy a zřejmě nemohou napadat plazy a obojživelníky (Opuni a Muller 1974; Kuchta a kol. 2014).

Člověk se může nakazit třemi možnými způsoby: 1) vypitím kontaminované vody s infikovanými buchankami, 2) konzumací nedostatečně tepelně upraveného masa infikovaných druhých či paratenických mezihostitelů (zejména hadů a žab) a 3) aplikací tradiční asijské medicíny a s ní spojené přikládání žabího či hadího masa na infikované rány, vředy nebo oči. Tato metoda léčby zánětů patří mezi tradiční formy medicíny v jihovýchodní Asii, zejména v Číně, Thajsku a ve Vietnamu. Plerocerkoidy jsou po přiložení na ránu aktivovány teplem těla člověka a migrují tak přímo do rány (Kuchta a kol. 2014).

Podle lokalizace můžeme sparganózu rozlišit na 5 typů:

1) Nejběžnější (přirozená) je podkožní forma. Sparganum penetruje skrz stěnu trávicího traktu do břišní dutiny, nebo přímo poraněnou pokožkou. V tomto případě plerocerkoid migruje do podkožního vaziva a povrchové svaloviny. Podkožní léze se spargamen tvoří hmatatelný pohyblivý a bolestivý vřídek (Kuchta a kol. 2014).

2) Další známou formou je oční sparganóza. V tomto případě dojde k migraci larvy do oční bulvy nebo jejího okolí a způsobuje tak značné podráždění oka. V extrémním

případě může zřejmě dojít až ke slepotě (Zhong a kol. 1983). Oční sparganóza je nejčastější v jihovýchodní Asii, ale byla zjištěna i u pacienta z České republiky, Francie a Indie (Kittiponghansa a kol. 1988; Mougeot a kol. 1999; Reháček a kol. 2006;). Běžné rozměry spargany se pohybují od 4 do 10 cm na délku a 1 až 3mm na šířku (Daly 1981), nejdelší *sparganum* vyjmuté z oka bylo dlouhé 44 cm (Otranto a Eberhard 2011).

3) U viscerální sparganózy larva migruje do hrudní nebo břišní dutiny a do vnitřních orgánů jako je pohrudnice (pleura) nebo osrdečníku (perikard), či do ňader a dalších orgánů. Způsobuje poškození vedoucí k omezení funkce dané tkáně nebo orgánu (Lee a kol. 2011).

4) Mozková forma sparganózy je nejnebezpečnější, ale poměrně vzácná. Pokud *sparganum* migruje v mozku nebo v páteřní míše, může dojít k mnoha klinickým projevům, jako například krvácení, zhoršení motoriky, bolesti hlavy, ztráta paměti, psychologické změny nebo například přecitlivělost kůže (Abdel Razek a kol. 2011; Deng a kol. 2011; Kuchta a kol. 2014).

5) Poslední, nejméně častou, ale velmi nebezpečnou, formou je proliferativní sparganóza. V tomto případě dochází k nekontrolovatelnému nepohlavnímu množení larev nazvaných *Sparganum proliferum*. Tyto larvy se nepravidelně větví a vzniká tak mnoho pupenů, které se oddělí a jako noví jedinci migrují do dalších tkání, kde se opět stejným způsobem množí. Touto formou může být postiženo mnoho tkání, jako například kostní tkáň a podkožní vazivo a všechny případy skončily smrtí (Mueller 1938; Kuchta a kol. 2014).

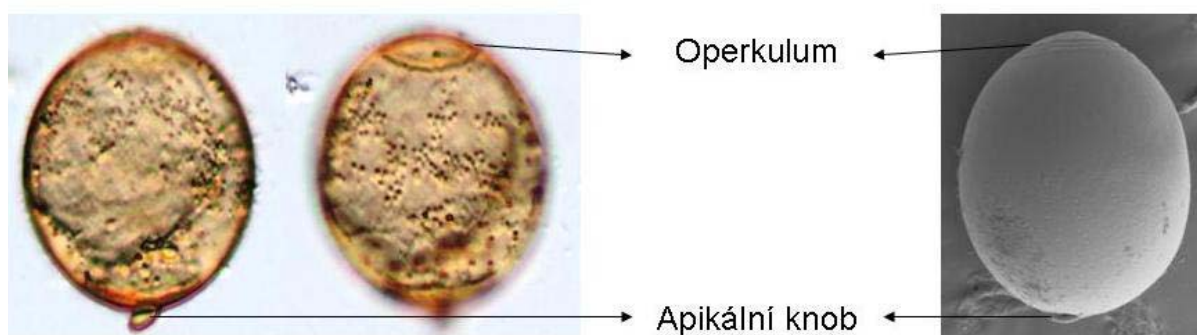
3.3. Vajíčka diphylobothriidů

Diagnostika difylobotriózy je velmi složitá, protože v klinických vzorcích stolice jsou často pouze vajíčka nebo vzácněji natrávené části strobily. Díky pevné a odolné skořápce jsou vajíčka jediným vhodným diagnostickým znakem. Nejčastěji používanými morfometrickými parametry jsou jejich délka a šířka, vzácněji pak jejich poměr (Andersen a Halvorsen, 1978). Dalším vhodným charakterem je struktura povrchu zralého vajíčka (Hilliard, 1960).

Vajíčka diphylobothriidních tasemnic se uvolňují nerozrýhovaná. K němu dochází až ve vodě, kam se vajíčko dostane se stolicí definitivního hostitele. Vývoj vajíček trvá průměrně 20–30 dní a na jeho rychlost má zásadní vliv teplota (Meyer 1967).

Vajíčka diphylobothriidů jsou polylecitální, silnostěnná s operkulem na jednom pólu a apikálním knobem na opačném pólu (Obr. 3.9.). První kresby vajíček tasemnice *D. latum* publikoval Goeze v roce 1782. Poukázal na odlišnosti od vajíček tasemnice rodu *Taenia*

(Bonsdorff 1977). Většina případů difylobotriózy je snadno diagnostikována pouze na úrovni rodů, ale může dojít k záměně s některými zástupci motolic, jako je například *Paragonimus westermani* nebo *Clonorchis sinensis*, které mají také operculovaná vajíčka (Scholz a kol. 2009; Ash a Orihel 2007). Druhovú diagnostiku je však velmi obtížná a často je automaticky bez dalších důkazů diagnostikována jako *D. latum*, jako například u lidských nálezů *D. pacificum* nebo *D. nihonkaiense* z Peru či Japonska (Dick 2007; Lee 2007).



Obr. 3.9. Mikrofotografie vajíčka tasemnice druhu *Diphyllobothrium pacificum* z člověka (originál).

Pevná skořápka zajišťuje odolnost vajíčka i po několika tisících letech, jak dokazují archeologické nálezy z koprolýtů a mumií (Tab. 3.3. a 3.4.) (Bathurst 2005; Conn a Świderski 2008). Nejstarší nález vajíčka rodu *Diphyllobothrium* ze Starého světa je datován kolem roku 7600 př. n. l. a pochází z Kypru (Bailly a Bouchet 2013) a nejstarší nález vajíček z Nového světa, datován 4110–1950 př. n. l., byl nalezen v Chile (Tab. 3.3., 3.4.) (Ferreira a kol. 1984).

Tab. 3.3. Archeologické nálezy vajíček tasemnic rodu *Diphyllobothrium* ve Starém světě.

Druh	Období	Rozměry (µm)	Naleziště	Reference
<i>Diphyllobothrium</i> sp.	7600–7500 př.n.l.	neuvedeno	Kypr	Bailly a Bouchet 2013
<i>Diphyllobothrium</i> sp.	5259–5258 př.n.l.	70 x 47	Německo	Bailly a Bouchet 2013
<i>Diphyllobothrium</i> sp.	3917–3905 př.n.l.	55 x 39	Německo	Bailly a kol. 2005
<i>Diphyllobothrium</i> sp.	3384–3370 př.n.l.	55 x 39	Švýcarsko	Bailly a kol. 2005
<i>D. latum</i>	3100 př.n.l.		Francie	Goncalves a kol. 2003 (Dommelier a kol. 1998)
<i>Diphyllobothrium</i> sp.	700–300 př.n.l.	neuvedeno	Sudan	Bailly a Bouchet 2013
<i>Diphyllobothrium</i> sp.	400–300 př.n.l.	neuvedeno	Egypt	Bailly a Bouchet 2013
<i>D. latum</i>	100 př.n.l. – 500 n.l.		Německo	Goncalves a kol. 2003 (Jansen a Over 1962)

Tab. 3.3. Pokračování.

Druh	Období	Rozměry (µm)	Naleziště	Raference
<i>Diphyllobothrium</i> sp.	200–300 n.l.	neuvedeno	Izrael	Bailly a Bouchet 2013
<i>Diphyllobothrium</i> sp.	476 – 1492 n.l.		Německo	Goncalves a kol. 2003 (Herrmann 1985)
<i>D. latum</i>	13. stol. n.l.		Izrael	Goncalves a kol. 2003 (Mitchell a Stern 2000)
<i>D. latum</i>	13. – 17. stol. n.l.	neuvedeno	Česká rep.	Bartošová a kol. 2011
<i>D. latum</i>	15. stol. n.l.		Norsko	Goncalves a kol. 2003 (Schia 1979)
<i>D. latum</i>	15. – 16. stol. n.l.	50-65 x 38-48	Rep. Korea	Shin a kol. 2011

Tab. 3.4. Archeologické nálezy vajíček tasemnic rodu *Diphyllobothrium* v Novém světě.

Druh	Období	Rozměry (µm)	Naleziště	Raference
<i>D. pacificum</i> *	8000–2000 př.n.l.		Peru	Reinhard 1992
<i>D. pacificum</i>	4110–1950 př.n.l.	51-56 x 34-45	Chile	Ferreira a kol. 1984
<i>Diphyllobothrium</i> sp.	3645–435 př.n.l.	57,1 x 38,5	Kanada (Pacifik)	Bathurst 2005
<i>D. pacificum</i>	3000–2000 př.n.l.	23-58 x 18-54	Peru, Chile	Reinhard a Urban 2003
<i>Diphyllobothrium</i> sp.	3000–1200 př.n.l.		Peru	Callen a Cameron, 1960
<i>D. pacificum</i>	2850–2700 př.n.l.	58 x 38	Peru	Patrucco a kol. 1983
<i>D. latum</i>	300 př.n.l. – 200 n.l.		USA Michigan	Goncalves a kol. 2003 (McClary 1972)
<i>D. pacificum</i>	1020–1156 n.l.		Peru	Martinson a kol. 2003
<i>D. pacificum</i> **	12. stol. n.l.	57 x 39	Aljaška	Bouchet a kol. 2001
<i>Diphyllobothrium</i> sp.	13.–17. stol. n.l.	75 x 53	Aljaška	Bouchet a kol. 1999
<i>D. pacificum</i>	13.–16. stol. n.l.	neuvedeno	Chile	Santoro a kol. 2003

* - Před datováním uhlíkem – zřejmě chybně datováno

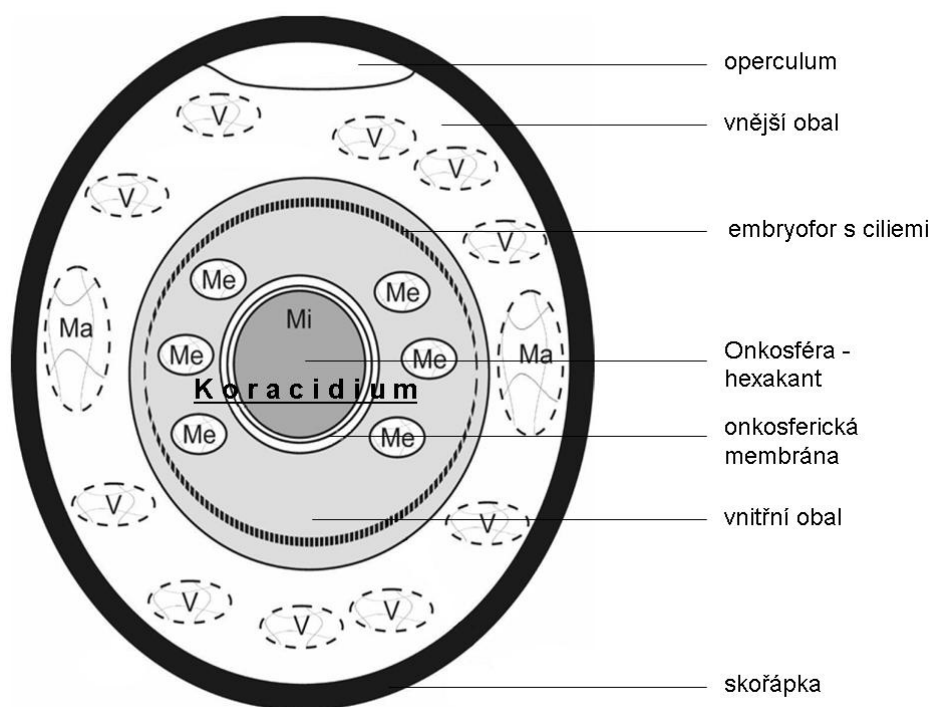
** - Chybné určení, pravděpodobně *D. nihonkaiense* nebo *D. latum* (Kuchta, nepublikované údaje)

3.3.1. Formování a vývoj vajíčka

Jak již bylo řečeno v kapitole 3.1., samičí zárodečné buněčné linie tvoří vitelocyty a oocyty. Vitelocyty zrají ve žlutkových folikulech a oocyty v ováriích. Formování vajíček u druhu *Diphyllobothrium nihonkainese* podrobně studoval Yamane a kol. (1983). Zralý vitelocyt se uvolní ze žlutkové žlázy do viteliního rezervoáru, kde jsou kulovité vitelocyty dočasně uloženy. Měří v průměru 3–10 µm a obsahují početné granule. Oocyty vychází z ovarii krátkým oviduktem a jsou obalovány vitelocyty. K fertilizaci a formování vajíčka dochází v ootypu (Smyth 1956; Yamane a kol. 1983). Vitelocyty nejdříve obklopují oocyt a na svém povrchu utvářejí kapsuli, která pak chrání celé embryo i s vitelocyty. Na vnitřní straně kapsule se posléze začne hromadit materiál produkovaný vitelocyty a vytvoří tak vláknitou fibrozní strukturu, která je považována za prekursor skořápky (Conn a Świdorski 2008).

V proximální části uteru, blízko ootypu, se objevují první rozpoznatelná vajíčka, která jsou čtyřikrát větší než zralá vajíčka, mají asymetrický tvar a na povrchu mají již zmíněnou tenkou měkkou fibrózní strukturu (Hilliard 1972; Yamane a kol. 1983). Během sestupování vajíčka dělohou se vláknitá děravá struktura povrchu mění v silnou hladkou skořápku. Ve střední části dělohy jsou vajíčka, která již mají znatelné operkulum (Yamane a kol. 1983). Plně zformované vajíčko má pevnou skořápku a dobře rozpoznatelné operkulum tvořené švem (Conn a Świderski 2008).

Další vývoj vajíčka probíhá u difylobotridů po uvolnění z mateřské tasemnice ve vodě. Pod vitellinní kapsulí se z makromerů (Ma, blastocytů vzniklé při mitotickém dělení zygoty) formuje vnější syncytiální obal embrya (Obr 3.3.1.). Syncytiální vnitřní obal embrya vzniká z mesomerů (Me, blastocytů). Embryo, ze kterého se později vyvíjí larva (hexakant), vzniká dělením mikromerů (Mi, blastocytů). Vitellinní kapsule je z vnější strany obalena skořápkou. Vitelocyty a makromery jsou rozvolněné a tvoří jednotné syncytium – vnější schránku embrya. Ve vnitřním obalu embrya vzniká embryofor s ciliemi (brvy). Embryo se mění v hexakant, který je obalen onkosférovou membránou, a vytváří tak onkosféru. Onkosféra s obrveným embryoforem vytváří koracidium, které díky ciliím na povrchu může po opuštění vajíčka volně plavat ve vodě (Conn and Świderski 2008). Struktura vyvinutého vajíčka difylobotridů je schématicky zobrazena na obrázku 3.10.



Obr. 3.10. Schématické znázornění vyvinutého polylecitálního vajíčka Diphyllobothriidních tasemnic. **Mi** – mikromery, **Me** – mesomery, **Ma** – makromery, **V** – vitelocyty. (Conn and Świderski 2008 – upraveno)

3.3.2. Morfometrie a struktura povrchu vajíček Diphyllbothriidů

Vajíčka diphyllbothriidních tasemnic mají pevnou skořápku a tak jsou vhodná pro morfologické a morfometrické studie. Při morfometrických studiích se sleduje délka a šířka vajíčka (Magath 1919; Vergeer 1936; Hilliard 1960; Andersen a Halvorsen 1978) a dále pak také poměr těchto hodnot (šířka ku délce) (Andersen a Halvorsen 1978). Rozměry jednotlivých zástupců se však prolínají a ani v rámci jednoho druhu nejsou stálé (Vergeer 1936; Andersen a Halvorsen 1978; Tsuboi a kol., 1993).

Rozměry vajíček tasemnice *D. latum* studoval Vergeer (1936), který mimo jiné poukázal na chybně uváděné údaje ve starších pracích. Z literatury není vždy jasné, odkud nalezená vajíčka pochází, jestli se jedná o vzorky lidské nebo z jiných hostitelů. Nebývá uvedeno, kolik vajíček bylo měřeno či z kolika jedinců tasemnic (Vergeer 1936). Další chybou je uvádění pouze průměrných hodnot měření (Andersen a Halvorsen 1978).

Hilliard (1960) studoval vajíčka a koracidia 11 druhů diphyllbothriidů, která rozdělil do tří ekologických skupin podle toho, kde dochází k nákaze prvního a druhého meziphostitele, a to na sladkovodní, mořské a braktické druhy. U mořských druhů byl poměr šířky ku délce nižší než 0,69 zatímco u sladkovodních byl vyšší (Hilliard 1960), to znamená, že vajíčka sladkovodních druhů jsou více kulatá. Magath (1929) pozoroval, že mladé tasemnice *D. latum* produkují menší vajíčka než tasemnice starší a to zhruba o 10 μm v obou rozměrech. Poměr šířky ku délce se stářím tasemnice neliší (Magath 1929). Tyto výsledky potvrdila studie sladkovodních druhů *D. latum*, *D. dendriticum* a *D. ditremum* (Andersen a Halvorsena 1978). Sledovali velikosti vajíček v rámci jednoho druhu v závislosti na stáří tasemnice, na intenzitě infestace a na definitivním hostiteli (*Mesocricetus auratus* pro *D. ditremum*, *D. latum* i *D. dendriticum*; *Alopex lagopus* pro *D. latum*; *Canis familiaris*, *Larus ridibundus* a *Larus canus* pro *D. dendriticum*). Poměr šířky ku délce u sladkovodních druhů byl menší než 1:1,45. Vajíčka druhu *D. dendriticum* se v prvních 10 až 12 dnech produkce zvětšovala. Dále už nebyla pozorována žádná korelace mezi velikostí a stářím tasemnice. Porovnávali také rozdíly ve velikosti vajíček u sledovaných druhů. Druh *D. ditremum* má nejmenší vajíčka z těchto druhů a *D. latum* má největší vajíčka a znatelně širší než *D. dendriticum*. (Andersen a Halvorsen 1978). Morfometrie a tvar vajíčka napomohl diagnostice lidského nálezu *D. pacificum* v Japonsku. Z uvolněné strobily byla kultivovaná vajíčka, která byla menší než doposud pozorované lidské druhy a byla také kulatější. I při skenovací elektronové mikroskopii byl potvrzen původ vajíčka a to díky typickým hlubokým důlkům po celém povrchu vajíčka (Makiya a kol., 1987).

Tab. 3.5. Morfologie vajíček uvedená v literatuře.

Zástupce	Hostitel	Velikost vajíček (μm)	S.E.M.	Reference	
<i>D. alascense</i>	<i>Canis familiaris</i>	56–79 x 43–67; (73 x 48)		Rausch a Williamson 1958	
		56–80 x 38–67; (68 x 48)		Hilliard 1960	
<i>D. cameroni</i>	<i>Homo sapiens</i>	51 x 40		Maejima a kol. 1983	
	<i>Monachus schauinslai</i>	41–52 x 33–37; (47 x 35)		Rausch 1969	
<i>D. cordatum</i>	<i>Canis familiaris</i>	65–75 x 42–44; (70 x 43)		Hilliard 1960	
	<i>Erignathus barbatus</i>	60–71 x 41–44; (65 x 42)		Hilliard 1960	
<i>D. dalliae</i>	<i>Homo sapiens</i>	51–71 x 37–58; (65 x 40)		Rausch 2005	
	<i>Homo sapiens</i>	58–73 x 44–54; (67 x 50)		Hilliard 1960	
<i>D. dendriticum</i>	<i>Larus glaucescens</i>	49–64 x 38–45; (59 x 43)		Hilliard 1960	
	<i>Canis familiaris</i>	56–67 x 40–52; (62 x 44)		Torres a kol. 1989	
<i>D. ditremum</i>	<i>Homo sapiens</i>	59–61 x 39–41		Serdyukov 1972	
		50–64 x 36–43		Wicht a kol. 2008	
		63–70 x 49–53; (64 x 49)		de Marval a kol. 2013	
	Laridae	61 x 39		Thomas 1946 ¹	
	<i>Larus argentatus</i>	55–61 x 36–43; (58 x 41)		Hilliard 1960	
		51–62 x 40–45; (58 x 43)		Hilliard 1960	
	<i>Larus glaucescens</i>	56–65 x 42–44; (60 x 42)		Hilliard 1960	
	<i>Larus ridibundus</i>	54–59 x 39–42; (56 x 40)		Kuhlow 1953	
	<i>Larus</i> spp.	51–54 x 34–39; (53 x 38)		Torres a kol. 1989	
	<i>Mesocricetus auratus</i>	58–68 x 43–49; (66 x 45)		Andersen a Halvorsen 1978	
		65 x 47		Vik 1957 ²	
	<i>Vulpes lagopus</i>	64–67 x 45–49; (65 x 47)		Andersen a Halvorsen 1978	
	<i>D. ditremum</i>	<i>Gavia immer</i>	49–62 x 35–42; (54 x 39)		Hilliard 1960
		<i>Mesocricetus auratus</i>	58–63 x 41–47; (60 x 43)		Andersen a Halvorsen 1978
			61–70 x 39–45; (66 x 43)		Yazaki a kol. 1988 ³
<i>D. elegans</i>	<i>Monachus schauinslandi</i>	37–41 x 26–30; (39 x 29)		Rausch 1969	
<i>D. fay</i>	<i>Odobenus rosmarus</i>	75–91 x 47–58; (84 x 55)		Rausch 2005 ⁴	
<i>D. fuhrmani</i>	<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>	45–55 x 64–75; (48 x 69)		Yauki a kol. 1982	
		45–47 x 63–66		Hsü 1935	
	<i>Orcinus orca</i>	61–71 x 43–51; (65 x 48)	x	Shirouzu a kol. 1999	
<i>D. gondo</i>	<i>Globicephalus scammoni</i>	45–54 x 54–78		Yamaguti 1942	
<i>D. hians</i>	<i>Monachus schauinslandi</i>	41–48 x 30–37; (42 x 34)		Rausch 1969	
<i>D. lanceolatum</i>	<i>Erignathus barbatus</i>	55–70 x 41–48; (64 x 46)		Hilliard 1960	
	<i>Phoeca barbata</i>	55–69 x 32–42; (61 x 40)		Stunkard a Schoenborn 1936	
<i>D. lasheyi</i>	<i>Leptonychotes weddelli</i>	52–63 x 32–42		Wojciechowska a Zdzitowiecki 1995	
<i>D. latum</i>	<i>Canis familiaris</i>	47–65 x 41–48; (60 x 44)		Torres a kol. 1989	
	<i>Felis catus</i>	63–75 x 46–51; (68 x 48)		Torres a kol. 1989	
	<i>Homo sapiens</i>	55–76 x 41–56; (64 x 47)		Magath 1919	
		70–75 x 46–52		Essex 1927	
	72–75 x 48–51		Podjapolskaja a Gnedina 1932 ⁵		
62–76 x 42–51; (67 x 46)		Rausch a Hilliard 1970			
55–75 x 43–53; (59–71 x 45–50)		Maejima a kol. 1991			

Tab. 3.5. Pokračování

Zástupce	Hostitel	Velikost vajíček (μm)	S.E.M.	Reference	
<i>D. latum</i>	<i>Homo sapiens</i>	68–72 x 48–50		Cavalcanti a kol. 2004	
		64 x 43		Lee a kol. 2007	
		71–73 x 55–59		Wicht a kol. 2007	
		40–60 x 50–85		Wicht a Peduzzi 2009	
		51–56 x 38–46; (53 x 41)		Knoff a kol. 2011	
			50–65 x 38–48		Shin a kol. 2011 *
		<i>Mesocricetus auratus</i>	60–66 x 45–49; (63 x 47)		Andersen a Halvorsen 1978
		<i>Vulpes lagopus</i>	64–67 x 48–49; (66 x 49)		Andersen a Halvorsen 1978
	<i>D. macroovatum</i>	<i>Balaenoptera acutorostrata</i>	81–92 x 46–51		Kamo a kol. 1980
	<i>D. nihonkaiense</i>	<i>Homo sapiens</i>	55–57 x 38–40	x	Yamane a kol. 1986
56–66 x 38–46				Yoshida a kol. 1999	
53–78 x 35–50; (56–59 x 39–46)				Maejima a kol. 1991	
60 x 41				Yera a kol. 2006	
57–58 x 44–45				Wicht a kol. 2007	
58–65 x 40–43				Shimizu a kol. 2008	
53–59 x 35–40				Wicht a kol. 2008	
57 x 44				Paugam a kol. 2009	
55–57 x 39–42			x	Jeon a kol. 2009	
62–74 x 42–48; (67 x 45)				Yanagida a kol. 2010	
<i>D. orcini</i>	<i>Homo sapiens</i>	61 x 42	x	Kifune a kol. 2000	
	<i>Orcinus orca</i>	67–70 x 47–58; (67 x 50)	x	Hatsushika a Shirouzu 1990	
<i>D. pacificum</i>	<i>Callorhinus ursinus</i>	50–60 x 36–40		Baer a kol. 1967	
		50 x 38		Maejima a kol. 1983	
		53 x 41		Rausch a kol. 2010	
		57–66 x 41–46; (63 x 43)	x	Maejima a kol. 1981	
		50–62 x 37–44		Stunkard 1948	
		51–60 x 39–42		Yamaguti 1951	
		<i>Homo sapiens</i>	50–56 x 38–43		Atias a Cattan 1976
			49–60 x 39–45		Kamo a kol. 1982
			52–59 x 42–50	x	Makiya a kol. 1987
			52–56 x 38–42	x	Tsuboi a kol. 1993
	48–60 x 35–41			González a kol. 1999	
	57 x 39			Bouchet a kol. 2001 *	
			23–58 x 18–54		Reinhard a Urban 2003 *
			53–61 x 34–43		Bathurst 2005 *
			54–58 x 42–44		Mercado a kol. 2010
			51 x 41		Rausch a kol. 2010
	<i>Neophoca cinerea</i>	63 x 33		Markowski 1952	
	<i>Otaria flavescens</i>	50–56 x 38–43		Cattan a kol. 1977	
<i>D. polygurosum</i>	<i>Orcinus orca</i>	63–71 x 47–52; (67 x 50)	x	Hatsushika a kol. 1987	
<i>D. quadratum</i>	<i>Hydrurga leptonyx</i>	47–62 x 34–45		Wojciechowska a Zdzitowiecki 1995	
		55 x 44		Linstow 1892	
<i>D. scoticum</i>	<i>Hydrurga leptonyx</i>	60–85 x 42–56		Wojciechowska a Zdzitowiecki 1995	

Tab. 3.5. Pokračování

Zástupce	Hostitel	Velikost vajíček (μm)	S.E.M.	Reference
<i>D. stemmacephalum</i>	<i>Globicephala melas</i>	58–65 x 40–50		Balbuena a Raga 1993
	<i>Homo sapiens</i>	55–58 x 42–45		Yamane a kol. 1981 ⁶
		65–68 x 47–49; (66 x 48)		Lee a kol. 1988
		59–63 x 43–46	x	Kumazawa a Matsouka 1998 ⁶
<i>D. subtile</i>	<i>Globicephalus scammoni</i>	60–87 x 45–57		Yamaguti 1942
<i>D. ursi</i>	<i>Larus glaucescens</i>	50–60 x 36–43; (55 x 41)		Hilliard 1960
	<i>Ursus arcto middendorffi</i>	51–75 x 37–48; (62 x 43)		Hilliard 1960
<i>D. wilsoni</i>	<i>Leptonychotes weddelli</i>	47–65 x 30–38		Wojciechowska a Zdzitowiecki 1995 ⁷
	<i>Leptonychotes weddelli</i> <i>Hydrurga leptonyx</i>	58–65 x 33–38		Wojciechowska a Zdzitowiecki 1995 ⁹
		43–59 x 34–46		Wojciechowska a Zdzitowiecki 1995 ⁸
<i>Diphyllobothrium</i> sp.	<i>Homo sapiens</i>	75 x 53	x	Bouchet a kol. 1999 *
		55 x 39	x	Bailly a kol. 2005 *
		66 x 45		Alós 2011
		55 x 78		Tavares a kol. 2005

identifikováno jako: ¹ – *D. oblongatum*; ² – *D. norvegicum*; ³ – *D. hottai*; ⁴ – *D. romeri*; ⁵ – *D. tungussicum*; ⁶ – *D. yonagoense*; ⁷ – *D. mobile*; ⁸ – *D. pseudowilsoni*; ⁹ – *D. scotti*; * - archeologický náleží ; S.E.M. – publikovaná mikrofotografie vajíčka ze skenovacího elektronového mikroskopu

3.3.2.1. Embryonální háčky

Další potenciální diagnostický znak, embryonální háčky onkosfér, byl detailně studován u sedmi druhů Diphyllbothriidů (*D. ditremum*, *D. latum*, *D. dendriticum*, *D. vogeli*, *Ligula intestinalis* L., *Schistocephalus solidus* (Müller, 1776) a *Spirometra erinacei*. Rozdíly byly zjištěny ve tvaru a velikosti háčků (Hussey 1950; Fraser 1960; Bonsdorff 1977; Yazaki 1982; Torres a kol. 2007).

