

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství**

## **Výskyt motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) v chovech skotu a malých přežvýkavců na území České republiky**

**Motyčka Čeněk  
Jihomoravský kraj**

**Brno 2020**

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

## Výskyt motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) v chovech skotu a malých přežvýkavců na území České republiky

## Occurrence of liver fluke (*Fasciola hepatica*) in cattle and small ruminants in the Czech Republic

**Autoři:** Motyčka Čeněk

**Škola:** Gymnázium Brno, Slovanské náměstí, příspěvková  
organizace, Slovanské náměstí 1804/7, Brno, 61200

**Kraj:** Jihomoravský kraj

**Konzultant:** Mgr. Lucie Škorpíková

# PROHLÁŠENÍ

---

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Brně dne 13.2.2020 .....

Čeněk Motyčka

## ANOTACE

---

Tato práce se zabývá kosmopolitně rozšířenou motolicí jaterní (*Fasciola hepatica*). Jedná se o parazita napadajícího játra a jaterní žlučovody u širokého spektra definitivních hostitelů, u nichž způsobuje závažné onemocnění nazývané fasciolóza. Značný veterinární význam mají motolice jaterní především u hospodářských zvířat – u skotu, ovcí a koz. Způsobují u nich vážné zdravotní potíže projevující se snížením užitkovosti a plodnosti, které vedou mnohdy až k hromadným úhynům zvířat. Ačkoliv může fasciolóza způsobovat velké ztráty v jednotlivých chovech, chybí o současném výskytu na území České republiky jakékoliv konkrétnější údaje. Práce pojednává o tělní stavbě a vývojovém cyklu. Upozorňuje na potenciální nebezpečí nákazy hospodářských zvířat fasciolózou, které následně způsobuje rozsáhlé ekonomické ztráty. Popisuje rozšíření v České republice od minulého století až po současnost, které je doplněno o aktuální data získaná formou dotazníků, pitvami jater a vyšetřováním trusu.

## KLÍČOVÁ SLOVA

---

*Fasciola hepatica*, jaterní motolice, fasciolóza, dotazník, sedimentace, flotace, PCR

## ANNOTATION

---

This work deals with cosmopolitan widespread common liver fluke (*Fasciola hepatica*). It is a parasite that harms the liver and hepatic bile ducts of many definitive hosts. causes fasciolosis, the severe disease with great veterinary importance especially in livestock – cattle, sheep, and goats. The health problems are manifested by reduced yield and gravidity of animals. Severe infection can lead to mass deaths of animals. Even when fasciolosis can caused significant losses in individual breeds, information about the occurrence of in the Czech Republic is not known well. Work deals with the body structure and the life cycle of. Work also highlights the potential dangers of contagious livestock by fasciolosis that cause significant economic losses. Work describes the evolution, of occurrence of in the Czech Republic, from the last century to the present days. This information is supplemented with actual data obtained from questionnaires, dissections of liver and examination of faeces.

## KEYWORDS

---

*Fasciola hepatica*, common liver fluke, fasciolosis, questionnaire, sedimentation, flotation, PCR

## STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

### Obor č. 7: Zemědělství, potravinářství, lesní a vodní hospodářství

Student: **Čeněk Motyčka**

Název práce: **Výskyt motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) v chovech skotu a malých přežvýkavců na území České republiky**

Název práce anglicky: **Occurrence of liver fluke (*Fasciola hepatica*) in cattle and small ruminants in the Czech Republic**

#### Oficiální zadání práce:


Motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) patří mezi velmi zajímavé parazitické červy (helminty) ze skupiny motolic (Trematoda), kteří jsou v současné době rozšířeni po celém světě. Infikují především játra a jaterních žlučovody celé řady savců, mnohdy též člověka, u nichž způsobují onemocnění nazývané fasciolóza neboli motoličnost. Největší význam má přítomnost těchto motolic u hospodářských zvířat - zejména v chovech ovcí a skotu, kdy je jednou z hlavních příčin značných ekonomických ztrát. Ačkoliv se v posledních letech objevují informace o vzrůstajícím výskytu motolice jaterní na území České republiky, o nynější situaci chybí jakékoliv ucelenější údaje.

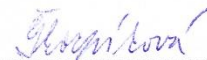
Hlavním výstupem práce by měla být aktualizace výskytu motolice jaterní na území České republiky a srovnání výsledků se situací v jiných evropských zemích. Dílčí cíle této SOČ jsou: 1. Zpracovat dostupnou odbornou literaturu týkající se motolice jaterní. 2. Formou dotazníku zjistit současný výskyt motolice jaterní v chovech hospodářských zvířat na území České republiky a celkovou aktuálnost této problematiky.

Student si v rámci SOČ vyzkouší práci s literárními a internetovými zdroji, vyhodnocování dat získaných z dotazníku, bude se účastnit odběrů koprologických vzorků v terénu, seznámí se se základními diagnostickými metodami (standardní koprologické ale i molekulární postupy). V neposlední řadě umožní tato SOČ studentovi bližší seznámení s mnoha parazitologií a dalšími vědeckými pracovníky i získání cenných zkušeností do dalšího kariérního rozvoje.

Vedoucí práce: **Mgr. Lucie Škorpíková**

V Brně dne: **10. 1. 2019**

  
.....  
**Čeněk Motyčka**  
student

  
.....  
**Mgr. Lucie Škorpíková**  
vedoucí práce

# 1 OBSAH

---

2	Úvod .....	6
3	Cíle práce .....	7
4	Přehled literatury .....	8
4.1	Zařazení do systému .....	8
4.2	Vývojový cyklus .....	8
4.3	Stavba těla .....	10
4.4	Fasciolóza .....	11
4.4.1	Fasciolóza skotu .....	11
4.4.2	Fasciolóza ovcí .....	12
4.4.3	Fasciolóza koz .....	13
4.4.4	Léčba fasciolózy .....	13
4.4.5	Prevence .....	14
4.5	Výskyt na území České republiky .....	14
5	Materiál a metodika .....	16
5.1	Sběr dat formou dotazníku .....	16
5.2	Získ biologických vzorků – pitva jater .....	16
5.2.1	Měření koncentrace vajíček .....	17
5.3	Koprologické vyšetření .....	18
5.3.1	Sedimentační metoda .....	18
5.3.2	Flotační metoda .....	19
5.3.3	Měření koncentrace vajíček .....	20
5.4	Molekulární analýza .....	20
5.4.1	Izolace DNA .....	20
5.4.2	Měření koncentrace DNA .....	21
5.4.3	Polymerázová řetězová reakce .....	22
5.4.4	Agarózová gelová elektroforéza .....	23
6	Výsledky .....	25
6.1	Sběr dat formou dotazníku .....	25
6.2	Získ biologických vzorků – pitva jater .....	27
6.3	Měření koncentrace vajíček získaných z oplachu jater .....	27
6.4	Koprologická vyšetření .....	28
6.5	Molekulární analýza .....	29
6.6	Konference .....	30

Diskuze .....	31
7 Závěr .....	33
8 Zdroje.....	34
9 Přílohy.....	37

## 2 ÚVOD

---

*Fasciola hepatica* je celosvětově rozšířený druh motolice parazitující v játrech a jaterních žlučovodech savců, u nichž způsobuje závažné onemocnění, fasciolózu. Nejčastěji se s fasciolózou setkáváme u přežvýkavců, můžeme na ni narazit i u všežravců, a to včetně člověka (Heydarian *et al.*, 2017; Parkinson *et al.*, 2006). Velké zdravotní riziko pro člověka hrozí hlavně v rozvíjejících se zemích s teplým a vlhkým podnebím, v našich zeměpisných podmínkách je riziko nákazy člověka minimální.

Tato práce je zaměřena především na ohrožení hospodářských zvířat motolicí jaterní. Infekce ve své chronické podobě vede ke snižování doживosti, porodnosti a celkového zdravotního stavu zvířete. V akutní podobě často dochází i k úhynu zvířete. Fasciolóza se stává v poslední době čím dál více závažnější z důvodu šíření rezistence vůči léčivům (Kelley *et al.*, 2016).

Každoročně dochází celosvětově kvůli této nemoci k velkým hospodářským a finančním ztrátám (Arbabi *et al.*, 2018; Liba *et al.*, 2017; Schweizer *et al.*, 2011). Avšak i přes tento známý fakt, není současný výskyt v České republice, ale i v Evropě, řádně zmonitorován.

Hlavním cílem mé práce se tedy stal úkol zjistit aktuální výskyt tohoto parazita na území České republiky. Pro zjištění informací bylo použito hned několik způsobů. Jako hlavní prostředek pro získání komplexnějších dat a vytipování rizikových lokalit byl využit dotazník, který byl rozeslán chovatelům hospodářských zvířat do celé České republiky. Následovalo pak terénní ověření, které mělo potvrdit informace získané z dotazníku. Údaje byly také doplněny o data získaná z celoročního monitorování záchytů na jedněch konkrétních jatkách.

Kromě pitvy jater byly pro zjištění infekce motolicemi využity klasické koprologické přístupy. V tomto případě byly vyzkoušeny dvě základní metody, flotační a sedimentační. Pro potvrzení druhové příslušnosti získaných dospělců byly některé vzorky analyzovány molekulárně – na úrovni DNA. Pro tyto účely byla využita polymerázová řetězová reakce a následně gelová agarózová elektroforéza.



### 3 CÍLE PRÁCE

---

Tato práce byla vypracována na oddělení Parazitologie spadající pod Ústav botaniky a zoologie Masarykovy univerzity v Brně a také ve spolupráci s doc. Ing. Jaroslavem Vadlejchem, Ph.D. a Ing. Ivetou Angelou Kyriánovou, Ph.D. z Katedry zoologie a rybářství pod Fakultou agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze.

Práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury ČR (GA19-17269S) a Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (LTC19018).

Hlavním cílem práce bylo zjištění výskytu motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) v chovech skotu a malých přežvýkavců na území České republiky.

#### **Dílčí cíle jsou:**

1. Zpracovat dostupnou literaturu týkající se základních informací o morfologii, životním cyklu, výskytu a patogenitě motolice jaterní *Fasciola hepatica*.
2. Formou dotazníku zjistit současný výskyt motolice jaterní v ekologických chovech hospodářských zvířat na území České republiky.
3. Osvojit si základní diagnostické techniky využívané pro parazitologická vyšetření v rámci projektů uskutečňovaných v laboratořích na oddělení Parazitologie (pitva, koprologie, molekulární analýza).
4. Vyhodnotit celkovou aktuálnost dané problematiky.

## 4 PŘEHLED LITERATURY

---

### 4.1 Zařazení do systému

Motolice jaterní (*Fasciola hepatica*) jsou řazeny do početného kmene parazitických ploštěnců *Platyhelminthes*, třídy *Trematoda*, podtřídy *Digenea*, řádu *Echinostomida* a čeledi *Fasciolidae* (Volf a Horák, 2007).

### 4.2 Vývojový cyklus

Vývoj *F. hepatica* je heteroxenní, což znamená, že se životního cyklu se účastní více různých hostitelů (mezihostitel a definitivní hostitel). Oproti jiným digenetickým motolicím, jejichž vývojové cykly mohou být velice komplikované a zahrnují i několik různých mezihostitelů (např. motolice rodu *Alaria*), má *F. hepatica* pouze jednoho mezihostitele (Esch *et al.*, 2002; Forejtek, 2013; Volf a Horák, 2007). Jedná se o sladkovodní plicnaté plže z čeledi plovatkovitých (*Lymnaeidae*). Původně se *F. hepatica* vyskytovala pouze na území Evropy, kde byla jejím mezihostitelem bahnatka malá (*Galba truncatula*) (Rondelaud *et al.*, 2004).

S postupným rozšiřováním po celém světě se začala *adaptovat* i na další plovatkovité plže. Například v Severní Americe se mezihostitelem stal plž *Pseudosuccinea columella* společně s *Fossaria bulimoides* (Alba *et al.*, 2018; Zukowski *et al.*, 1991), v Austrálii *Austropeplea tomentosa* (Rathinasamy *et al.*, 2018). Do Jižní a Střední Ameriky byla kolonisty dokonce zavlčena přímo bahnatka malá, která se zde začala ve velkých počtech rozmnožovat (Mas-Coma *et al.*, 2005).

Schéma vývoje je znázorněno na obrázku 1 (Pipiková, 2015). Cyklus začíná v jaterních žlučovodech definitivního hostitele, ve kterých dospělí jedinci kladou vajíčka. Jeden dospělý červ je schopen naklásť 10 až 20 tisíc vajíček za den (Taha *et al.*, 2014). Vajíčka dále se žlučí putují do tenkého a tlustého střeva a následně opouští tělo společně s výkaly hostitele (Dubinský *et al.*, 2015; Moazeni a Ahmadi; 2016; Volf a Horák, 2007). Díky srážkám se vajíčka dostávají do vody, ve které se během pár dní uvnitř vajíček začnou vyvíjet obrvené larvy zvané miracidium. Celý vývoj je ovlivněn mnoha různými faktory – například množstvím kyslíku ve vodě, vlhkostí nebo teplotou. V teplém prostředí se miracidia líhnou po 9 až 10 dnech (v studeném po delší době).

