

**MASARYKOVA
UNIVERZITA**



Česká
zemědělská
univerzita
v Praze



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Diagnostika invazní motolice

Fascioloides magna

T A

Č R

Technologická
agentura
České republiky

Mgr. Lucie Škorpíková, Ph.D.

Mgr. et Mgr. Jana Ilgová, Ph.D.

doc. Ing. Jaroslav Vadlejch, Ph.D.

RNDr. Martin Kašný, Ph.D.

Ing. Jakub Drimaj, Ph.D.

Mgr. Nikol Reslová, Ph.D.

UPLATNĚNÁ CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Diagnostika invazní motolice *Fascioloides magna*

NmetS – Metodika schválená příslušným orgánem státní správy,
do jehož kompetence daná problematika spadá

Autoři:

Mgr. Lucie Škorpíková, Ph.D. (Masarykova univerzita; 357379@mail.muni.cz) et al.

Oponenti:

Mgr. Roman Leontovyč, Ph.D.

Katedra parazitologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Viničná 7,
128 44, Praha 2, Česká republika; roman.leontovyc@natur.cuni.cz

MVDr. Tomáš Jarosil

Odbor ochrany zdraví a pohody zvířat, Ústřední veterinární správa Státní
veterinární správy ČR, Slezská 100/7, 120 00, Praha 2; Česká republika;
t.jarosil@svscr.cz

T A
Č R

Uvedená certifikovaná metodika je výstupem projektu číslo
SS05010070 s názvem: „Šíření invazních druhů parazitů a jejich
drtivé dopady na biologickou rozmanitost původních druhů
přežvýkavců“.

Tento projekt je spolufinancován se státní podporou Technologické
agentury ČR v rámci Programu Prostor pro život.

Program **Prostředí pro život**

Osvědčení o uznání certifikované metodiky vydala
Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy ČR
Slezská 100/7, 120 00 Praha 2

Důvěrnost a dostupnost: veřejně přístupný

OBSAH

1. Cíl metodiky	5
2. Vlastní popis metodiky	6
2.1. Uvedení do problematiky	6
2.1.1. Původ a současné rozšíření	6
2.1.2. Morfologie	8
2.1.3. Vývojový cyklus	9
2.1.4. Mezihostitelé.....	10
2.1.5. Definitivní hostitelé a klinický průběh fascioloidózy	13
2.1.6. Patologické změny	16
2.1.7. Léčba a prevence.....	18
2.2. Diagnostické metody – postmortální	22
2.2.1. Parazitologická pitva.....	22
2.2.2. Histopatologické vyšetření.....	24
2.2.3. Oplach jater.....	26
2.3. Diagnostické metody – intravitální	27
2.3.1. Koprologie	27
2.3.2. Nepřímé metody.....	31
2.3.3. Molekulární metody.....	32
2.4. Jednokroková nested qPCR.....	33
2.4.1. Cíl testu	33
2.4.2. Princip testu	33
2.4.3. Detekční cíle testu.....	35
2.4.4. Předmět a působnost	37
2.4.5. Podstata testu	37
2.4.6. Přístroje a pomůcky	37
2.4.7. Chemikálie a roztoky	38

2.4.8.	Vzorkování, manipulace se vzorkem a jeho příprava	40
2.4.9.	Izolace DNA z výkalů	41
2.4.10.	Postup vlastního testu	43
2.4.11.	Ověření validity	45
2.4.12.	Zpracování dat a interpretace výsledků	47
3.	Srovnání „novosti postupů“	49
4.	Popis uplatnění certifikované metodiky	49
5.	Ekonomické aspekty	50
5.1.	Parazitologická pitva	50
5.2.	Sedimentační metoda	50
5.3.	ELISA	51
5.4.	Konvenční PCR následovaná sekvenční analýzou	52
5.5.	Jednokroková nested qPCR	53
5.6.	Ekonomický přínos pro uživatele metodiky	54
6.	Seznam použité literatury	56
7.	Seznam publikací a dalších výsledků, které předcházely metodice	63
8.	Dedikace	64

1. CÍL METODIKY

Cílem předložené metodiky je vytvoření uceleného přehledu o invazní motolici *Fascioloides magna* a především o zavedených diagnostických postupech používaných pro potvrzení přítomnosti tohoto parazita u jeho definitivních hostitelů.

Metodika zahrnuje také nový standardizovaný postup detekce této motolice, konkrétně její nukleové kyseliny (DNA), přímo z výkalů specifických definitivních hostitelů. Mimo výkaly může být pro analýzu využita DNA různého původu, získaná například z infikovaných tkání hostitele nebo mezihostitele, z různých vývojových stádií motolice, popřípadě z prostředí. Předností popsaného postupu je jeho možnost specificky detekovat kromě *F. magna*, také další gastrointestinální patogeny v jedné rychlé reakci.

Na základě postupů uvedených v této metodice by měl její uživatel získat vhodný komplexní nástroj k pochopení celé problematiky spojené s motolicí *F. magna* a k odhalení infikovaných kusů přežvýkavé zvěře volně se pohybující v honitbách či chované v oborách a na farmách. V návaznosti na diagnostická data získaná s využitím metodiky bude její uživatel schopen posoudit účinnost dříve přijatých opatření nebo nastavit další vhodná preventivní opatření či terapeutické zásahy, jejichž cílem bude snížit výskyt tohoto invazního parazita na ekologicky a ekonomicky přijatelnou úroveň.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1. Uvedení do problematiky

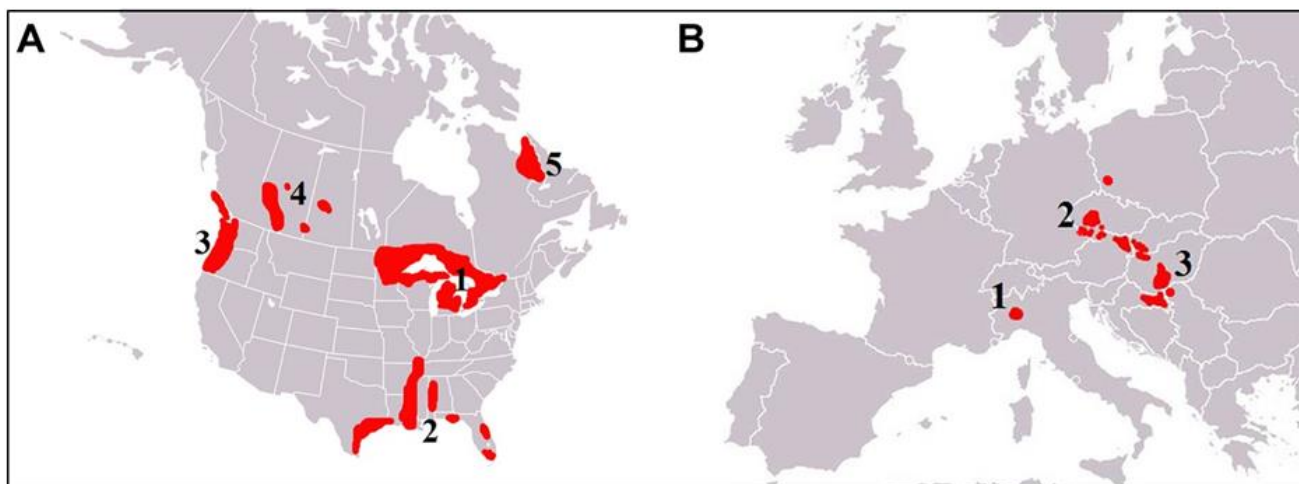
Fascioloides magna (třída motolice – Trematoda, čeleď Fasciolidae) je parazitický červ (helminth), v České republice známý pod názvy motolice velká či motolice obrovská (Obr. 1). Jedná se o veterinárně významného parazita infikujícího játra u širokého spektra hostitelů, především volně žijících, ale i hospodářských přežvýkavců, u nichž způsobuje onemocnění nazývané fascioloidóza (též obecněji motolichnatost). Tato původem severoamerická motolice byla neúmyslně zavlečena člověkem do Evropy společně s nepůvodními druhy spárkaté přežvýkavé zvěře. Motolice *F. magna* musela překonat mnoho ekologických a fyziologických bariér, aby se stala úspěšným invazním druhem, jehož trvalé usazení a šíření v evropských zemích způsobuje nemalé ekologické a ekonomické škody.



Obrázek 1.: Dospělý jedinec motolice velké (*F. magna*). (Foto M. Kašný)

2.1.1. Původ a současné rozšíření

Původním areálem výskytu motolice *F. magna* je Severní Amerika (Lotfy et al., 2008), kde se doposud nachází v pěti stálých ohniscích na území USA a jižní Kanady (Obr. 2) (Pybus, 2001). Zde parazituje u definitivních hostitelů, jimiž jsou nejčastěji jelen wapiti, jelenec běloocasý či sob polární (Foreyt & Todd, 1976). Pravděpodobně společně s prvními dvěma zmíněnými zástupci přežvýkavců byla tato motolice zavlečena do Evropy, a to někdy v druhé polovině 19. století (Erhardová-Kotrlá, 1971; Juhász & Stothard, 2023; Malcicka, 2015).



Obrázek 2.: A) Pět stálých ohnisek výskytu motolice *F. magna* v Severní Americe, která je původním areálem výskytu: 1 – oblast Velkých jezer, 2 – jižní pobřeží Atlantiku, 3 – severní pobřeží Tichého oceánu, 4 – oblast Skalistých hor, 5 – Severní Quebec a Labrador; B) tři stálá ohniska výskytu v Evropě, kam byl tento parazit zavlečen: 1 – Itálie, 2 – Česká republika/Polsko/Německo, 3 – podunajské lužní lesy.

(Malcicka, 2015; upraveno)

V této době byly nové druhy spárkaté prežvýkavé zvěře cíleně a opakovaně dováženy na majetky šlechtických rodů k ozvláštňení oborních chovů a zámeckých parků (Erhardová-Kotrlá, 1971; Pybus, 2001). Není tedy překvapením, že tento nepůvodní parazit postupem času, společně se zvěří, opustil ohrazené prostory a dostal se do volné přírody, kde se přizpůsobil zdejšímu klimatickým podmínkám a začal bez problémů infikovat i původní evropské druhy volně žijících prežvýkavců, například jelena lesního nebo srnce obecného.

O první zmínku a popis této motolice se zasloužil Roberto Bassi v roce 1875 (Pybus, 2001), který ji objevil v játrech jelenů pocházejících z královského parku La Mandria, ležícího nedaleko Turína v Itálii. V tomto čase bylo na příkaz krále Viktora Emanuela II. Savojského do parku dovezeno několik desítek jelenů wapiti z USA. Po realizaci tohoto přesunu došlo v parku k masivním úhynům původní jelení zvěře.