Fraser (1960) studoval embryonální háčky u koracidí a procerkoidů u *D. medium* (syn. *D. dendriticum*), *D. ditremum* a *D. dendriticum*. Potvrdil, že tvar a velikost háčků je druhově specifický (Fraser 1960).

Bylund (1975) studoval háčky u larválních stádií druhů *D. ditremum*, *D. dendriticum*, *D. latum* a *D. vogeli*. Našel a popsal rozdíly u háčku v laterální pozici, diagnostika živého materiálu je složitá. Rozdíly ve tvaru háčků byly znatelné při studiu 3D struktury pomocí skenovací elektronové mikroskopie u druhů *D. latum*, *Diphyllbothrium* sp. a *Spirometry erinacei* (Yazaki 1982).

Na základě morfometrie a tvaru háčků se od sebe dají odlišit některé rody diphyllbothriidů (*Diphyllbothrium*, *Ligula* a *Schistocephalus*) (Fraser 1960). Mezi druhové rozdíly byly nalezeny u některých zástupců z rodu *Diphyllbothrium* (*D. dendriticum*, *D. ditremum*, *D. latum* a *D. vogeli*) (Bylund 1975). Problém této diagnostické metody je, že vajíčka vyloučená se stolicí musí být nejdříve kultivovaná minimálně dva týdny, aby došlo k vývoji onkosféry. Proto je tento znak nevhodný pro běžnou diagnostiku (Bonsdorff 1977; Torres a kol. 2007).

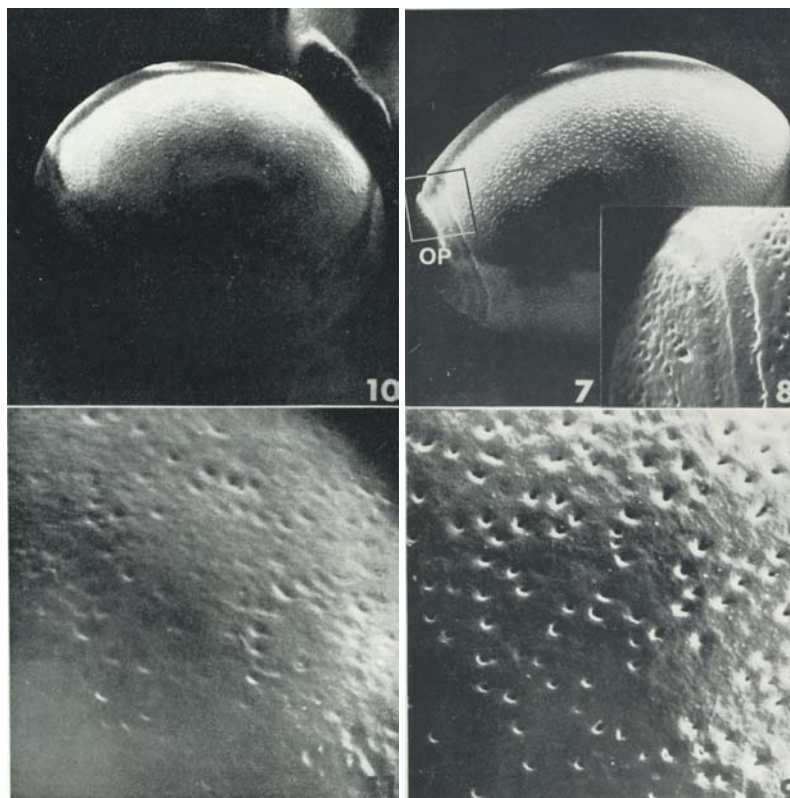
3.3.2.2. Struktura povrchu

Hilliard (1960) jako první studoval povrch vajíček u 11 druhů diphyllbothriidů. Zjistil, že různá struktura povrchu odpovídá ekologickým skupinám diphyllbothriidů. Mořské druhy mají na povrchu mnohočetné prohlubně, zatímco sladkovodní druhy mají povrch hladký.

Ishii a Miyazaki (1971) ve své práci porovnávali povrch vajíček pomocí skenovací elektronové mikroskopie u vajíček 7 zástupců motolic a tasemnic včetně *Diplogonoporus grandis* a *Diphyllbothrium nihonkaiense*. Povrch vajíček *Dipl. grandis* byl hustě pokryt hlubokými důlky trychtýřovitého tvaru, zatímco u *D. nihonkaiense* pozorovali daleko hladší povrch, důlky byly menší a ne tak hluboké (Obr. 3.11.). To později doložil ve své studii Hilliard (1972), který za použití scanovacího elektronového mikroskopu studoval 9 druhů (*D. alascense*, *D. cordatum*, *D. dendriticum*, *D. lanceolatum*, *D. latum*, *Diphyllbothrium* sp. z mrože, *Diplogonoporus balaneopterae*, *Pyramicocephalus phocarum* a *Spirometra*

mansonoides). Zjistil, že prohlubně u mořských druhů nejsou jednotné. Například vajíčka *D. alascense* mají na povrchu hluboké jasně definované důlky, které ale nejsou rovnoměrně ani hustě zastoupené na povrchu. Naopak u vajíček *Dipl. balaneopterae* pozoroval hustě rozmístěné hluboké prohlubně, které vytvářely velmi vrásčitý povrch vajíčka.

Yamane a kol. (1976) potvrdil Hilliardovy poznatky a potvrdil důležitost studia povrchu vajíček a použití tohoto znaku při diferenciální diagnostice. Studoval 3 druhy z rodu *Diphyllobothrium*, po jednom druhu z rodu *Diplogonopora* a *Spirometra* a to náhodně, experimentální i lidské nákazy. Pozoroval rozdíly i ve stavbě operkula. Potvrdil, že struktura povrchu odpovídá ekologickým skupinám. Povrch vajíček tasemnic rodu *Spirometra* má poměrně hladký povrch s řídko zastoupenými mělkými prohlubněmi (Yamane a kol. 1976).



Obr. 3.11. První SEM mikrofotografie vajíček tasemnic z řádu Diphyllobothriidea (Ishii a Miyazaki 1971). 7, 8, 9 – *Diplogonoporus grandis*; 10, 11 – *Diphyllobothrium nihonkaiense*.

Sladkovoní zástupci

Vajíčka této skupiny mají hladší povrch než vajíčka mořských zástupců (Hilliard 1960, 1972; Kamo a kol. 1982). Mezi druhy *D. latum* a *D. dendriticum* nebyly pozorovány žádné rozdíly ve struktuře povrchu ani ve vzhledu operkula (Andersen a Halvorsen 1978). Sladkovodní druhy mají tenčí skořápku než druhy mořské a pokud se na povrchu důlky vyskytují, jsou jen malé, mělké a špatně viditelné. Vajíčka *D. latum* z různých lokalit i

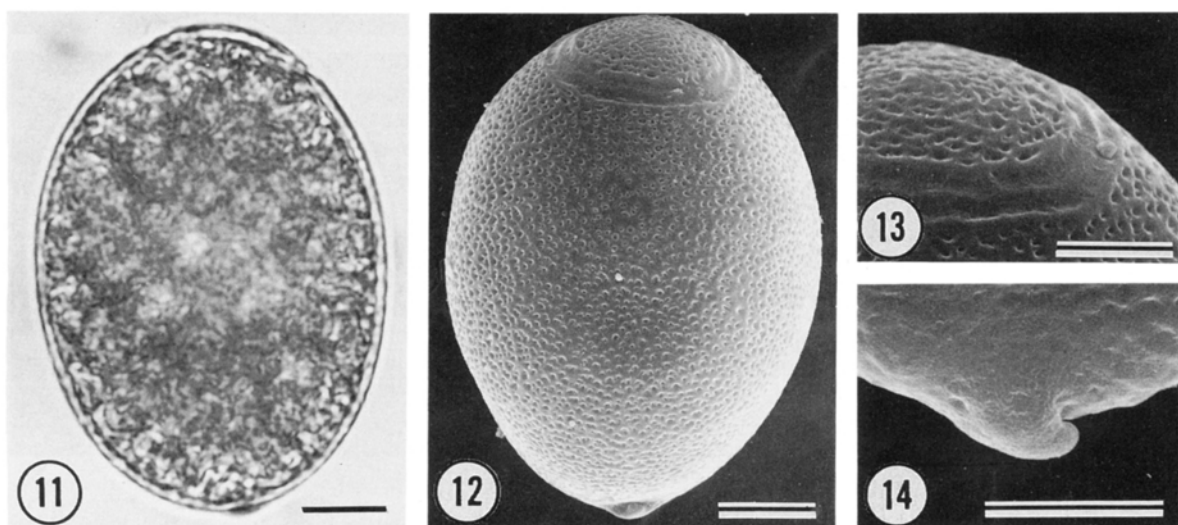
hostitelů této charakteristice odpovídají. Výjimku tvoří vajíčka zástupce *Spirometra erinacei*, u kterého byly na povrchu pozorovány velké důlky a byly i různě hustě rozmístěné na povrchu (Maejima a kol., 1983).

Anadromní zástupci

Povrch *D. nihonkaiense* je relativně hladký s řídce rozmístěnými mělkými prohlubněmi (Yamane a kol. 1986; Jeon a kol. 2009). Naopak u *D. alascense* byly na povrchu pozorovány mnohočetné důlky (Hilliard 1960, 1972; Maejima a kol. 1983).

Mořští zástupci

Vajíčka mořských zástupců mají silnější skořápku než druhy sladkovodní. Na povrchu jsou mnohočetné důlky (Hilliard 1960, 1972; Maejima a kol. 1983). Při porovnání mořského druhu *D. stemmacephalum* se sladkovodním *D. latum* byly důlky na povrchu mořského vajíčka hustěji rozmístěné po povrchu než u *D. latum* (Kamo a kol., 1982). U druhu *D. pacificum* byly na povrchu pozorovány hluboké důlky, hustě rozmístěné po povrchu, a relativně široké operkulum (Obr. 3.12.) (Makiya a kol., 1987; Yazaki a kol., 1990; Tsuboi a kol., 1993). Druh *D. fuhrmani* má masivní operculum s dvojitou rýhou, hluboké důlky hustě rozmístěné nerovnoměrně po povrchu (Maejima a kol., 1983; Shirouzu a kol., 1999). Maejima (1983) pozoroval skořápky s mnohočetnými důlky i u *D. macroovatum*. Popsal i rozdílnou tloušťku skořápky v rámci mořských druhů, vždy se ale jednalo o skořápku silnější než u druhů sladkovodních (Maejima a kol., 1983).



Obr. 3.12. *D. pacificum* z člověka (Tsuboi a kol., 1993). **11** – světelná mikroskopie; **12-14** – skenovací elektronová mikroskopie; **13** – detail masivního opercula; **14** – detail apikálního knobu.

3.3.3. Vývoj vajíček

Hlavní vliv na rychlost vývoje vajíček má teplota (Tab. 3.5.), která ovlivňuje jak délku vývoje vajíček, tak úspěšnost líhnutí. Líhnutí vajíček v odlišných teplotách studovali Wright a Curtis (2000). Při teplotě 10°C pozorovali úspěšné líhnutí u 50-80% vajíček. Při 20°C byla úspěšnost líhnutí o něco nižší (49-58%).

U *D. dendriticum* byl sledován vliv teploty a hloubky na vývoj vajíček. Bylo zjištěno, že hloubka vody nemá zásadní význam pro rychlost vývoje. Při inkubaci při 20°C se většina vajíček vylíhne během 21 dnů. Při 15°C trvá vývoj 35 dní a při 10°C trvá vývoj až 51 dní (Meyer 1967). Při 7°C trval vývoj vajíčka 48 dní (Kuhlow 1953). Při porovnání teplot 10°C a 20°C se nižší uvedená teplota jeví jako ideálnější. Při teplotě vody 10°C je sice doba vývoje delší, ale více vajíček se úspěšně vylíhlo (Wright a Curtis, 2000). Typické prostředí pro druh *D. dendriticum* jsou jezera v severní části Severní Ameriky a severní Evropy, kde se teplota vody v létě pohybuje mezi 8–14°C a koracidia jsou zde k dispozici až v polovině srpna (Wright a Curtis 2000).

Hatsushika (1981) jako první sledoval vývoj a líhnutí vajíček mořského druhu *D. macroovatum* z plejtváka malého (*Balaenoptera acutorostrata*). Nejlepší výsledky pozoroval při teplotě 18°C v mořské vodě. Při stejné teplotě v kohoutkové vodě došlo sice k vývoji vajíčka, ale nedošlo už k líhnutí. Z většiny vajíček se uvolnila koracidia po 8 až 10 dnech inkubace v umělé slané vodě při 18°C. Žádná vajíčka se nevyvíjela při teplotách 25°C až 27°C. Vylíhnutá koracidia přežila minimálně 4 dny při těchto podmínkách (Hatsushika 1981).

Kritická teplota pro přežití vajíček je -8°C. Při teplotě -10°C vajíčka umírají. Tento jev byl pozorován i u plerocerkoidů (Essex a Magath 1931; Wikgren a Nikander, 1964; Dörücü 1996). Nejkratší pozorovaná inkubační doba vajíček je 9–11 dní (Essex 1927). Nejčastěji uváděná doba líhnutí je 20–30 dní. Ideální teploty pro normální vývoj koracidia – 16–20°C (Rosen 1919).

Essex a Magath (1931) testovali vliv typu vody na kultivaci. Pilotní pokus probíhal v kohoutkové vodě. Dalším typem byla pramenitá voda a dešťová voda. Ze všech prostředí pozorovali stejný výsledek, takže typ vody na vývoj vajíček neměl vliv. Hilliard studoval i vliv světla, teploty, slanosti a tlaku na líhnutí vajíček a chování koracidí (Hilliard 1960).

Bizyulyavichus (1968) testoval odolnost a následnou životaschopnost vajíček, která byla ponechána v různém prostředí, a to v septikách, v půdě, v ledu, v chladné vodě pod ledem nebo dna vodních nádrží. U vajíček, která našel v septikách s propustnými stěnami,

pozoroval velkou životaschopnost a to i po celou zimu. V půdě pozoroval nejvíce životaschopných vajíček na podzim. Pokud vajíčka zamrzla v ledu nebo v písčitém či jílovém dně nádrží, životaschopnost byla minimální až nulová. Vajíčka, která přečkala celou zimu ve vodě pod ledem, se na jaře vyvíjela bez problému. Vývoj vajíček ve vodních nádržích závisí také na koncentraci kyslíku. Určujícími faktory pro úspěšné přežití a vývoj vajíček jsou teplota vody a nasycenost vody kyslíkem (Bizyulyavichus 1968). Podobné výsledky pozoroval již Vergeer (1936), kdy vajíčka byla schopná přežít teploty blízké mrazu. Také uvedl, že stáří vajíček není přímoúměrné stupni vývoje, protože záleží právě na teplotě, ve které se vajíčko vyvíjí (Vergeer, 1936).

Pro vývoj vajíček je důležitá také slanost vody. Hilliard (1960) při testech přežití vajíček potvrdil výskyt tří ekologických skupin. Vlastností, která odlišuje druh *D. latum* od *D. nihonkaiense* je právě vývoj vajíček v různě slané vodě. Vajíčka *D. nihonkaiense* se vyvíjejí pouze v brakické vodě, *D. latum* se vyvíjí pouze ve sladké vodě (Muratov a Posokhov 1989; Muratov a kol., 1992). Naopak například *D. macroovatum* pouze ve vodě mořské (Hatsushika 1981).

I volba hostitele má určitý vliv na úspěšnost vývoje vajíček. Le Bas (1924) provedl experimentální studii vývoje vajíček z různých hostitelů (kočata, opice, psi a dobrovolníci). Pouze u lidí došlo k nákaze všech jedinců. Ze tří koček byla úspěšně infikována pouze jedna. U psů ani opice nebyla nákaza úspěšná. Essex a Magath (1931) porovnávali vývoj vajíček *D. latum* ze psa a člověka. U vajíček ze psa nedošlo ke kompletnímu vývoji vajíček. Vajíčka kolabovala ve většině případů dříve, než došlo k vyvinutí koracidia. Úspěšný vývoj sledovali pouze u 0,96%. U žádného ze psů nebyla nákaza udržena déle jak dva roky. Většina testovaných psů vyloučila tasemnici po 6–8 měsících od nákazy. U vajíček z člověka se kultivace dařila a úspěšně se vyvinulo 79% vajíček. Novější pokusy se psi jako definitivním hostitelem byly úspěšnější, jako například studie Hilliarda (1960) nebo Andersen (1978).

Křeček zlatý se osvědčil jako dobrý náhradní hostitel při experimentálních studiích (Bråten 1966; Andersen 1971, 1975, 1978; Halvorsen a Andersen, 1974; Wright 2000). I když ve starší literatuře byla zaznamenána nižší životaschopnost vajíček. Vergeer (1936) při studii *D. latum* pozoroval úspěšný vývoj a líhnutí pouze u 29% vajíček, ale jednalo se o vajíčka odebraná přímo ze strobily a ne o vajíčka uvolněná se stolicí křečka. Ještě menší úspěšnost popsali Meyer a Vik (1963) v jejich experimentu na druhu *D. sebago* (syn. *D. dendriticum*). Úspěšné líhnutí zaznamenali jen u 5–10% vajíček. Na základě pozorovaných koracidíí uvedl Bråten (1966) pouze 11% úspěšnost fertility vajíček u druhu *D. norvegicum* (syn. *D. dendriticum*).

Tab. 3.5.: Teplota a délka vývoje vajíček tasemnic rodu *Diphyllobothrium*.

Teplota (°C)	Doba vývoje vajíček (dny)	Zástupce	Reference
16–20	-	<i>D. latum</i>	Rosen 1919
-	9–11	<i>D. latum</i>	Essex 1927
7	48	<i>D. dendriticum</i>	Kuhlow 1953
18–20	-	<i>D. latum</i>	Guttowa 1961
20	21	<i>D. dendriticum</i>	Meyer 1967
15	35	<i>D. dendriticum</i>	Meyer 1967
10	až 51	<i>D. dendriticum</i>	Meyer 1967
18	8–10	<i>D. macroovatum</i>	Hatsushika 1981
25–27	líhnutí neproběhlo	<i>D. macroovatum</i>	Hatsushika 1981
18–20	10–12	<i>D. latum</i>	Von Bonsdorff a Blund, 1982
10	29	<i>D. dendriticum</i>	Wright a Curtis, 2000
20	9–14	<i>D. dendriticum</i>	Wright a Curtis, 2000
20	20–30	<i>D. latum</i>	Torres 2004
20	20–30	<i>D. latum</i>	Torres 2007

4. MATERIÁL A METODY

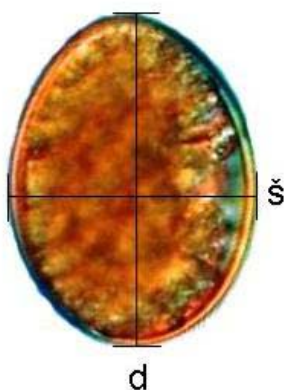
Materiál pro tuto magisterskou práci byl získán:

- A. Z fixovaných diphyllobothridních tasemnic získaných školitelem nebo z materiálu uložených v helmintologických sbírkách (Tab. 4.1.).
- B. Z experimentálních nákaz plerocercoidy *D. latum*.

4.1. Studium fixovaného materiálu

4.1.1. Studium morfometrie vajíček

Vajíčka pro studium byla získána z gravidních segmentů tasemnic fixovaných převážně ve 4% formalínu a uložených v 70% alkoholu. Gravidní segmenty jsem roztrhla pomocí pitevních nástrojů pod binokulární lupou v 70% alkoholu a uvolněná vajíčka jsem poté napipetovala na mikroskopické sklíčko a poté pozorovala ve světelném mikroskopu Olympus BX51. Vybraná nezdeformovaná a vyvinutá vajíčka jsem poté dokumentovala a měřila pomocí kamery a programu QuickPHOTO MICRO 2.3. Z morfometrických hodnot jsem měřila maximální délku a šířku vajíček (Obr. 4.1.). Celkem bylo proměřeno 1580 vajíček 64 vzorků náležících do 20 druhů diphyllobothriidních tasemnic (Tab. 5.1.).



Obr. 4.1: Mikrofotografie vajíčka *Diphyllobothrium cordatum* z *Erignathus barbatus* (originál). d – maximální délka; š – maximální šířka.

Data jsem poté zpracovala pomocí programu Microsoft Office Excel 2003 a programu Statistica 9 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

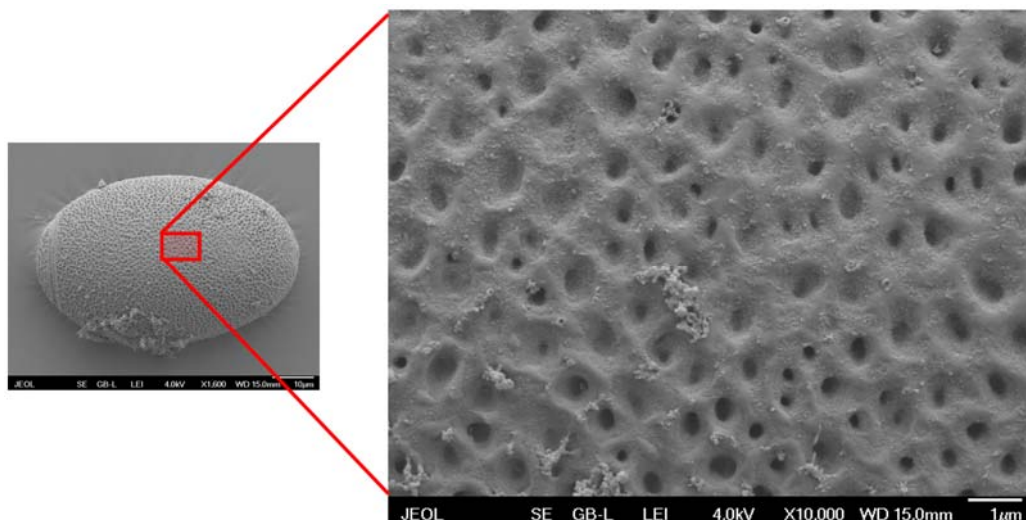
V programu Excel (Windows 7) jsem počítala průměrné hodnoty měření jednotlivých vzorků a také jejich minima, maxima a směrodatné odchylky. Počítala jsem i kulatost vajíček (poměr šířky ku délce).

Chtěla jsem zjistit, zda se vajíčka jednotlivých druhů od sebe liší. Stanovená nulová hypotéza zní, že se velikost vajíček mezi jednotlivými druhy neliší. Pro statistické zpracování metrických dat, jsem použila logaritmickou transformaci v programu Excel. Takto transformovaná data jsem zpracovala v programu Statistica 9. Poté jsem provedla analýzu variance a to jednocestnou ANOVu pro délku, šířku a kulatost. V případě průkaznosti byl použit Tukey test pro zjištění vzájemné odlišnosti jednotlivých vzorků v rámci testovaných skupin. Pro potvrzení nebo vyvrácení nulové hypotézy (H_0) byla ve všech případech zvolena 1% hladina významnosti testu. Pro vizualizaci podobnosti velikosti vajíček jednotlivých druhů v rámci vybraných skupin jsem vytvořila korelační diagram (Scatterplot) v programu Statistica 9.

4.1.2. Studium povrchu vajíček

Vybraní zástupci diphyllbothriidů (Tab. 4.2.) s gravidními segmenty byly podrobeny také přípravě pro skenovací elektronovou mikroskopii. Vzorky jsem odvodňovala ve vzestupně alkoholové řadě (po 15-ti minutách v 70%, 80%, 96% a dvakrát v 100% alkohol) a poté převedla do 1, 1, 1, 3, 3, 3–Hexamethyldisilazanu (HMDS; $C_6H_{19}NSi_2$). Po 10ti minutách jsem medium odstranila a vzorky ještě nechala po dobu minimálně 15-ti minut v digestoři. Vysušené vzorky jsem pod binokulární lupou připevnila pomocí preparačních jehel a pinzety na nosné hliníkové terčiky polepené oboustranně lepicí páskou. Vajíčka jsem uvolňovala z uteru pomocí preparačních jehel až při lepení vzorků na terčík. Poslední úpravou vzorku bylo pokovení zlatem ve vakuu (metoda iontového naprašování – cca 10–20 nm) v pokovovací aparatuře Polaron equipment LTD v Laboratoři elektronové mikroskopie (PaU, AV ČR).

Vzorky jsem prohlížela ve skenovacím elektronovém mikroskopu JEOL JSM-7401F v Laboratoři elektronové mikroskopie (PAÚ, AV ČR). Jedná se o nízkonapěťový mikroskop s ultravysokým vakuem (10^{-9} Pa) a rozlišením 1 nm při 15 kV a 1,5 nm při 1 kV. Zdrojem elektronů je studená autoemisní tryska typu (field emission – FE). Jednotlivá vajíčka jsem prohlížela a fotila při zvětšení 1.500–2.000 x a detail povrchu středu vajíčka pokaždé při zvětšení 10.000 x (Obr. 4.2.).



Obr. 4.2.: Ilustrační mikrofotografie způsobu dokumentace detailu povrchu pomocí skenovacího elektronového mikroskopu. Vajíčko druhu *D. skriabini* z tuleně vousatého (*Erignathus barbatus*) (ordinál).

Celkem jsem připravila a prohlédla 31 vzorků 17 druhů diphyllbothriidních tasemnic ze kterých bylo nafoceno 109 vajíček (Tab. 4.2.).

Tab. 4.2. Seznam vzorků diphyllbothriidních tasemnic použitých pro skenovací elektronovou mikroskopii.