Po odklopení víčka vajíčka se miracidium uvolňuje do vodního prostředí a vyhledává vhodného mezihostitelského plže (Kalbe *et al.*, 2000; Wilson a Denison, 1970). Využívá k tomu pohyb orientovaný ke světlu, pomocí chemických látek produkovaných plzem či podle zemské gravitace – vyžívá tedy fototaxi, chemotaxi či geotaxi. Miracidium nemá trávicí soustavu a má tedy na celý tento proces pouze omezené množství energie, a tedy i času (Dubinský *et al.*, 2015; Volf a Horák, 2007). Nestihne-li najít svého hostitele včas, po 12-24 hodinách umírá.

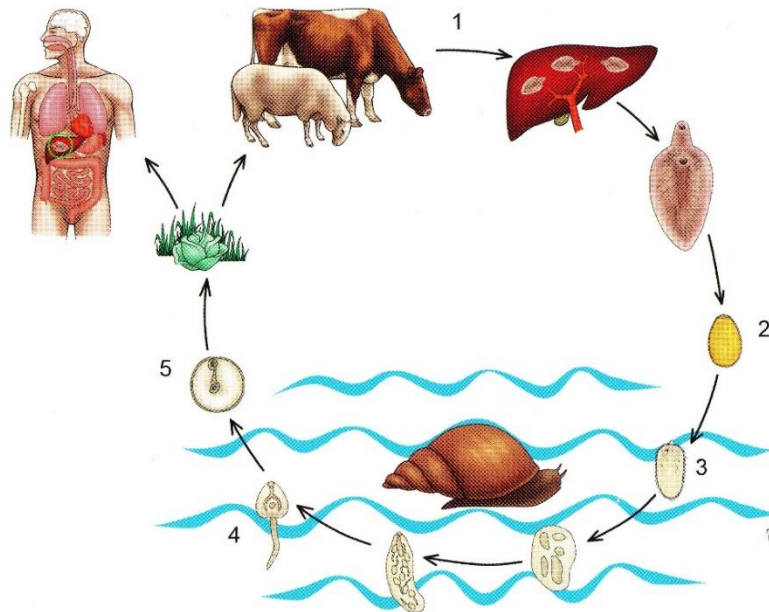
Při nalezení vhodného plže proniká miracidium do jeho tkání, kde se přeměňuje na další larvální stádium nazývané sporocysta. Sporocysta putuje tělem mezihostitele do slinivkojaterní žlázy, kde se usazuje a následně roste a vyvíjí se. Stejně jako miracidium nemá vyvinutou trávicí soustavu, živí se však již absorbcí látek z okolí.

V této fázi životního cyklu se začíná parazit pomnožovat nepohlavně. Ze zárodečných buněk sporocysty se vyvíjí další larvální stadia označovaná jako redie. Redie již disponují ústy a trávicím systémem. Živí se převážně tkáňovým morkem. V plži vytváří dvě generace. První je nazývaná mateřská, z jejichž zárodečných buněk vznikají redie dceřiné, ve kterých se formuje další stádium nazývané cercárie.

Cercárie opouští tělo mezihostitele po 5-7 týdnech od nákazy v mnoha stovkách někdy až tisících jedincích. Morfologicky se již podobá dospělci. Navíc má bičík, díky kterému se pohybuje ve vodě, kde vyhledává vodní rostliny (Dubinský *et al.*, 2015; Dreyfuss *et al.*, 2004; Volf a Horák, 2007). Po nalezení rostliny cercárie odhazuje bičík a obaluje se cystou, čímž se přeměňuje na poslední larvální stádium – adoleskarii (metacercarii). Adoleskarie se časem se mohou z rostlin uvolnit a začít volně plavat na hladině. V přírodě mohou v této encystované formě přežít až několik měsíců.

Pro úspěšné dokončení vývojového cyklu je potřeba, aby byla adoleskarie pozřena konečným hostitelem. Trávicí enzymy v tenkém střevě naruší obal adoleskarie a dochází k excystaci nedospělých motolic, které tělem hostitele putují do jater. Motolice mohou migrovat i do jiných orgánů, například do oka, plic, míchy či ledvin a být lokalizovány ektopicky (Makay *et al.* 2007; Vatsal *et al.*, 2006). Často k tomu dochází když není definitivním hostilem přežvýkavec, ale například právě člověk.

Po dosažení jater putují nedospělé motolice jaterním parenchymem až 5-6 týdnů, během kterých rostou. Svoji cestu nakonec končí ve žlučovodu hostitele, kde po 8-13 týdnech od nákazy pohlavně dospívají a začínají se rozmnožovat. V definitivním hostiteli mohou přežívat až deset let.



Obrázek 1: Životní cyklus *F. hepatica*. 1 – Dospělé motolice žijící ve žlučovodech definitivních hostitelů, 2 – vajíčko, 3 – miracidium, 4 – cercárie, 5 – adoleskáríe (Pipíková, 2015).

### 4.3 Stavba těla

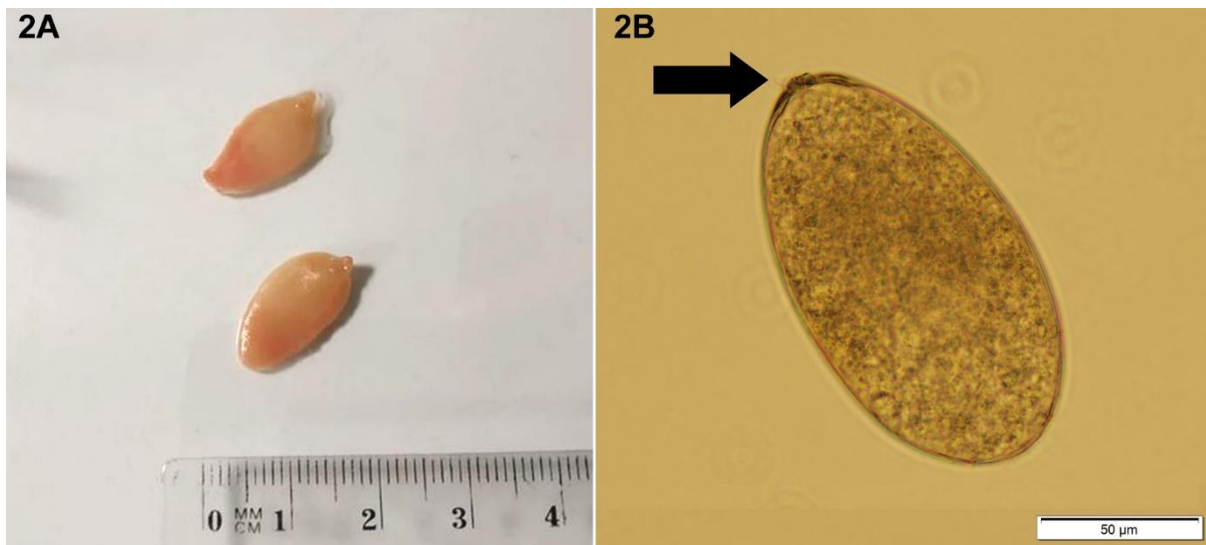
Obecně se uvádí, že dospělé motolice dosahují délky až 3 cm a šířky kolem 1,5 cm. Morfometrické hodnoty bývají zpravidla ovlivněny druhem definitivního hostitele, ve kterém se motolice vyvíjí a lokalitou výskytu (Shafiei *et al.*, 2014; Valero *et al.*, 2001; Yakhchali a Bahramnejad; 2015).

Tělo dospělců je zploštělé, bez článků a nahnědlé (Volf and Horák, 2007). Podélně se zužuje k jednomu konci a svým tvarem připomíná kopinatý list (Obrázek 2A). Povrch těla je tvořen syncytiálním tegumentem s vystupujícími ostny krytými membránou.

Smyslové ústrojí je v důsledku jejich parazitického způsobu života slabě vyvinuté, stejně jako pohybové ústrojí. Charakteristickým znakem jsou dvě přísavky. Břišní přísavkou se motolice přichycuje k povrchu. Uprostřed druhé, ústní přísavky, se nachází ústní otvor, který je zároveň i otvorem vyvrhovacím. Za ústním otvorem je předhltan, svalnatý hltan, jícn a střevo se svými slepými výběžky. Díky svalnatému hltanu saje krev konečného hostitele, ze které získává potřebné živiny. Motolice ovšem nepřijímá potravu jen trávicím ústrojím, ale část živin přijímá povrchem svého těla. Dýchá anaerobně. Vylučovací soustava je tvořena plaménkovými buňkami – protonefridiemi. Nervová soustava je tvořena dvojicí mozkových zauzlin, z kterých vybíhají krátké provazce a 3 páry dlouhých provazců propojených příčnými spojkami.

Největší část těla zabírá rozmnožovací soustava, která zahrnuje současně samičí i samčí orgány, neboť je hermafrodit. Má párová varlata a nepárový vaječník. Vajíčka mají charakteristický oválný tvar, jsou nažloutlá a na jednom pólu mají víčko (operculum) (Obrázek 2B). První dozrávají spermie, přičemž spermii jiné motolice jsou oplodněna

vajíčka. Nadbytečný materiál z ootypu je odstraněn do vnějšího prostředí Laurerovým kanálem, který je jednou z částí samičí rozmnožovací soustavy. Ke kopulaci slouží děloha zakončená metraternem.



Obrázek 2: A: Dospělci *F. hepatica*; B: Vajíčko *F. hepatica* s vyznačeným víčkem (Foto Č. Motyčka, 2019).

## 4.4 Fasciolóza

Jak již bylo uvedeno, fasciolóza (motolichnatost) je celosvětově rozšířené onemocnění hospodářských zvířat, zejména skotu, ovcí, a koz vyvolané v našich podmínkách parazitickou motolicí. Poté, co jsou larvy požitý společně s kontaminovanou potravou (rostlinami) nebo vodou, začíná inkubační doba, která trvá několik dní až měsíců. Následuje akutní, subakutní a chronická klinická fáze (Boray, 2017; Forbes, 2017; Ježková, 2019).

Akutní fáze začíná pronikáním nedospělých motolic do jater. Ty se následně pohybují jaterním parenchymem, dokud nedospějí a neusadí se v jaterních žlučovodech. Během toho dochází k rozsáhlému poškození jaterních buněk, což je doprovázeno intenzivním vnitřním krvácením. Subakutní fáze je reakcí na poškození tkáně, projevuje se záněty jater a jejich postupnou fibrózou a kalcifikací. Chronická fáze začíná po usazení motolic ve žlučovodech, jejich dosažením dospělosti a produkováním vajíček.

Projevy fasciolózy závisí především na množství pozřených parazitů, liší se v rámci různých hostitelských druhů a souvisí s celkovým zdravotním stavem a věkem infikovaného zvířete.

### 4.4.1 Fasciolóza skotu

Akutní fáze fasciolózy u skotu je extrémně vzácná (Adrien, 2013; Forbes, 2017), onemocnění tedy probíhá nejčastěji ve své chronické formě (Boray, 2017; Ježková, 2019). Obecně totiž platí, že je skot v porovnání s ovcemi či kozami vůči fasciolóze poměrně odolný. Klinické příznaky jsou zaznamenávané především u telat, která jsou k infekci vnímavější.

U většiny zvířat se však infekce projevuje subklinicky – to znamená, že se na úrovni stáda navenek příliš neprojevuje.

Dospělci se v jaterních žlučovodech živí krví, což vede k anémiím, které se mohou projevovat charakteristickým otokem mezisaničí (tzv. bottlejaw) a bledými sliznicemi (Forbes, 2017; Ježková, 2019; Volf and Horák, 2007). Jedna motolice v těle skotu spotřebuje denně až 0,2 ml krve (Ježková, 2019). Ostatný povrch těla motolic způsobuje dráždění žlučovodů, což vede k jejich fibróze a kalcifikaci. Fasciolóza způsobuje celkové snížení imunity hostitele a bývá tedy doprovázena mnohými dalšími nemocemi. Příkladem může být střevní červivost, ostertagióza a salmonelóza. Zřídka pak může dojít k ucpaní žlučovodů, žloutence a ohrožení celkového zdravotního stavu zvířete.

Při masivních infekcích (více než 200 motolicemi) může docházet ke snížení užitkovosti až o 40 % (Ježková, 2019). Snižují se hmotnostní přírůstky zvířat i produkce a kvalita mléka. Infekce ovlivňuje fertilitu u samic a narozená mláďata se vyznačují sníženou hmotností. Poškození jater vede k jejich konfiskaci na jatkách. Fasciolóza u skotu je důvodem velkých ekonomických ztrát po celém světě (Jaja *et al.*, 2017; Schweizer *et al.*, 2011).

Zajímavostí je, že si skot přibližně 5 až 6 měsíců po nakažení vytváří částečnou imunitu proti tomuto parazitovi, která alespoň snižuje životnost motolic, jejich počet a slouží jako částečná ochrana před opakováním nákazy (Garcia-Campos *et al.*, 2019; Ježková, 2019; Mulcahy *et al.*, 1999).