Na území dnešní České republiky byl druh *F. magna* poprvé zaznamenán někdy kolem roku 1910 u daňka skvrnitého. Od této doby se vědělo o přetrvávajícím výskytu tohoto parazita u jelenů a daňků na jihu Čech (Erhardová-Kotrlá, 1971). Na území ČR je tedy tato motolice u zvěře zjišťována již přes sto let. Stabilní ohniska výskytu *F. magna* se nacházejí především v oblastech jižních a středních Čech (Erhardová-Kotrlá, 1971; Kašný et al., 2012; Novobilský et al., 2007a).

V průběhu 20. letch minulého století se pravděpodobně nákaza rozšířila z ČR do jihozápadního Polska, ale mohlo tomu být i naopak, protože i do Polska byli v 19. století importováni jeleni wapiti z USA (Demiaszkiewicz et al., 2015). V prvních desetiletích 20. století byla motolice *F. magna* poprvé zaznamenána také v Německu (Rehbein et al., 2021). Nicméně konkrétně v Bavorsku, které sousedí s českými hranicemi (Kašný et al., 2012; Rehbein et al., 2021), byl nález této motolice potvrzen teprve až v roce 2009. Ohnisko parazitózy zde stabilně přetrvává doposud.

Poměrně nedávno, v devadesátých letech 20. století, se tato invazní motolice začala přenášet prostřednictvím vysoce početné jelení zvěře v lužních lesích lemujících řeku Dunaj, a to na území Slovenska (Rajský et al., 2002), Maďarska (Majoros & Sztojkov, 1994), Rakouska (Hörweg et al., 2011), Chorvatska (Marinculic et al., 2002) a Srbska (Mirčeta et al., 2018). Tento ekosystém poskytuje ideální podmínky pro vývoj motolice. Pokud se vývojová stadia této motolice dostanou do dalších říčních systémů (především přítoků Dunaje, kterými jsou například řeky Váh, Hron či Dráva), existuje vysoká pravděpodobnost, že *F. magna* bude i nadále rozšiřovat svůj areál výskytu v Evropě (Halasz et al., 2023; Konjević et al., 2018; Slavica et al., 2006).

V současné době se tedy jaterní motolice *F. magna* vyskytuje v Evropě ve třech stálých ohniscích a to 1) v severní Itálii, 2) v České republice, (a popřípadě Polsku a Německu) a 3) v podunajských lužních lesích (Obr. 2). Kromě Evropy byly zaznamenány i další ojedinělé případy, kdy byl tento parazit importován ze svých původních severoamerických lokalit, například do Střední Ameriky, jižní Afriky nebo Austrálie (Arundel & Hamir, 1982; Boomker & Dale-Kuys, 1977; Lorenzo et al., 1989)

2.1.2. Morfologie

Fascioloides magna je parazitický červenohnědě zbarvený helmint s oboustranně symetrickým, dorzoventrálně zploštělým tělem, které připomíná tvar listu. Český název motolice velká či obrovská poukazuje na značnou velikost tohoto endoparazita, která jej řadí mezi jedny z největších motolic na světě. Dosahuje délky úctyhodných 40 až 100 mm a šířky 20 až 35 mm (Pybus, 2001; Swales, 1935). Tloušťka těla se pohybuje od 2 do 5 mm. Na předním konci těla se nacházejí dvě svalnaté přísavky – ústní přísavka umožňující sání krve hostitele, kterou se živí (tzv. hematofágie), a břišní přísavka sloužící k přichycení na parazitované tkáni. Jelikož se jedná se o hermafrodity, má každý dospělý

jedinec kompletně vyvinutou jak samčí, tak i samičí reprodukční soustavu. To motolici *F. magna* umožňuje se v případě potřeby rozmnožovat i samooplozením (autogamií), například právě během kolonizace nového hostitele, kdy se musí v počáteční fázi vyrovnávat se svojí nízkou populační hustotou (Halasz et al., 2023).

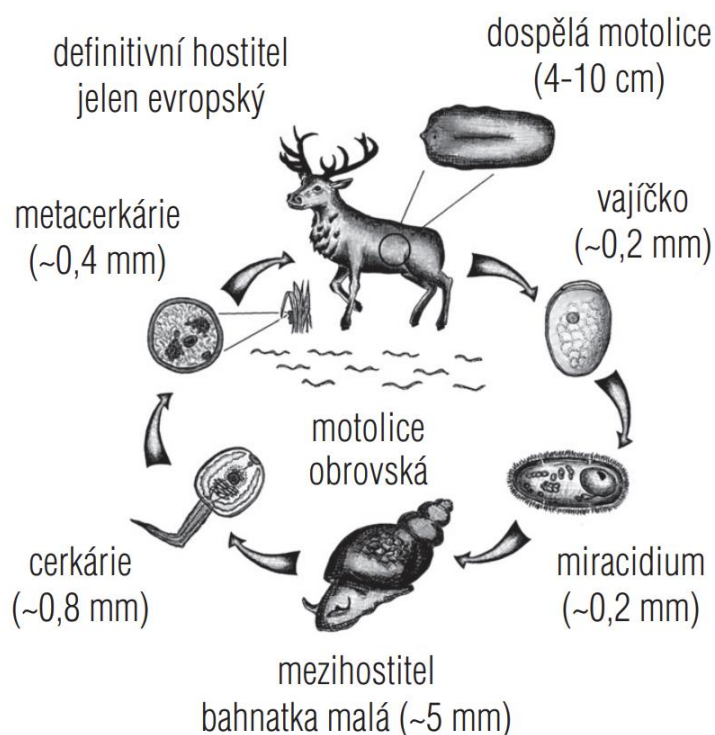
Vajíčka jsou žlutohnědě zbarvená a oválná (Obr. 3) (Swales, 1935). Jejich rozměry se průměrně pohybují kolem $150 \times 95 \mu\text{m}$, nicméně velikost i tvar se mohou značně různit i v rámci jednoho definitivního hostitele. Stěny vajíček jsou silné $2,5\text{--}3 \mu\text{m}$ a jejich vnější povrch je hladký. Na vrcholu jsou vajíčka uzavřena charakteristickým kulatým víčkem (operkulem), pomocí kterého se z něj ven uvolňuje larvální stádium miracidium.



Obrázek 3.: Vajíčko motolice *F. magna* s charakteristickým víčkem (označené šipkou). (Foto J. Vadlejš)

2.1.3. Vývojový cyklus

Vývojový cyklus motolice *F. magna* je poměrně složitý, protože vyžaduje zapojení jak mezihostitele (vodního plže), tak i definitivního hostitele (obvykle přežvýkavce) (Pybus, 2001; Swales, 1935). Celý vývoj může být zjednodušený do pěti základních fází: 1) uvolnění nezralých vajíček z definitivního hostitele spolu s výkaly do vnějšího prostředí; 2) vývoj a líhnutí prvního larválního stádia (miracidia) a jeho aktivní proniknutí do těla mezihostitelského plže; 3) nepohlavní rozmnožování parazita v mezihostiteli (generace sporocyst a redií); 4) uvolnění larev cercárií z mezihostitele a jejich zapouzdření na vegetaci (metacerkárie); 5) pozření infekčních metacerkárií definitivním hostitelem společně s vegetací, vývoj dospělých motolic v jaterních pseudocystách a produkce vajíček (Obr. 4).

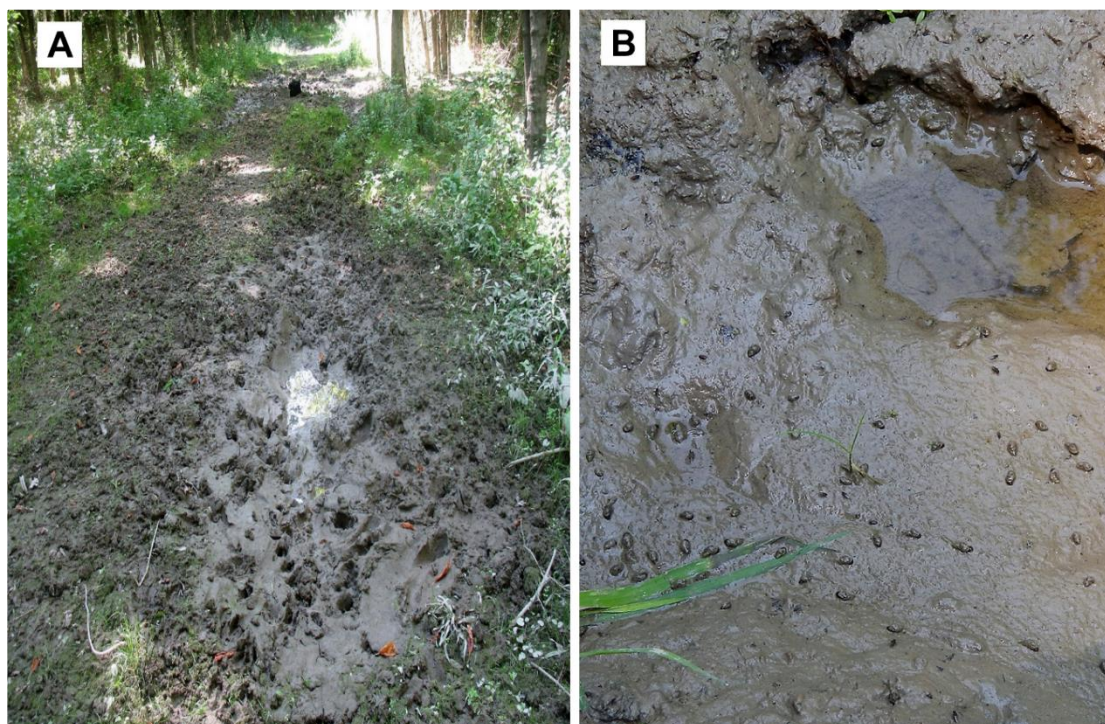


Obrázek 4.: Dvuhostitelský vývojový cyklus motolice *F. magna* zahrnující vodního plže jako meziphostitele a obratlovce (přežvýkavce) jako definitivního hostitele.

(Ilustrace L. Jedličková ve Vaca & Kašný, 2012)

2.1.4. Meziphostitelé

Úspěšné dokončení vývojového cyklu *F. magna* je závislé na přítomnosti vhodného meziphostitele, kterým jsou zástupci sladkovodních plicnatých plžů z čeledi plovatkovitých (Lymnaeidae) (Lockyer et al., 2004). Geografické rozšíření motolice by tedy logicky mělo být striktně limitované na sladkovodní habitáty s mělkými bahnitými břehy a bohatým společenstvem vodních rostlin, kde tito meziphostitelé žijí. Nicméně nově bylo prokázáno, že se tito plži a případně jejich vajíčka mohou s bahnem přichytávat na srst černé, srnčí i jelení zvěře a tak se pasivně přenášet na určité vzdálenosti (Juhász & Majoros, 2023). Meziphostitelé pak kolonizují i stanoviště zcela nevhodná pro jejich dlouhodobější přežití. Příkladem jsou louže na uježděných polních a lesních cestách, kde se drží bahno a voda pouze po několik týdnů a která zvěř používá jako kaliště (Obr. 5). Zvířata si tak pravděpodobně sama vytvářejí místa, kde dochází k hlavnímu přenosu motolice *F. magna* mezi definitivním hostitelem a meziphostitelem.