Zástupce	Definitivní hostitel	Kód vzorku
<i>D. cameroni</i>	<i>Monachus schauinslandi</i>	KET 7 *
<i>D. cordatum</i>	<i>Odobenus rosmarus</i>	TS 08/40 *
	<i>Erignathus barbatus</i>	EB a+b
	<i>Erignathus barbatus</i>	TS 05/47
<i>D. dendriticum</i>	<i>Canis familiaris</i>	TS 08/37 Dde *
	<i>Mesocricetus auratus</i>	ZMUO 437a
	<i>Mesocricetus auratus</i>	ZMUO 437b
<i>D. lanceolatum</i>	<i>Erignathus barbatus</i>	TS 08/35 DLn *
	<i>Erignathus barbatus</i>	EB c
<i>D. latum</i>	<i>Canis familiaris</i>	TS 04/17
	<i>Homo sapiens</i>	PFIS 4 S1 1.
	<i>Homo sapiens</i>	PFIS 4 S1 2.
	<i>Homo sapiens</i>	PFIS 4 S1 3. *
	<i>Homo sapiens</i>	PFIS 4 S1 4.
	<i>Mesocricetus auratus</i>	ZMUO 7A
	<i>Mesocricetus auratus</i>	PFIS H S *
<i>D. macroovatum</i>	<i>Eschrichtius robustus</i>	TS 05/52 *
<i>D. nihonkaiense</i>	<i>Homo sapiens</i>	Dn1 *
<i>D. pacificum</i>	<i>Homo sapiens</i>	TS 08/38 *
	<i>Callorhynchus ursinus</i>	SAM 019A
	<i>Callorhynchus ursinus</i>	SAM 14 A
	<i>Neophoca cinerea</i>	AU 10
	<i>Canis mesomelas</i>	BMNH 1988.5.13 *
	<i>Arctocephalus pusillus doriferus</i>	AU 11

Tab. 4.2. Pokračování

Zástupce	Definitivní hostitel	Kód vzorku
<i>D. rauschi</i>	<i>Monachus schauinslandi</i>	USNPC 26205 *
<i>D. skriabini</i>	<i>Erignathus barbatus</i>	TS 05/48 *
<i>D. stemmacephalum</i>	<i>Lagenorhynchus acutus</i>	TS 08/39 DS *
<i>D. ursi</i>	<i>Mesocricetus auratus</i>	ZMUO D.ursi
<i>Diphyllobothrium</i> sp. 1 °	<i>Zalophus californicus</i>	USNPC 65882 *
<i>Diphyllobothrium</i> sp. 2 °°	<i>Globicephala melas</i>	GM - FR 420 *
<i>Diplogonoporus tetrapterus</i>	<i>Enhydra lutris</i>	USNPC 89772 *
<i>Scyphocephalus bisulcatus</i>	<i>Varanus salvator</i>	VHN85 *
<i>Tetragonoporus calyptocephalus</i>	<i>Physeter macrocephalus</i>	YU T.caly *

* Vzorky použité pro studii povrchu (viz. kapitola 5.2.)

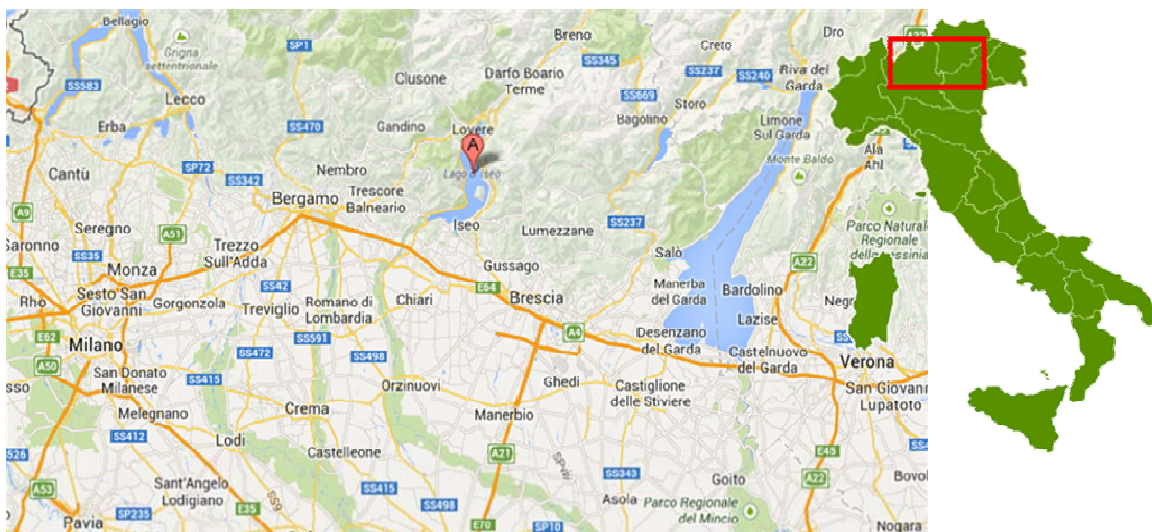
° — nový nepopsaný druh

°° — *Diphyllobothrium* A podle Balbuena a Raga (1993)

4.2. Materiál a metody pro studium vývojových cyklů

4.2.1. Experimentální nákazy

K experimentálním nálezům byly školitelem získány živé plerocerkoidy *Diphyllobothrium latum* z okounů (*Perca fluviatilis*) a mníků (*Lota lota*) z jezera Iseo v Itálii (Obr. 4.3.). Ryby byly odloveny 5. února 2013 a na ledu dopraveny do Laboratoře helmintologie (PAÚ AVČR), kde byly následně vypitvány. Z jednoho pozitivního mníka bylo získáno 10 živých plerocerkoidů, které byly encystovány na mesenteriu, žaludku a pylorických přivěscích. Svalovina jedenácti z 51 okounů obsahovala 22 volných (neencystovaných) živých plerocerkoidů *D. latum* (kód PFIS).



Obr. 4.3. Lokalita lovu okounů (*Perca fluviatilis*). A – jezero Iseo, Itálie (převzato z <https://maps.google.cz/>).

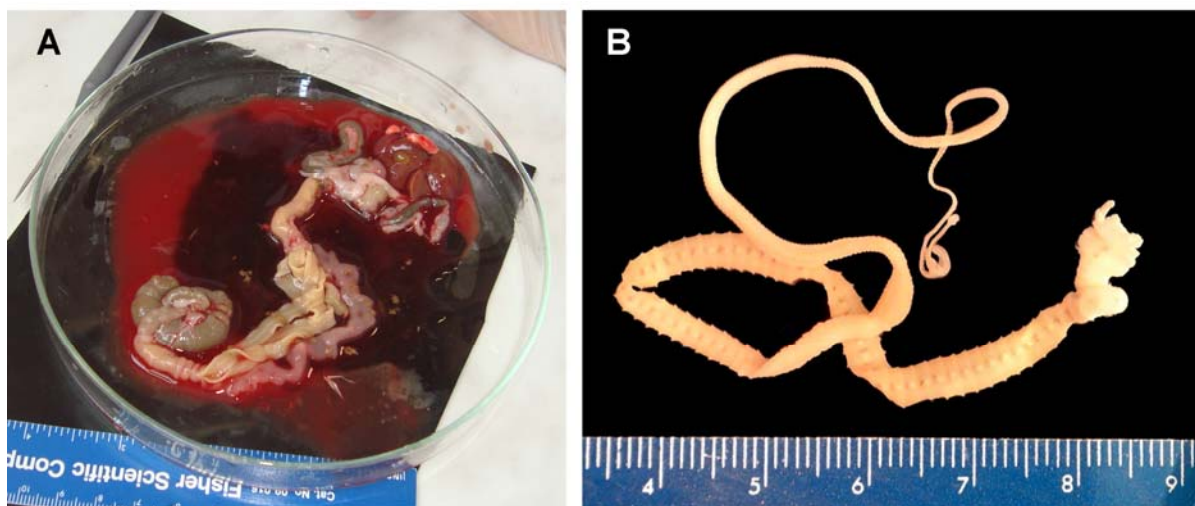
4.2.1.1. Experimentální nákaza křečků

Experimentálním hostitelem pro získání dospělců *D. latum* byl zvolen křeček zlatý (*Mesocricetus auratus*), který je k tomuto účelu běžně používán (Braten 1966; Andersen 1971, 1975, 1978; Halvorsen a Andersen, 1974; Wright 2000). Čtyři křečci byli perorálně infikováni živými plerocerkoidy *D. latum* (Tab. 4.3.). Křečci byli standardně chováni v prostorách zvěřince Parazitologického ústavu a po 10. den po infekci (10 DPI) byl testován jejich trus na přítomnost vajíček.

Tab. 4.3. Experimentální nákaza křečků (*Mesocricetus auratus*) plerocerkoidy *Diphyllobothrium latum*.

Mezihostitel	Počet plerocerkoidů	Definitivní hostitel	DPI	Počet dospělců <i>D. latum</i>
<i>L. lota</i>	5	křeček A	17	0
<i>L. lota</i>	5	křeček B	17	0
<i>P. fluviatilis</i>	5	křeček C	28	0
<i>P. fluviatilis</i>	7	křeček D	17	4

Pouze jeden ze čtyř experimentálně nakažených křečků (D) byl pozitivní na přítomnost vajíček *D. latum* (Tab. 4.3.). V tomto jedinci byli 17 DPI po narkotizaci a usmrcení nalezeny standardní pitvou 4 živí dospělí jedinci *D. latum* (Obr. 4.4.).



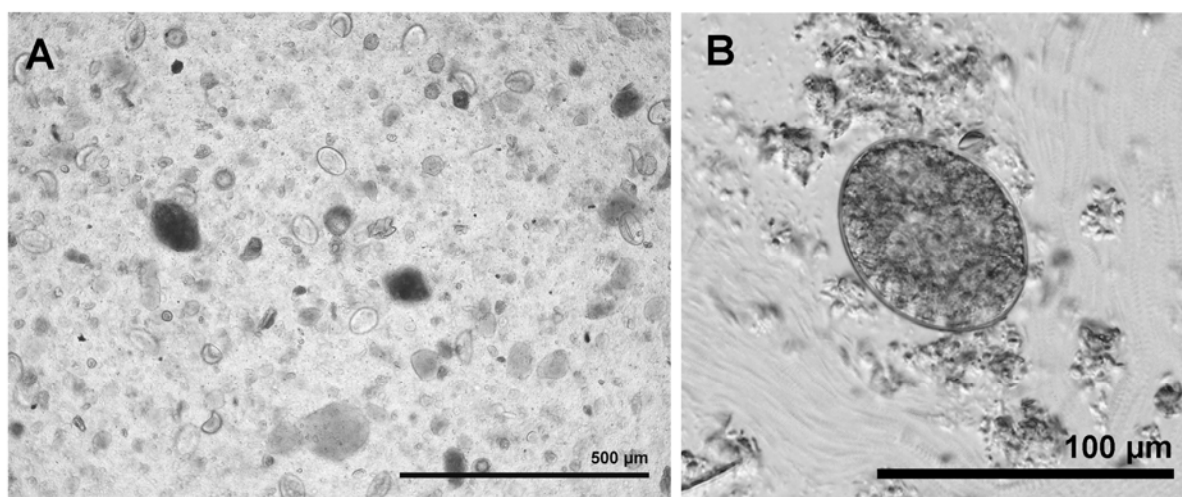
Obr. 4.4. A – střevo vypitvané z křečka se čtyřmi dospělci *D. latum*. B – dospělec tasemnice *D. latum* ze střeva pitvaného křečka.

Ze získaných živých jedinců jsem získala vajíčka roztrháním několika živých gravidních segmentů. Ostatní jedinci byli standardně fixováni horkým (4%) formalínem pro další morfologické studie.

U získaných živých vajíček jsem pozorovala vývoj pomocí kultivace v destilované vodě při 18 °C ve tmě. Vajíčka jsem sledovala, měřila a fotodokumentovala každé 2–3 dny po dobu 18-ti dnů. Po dokončení vývoje vajíček jsem následně sledovala vývoj a líhnutí koracidia iniciovaný světlem. Jakmile se začala líhnout koracidia, přidala jsem celý vzorek k potencionálním prvním mezihostitelům – buchankám rodu *Cyclops* Müller, 1785 (Copepoda: Copepoidea) pocházejících z rybníku U Hada (České Budějovice). Buchanky jsem sledovala průběžně 19 dní. Jednotlivé buchanky jsem vložila do kapky vody mezi dvě podložní sklíčka a pod mikroskopem jsem hledala procerkoidy *D. latum*. Celkem jsem takto vyšetřila 44 buchank s negativním výsledkem.

4.2.1.2. Experimentální nákaza člověka

Nákaza dobrovolníka (JL) třemi živými plerocerkoidy z okouna (viz. kapitola 4.2.1.) proběhla 7. února 2013. První vajíčka byla v nativním vzorku stolice detekována 32 DPI (12. března 2013) (Obr. 4.5.). Mimo vajíčka *D. latum* byla detekována i ojedinělá vajíčka *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi, 1819). Vajíčka *D. latum* jsem dokumentovala a měřila.



Obr. 4.5. Mikrofotografie vajíček *D. latum* ve stolici dobrovolníka.

Další odběr vzorků byl proveden 151 DPI (8. července 2013), kdy jsem ve vzorku nativní stolice pozorovala pouze vajíčka *D. latum* bez přítomnosti vajíček *H. diminuta*. Další odběr proběhl 154 DPI (11. července 2013) pro studium vývoje vajíček (viz kap. 4.2.4.). Vajíčka jsem měřila, fotodokumentovala a počítala jsem EPG (počet vajíček na gram stolice).

Po 230 DPI (25. září 2013) došlo ke spontánnímu vyloučení 2,65 m strobily dobrovolníkem bez scolexu po konzumaci jídla s česnekem. Z gravidní strobily byla odebrána vajíčka pro další studium. Tato vajíčka jsem odebrala do destilované vody a kultivovala ve tmě při teplotě 15°C. Vajíčka jsme pravidelně kontrolovala, dokumentovala a měřila. Pozorování probíhalo 84 dní (do 17. prosince 2013) (Obr. 5.15.).

4.2.1.3. Experimentální vývoj vajíček *D. latum*

Vzorky stolice získané 151 a 154 DPI jsem použila ke studiu vývoje vajíček. Vzorky jsem rozdělila na dvě poloviny. První polovinu jsem nechala v nativním stavu (pouze pročištění – cykly sedimentace a doplnění vzorku čistou destilovanou vodou) a do druhé jsem přidala 5% dichroman draselný ($K_2Cr_2O_7$; o výsledné koncentraci 2,5%), k omezení růstu mikroorganismů. U obou vzorků jsem sledovala vývoj vajíček. Vajíčka byla kultivovaná ve tmě při teplotě 18°C. Po třech dnech jsem vzorek s dichromanem draselným přečistila (cykly centrifugace – 5 minut, 740 RPM, při 4°C). Z obou vzorků jsem odebrala menší vzorek pro paralelní studium vývoje vajíček v laboratorních podmínkách. Tento pokus pokračoval 31 dní (do 7. srpna 2013) při RT ve tmě.

Vzorek stolice (151 DPI) byl použit také pro experimentální vývoj ve venkovních experimentálních nádržích (dvě kádě o rozměrech 1,5 x 4 x 0,75 m obsahující inokulum klanonožců z 10. července 2013) za pomoci RNDr. Jiřího Peterky, PhD. (Hydrobiologický ústav AVČR). Do jedné kádě jsem přidala 50 g vzorku (cca 2 500 000 vajíček) v nativním stavu a do druhé stejné množství vzorku s dichromanem draselným. V kádích byla po celou dobu pokusu sledována teplota (Tab. 4.4.).

Tabulka 4.4. Teplota naměřená v experimentálních kádích po dobu pokusu s vajíčky *D. latum*.

	červenec			srpen			září			říjen			celkové hodnoty		
	teplota (°C)			teplota (°C)			teplota (°C)			teplota (°C)			teplota (°C)		
	min	max	průměr	min	max	průměr	min	max	průměr	min	max	průměr	min	max	průměr
kád' 1	18,9	29,7	23,6	15,5	29	21,1	10,6	22,1	15,8	6,61	13,8	10,2	6,61	29,7	17,7
kád' 2	18,6	29,4	23,5	15,5	28,4	21	10,8	21,7	15,8	6,97	15,2	10,3	6,97	29,4	17,6

Padesátý den po začátku experimentu (28. srpna 2013) bylo do kádí přidáno celkem 37 0+ okounů (*Perca fluviatilis*) z Lipenské přehrady o velikosti 5–7 cm. Po zhruba dvou měsících (24. a 25. října 2013; 65–66 dnech) byly ryby vypitvány na přítomnost plerocercoidů *D. latum*.

5. VÝSLEDKY

5.1. Morfometrická analýza vajíček

Během studia jsem změřila 1580 vajíček patřícím k 20 druhům diphyllbothriidních tasemnic (Tab. 5.1.).

Získané údaje byly podrobeny základním statistickým analýzám, jejichž nejdůležitější výsledky jsou součástí této práce. Protože u všech analyzovaných skupin byla dosažena hodnota významnosti $p < 10^{-4}$ mohla jsem zamítnout nulovou hypotézu (H_0 = velikost vajíček se mezi jednotlivými druhy neliší) na 1% hladině významnosti. Rozdíly v délce a šířce mezi testovanými druhy byly signifikantní. Detailní výsledky testu variance, Tukeyho testy a výsledné korelační pro jednotlivé skupiny jsou uvedeny v příslušných kapitolách nebo v Příloze (viz níže).

Délka u studovaných diphyllbothriidních vajíček se pohybovala od 41 do 92 μm a šířka od 33 do 60 μm . Velikost vajíček u většiny druhů je velmi podobná s výjimkou druhu *Diphyllbothrium macroovatum*, který má výrazně větší vejčka (Tab. 5.1.).

Korelační diagram všech zanalyzovaných vajíček všech 15 druhů z rodu *Diphyllbothrium* je uveden v příloze (Obr. 9.1.). Výsledný diagram je díky velkému množství vzorků nepřehledný, proto jsem pro další analýzy rozdělila studované zástupce rodů *Diphyllbothrium* na dvě skupiny, na druhy sladkovodní/anadromní a druhy mořské, kam jsem zahrнула také druhy z rodu *Diplogonoporus*. Dále jsem zvlášť analyzovala zástupce infikující člověka a vnitrodruhovou variabilitu u druhů *D. latum* a *D. pacificum*.

Tab. 5.1. Rozměry vajíček studovaných diphyllotohriidních tasemnic.

Zástupce	Definitivní hostitel	Kód	No.	Rozměry (µm)	S.D. délka	S.D. šířka	poměr š/d	S.D. (š/d)
Sladkovodní/anadromní								
<i>D. dendriticum</i>	<i>Mesocricetus auratus</i>	ZMUO 437	74	49—64 x 37—49; (58 x 41)	3,001	1,986	0,716	0,047
<i>D. latum</i>	<i>Homo sapiens</i>	RUS 106	25	64—69 x 47—51; (66 x 48)	1,552	1,269	0,730	0,026
		PFIS 4 F1 MIFC	25	60—72 x 44—54; (68 x 49)	2,959	1,742	0,723	0,038
		PFIS 4 F1 nativ	25	63—73 x 47—54; (68 x 50)	2,637	1,946	0,734	0,038
		PFIS 4 F1 flot.	25	63—76 x 45—53; (69 x 48)	2,93	1,804	0,702	0,041
		PFIS 4 F2	150	62—80 x 47—56; (70 x 51)	3,048	1,875	0,728	0,035
		PFIS 4 S1	141	62—76 x 47—58; (69 x 51)	2,539	1,957	0,743	0,034
	<i>Mesocricetus auratus</i>	ZMUO 7A	23	54—65 x 39—45; (59 x 42)	2,629	1,487	0,718	0,042
		PFIS H F	50	57—68 x 43—49; (63 x 46)	2,725	1,471	0,729	0,035
		PFIS H S	25	64—75 x 47—60; (70 x 53)	2,804	4,372	0,766	0,047
	<i>Ursus maritimus</i>	NMW 20045	25	66—74 x 46—52; (70 x 49)	2,149	1,341	0,703	0,028
<i>D. nihonkaiense</i>	<i>Homo sapiens</i>	Dn1	21	55—66 x 44—47; (61 x 46)	2,625	0,785	0,760	0,030
<i>D. ursi</i>	<i>Mesocricetus auratus</i>	ZMUO D. ursi	25	56—65 x 39—45; (61 x 43)	2,481	1,401	0,702	0,035
Mořští								
<i>D. cameroni</i>	<i>Monachus schauinslandi</i>	KET 8 3F	25	41—51 x 33—42; (46 x 38)	2,981	2,214	0,832	0,061
		KET 37C + 83C	50	42—56 x 35—45; (48 x 40)	2,655	2,139	0,828	0,040
<i>D. cordatum</i>	<i>Erignathus barbatus</i>	EB a+b	50	65—78 x 43—54; (71 x 48)	2,368	2,329	0,677	0,034
		TS 05/47	25	66—77 x 47—53; (71 x 50)	2,926	1,698	0,710	0,029
	<i>Odobenus rosmarus</i>	TS 04/27	25	65—75 x 46—52; (70 x 49)	2,348	1,516	0,695	0,030
<i>D. hians</i>	<i>Monoachus monachus</i>	NMW 2884	50	45—65 x 35—50; (59 x 46)	3,985	2,810	0,773	0,040

Tab. 5.1.: Pokračování

Zástupce	Definitivní hostitel	Kód	No.	Rozměry (µm)	S.D. délka	S.D. šířka	poměr š/d	S.D. (š/d)	
<i>D. lanceolatum</i>	<i>Erignathus barbatus</i>	EB c+d	50	55—67 x 39—48; (61 x 43)	2,728	1,742	0,717	0,035	
		TS 05/48	25	58—70 x 41—45; (65 x 43)	2,463	1,048	0,659	0,032	
<i>D. macroovatum</i>	<i>Eschrichtius gibbosus</i>	TS 05/52	25	75—92 x 48—57; (85 x 50)	3,766	1,878	0,578	0,029	
<i>D. pacificum</i>	<i>Arctophoca australis</i>	Aa 89	25	49—54 x 39—43; (53 x 41)	1,243	1,024	0,785	0,025	
		<i>Arctocephalus pusillus doriferus</i>	AU 11	26	46—54 x 36—42; (50 x 39)	2,063	1,311	0,775	0,037
			SAM 0—17	25	50—62 x 40—48; (55 x 44)	3,079	2,298	0,801	0,053
	<i>Callorhinus ursinus</i>	SAM 7—64	25	51—60 x 39—47; (55 x 43)	2,392	1,600	0,775	0,041	
		SAM 6—51	25	49—57 x 39—45; (54 x 43)	1,765	1,705	0,798	0,047	
		<i>Canis mesomelas</i>	BMNH 1988.5.13	25	54—59 x 40—45; (57 x 42)	1,439	1,280	0,741	0,033
	<i>Homo sapiens</i>	TS 06/27	25	47—55 x 37—44; (51 x 41)	2,209	1,504	0,806	0,036	
			25	43—51 x 35—42; (48 x 40)	1,649	1,582	0,835	0,031	
		AU 10	24	41—57 x 40—48; (52 x 43)	3,73	2,267	0,829	0,061	
<i>D. rauschi</i>	<i>Monachus schauinslandi</i>	USNPC 26205	25	45—52 x 36—41; (49 x 39)	1,814	1,07	0,807	0,033	
<i>D. stemmacephalum</i>	<i>Lagenorhynchus acutus</i>	TS 09/101	25	53—64 x 41—48; (60 x 46)	2,459	1,413	0,766	0,036	
<i>Diphyllobothrium</i> sp. 1 *	<i>Zalophus californicus</i>	USNPC 65882	50	46—58 x 35—46; (51 x 40)	2,197	2,319	0,784	0,045	
<i>Diphyllobothrium</i> sp. 2 **	<i>Globicephala melas</i>	D.A. 283020887	25	62—71 x 45—53; (66 x 50)	2,394	1,885	0,759	0,035	
<i>Diphyllobothrium</i> sp. 3 ***	<i>Mirounga leonina</i>	AU 13	25	66—77 x 47—53; (73 x 50)	2,392	1,632	0,691	0,029	
<u>Zástupci ostatních dostupných rodů</u>									
<i>Bothridium pithonis</i>	<i>Xenopeltis unicolor</i>	VNH 96	25	66—86 x 42—54; (79 x 46)	4,030	2,704	0,585	0,049	
<i>Diplogonoporus tetraapterus</i>	<i>Enhydra lutris</i>	USNPC 60361	25	64—79 x 44—52; (71 x 49)	3,018	2,100	0,688	0,035	
		USNPC 86772	25	61—73 x 45—50; (68 x 47)	2,855	1,342	0,701	0,042	

Tab. 5.1.: Pokračování

Zástupce	Definitivní hostitel	Kód	No.	Rozměry (µm)	S.D. délka	S.D. šířka	poměr š/d	S.D. (š/d)
<i>Diplogonoporus tetrapterus</i>	<i>Callorhinus ursinus</i>	SAM 7—32	21	66—86 x 41—52; (75 x 46)	5,933	2,793	0,623	0,073
<i>Diplogonoporus violetteae</i>	<i>Erignathus barbatus nauticus</i>	TS 4/22	25	64—75 x 45—50; (70 x 48)	2,681	1,252	0,674	0,026
<i>Duthiersia fimbriata</i>	<i>Varanus exanthematicus</i>	B9 PS	54	51—62 x 41—48; (56 x 45)	2,320	1,517	0,799	0,036
		B9 F	21	49—62 x 38—47; (56 x 44)	2,813	2,166	0,780	0,046
<i>Scyphocephalus bisulcatus</i>	<i>Varanus salvator</i>	USNPC 74302	25	54—63 x 42—48; (59 x 45)	2,486	1,536	0,767	0,044
<i>Tetragonoporus calyptocephalus</i>	<i>Physeter macrocephalus</i>	TS 05/56	25	66—74 x 46—54; (70 x 50)	2,112	2,326	0,720	0,029

* — nový nepopsaný druh

** — *Diphyllobothrium* A podle Balbuena a Raga (1993)

*** — nový nepopsaný druh

No. — počet vajíček; S.D. — směrodatná odchylka; BMNH - Natural History Museum, Londýn, UK; NMW – Naturhistorisches Museum, Vídeň, Rakousko; USNPC – United States National Parasite Collection, Beltsville, Maryland, USA; ZMUO – Zoological Museum (University of Oslo), Norsko

5.1.1. Mořští zástupci rodů *Diphyllbothrium* a *Diplogonoporus*

Ve skupině zástupců z mořských savců jsem studovala 13 druhů. Vlastní analýza variance pro skupinu mořských druhů zamítla nulovou hypotézu v obou testovaných hodnotách pro délku ($F = 373,99$; $p < 10^{-4}$) a pro šířku ($F = 126,29$; $p < 10^{-4}$). Rozdíly ve velikosti vajíček mezi jednotlivými druhy jsou statisticky průkazné. Korelační diagram velikosti vajíček je zobrazen na obrázku 5.1.

Z výsledku Tukey testu (Tab. 9.2.) je patrné, že je možné vajíčka mořských zástupců rozdělit do čtyř velikostních skupin.

I. duhy *D. cameroni*, *D. pacificum*, *D. rauschi* a *Diphyllbothrium* sp. 1 s průměrnou délkou vajíček 47–51 μm .

II. druhy *D. lanceolatum*, *D. stemmacephalum* a *D. hians* s průměrnou délkou vajíček 60–62 μm .

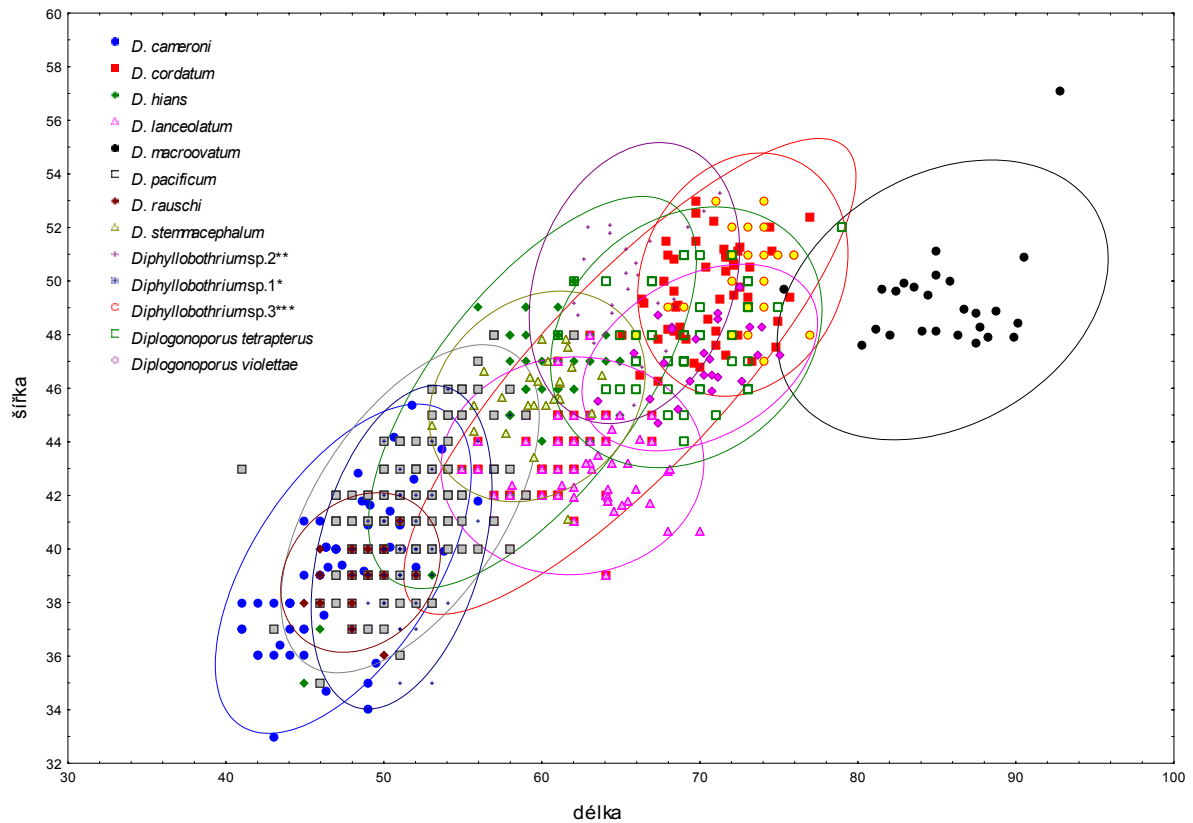
III. druh *D. cordatum* má úplně stejně dlouhá vajíčka jako zástupce *Diphyllbothrium* sp. 2 a jejich průměrná délka je 65 μm .