#### **4.4.2 Fasciolóza ovci**

Fasciolóza představuje pro ovce mnohem větší nebezpečí než pro skot. Nemusí se již objevit pouze jako chronické onemocnění, ale také již jako akutní nebo subakutní onemocnění (Boray, 2017; Forbes, 2017; Ježková, 2019).

Akutní fasciolóza nastává při pozření velkého počtu metacerkarií (více než 2 000) během krátkého časového úseku, což bývá spojováno s klimatickými a sezónními podmínkami (Boray, 2017; Bosco *et al.*, 2015; Ježková, 2019) Během dvou až šesti týdnů jsou nedospělé motolice stále migrují játry, během čehož silně poškozují jaterní tkáň a dochází k rozsáhlé nekróze a vnitřnímu krvácení (Boray, 2017; Forbes, 2017; Ježková, 2019). Nemoc je krátká, charakteristická slabostí, ztrátou chuti k jídlu, bolestí břicha a neochotou k pohybu. Zvíře po krátké době hyne.

Subakutní forma onemocnění se objevuje u zvířat, která jsou postupně infikována více jak 800 metacerkariemi v průběhu několika týdnů (Boray, 2017; Ježková, 2019). Díky tomu hostí hned několik stádií vývoje motolice. Ovce trpí anémií, rychle ztrácí na váze a mají nekvalitní vlnu. Postižená zvířata mají postupně problém vstát, objevují se bolesti v oblasti jater, mají nafouklé břicho, nepřijímají potravu a jsou netečná. K úhynu dochází během 8 až 10 týdnů v důsledku těžké anémie a celkového selhání jater.

Chronické onemocnění se projevuje stejně jako u skotu úbytkem na váze kvůli stále trvajícím průjmům, objevují se otoky v mezisaničí a bledost sliznic (Boray, 2017; Forbes, 2017; Ježková, 2019). Ovcím se zhoršuje kvalita vlny, mají problémy se zabřeznutím. Samice, kterým se přesto podaří zabřednout, často umírají kvůli celkovému vyčerpání. Také může docházet ke špatnému vývoji plodu a jeho následnému potratu.

#### 4.4.3 Fasciolóza koz

Nemoc probíhá stejně jako u ovcí, jelikož se však jedná spíše o okusovače než spáseče, zřídka spasou takové množství metacerkárií jako ovce (Boray, 2017; Ježková, 2019). Setkáváme se u nich tedy spíše s chronická formou fasciolózy, která se opět projevuje dlouhodobým strádáním, ztrátou chuti k jídlu, nedostatkem energie, poklesem produkce mléka a hubnutím. Zvířata mají otoky mezisaničí, bledé sliznice a hubené tělo s hrubou srstí.

#### 4.4.4 Léčba fasciolózy

Léčba akutní fasciolózy není nemožná, avšak i přes léčbu mohou zvířata uhynout (Boray, 2017; Forbes, 2017; Ježková, 2019). U chronického onemocnění je větší pravděpodobnost pro uzdravení zvířete, předchází tomu však zdlouhavé léčení. Nejdůležitějším prvním krokem je přesun zvířat z nakažené pastviny.

*F. hepatica* je odolný parazit, na kterého působí jen malé množství antiparazitik. Na každé stadium parazita mívá navíc léčivo odlišný účinek.

Triklabendazol slouží proti dospělým i mladým motolicím. U ovcí zabíjí malé motolice již od druhého dne početí infekce, u skotu pak po dvou týdnech. Jako jediný lék se používá k léčbě akutní fasciolózy. Jeho účinnost je vysoká, likviduje přes 90 % mladých a až 99 % dospělých jedinců.

Albendazol působí pouze proti dospělým jedincům a vajíčkům ve žlučovodech. Jeho účinnost je 72-96 %. Zároveň působí proti oblým červům a tasemnicím.

Closantel slouží proti dospělým i mladým motolicím starším déle než 4 týdny. Jeho účinnost proti dospělým motolicím je až 100 %. U mladých jedinců je toto procento však poloviční, pouhých 50 %. Motolice, které po léčbě dospějí zůstanou malé a jejich produkce vajíček bude nižší.

Clorsulon slouží proti dospělým i mladým motolicím starším déle než 12 týdnů. Účinnost je 97-99 %. Proti mladším motolicím však opět funguje nespolehlivě.

Rafoxanid zabíjí jak dospělé, tak migrující motolice. Účinnost proti dospělým motolicím je přes 90 %, proti migrujícím přes 50 %.

Nevýhodou těchto léčiv je dlouhá ochranná lhůta na mléko a maso. Všechna výše uvedená antiparazitika jsou pouze na předpis. Nesprávné používání těchto léčiv může zapříčinit ještě větší rezistenci jedinců (např. Kelley *et al.*, 2016).

#### 4.4.5 Prevence

Prevence je nejlepší způsob, jak předcházet fasciolóze (Ježková, 2019). Mezi nejjednodušší způsoby patří nepást zvířata na vlhkých loukách zamořených mezihostitelskými plži – bahnatkami. Popřípadě je možné tato místa vysušovat. Důležité je též nově zakoupená zvířata umisťovat do karantény. Již nakažená zvířata je dobré odčervovat v lednu proti dospělým a mladým motolicím. V květnu pak proti dospělým, aby nedošlo k šíření nákazy. Pokud je suchý rok, není potřeba preventivního odčervování. Naopak v případě mokrého roku je důležité na podzim použít antiparazitika proti nezralým formám i v intervalech 4 týdnů.

### 4.5 Výskyt na území České republiky

V 60. letech minulého století byl výskyt motolice jaterní na našem území poměrně vysoký (Zmuda a Chroust, 2001). Fasciolóza se vyskytovala téměř ve 30 % obcí bývalého Československa. Například v Chrudimském okrese, který spadá pod Pardubický kraj, v této době prevalence u skotu dosahovala i více než 50 %. Fasciolóza byla důvodem značných ekonomických ztrát, proto bylo od poloviny 70. let zahájeno cílené a plošné tlumení motolice jaterní u ovcí a skotu. Díky tomu klesl výskyt tohoto parazita od poloviny 80. let do počátku 90. let pod 1 %. Došlo k významnému snížení u skotu a ovcí v tradičních oblastech výskytu, tedy v západních a jižních Čechách. Praktické vymizení bylo zaznamenáno na jižní Moravě a nízký stálý výskyt byl popisován v severních a severozápadních Čechách a na severní Moravě.

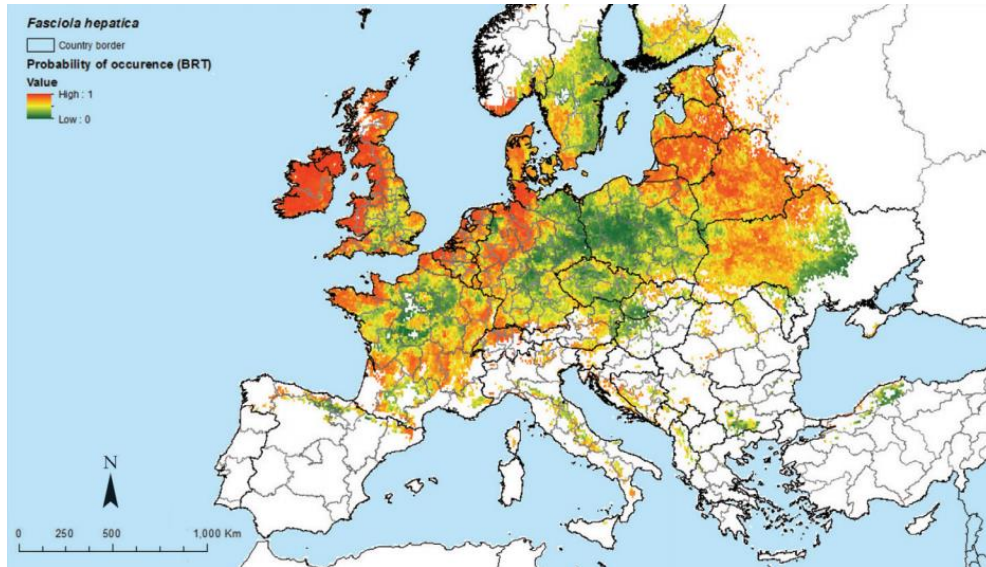
Studie, kterou publikovali Zmuda a Chroust (2001), popisuje vzestupnou tendenci výskytu u skotu v letech 1996 až 1999 v okrese Frýdek-Místek (Moravskoslezský kraj). Počet nálezů živých motolic při veterinární prohlídce na jatkách se zvýšil z 1,33 % v roce 1996 až na 9,45 % v roce 1999. Důvodem byla povodeň z června roku 1997, při níž došlo k zaplavení rozsáhlého území a zanesení koryt řek, což vedlo k podmáčení pastvin a luk i v následujících letech.

Model pravděpodobného výskytu u mléčného skotu v Evropě byl vytvořen ve studii z roku 2015 (Ducheyne *et al.*, 2015). Tento model byl vytvořen na základě záchytů motolic na náhodně vybraných farmách v Belgii, Německu, Irsku, Polsku a Švédsku pomocí dvou metod, Random Forests (RF) and Boosted Regression Trees (BRT).

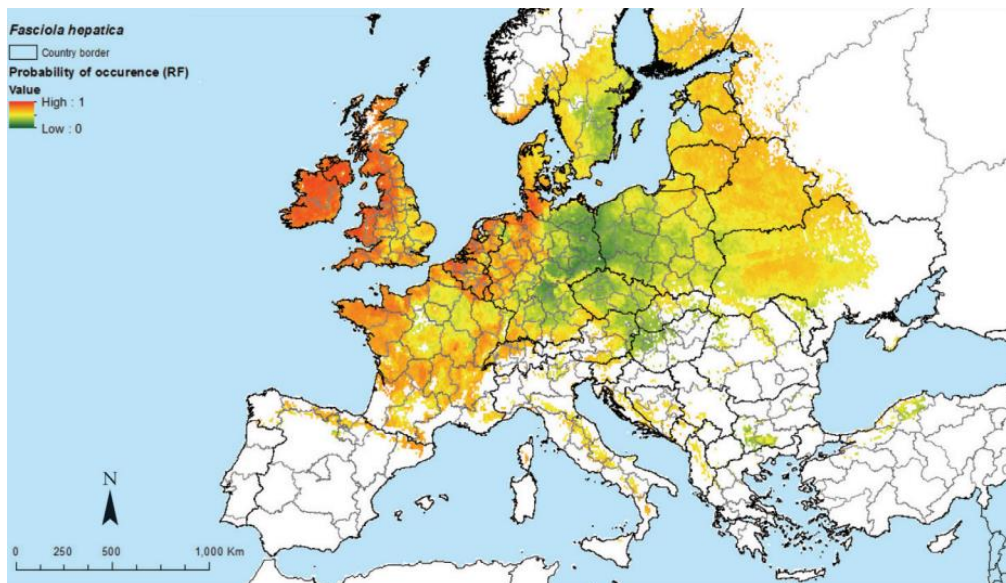
V případě RF byly nejdůležitější proměnné (podle kterých byl model vytvořen) – průměrná teplota v nejsušším čtvrtletí, průměrná teplota nejchladnějšího čtvrtletí, množství srážek v nejsušším čtvrtletí, sezónní teplota a roční srážky. Pomocí této metody je předpokládané riziko výskytu na území České republiky mírné až střední, viz obrázek 3.



V případě BRT byly nejdůležitější proměnné – sezonní teplota, druhá amplituda středního infračerveného pásma, srážky v nejhladnějším čtvrtletí, teplota druhé poloviny dne a minimální teplota nejhladnějšího čtvrtletí. Pomocí této metody je předpokládané riziko výskytu na území České republiky mírně vyšší než u metody RF, viz obrázek 4.



Obrázek 4: Pravděpodobný výskyt (RF). (Ducheyne et al., 2015)



Obrázek 3: Pravděpodobný výskyt (BRT). (Ducheyne et al., 2015)

## 5 MATERIÁL A METODIKA

---

### 5.1 Sběr dat formou dotazníku

Jako stěžejní metodu pro sběr dat jsem zvolil dotazník, který byl zaměřen na ekologické chovy domácích přežvýkavců, tedy skotu, ovcí a koz, v České republice. Práci jsem započal sběrem kontaktních údajů (telefonní číslo, e-mailová adresa, kontaktní osoba, lokalita chovu na úrovni kraje, typ chovaných zvířat), které jsou veřejně dohledatelné na internetových stránkách. Celkově se mi podařilo zajistit 628 kontaktů.

Následujícím krokem bylo vytvoření dotazníku v elektronické podobě, aby se mohl rozeslat na jednotlivé emailové adresy. Pro vytvoření dotazníku byla využita aplikace „Formuláře Google“ v rámci Google Disku. Dotazník se celkově skládal z šesti polí a oddílu o souhlasu se sběrem informací (viz příloha 1).