Obrázek 5.: Typická louže na lesní cestě (A) a poměrně velká populace plžů druhu *G. truncatula* přítomných ve vysychající louži (B) (Juhász & Majoros, 2023; upraveno)

Pokud na dané lokalitě panují příznivé environmentální podmínky (světlo, optimální vlhkost a koncentrace kyslíku, teplota mezi 10 a 30 °C), dojde k vývoji vajíček, z nichž se následně do vody uvolní obrvené larvy miracidia (Pybus, 2001; Swales, 1935). Ty se musí v krátkém čase zorientovat pomocí světla a chemických signálů najít vhodného plže, a proniknout do něj. V plži se parazit mnohonásobně nepohlavně množí. V této fázi může mezihostitele využít pro přezimování a pokračovat v rozmnožování, až když opět nastanou příznivé podmínky. Z jednoho plže se pak mohou uvolnit zpátky do vody desítky až stovky plovoucích larev cercarií (Foreyt & Todd, 1976; Vignoles et al., 2006).

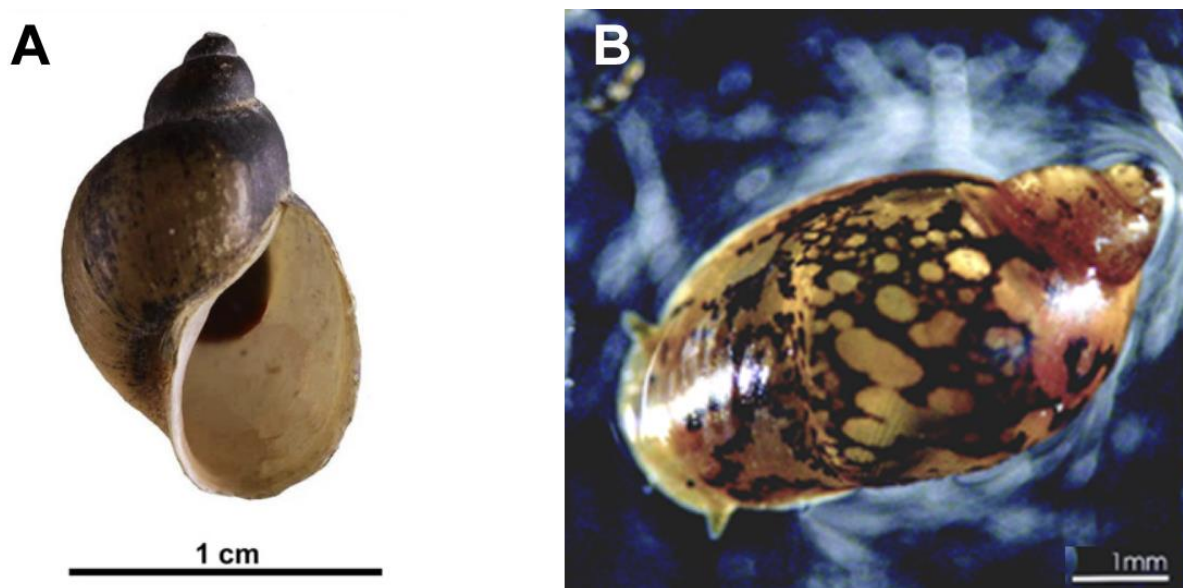
Pro úspěšné dokončení vývoje parazita je tedy zapotřebí, aby vhodné podmínky trvaly alespoň po dobu několika týdnů. V důsledku toho v oblastech s chladnějším podnebím, kdy aktivitu plžů limituje chladné zimní období, proběhne za rok pouze jeden vývojový cyklus a fascioloidóza je tedy sezónní onemocnění (Hörweg et al., 2011; Kašný et al., 2012). V našich podmínkách se jedná o období mezi květnem a říjnem. Koncem léta a začátkem podzimu pak také vrcholí infekce definitivních hostitelů. Naopak v teplých klimatických oblastech (např. pobřeží Mexického zálivu v USA), může přenos probíhat půl roku i déle.

V Severní Americe je motolicí *F. magna* přirozeně infikováno hned několik zástupců plžů z čeledi plovatkovitých. Jedná se o druhy *Galba techella*, *Galba modicella*, *Galba parva*, *Hinkleyia caperata*, *Pseudosuccinea columella* a *Galba humilis* (Dunkel et al., 1996; Swales, 1935; Vannatta & Moen, 2016).

Jelikož je tato motolice úspěšným invazním parazitem, dokázala se přizpůsobit a nalézt vhodného mezihostitele i v Evropě. Jedná se hlavně o bahnatku malou (*Galba truncatula*), což je drobný semiakvatický druh, který se vyskytuje nejčastěji podél břehů pomalu tekoucích a stojatých vod, v mokřadech, v odvodňovacích struhách a příkopech kolem cest a na dalších periodicky zaplavovaných písčito-bahnitých stanovištích (Kašný et al., 2012; Leontovyč et al., 2014; Vignoles et al., 2006). Dalším zástupcem evropského plže přirozeně infikovaného motolicí *F. magna* je uchatka toulavá (*Radix labiata*, syn. *Radix peregra*) (Obr. 6A) (Faltýnková et al., 2006; Leontovyč et al., 2014). Ve srovnání s populací bahnatky malé je její populace početnější, nicméně četnost nákazy tohoto druhu je naopak mnohonásobně nižší. Uchatka toulavá snáší lépe kyselé prostředí, proto je i její areál rozšíření širší. Obývá například potoky či chladné, dobře prokysličené tůňky chudé na živiny.

Dalšími potenciálními mezihostiteli pro *F. magna* v Evropě mohou být plži z čeledi plovatkovitých, u nichž byla nákaza prokázána pouze experimentálně. Jsou jimi blatenka štíhlá (*Omphiscola glabra*), blatenka bažinná (*Stagnicola palustris*), uchatka zaostřená (*Radix lagotis*), uchatka vejčitá (*Radix ovata*), plovatka bahenní (*Lymnaea stagnalis*) a blatenka rybníčná (*Stagnicola fuscus*) (Chroustová, 1979; Huňová et al., 2012; Novobilský et al., 2012; Rondelaud et al., 2006a).

Dalším možným kandidátem je blátivka americká (*Pseudosuccinea columella*) (Obr. 6B), která je přirozeným mezihostitelem *F. magna* v Severní Americe. Tento nepůvodní plž byl do botanických zahrad po celém světě neúmyslně zavlečen s okrasnými vodními rostlinami (Glöer & Sîrbu, 2005; Prepelitchi et al., 2003; Vignoles et al., 2018; Šefrová & Laštůvka, 2005). I tomuto živočichovi se podařilo uniknout do volné přírody v mnoha zemích světa, včetně ČR, kde prokázal, že má značný potenciál stát se invazivním. Nadměrné rozšíření tohoto plže v Evropě by pak mohlo otevřít nové cesty pro další šíření motolice *F. magna*.



Obrázek 6.: A) Ulita plže *R. labiata*, který je přirozeným mezihostitelem motolice *F. magna* v Evropě;

B) invazní druh plže *P. columella*, který je mezihostitelem *F. magna* v Severní Americe.

(Leontovyč et al., 2014; Prepelitchi et al., 2003; upraveno)

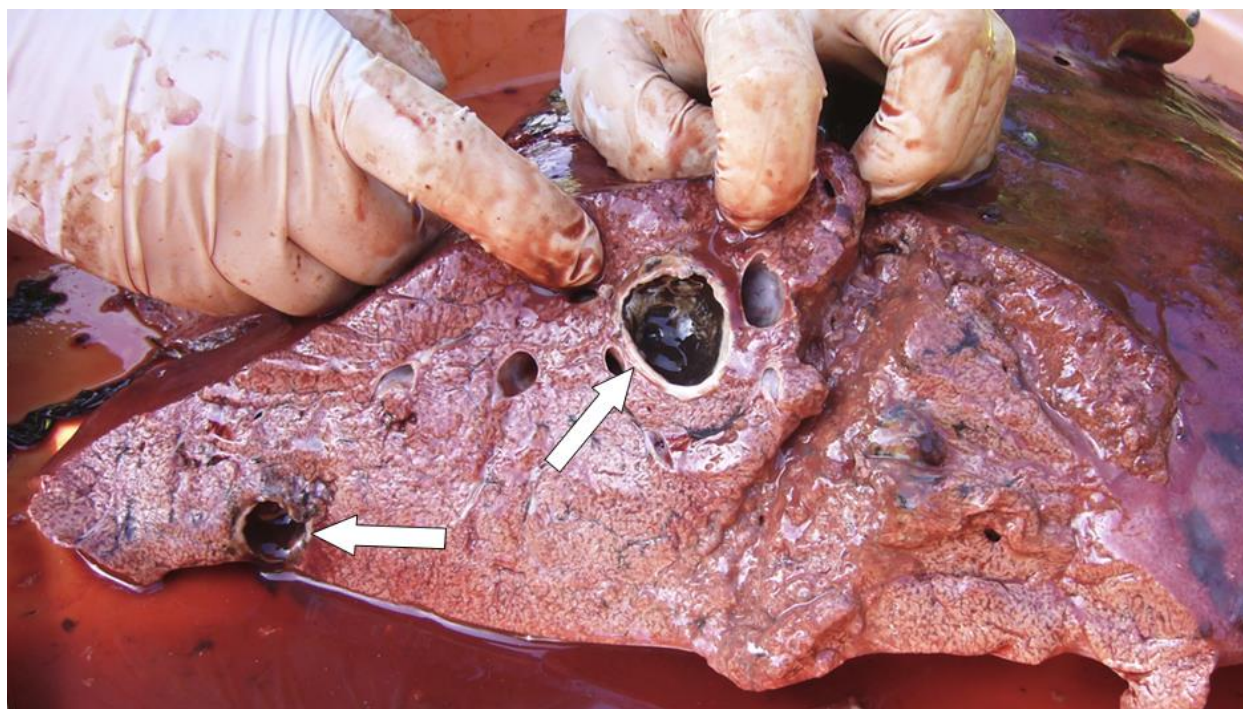
2.1.5. Definitivní hostitelé a klinický průběh fascioloidózy

Hlavním definitivním hostitelem motolice *F. magna* v původním areálu výskytu je jelenec běloocasý (Pybus, 2001). Spektrum definitivních hostitelů, které může tento parazit napadat je však mnohem širší. Podle dosud uznávané terminologie jsou rozlišovány tři skupiny definitivních hostitelů – specifictí definitivní hostitelé, nspecifictí (dead-end) hostitelé a netypictí (aberantní) hostitelé. Šíření vajíček parazita do prostředí, samotný průběh infekce a patogenní působení parazita na tyto hostitele se pak značně liší v závislosti na tom, do jaké skupiny daný hostitelský druh spadá.