IV. zástupce *Diphyllbothrium* sp. 3 velikostně zapadá mezi zástupce z rodu *Diplogonoporus*. Průměrná délka vajíček zástupců této skupiny se pohybuje v rozmezí 69–73 μm .

Pouze vajíčka druhu *D. macroovatum* se lišila od všech studovaných zástupců.

Největší variabilitu v rozměrech vajíček vykazovali zástupci *D. cordatum*, *D. cameroni* a *D. pacificum*. Variabilita může být ovlivněna i množstvím měřených vajíček (závislost na dostupnosti a kvalitě získaného materiálu). Například u druhu *D. macroovatum* byl k dispozici pouze jeden jedinec (25 vajíček) naopak u druhu *D. pacificum* jsem měřila 9 vzorků z různých hostitelů a lokalit, proto je znatelná i větší variabilita.

Největší vajíčka jsem pozorovala u *Diphyllbothrium macroovatum*. Naopak nejmenší vajíčka má *D. cameroni*.



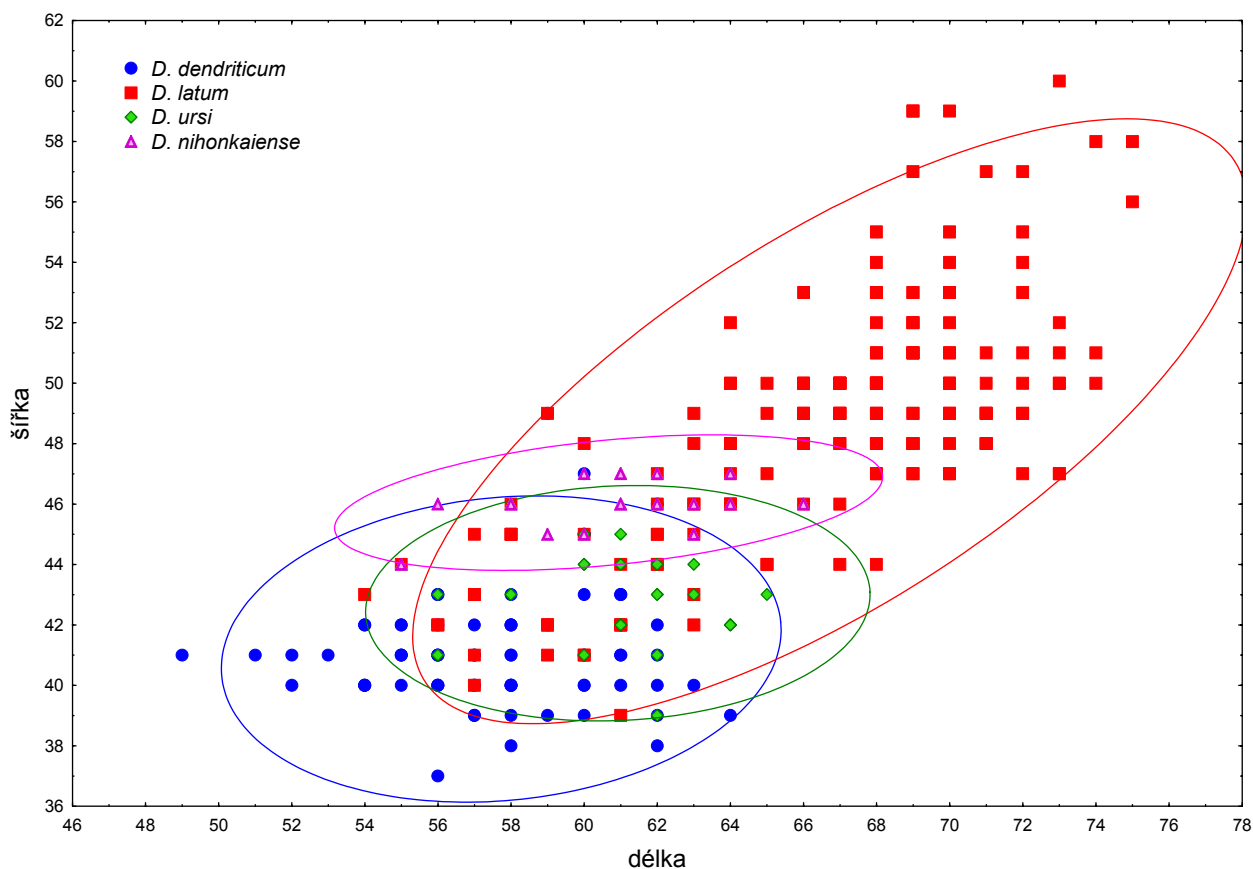
Obr. 5.1. Korelační diagram velikosti vajíček mořských zástupců rodů *Diphyllbothrium* a *Diplogonoporus*.

5.1.2. Sladkovodní a anadromní zástupci rodu *Diphyllbothrium*

Sladkovodní a anadromní zástupci zahrnovali 4 druhy. Vlastní analýza variance pro skupinu sladkovodních a anadromních druhů zamítla nulovou hypotézu v obou testovaných hodnotách (pro délku: $F = 96,879$; $p < 10^{-4}$; pro šířku: $F = 109,73$; $p < 10^{-4}$). Rozdíly ve velikosti vajíček mezi jednotlivými druhy jsou statisticky průkazné. Korelační diagram velikosti vajíček je zobrazen na obr. 5.2.

Největší variabilitu vykazovala vajíčka *D. latum*, která ovšem souvisela s největším počtem naměřených vzorků z různých hostitelů (viz tabulka 5.1.). Jednoznačně nejmenší vajíčka jsem pozorovala u druhu *D. dendriticum*. Z výsledku Tukey testu (Tab. 9.3.) je patrné, že se vajíčka druhu *D. dendriticum*, s průměrnou délkou 58 μm , i *D. latum*, s průměrnou délkou 67 μm , liší od ostatních druhů, ale také se výrazně liší vzájemně od sebe.

Anadromní zástupci se velikostí podobají. Průměrná délka *D. ursi* je 60,920 μm a průměrná délka *D. nihonkaiense* je 60,667 μm .



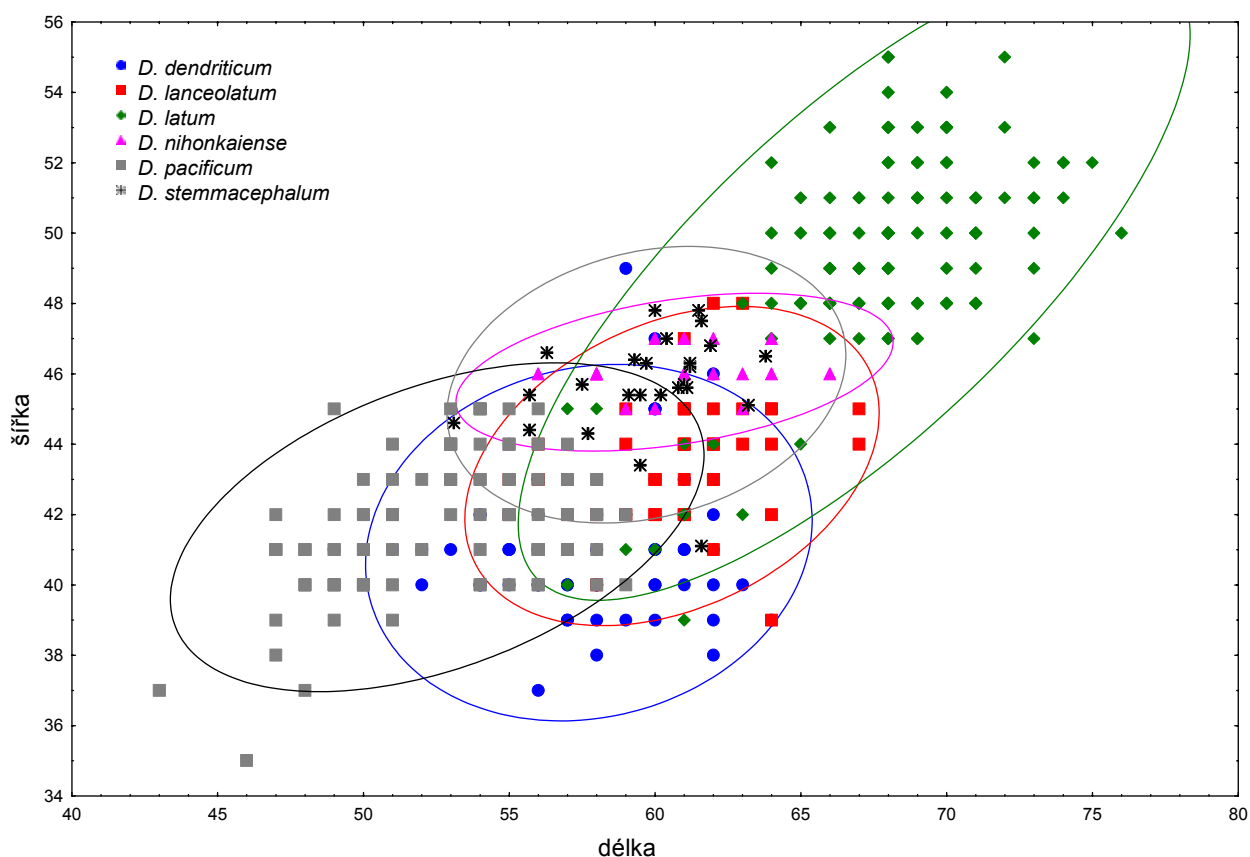
Obr. 5.2. Korelační diagram velikosti vajíček sladkovodních a anadromních zástupců rodu *Diphyllbothrium*

5.1.3. Druhy známé z člověka

Analýza variance pro skupinu druhů nalezených u člověka zamítla nulovou hypotézu v obou testovaných hodnotách (pro délku: $F = 349,6626$; $p < 10^{-4}$; pro šířku: $F = 279,1525$; $p < 10^{-4}$). Rozdíly ve velikosti vajíček mezi jednotlivými druhy jsou statisticky průkazné. Korelační diagram velikosti vajíček je zobrazen na obrázku 5.3.

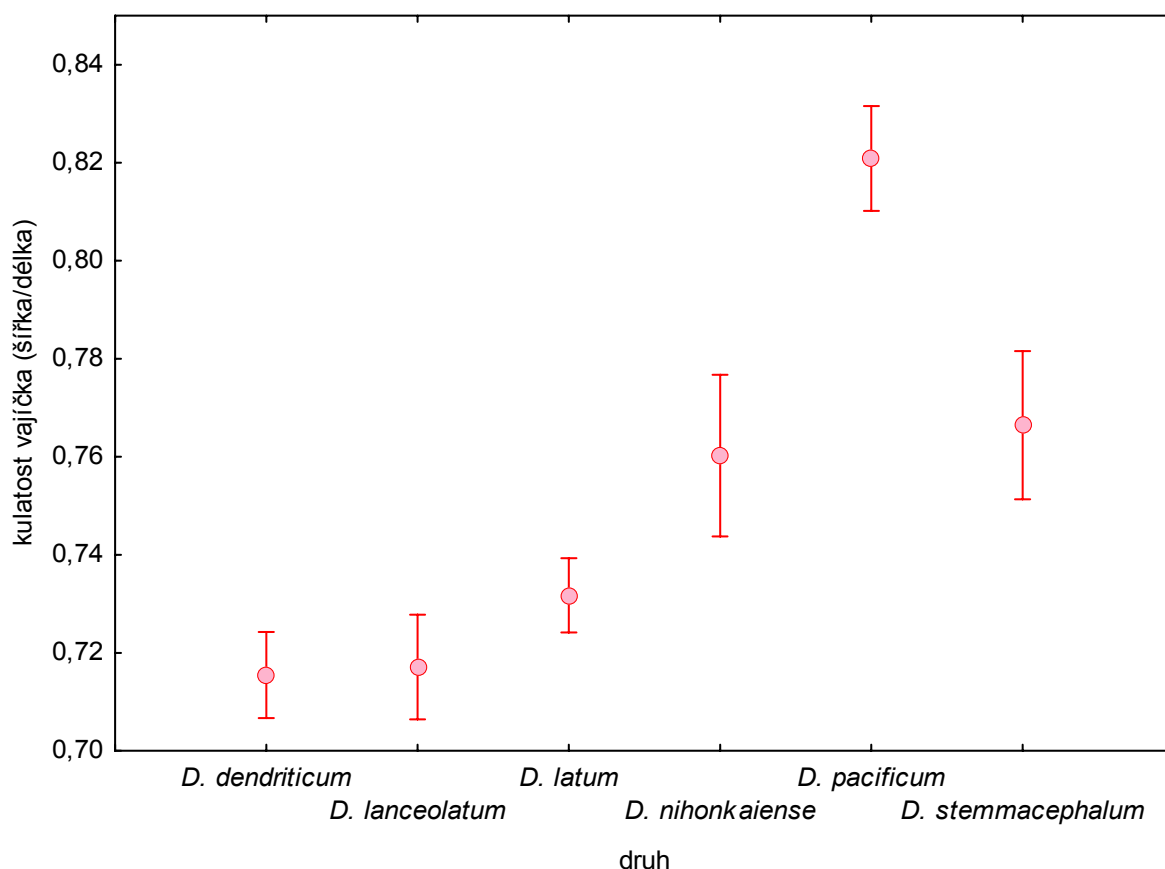
Analýza zástupců získaných z člověka spolu s *D. stemmacephalum* a *D. lanceolatum* z mořských savců (které mohou infikovat i člověka) ukazuje, že vajíčka *D. latum* nalezená u člověka vykazují mnohem menší variabilitu, než vajíčka *D. latum* z ostatních hostitelů (kapitola 5.1.2). Na základě těchto údajů je možné odlišit vajíčka *D. latum* z člověka od vajíček *D. pacificum* i *D. dendriticum*, která jsou signifikantně menší a se kterými bývají

často zaměňována. Výsledek Tukey testu pro délku ukázal, že se vajíčka druhů *D. dendriticum*, *D. latum* ani *D. pacificum* ve velikosti nepodobají ostatním studovaným druhům z člověka ani mezi sebou (Tab. 9.4.). Naopak druhy *D. stemmacephalum*, *D. nihonkaiense* a *D. lanceolatum* se svými rozměry podobají a morfometrie vajíček nám neumožňuje jejich odlišení.



Obr. 5.3. Korelační diagram velikosti vajíček druhů z rodu *Diphyllbothrium* známých z člověka.

Pro diagnostiku lidských druhů je užitečná také kulatost vajíček. Analýza variance pro kulatost vajíček lidských druhů zamítla nulovou hypotézu (že se vajíčka v kulatosti neliší) s výsledkem $F = 53,5100$ a $p < 10^{-4}$. Na obrázku 5.4. je zobrazena kulatost vajíček udávaná jako poměr šířky ku délce. Hodnoty blíží se k 1 (kulatá vajíčka) představuje druhu *D. pacificum* a to i při analýze z ostatních hostitelů. Vajíčka druhů *D. dendriticum*, *D. lanceolatum* a *D. latum* jsou podobně vejčitá, zatímco vajíčka druhů *D. nihonkaiense* a *D. stemmacephalum* jsou středně kulatá a tvarově jsou si vzájemně hodně podobná. Dá se tedy konstatovat, že vajíčka druhu *D. pacificum* jsou ze všech studovaných lidských druhů nejkulatější a svým tvarem se jiným studovaným druhům nepodobají (Tab. 9.5.).



Obr. 5.4. Kulatost vajíček z lidských zástupců.

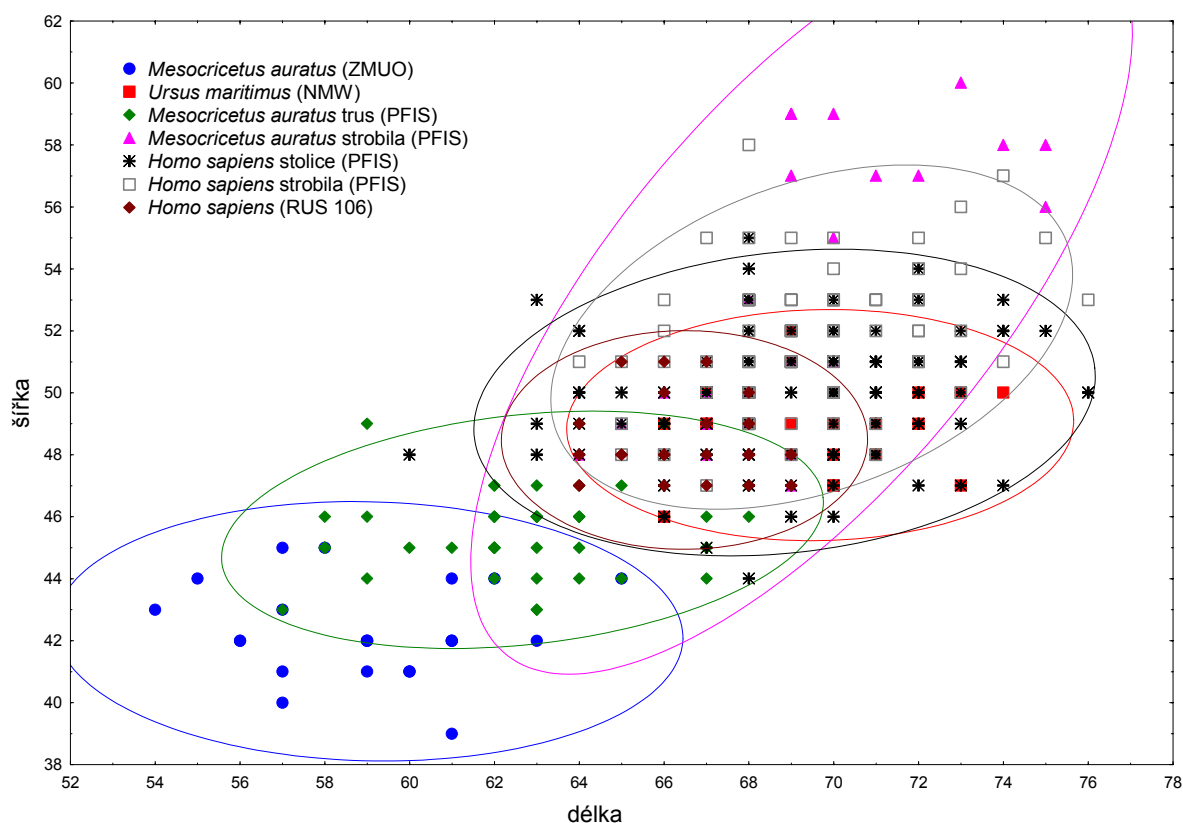
5.1.4. Vnitrodruhová variabilita vajíček *D. latum* a *D. pacificum*

Z výsledků morfometrické analýzy jednoho druhu z různých hostitelů je patrné, že velikost vajíčka je ovlivněna definitivním hostitelem.

Vzorky *D. latum*, u kterých byl experimentálním definitivním hostitelem křeček zlatý (*Mesocricetus auratus*), mají signifikantně menší vajíčka, než vzorky z člověka a ledního medvěda (Obr. 5.5.). Výjimkou je ale vzorek vajíček odebraný přímo ze strobily čerstvě po pitvě křečka (Tab. 5.1.). Výsledek Tukey testu ukázal, že se tento vzorek svojí délkou podobá vzorkům z medvěda ledního (*Ursus maritimus*) a z člověka (dobrovolná nákaza, PFIS). Při porovnání velikosti vajíček z trusu křečka a ze strobily po pitvě křečka ze stejné nákazy se objevily signifikantní rozdíly ve velikosti vajíček (Tab. 9.6.). Hodnota průměrné délky vajíček z trusu křečka je o 6,58 μm nižší než u vajíček ze strobily. Zdá se, že i původ

vzorku, zdali je z trusu nebo odebraný přímo ze strobily, má vliv na velikost vajíčka. Lidské vzorky *D. latum* vykazují podobnou velikost jako vzorek z ledního medvěda.

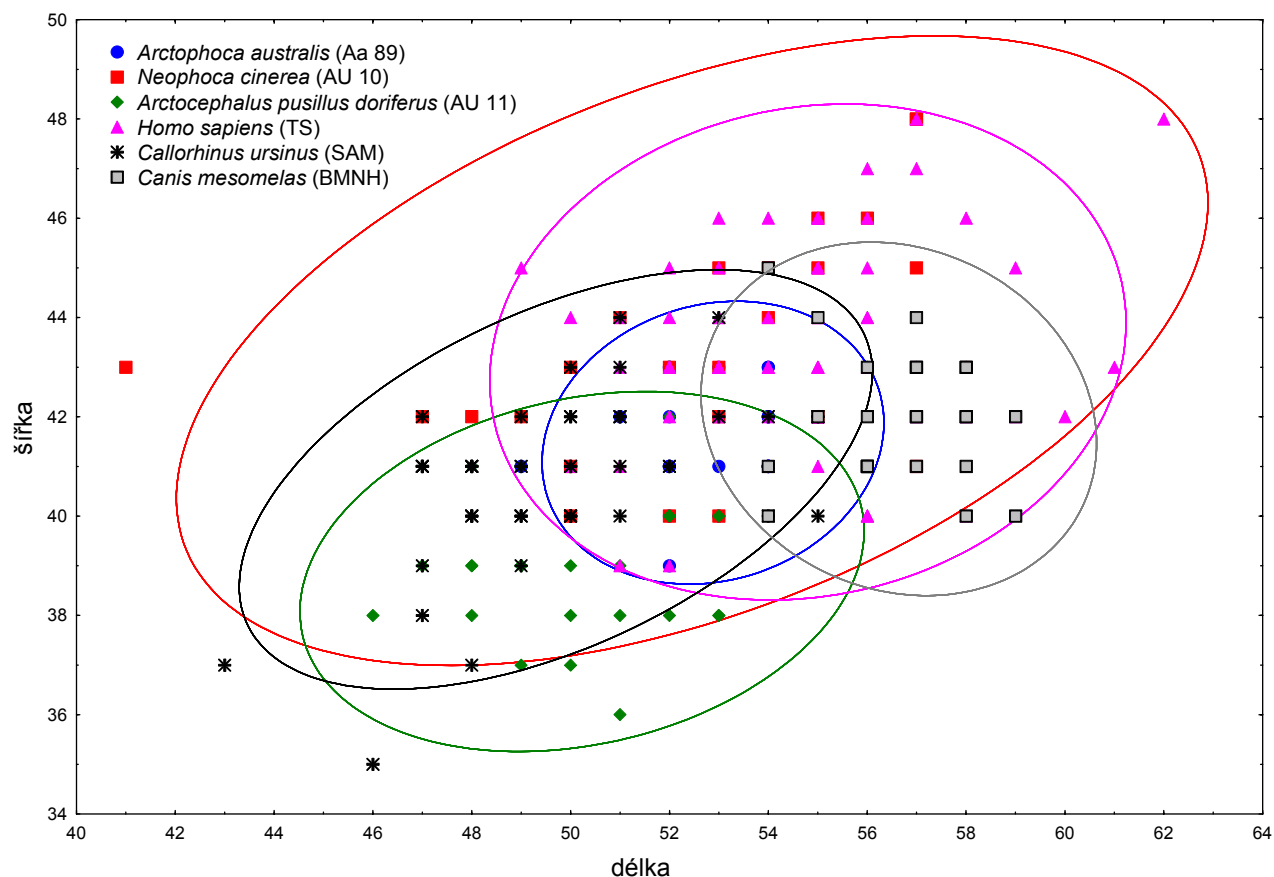
Analýza variance pro druh *D. latum* z různých hostitelů zamítla nulovou hypotézu v obou testovaných hodnotách (pro délku: $F = 89,8154$; $p < 10^{-4}$; pro šířku: $F = 107,5981$; $p < 10^{-4}$). Rozdíly ve velikosti vajíček jsou v této skupině signifikantní.



Obr. 5.5.: Korelační diagram vnitrodruhové variability velikosti vajíček *D. latum*.

Analýza variance pro druh *D. pacificum* z různých hostitelů zamítla nulovou hypotézu v obou testovaných hodnotách (pro délku: $F = 49,00022$; $p < 10^{-4}$; pro šířku: $F = 35,84765$; $p < 10^{-4}$). Rozdíly ve velikosti vajíček jsou v této skupině signifikantní.

Nejvíce se svými parametry odlišoval vzorek z šakala čabrakového (Obr. 5.6.), který se nepodobal žádnému jinému studovanému vzorku svojí délkou ani kulatostí (Tab. 9.8.).



Obr. 5.6. Korelační diagram vnitrodruhové variability velikosti vajíček *D. pacificum*.

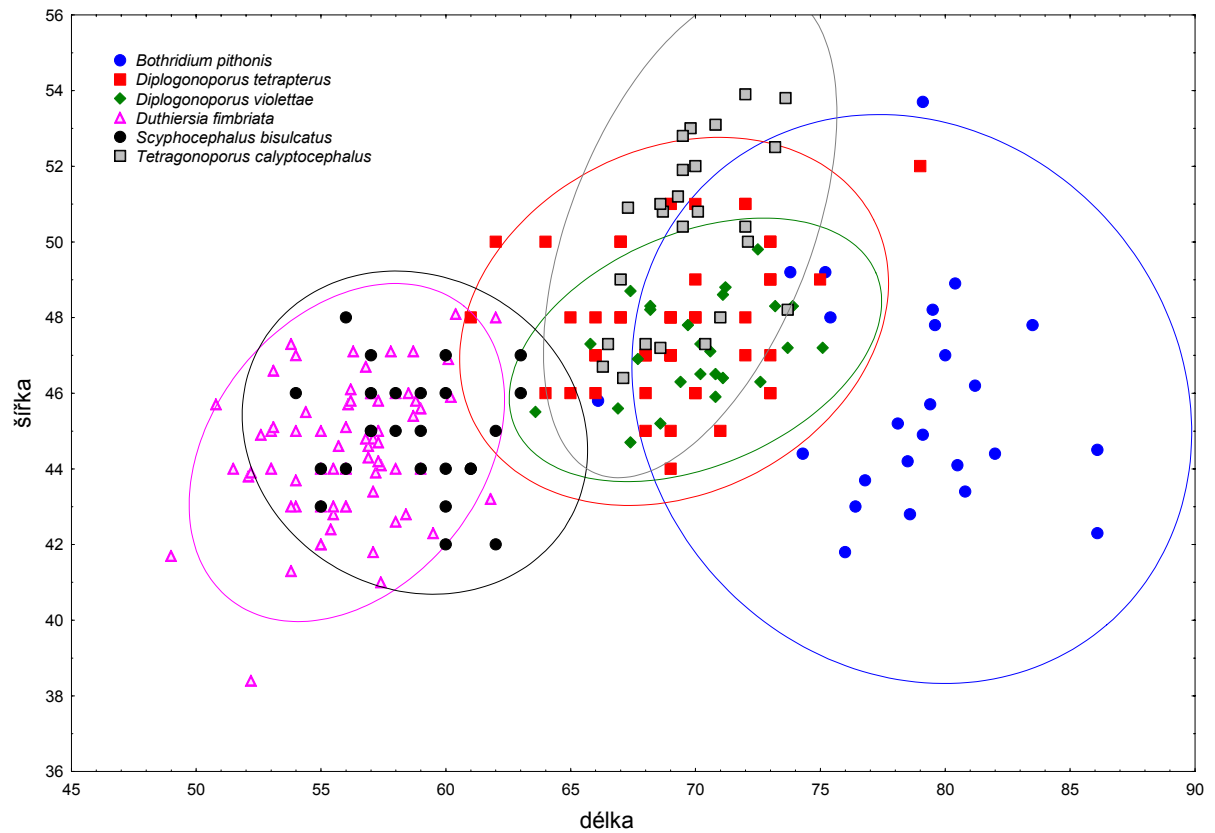
5.1.5. Morfometrická analýza ostatních zástupců diphyllbothriidů

Analýza variance pro skupinu vzorků z ostatních dostupných rodů zamítla nulovou hypotézu v obou testovaných hodnotách (pro délku: $F = 325,9984$; $p < 10^{-4}$; pro šířku: $F = 44,2564$; $p < 10^{-4}$). Rozdíly ve velikosti vajíček mezi jednotlivými druhy jsou statisticky průkazné. Korelační diagram velikosti vajíček je zobrazen na obrázku 5.7.