Šest hlavních bodů v dotazníku:

- Kontaktní email \*povinné pole
- Kraj, do kterého spadáte \*povinné pole
- Doplňující informace (např. jméno a příjmení, název farmy, telefonní číslo, poštovní adresa)
- V minulosti jsem se setkal/setkala s nákazou motolicí jaterní (patologiemi jater a žlučovodů) \*povinné pole
- Pokud ano, u kterých zvířat konkrétně?
- Dotazy a připomínky

Dotazník byl nejen rozeslán na jednotlivé emailové adresy, ale také umístěn na webovou stránku zaměřenou na problematiku fasciolózy u hospodářských zvířat (<https://sites.google.com/view/fasciola-hepatica>), na jejímž vytváření jsem se částečně podílel. Text e-mailu poslaného chovatelům je uveden v příloze 2. Respondentům bylo následně nabídnuto koprologické vyšetření (viz Koprologické vyšetření).

### 5.2 Zisk biologických vzorků – pitva jater

V rámci řešených projektů na oddělení Parazitologie MU byla domluvena spolupráce o dodání biologického materiálu pro experimentální účely s konkrétními jatky, které se nacházejí v kraji Vysočina. Podle nařízení Evropské komise musí vždy proběhnout kontrola poražených jatečných zvířat a masa odpovědným veterinárním lékařem či technikem. U přežvýkavců je na přítomnost motolic kontrolován povrch jater a několika řezy i jaterní parenchym. Pokud bylo při prohlídce potvrzeno napadení jaterní tkáně motolicemi, byla následně celá játra co nejdříve dopravena do parazitologické laboratoře MU v Brně a podrobena pitvě, příloha 3, 4. Jedné pitvy jater jsem se v rámci práce SOČ účastnil.

**Biologický materiál:**

- Játra skotu infikovaná motolicí jaterní

**Chemikálie:**

- Fyziologický roztok (pH 7.8; 37 °C)  
V 400 ml destilované vody rozpustit 8,4 g of NaCl, 100 mg KCl, 720 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 120 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Upravit roztok na požadované pH a doplnit destilovanou vodou do objemu 500 ml.
- Kohoutková voda (odstátá několik hodin)

**Přístroje:**

- Vodní lázeň vytemperovaná na 37 °C
- Běžné kuchyňské síto
- Pitevní nůž (Medin)

**Pracovní postup pro izolaci dospělců:**

1. Játra nožem nařezat na plátky o šířce cca 2 cm a vizuálně zkontrolovat
2. Větší jaterní žlučovody naříznout podélně a vymačkat jejich obsah
3. Dospělce motolic přenést pomocí pinzety do 50 ml zkumavek a třikrát promýt fyziologickým roztokem zahřátým ve vodní lázni na 37 °C, příloha 6.
4. Získané dospělce spočítat a následně využít pro potřebné experimenty či zamrazit při – 80 °C

**Pracovní postup pro izolaci vajíček:**

1. Zkontrolované části jater přenést do kýble a důkladně promýt kohoutkovou vodou, aby došlo k vypláchnutí vajíček z jaterního parenchymu
2. Obsah kýble přelít přes kuchyňské síto do 1 l lahvi a následně provést sedimentaci (viz Sedimentační metoda od bodu 3)
3. Vajíčka motolic získaných sedimentací (příloha 5) uchovávat v kohoutkové vodě ve tmě při 4 °C,
4. Veškerou jaterní tkáň uzavřít do odpadkového pytle a zamrazit pro následné převezení do kafilérie k asanaci

**5.2.1 Měření koncentrace vajíček****Biologický materiál:**

- Vajíčka motolic získaných sedimentací

**Přístroje:**

- Preparační stereomikroskop SZX7 (Olympus)

### **Pracovní postup při měření koncentrace vajíček:**

1. Sedimentovaná vajíčka důkladně rozsuspendovat ve vodě opakovaným obracením zkumavky v ruce
2. Pipetovat 5 µl suspenze na hodinové sklíčko
3. Spočítat vajíčka pod stereomikroskopem při celkovém zvětšení 40x
4. Dvakrát opakovat kroky 1 až 3
5. Vypočítat průměrnou koncentraci vajíček ze všech měření

## **5.3 Koprologické vyšetření**

Jde o vyšetření trusu, díky kterému můžeme přímou metodou potvrdit či vyvrátit napadení zvířete pomocí nálezu vajíček, případě larev parazita. Aby byla zaručena čerstvost a nekontaminovanost trusu, byl odebírán od jednotlivých zvířat technikou *per rectum*, a to minimálně od 10 % zvířat z jejich celkového počtu ve stádě. Od každého zvířete byly odebírány dva vzorky, každý o hmotnosti minimálně 5 g, které byly ukládány do uzavíratelných plastových sáčků označených evidenčním číslem farmy a číslem vzorku. Ke každému vzorku bylo zaznamenáno také identifikační číslo zvířete z jeho ušní známky, aby bylo možné informovat chovatele o výsledcích vyšetření u konkrétních zvířat. Vzorky byly co nejrychleji po odběru převezeny do parazitologické laboratoře MU v chladícím přístroji při teplotě cca 4 °C. Polovina vzorků byla uložena v mrazáku při teplotě -80 °C, do jejich zpracování molekulárními metodami. Druhá polovina byla neprodleně zaslána na Českou zemědělskou univerzitu v Praze, kde proběhlo odborné vyšetření těchto vzorků flotační metodou.

Z každé farmy byl z pastviny či ze stáje sesbíráán i směsný vzorek trusu o hmotnosti 500 až 1000 g, který byl převážen mimo chladicí přístroj. Tento vzorek byl též zaslán na Českou zemědělskou univerzitu v Praze, kde byl vyšetřen sedimentační metodou (ve třech opakováních na vzorek).

### **5.3.1 Sedimentační metoda**

Využívá hmotnosti vajíček, kterou jsou těžší oproti ostatním sedimentům a díky tomu tedy klesají ke dnu. Výhody této metody jsou hlavně jednoduchost a nepotřebnost chemikálií.

#### **Biologický materiál:**

- Čerstvý ovčí trus

#### **Chemikálie:**

- Kohoutková voda (odstátá několik hodin)

#### **Přístroje:**

- Třecí miska

- Čajové sítko
- Plastové kónické odměrky (tzv. šampusky)
- Vodní vývěva
- Mikroskop Olympus BX61
- Kuchyňská váha
- Odměrný válec

#### **Pracovní postup:**

1. Připravit 200 ml vody; navážit 10 g trusu
2. Homogenizovat trus v troše vody v třecí misce; doplnit zbytek vody
3. Přecedit přes čajové sítko do šampusky
4. Nechat sedimentovat 10 min
5. Odsát kapalnou část vodní vývěvou
6. Homogenizovat sediment v 200 ml vody
7. Opakovat krok 4 až 6 třikrát a více pro dosažení potřebné čistoty sedimentu
8. Prohlédnout celý sediment pod mikroskopem

### **5.3.2 Flotační metoda**

Tato metoda je založena na flotačním roztoku, který má větší hustotu než vajíčka. Vajíčka tedy vyplavou na povrch roztoku, kde jsou zachycena. Tuto metodu však znevýhodňuje velká hmotnost vajíček, může tedy docházet k jejich větším ztrátám než u sedimentační metody.

#### **Biologický materiál:**

- Čerstvý ovčí trus

#### **Chemikálie:**

- Kohoutková voda (odstátá několik hodin)
- Flotační roztok
  - 1 l nasyceného roztoku NaCl + 500 g glukózy; míchá se na elektromagnetické míchačce přes noc

#### **Přístroje:**

- Třecí miska
- Čajové sítko
- Kádinka
- 15 ml zkumavka
- Pasteurova pipeta
- Odměrný válec
- Kuchyňská váha

- Krycí sklíčko
- Podložní sklíčko
- Mikroskop Olympus BX61

#### **Pracovní postup:**

1. Připravit 56 ml vody; navážit 4 g trusu
2. Homogenizovat trus v troše vody v třecí misce; doplnit zbytkem vody
3. Přecedit přes čajové sítko do kádinky
4. 10 ml homogenitu přelít do 15 ml zkumavky a centrifugovat při 250 x g po 5 min
5. Opatrně odlít supernatant, aby nedošlo k porušení peletu
6. K peletu přidat cca 5 ml flotačního roztoku a rozmíchat pipetou
7. Zkumavku doplnit až úplně k jejímu okraji flotačním roztokem a na hladinu umístíme krycí sklíčko
8. Centrifugovat při 200 x g po 3 minuty
9. Opatrně přesunout sklíčko na podložní a prohlédnout pod mikroskopem

### **5.3.3 Měření koncentrace vajíček**

#### **Biologický materiál:**

- Vajíčka motolic získaných sedimentací

#### **Přístroje:**

- Preparační stereomikroskop SZX7 (Olympus)

#### **Pracovní postup při měření koncentrace vajíček:**

1. Sedimentovaná vajíčka důkladně rozsuspendovat ve vodě opakovaným obracením zkumavky v ruce
2. Pipetovat 5  $\mu$ l suspenze na hodinové sklíčko
3. Spočítat vajíčka pod stereomikroskopem při celkovém zvětšení 40x
4. Dvakrát opakovat kroky 1 až 3
5. Vypočítat průměrnou koncentraci vajíček ze všech měření

## **5.4 Molekulární analýza**

### **5.4.1 Izolace DNA**

DNA byla izolována pomocí komerčního kitu – DNeasy Blood & Tissue Kit. Principem je, že se DNA absorbuje na silikátové membrány v izolačních kolonkách, kde je přečišťována promývacím pufrý a následně je z membrány uvolněna.

**Biologický materiál:**

- Dospělí jedinci

**Chemikálie:**

- Absolutní etanol (Penta)
- DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen)
- Destilovaná voda

**Přístroje:**

- Centrifuga 5415 R (Eppendorf)
- ThermoMixer Comfort (Eppendorf)
- Vortex Lab Dancer (IKA)

**Postup:**

1. Tkáň o hmotnosti 24 mg nakrájet na malé kousky a vložit do 1,5 ml zkumavky.
2. Přidat 180  $\mu$ l pufru ATL a 20  $\mu$ l proteinázy K a inkubovat při 56 °C O/N při 300 rpm, dokud se tkáň zcela nerozpustí.
3. Přidat 200  $\mu$ l etanolu a důkladně promíchat pomocí vortexu.
4. Pipetovat směs na kolonku vloženou do 2 ml sběrné zkumavky. Centrifugovat při 6000 x g po dobu jedné minuty. Vylít to, co protéklo, a vrátit kolonku do sběrné zkumavky.
5. Přidat 500  $\mu$ l promývacího pufru AW1. Centrifugovat při 6 000 x g po dobu jedné minuty. Vylít to, co protéklo, a vrátit kolonku do sběrné zkumavky.
6. Přidat 500  $\mu$ l promývacího pufru AW2. Centrifugovat při 16 100 x g po dobu tří minut. Vylít to, co protéklo, a vrátit kolonku do sběrné zkumavky.
7. Ke kolonce nic nepřidávat a centrifugovat znovu "na sucho" při 16 100 x g po dobu tří minut.
8. Přenést kolonku do nové 1,5 ml sběrné zkumavky.
9. Uvolnit DNA přidáním 100  $\mu$ l vody do středu membrány v kolonce. Inkubovat po dobu jedné minuty za pokojové teploty (15-25°C). Centrifugovat po dobu jedné minuty při 6 000 x g.
10. Opakovat krok 9 pro zvýšení výtěžku DNA.

**5.4.2 Měření koncentrace DNA**

Koncentrace vzorků byla určena spektrofotometrickou metodou založenou na schopnosti DNA absorbovat UV záření. Koncentrace je pak přímo úměrná množství pohlceného UV záření.

**Biologický materiál:**

- DNA izolovaná z dospělců

- DNA izolovaná z dospělců *Fascioloides magna*

**Chemikálie:**

- Destilovaná voda

**Přístroje:**

- NanoDrop 8000 (ThermoScientific)

**Postup:**

1. Zapnout přístroj a vybrat modul pro měření nukleových kyselin
2. Očistit rameno NanoDropu od nečistot
3. Provést nastavení nulové hodnoty BLANK pomocí destilované vody, v níž byla DNA rozpuštěna
4. Nanést 2 µl vzorku a změřit jeho koncentraci DNA

### 5.4.3 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce – PCR (z anglického Polymerase Chain Reaction) slouží k namnožení určitého úseku DNA (tzv. amplifikace). Je založena na principu opakovaného ohřívání a ochlazování směsi DNA polymerázy, volných nukleotidů, vzorků DNA a primerů. K rychlému střídání teplot se využívá termocykler, ve kterém se několikrát za sebou rychle opakují tři různé fáze. První je denaturace, kdy při teplotě 94-98 °C dochází k rozpadu vodíkových můstků v molekule DNA, což vede k rozvolnění dvoušroubovice na jednovláknovou DNA. Další fází je annealing, kdy při snížené teplotě 45-65 °C nasedají primery na specifické úseky DNA, čímž ohraničují konkrétní úsek DNA. Poslední fází je elongace, při které se k nasedlým primerům naváže DNA polymeráza, která za pomoci volných nukleotidů syntetizuje komplementární vlákno DNA.