Pro infekci **specifických definitivních hostitelů** je *F. magna* adaptována nejlépe. Motolice v nich dokončuje svůj vývojový cyklus, díky čemuž dochází k dalšímu šíření parazita do vnějšího prostředí. Jedná se především o druhy z čeledi jelenovitých (Cervidae). V Severní Americe jsou to jelenec běloocasý (*Odocoileus virginianus*), jelen wapiti východní (*Cervus elaphus canadensis*), sob polární (*Rangifer tarandus caribou*), jelenec černoocasý (*Odocoileus hemionus columbianus*), jelenec horský (*Odocoileus hemionus hemionus*), jelen wapiti Nelsonův (*Cervus elaphus nelsoni*) a jelen wapiti západní (*Cervus canadensis roosevelti*) (Bazsalovicsová et al., 2015; Pybus, 1990; Pybus et al., 2015).

Specifickými definitivními hostiteli této motolice v Evropě jsou především jelen lesní (*Cervus elaphus*), daněk skvrnitý (*Dama dama*) a nepůvodní jelen sika (*Cervus nippon*) (Kašný et al., 2012; Novobilský et al., 2007a; Rehbein & Visser, 2022).

Infekčních stádií parazita jsou pozřena definitivním hostitelem spolu s vegetací nebo případně s vodou a dostávají se tak do jeho trávicího traktu (Pybus, 2001; Swales, 1935). Zde dochází k uvolnění nedospělých motolic z ochranných pouzder a jejich následnému průniku přes střevní stěnu hostitele do jeho břišní dutiny a nakonec do jater (Sukhdeo & Sukhdeo, 2002). V játrech následně motolice migrují obvykle tři až šest měsíců do doby, než narazí na jednoho či více partnerů (Foreyt & Todd, 1976; Pybus, 2001). V tu chvíli jejich pohyb v jaterním parenchymu ustává a dochází k jejich ohrazení vazivovými pseudocystami s tenkou stěnou (1,00–1,75 mm), které slouží jako „pářící komůrky“ (Obr. 7) (Swales, 1935; Wolf-Spengler & Isseroff, 1983). Tyto pseudocysty jsou propojeny se žlučovody, přes které dochází k odvádění vyprodukovaných vajíček spolu se žlučí do střeva. Odtud vajíčka následně odchází s výkaly do vnějšího prostředí. Jedna dospělá motolice je pak schopna vyprodukovat až několik tisíc vajíček denně a v hostiteli může přežívat i několik let. Prepatentní období, tedy časový interval od pozření infekčních stádií parazita zvířetem, do prvního výskytu vajíček v jeho výkalech, se pohybuje v rozmezí tří až sedmi měsíců (Foreyt & Todd, 1976).



Obrázek 7.: Pseudocysty v játrech jelena lesního vzniklé v důsledku infekce jaterní motolící *F. magna*.

(Foto M. Kašný)

Infekce specifických hostitelů i relativně vysokými počty motolic probíhají obvykle bezpříznakově a nepředstavují pro zvířata závažnější riziko (Filip-Hutsch et al., 2022; Malcicka, 2015; Swales, 1935). Výjimkou může být infekce mláďat či zdravotně oslabených kusů. U některých infikovaných jedinců lze pozorovat nespecifické klinické příznaky, jako je snížení hmotnostních přírůstků, apatie, zhoršená celková tělesná kondice a kvalita paroží, zacuchaná srst, průjem, či ovlivnění reprodukčního úspěchu (Karamon et al., 2015; Malcicka, 2015; Marinculić et al., 2002; Slavica et al., 2006). Ve vzácných případech mohou masivní infekce (nad 100 motolic) vést až k úhynu zvěře.

V **nespecifických definitivních hostitelích** dospívají motolice *F. magna* velice vzácně (Malcicka, 2015; Pybus, 2001; Swales, 1935). Pokud ale dospějí, jsou v jaterním parenchymu obklopeny silnostěnnými pseudocystami (až 1 cm), které nejsou propojeny se žlučovody a vajíčka tak nemohou odcházet do vnějšího prostředí. Na rozdíl od specifických definitivních hostitelů je životní cyklus parazita přerušen a nedochází k dalšímu šíření nákazy – proto se používá pojem "dead-end" hostitel, čili ten, který je pro parazita "slepu uličkou". Byly však zaznamenány výjimečné případy, kdy při silných infekcích byla i ve výkalech nespecifických hostitelů nalezena vajíčka *F. magna* (Swales, 1935).

Příkladem nespecifických definitivních hostitelů je tur domácí (*Bos taurus*), los evropský (*Alces alces*), bizon americký (*Bison bison*), jak domácí (*Bos mutus* f. *grunniensis*) ale také prase divoké (*Sus scrofa*), ojedinele kůň domácí (*Equus caballus*) či lama krotká (*Lama glama*) (Conboy et al., 1988; Foreyt & Tood, 1972; McClanahan et al., 2005; Murray et al., 2006; Swales, 1935). Infekce u nespecifických definitivních hostitelů probíhá ve většině případů bezpříznakově. Opět se při silných infekcích může objevit snížení užitkovosti zvířete, jeho oslabení a letargie, ovlivnění plodnosti a v některých případech i úhyn (Foreyt & Todd, 1976; Loyacano et al., 2002; Murray et al., 2006).

V případě **aberantních definitivních hostitelů** je infekce charakterizována neustálou migrací juvenilních motolic v orgánech břišní a hrudní dutiny hostitele (tj. i mimo játra), což vede k masivnímu krvácení a poškození orgánů (Pybus, 2001; Swales, 1935). Nedospělé motolice se mohou dostat i do jater, ale nedospívají a tvorba pseudocyst a produkce vajíček jsou obvykle neúspěšné. Mezi aberantní hostitele patří zejména malí hospodářští přežvýkavci jako je ovce domácí (*Ovis aries*) a koza domácí (*Capra hircus*), ale také volně žijící ovce tlustorohá (*Ovis canadensis*) či muflon (*Ovis aries musimon*) (Mathieu et al., 2022; Pybus, 2001; Stiles et al., 2021). Tito hostitelé jsou velmi citliví k infekci *F. magna*, v naprosté většině

případů končí jejich smrtí a to i při velice nízkých intenzitách infekce. Napadená zvířata obvykle hynou v rozmezí 4–6 měsíců po infekci, v důsledku mnohočetného selhání orgánů. Tyto fatální důsledky jsou jen ojediněle spojeny s celkovou apatií a nechutenstvím nebo se klinické příznaky nemusí vyskytovat vůbec (Foreyt, 1996; Foreyt & Todd, 1976; Swales, 1935).

Názory na význam srnce obecného se v životním cyklu motolice *F. magna* v poslední době změnily. Původně byl považován za aberantního hostitele, protože se zaznamenané infekce *F. magna* vyznačovaly těžkým a často fatálním průběhem, bez nálezu pseudocyst a vajíček motolic. Nicméně nyní jsou čím dál častěji popisovány případy, které naznačují možný počátek adaptačních procesů u srncí zvěře. V jejich játrech jsou čím dál častěji nacházeny pseudocysty a je potvrzována produkce vajíček dospělými motolicemi i jejich vylučování hostitelem do vnějšího prostředí (Demiaszkiewicz et al., 2015; Filip-Hutsch et al., 2022; Halasz et al., 2023; Houszka et al., 2016; Konjević et al., 2021). Avšak ve srovnání s jinými zástupci jelenovitých jsou zatím počty dospělých motolic nacházených u srncí zvěře výrazně nižší. Podobný nález tenkostěnné pseudocysty byl popsán například i u prasete divokého v Chorvatsku (Konjević et al., 2017). Výsledkem těchto neustále probíhajících koevolučních procesů mezi parazitem a hostitelem je postupná optimalizace virulence parazita a zmírnění patologického projevu fascioloidózy. Z akutní formy vedoucí k úhynu přechází toto onemocnění na chronickou formu, která umožňuje přežívání většiny infikovaných jedinců v hostitelských populacích. Lze tedy očekávat, že postupem času i další druhy obratlovčích hostitelů začnou přispívat k udržování a šíření tohoto invazního parazita.

2.1.6. Patologické změny

Patologické změny vzniklé u definitivních hostitelů v důsledku fascioloidózy souvisí s konkrétním typem definitivního hostitele (jak již bylo popsáno výše), s infekční dávkou, se samotným druhem hostitele, jeho stářím a jeho celkovým zdravotním stavem (Foreyt & Todd, 1976; Pybus, 2001; Rehbein et al., 2021).

Unikátním znakem motolice *F. magna* je tvorba černého pigmentu, který tvoří viditelné lineární skvrny rozmístěné v náhodných ložiscích na povrchu i uvnitř orgánů břišní a hrudní dutiny, nejčastěji na játrech, plicích a mízních uzlinách, popřípadě v dalších migračních cestách motolic (Karamon et al., 2015; Pybus, 2001; Swales, 1935). Tmavé zbarvení je způsobeno

pigmentem hematinem, který vzniká jako vedlejší produkt při trávení krve hostitele (Blažek & Gilka, 1970; Campbell, 1960).

U specifických, popřípadě i u nespecifických, definitivních hostitelů je typickým znakem zvětšení jater v důsledku přítomnosti vazivových pseudocyst, které dosahují velikosti až 10 cm (Swales, 1935). Tyto útvary jsou často viditelně vystouplé na povrchu jater a vyplňují je živá či rozložená těla motolic, vajíčka a typická tmavě zelená slizovitá tekutina tvořená žlučí a degradovanou krví. Jaterní tkáň v okolí pseudocyst atrofuje kvůli zvyšujícímu se tlaku, kterým na ni tyto útvary působí během jejich růstu. Život hostitele může ohrozit dokonce i úplné roztržení jaterního parenchymu pseudocystami (Pursglove et al., 1977).

Na povrchu infikovaných jater obvykle bývá na první pohled viditelný zánět jaterního pouzdra (tzv. perihepatitis villosa). Fasciolidóza způsobuje úbytek funkční jaterní tkáně, kdy je poškozená tkáň nahrazována pojivovou tkání, která je nahromaděná nejčastěji kolem pseudocyst a v okolí cév procházejících uvnitř i na povrchu jater (tzv. fibróza). Častým znakem je také zbytnění slizničního epitelu ve žlučovodech. V jaterní tkáni jsou přítomna oválná nažloutlá vajíčka s víčky, jejichž nadměrná produkce motolicemi může zcela zablokovat žlučovody a omezit jejich funkci. V případě chronických infekcí mohou být tuhou pojivovou tkání prostoupena úplně celá játra (tzv. cirhóza) a může dojít i ke kalcifikaci pseudocyst.