Z výsledného korelačního diagramu (Obr. 5.7.) i Tukey testu (Tab. 9.10.) je patrné, že vajíčka druhů ze savců (*Diplogonoporus tetrapterus*, *Diplogonoporus violettæ* a *Tetragonoporus calyptocephalus*) jsou si velikostně podobná (průměrná délka se pohybuje v rozmezí 69–70 μm).

Plazí druhy se rozdělily na dvě, rozměrově odlišné skupiny, mezi které zapadají právě savčí druhy. Největší vajíčka má druh *Bothridium pithons* (průměrná délka vajíček je 79 μm), jehož hostitelem je had (duhovec jednobarvný, *Xenopeltis unicolor* Reinwardt).

Nejmenší vajíčka mají druhy z varanů a to *Scyphocephalus bisulcatus* a *Duthiersia fimbriata* (průměrná délka vajíček se pohybuje v rozmezí 56–59 μm).



Obr. 5.7. Korelační diagram velikosti vajíček diphyllbothriidních tasemnic rodů *Bothridium*, *Diplogonoporus*, *Duthiersia*, *Scyphocephalus* a *Tetraxonoporus*.

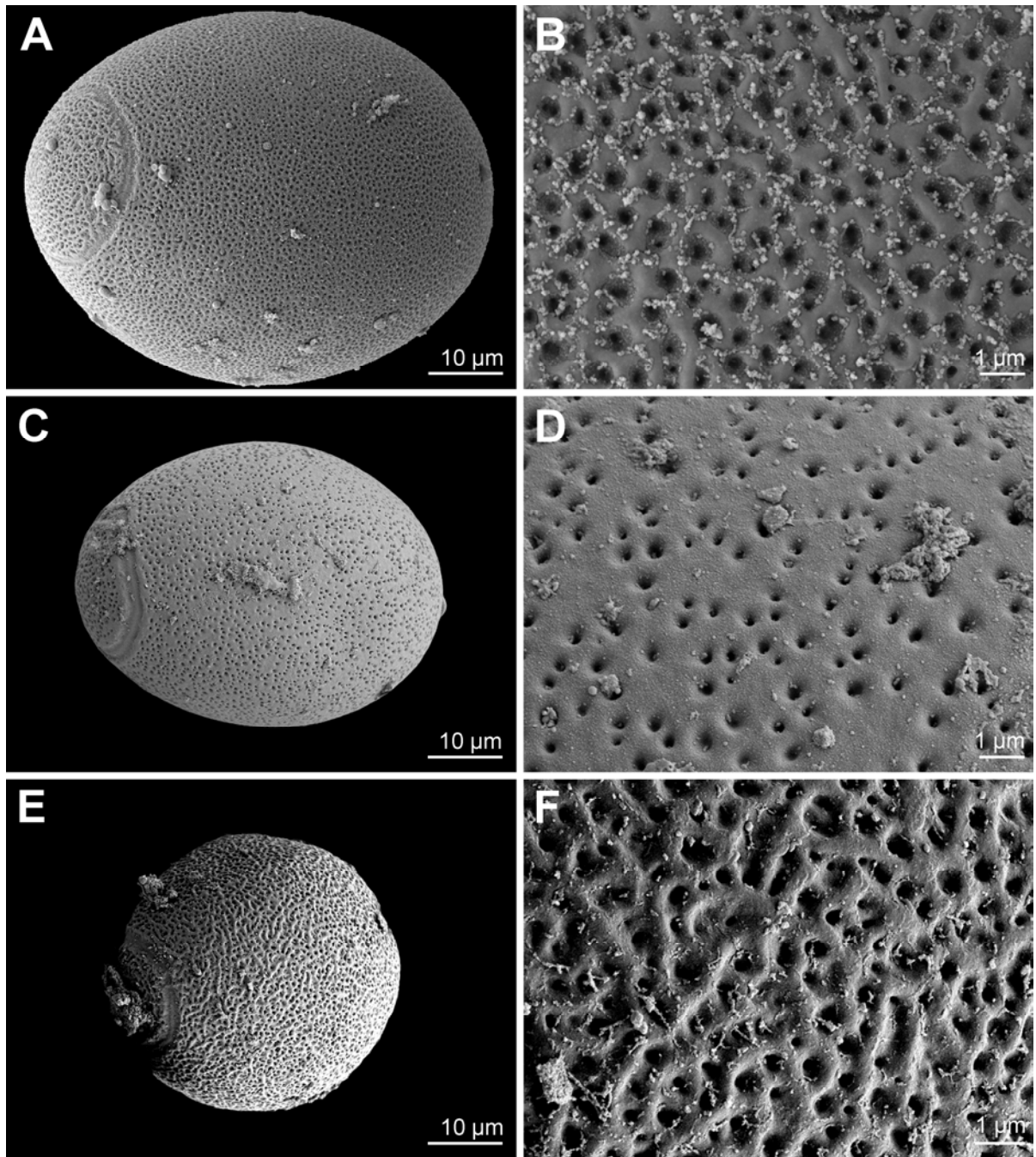
5.2. Skenovací elektronová mikroskopie

Testovala jsem přítomnost důlků (prohlubní, pits) na povrchu vajíček, které byly prokázány pouze u mořských zástupců předchozími studii (Hilliard 1960; Ishii a Miyazaki 1971; Hilliard 1972)

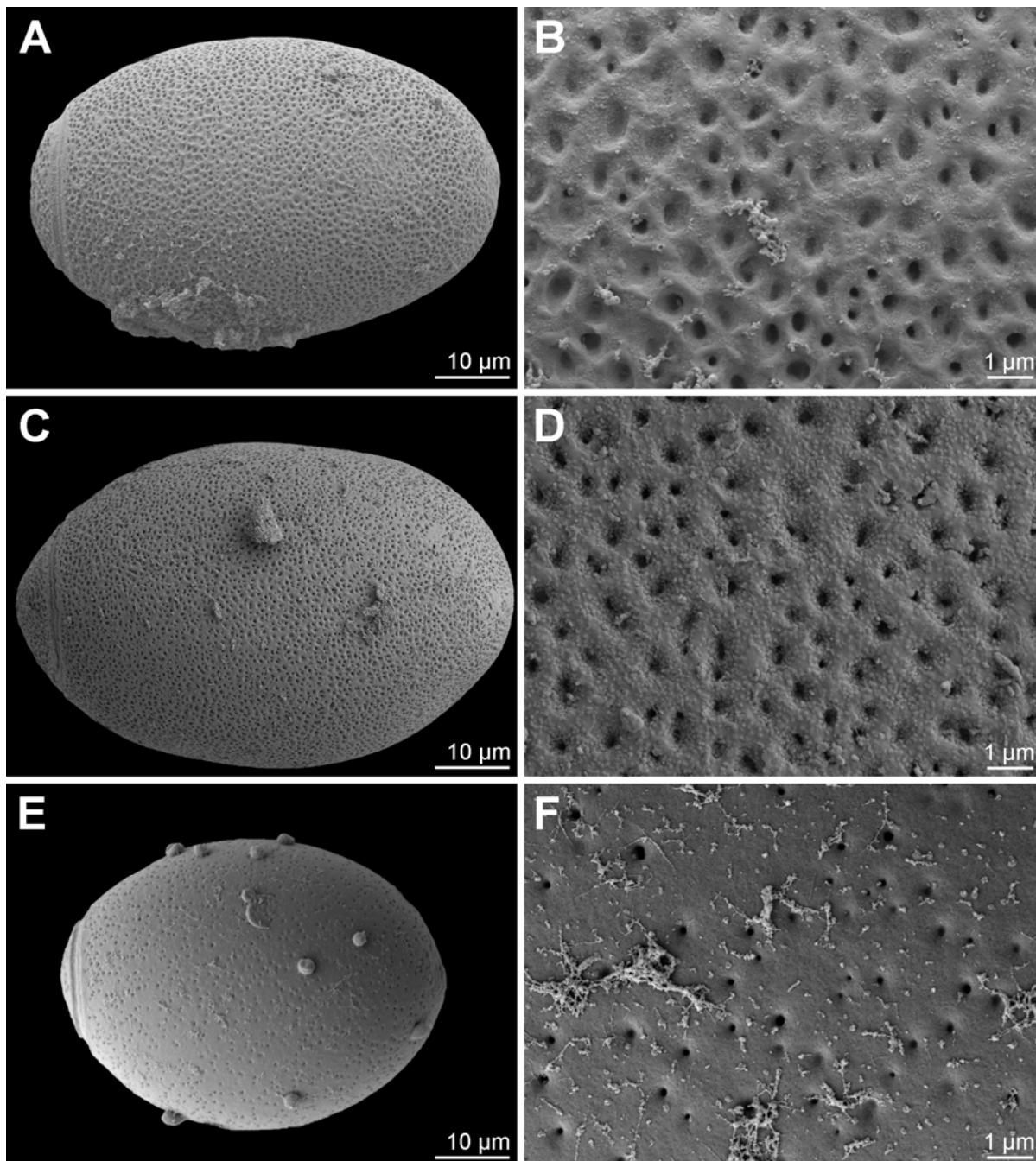
5.2.1. Povrch vajíček mořských zástupců rodu *Diphyllobothrium*

Studovala jsem povrch vajíček 9 druhů mořských zástupců diphyllobothriidů. Přítomnost důlků jsem prokázala u všech těchto zástupců. Nicméně, jejich hustota a hloubka se mezi studovanými zástupci lišila. Nejintenzivněji zvrásněný povrch s velkým množstvím prohlubní jsem pozorovala u vajíček *D. cameroni* (Obr. 5.8. E, F), kde bylo kolem 53 prohlubní na $25 \mu\text{m}^2$. Mezi těmito důlky nebyl skoro žádný hladký povrch. Dalším zástupcem s výrazně častými prohlubněmi byl druh *D. cordatum* (Obr. 5.8. A, B), kde bylo kolem 41 prohlubní na $25 \mu\text{m}^2$. Nejméně prohlubní bylo pozorováno u druhu *D. pacificum* (Obr. 5.9. E, F), kde bylo kolem 22 prohlubní na $25 \mu\text{m}^2$.

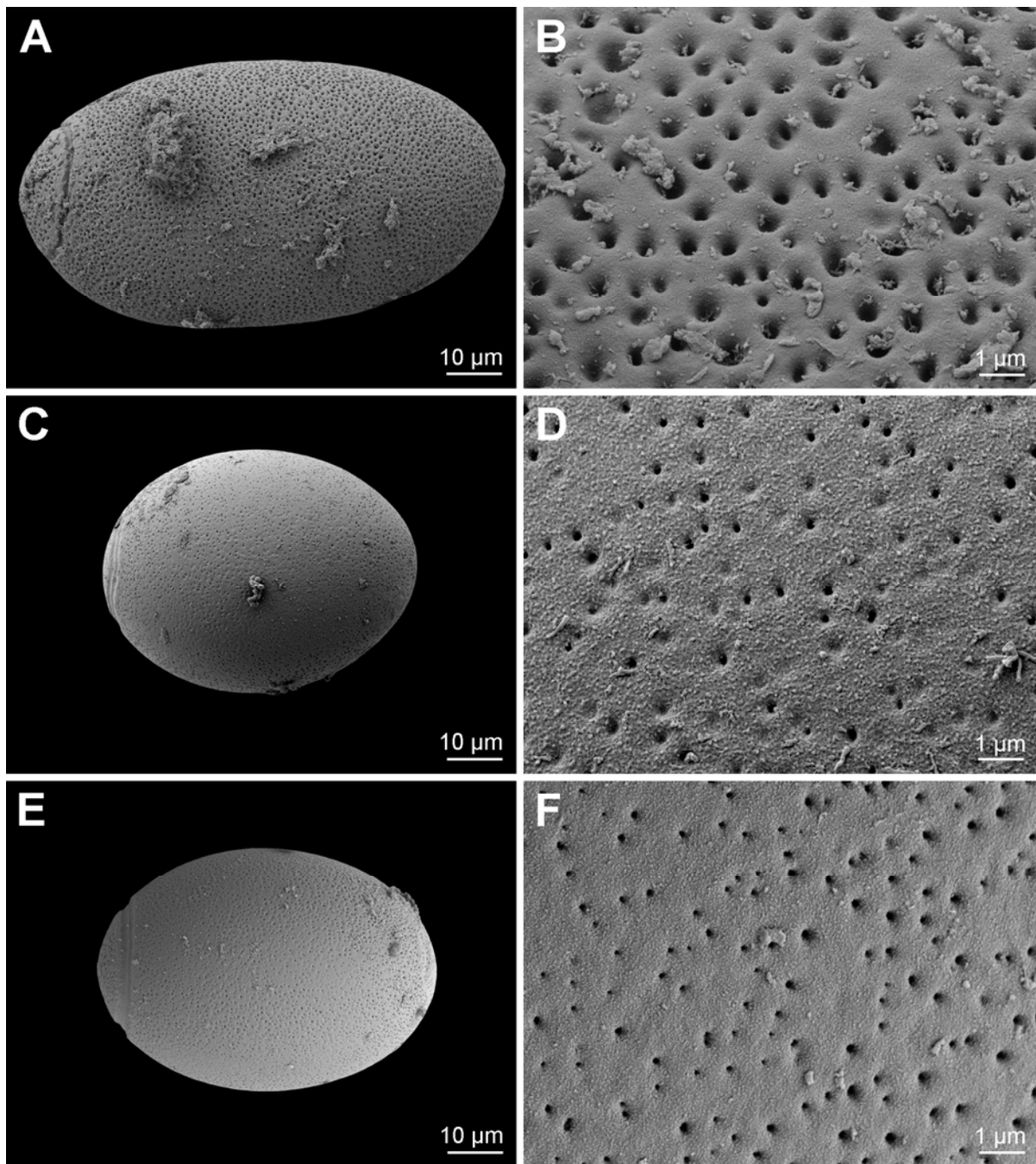
Vajíčka zástupců z kytovců a tuleňů se výrazně nelišila. U zástupce *Diphyllobothrium* sp. 2** z kulohlavce černého (*Globicephala melas*) jsem pozorovala nejvíce důlků na povrchu a to kolem 35 důlků na $25 \mu\text{m}^2$ (Obr. 5.10. E, F). Důlky byly v průměru nejmenší a byly tak vzdáleny dál od sebe a vajíčka se tak jevila jako hladší než u druhu *D. macroovatum* (Obr. 5.10. A, B), kde bylo kolem 26 důlků na $25 \mu\text{m}^2$. U druhu *D. stemmacephalum* jsem pozorovala nejmenší hustotu důlků ze všech mořských zástupců a to kolem 21 důlků na $25 \mu\text{m}^2$.



Obr. 5.8. Mikrofotografie vajíček mořských zástupců rodu *Diphyllbothrium* (SEM).
A, B – *D. cordatum* z *Odobenus rosmarus*; **C, D** – *D. rauschi* z *Monachus schauinslandi*;
E, F – *D. cameroni* z *Monachus schauinslandi*; **B, D, F** – povrch zvětšen 10.000x



Obr. 5.9. Mikrofotografie vajíček mořských zástupců rodu *Diphyllobothrium* (SEM)
A, B – *D. skriabini* z *Erignathus barbatus*; **C, D** – *D. lanceolatum* z *Erignathus barbatus*;
E, F – *D. pacificum* z *Canis mesomelas*; **B, D, F** – povrch zvětšen 10.000x.



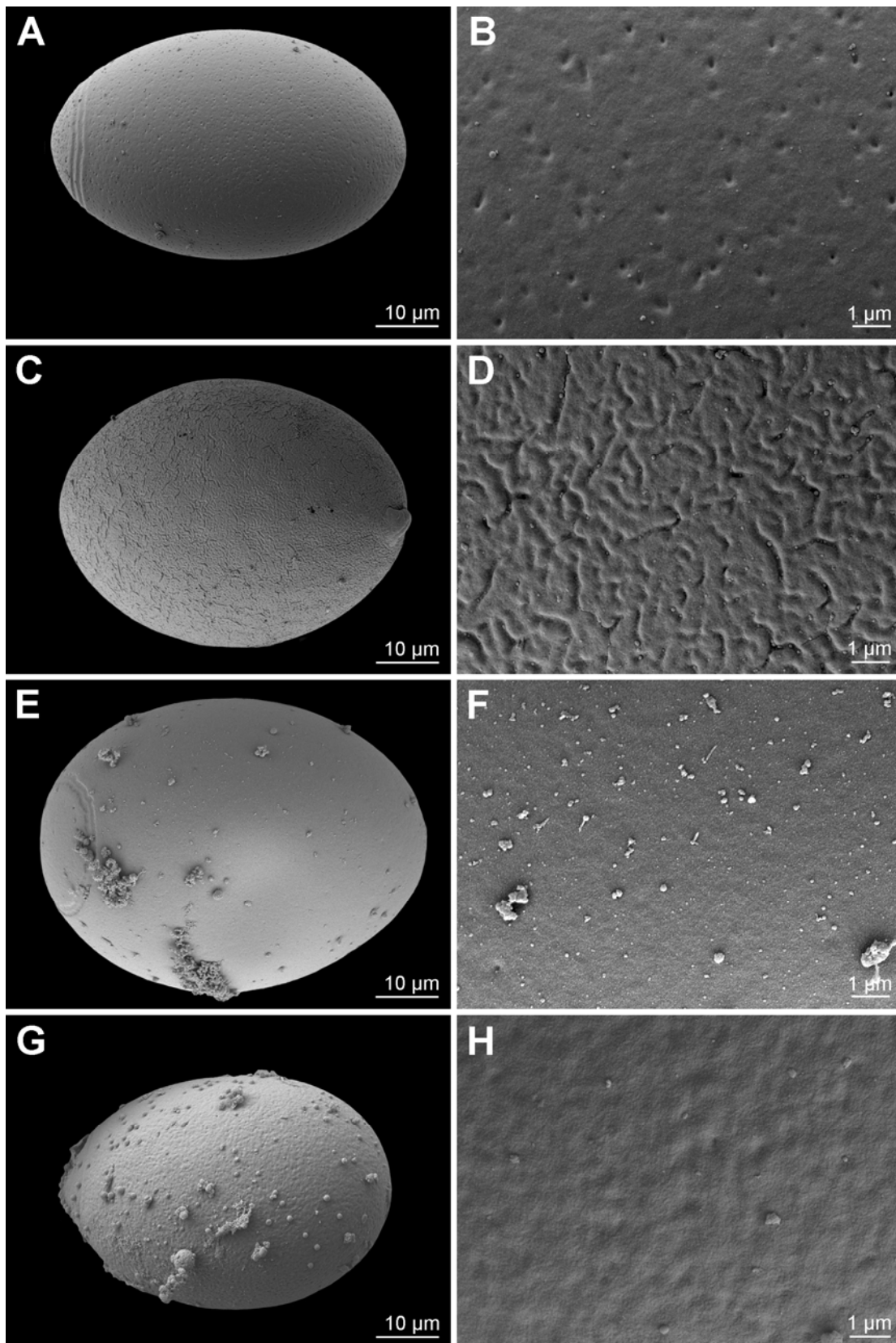
Obr. 5.10. Mikrofotografie vajíček mořských druhů tasemnic rodu *Diphyllbothrium* z kytovců (SEM):

A, B – *D. macroovatum* z *Eschrichtius robustus*; **C, D** – *D. stemmacephalum* z *Lagenorhynchus acutus*; **E, F** – *Diphyllbothrium* sp. 2** z *Globicephala melas*; **B, D, F** – povrch zvětšen 10.000x.

** - podle Balbuena & Raga, 1993

5.2.2. Povrch vajíček sladkovodních a anadromních zástupců rodu *Diphyllobothrium*

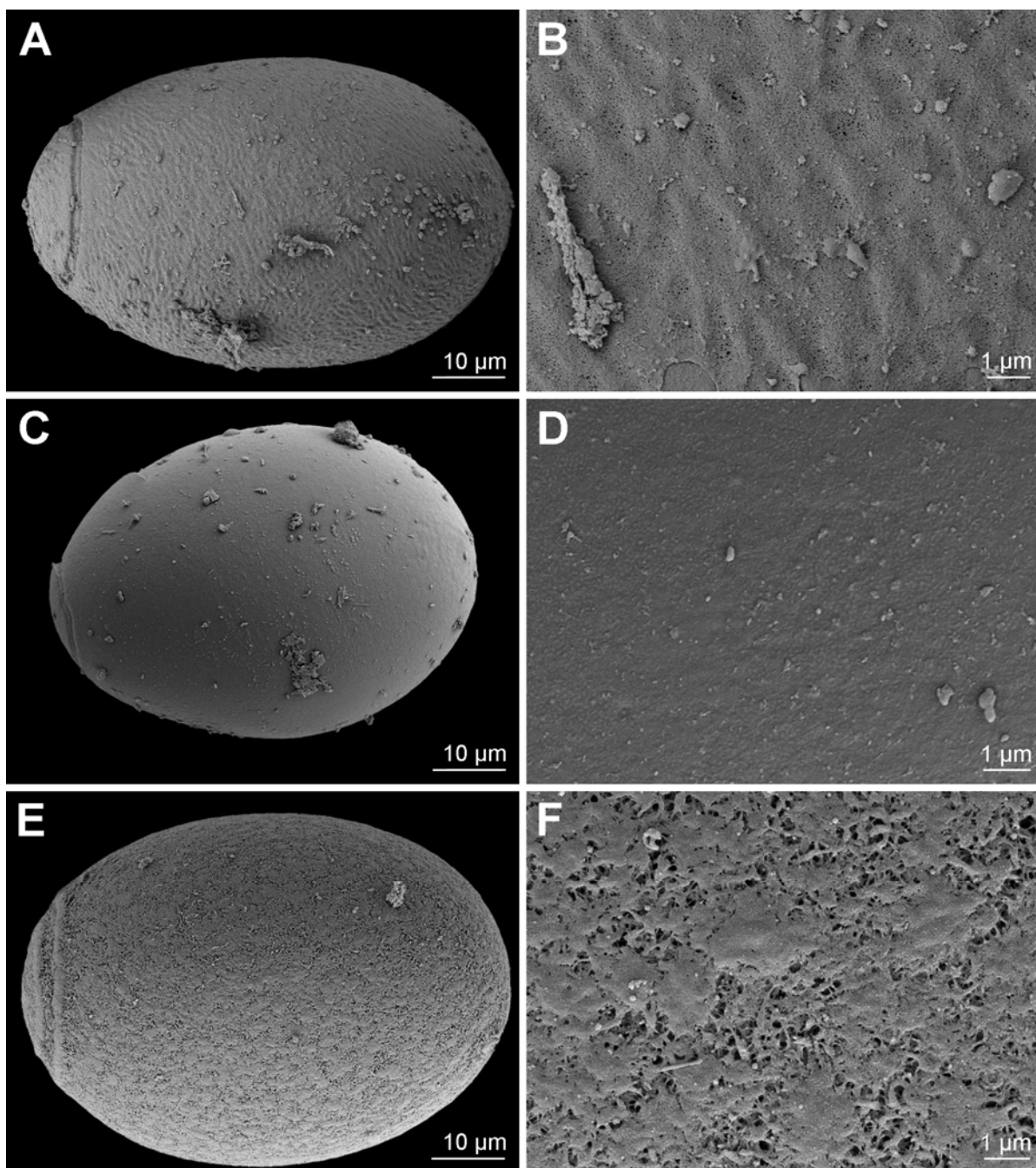
V této studii byly použity tři druhy sladkovodních zástupců a jeden (*D. nihonkaiense*) anadromní zástupce (Obr. 5.11.). V porovnání s mořskými druhy mají druhy sladkovodní viditelně mnohem hladší povrch. Důlky se zde ve většině případů nevyskytují, a pokud ano, jsou daleko mělké, ploché a rozmístěné dál od sebe. Jedině u druhu *D. dendriticum* jsem pozorovala mělké, sotva znatelné důlky, kterých bylo na povrchu kolem 13 na 25 μm^2 (Obr. 5.11. A, B). Naprosto hladký povrch byl pozorován u většiny pozorovaných vajíček *D. latum* (Obr. 5.11. F), avšak vzácně jsem pozorovala jakési zvrásnění u *D. latum* z křečka (Obr. 5.11. D).



Obr. 5.11. Mikrofotografie vajíček sladkovodních a anadromních druhů tasemnic rodu *Diphyllbothrium* (SEM). **A, B** – *D. dendriticum* z *Canis familiaris*; **C, D** – *D. latum* z *Canis familiaris* – experimentální nákaza; **E, F** – *D. latum* z *Homo sapiens* – experimentální nákaza; **G, H** – Anadromní druh *D. nihonkaiense* z *Homo sapiens*; **B, D, F, H** – povrch zvětšen 10.000x.

5.2.3. Povrch vajíček tasemnic ostatních zástupců diphyllbothriidů

Zástupci dalších studovaných rodů řádu Diphyllbothriidea měli převážně hladký povrch, včetně mořského zástupce *Diplogonoporus tetrapterus* i když náznaky prohlubní jsou patrné (Obr. 5.12.: B). Nejhladší vajíčka z těchto tří zástupců jsem pozorovala u druhu *Scyphocephalus bisulcatus* (Obr. 5.12.: C, D).

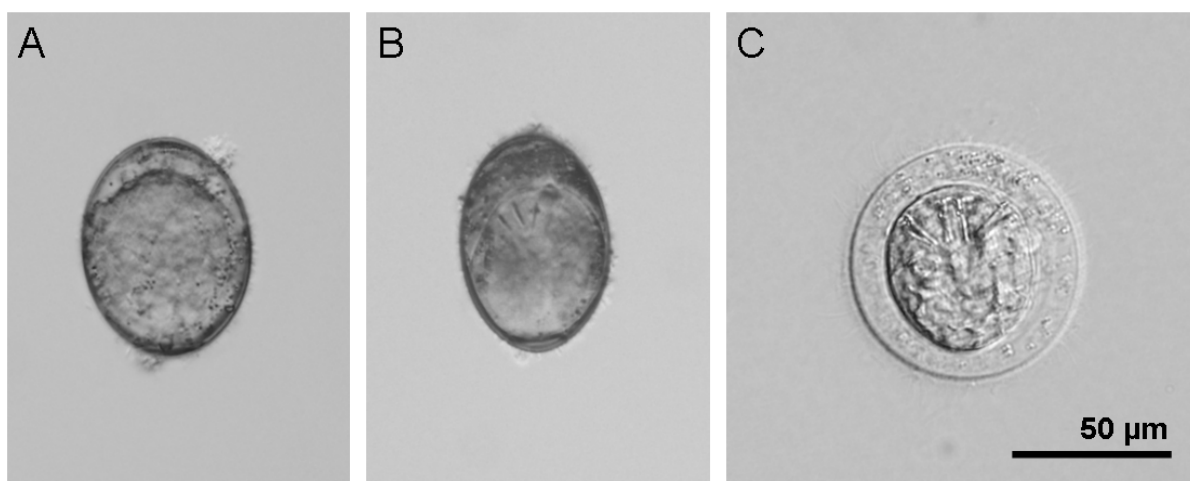


Obr. 5.12. Mikrofotografie vajíček diphyllbothriidních tasemnic. **A, B** – *Diplogonoporus tetrapterus* z *Enhydra lutris*; **C, D** – *Scyphocephalus bisulcatus* z *Varanus salvator*; **E, F** – *Tetragonoporus calyptocephalus* z *Physeter macrocephalus*; **B, D, F** – povrch zvětšen 10.000x.