**Biologický materiál:**

- DNA izolovaná z dospělců
- DNA izolovaná z dospělců *F. magna*

**Chemikálie:**

- Druhově specifické primery (převzaté z diplomové práce Siegelová, 2012)
- PPP Master Mix (Top-Bio)
- Destilovaná voda

**Přístroje:**

- Mastercycler epgradient S (Eppendorf)
- Centrifuga 5415 R (Eppendorf)
- Vortex Lab Dancer (IKA)



**Postup:**

1. Připravit směs o celkovém objemu 20  $\mu\text{l}$  podle tabulky 1
2. Směs vortexovat a krátce centrifugovat.
3. Shodně připravit kontrolní vzorek nahrazením templátové DNA destilovanou vodou
4. Směs inkubovat v termocycleru podle protokolu jak je uvedeno v tabulce 2

Tabulka 1: Složení směsi pro PCR.

Reagencie	Objem
PPP Master Mix	10 $\mu\text{l}$
Primer forward (10x)	2 $\mu\text{l}$
Primer reverse(10x)	2 $\mu\text{l}$
DNA	1 $\mu\text{l}$
Destilovaná voda	5 $\mu\text{l}$

Tabulka 2: Teplotní program pro PCR.

Fáze cyklu	Teplota	Čas	Počet opakování
Počáteční denaturace	94 °C	5 min	1x
Denaturace	94 °C	30 sec	
Annealing	63 °C	30 sec	30x
Elongace	72 °C	2 min	
Závěrečná elongace	72 °C	3 min	1x

#### 5.4.4 Agarózová gelová elektroforéza

Jedná se o separační metodu, která spočívá v rozdělování molekul ve směsi podle jejich molekulové hmotnosti pomocí stejnoměrného proudu. DNA nesoucí záporný elektrický náboj putuje od záporné katody ke kladné. Pohyb probíhá v agarózovém gelu, jehož póry fungující jako trojrozměrné síto. Proces probíhá v příslušném pufru v elektroforetické komůrce. Pufir udržuje stálou teplotu, vede elektrický proud a optimalizuje hladinu pH.

Vzorky DNA se společně s nanášecím roztokem a barvivem nanášejí do jamek v gelu. Pomocí barviva navázaného na DNA lze následně zjistit, jak rychle se fragmenty DNA pohybují a v jaké vzdálenosti od startu se v daném okamžiku nacházejí. Do jamek bývá nanášen též tzv. marker molekulové hmotnosti, což je směs fragmentů o definované velikosti. Výsledky jsou vyhodnocovány pomocí transiluminátoru.

**Biologický materiál:**

- PCR produkty

**Chemikálie:**

- Agaróza (Invitrogen)
- UltraPure™ 10x TBE Buffer (Invitrogen)

- Pro pracovní koncentraci 0,5x ředit 50 ml 10x koncentrovaného pufru TBE v 950 ml destilované vody.
- GoodView™ Nucleic Acid Stain (Beijing Genetech)
- Economy DNA marker 100-500 coloured

**Přístroje:**

- GelXL plus–Mini Gel Electrophoresis System (Labnet International)
- G: Box (SynGene)
- Mikrovlnná trouba
- Erlenmeyerova baňka
- Analytické váhy

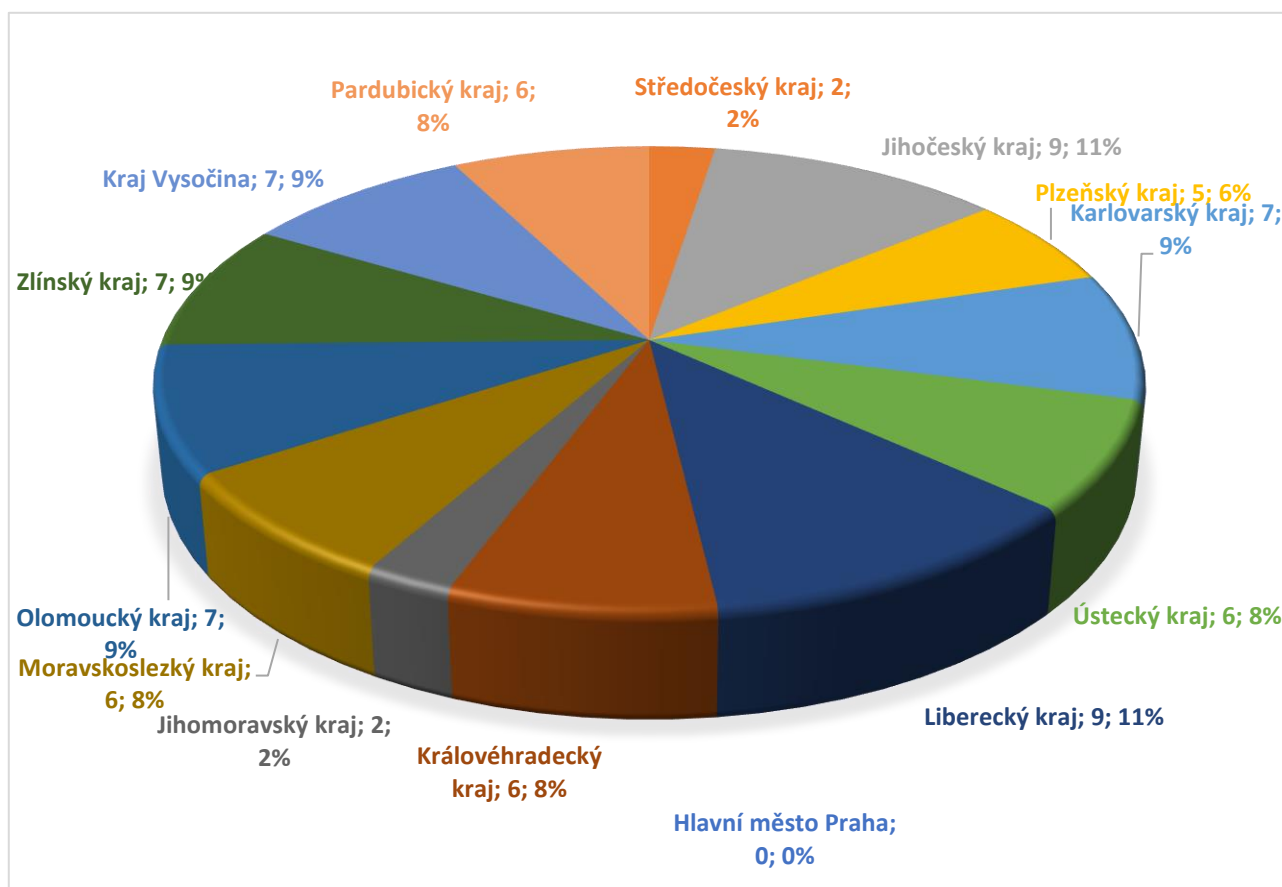
**Postup:**

1. Pro 2% gel do erlenmeyerovy baňky navážit 0,4 g agarózy a přilít 20 ml TBE pufru.
2. Vařit v mikrovlnné troubě 2 až 3 min do úplného rozpuštění agarózy.
3. Vychladit přibližně na 60 °C a přidat 0,8 µl barvy.
4. Nalít do formy na gel, vložit hřeben pro tvorbu jamek a nechat tuhnout asi 15 min.
5. Vytáhnout hřeben a gel ponořit do TBE pufru v elektroforetické vaně.
6. Do jamek pipetovat 10 µl PCR produktu a 5 µl markeru molekulové hmotnosti.
7. Uzavřít elektroforetickou vanu a spustit při konstantním napětí 100 V po 20 min.
8. Gel se separovanými PCR fragmenty vyfotit pomocí transluminátou.

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 Sběr dat formou dotazníku

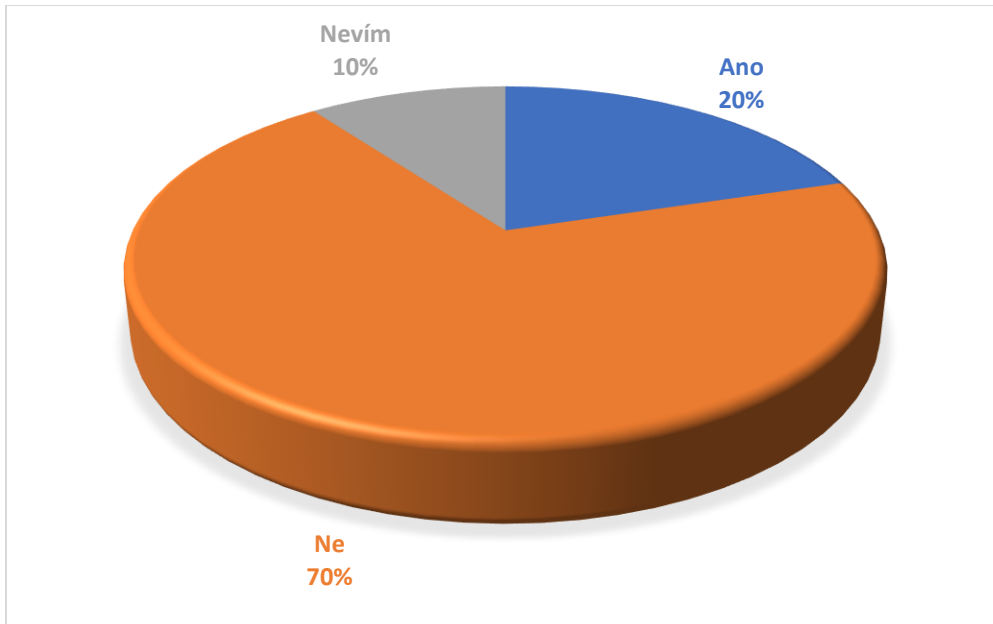
Celkově bylo kontaktováno 628 chovatelů z celé České republiky. Email se však dostal pouze k 566 z nich, jelikož u 62 emailová adresa již neexistovala, nebo se email nepodařilo doručit z důvodu plné schránky a podobně. Zpětných vazeb nakonec bylo 79. Nejvíce respondentů bylo z Libereckého a Jihočeského kraje, naopak nejméně z Hlavního města Prahy, Středočeského a Jihomoravského kraje, viz graf 1.



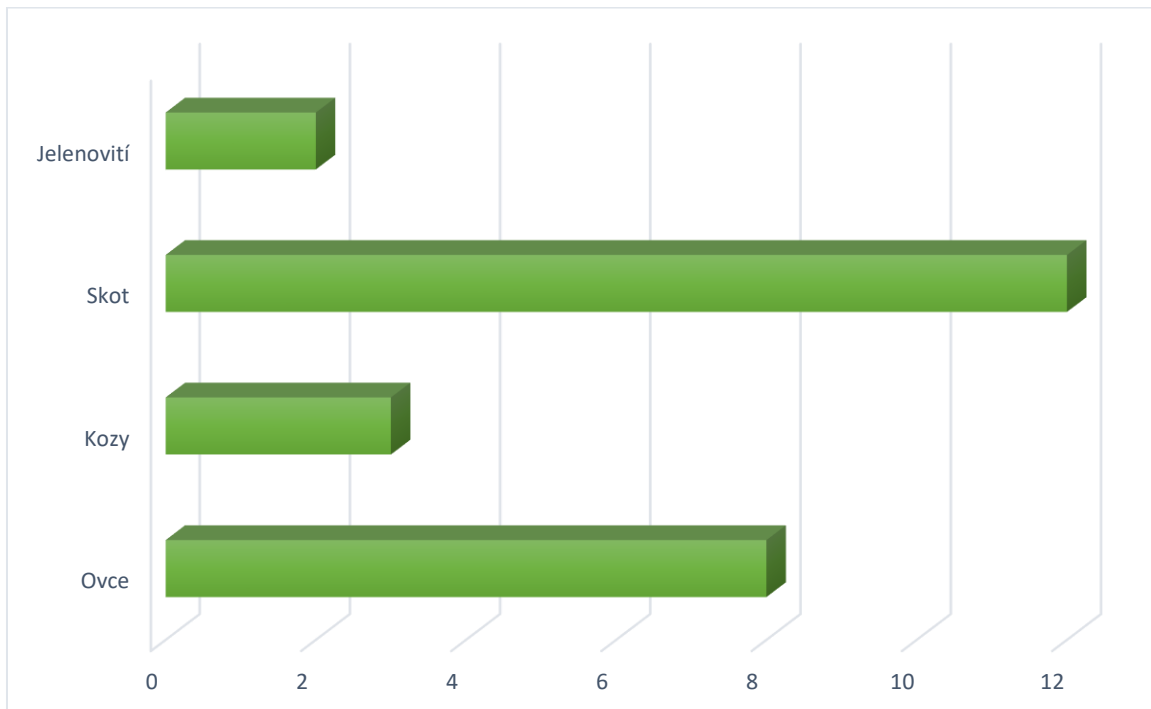
Graf 1: Povinná odpověď č. 1: Kraj, do kterého spadáte. Procentuální znázornění odpovědí respondentů podle příslušnosti k jednotlivým krajům.