Nicméně největší patologické změny způsobují bez pochyby nedospělé motolice při své migraci břišní dutinou a jaterní tkání hostitele, které způsobuje mechanické poškození vnitřních orgánů. Jak již bylo zmíněno, mimo játra se mohou nedospělé motolice pohybovat i v jiných tělních orgánech, a to především u aberantních definitivních hostitelů. Zasaženými orgány může být například mozek, plíce, ledviny či slezina. Motolice *F. magna* byla nalezena i v potracených plodech zvířat, což potvrzuje přenos infekce do dělohy samice během její březosti (Pecoraro et al., 2022). V místech migračních drah parazita dochází k silným krvácením (hemoragiím), tvorbě krevních sraženin, nekrotickým tkání, které vedou k akutní i chronické zánětlivé reakci (Obr. 8). Dochází tak k nevratnému poškození a k postupnému selhání funkce jednotlivých orgánů.



Obrázek 8.: Akutní fáze infekce u srnce obecného způsobená jaterní motolicí *F. magna*. Na řezu jater jsou viditelné rozsáhlé hemoragie způsobené migrací motolic. (Konjević et al., 2021)

2.1.7. Léčba a prevence

Tlumení fasciolidózy je u hospodářských zvířat, či u zvěře v intenzivních chovech (obory, farmové chovy) mnohem účinnější, než u volně žijící zvěře. Je tomu tak proto, že léčbu i zavedení preventivních opatření lze mnohem lépe řídit na vymezených plochách a je možná i jistá manipulace se zvířaty. K léčbě fasciolidózy se u hospodářských přežvýkavců (skot, ovce, koza) využívají anthelmintika podávaná kontaktně – perorální cestou nebo injekčně, zvěři se v naprosté většině případů předkládá medikovaná krmná směs s anthelmintiky (Foreyt, 1988; Foreyt & Todd, 1974; Novobilský & Koudela, 2005; Reiss, 2021). Každému terapeutickému zásahu by mělo vždy předcházet vyšetření zvířat (koprologické vyšetření nebo pitva jater) pro ověření přítomnosti motolice *F. magna* a zjištění aktuálního parazitárního zatížení. Důležitou roli hraje také management chovu (ustájení zvířat, střídání pastvin, četnost pobytu zvířat na pastvinách, zoohygienické podmínky), věková skladba zvířat, zaměření chovu apod (Pybus, 2001).

Léčba fasciolidózy u zvěře pohybující se ve volnosti je značně komplikovaná, obtížná a z pohledu mnoha odborníků i značně kontroverzní. Je založena na aplikaci anthelmintik

do krmných směsí při příkrmování zvěře především v zimních měsících, kdy má zvěř omezený přístup k jiným zdrojům potravy (Majoros & Sztojkov, 1994; Novobilský & Koudela, 2005; Pybus, 2001). Aplikaci medikované krmné směsi by měla vždy předcházet návyková fáze, při níž se trávicí trakt zvěře připraví na intenzivní příjem jaderného krmiva v krátkém čase. Sníží se tak případné zdravotní problémy spojené s přesycením zvěře krmivem bohatým na sacharidy. Největší komplikací však zůstává dosažení doporučené terapeutické dávky léčiva u všech jedinců tak, aby byl zaručen úspěch anthelmitického zásahu. Léčivo je možné například míchat s krmnou solí, aby se zabránilo předávkování dominantních samců a dostalo se i na ostatní zvířata (Janicki et al., 2005; Slavica et al., 2006). Nicméně z mnoha pokusů o léčbu divokých přežvýkavců, kdy některé trvaly i několik let (např. léčebná kampaň zvěře triklabendazolem v Rakousku), plyne, že se tímto přístupem nedaří dosáhnout velké úspěšnosti v tlumení výskytu motolice *F. magna* (Haider et al., 2012; Konjević et al., 2018; Qureshi et al., 1994; Reiss, 2021; Slavica et al., 2006). Je potom na zvážení, zda je žádoucí anthelmintika používat jen k dočasnému a částečnému potlačení infekce a zároveň zaplavovat rezidui léčiv těla zvěře i prostředí.

Pro léčbu fascioloidózy bylo v průběhu mnoha let testováno a používáno několik různých chemických látek z několika tříd anthelmintik (Novobilský & Koudela, 2005). Za účinnou látku s nejlepšími výsledky je považován triklabendazol (benzimidazol), který je účinný proti larválním stádiím i dospělým jedincům motolice *F. magna* (Foreyt & Todd, 1976; Konjević et al., 2018; Qureshi et al., 1989). Narušuje u nich proces tvorby mikrotubulů a tím znemožňuje základní biologické procesy, jako je například příjem živin. S touto látkou je v ČR v současnosti registrován pouze jediný přípravek – Triclaben, který je registrován pro skot. Příkladem další látky je rafxanid (salicylanilidy), který je rovněž vysoce účinný při léčbě volně žijících i hospodářských přežvýkavců (Foreyt & Todd, 1974; Novobilský & Koudela, 2005; Rajský et al., 2002). Mechanismus působení salicylanilidů spočívá v narušení procesu oxidativní fosforylace, který vede k spastické paralýze motolic. Rafxanid v kombinaci s mebendazolem obsahuje přípravek Rafendazol premix, který je druhým, a zároveň posledním, léčivem registrovaným v ČR. Je také jediným léčivem určeným pro perorální podání divokým přežvýkavcům, jako je jelen, srnec, daněk, muflon a kamzík. Zároveň se v posledních letech kvůli nesprávnému používání anthelmintik (preventivní plošné aplikace, špatné dávkování) může začít v populacích motolic *F. magna* šířit rezistence vůči těmto léčivům, které tak přestanou dosahovat požadovaných účinků (Fairweather & Boray,

1999; Prchal et al., 2016). Vývoj nových látek pro léčbu fascioloidózy, ale i ostatním parazitózám veterinárního významu, nemá v dnešní době velkou důležitost a spíše stagnuje.

Z tohoto důvodu hrají významnou úlohu preventivní opatření. Jedním z nich by mohla být vakcinace, a to zejména u oborních a farmových chovů zvířete, ale i u hospodářských přežvýkavců (Cwiklinski et al., 2023; Zafra et al., 2021). Dosud však není na trhu dostupná žádná vakcína proti jaterním motolicím, a proto se musí přistupovat k jiným alternativám.

Vzhledem k tomu, že vývoj motolice *F. magna* je úzce spjat s vodním prostředím, je účinné provádět odvodňování a vysoušení kontaminovaných pastvin, oplocování mokřadů či pravidelné kosení nebo pálení vegetace kolem potoků a vodních zdrojů (Novobilský & Koudela, 2005; Trailović et al., 2016). Případně je doporučováno se zcela vyhnout využívání těchto ploch minimálně v nejrizikovějších obdobích roku. Výsledkem je změna abiotických podmínek nezbytných pro přežití vodních plžů i pro larvální vývoj motolic. Nedochozí tak k rozmnožování parazita v mezihostitelích, ale je také omezen vývoj miracidíí i přežívání infekčních metacerkárií na vegetaci. Z praktického hlediska je většinou nereálné dodržovat tyto podmínky, zvláště kvůli aktuální potřebě pro zadržování vody v krajině. Vhodné podmínky pro plže a s tím související šíření motolic tak bývá spíše ještě umocňováno díky extenzivní zemědělské činnosti a krajinnému hospodaření s vodou (Grabner et al., 2014). Dochází k umělému vytváření zavlažovacích kanálů a vodních zdrojů se stojatou vodou (nádrže, přehrady, vodní elektrárny apod.), v nichž se právě i díky zemědělskému znečištění hnojivy plžům, kteří slouží jako mezihostitelé motolic, velice daří. Příkladem je výstavba soustavy vodních děl Gabčíkovo – Nagymaros na Dunaji, po které se toto místo stalo nejvíce promořenou oblastí motolicí *F. magna* (Králová-Hromadová et al., 2011).

Mimo odvodňování byly testovány i další přístupy směřující k eliminaci plžů. Biologické metody zahrnovaly vysazování jejich přirozených predátorů, například kachen a hus, nebo zavádění konkurenceschopných druhů plžů (např. zástupci zemounek lesklý – *Zonitoides nitidus* a skelnatka západní – *Oxychilus draparnaudi*) do ohnisek výskytu motolic (Ndlela & Chimbari, 2000; Rondelaud et al., 2006b). Používání moluskocidů (chemických látek hubících plže) je v současnosti spíše zavržováno. I přes to, že jejich aplikace dosahuje vysoké účinnosti, je tento přístup značně finančně náročný a zároveň existuje vysoké riziko poškození přírodního prostředí (Crossland, 1976; Swales, 1935). Přípustnou alternativou by mohlo být používání moluskocidů na bázi přírodních rostlinných extraktů (Hammami et al., 2011; Mezghani-Jarraya et al., 2009).

V případě uzavřených obor a chovů lze předcházet zavlečení nákazy *F. magna* důkladnou veterinární kontrolou zahrnující mimo jiné opakované vyšetření výkalů a případné odčervení všech transportovaných jedinců (Majoros & Sztojkov, 1994; Sargison et al., 2019; Slavica et al., 2006). Zároveň je vhodné dodržovat minimálně třicetidenní karanténu těchto zvířat před jejich zařazením do základního stáda. Tento postup je obzvláště důležitý v oblastech, kde je znám výskyt motolic rezistentních na léčiva.

Co se týká prevence u volně žijících druhů zvěře, je situace značně složitá (Konjević et al., 2018; Majoros & Sztojkov, 1994; Novobilský & Koudela, 2005). Odvodňování, oplocování či regulace vegetace kolem potoků a vodních zdrojů nejsou ve volně přístupných lesních i nelesních biotopech proveditelné. Zároveň jsou tato opatření poněkud kontroverzní kvůli možným negativním dopadům na faunu i flóru. Stejně tak eliminace plžů není v rozsáhlých areálech představitelná. Snížit riziko nákazy zvěře by pomohly změny v managementu předkládání krmiv, například přemístěním krmných míst do větší vzdálenosti od břehů a zaplavovaných luk (Reiss, 2021). Důležitým preventivním krokem je také regulace hustoty a věkové struktury zvěře lovem. Je prokázáno, že šíření parazita bývá rychlejší v populacích s vyššími počty jedinců, mezi kterými se nákaza snadněji kumuluje a přenáší (Konjević et al., 2021). Epizootologicky důležitou roli hrají také nemocná a slabá zvířata, která významně přispívají ke kontaminaci prostředí a měla by být ze stáda co nejdříve odstraněna (Reiss, 2021). Z tohoto pohledu mohou hrát významnou roli i přirození predátoři divokých přežvýkavců. Pozitivní efekt tak může mít návrat velkých šelem do naší krajiny, jako například vlka.