5.3. Experimentální nákazy

5.3.1. Vývoj vajíček z experimentální nákazy křečků

Při pitvě nakaženého křečka byly získány 4 živí dospělci tasemnice *D. latum*. Délka vajíček byla v rozmezí 64–75 μm a šířka vajíček byla v rozmezí 47–60 μm (Tab. 5.1.). Vývoj vajíček jsem sledovala 18 dnů při teplotě 18 °C. Formování obalů embrya jsem pozorovala od devátého dne (Obr. 5.13.: A) a embryonální háčky byly zformovány 13. den (Obr. 5.13.: B). První koracidia se líhla 17. den kultivace při zahřátí na RT a na světle (Obr. 5.13.: C).



Obr. 5.13. Mikrofotografie vajíček a koracidia *D. latum* z *Mesocricetus auratus*: **A** – formování embryonálních obalů; **B** – formování embryonálních háčků; **C** – koracidium.

Experimentální nákazy klanonožců (rod *Cyclops*) nebyly úspěšné, všech 44 jedinců bylo po 19 dnech negativních.

5.3.2. Vývoj vajíček z experimentální nákazy dobrovolníka

5.3.2.1. Vývoj vajíček ze stolice dobrovolníka

Vajíčka nalezená ve stolici (Tab. 5.1.) byla 63–73 μm dlouhá a 47–54 μm široká. Vajíčka byla živá v časném stádiu vývoje. Vzorek obsahoval cca 49 700 EPG.

Nepozorovala jsem žádné negativní účinky dichromanu draselného na velikost ani životaschopnost vajíček.

Vajíčka kultivovaná v laboratoři při RT kolabovala a nedošlo k vývinu vajíčka. Vajíčka popraskala a odumřela.

Experimentální nákaza okounů nebyla úspěšná. Žádný ze 37 okounů nebyl na konci pokusu nakažen.

5.3.2.2. Vývoj vajíček z vyloučené strobily

Vyloučená strobila (230 DPI) bez scolexu byla dlouhá 2,65 m (Obr. 5.14.). Čerstvě odebraná vajíčka přímo z uteru gravidní proglotidy (Tab. 5.1.) byla 62–76 μm dlouhá a 47–58 μm široká. Průběh vývoje vajíček v různých dnech je zaznamenán v tabulce 5.12 a na obrázku 5.15.

Sledovala jsem také méně zralá nebo nezralá vajíčka z mladších článků tasemnice. Nedošlo k žádnému vývoji v laboratorních podmínkách. Vajíčka nebyla životaschopná, i když byla ve stejném prostředí jako vyvíjející se vajíčka odebraná ze zralých proglotid.

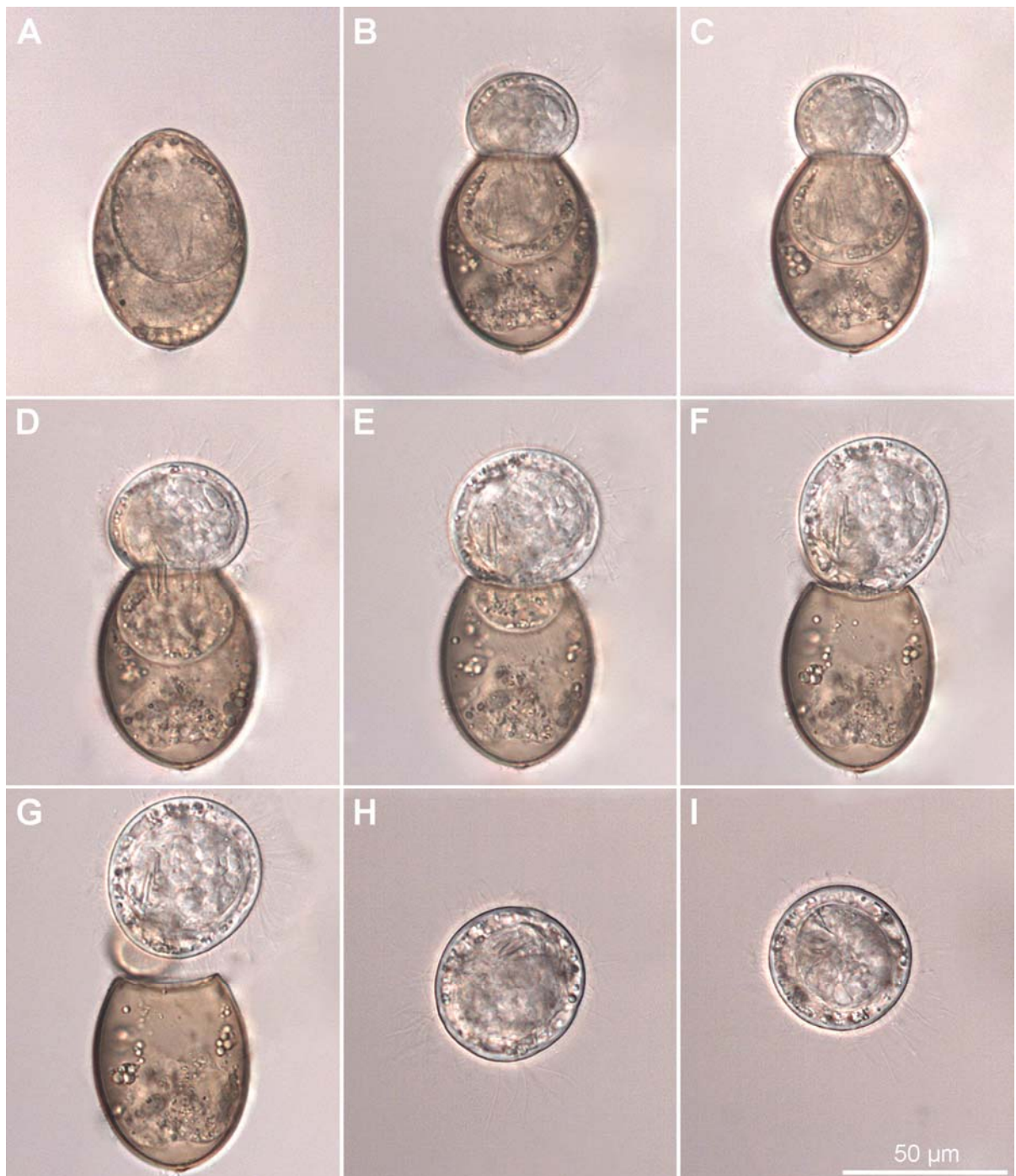


Obr. 5.14. Strobila tasemnice *D. latum* z dobrovolníka vyloučená se stolicí.

Tab. 5.12: Vývoj vajíček z vyloučené strobily. Dny ve kterých byla pozorována zásadní změna.

Den	Pozorovaný jev
1	Vyloučena strobila, odebrána vajíčka
2	Vajíčka živá, vývoj probíhá
8	Vytváření embryoforu
13	Vytvořený embryofor u většiny vajíček
15	Vytvořeny háčky
17	Životaschopná koracidia – pohyb uvnitř vajíčka
18	Líhnutí koracidia

Líhnutí koracidia (Obr. 5.15) je prosec trvající pár sekund až desítky minut. Plně vyvinuté koracidium (Obr. 5.15.) je ve vajíčku pohyblivé. Postupně se přesune k apikální části s operkulem. Po otevření operkula se koracidium začne protlačovat vzniklým otvorem ven z vajíčka (Obr. 5.15.). Ve chvíli, kdy celé koracidium opustí skořápku, se začne okamžitě rychle trhavě pohybovat díky svým dlouhým brvám na povrchu (Obr. 5.15.). Celý proces líhnutí se mi podařilo z dokumentovat také na videu, ve kterém líhnutí trvalo 1 minutu a 20 sekund (od okamžiku otevření operkula po uvolnění celého koracidia z vajíčka).



Obr. 5.15. Mikrofotografie procesu líhnutí koracidia. **A** – vajíčko s plně vyvinutým koracidem; **B – F** – postupné líhnutí koracidia; **G – I** – čerstvě vylíhnuté koracidium.

6. DISKUZE

Komplexní studie morfometrie vajíček diphyllobothriidních tasemnic nebyla doposud provedena. Nejrozsáhlejší publikované práce publikovali Hilliard (1960) či Andersen a Halvorsen (1978), ale tito autoři se vždy zabývali studiem jen úzké skupiny zástupců. Kulatost vajíčka byla studována jen v několika ojedinělých studiích jako například Magath (1919, 1929), Hilliard (1960) či Andersen a Halvorsen (1978). Rozsáhlé práce o morfologii a vývoji vajíček vždy jen jednoho druhu publikovali Vergeer (1936) (*D. latum*) a Tsuboi a kol. (1993) (*D. pacificum*).

Podle naší analýzy vajíček 20 druhů diphyllobothriidních tasemnic má nejmenší vajíčka *D. cameroni*. Ze sladkovodních druhů je to *D. dendriticum* a menší vajíčka z lidských zástupců má *D. pacificum*. Největší vajíčka má, jak už jeho jméno napovídá *D. macroovatum* a to i při porovnání s ostatními dostupnými zástupci rodů *Diplogonoporus*, *Duthiersia*, *Tetragonoporus* a *Scyphlocephalus*.

6.1. Morfometrická analýza vajíček

S ohledem na mezidruhovou podobnost morfometrie vajíček nelze jednoznačně jednotlivé druhy odlišit. V případě čtyř nejvýznamnějších lidských zástupců je možné na základě velikosti a kulatosti nejsnadněji odlišit *D. pacificum*, které má nejmenší a nejkulatější vajíčka. V rámci všech 15 studovaných zástupců z rodu *Diphyllobothrium* je možné jednoznačně rozlišit vajíčka *D. macroovatum*, která jsou největší.

Nejmenší vajíčka jsem pozorovala u druhu *D. cameroni* z tuleně *Monachus schauinslandi*. Stejně rozměry vajíček ze stejného hostitele pozoroval také Rausch (1969). Větší vajíčka (publikovány pouze průměrné hodnoty) pozoroval Maejima a kol. (1983) u jediné známé nákazy člověka. Infekce tímto druhem u Japonského občana je sporná, protože byla identifikována pouze na základě morfologie a navíc *D. cameroni* je popsáno z tuleně havajského (*M. schauinslandi*), který je endemitem havajského souostroví.

U druhu *D. cordatum* jsem zaznamenala rozdíly v kulatosti vajíček, kdy Hilliard (1960) uvádí kulatější vajíčka ze psa (Tab. 5.1.), zatím co já jsem měla méně kulatá vajíčka z přirozených hostitelů – lachtanů. Ve velikosti se však mé vzorky nelišily od Hilliardových (1990).

U vajíček *D. lanceolatum* z tuleně, *D. macroovatum* z kytovce a *D. pacificum* z člověka a tuleňů byly rozměry zjištěné v této práci srovnatelné s údaji uvedené v předchozích studiích (Tab. 3.5., Tab. 5.1.). Některé práce (Baer a kol. 1967; Maejima a kol. 1983; Rausch a kol. 2010; Stunkard 1948) ovšem u *D. pacificum* uvádí menší rozměry. Jedná se o nálezy z lachtana *Callorhinus ursinus* (Tab. 3.5., Tab. 5.1.).

Naopak u druhu *D. hians* jsem naměřila výrazně větší rozměry, než uvádí Rausch (1969) (Tab. 3.5.). V tomto případě se ovšem jednalo o materiál z tuleně havajského (*M. schauinslandi*), zatímco já jsem studovala typový materiál z tulně středomořského (*M. monachus*). V havajském tuleni se vyskytuje nejspíše jiný druh popsán jako *D. rauschi*, jak naznačila Andersen (1987). Srovnatelné hodnoty s literaturou u velikostí vajíček z rozdílných hostitelů jsem zaznamenala u *D. stemmacephalum* (Yamane a kol., 1981) a *D. ursi* (Hilliard 1960) (Tab. 3.5., 5.1.).

Hilliard (1960) uvádí rozdíly v kulatosti u anadromního zástupce *D. ursi*, kdy vajíčka z racka jsou kulatější (0,741) než z vajíčka medvěda (0,658–0,729). Náš vzorek *D. ursi* pocházel z experimentální nákazy křečka (Andersen a kol. 1987b) a tvarem se podobal méně kulatým vajíčkům z medvěda (Tab. 5.1.). U druhého studovaného anadromního zástupce – *D. nihonkaiense* z člověka, jsem pozorovala hodnoty srovnatelné s literaturou, až na výjimku, kterou uvedl Yanadiga a kol. (2010), který pozoroval větší rozměry vajíček u *D. nihonkaiense* z člověka (Tab. 3.5., 5.1.).

U sladkovodních druhů stojí za zmínku vnitrodruhová variabilita, kterou jsem sledovala u dvou druhů. U *D. latum* z člověka jsem u dvou různých případů našla odlišnosti ve velikosti. U našeho dobrovolníka (vzorek PFIS 4) byla vajíčka menší než u vzorku nakaženého pacienta z Ruska (vzorek RUS 106) (Tab. 5.1.). V literatuře jsem se setkala ve většině případů s vajíčky srovnatelných rozměrů až na výjimky, kdy byla pozorována menší vajíčka (Wicht a Peduzzi 2009; Knoff a kol., 2011; Shin a kol., 2011), což může naznačovat na chybnou identifikaci či nevhodně fixovaný materiál (Tab. 3.5.). Vnitrodruhová analýza vajíček *D. latum*, z různých hostitelů v této práci ukázala předpokládanou variabilitu velikosti. Nejmenší vajíčka byla ze vzorků z křečka z Norska (ZMUO) (Obr. 5.5.; Tab. 5.1.). Tyto údaje jsou obdobné výsledkům z nálezů křečků, které uvádí Andersen a Halvorsen (1978) (Tab. 3.5.). Větší byla vajíčka z člověka a medvěda, přičemž z medvěda byla vajíčka největší (Obr. 5.5.). Rozdíly jsem našla i v materiálu pocházejícího z trusu a strobily téhož křečka z naší experimentální nákazy. Vajíčka z trusu byla v průměru o 6,58 μm menší než vajíčka odebraná ze strobily (Obr. 5.5.). Vajíčka ze strobily křečka jsou také srovnatelně velká s vajíčky z lidské nákazy, jak ze stolice tak odebraná z vyloučené strobily. V obou

případech se jednalo o nákazu stejného původu, plerocerkoidy pocházely ze stejných mezipřijemitelů, stejné lokality (Viz kap. 4.2.).

Nejlépe prostudovaným zástupcem je zřejmě *D. dendriticum*, u něhož byl podrobně studován vliv hostitele na velikost vajíček (Hilliard 1960, Andersen a Halvorsen 1978). U tohoto sladkovodního druhu byly nalezeny signifikantní rozdíly mezi vajíčky z různých hostitelů nejen ve velikosti, ale i v kulatosti (vzorky z křečka 0,684, z lišek 0,719–0,735 a z racků 0,702–0,740). Já jsem měla k dispozici pouze materiál z křečka, který se nelišil od předchozích studií (Tab. 5.1). U *D. latum* nebyly v předchozích studiích pozorovány rozdíly v kulatosti mezi hostiteli (lišky a křečci) (Andersen a Halvorsen 1978). Ani já jsem nenalezla signifikantní rozdíly v materiálu z člověka a křečka (Tab. 5.1). Lze tedy pozorovat vnitrodruhovou variabilitu i ve tvaru vajíček (Andersen a Halvorsen 1978; Hilliard 1960).

Na základě rozměrů nelze vajíčka diphyllbothriidů spolehlivě druhově identifikovat, ale je možné od sebe oddělit často zaměňované druhy, zejména zástupců známých z člověka. Typickým příkladem je záměna vajíček *D. pacificum* s vajíčky *D. latum* u mnoha klinických studií (Esteban a kol. 2013). Vajíčka *D. pacificum* jsou mnohem menší a také jsou výrazně kulatější než všechny studované zástupci z člověka (Obr. 5.3., Tab. 5.1.). Identifikace ostatních zástupců na základě velikosti a tvaru je obtížnější, s výjimkou *D. macroovatum*, které má jednoznačně největší vajíčka ze všech studovaných druhů. Ostatní studované zástupci se mezi sebou významně statisticky nelišili (Obr. 5.1., Tab. 5.1.).

6.2. Morfologická analýza povrchu vajíček

Na základě poznatků předchozích autorů (Hilliard 1960, 1972; Ishii a Miyazaki 1971; Kamo 1999) jsem se pokusila využít povrch vajíček studovaný pomocí skenovací elektronové mikroskopie k druhové identifikaci. Potvrdila jsem platnost dvou typů povrchů na základě prostředí, ve kterém se vajíčka vyvíjejí, jak naznačil Hilliard (1960 a 1972). Mořské druhy se na první pohled odlišují od ostatních druhů mnohočetnými, hlubokými důlky rozmístěných hustě po povrchu, zatím co sladkovodní a anadromní druhy mají povrch hladký (Obr. 5.8.–11.).

Hodnotila jsem také hustotu rozmístění důlku na povrchu od hlubokých, ale od sebe vzdálených důlků (např. u *Diphyllbothrium* sp. 2; Obr. 5.10. E, F), až po výrazně zvrásněná vajíčka s mnohočetnými hlubokými těsně u sebe ležícími prohlubněmi (např. *D. cameroni*;

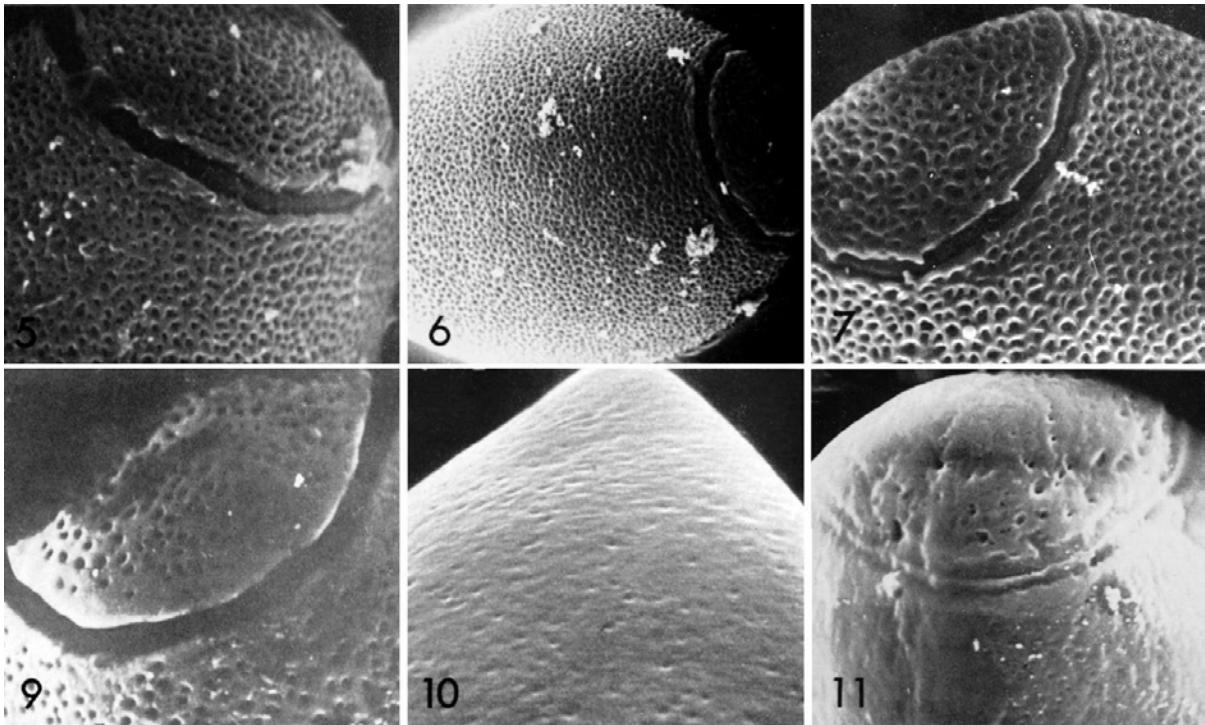
Obr. 5.8. E, F). Mimo důlky může být povrch vajíček také zvrásněný, jako u *D. cameroni* a *D. cordatum* (Obr. 5.8. A, B, E, F). Stejnou strukturu povrchu u zástupců *D. cameroni* a *D. cordatum* pozoroval Hilliard (1960) a Kamo (1999) (Obr. 6.1. a 6.2.).

Vajíčka *D. rauschi*, *D. skriabini* a *D. lanceolatum* se ve struktuře povrchu podobala. U těchto druhů jsem pozorovala kolem 32 důlků na $25 \mu\text{m}^2$.

Vajíčka *D. pacificum* a *D. stemmacephalum* měla vajíčka s nejmenší hustotou důlků a jevila se tak jako nejhladší ze studovaných mořských zástupců (Obr. 5.9. E, F; Obr. 5.10. C, D). Obdobnou strukturu povrchu sledoval také Kamo (1999) (Obr. 6.2.).

Vajíčka *D. macroovatum* (Obr. 5.10.: A, B) mají hustotu důlků obdobnou jako *D. rauschi*, ale důlky jsou hlubší a širší než u *D. rauschi* (Obr. 5.9.: C, D). Povrch vajíček druhu *D. macroovatum* byl sice studován předchozími autory (Yamane a kol. 1976 a, b; Maejima a kol. (1983), ale kvalita mikrofotografií v těchto pracích nedovoluje srovnání s našimi údaji. Přesto se jeví i v těchto pracích povrch vajíček s relativně hojnými hlubokými důlky .

U *D. cameroni* jsem pozorovala obdobně zvrásněný povrch vajíček (cca 53 důlků na $25 \mu\text{m}^2$) jako Kamo (1999) (Obr. 5.8., 6.2.). Tento zástupce má však větší hustotu důlků, než *D. cameroni* (cca 41 důlků na $25 \mu\text{m}^2$). Podobně strukturovaná vajíčka tohoto druhu pozoroval Hilliard (1972) (Obr. 6.1.). U *D. lanceolatum* však Hilliard (1972) pozoroval hustěji rozmístěné důlky pravidelnějšího tvaru (Obr. 6.1.) než naše vzorky (Obr. 5.9. C, D). Na povrchu vajíček druhu *D. pacificum* byly ve všech studiích pozorovány mnohočetné důlky (Obr. 3.12. a 6.2.) (Makiya a kol., 1987; Yazaki a kol., 1990; Tsuboi a kol., 1993; Kamo 1999). V porovnání s těmito studii byly vajíčka z našich vzorků hladší (cca 22 důlky na $25 \mu\text{m}^2$) (Obr. 5.9.). Nejhladší povrch jsem pozorovala u již zmíněného *D. pacificum* a *D. stemmacephalum* (cca 22–21 důlků na $25 \mu\text{m}^2$) (Obr. 5.10. C, D). Podobnou hustotu důlků pozoroval také Kamo (1999) (Obr. 6.2.), který tento druh uvádí jako *D. yonagoense* (synonymum *D. stemmacephalum*) i další studie (Kumazawa a Matsouka 1998; Kamo a kol., 1982).



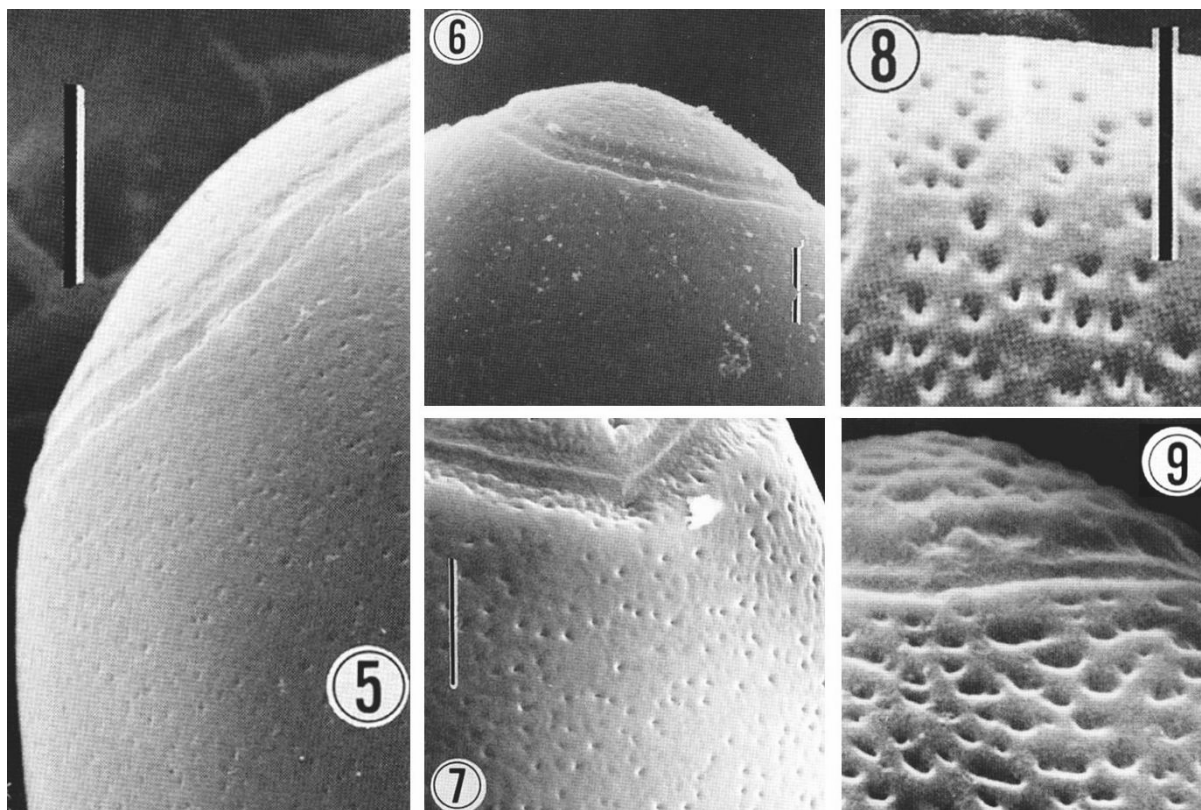
Obr. 6.1.: SEM mikrofotografie vajíček zástupců z rodu *Diphyllobothrium* (Hilliard 1972). 5, 6- *D. cordatum* (x 2900; x 2000); 7- *D. lanceolatum* (x 2900); 9- *Diplogonoporus tetrapterus* (x 2900); 10- *D. dendriticum* (x 5860); 11- *D. latum* (x 3000).

U sladkovodních a anadromních zástupců jsem pozorovala hladší povrch než u druhů mořských přesně tak, jak uvádí Hilliard (1960, 1972). Nejhladší povrch bez prohlubní jsem pozorovala u *D. latum* pocházejícího z experimentální nákazy člověka (Obr. 5.11. E, F). U materiálu ze psa jsem však pozorovala zvrásněný povrch s nerovnostmi a podlouhlými rýhami, ale bez důlků (Obr. 5.11. C, D). Tato povrchová struktura nebyla pozorována u žádných jiných vzorků a proto usuzuji, že se jedná o artefakt, který mohl vzniknout nevhodnou fixací nebo přípravou vzorku.

Anadromní druh *D. nihonkaiense* byl pozorován v první studii povrchu vajíček pomocí skenovací elektronové mikroskopie (Obr. 3.11.) (Ishii a Miyazaki, 1971) a na jeho povrchu byly pozorovány ojedinělé mělké drobné prohlubně. Já jsem u vajíček tohoto druhu pozorovala hladší povrch než Ishii a Miyazaki (1971) (Obr. 5.11.), stejně jako Kamo (1999) (Obr. 6.2.). Měla jsem však k dispozici jen jeden vzorek, u kterého jsem našla pouze jedno nedeformované vajíčko, vhodné pro analýzu povrchu. Druh *D. dendriticum* byl jediný ze sladkovodních/anadromních druhů, u kterého jsme pozorovala drobné mělké důlky na povrchu (cca 13 důlků na $25 \mu\text{m}^2$). Podobný povrch vajíček tohoto druhu pozoroval také Hilliard (1972) (Obr. 6.1.). U druhu *D. latum* jsem pozorovala nejhladší povrch ze všech

studovaných druhů. Hladký povrch s drobnými důlky pozoroval u *D. latum* i Kamo (1999) (Obr. 6.2.).