S motolicí jaterní *F. hepatica* se nesetkalo celkově 70 % respondentů a 10 % nemělo o nákaze žádné informace. 20 % respondentů mělo zkušenost s tímto parazitem, jak znázorňuje graf 2.

Jestliže již respondenti měli nějakou zkušenost, jednalo se převážně o nakažení skotu a to ve 12 případech. U ovcí se jednalo o 8 případů, u koz byly zaznamenány 3 případy a u jelenovitých 2 případy, viz graf 3.



Graf 2: Povinná odpověď č. 2: V minulosti jsem se setkal/setkala s nákazou motolicí jaterní (patologiemi jater a žlučvodů). Procentuální vyjádření odpovědí respondentů na danou otázku.



Graf 3: Povinná odpověď č. 3: Pokud ano, u kterých zvířat konkrétně? Jednotlivé druhy zvířat, u nichž byla chovateli zaznamenána nákaza jaterními motolicemi.

Dotazník je stále možné nalézt na webové stránce <https://1url.cz/Nzucd>, na které je možné se blíže seznámit s daným tématem a nalézt základní informace o *F. hepatica*, například o jejím vývoji nebo o možných hrozbách spjatých s nákazami. Součástí webové stránky je také výukové video o životním cyklu *F. hepatica* či videa pořízená během pitvy jater.

Dotazy o výskytu motolice jaterní byly dodatečně zaslány i na kontaktní adresy jatek, u kterých byly v minulosti zaznamenány různé jaterní patologie (informace byly poskytnuté ze Státní veterinární správy). Celkem se jednalo o 22 jatek, přičemž se podařilo spojit se osmi z nich. Ze zkontaktovaných jatek neměla zájem o spolupráci jen jedna z Jihomoravského kraje. Ze Zlínského, Ústeckého a Moravskoslezského kraje byla podána informace o nulovém výskytu za poslední roky. Pozitivní záchyty motolic potvrdila dvě jatka z Jihočeského, jedna ze Středočeského kraje a jedna z kraje Vysočina.

S jatky z kraje Vysočina byla navázána užší spolupráce kvůli dojezdové vzdálenosti do Brna a dohoda o kontaktování nás v případě pozitivního záchytu *F. hepatica* v průběhu kontroly jater po porážce odpovědným veterinárním lékařem či technikem. V tabulce číslo 3 jsou uvedeny záchyty motolice jaterní u skotu ze zmíněných jatek sledované v průběhu jednoho roku – od února 2019 do ledna 2020. Pozitivní záchyty *F. hepatica* byly opakovaně potvrzeny v Jihočeském a Plzeňském kraji. Infekce byla též potvrzena u skotu dováženého na porážky ze Slovenské republiky.

Tabulka 3: Infekce jater u skotu. Údaje byly poskytnuty veterinárním lékařem či technikem během porážek skotu na konkrétních jatkách v průběhu jednoho roku.

Datum záchytu	Počet infikovaných kusů	Kraj
6.3.2019	1x	Jihočeský
19.3.2019	1x	Slovensko
3.4.2019	1x	Jihočeský
12.6.2019	1x	Plzeňský
23.10.2019	3x	Slovensko
8.12.2019	1x	Plzeňský
9.1.2020	1x	Jihočeský
17.1.2020	5x	Plzeňský

## 6.2 Získ biologických vzorků – pitva jater

Při porážce skotu na jatkách na Vysočině byly 12. 6. 2019 potvrzeny veterinárním lékařem či technikem motolice v játrech. Jednalo se o jednu starší samici ve věku 51 měsíců, která byla na jatka přivezena z Plzeňského kraje. Játra byla následně co nejdříve převezena na Masarykovu univerzitu, kde byla pitvána. Přítomnost motolic bylo možné potvrdit již ze samotného povrchu jater, kde byly viditelné patologické změny, viz příloha číslo 3, 4. Celkově bylo v játrech nalezeno 23 dospělců (příloha číslo 6).

## 6.3 Měření koncentrace vajíček získaných z oplachu jater

Játra, ze kterých se získávala vajíčka, byla identická s těmi, ze kterých se získávali dospělci. Nařezané kousky jater z pitvy byly důkladně promyty vodou. Následnou

sedimentací oplachu byla získána vajíčka, která byla rozdělena do osmi skupin pro následné experimenty. V každé skupině byla spočítána koncentrace vajíček (tabulka číslo 4). Výsledný počet vajíček *F. hepatica* z těchto konkrétních jater byl průměrně 8 174 vajíček na 1 ml. Odhadem pak bylo celkově získáno 81 740 vajíček.

Tabulka 4: Počet vajíček získaný z infikovaných jater skotu.

Skupina	Počet vajíček na 5 $\mu$ l			Průměrný počet vajíček na 1 ml
1	28	36	27	6 066
2	39	32	37	7 200
3	40	30	43	7 533
4	38	34	56	8 533
5	24	38	54	7 733
6	45	42	47	8 933
7	44	63	55	10 800
8	33	46	50	8 600

## 6.4 Koprologická vyšetření

Odběry vzorků trusu probíhaly na podzim roku 2019 a to celkem na dvaceti farmách v 9 krajích. V kraji Vysočina a ve Zlínském, Jihočeském, Jihomoravském, Pardubickém, Moravskoslezském, Libereckém, Karlovarském a Olomouckém kraji. Osobně jsem se podílel na odběrech na sedmi z nich.

Na každé farmě byl odebrán směsný vzorek, tzn. vzorek tvořený trusem pocházejícím od všech zvířat ve stádu. Jednalo se o 16 vzorků ovčího trusu a dva vzorky tvořené směsí trusu ovcí a koz. Tyto vzorky byly vyšetřeny sedimentační metodou na přítomnost motolic na ČZU v Praze. Na MU jsem byl přítomný u vyšetření zbývajících dvou vzorků sedimentační i flotační metodou. V případě vzorků z Jihomoravského kraje šlo o vyšetření trusu ovcí, koz a skotu. V Jihočeském kraji se jednalo o směsný vzorek trusu ovcí.

Celkem z 19 farem bylo odebráno 600 individuálních vzorků trusu ovcí, z toho 300 bylo uchováno na MU pro budoucí molekulární analýzy a zbylých 300 vzorků bylo odesláno na vyšetření flotační metodou do Prahy. Na dvou farmách (z Libereckého a Moravskoslezského kraje) bylo navíc odebráno 22 individuálních vzorků trusu koz. Polovina byla opět ponechána na MU a druhá polovina byla poslána do Prahy. Nejmenší vyšetřované stádo ovcí čítalo 15 zvířat, největší pak 550 kusů zvířat, medián odpovídal 50 kusům ovcí na stádo.

Ze všech vyšetřených vzorků byl pouze jeden vzorek pozitivní na přítomnost vajíček motolice, nejednalo se však o motolici jaterní, nýbrž o motolici kopinatou *Dicrocoelium dendriticum* (příloha 7). Přítomnost vajíček *D. dendriticum* byla zaznamenána v ovčím truse vyšetřovaném právě na MU. Pro ověření správnosti byl trus dodatečně odeslán na vyšetření do Prahy, kde byly naše závěry potvrzeny. Tento vzorek pocházel z Jihočeského kraje. Dále jsme ve vzorcích trusu identifikovali několik článků tasemnice *Moniezia* sp., vajíčka hlístic rodů *Trichuris*, *Nematodirus*, *Strongyloides*, strongylidní hlístice a oocysty parazitických prvoků rodu *Eimeria* (příloha 8, 9).

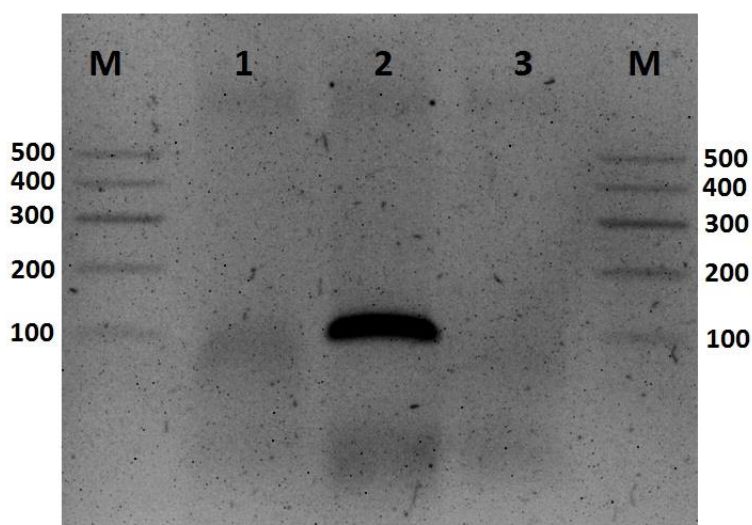
## 6.5 Molekulární analýza

Z dospělce motolice jaterní získaného z pitvy jater byla izolována DNA podle protokolu komerčního kitu. Analýza byla doplněna o vzorek DNA motolice obrovské *F. magna*, získaný v dřívějších experimentech. Koncentrace získané DNA změřené na spektrofotometru dosahovala 58 ng/μl pro a 1 282 ng/μl pro *F. magna*.

Druhově specifické primery navržené na oblast ITS2 regionu rDNA (tabulka 5) byly převzaty z diplomové práce Veroniky Siegelové (2012). S těmito primery a DNA obou druhů motolic byla provedena PCR o celkovém objemu jedné reakce 20 μl. Vzniklé produkty byly rozděleny pomocí agarózové elektroforézy v 2 % gelu (obrázek 5).

Tabulka 5: Druhově specifické primery pro oblast ITS2.

Druh motolice	Sekvence primeru	Velikost amplikonu
<i>F. magna</i>	Fw: 5'-CACTACTGTCGCTTTATCGTCG-3'	89 bp
	Rev: 5'-TGATCACGAAGGATACCGTCTT-3'	
	Fw: 5'-CTTATGATTTCTGGGATAATT-3'	119 bp
	Rev: 5'-GCACAAACCAATGACAAAGTG-3'	



Obrázek 5: DNA amplifikovaná pomocí druhově specifických primerů. PCR produkty rozděleny pomocí agarózové elektroforézy (2 % agarózový gel obarvený GoodView™ Nucleic Acid Stain). M: hmotnostní marker (bp); 1: vzorek *F. magna*; 2: vzorek *F. hepatica*; 3: kontrolní vzorek. (Foto Č. Motyčka, 2019)

## **6.6 Konference**

Data z dotazníků a představení problematiky byly představeny na dvou konferencích. Jednou v České republice, v hotelu Kouty v Rejčkově u Ledče nad Sázavou při Helmintologických dnech 2019 v období 6. – 10. května 2019. Druhá konference se pořádala v Belgii, ve dnech od 27. do 29. srpna zde probíhala konference Joint COMBAR – ACSRPC meeting: Anthelmintic resistance in ruminants (příloha 10, 11).



## 7 DISKUZE

---

Sběr dat formou dotazníku probíhal zasíláním informačních emailů s dotazníkem jednotlivým chovatelům po celé České republice. Kvůli snazšímu přístupu ke kontaktům a informacím na internetu byly zvoleny jako cílová skupina pro výzkum ekofarmy. Byla zde i větší pravděpodobnost zájmu o danou problematiku, což je důležitý faktor pro případnou další spolupráci – tedy možnost terénního výzkumu právě na těchto farmách.

Celkově byl dotazník doručen na 566 adres a zpětná vazba byla zaznamenána pouze u každého sedmého. Tento počet odpovědí přisuzuji promazávání emailů bez jejich přečtení nebo neotevření.

Oslovení chovatelé pocházeli ze všech krajů České republiky až na Hlavní město Prahu. Z výsledků je patrné, že celkem 70 % chovatelů nemělo žádnou zkušenost s nálezem u zvířat, z čehož můžeme vyvozovat nízký či nulový výskyt tohoto parazita v daných lokalitách. 20 % respondentů však zkušenosti a nálezy mělo. Jednalo se o chovatele převážně z Jihočeského kraje, zastoupeny byly farmy i z Jihomoravského, Ústeckého a Moravskoslezského kraje. Pevážně šlo o nákazu skotu a ovcí. Objevila se i informace o možné nazeze motolicemi u zvířat z řad jelenovitých. S větší pravděpodobností by se však mohlo jednat o motolici obrovskou *Fascioloides magna*, která častěji napadá právě tyto hostitele (Kašný a Novobilský, 2008).

Během výzkumu bylo též kontaktováno 22 jatek, přičemž spojit se podařilo pouze se sedmi z nich. Pozitivní nálezy pak potvrdila pouze jatka z Jihočeského, Středočeského kraje a kraje Vysočina. S jatky z kraje Vysočina byla navázána užší spolupráce, díky čemuž mohly být sledovány záchyty motolice jaterní v průběhu celého jednoho roku. Nejvíce potvrzených nálezů z těchto jatek bylo ze zvířat pocházejících z Plzeňského kraje (7 infikovaných krav) a dále z Jihočeského kraje (3 infikované krávy).