V neposlední řadě k základním preventivním opatřením patří také pravidelný monitoring výskytu motolice *F. magna*, především v populacích volně žijících přežvýkavců, kteří mají schopnost kontaminovat prostředí vajíčky parazita (Janicki et al., 2005; Juhász & Stothard, 2023; Slavica et al., 2006). Je žádoucí dlouhodobě a celoplošně vyšetřovat vzorky výkalů a jater zvěře, což poskytne důležité informace o výskytu tohoto parazita a jeho šíření v průběhu času.

2.2. Diagnostické metody – postmortální

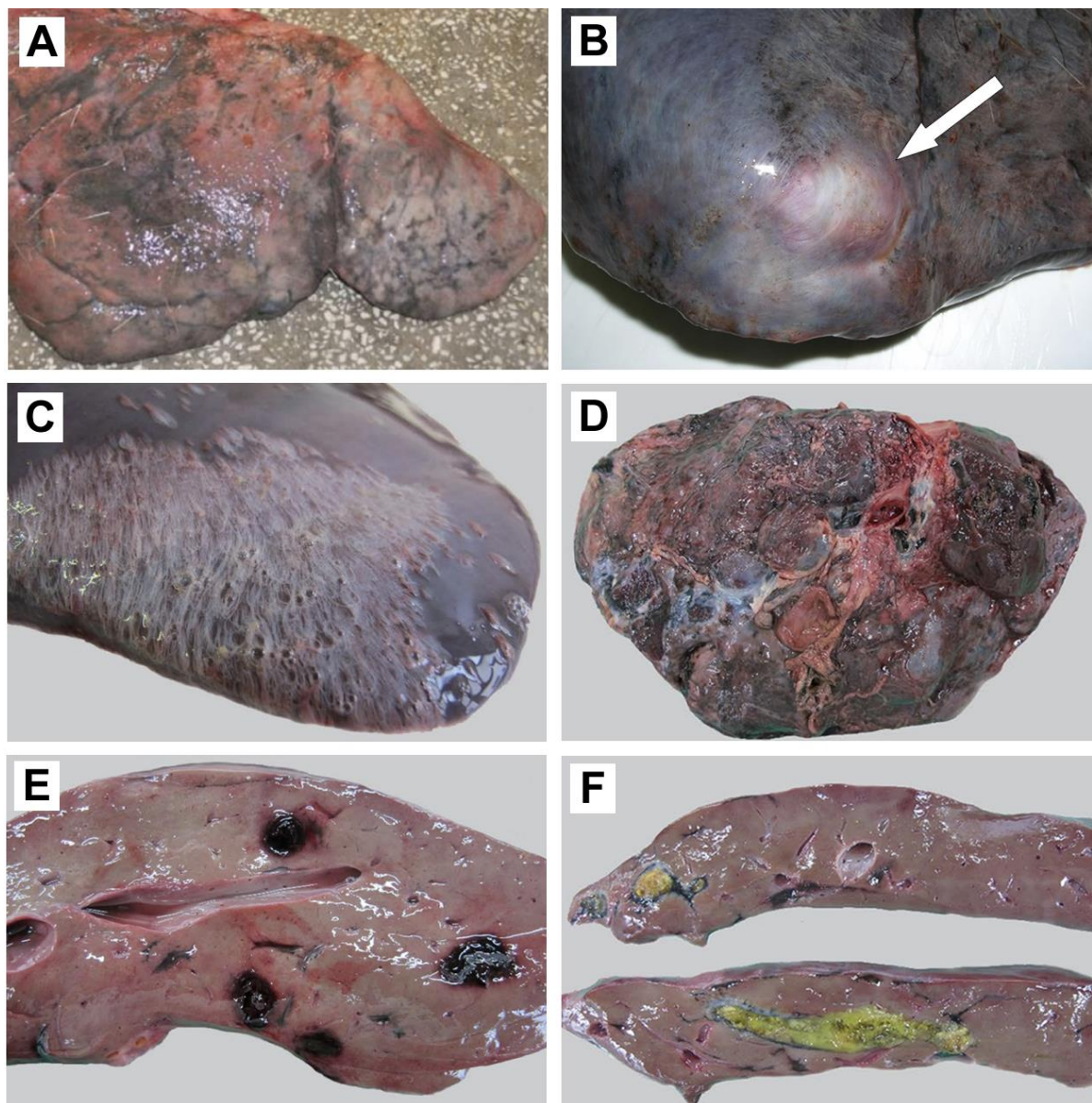
Pro detekci a případnou kvantifikaci nákaz vyvolaných invazní motolicí *F. magna* u definitivních hostitelů je využíváno hned několik základních přístupů. Mezi postmortální vyšetření se řadí především parazitologická pitva uhynulých či ulovených zvířat, která může být doplněna histologickým vyšetřením postižené tkáně nebo mikroskopickým průkazem vajíček parazita v tkáních infikovaných zvířat.

2.2.1. Parazitologická pitva

Základem postmortální diagnostiky je parazitologická pitva, která je nejdéle používanou a nejspolehlivější metodou pro zachycení infekce *F. magna*. Proto není překvapením, že se o ni opírá většina doposud provedených studií (Bazsalovicsová et al., 2016; Novobilský et al., 2007a; Pybus et al., 2015; Rehbein et al., 2021; Stiles et al., 2021). Parazitologická pitva umožňuje jako jediná z metod odhalit reálné zatížení vyšetřovaného jedince parazity (tzv. intenzitu infekce), zjistit jejich lokalizaci a stanovit patologické změny vyvolané parazitací. Pitvu lze zaměřit na všechny orgány a tkáně hostitele, avšak v případě nákazy motolicí *F. magna* jsou hlavním vyšetřovaným orgánem játra.

Je doporučeno, aby byla játra z uhynulých či ulovených zvířat odebrána a ihned převezena do laboratoře k okamžitému vyšetření. V určitých případech lze játra zamrazit na -20 °C do jejich dalšího zpracování, ale je nutné mít na paměti, že mrazem dochází k narušení a pozměnění jaterní tkáně i vývojových stádií parazita, což může značně ovlivnit či úplně znemožnit následná doplňující vyšetření.

V prvním kroku parazitologické pitvy se přistupuje k makroskopickému vyšetření jater, kdy je sledován jejich povrch, tvar, velikost a zbarvení. Jak již bylo zmíněno, infekce *F. magna* se ve většině případů vyznačuje viditelnými tmavými pigmentovými skvrnami, které na povrchu jater tvoří nepravidelné a různě velké okrsky nebo linie o šířce 1,5–2,0 cm (Obr. 9A). Dále mohou být na povrchu jater patrné vystouplé nažloutlé boule o průměrné velikosti zhruba 5 cm, které vytvářejí pseudocysty (Obr. 9B). Kvůli jejich přítomnosti mohou být silně infikovaná játra i třikrát větší než játra neinfikovaného jedince. U mnoha jater pozitivních na *F. magna* bývá přítomný lehký až těžký zánět jaterního pouzdra (Obr. 9C). V chronických případech mohou být celá játra prostoupena tuhou pojivovou tkání a částečně zmenšena (Obr. 9D).



Obrázek 9.: A) Černě pigmentované migrační cesty motolic *F. magna* viditelné na povrchu jater; B) Prosvítající pseudocysta obklopená pojivovou tkání; C) Zánět jaterního pouzdra; D) Zmenšená a značně poškozená cirhotická játra s mnoha pseudocystami; E) Mnohočetné migrační cesty motolic vyplněné sraženou krví; F) Migrační cesty motolic vyplněné nažloutlou hmotou.

(Filip-Hutsch et al., 2022; Karamon et al., 2015; Sommer et al., 2022; upraveno)

V druhém kroku je skalpelem či nožem provedena incize orgánu na zhruba 0,5–2,0 cm silné plátky, aby bylo možné odhalit případnou přítomnost motolic i hlouběji v tkáni. Při akutní fázi infekce jsou viditelné jednotlivé migrační cesty motolic, které jsou vyplněny čerstvou krví a rozrušenou jaterní tkání (Obr. 9E). V jaterním parenchymu mohou být přímo nacházeny migrující nedospělé motolice o velikosti do 4 cm. Na průřezech jater bývají také patrná ložiska černého pigmentu různých velikostí. V chronické fázi infekce

je v jaterním parenchymu nacházena bělavá vláknitá pojivová tkáň především kolem pseudocyst a v okolí cév (Obr. 7). Uvnitř pseudocyst kulovitě až oválného průřezu, které se mohou nacházet i hlouběji v jaterní tkáni, bývá přítomna jedna i více motolic obklopených tmavou tekutinou s vajíčky (Obr. 7). V některých případech (např. po degradaci motolic v souvislosti s léčbou) mohou být migrační cesty i pseudocysty vyplněny nažloutlým materiálem tekuté, pastovité až tuhé drobné konzistence (Obr. 9F).

Pokud jsou v průběhu pitvy nalezeny motolice, je nutné je izolovat, spočítat a určit podle morfologických charakteristik. Pro komplexní zhodnocení parazitárního zatížení u vyšetřovaného jedince se používá počet nalezených jaterních motolic (dospělá i juvenilní stádia). Interpretaci výsledků parazitologické pitvy je potřeba provádět s ohledem na druh zvíře, jeho věk, celkový zdravotní stav, či zjištěné patologie. Za silnou infekci můžeme například považovat nález více než 100 dospělců *F. magna* u jelena lesního (Bazsalovicsová et al., 2016), nicméně u muflona může být smrtelná přítomnost i jedné juvenilní motolice (Stiles et al., 2021). Izolované motolice zbavené nečistot je pak možné převést do fixačního roztoku nebo 70% ethanolu, v nichž se uchovávají pro pozdější morfologickou či molekulární determinaci.

Nevýhodou parazitologické pitvy je její pracnost, značná časová náročnost a nutná smrt vyšetřovaného jedince. Významnou chybou také bývá předběžná selekce jater nesoucí pouze viditelné makroskopické změny (Sommer et al., 2022). V důsledku toho mohou být generovány falešně negativní výsledky v případech časných infekcí, kdy v prvních 15 týdnech po napadení hostitele dosahují nedospělé motolice velikost menší než 1 cm (Foreyt & Todd, 1976). Drobné změny, které způsobují v jaterní tkáni tak mohou být v terénu snadno přehlédnuty, v důsledku čehož pak dochází ke zkreslování dat. Pro získání spolehlivých údajů o výskytu *F. magna* je doporučováno současné využití i dalších diagnostických metod.