Struktura povrchu vajíček se dá považovat za specifickou vlastnost, která odpovídá rozdělení zástupců do dvou skupin a to mezi sladkovodní/anadromní a mořské zástupce. Nepodařilo se mi však najít jasný vzor pro určení vajíček do druhu.



Obr. 6.2.: SEM mikrofotografie vajíček zástupců z rodu *Diphyllobothrium* (Kamo, 1999). 5- *D. latum* (5 μm); 6- *D. nihonkaiense* (2 μm); 7- *D. stemmacephalum* (5 μm); 8- *D. pacificum* (5 μm); 9- *D. cameroni* (měřítko neuvedeno).

6.3. Experimentální nákazy

Přesto, že křeček zlatý (*Mesocricetus auratus*) není přirozeným hostitelem tasemnice *D. latum*, je pro svou jednoduchost chovu nejběžnějším experimentálním hostitelem při studiu diphyllobothriidních tasemnic (Braten 1966; Andersen 1971, 1975, 1978; Halvorsen a Andersen, 1974; Wright 2000; Yamane a kol., 1986). Experimentální nákaza křečků plerocerkoidy *D. latum* byla úspěšná u jednoho ze čtyř jedinců. Nákaza byla úspěšná pouze s plerocerkoidy ze svaloviny okounů, zatímco nákazy encystovanými plerocerkoidy z mníků byly neúspěšné. Jednalo se ovšem pouze o dva experimenty, proto z výsledků experimentů nelze vyvozovat závěry.

Člověk byl jako experimentální hostitel používán ve studiích zejména pro sledování příznaku a průběhů infekce (Leiper 1928; Tarassov 1937; Vik 1954; Yazaki a kol. 1984; Andersen a kol. 1987; Dick a kol. 2001). V mé práci jsem využila probíhající experimentální nákazy k získání vajíček k následným pokusům a pozorování vývoje vajíček.

Pokusila jsem se o experimentální nákazy na prvního a následně i druhého meziphostitele. Experimentální nákaza klanonožců (rod *Cyclops*) ani okounů (*Perca fluviatilis*) nebyla úspěšná. Pokus se nezdařil nejspíše díky extrémně vysokým letním teplotám a nevhodným prvním meziphostitelům. V případě mého pokusu se teplota vody vyšplhala až na 29,7°C (viz. Tab. 4.4.). Přirozeným prvním meziphostitelem jsou zejména vznášivky rodu *Diatomus* (Guttowa, 1961, 1965; Vergeer, 1936). Ale tyto zástupci nejsou u nás během léta dostupní. Proto jsem se pokusila o nákazu klanonožců rodu *Cyclops*, kteří byly úspěšně použiti jako experimentální hostitelé Guttowou (1961, 1965).

V rámci této práce se mi podařilo úspěšně kultivovat vajíčka *D. latum* z člověka. Při stálé teplotě 15°C se vajíčka začala líhnout dvacátý den, vývoj probíhal zhruba středně dlouhou dobu. U *D. latum* je nejkratší pozorovaná doba vývoje koracidia 9–11, ale teplota v této práci není uvedena (Essex 1927). Naopak nejdelší dobu vývoje při teplotě 10°C pozoroval Mayer (1967) a to 51 dní.

Ekosystém, který by odpovídal nejbližším lokalitám, kde se *D. latum* vyskytuje – Subalpínská jezera v Itálii, Francii a Švýcarsku) se u nás nevyskytuje. Proto zřejmě v české Republice nemůže dojít k dokončení životního cyklu *D. latum*. Teplota v tomto případě není jediným charakterem, který zabezpečí úspěšný průběh a dokončení cyklu, ale také faunu klanonožců – prvních meziphostitelů. Pokud jeden článek v životním cyklu chybí, nemůže být dokončen. Stále však nejsme schopni vysvětlit, proč se *D. latum* vyskytuje jen v několikáti omezených lokalitách v Evropě.

Z území České republiky není znám jediný případ autochtonní infekce *D. latum*. Vajíčka *D. latum* však byla nalezena v koprolytech z Byl však nalezen z , s výjimkou archeologického nález vajíček *D. latum* z koprolytů v Chrudimi (Tab. 3.3.) (Bartošová a kol. 2011). Původ tohoto nález není znám.

Jediným zástupcem diphyllbothriidů vyskytujícím se na území České republiky je řemenatka (*Ligula intestinalis*), která je u nás známa zejména z druhého meziphostitele, kterým jsou kaprovité ryby (Moravec 2001).

7. ZÁVĚR

Zpracovala jsem literární rešerši týkající se vajíček a vývojového cyklu tasemnic řádu Diphyllobothriidea, především pak o rodech parazitujících i u člověka (*Diphyllobothrium*, *Diplogonoporus* a *Spirometra*).

Provedla jsem morfometrickou studii 1580 vajíček vybraných 20ti zástupců rodu *Diphyllobothrium*, *Diplogonoporus*, *Duthiersia*, *Schystocephalus*, a *Tetragonoporus* pomocí světelné a skenovací elektronové mikroskopie.

Při kombinaci morfometrických a morfologických (povrchových) údajů vajíček je možné některé zástupce (zejména infikující člověka) zařadit do druhu.

Byly provedeny experimentální nákazy křečků a dobrovolníka. Z těchto nákaz jsem provedla kultivaci získaných vajíček a sledovala jejich vývoj. Získaná vajíčka jsem použila také pro experimentální nákazy prvního a druhého mezipřehostitele, které však nebyly úspěšné.

8. POUŽITÁ LITERATURA

- Adl SM, Simpson AGB, Lane ChE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, McManus H, Mitchell EAD, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW (2012):** The Revised Classification of Eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59(5): 429–493
- Abdel Razek AA, Watcharakorn A, Castillo M (2011):** Parasitic diseases of the central nervous system. *Neuroimag. Clin. N. Am.* 21(4): 815–841.
- Alós JI (2011):** Difilobotriosis. *Caso N.* 498: 1–2.
- Anantaphruti MT, Nawa Y, Vanvanitchai Y (2011):** Human sparganosis in Thailand: An overview. *Acta Trop.* 118(3): 171–176.
- Andersen KI (1971):** Studies of the helminth fauna of Norway XVII: Morphological comparison of *Diphyllobothrium dendriticum* Nitzsch 1824, *D. norvegicum* Vik 1957 and *D. latum* (Linné 1758) [Cestoda: Pseudophyllidea]. *Norw. J. Zool.* 19(1): 21–36.
- Andersen KI (1975):** Comparison of surface topography of three species of *Diphyllobothrium* (Cestoda, Pseudophyllidea) by scanning electron microscopy. *Int. J. Parasitol.* 5(3): 293–300.
- Andersen KI (1978):** The development of the tapeworm *Diphyllobothrium latum* (L. 1756) (Cestoda; Pseudophyllidea) in its definitive hosts, with special references to the growth patterns of *D. dendriticum* (Nitzsch, 1824) and *D. ditremum* (Creplin, 1827). *Parasitology* 77: 111–120.
- Andersen KI (1987):** A redescription of *Diphyllobothrium stemmacephalum* Cobbold, 1858 with comment on other marine species of *Diphyllobothrium* Cobbold, 1858. *J. Nat. Hist.* 21: 411–427.
- Andersen KI, Halvorsen O (1978):** Egg size and form as taxonomic criteria in *Diphyllobothrium*. *Parasitology* 76: 229–240.
- Andersen KI, Ching HL, Vik R (1987):** A review of freshwater species of *Diphyllobothrium* with redescrptions and the distribution of *D. dendriticum* (Nitzsch, 1824) and *D. ditremum* (Creplin, 1825) from North America. *Can. J. Zool.* 65: 2216–2228.

- Arizono N, Fukumoto S, Tademoto S, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Kuramochi T (2008):** Diplogonoporiasis in Japan: genetic analyses of five clinical isolates. *Parasitol. Int.* 57(2): 212–216.
- Arizono N, Shedko M, Yamada M, Uchikawa R, Tegoshi T, Takeda K, Hashimoto K (2009):** Mitochondrial DNA divergence in populations of the tapeworm *Diphyllobothrium nihonkaiense* and its phylogenetic relationship with *Diphyllobothrium klebanovskii*. *Parasitol. Int.* 58(1): 22–28.
- Ash LR, Orihel T C (2007):** Ash & Orihel's Atlas of Human Parasitology. *American Society of Clinical Pathologists Press.*
- Ashford RW, Crewe W (2003):** The parasites of *Homo sapiens*: an annotated checklist of the Protozoa, Helminths and Arthropods for which we are home. London, UK, Taylor and Francis.
- Atias A, Cattán P (1976):** Primero caso humano de infección por *Diphyllobothrium pacificum* en Chile. *Rev. Med. Chile.* 104: 216–217.
- Baer JG (1969):** *Diphyllobothrium pacificum*, a tapeworm from sea lions endemic in man along the coastal area of Peru. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 26: 717–723.
- Baer JG, Miranda CH, Fernandez RW, Medina TJ (1967):** Human diphyllbothriasis in Peru. *Z. Parasitenk.* 28: 277–289.
- Bailly M, Bouchet F (2013):** Diphyllbothrium in the past: Review and new records. *Int. J. Paleopathol.* 3(3): 182–187.
- Bailly M, Leuzinger U, Schlichtherle H, Bouchet F (2005):** Diphyllbothrium: Neolithic parasite? *J. Parasitol.* 91(4): 957–959.
- Balbuena JA, Raga JA (1993):** Diphyllbothriids (Cestoda: Pseudophyllidea) from the long-finned pilot whale *Globicephala melas* (Traill, 1809) off the Faroe Islands, with comments on the taxonomy of *Diphyllobothrium* Cobbold, 1858 species from cetaceans. *Syst. Parasitol.* 26(2): 117–126.
- Bartošová L, Ditrich O, Beneš J, Frolík J, Musil J (2011):** Paleoparasitological findings in medieval and early modern archaeological deposits from Hradebni Street, Chrudim, Czech Republic. *IANSA* 2(1): 27–38.
- Bathurst RR (2005):** Archaeological evidence of intestinal parasites from coastal shell middens. *J. Archaeol. Sci.* 32(1): 115–123.
- Beveridge I (2001):** The use of life-cycle characters in studies of the evolution of cestodes. In: Littlewood DTJ, Bray RA, editors: *Interrelationships of the Platyhelminthes*. Taylor and Francis, London and New York. 250-256

- Bizyulyavichus SK (1968):** The question of the survival of a broad tapeworm eggs in the environment. In: Prokopenko (ed.) *Diphyllobothriosis*. Moskow, 48–57 pp.
- Bonsdorff Bv (1977):** *Diphyllobothriasis in man*. London: Academic Press, 189 pp.
- Bonsdorff Bv, Bylund G (1982):** The ecology of *Diphyllobothrium latum*. *Ecol. Dis.* 1: 21–26.
- Bouchet F, Lefèvre C, West D, Corbett D (1999):** First paleoparasitological analysis of a midden in the Aleutian Islands (Alaska): Results and limits. *J. Parasitol.* 85(2): 369–372.
- Bouchet F, West D, Lefèvre C, Corbett D (2001):** Identification of parasitoses in a child burial from Adak Island (Central Aleutian Islands, Alaska). *C. R. Acad. Sci. III-Vie* 324(2): 123–127.
- Bråten T (1966).** Studies of the helminth fauna of Norway. VII. Growth, fecundity and fertility of *Diphyllobothrium norwegicum* Vik (Cestoda) in the golden hamster. *Zoological Laboratory of the University of Oslo*.
- Bylund G (1975):** The taxonomic significance of embryonic hooks in four European *Diphyllobothrium* species (Cestoda, Diphylobothriidae). *Acta Zool. Fen.* 142: 21-22
- Caira JN, Littlewood DTJ (2013):** Worms, Platyhelminthes. In: Levin S.A. (ed.) *Encyclopedia of Biodiversity*, second edition, Volume 7, pp. 437-469. Waltham, MA: Academic Press.
- Callen EO, Cameron TMW (1960):** A prehistoric diet revealed in coprolites. *New Scientist* 8: 35-40.
- Cattan PE, Atias A, Babero BB, Torees D (1977):** Helminthofauna de Chile. V. Primer hallazgo de *Diphyllobothrium pacificum* (Nybelin 1931) Margolis 1956, en lobos marinos de la costa chilena. *Revista Iberica de Parasitología* 37: 285–290.
- Cavalcanti P, Filia MA, Crotti D (2004):** Infestazione da botriocefalo: descrizione di un caso e problematiche diagnostiche (A case of diphylobothriasis: description and diagnosis). *Infez. Med.* 4: 266–269.
- Clavel A, Bargues MD, Castillo FJ, Rubio MC, Mas-Coma S (1997):** Diplogonoporiasis presumably introduced into Spain: first confirmed case of human infection acquired outside the Far East. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57: 317–320.
- Cobbold TS (1858):** Observations on Entozoa, with notices of several new species, including an account of two experiments in regard to the breeding of *Taenia serrata* and *T. cucumerina*. *Trans. Linn. Soc. London* 22: 155–172.

- Cobbold TS (1883):** Description of *Ligula mansoni*, a new human cestode. *J. Linn. Soc. London, Zool.* 17(98): 78–83.
- Conn DB, Swiderski Z (2008):** A standardised terminology of the embryonic envelopes and associated developmental stages of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda). *Folia Parasitol.* 55(1): 42–52.
- Conn DB (2000):** Atlas of Invertebrate Reproduction and Development, 2nd Edition. John Wiley & Sons, Inc., New York, 315 pp.
- Daly JJ (1981):** Sparganosis. CRC handbook series in zoonoses. Section C: Parasitic Zoonoses. J. H. Steele and G. W. Beran. Boca Raton, CRC Press. 1: 293–312.
- Delyamure SL, Skryabin AS, Serdiukov AM (1985):** Diphyllbothriata – flatworm parasites of man, mammals and birds. Moscow, Russia, Nauka. vo 19
- Deng L, Xiong PJ, Qian SK (2011):** Diagnosis and stereotactic aspiration treatment of cerebral sparganosis: summary of 11 cases. *J. Neurosurg.* 114(5): 1421–1425.
- Dick T (2007).** Diphyllbothriasis: the *Diphyllbothrium latum* human infection conundrum and reconciliation with a worldwide zoonosis. Food-borne parasitic zoonoses: fish and plant-borne parasites (world class parasites). K. Darwin Murrell and B. Fried. London, UK, Springer. 11: 151–184.
- Dick TA, Nelson PA, Choudhury A (2001):** Diphyllbothriasis: update on human cases, foci, patterns and sources of human infections and future considerations." *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 32(2): 59–76.
- Dörücü M, Adams CE, Huntingford FA, Crompton DWT (1995):** How fish-helminth associations arise: an example from Arctic charr in Loch Rannoch. *J. Fish Biol.* 47: 1038-1043.
- Dörücü M (1996):** Ecology of helminth infections in salmonid fish. Division of Environmental and Evolutionary Biology. PhD thesis, Glasgow, University of Glasgow, 246 pp.
- Dupouy-Camet J, Peduzzi R (2004):** Current situation of human diphyllbothriasis in Europe. *Eurosurveillance* 9: 31–34.
- Essex HE (1927):** Early development of *Diphyllbothrium latum* in northern Minnesota. *J. Parasitol.* 14: 106–109.
- Essex HE, Magath TB (1931):** Comparison of the variability of ova of the broad fish tapeworm, *Diphyllbothrium latum*, from man and dogs: its bearing on the spread of infestation with this parasite. *Am. J. Hyg.* 14(3): 698–704.

- Esteban JG, Muñoz-Antoli C, Borrás M, Colomina J, Toledo R (2013):** Human infection by a “fish tapeworm”, *Diphyllobothrium latum*, in a non-endemic country. *Infection*: 1–4.
- Eguchi S (1973):** *Diphyllobothrium latum* (Linnaeus, 1758). *Progress of Med. Parasitol. Japan* 5: 129–143.
- Ferreira LF, de Araújo AJG, Confalonieri UEC, Nunez L (1984):** The finding of eggs of *Diphyllobothrium* in human coprolites (4,100–1,950 B.C.) from northern Chile. *Mem. I. Oswaldo Cruz* 79(2): 175–180.
- Fraser PG (1960):** The form of the larval hooks as a means of separating species of *Diphyllobothrium*. *J. Helminthol.* 34: 73–80.
- Giribet G (2008):** Assembling the lophotrochozoan (=spiralian) tree of life. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363, 1513–1522
- Goncalves MLC, Araujo A, Ferreira LF (2003):** Human intestinal parasites in the past: New findings and a review. *Mem. I. Oswaldo Cruz* 98: 103–118.
- González A, Sagua H, Sagua H, Cortéz L, Lobo J, Neira I, Araya J (1999):** *Diphyllobothrium pacificum* human infection. Report of one case. *Rev. Med. Chile* 127(1): 75–77.
- Guttowa A. (1961):** Experimental investigations on the systems procooids of *Diphyllobothrium latum* (L.) – Copepoda. *Acta Parasitol.* 9(25): 371–408.
- Halvorsen O, Andersen K (1974):** Some effects of population density in infections of *Diphyllobothrium dendriticum* (Nitzsch) in golden hamster (*Mesocricetus auratus* Waterhouse) and common gull (*Larus canus* L.). *Parasitology* 69(2): 149–160.
- Hatsushika R, Maejima J, Kamo H (1981):** Experimental studies on the development of *Diphyllobothrium macroovatum* Jurakhno, 1973 from the minke whale, *Balaenoptera acutorostrata* I. Embryonation and hatching of the eggs. *Jpn. J. Parasitol.* 30(3): 205–213.
- Hatsushika R, Shirouzu H, Okino T (1987):** Morphological study on the diphyllobothriid cestode from killer whale, *Orcinus orca*. *Jpn. J. Parasitol.* 36(3): 166–173.
- Hatsushika R, Shirouzu H (1990):** A new species of marine tapeworm *Diphyllobothrium orcini* n. sp. (Cestoda: Pseudophyllidea) found from killer whale *Orcinus orca* (Linnaeus, 1758) in Japan. *Jpn. J. Parasitol.* 39(6): 566–573.
- Hatsushika R, Yamane Y, Maejima J, Kamo H (1974):** Experimental studies on the development of *Diphyllobothrium* sp. from the minke whale, *Balaenoptera*

acutorostrata. 1. On the embryonation of eggs and the larval development in the copepod host. *Jpn. J. Parasitol.* 23(2).

Hilliard DK (1960): Studies on the helminth fauna of Alaska. XXXVIII. The taxonomic significance of eggs and coracidia of some diphyllbothriid cestodes. *J. Parasitol.* 46: 703–715.

Hilliard DK (1972): Studies on the helminth fauna of Alaska. LI. Observations on eggshell formation in some diphyllbothriid cestodes. *Can. J. Zool.* 50: 585–592.

Hsü HF (1935): Contribution a l'étude des cestodes de Chine. *Rev. Suisse Zool.* 42: 477–569.

Hussey KL (1950): A comparative study of coracidia and procercooids of Pseudophyllodeans of the Great Lakes region. *J. Parasit.* 39: 44 (W.L. 11428)

Chai JY, Murrell KD, Lymbery AJ (2005): Fish-borne parasitic zoonoses: Status and issues. *Int. J. Parasitol.* 35(11–12): 1233–1254.

Chen S, Ai L, Zhang Y, Chen J, Zhang W, Li Y, Muto M, Morishima Y, Sugiyama H, Xu X, Zhou X, Yamasaki H (2014): Molecular Detection of *Diphyllbothrium nihonkaiense* in Humans, China. *Emerg. Infect. Dis.* 20(2): 315–318.

Chervy L (2002): The terminology of larval cestodes or metacestodes. *Syst. Parasitol.* 52: 1–33.

Chervy L (2009): Unified terminology for cestode microtriches: a proposal from the International Workshops on Cestode Systematics in 2002-2008. *Folia Parasitol.* 56(3): 199-230.

Chung SW, Kim YH, Lee EJ, Kim DH, Kim GY (2012): Two cases of pulmonary and pleural sparganosis confirmed by tissue biopsy and immunoserology. *Braz. J. Infect. Dis.* 16(2): 200–203.

Ijima I, Kurimoto T (1894): On a new human tape-worm (*Bothriocephalus* sp.). *J. Coll. Sci.* 6(4): 371–384.

Ishii Y, Miyazaki I (1971): Morphology of helminth ova revealed by the scanning electron microscope. *Chin. J. Microbiol.* 4: 123–131.

Jeon HK, Kim KH, Huh S, Chai JY, Min DY, Rim HJ, Eom KS (2009): Morphologic and genetic identification of *Diphyllbothrium nihonkaiense* in Korea. *Kor. J. Parasitol.* 47(4): 369–375.

Kamo H (1999): Guide to identification of diphyllbothriid cestodes. Tokyo, Japan.

Kamo H (2003): Chapter III Cestodes. 1 General view. *Prog. Med. Parasitol. Japan* 8: 236–243.

- Kamo H, Iwata S, Hatsushika R, Maejima J (1973):** Experimental studies on the life-cycle of *Diplogonoporus grandis*. II. Experimental infection of marine copepods with coracidia. *Jpn. J. Parasitol.* 22(2): 21–28.
- Kamo H, Maejima J, Hatsushika R (1982):** Taxonomical status of the so-called "Koga-Okamura type" of the genus *Diphyllobothrium*. *J. Yonago. Med. Ass.* 3(6): 550–554.
- Kamo H, Yazaki S, Maejima J, Fukumoto S, Hiraga M (1980):** Development of broad tapeworm plerocercoids from pink salmon, *Oncorhynchus gorbusha*, in golden hamster. *Jpn. J. Parasitol.* 29(2): 64.
- Khalil LF, Jones A, Bray RA (1994):** Keys to the Cestode Parasites of Vertebrates. CAB International, Wallingford, UK, 751 pp.
- Kifune T, Hatsushika R, Ushirogawa H, Takeda S, Kono K, Shimizu T (2000):** A case study of human infection with diphyllobothriid tapeworm (Cestoda: Pseudophyllidea) found from a man in Fukuoka Prefecture, Japan. *Med. Bull. Fukuoka Univ.* 27(2): 93–100.
- Kittiponghansa S, Tesana S, Ritch R (1988):** Ocular sparganosis: a cause of subconjunctival tumor and deafness. *Trop. Med. Parasitol.* 39(3): 247–248.
- Knoff M, Pinto RM, de São Clemente SC, Fonseca MCG, Gomes DC (2011):** *Diphyllobothrium latum* and *Diphyllobothrium* sp. as the agents of diphyllobothriasis in Brazil: morphological analysis and two new case reports. *Rev. Bras. Med. Vet.* 33(3): 159–164.
- Kornyushin VV (2009):** *Taenia lata*: Position in the system of the family Diphyllobothriidae. *Vestnik zoologii* 23: 69–76.
- Kron MA, Guderian R, Guevara A, Hidalgo A (1991):** Abdominal sparganosis in Ecuador: a case report. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44(2): 146–150.
- Kuhlow F (1953):** Über die Entwicklung und Anatomie von *Diphyllobothrium dendriticum*, Nitzsch 1824. *Z. Parasitenk.* 16: 1–35.
- Kuchta R., 2007:** Revision of the paraphyletic “Pseudophyllidea” (Eucestoda) with description of two new orders Bothriocephalidea and Diphyllobothriidea. Ph.D. Thesis, Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 99 pp.
- Kuchta R, Brabec J, Kubáčková P, Scholz T (2013):** Tapeworm *Diphyllobothrium dendriticum* (Cestoda)—Neglected or Emerging Human Parasite? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7(12).

- Kuchta R, Scholz T, Brabec J, Wicht B (2014):** Chapter 16 Diphyllbothrium, Diplogonoporus and Spirometra. In: Xiao, Ryan, Feng (eds.) Biology of Foodborne Parasites. Section III Important Foodborne Helminths. September 15, 2014 by CRC Press
- Kuchta R, Scholz T, Brabec J, Bray RA (2008):** Suppression of the tapeworm order Pseudophyllidea (Platyhelminthes: Eucestoda) and the proposal of two new orders, Bothriocephalidea and Diphyllbothriidea. *Int. J. Parasitol.* 38(1): 49–55.
- Kumazawa H, Matsuoka R (1998):** *Diphyllbothrium yonagoense*: another case found in Kochi Prefecture, Japan. *Parasitol. Int.* 47(1): 41–45.
- Le Bas GZL (1924):** Experimental studies on *Dibothriocephalus latus* in man. *J. Helminthol.* 2(04): 151–166.
- Lee EB, Song JH, Park NS, Kang BK, Lee HS, Han YJ, Kim HJ, Shin EH, Chai JY (2007):** A case of *Diphyllbothrium latum* infection with a brief review of diphyllbothriasis in the Republic of Korea. *Kor. J. Parasitol.* 45: 219–223.
- Lee J-H, Kim G-H, Kim SM, Lee SY, Lee W-Y, Bae J-W, Shin K-S, Hwang K-K, Kim D-W, Cho M-Ch (2011):** A case of sparganosis that presented as a recurrent pericardial effusion. *Korean Circ. J.* 41(1): 38–42.
- Lee S-H, Chai J-Y, Hong S-T, Sohn W-M, Choi D (1988):** A case of *Diphyllbothrium yonagoense* infection. *Seoul J. Med.* 29(4): 391–395.
- Lee S-H, Chai J-Y, Seo M, Kook J, Huh S, Ryan Y-S, Ahn Y-K (1984):** Two cases of human infection by adult of *Spirometra erinacei*. *Kor. J. Parasitol.* 22: 66–71.
- Li AH, Na BK, Song KJ, Lim SB, Chong CK, Park YK, Kim TS (2011):** Identification and characterization of a mitochondrial manganese superoxide dismutase of *Spirometra erinacei*. *J. Parasitol.* 97(6): 1106–1112.
- Linstow O (1892):** Helminthen von Sud-Georgien Nach der Ausbeute der Deutschen Expedition von 1882-1883. *Jahrbuch der Hamburgischen Wissenschaftlichen Anstalten* 9: 59–77.
- Maejima J, Yazaki S, Fukumoto S (1983):** Morphological comparison of eggs between marine species and freshwater species in diphyllbothriid cestodes. *Jpn. J. Parasitol.* 32: 27–42.
- Maejima J, Yazaki S, Fukumoto S (1991):** Comparative studies on egg-sizes and -forms of various *Diphyllbothrium* species from man in Japan. *Jpn. J. Parasitol.* 40(2): 170–176.

- Maejima J, Yazaki S, Fukumoto S, Hiraga M, Kamo H (1981):** Morphological observations of *Diphyllobothrium pacificum* (Nybelin, 1931) Margolis, 1956 from fur seals, *Callorhinus ursinus* in Japan. *Yonago Acta Med.* 25(2–3): 69–79.
- Magath T (1919):** The eggs of *diphyllobothrium latum*. *J. Am. Med. Assoc.* 73: 85-87.
- Magath TB (1929):** Experimental studies on *Diphyllobothrium latum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1-9: 17-48
- Makiya K, Tsukamoto M, Horio M, Goto M (1987):** *Diphyllobothrium pacificum*, a cestode of marine mammals, expelled from a Japanese seaman. *Jpn. J. Parasitol.* 36: 145–153.
- Maltsev VN (2000):** A new data on four species of *Diphyllobothrium* parasiting pinnipeds in Antarctica. *Proceedings of the Southern Scientific Research Institute of Marine Fisheries and Oceanography* 45: 93–105.
- Markowski S (1952):** The cestodes of pinnipeds in the Arctic and other regions. *J. Helminthol.* 26: 171–214.
- Martinson E, Reinhard KJ, Buikstra JE, de la Cruz KD (2003):** Pathoecology of Chiribaya parasitism. *Mem. I. Oswaldo Cruz* 98(Suppl. 1): 195–205.
- Marval F, Gottstein B, Weber M, Wicht B (2013):** Imported diphyllobothriasis in Switzerland: molecular methods to define a clinical case of *Diphyllobothrium* infection as *Diphyllobothrium dendriticum*, August 2010. *Eurosurveillance* 18(3): 31–36.
- Mercado R, Yamasaki H, Kato M, Munoz V, Sagua H, Torres P, Castillo D (2010):** Molecular identification of the *Diphyllobothrium* species causing diphyllobothriasis in Chilean patients. *Parasitol. Res.* 106(4): 995–1000.
- Meyer MC, Vik R (1963):** The life cycle of *Diphyllobothrium sebago* (Ward, 1910). *J. Parasitol.* 49(6): 962–968.
- Meyer MC (1967):** Hatching of *Diphyllobothrium sebago* eggs in nature. *Transactions of the American Microscopical Society* 86: 239–243.
- Min DY (1990):** Cestode infections in Korea. *Kor. J. Parasitol.* 28(Suppl): 123–144.
- Moravec F (2001):** Checklist of the Metazoan Parasites of Fishes of the Czech Republic and the Slovak Republic (1873-2000). *Academia, Praha.*
- Mougeot G, Cambon M, Menerath JM, Dimeglio V, Houin R (1999):** Human eye anterior chamber sparganosis. *Parasite* 6(4): 365–366.
- Mueller JF (1938):** Studies on *Sparganum mansonoides* and *Sparganum proliferum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 18: 303–328.