Koprologický výzkum byl prováděn na 20 farmách v devíti krajích České republiky. Absence některých krajů je zapříčiněna špatnou dostupností z Brna a časovou náročností, která snížila i celkový počet navštívených farem. Flotační ani sedimentační metodou nebyl potvrzen žádný nález. A to dokonce ani v Moravskoslezském kraji, kde byl v minulosti zaznamenán zvyšující se výskyt tohoto parazita kvůli zaplavování rozsáhlých území (Zmuda a Chroust, 2001). Důvodem může být i fakt, že v naší studii byly vyšetřovány především ovce a kozy, zatímco Zmuda a Chroust se zaměřují především na skot. Je známé, že se průběh fasciolózy se u jednotlivých druhů definitivních hostitelů liší (Boray, 2017; Forbes, 2017; Ježková).

Při shrnutí výsledků všech našich studií, můžeme říci, že největší výskyt byl zaznamenán v Jihočeském a Moravskoslezském kraji. Následně byl zvýšený výskyt zaznamenán také v Jihomoravském, Ústeckém a Pardubickém kraji. Ve srovnání s výzkumem výskytu *F. hepatica* z 80. – 90. let 20. století (Zmuda a Chroust, 2001), který

uvádí zvýšený výskyt převážně na severní Moravě a v severních Čechách. Následně jako místo s nejnižším výskytem uvádí jižní Čechy a jižní Moravu (zde dokonce uvádí až nulové výsledky). Můžeme zde tedy potom mluvit o určitém rozprostření husté populace do dalších krajů České republiky. K tomuto trendu mohlo dojít v důsledku nekontrolovaných přesunů, případně spárkatou změní. Nynější nižší výskyt v některých krajích se tedy může také stát jednou minulostí.

Počet záchytnů ovšem není tak velký, jako tomu bylo v minulém století (Zmuda a Chroust, 2001). Tento fakt mohlo způsobit dlouhodobé sucho, při kterém se v krajině nevytváří periodické tůně. Následná úspěšnost vývoje od vajíčka až po dospělého jedince je pak méně pravděpodobnější. Poslední roky však nedošlo pouze k poklesu počtu srážek v České republice, ale také k celoročnímu zvýšení teploty. Podle publikace, kterou vydali Fox *et al.* v roce 2011, teplejší zimy umožňují snazší přežití mezihostitelů v prostředí. Kvůli tomu ve svých závěrech upozorňují na nebezpečí rozšíření v následujících letech. Tento fenomén je lze očekávat na Britských ostrovech, kterých se studie týká, a to díky vysoké vlhkosti a teplejším zimám. V podmínkách České republiky se kvůli nižší vlhkosti nemusí dané závěry naplnit, což podporují i závěry této práce.

Ve studii, kterou publikovali Ducheyne *et al.* (2015) byl pomocí geografického informačního systému (GIS) předpovězen nízký až střední výskyt na území České republiky. Je možné, že v roce 2015 tento odhad odpovídal reálné situaci, ovšem kvůli suššímu období, které nastalo po roce 2015 mohlo dojít k většímu poklesu populace mezihostitelů i parazita samotného.

Výskyt ostatních parazitů v trusu ovcí a koz se také oproti minulým létům pohyboval v nižších hodnotách (Vadlejch, nepublikovaná data), což koresponduje se sníženým výskytem, který předpokládám ve svých závěrech.

## 8 ZÁVĚR

---

Motolice jaterní *Fasciola hepatica* je kosmopolitně rozšířený druh parazita, který napadá játra a žlučovody definitivních hostitelů a způsobuje u nich závažné, mnohdy i smrtelné onemocnění nazývané fasciolóza. V Evropě se s fasciolózou setkáváme především u hospodářských zvířat – skotu, ovcí a koz. K infekci zvířat dochází po pozření infekčních stádií parazita přichycených na vegetaci či volně plujících na vodní hladině. Klinický průběh fasciolózy se liší v závislosti na druhu hostitele. Pro skot odolnější vůči infekci je charakteristický chronický průběh, u ovcí a koz bývá zaznamenán i akutní a subakutní průběh spojený s náhlými úhyny zvířat. Vlivem infekce dochází ke snižování užitkovosti zvířat, jako jsou například nižší hmotnostní přírůstky, snížená produkce a kvalita mléka, ovlivněná plodnost samic, což vede k velkým ekonomickým ztrátám v chovech hospodářských zvířat po celém světě. Navzdory těmto faktům, není současný výskyt v České republice přesněji znám.

Hlavním cílem práce bylo zmapovat aktuální situaci výskytu v České republice a porovnat tento výsledek s historickou a odhadovanou hodnotou. Pro tyto účely byl vytvořen adresář chovatelů, kterým byl následně rozeslán informační email s dotazníkem. Pro potvrzení získaných dat bylo s několika vybranými chovateli domluveno koprologické vyšetření trusu na jejich farmách. Odebrané vzorky byly vyšetřeny standardními koprologickými metodami (flotační a sedimentační) na Masarykově univerzitě a ve spolupráci s Českou zemědělskou univerzitou v Praze. Další informace byly získány z jatek, kde dochází ke kontrole jater při každé porážce. Zde již byl výskyt několikrát potvrzen veterinárním lékařem či technikem. Tyto výsledky mi umožnily dotvořit ucelenější mapu výskytu toho parazita.

Při porovnávání výsledků se staršími pracemi bylo zjištěno rozprostření do více krajů po celé České republice. Také ale došlo k snížení prevalence parazita v tradičních oblastech výskytu. Budoucí trend vývoje je ovšem nejistý, jelikož ho ovlivní mnoho faktorů.

Závěrem mohu říci, že osobně neočekávám žádné radikální změny ve výskytu motolice jaterní u skotu a malých přežvýkavců v chovech v České republice. Fasciolóza neustále přetrvává na našem území v nízké míře, proto je riziko nákazy u hospodářských zvířat malé, ale stále reálné.

## 9 ZDROJE

---

Adrien ML, Schild AL, Marcolongo-Pereira C, Fiss L, Ruas JL, Grecco FB, Raffi MB. Acute fasciolosis in cattle in southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2013; 33:705-709.

Alba A, Vázquez A, Sánchez J, Duval D, Hernández H, Sabourin E, Vittecoq M, Huertrez-Boussés S, Gourbal B. *Fasciola hepatica*-*Pseudosuccinea columella* interaction: effect of increasing parasite doses, successive exposures and geographical origin on the infection outcome of susceptible and naturally resistant snails from Cuba, 2018; 11:559

Boray JC. Liver fluke disease in sheep and cattle. *Primefact* 2017; 446, fourth edition.

Bosco A, Rinaldi L, Musella V, Amadesi A, Cringoli G. Outbreak of acute fasciolosis in sheep farms in a Mediterranean area arising as a possible consequence of climate change. *Geospatial Health* 2015; 9:319-324.

Devendra V, Shalini K, Vimala V, Prtiti V, Nuzhat H. Ectopic fascioliasis in the dorsal spine: case report. *Neurosurgery* 2006; 59:706-707

Ducheyne E, Charlier J, Vercruyse J, Rinaldi L, Biggeri A, Demeler J, Brandt C, de Waal T, Selemetas N, Höglund J, Kaba J, Slawomir J, Kowalczyk J, Hendrickx G. Modelling the spatial distribution of *Fasciola hepatica* in dairy cattle in Europe *Geospatial Health* 2015, pp. 261-270

Dreyfuss G, Abrous M, Vignoles P, Rondelaud D. *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: vertical distribution of metacercariae on plants under natural conditions. *Parasitol Res* 2004; 94: 70–73

Esch WG, Barger MA, Fellis KJ. The Transmission of Digenetic Trematodes: Style, Elegance, Complexity. *Integrative and Comparative Biology* 2002; 42:304-312.

Forbes A. Liver fluke infections in cattle and sheep. *Livestock* 2017; 22:250-256.

Forejtek P. *Alaria alata* – parazit masožravců s výskytem vývojových stádií u černé zvěře. *Myslivost* 2013; 3:48.

Garcia-Campos A, Correia CN, Naranjo-Lucena A, Garza-Cuartero L, Farries G, Browne JA, MacHugh DE, Mulcahy G. *Fasciola hepatica* Infection in Cattle: Analyzing Responses of Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) Using a Transcriptomics Approach. *Frontiers in Immunology* 2019; 10: 2081.

Heydarian P, Ashrafi K, Mohebbali M, Kia E, Aryaeipour M, Chegeni Sharafi A, Mokhayeri H, Bozorgomid A, Rokni M. Seroprevalence of Human Fasciolosis in Lorestan Province, Western Iran, in 2015-16. *Iran J Parasitol* 2017; 389-397

Jaja IF, Mushonga B, Green E, Muchenje V. Financial loss estimation of bovine fasciolosis in slaughtered cattle in South Africa. *Parasite Epidemiology and Control* 2017; 2:27-34.

Ježková T. Fasciolóza [online]. 2019. Dostupné z: <https://zverolekarka.com/fascioloza/>

Kalbe M, Haberl B, Haas W. Snail Host Finding by *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata*: Compound Analysis of “Miracidia-Attracting Glycoproteins”. Academic Press 2000; 231–242

Kašný M, Novobilský A. Je naše spárkatá zvěř ohrožena motolicí velkou? *Svět myslivosti* 2008; 12: 13-15.

Kelley J, Elliott T, Baddoe T, Anderson G, Skuce P, Spithill T. Current Threat of Triclabendazole Resistance in *Fasciola hepatica*. 2016

Liba J, Atsanda N, Francis M. Economic loss from liver condemnation due to Fasciolosis in slaughtered ruminants in Maiduguri abattoir, Borno State, Nigeria. *Vet. Anim. Res* 2017; 65-70

Makay O, Gurcu B, Caliskan C, Nart D, Tuncyurek M, Korkut M. Ectopic fascioliasis mimicking a colon tumor. *World J Gastroenterol* 2007; 2633-2635

Mas-Coma S, Bargues M, Valero M. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonose. *International Journal for Parasitology* 2005; 1255–1278/1256

Moazeni, M, Ahmadi, A0, Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*, *Experimental Parasitology* 2016; 10.1016

Mohsen A, Elnaz N, Hossein H, Mahdi D. Epidemiology and economic loss of fasciolosis and dicrocoeliosis in Arak, Iran. *Kashan University of Medical Sciences* 2018; 1648-1655

Mulcahy G, O'Connor F, Clery D, Hogan SF, Dowd AJ, Andrews SJ, Dalton JP. Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Research in Veterinary Science* 1999; 67: 27–33.


Parkinson M, O'Neill S, Dalton J. Endemic human fasciolosis in the Bolivian Altiplano. Cambridge University Press 2006; 135, 669–674

Pipiková J. Životný cyklus *Fasciola hepatica*. V: Dubinský P, Majláthová V, Mitterpáková M, Papajová I, Peťko B, Stanko M, Vichová B. Atlas závažných parazitozoonóz. Košice: Parazitologický ústav Slovenskej akadémie vied, 2015; 192.

Rathinasamy V, Hosking C, Tran L, Kelley J, Williamson G, Swana J, Elliott T, Rawlin G, Beddoea T, Spithill T. Development of a multiplex quantitative PCR assay for detection and quantification of DNA from *Fasciola hepatica* and the intermediate snail host, *Austropeplea tomentosa*, in water samples. *Elsevier* 2018; 0304-4017

- Rondelaud D, Vignoles P, Dreyfuss G. *Fasciola hepatica*: the developmental patterns of redial generations in naturally infected *Galba truncatula*. *Parasitology research* 2004; 94:183–187.
- Shaflei R, Sarkari B, Sadjjadi S, Mowlavi G, Moshfe A. Molecular and Morphological Characterization of *Fasciola* spp. Isolated from Different Host Species in a Newly Emerging Focus of Human Fascioliasis in Iran- Shiraz 2014; 405740
- Schweizer G, Braun U, Deplazes P, Torgerson P. Estimating the financial losses due to bovine fasciolosis in Switzerland. *Veterinary Record* 2005; 157: 188-193
- Siegelová V. Molekulární diagnostika motolice obrovské (*Fascioloides magna*). Diplomová práce 2012.
- Taha H, El-Shaikh K, Al-Sadi M. Effect of sodium hypochlorite on *Fasciol gigantica* egg and the intermediate host, Taibah university 2014; 1658-3655
- Valero M, Darce N, Panova M, Mas-Coma S. Relationships between host species and morphometric patterns in *Fasciola hepatica* adults and eggs from the northern Bolivian Altiplano hyperendemic region. *Universidad de Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n* 2001; 85-100
- Volf P., Horák P. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton, 2007.
- Wilson R, Denison J. Studies on the activity of the miracidium of the common liver fluke, *fasciola hepatica*. Department of Biology, University of York, Heslington, York 1969; 301-3030
- Yakhchali M, Bagramnejad K. Morphologic and morphometric variations of the adult and the eggs of frequent *Fasciola* species from domestic ruminants of North West of Iran. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology* 2015; 75-83
- Zmuda K, Chroust K. Motoličnatost skotu v okrese Frýdek-Místek. *Veterinářství* 2001; 51:181-183.
- Zukowski S, Hill J, Jones F, Malone J. Development and validation of a soil-based geographic information system model of habitat of *Fossaria bulimoides*, a snail intermediate host of *Fasciola hepatica*. 1991; 11: 221-227

# 10 PŘÍLOHY



**Dotazník**

Budeme velice rádi, když nám věnujete několik minut pozornosti a odpovíte vyplněním tohoto dotazníku.  
Děkujeme!