2.2.2. Histopatologické vyšetření

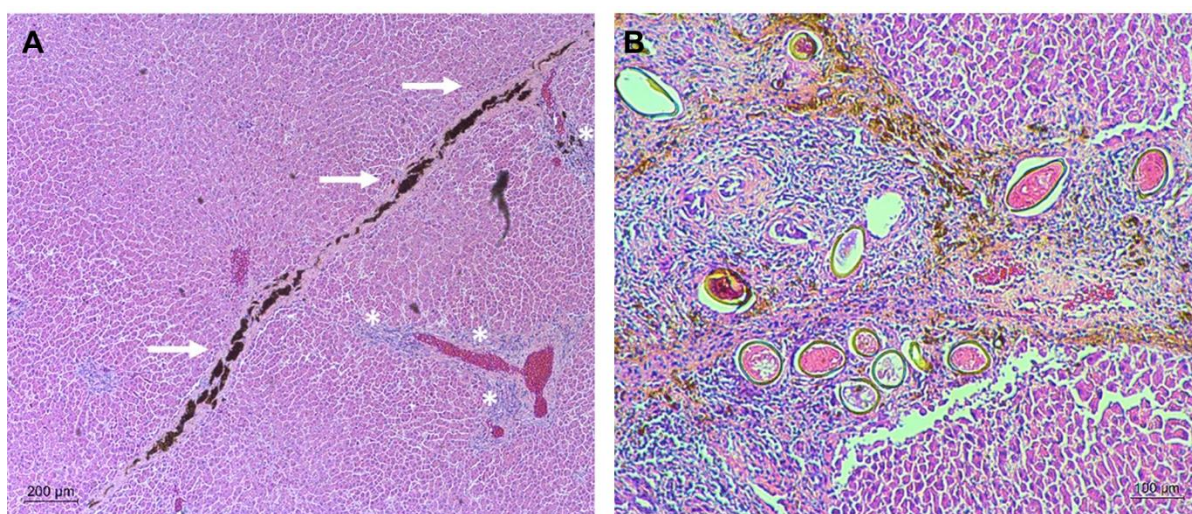
Histopatologické vyšetření jaterní tkáně je cennou doplňující diagnostickou metodou pro ověření infekce motolicí *F. magna* (Filip-Hutsch et al., 2022; Pecoraro et al., 2022; Sommer et al., 2022). Využívá se v případech, kdy v jaterní tkáni nejsou zaznamenány žádné makroskopické patologické změny specifické pro *F. magna* nebo žádná vývojová stádia motolic.

Standardního protokol pro řezání tkáně zalité do parafinových bloků je následující (Fischer et al., 2008c). Kousky změněné jaterní tkáně (maximální šířka 0,2 cm; délka a výška do 2,0 cm) jsou v co možná nejkratším možném čase po pitvě fixovány při pokojové teplotě v dostatečném množství fixačního činidla (např. v 10% neutrálním pufrovaném formalínu) po dobu až 24 hod. Následuje odvodnění vzorku vzestupnou řadou ethanolu (koncentrace od 70% do 100%), kdy každá lázeň alkoholu trvá minimálně 1 hod. Dále je vzorek tkáně projasňován xylenem (1 hod) a převeden do rozpuštěného parafinu. Prosycování vzorku parafinem probíhá v termostatu při 58 až 60 °C ve třech opakováních po dobu 1 hod. Prosycený vzorek je zalit parafinem v zalévací formě a ponechán tuhnout při pokojové teplotě. Pomocí mikrotomu jsou ze ztuhlého parafinového bločku zhotoveny řezy o tloušťce 4 µm, které jsou napínány a vyrovnávány na hladině teplé vody, ze které jsou následně opatrně přeneseny na podložní sklička (Fischer et al., 2008a). Ta jsou dána do termostatu při 60 °C, aby došlo k odpaření vody a přilnutí řezů. Z takto připravených řezů je nejprve nutné odstranit parafin, což se provádí omytím v xylenu a k zavodnění vzorku sestupnou ethanolovou řadou (koncentrace od 100% do 70%), kdy každý krok trvá zhruba 5 minut. Na závěr jsou řezy přeneseny do vody.

Většina struktur živočišných tkání je bezbarvá. Aby je bylo možné rozlišit, musí se obvykle obarvit. Mezi nejpoužívanější přehledné histologické barvení patří barvení hematoxylinem a eosinem (HE) (Fischer et al., 2008b). Jádra buněk získávají pomocí tohoto barviva modro-fialové zbarvení, cytoplazma a kolagenní vlákna se barví růžově, svalová tkáň červeně, chrupavky a mukoidní substance mají světle modré zbarvení. Barvení probíhá následovně. Hydratované řezy tkání na podložních sklíčkách jsou omývány po dobu 30 sec ve vodě. Po této proceduře jsou barveny v Coplinově barvicí nádobce roztokem hematoxylinu po dobu 30 sec, následuje vymývání barviva vodou po dobu 1 min. Podle intenzity zbarvení je možné kroky barvení či vymývání opakovat. Dalším krokem je barvení eosinem trvajícím 10 až 30 sec. Následuje odvodnění řezu v 95% a 100% ethanolu, kdy je každý krok opakován dvakrát po dobu 30 sec, a prosvětlení xylenem (opět dvě opakování). Proces končí nanesením montovacího média (např. kanadského balzámu) a uzavřením preparátu krycím sklíčkem. Takto připravené preparáty jsou mikroskopicky vyšetřeny pomocí světelného mikroskopu a případné morfologické změny jsou fotograficky zaznamenány.

V jaterní tkáni napadené motolicemi druhu *F. magna* bývá v porovnání se zdravou tkání pozorováno několik charakteristických morfologických změn, jejich závažnost se liší v závislosti na intenzitě infekce. V různé míře dochází k mechanickému poškození struktury

jaterního parenchymu migrujícími motolicemi a porušení jeho funkce. V migračních cestách motolic je patrná fibróza (tj. různě široké pruhy vazivové tkáně) nacházející se zejména v blízkosti žlučových a cév a černý pigment hematin (Obr. 10A). V některých případech bývá popisována hyperplazie žlučových. V parenchymu jsou často přítomna různě velká nekrotická ložiska. Při poškození cév dochází ke krvácení, případně mohou být v blízkosti migračních kanálů pozorovány krevní sraženiny. V místech poškození dochází k zánětlivým reakcím spojeným s infiltrací zánětlivých buněk – lymfocytů, plazmocytů a tkáňových makrofágů. Kromě toho mohou být v jaterní tkáni v různém množství pozorovány žluto hnědé oválné struktury, naznačující přítomnost vajíček motolic (Obr. 10B).



Obrázek 10.: A) Jaterní parenchym s migrační cestou *F. magna* s hematinem obklopeným fibrózou (označeno bílými šipkami) a zánětlivé reakce (označeny bílými hvězdičkami); barvení HE; zvětšení 50×;

B) Řezy vajíčky motolic přítomnými v jaterní tkáni, která jsou obklopena ložisky hematinu;

barvení HE; zvětšení 200×. (Sommer et al., 2022; upraveno).

2.2.3. Oplach jater

Další doplňující metodou k potvrzení stanovené diagnózy je oplach jater (Filip-Hutsch et al., 2022; Sommer et al., 2022). Využívá se ho zejména u chronických infekcí, kdy jsou těla motolic již rozložena. Nařezané kusy jater se ponoří na 12–24 hodin do odstáté kohoutkové vody, ve které se důkladně promyjí a opláchnou tak, aby se vajíčka motolic uvolnila z jaterní tkáně a žlučových. Následně se voda použitá k oplachu nechá několik minut stát, aby mohla vajíčka sedimentovat. Tekutina se opatrně odsaje a sediment se znovu promíchá s vodou. Krok promývání a sedimentace vzorku se může několikrát opakovat, dokud nejsou odstraněny přebytečné nečistoty. Poté je sediment vyšetřen na přítomnost vajíček *F. magna* pomocí

světelného mikroskopu. Celý postup probíhá obdobně jako při sedimentační metodě popsané v kapitole 2.3.1. Koprologie.

2.3. Diagnostické metody – intravitální

Intravitální diagnostické metody umožňují získat přehled o parazitech (nejčastěji o jejich dospělých stádiích produkujících vajíčka) v hostiteli, aniž by muselo dojít k usmrcení či uhynutí vyšetřovaného jedince. Zároveň je možné více, či méně přesně odhadnout intenzitu infekce, kterou tito paraziti vyvolávají. Kromě monitoringu se k této strategii vyšetření přistupuje v případech, kdy je vhodné zvířata diagnostikovat opakovaně. Jedná se například o ověření účinnosti léčby, kdy se zjišťuje redukce počtu vajíček po aplikaci léčiva nebo v rámci preventivních opatření proti zavlečení parazitů (hlavně těch invazních) společně se zvěří při jejich přesunech na nová místa.

2.3.1. Koprologie

V oboru parazitologie je zlatým standardem intravitální diagnostiky koprologické vyšetření výkalů hostitele (Kaufmann, 1996). Tento jednoduchý, finančně nenáročný přístup s minimálními požadavky na speciální vybavení je využíván jak v humánní, tak i ve veterinární medicíně. Jedná se o soubor několika koncentračních metod a jejich modifikací, kterými je na základě mikroskopického pozorování možné prokázat přítomnost parazitických vývojových stádií ve vzorku výkalu vyšetřovaného jedince.

Nejčastěji jsou využívány k celkovému parazitologickému vyšetření výkalů na přítomnost parazitárních útvarů, včetně vajíček motolic, využívány **flotační metody** (Kaufmann, 1996). Ty jsou založené na nasycených roztocích solí či sacharidů o vyšší hustotě (např. chlorid sodný, sacharóza, glukóza, síran zinečnatý, dusičnan sodný nebo jejich kombinace), než mají vajíčka parazitů. Ta se v důsledku fyzikálního principu koncentrují na hladině flotačního roztoku. Po odebrání tekutiny z hladiny v ní lze následně parazity detekovat pod mikroskopem. Avšak vajíčka většiny motolic jsou velká a těžká a je proto nutné volit flotační roztoky s poměrně vysokou hustotou (nad 1,3 g/cm³) (Cringoli et al., 2006; Rinaldi et al., 2015). Pro účely následné mikroskopické a molekulární determinace jsou flotační metody spíše nevhodné vzhledem k časté deformaci vajíček v důsledku vysokého osmotického tlaku či inhibice molekulární reakce flotačním roztokem.