- Mueller JF (1974):** The biology of *Spirometra*. *J. Parasitol.* 60(1): 3–14.
- Mueller JF, Hart EP, Walsh W (1963):** Human sparganosis in the United States. *J. Parasitol.* 49(2): 294–296.
- Muratov IV, Posokhov PS (1989):** Specific features of epidemiology of diphyllbothriosis in the lower part of the Amur watershed. *Meditssinskaia Parazitologija i Parazitarnye Bolezni* 1989: 53–57. **Muratov IV (1992):** A new type of diphyllbothriasis foci in the Far East. *Meditssinskaia Parazitologija i Parazitarnye Bolezni* 1992: 25–27.
- Nakazawa M, Amano T, Oshima T (1992):** The first record of human infection with *Diphyllbothrium orcini* Hatsushika and Shirouzu, 1990. *Jpn. J. Parasitol.* 41(4): 306–313.
- Nickerson W.S. (1906):** The broad tapeworm in Minnesota, with the report of a case of infection acquired in the state. *J. Am. Med. Assn.* 46: 711–713
- Opuni EK, Muller RL (1974):** Studies on *Spirometra theileri* (Baer, 1925) n. comb. 1. Identification and biology in the laboratory. *J. Helminthol.* 48(1): 15–23.
- Otranto D, Eberhard M L (2011):** Zoonotic helminths affecting the human eye. *Parasite. Vector.* 4(1–21).
- Pampiglione S, Fioravanti ML, Rivasi F (2003):** Human sparganosis in Italy - Case report and review of the European cases. *Apmis* 111(2): 349–354.
- Pasternak AF, Huntingford FA, Crompton DWT (1995):** Changes in metabolism and behaviour of the freshwater copepod *Cyclops strenuus abyssorum* infected with *Diphyllbothrium* spp. *Parasitology* 110(4): 395–399.
- Pastor-Valle J, González LM, Martín-Clemente JP, Merino FJ, Gottstein B, et al. (2014):** Molecular diagnosis of diphyllbothriasis in Spain, most presumably acquired via imported fish, or sojourn abroad. *New Microb. New Inf.* 2: 1–6.
- Patrucco R, Tello R, Bonavida D (1983):** Parasitological studies of coprolites of pre-hispanic peruvian populations. *Curr. Anthropol.* 24(3): 393–394.
- Paugam A, Yera H, Poirier P, Lebuissou A, Dupouy-Camet J (2009):** *Diphyllbothrium nihonkaiense* infection: a new risk in relation with the consumption of salmon. *Presse Med.* 38(4): 675–677.
- Podjapolskaja WP, Gnedina MP (1932):** *Diphyllbothrium tungussicum* n. sp. ein neuer Parasit des Menschen. *Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde* 126: 415–419.
- Qiu MH, Qiu MD (2009):** Human plerocercoidosis and sparganosis: I. A historical review on aetiology. *Chin. J. Parasitol. Parasit. Dis.* 27(1): 54–60.

- Rausch R (2005):** *Diphyllobothrium fayi* n. sp. (Cestoda: Diphyllbothriidae) from the Pacific Walrus, *Odobenus rosmarus divergens*. *Comp. Parasitol.* 72(2): 129–135.
- Rausch R, Williamson SL (1958):** Studies on the helminth fauna of Alaska. XXXIII. The description and occurrence of *Diphyllobothrium alascense* n. sp. (Cestoda). *Z. Tropenmed. Parasitol.* 9(1): 64–72.
- Rausch RL (1956):** Studies on the helminth fauna of Alaska. XXVIII. The description and occurrence of *Diphyllobothrium dalliae* n. sp. (Cestoda). *Trans. Am. Microsc. Soc.* 45: 180–187.
- Rausch RL (1969):** Diphyllbothriid cestodes from the Hawaiian monk seal, *Monachus schauinslandi* Matschie, from Midway Atoll. *J. Fish. Res. Canada* 26: 947–956.
- Rausch RL, Hilliard DK (1970):** Studies on the helminth fauna of Alaska. XLIX. The occurrence of *Diphyllobothrium latum* (Linnaeus, 1758) (Cestoda: Diphyllbothriidae) in Alaska, with notes on other species. *Can. J. Zool.* 48: 1201–1212.
- Rausch RL, Adams AM, Margolis L (2010):** Identity of *Diphyllobothrium* spp. (Cestoda: Diphyllbothriidae) from sea lions and people along the Pacific coast of South America. *J. Parasitol.* 96: 359–365.
- Rehák M, Kolářová L, Kohnová J, Řehák J, Mohlerová Š, Fric E, Chrapek O (2006):** Ocular sparganosis in the Czech Republic – a case report. *Klin. Mikrobiol. Infekc. Lek.* 12(4): 161–164.
- Reinhard KJ (1992):** Parasitology as an Interpretive Tool in Archaeology. *Am. Antiquity* 57: 231–245.
- Reinhard K, Urban O (2003):** Diagnosing ancient diphyllbothriasis from Chinchorro mummies. *Mem. I. Oswaldo Cruz* 98(Suppl. 1): 191–193.
- Roberts L.S., Janovy J. Jr. 2009.** Foundations of Parasitology. Eighth Edition, McGraw-Hill, New York, 701 pp.
- Rosen F (1919):** Recherches sur le développement des cestodes. I. Le cycle évolutif des Bothriocéphales. *B. Soc. Sci. Natur. Neuchâtel* 43: 241–300.
- Santoro C, Vinton SD, Reinhard KJ (2003):** Inca expansion and parasitism in the Lluta Valley: Preliminary data. *Mem. I. Oswaldo Cruz* 98(Suppl. 1): 161–163.
- Semenas L, Kreiter A, Urbanski J (2001):** New cases of human diphyllbothriasis in Patagonia, Argentina. *Rev. Saúde Publ.* 35(2): 214–216.
- Semenas L, Ubeda C (1997):** Difilobotriasis humana en la Patagonia, Argentina. *Rev. Saúde Publ.* 31(3): 302–307.

- Serdyukov AM (1972):** *Diphyllobothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824) – parasite of man in Tumensky district. *Parazitologiya* 6(5): 419–425.
- Sharp GJE, Secombes CJ, Pike AW (1990):** The laboratory maintenance of *Diphyllobothrium dendriticum* (Nitzsch, 1824). *Parasitology* 101(1): 153–161.
- Shimizu H, Kawakatsu H, Shimizu T, Yamada M, Tegoshi T, Uchikawa R, Arizono N (2008):** Diphyllobothriasis nihonkaiense: possibly acquired in Switzerland from imported Pacific salmon. *Internal Med.* 47(14): 1359–1362.
- Shin DH, Oh CS, Lee SJ, Chai JY, Kim J, Lee SD, Park JB, Choi I-H, Lee HJ, Seo M (2011):** Paleo-parasitological study on the soils collected from archaeological sites in old district of Seoul City. *J. Archaeol. Sci.* 38(12): 3555–3559.
- Shirouzu H, Hatsushika R, Okino T (1999):** Morphological studies on the diphyllbothriid tapeworms from killer whale, *Orcinus orca* (Linnaeus, 1758) and bottlenosed dolphin, *Tursiops truncatus* (Montague, 1821). *Jpn. J. Zoo Wildlife Med.* 4(1): 53–60.
- Scholz T, Garcia HH, Kuchta R, Wicht B (2009):** Update on the human broad tapeworm (genus *Diphyllobothrium*), including clinical relevance. *Clin. Microbiol. Rev.* 22(1): 146–160.
- Smyth JD (1956):** Studies on tapeworm physiology. IX: A histochemical study of egg-shell formation in *Schistocephalus solidus* (Pseudophyllidea). *Exp. Parasitol.* 5(6): 519–540.
- Smyth JD, McManus DP (1989):** The physiology and Biochemistry of Cestodes. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 398 pp.
- Stunkard HW (1948):** Pseudophyllidea cestodes from alaskan pinnipeds. *J. Parasitol.* 34: 211–228.
- Stunkard HW, Schoenborn HW (1936):** Notes on the structure, distribution and synonymy of the *Diphyllobothrium lanceolatum*. The American Museum of Natural History 880: 1–8.
- Swartzwelder JC, Beaver PC, Hood MW (1964):** Sparganosis in Southern United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 13(1): 43–47.
- Tavares LER, Luque JL, Bomfim TCB (2005):** Human diphyllbothriasis: reports from Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 14: 85–87.
- Thomas LJ (1946):** New pseudophyllidean cestodes from the Great lakes region. I. *Diphyllobothrium oblongatum* n. sp. from gulls. *J. Parasitol.* 32(1): 1–6.

- Thurston JP (1967):** The morphology and life-cycle of *Cephalochlamys namaquensis* (Cohn, 1906) (Cestoda: Pseudophyllidea) from *Xenopus muelleri* and *X. laevis*. *Parasitology* 57(1): 187–200.
- Torres P, Torres J, Garrido O, Thibaut J (1989):** Investigaciones sobre Pseudophyllidea (Carus, 1813) en el sur de Chile. X. Observaciones experimentales sobre la coexistencia de plerocercoides de *Diphyllobothrium latum* (L.) y *Diphyllobothrium dendriticum* (Nitzsch) en salmónidos de la cuenca del río Valdivia. *Arch. Med. Vet.* 21: 51–57.
- Torres P, Franjola R, Figueroa L, Schlatter R, González H, Contreras B, Martín R (1981):** Researches on Pseudophyllidea (Carus, 1813) in the south of Chile. IV Occurrence of *Diphyllobothrium dendriticum* (Nitzsch). *J. Helminthol.* 55: 173–187.
- Torres P, Torres J, Garrido O, Thibaut J (1989):** Investigaciones sobre Pseudophyllidea (Carus, 1813) en el sur de Chile. X. Observaciones experimentales sobre la coexistencia de plerocercoides de *Diphyllobothrium latum* (L.) y *Diphyllobothrium dendriticum* (Nitzsch) en salmónidos de la cuenca del río Valdivia. *Arch. Med. Vet.* 21: 51–57.
- Torres P, Villalobos L, Woelfl S (2007):** Experimental infection of copepods from four lakes in southern Chile with *Diphyllobothrium latum* (Linnaeus, 1758) coracidia. *Comp. Parasitol.* 74(1): 167–170.
- Tsuboi T, Torii M, Hirai K (1993):** Light and scanning electron microscopy of *Diphyllobothrium pacificum* expelled from a man. *Jpn. J. Parasitol.* 42: 422–428.
- Vergeer T (1936):** The eggs and the coracidia of *Diphyllobothrium latum*. *Pap. Michigan Academy of Sciences, Arts and Letters* 21: 715–727.
- Vik R (1957):** Studies of the Helminth Fauna of Norway. I. Taxonomy and ecology of *Diphyllobothrium norvigicum* n. sp. and the Plerocercoid of *Diphyllobothrium latum* (L.). *Nyt. Mag. Zool.* 5: 25–93.
- Vik R (1964):** The genus *Diphyllobothrium*. An example of the interdependence of systematics and experimental biology. *Exp. Parasitol.* 15: 361–380.
- Waeschenbach A, Webster BL, Littlewood DTJ (2012):** Adding resolution to ordinal level relationships of tapeworms (Platyhelminthes: Cestoda) with large fragments of mtDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 63(3): 834–847.
- Wardle RA, McLeod JA, Stewart IE (1974):** Lühe's "*DIPHYLLOBOTHIMUM*" (CESTODA). *J. Parasitol.* 33(4): 319–330.

- Wicht B, de Marval F, Peduzzi R (2007):** *Diphyllobothrium nihonkaiense* (Yamane *et al.*, 1986) in Switzerland: First molecular evidence and case reports. *Parasitol. Int.* 56: 195–199.
- Wicht B, de Marval F, Gottstein B, Peduzzi R (2008):** Imported diphyllobothriasis in Switzerland: molecular evidence of *Diphyllobothrium dendriticum* (Nitsch, 1824). *Parasitol. Res.* 102: 201–204.
- Wicht B., Peduzzi R. (2009):** Difillobotriosi (Botriocefalosi): attualità di una zoonosi in risorgenza. *Tribuna Medica Ticinese* 74: 187–191
- Wikgren BJ, Nikander P (1964):** Cause of death of plerocercoids of *Diphyllobothrium latum* (L.) at low temperatures. *Mem. Soc. Fauna Flora Fennica* 40: 189–192.
- Wikström M (1972):** The incidence of the broad fish tapeworm, *Diphyllobothrium latum*, in the human population of Finland. *Commentationes Biologicae* 48: 3–8.
- Wojciechowska A, Zdzitowiecki K (1995):** Cestodes of Antarctic seals. *Acta Parasitol.* 40: 125–131.
- Wright ME (2000):** Life history ecology of the cestode *Diphyllobothrium dendriticum* in copepod and fish hosts. *Department of Natural Resource Sciences*. Montreal, McGill University. PhD: 139.
- Wright ME, Curtis MA (2000):** Temperature effects on embryonic development and the life cycle of *Diphyllobothrium dendriticum*. *Int. J. Parasitol.* 30: 849–852.
- Yamaguti S (1942):** Studies on the helminth fauna of Japan. Part 42. Cestodes of mammals, II., By author.
- Yamaguti S (1951):** Studies on the helminth fauna of Japan. Part 47. Cestodes of marine mammals and birds. *Acta Med. Okayama* 7(4): 307–314.
- Yamane Y, Seki R, Okada N (1976):** Comparative observation on surface topography of teguments and egg shells of diphyllobothriid cestodes by scanning electron microscopy. *Yonago Acta Med.* 20: 55–65.
- Yamane Y, Kamo H, Bylund G, Wikgren B-JP (1986):** *Diphyllobothrium nihonkaiense* sp. nov. (Cestoda: Diphyllobothriidae) – revised identification of Japanese broad tapeworm. *Shimane J. Med. Sci.* 10: 29–48.
- Yamane Y, Kamo H, Yazaki S, Fukumoto S, Maejima J (1981):** On a new marine species of the genus *Diphyllobothrium* (Cestoda: Pseudopyllidea) found from a man in Japan. *Jpn. J. Parasitol.* 30(2): 101–111.
- Yamane Y, Nagasawa A, Makino Y, Hirai K (1983):** *Diphyllobothrium latum*: scanning electron microscopic study on the eggshell formation. *Jpn. J. Parasitol.* 32: 13–25.

- Yamane Y, Shiwaku K (2003):** 2. *Diphyllbothrium nihonkaiense* and other marine-origin cestodes. *Prog. Med. Parasitol. Jpn.* 8: 245–250.
- Yamasaki H, Ohmae H, Kuramochi T (2012):** Complete mitochondrial genomes of *Diplogonoporus balaenopterae* and *Diplogonoporus grandis* (Cestoda: Diphyllbothriidae) and clarification of their taxonomic relationships. *Parasitol. Int.* 61(2): 260–266.
- Yanagida T, Matsuoka H, Kanai T, Nakao M, Ito A (2010):** Anomalous segmentation of *Diphyllbothrium nihonkaiense*. *Parasitol. Int.* 59(2): 268–270.
- Yauki S, Hitsga M, Maejima J, Kamo H (1982):** *Diphyllbothrium fuhrmani* Hsü, 1935 found from a Pacific white sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). *J. Yonago Med. Assoc.* 33: 134–142.
- Yazaki S (1982):** Studies on three dimensional features of embryonic hooks in some species of diphyllbothriids, with special reference to taxonomic significance." *Jpn. J. Parasitol.* 31(5): 435–446.
- Yazaki S, Fukumoto S, Abe K (1988):** A new species of the genus *Diphyllbothrium* originated from plerocercoids in Japanese surf smelt (*Hypomesus pretiosus japonicus*) and olive rainbow smelt (*Osmerus eperlanus mordax*). *Jpn. J. Parasitol.* 37(6): 422–428.
- Yazaki S, Fukumoto S, Maejima J, Miyahara M (1990):** Comparative observations of *Diphyllbothrium pacificum* from a man and from fur seals. *J. Yonago Med. Ass.* 41: 204–210.
- Yera H, Estran C, Delaunay P, Gari-Toussaint M, Dupouy-Camet J, Marty P (2006):** Putative *Diphyllbothrium nihonkaiense* acquired from a Pacific salmon (*Oncorhynchus keta*) eaten in France: genomic identification and case report. *Parasitol. Int.* 55: 45–49.
- Yoshida M, Hasegawa H, Takaoka H, Miyata A (1999):** A case of *Diphyllbothrium nihonkaiense* infection successfully treated by oral administration of Gastrografin. *Parasitol. Int.* 48(2): 151–155.
- Yurachno, M. V. (1992):** About systematics and phylogeny of some groups of the order Pseudophyllidea. *Parazitologiya* 26: 449-461.
- Zhong HL, Shao L, Lian DR, Deng ZF, Zhao SX, Gao PZ, He LY, Yun CF, Pan JY (1983):** Ocular sparganosis caused blindness. *Chin. Med. J.* 96(1): 73–75.

Tab 9.2. Výsledek Tukey HSD testu pro mořské zástupce rodů *Diphyllobothrium* a *Diplogonoporus* – délka vajíček (ln hodnoty). **1** – *D. cameroni*; **2** – *D. cordatum*; **3** – *D. hians*; **4** – *D. lanceolatum*; **5** – *D. macroovatum*; **6** – *D. pacificum*; **7** – *D. rauschi*; **8** – *D. stemmacephalum*; **9** – *Diphyllobothrium* sp.2; **10** – *Diphyllobothrium* sp.1; **11** – *Diphyllobothrium* sp.3; **12** – *Diplogonoporus tetrapterus*; **13** – *Diplogonoporus violettae* (syn. *D. tetrapterus*).

vzorek	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}	{8}	{9}	{10}	{11}	{12}	{13}
	3,8570	4,1794	4,0929	4,1247	4,4425	3,9425	3,8832	4,0934	4,1868	3,9333	4,2861	4,2350	4,2477
1		0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,830618	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020
2	0,000020		0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,999998	0,000020	0,000020	0,000025	0,000042
3	0,000020	0,000020		0,166379	0,000020	0,000020	0,000020	1,000000	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020
4	0,000020	0,000020	0,166379		0,000020	0,000020	0,000020	0,566200	0,000667	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020
5	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020		0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020
6	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020		0,000664	0,000020	0,000020	0,999253	0,000020	0,000020	0,000020
7	0,830618	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000664		0,000020	0,000020	0,047636	0,000020	0,000020	0,000020
8	0,000020	0,000020	1,000000	0,566200	0,000020	0,000020	0,000020		0,000024	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020
9	0,000020	0,999998	0,000020	0,000667	0,000020	0,000020	0,000020	0,000024		0,000020	0,000021	0,061024	0,021711
10	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,999253	0,047636	0,000020	0,000020		0,000020	0,000020	0,000020
11	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000021	0,000020		0,028117	0,538450
12	0,000020	0,000025	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,061024	0,000020	0,028117		0,999705
13	0,000020	0,000042	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,021711	0,000020	0,538450	0,999705	

Tab. 9.3. Výsledek Tukey HSD testu pro sladkovodní zástupce rodu *Diphyllobothrium*.
Tabulka A – délka (ln hodnoty), Tabulka B – kulatost (ln hodnoty).
1 – *D. dendriticum*, **2** – *D. latum*, **3** – *D. ursi*, **4** – *D. nihonkaiense*.

A

vzorek	{1}	{2}	{3}	{4}
	4,0544	4,1980	4,1087	4,1044
1		0,000008	0,001168	0,007384
2	0,000008		0,000008	0,000008
3	0,001168	0,000008		0,995812
4	0,007384	0,000008	0,995812	

B

vzorek	{1}	{2}	{3}	{4}
	-,3370	-,3149	-,3546	-,2749
1		0,034232	0,567691	0,000119
2	0,034232		0,008718	0,017111
3	0,567691	0,008718		0,000034
4	0,000119	0,017111	0,000034	

Tab. 9.4. Výsledek Tukey HSD testu druhy známé z člověka – délka vajíček (ln hodnoty).
1 – *D. dendriticum*; **2** – *D. lanceolatum*; **3** – *D. latum*; **4** – *D. nihonkaiense*;
5 – *D. pacificum*; **6** – *D. stemmacephalum*.

vzorek	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	4,0544	4,1029	4,2278	4,1044	3,9048	4,0885
1		0,000020	0,000020	0,000171	0,000020	0,016823
2	0,000020		0,000020	0,999996	0,000020	0,796126
3	0,000020	0,000020		0,000020	0,000020	0,000020
4	0,000171	0,999996	0,000020		0,000020	0,851384
5	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020		0,000020
6	0,016823	0,796126	0,000020	0,851384	0,000020	

Tab. 9.5. Výsledek Tukey HSD testu druhy známé z člověka – kulatost vajíček (ln hodnoty).
1 – *D. dendriticum*; **2** – *D. lanceolatum*; **3** – *D. latum*; **4** – *D. nihonkaiense*;
5 – *D. pacificum*; **6** – *D. stemmacephalum*.

vzorek	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	-,3370	-,3337	-,3134	-,2749	-,1984	-,2671
1		0,999391	0,038571	0,000042	0,000020	0,000020
2	0,999391		0,218535	0,000233	0,000020	0,000023
3	0,038571	0,218535		0,026150	0,000020	0,001049
4	0,000042	0,000233	0,026150		0,000021	0,995987
5	0,000020	0,000020	0,000020	0,000021		0,000021
6	0,000020	0,000023	0,001049	0,995987	0,000021	

Tab. 9.6. Výsledek Tukey HSD testu pro *D. latum* – délka vajíček (ln hodnoty).
1 – *Mesocricetus auratus* (ZMUO); **2** – *Ursus maritimus* (NMW); **3** – *Mesocricetus auratus* trus (PFIS); **4** – *Mesocricetus auratus* strobila (PFIS); **5** – *Homo sapiens* stolice (PFIS);
6 – *Homo sapiens* strobila (PFIS); **7** – *Homo sapiens* (RUS 106).

vzorek	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
	4,0773	4,2434	4,1368	4,2368	4,2309	4,2404	4,1966
1		0,000026	0,000026	0,000026	0,000026	0,000026	0,000026
2	0,000026		0,000026	0,996975	0,776492	0,999901	0,000602
3	0,000026	0,000026		0,000026	0,000026	0,000026	0,000026
4	0,000026	0,996975	0,000026		0,993802	0,999680	0,006328
5	0,000026	0,776492	0,000026	0,993802		0,648781	0,001558
6	0,000026	0,999901	0,000026	0,999680	0,648781		0,000058
7	0,000026	0,000602	0,000026	0,006328	0,001558	0,000058	

Tab. 9.7. Výsledek Tukey HSD testu pro *D. latum* – kulatost vajíček (ln hodnoty).
1 – *Mesocricetus auratus* (ZMUO); **2** – *Ursus maritimus* (NMW); **3** – *Mesocricetus auratus* trus (PFIS); **4** – *Mesocricetus auratus* strobila (PFIS); **5** – *Homo sapiens* stolice (PFIS);
6 – *Homo sapiens* strobila (PFIS); **7** – *Homo sapiens* (RUS 106).

vzorek	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
	-,3330	-,3528	-,3178	-,2683	-,3259	-,2939	-,3158
1		0,816815	0,891503	0,000169	0,995957	0,017740	0,897460
2	0,816815		0,064035	0,000026	0,174474	0,000032	0,120074
3	0,891503	0,064035		0,001037	0,960819	0,119780	0,999998
4	0,000169	0,000026	0,001037		0,000028	0,285065	0,013683
5	0,995957	0,174474	0,960819	0,000028		0,000252	0,969086
6	0,017740	0,000032	0,119780	0,285065	0,000252		0,481714
7	0,897460	0,120074	0,999998	0,013683	0,969086	0,481714	

Tab. 9.8. Výsledek Tukey HSD testu pro *D. pacificum* – délka vajíček (ln hodnoty).
1 – *Arctophoca australis* (Aa 89); **2** – *Neophoca cinerea* (AU 10); **3** – *Arcotocephalus* *pusillus* *doriferus* (AU 11); **4** – *Homo sapiens* (TS); **5** – *Callorhinus ursinus* (SAM);
6 – *Canis mesomelas* (BMNH).

vzorek D. pac	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	3,9677	3,9608	3,9158	4,0026	3,9063	4,0364
1		0,994481	0,000310	0,006960	0,000020	0,000021
2	0,994481		0,005786	0,001397	0,000043	0,000020
3	0,000310	0,005786		0,000020	0,948241	0,000020
4	0,006960	0,001397	0,000020		0,000020	0,010300
5	0,000020	0,000043	0,948241	0,000020		0,000020
6	0,000021	0,000020	0,000020	0,010300	0,000020	

Tab. 9.9. Výsledek Tukey HSD testu pro *D. pacificum* – kulatost vajíček (ln hodnoty). **1** – *Arctophoca australis* (Aa 89); **2** – *Neophoca cinerea* (AU 10); **3** – *Arcotocephalus pusillus doriferus* (AU 11); **4** – *Homo sapiens* (TS); **5** – *Callorhinus ursinus* (SAM); **6** – *Canis mesomelas* (BMNH).

vzorek D. pac	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	-,2428	-,2028	-,2557	-,2354	-,1969	-,3001
1		0,082810	0,944951	0,988173	0,003200	0,000963
2	0,082810		0,005146	0,098118	0,997807	0,000020
3	0,944951	0,005146		0,489819	0,000045	0,022520
4	0,988173	0,098118	0,489819		0,000549	0,000021
5	0,003200	0,997807	0,000045	0,000549		0,000020
6	0,000963	0,000020	0,022520	0,000021	0,000020	

Tab 9.10. Výsledek Tukey HSD testu pro délku (ln hodnoty) ostatních zástupců diphyllbothriidů. **1** – *Bothridium pithonis*; **2** – *Diplogonoporus tetrapterus*; **3** – *Diplogonoporus violettæ*; **4** – *Duthiersia fimbriata*; **5** – *Scyphocephalus bisulcatus*; **6** – *Tetragonoporus calyptocephalus*.

vzorek	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	4,3638	4,2350	4,2477	4,0250	4,0726	4,2449
1		0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020
2	0,000020		0,854867	0,000020	0,000020	0,943989
3	0,000020	0,854867		0,000020	0,000020	0,999933
4	0,000020	0,000020	0,000020		0,000075	0,000020
5	0,000020	0,000020	0,000020	0,000075		0,000020
6	0,000020	0,943989	0,999933	0,000020	0,000020	

Tab 9.11. Výsledek Tukey HSD testu pro kulatost (ln hodnoty) ostatních zástupců diphyllbothriidů. **1** – *Bothridium pithonis*; **2** – *Diplogonoporus tetrapterus*; **3** – *Diplogonoporus violettæ*; **4** – *Duthiersia fimbriata*; **5** – *Scyphocephalus bisulcatus*; **6** – *Tetragonoporus calyptocephalus*.

vzorek	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}
	-,5401	-,3666	-,3948	-,2318	-,2674	-,3293
1		0,000020	0,000020	0,000020	0,000020	0,000020
2	0,000020		0,299902	0,000020	0,000020	0,064727
3	0,000020	0,299902		0,000020	0,000020	0,000422
4	0,000020	0,000020	0,000020		0,060004	0,000020
5	0,000020	0,000020	0,000020	0,060004		0,001073
6	0,000020	0,064727	0,000422	0,000020	0,001073	