\*Povinné pole

Kontaktní email \*

Vaše odpověď

Kraj do kterého spadáte \*

Vyberte

Doplňující informace (např. jméno a příjmení, název farmy, telefonní číslo, poštovní adresa)

Vaše odpověď

Příloha 1: „Formulář Google“ v rámci Google Disku.

Předmět: Monitoring motolice jaterní

Dobrý den,

chtěli bychom Vás upozornit na možnost navázání spolupráce.

Jsme skupina vědců z Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. V rámci našeho výzkumného záměru se zabýváme motolicí jaterní *Fasciola hepatica*, která parazituje v játrech a žlučovodech především u ovci, koz a skotu. V současné době jsou jaterní patologie při porážkách běžně zaznamenávány, nicméně jim není věnována odpovídající pozornost. Motolice mohou ovlivňovat zdraví, celkovou pohodu i užitkovost Vašich zvířat. Proto jsme se této problematice začali věnovat a rádi bychom tuto situaci zlepšili.

Pro náš výzkum i pro případné tlumení fasciolózy je nezbytné získat data o geografickém rozšíření parazita. Z tohoto důvodu nás zajímá, zda jste se ve Vašich chovech při porážkách hospodářských zvířat nesetkali s motolichatostí. Záporná odpověď je pro nás stejně cenná jako údaje o pozitivních nálezech. Budeme velice rádi, když nám věnujete několik minut pozornosti, a v případě zájmu nám odpovíte vyplněním krátkého dotazníku (vyplnění Vám opravdu zabere maximálně jen minutu):

<https://goo.gl/forms/q7zSqR5DUzj0NFt1>

Na této adrese pak naleznete také podrobnější informace o motolici jaterní a odkazy na danou problematiku:

<https://sites.google.com/view/fasciola-hepatica>

Předně Vás chceme ujistit, že se jedná pouze o výzkumné a laboratorní účely, jejichž výstupy budou anonymizovány a nebudou moci být spojovány s konkrétním chovem, farmou ani majitelem.

Pokud byste měli jakýkoliv návrh, připomínku či doporučení, neváhejte se na mne obrátit.

S pozdravem za celý tým,

Mgr. Lucie Škorpičková

Masarykova univerzita  
Ústav botaniky a zoologie  
Parazitologie  
Kamenice 753/5  
625 00 Brno

Příloha 2: Text e-mailu poslaného chovatelům.



Příloha 3: Játra skotu napadená *F. hepatica*. (Foto Č. Motyčka, 2019)



Příloha 4: Detail jater skotu napadených *F. hepatica*. (Foto Č. Motyčka, 2019)

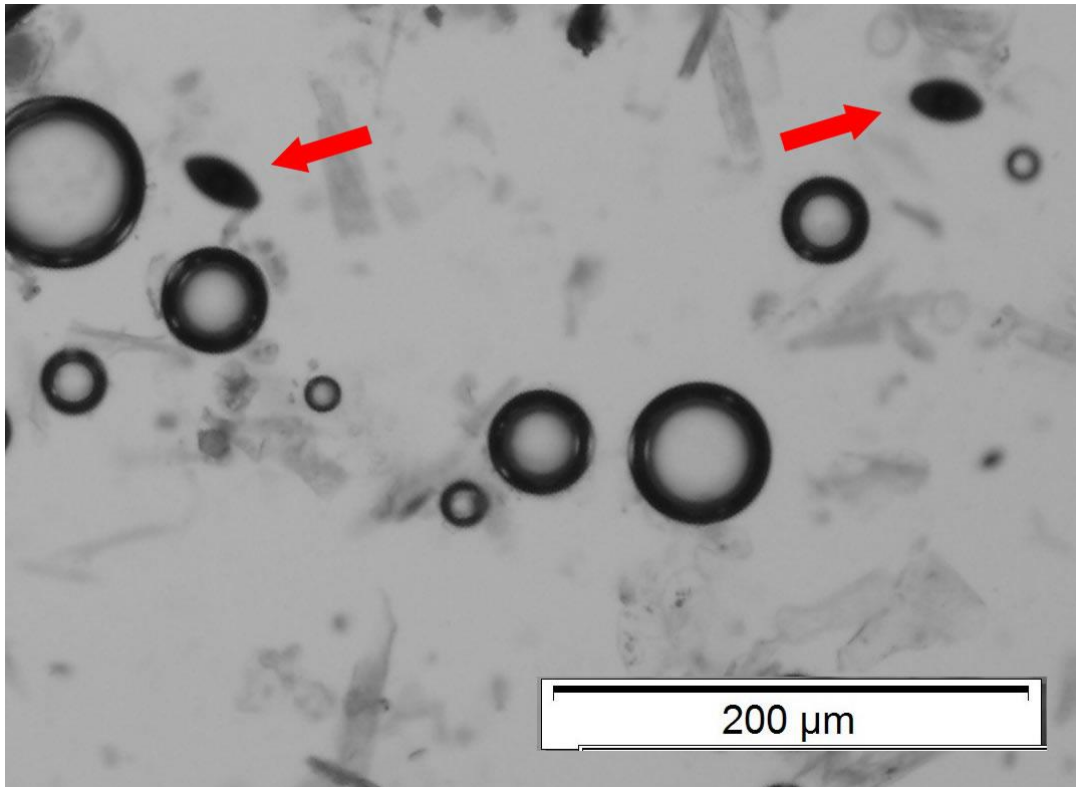


Příloha 5: Vajíčka *F. hepatica* z oplachu jater. (Foto Č. Motyčka, 2019)



Příloha 6: Dospělí jedinci *F. hepatica*. (Foto Č. Motyčka, 2019)





Příloha 7: Vajíčka *D. dendriticum*. (Foto Č. Motyčka, 2019)



Příloha 8: Článek tasemnice *Moniezia sp.*. (Foto Č. Motyčka, 2019)



Příloha 9: Vlevo vajíčko *Nematodirusu* o velikosti 189 µm. Vpravo vajíčka *strongylidní* hlístice o velikosti 85 µm. (Foto Č. Motyčka, 2019)

Jana Ilgová<sup>1</sup>, Nikol Reslová<sup>1</sup>, Lucie Škorpíková<sup>1</sup>, Pavel Roudnický<sup>1</sup>, Jiří Vorel<sup>1</sup>, Jaroslav Vadlejch<sup>2</sup>, Martin Kašný<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Botany and Zoology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic


<sup>2</sup>Department of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences, Prague, Czech Republic


[www.besovfarmad.com](http://www.besovfarmad.com)


## INTRODUCTION

Czech Republic lacks systematic and coordinated plan to tackle emerging anthelmintic resistance (AR) in small grazing ruminants. Monitoring of AR is limited to only few studies in which molecular approaches are absent. In our new research project we aim to apply conventional and modern diagnostic methods to monitor the parasite load, with a special focus on the gastrointestinal nematodes (GINs). We intent to map the occurrence of AR in selected goat and sheep farms in the Czech Republic and define the risk factors related with the selection for AR. As an outcome, we would like to deliver the recommendations to farmers which should result in improved grazing management, parasite control and sustainable use of anthelmintics.

## RESISTANCE IN THE CZECH REPUBLIC

Chroust et al. (1998, 2000)  AR 50% to BZ  
100% to LZ  
0% to IVM

Vernerová et al. (2009)  AR up to 98% to BZ

Vadlejch et al. (2014)  AR 40% to BZ (*Trichostrongyle* sp.)  
10% to IVM (*Haemonchus contortus*)

METHODOLOGY - FECRT, EHT, MALDT

## MAIN AIMS

- ✓ Monitoring of the helminth infection distribution
- ✓ Validation of novel molecular tests for practical application in species/AR detection
- ✓ Identification of risk factors associated with selection for AR in sheep and goats

## PROGRESS

- ✓ 60 sheep farms contacted
- ✓ Informational web page for farmers dealing with AR created (only in Czech, sorry ☹)
- <https://sites.google.com/view/anthelmintic-resistance/>
- ✓ Questionnaire for the identification of risk factors assembled
- ✓ Sampling planned for the period from September to December 2019

## SUPPOSED OUTCOMES

- ✓ Identification of risk factors associated with AR in sheep and goats
- ✓ Recommendations for appropriate grazing management
- ✓ Enhanced parasite control
- ✓ Knowledge of distribution of AR in the Czech Republic
- ✓ Improved methods for GINs diagnostics
- ✓ Better understanding of AR mechanisms

## LAB METHODOLOGY

- ✓ *in vivo* (FECRT) and *in vitro* AR detection methods (EHT, MALDT, LFIA)
- ✓ Molecular detection of GINs in stool (qPCR)
- ✓ Species identification of L3 larvae (High Resolution Melting Analysis)
- ✓ Detection of AR
  - ✓ sequential gene polymorphisms
  - ✓ DNA methylation (genome sequencing)

## WHO AM I?

This team will solve the Strongylid Egg Identity Crisis ☹



This research is supported by Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic (LTC19018) and COST Action CA16230 (Combatting Anthelmintic Resistance in Ruminants)

**COMBAR**  
COMBATTING ANTHELMINTIC RESISTANCE IN RUMINANTS

# Proteolysis in eggs of *F. hepatica*: role in pathology and its regulation

N. Reslová, L. Škorpíková, J. Ilgová, P. Roudnický, J. Vorel, Č. Motyčka, M. Kašný

Department of Botany and Zoology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

## INTRODUCTION

A huge number of negative economic impacts is associated with infections of livestock, mainly in sheep and cattle breeding, by fluke *Fasciola hepatica*. This fluke parasitizes the liver and liver bile ducts causing a disease called fasciolosis manifesting by internal bleeding and liver damage, which in high loads of parasites often leads to mass deaths of animals (production losses almost EUR 1 billion/year in EU).



A) Fibrosis of liver tissues and B) calcification of bile ducts caused by actions of adult worms.

The parasite transmission is accomplished via eggs, which are produced in huge quantities. The eggs of *F. hepatica* can serve as an appropriate comparative model system to trematodes such as schistosomes (e.g. *Schistosoma mansoni*), whose eggs cause significant pathology.

- A) Eggs of schistosomes elicit a strong granulomatous response in host's tissue due to the proteolytic cocktail which facilitates their migration.
- B) Eggs of *F. hepatica* probably do not have any pathogenic effect on the host.



Occurrence of flukes in livestock breeding around the Czech Republic (data resulting from the questionnaire).

## AIMS OF THE PROJECT

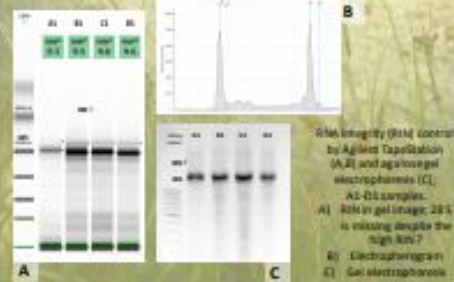
- Identification and determination of egg-derived excretory-secretory proteins (ESP)
- Detection of proteases by an *in vitro* analysis of ESPs, profiling by functional proteomics
- Evaluation of the physiological role of proteases applied in assays with cultured eggs
- Recombinant expression and biochemical characterization

## MATERIALS & METHODS

- ✓ General selection of areas with flukes' occurrence (questionnaire to farmers)
- ✓ Isolation of adults and eggs from liver bile ducts
- ✓ Optimization of adult worms cultivation to highest possible yield of eggs (37 °C/6 hours, RPMI medium), ESP collections
- ✓ Optimization of RNA isolation, cDNA synthesis, quality control



A) Adults cultivation in RPMI medium and B) homogenized eggs.



RNA integrity (RIN) control by Agilent TapeStation (A,B) and agarose gel electrophoresis (C). A1-A2: samples. A) RIN in gel image: 28 S is missing despite the high RIN? B) Electrophoresis C) Gel electrophoresis

- X Mass spectrometry analysis of ESP produced by both adults and eggs in different stage of embryonation
- X Transcriptome analysis (RNAseq)

## CONCLUSION

Results obtained from the studies targeted on proteases of eggs of trematodes could help to improve the current diagnostics, vaccine development and also therapeutic strategies.

Note: The second part of the project focused on *S. mansoni* is being solved by our colleagues from Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the CAS in Prague, team of Dr. Martin Hron.

Acknowledgements: This study was supported by Czech Science Foundation (GA19-17269S) and by Masaryk University institutional support (MUNI/A/0918/2018).

MUNI MUNI MUNI MUNI