K záchytu vajíček motolic se používají především **sedimentační metody** (Boray & Pearson, 1960; Kaufmann, 1996; Thienpont et al., 2003). Tyto metody využívají gravitace k tomu, aby se těžká vajíčka motolic koncentrovala, tj. sedimentovala, na dně nádoby. Základní protokol je poměrně jednoduchý. Vzorek výkalu o velikosti vlašského ořechu (tj. optimálně 5 g) je důkladně rozmělněn v odstáté kohoutkové vodě. V dalším kroku se vše přecedí přes čajové sítko, gázu nebo jiný síťovaný materiál, čímž se od vajíček oddělí hrubé nečistoty. Suspenze se nechá přibližně 10 minut stát, aby mohla vajíčka sedimentovat. Následně se supernatant opatrně odsaje a sediment se znovu promíchá s vodou. Krok promývání a sedimentace vzorku se může několikrát opakovat. Po finálním promytí je možné sediment obarvit přidáním jedné kapky 1% roztoku methylenové modři, která zbarví částice výkalů modře, zatímco vajíčka motolic si zachovávají svoji žlutavou až oranžovohnědou barvu. Sediment se následně přenesení do počítací komůrky nebo na Petriho misku a zkoumá se pomocí světelného mikroskopu při minimálně dvacetinásobném zvětšení. Pozitivní nález vajíček motolic je možné vyfotografovat a morfometricky vyhodnotit pomocí odpovídajícího programu. Jelikož není nezbytné používat v průběhu sedimentační metody žádné chemické látky, lze sediment uchovat při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další molekulární analýzy.

Výsledkem koprologického vyšetření je kvalitativní průkaz motolic či kvantitativní stanovení počtu jejich vajíček v jednom gramu výkalů (EPG, z angl. Eggs Per Gram), ke kterému lze využít počítací komůrku umožňující snadnější sčítání vajíček (Obr. 11). Hodnotu EPG je možné následně vypočítat na základě vstupní hmotnosti výkalů, objemu počítací komůrky a zjištěného počtu vajíček.



Obrázek 11.: Počítací komůrka s vyznačenou sítí umožňující snazší sčítání vajíček. (Foto J. Vadlejch)

Transport a uchovávání koprologických vzorků určených pro diagnostiku motolic nevyžaduje žádné náročné podmínky. Pokud není možné okamžité vyšetření, je vhodné uložit výkaly do lednice při teplotě 4 až 8 °C. Vajíčka motolic zůstávají v chladu životaschopná a neporušená i několik let (Boray, 1969), pokud nedojde k jejich vyschnutí či zplsnivění. Pro delší dobu uchování je možné výkaly fixovat (např. ve 4% roztoku formaldehydu), což ale může mít vliv na následné molekulární analýzy.

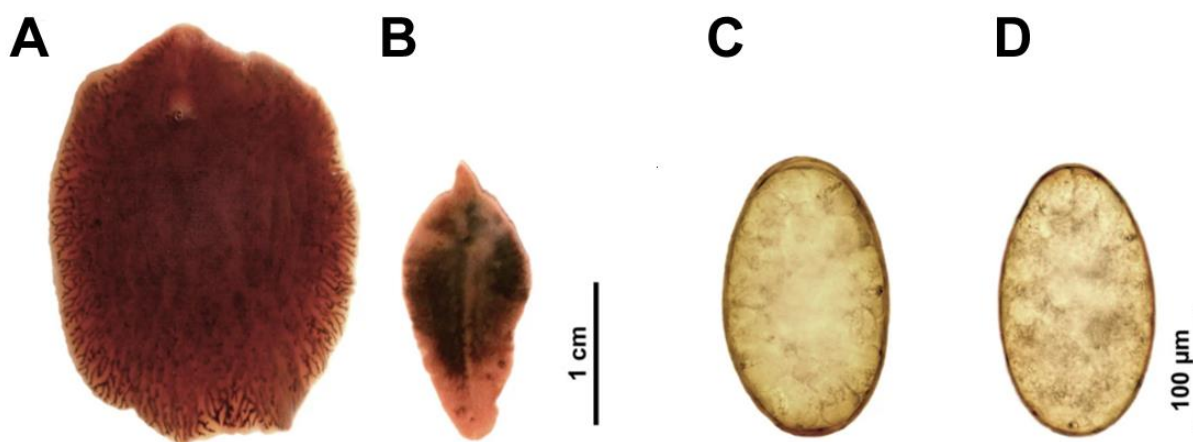
Proces sedimentace a prohlížení celého sedimentu pod mikroskopem je poměrně pracný a časově náročný. Odlišení různých vývojových stádií parazita ztěžuje přítomnost artefaktů, jako jsou chlupy, rostlinné buňky, pylová a škrobová zrna, svalová vlákna, vzduchové bubliny, spory hub, vývojová stadia roztočů či volně žijících hlístic, která se také mohou v sedimentu nacházet. Je tedy zřejmé, že samotná mikroskopická identifikace vyžaduje jisté odborné zkušenosti.

Mimo to je vyšetřování vzorků výkalů na přítomnost *F. magna* spojeno s několika omezeními, na které je nutno brát zřetel. Vajíčka motolice lze detekovat ve výkalech specifických definitivních hostitelů pouze v patentní fázi infekce (Foreyt & Todd, 1976; Pybus, 2001). Jedná se o období, kdy jsou v hostiteli přítomny dospělé motolice, které do trávicího traktu, respektive výkalů hostitele, produkují svá vajíčka. K tomu dochází obvykle až v období osmi i více týdnů po nákaze, v závislosti na druhu infikovaného zvířete. Vyšetření tedy neumožňuje záchyt migrujících nedospělých motolic, které ještě neprodukují vajíčka. Tato skutečnost značně omezuje diagnostiku také v případě vyšetřování vzorků výkalů u nespecifických a atypických definitivních hostitelů.

Vytváření závěrů o intenzitě infekce na základě počtu nalezených vajíček komplikuje fakt, že nebyla potvrzena zřejmá korelace mezi hodnotou EPG a počtem dospělých motolic v játrech (Phiri et al., 2006; Plötz et al., 2015; Qureshi et al., 1989). Vylučování vajíček není kontinuální, ale obvykle se liší v závislosti na ročním období, ba dokonce i v průběhu dne. Je tedy doporučováno odebrat více vzorků výkalů od konkrétního zvířete, a to v různou denní dobu v průběhu dvou až tří dnů, což je realizovatelné hlavně u farmových zvířat. Vajíčka ve výkalech také nemusí znamenat přítomnost živých dospělých motolic v játrech hostitele. Po úspěšném ošetření léčivem mohou být vajíčka s výkaly vylučována i další tři týdny. Zároveň platí, že nepřítomnost vajíček stoprocentně nevylučuje infekci (Mathewos et al., 2023; Qureshi et al., 1989). Citlivost základní sedimentační metody je 100 %, pokud je ve vzorku přítomno více než 20 EPG (Becker et al., 2016; Conceição et al., 2002). Avšak reálné počty

vajíček *F. magna* ve vzorcích jsou velmi často mnohem nižší (Flirijančić et al., 2007; Novobilský et al., 2007a; Rehbein & Visser, 2022). Celkově se tedy pravděpodobnost záchytu vajíček pohybuje v rozmezí mezi 30 až 50 %. Nicméně pro zvýšení citlivosti je možné zvýšit vstupní množství vyšetřovaného vzorku, případně vyšetření s časovým odstupem opakovat (Rapsch et al., 2006).

Další nevýhodou tohoto diagnostického přístupu je jeho nespecifičnost. Vajíčka některých druhů motolic (např. motolice jaterní *Fasciola hepatica* či motolice jelení *Paramphistomum cervi*) nelze od vajíček *F. magna* vždy jednoznačně morfologicky rozlišit, protože jsou si značně podobná (Obr. 12) (Bazsalovicsová et al., 2010; Kaufmann, 1996; Leontovyč et al., 2014; Pybus et al., 2015). Determinaci také komplikuje již zmíněná proměnlivost rozměrů jednotlivých vajíček motolic ovlivněná například druhem parazitovaného definitivního hostitele (Valero et al., 2009). Diagnostika může být navíc ztížena možnou koinfekcí jednoho hostitele více druhy motolic, kdy se vajíčka všech těchto motolic mohou současně objevit v jednom koprologickém vzorku (Böhm et al., 2006; Sommer et al., 2022).



Obrázek 12.: Srovnání dospělých stádií jaterních motolic druhů **A) *F. magna*** a **B) *F. hepatica***; a jejich vajíček **C) *F. magna*** a **D) *F. hepatica***. (Leontovyč et al., 2014; upraveno)

Je zřejmé, že vyšetřování výkalů není zcela optimálním diagnostickým přístupem pro zachycení motolice *F. magna* u všech jejích definitivních hostitelů, ani pro přesné určení intenzity infekce. Navzdory tomu se v současnosti jedná o nejlepší monitorovací strategii, která umožňuje získat základní údaje o přítomnosti tohoto invazního parazita ve volné přírodě, a to i v lokalitách, kde je lov zvěře omezen (např. národní parky) (Demiaszkiewicz et al., 2015; Flirijančić et al., 2007; Novobilský et al., 2007a). Pokud je koprologický vzorek pozitivní

na přítomnost vajíček *F. magna*, lze usuzovat, že bude v dané lokalitě nakaženo více jedinců z dané populace zvíře. Volně žijící přežvýkavci jsou stádová zvířata, která společně navštěvují stejná místa a riziko nákazy více jedinců infekčními stádii *F. magna* je tedy vysoké.

2.3.2. Nepřímé metody

Při infekci motolicí *F. magna* dochází k poruchám jaterních funkcí hostitele a k narušení integrity jaterních buněk. Tyto poruchy lze zjišťovat pomocí **biochemického stanovení hladin jaterních enzymů** (např. zvýšených koncentrací γ -glutamyltransferázy nebo glutamát dehydrogenázy) v krvi hostitele (Conboy & Stromberg, 1991; Severin et al., 2012; Shury et al., 2019).

Hematologické vyšetření krve může, stejně jako vyšetření biochemické, poukázat na přítomnost *F. magna* v hostiteli (Conboy & Stromberg, 1991; Presidente et al., 1980; Shury et al., 2019). Projevuje se zvýšenými hladinami eosinofilů, leukocytů, lymfocytů a gamaglobulinů (především protilátek třídy IgE). Charakteristická je také anémie způsobená migrací motolic i jejich hematofágní aktivitou (výživa krví), která se projevuje snížením počtu erytrocytů a nízkými hladinami hemoglobinu. Je nutno poznamenat, že řadu infekcí patogeny provází podobné změny krevních parametrů. Proto jsou na přesnou diagnostiku toto vyšetření nepostačující a je nutné doplnit další analýzy.

Imunologická diagnostika slouží k průkazu protilátek vytvořených imunitním systémem hostitele proti určitému patogenu. Existuje mnoho různých imunologických metod, nicméně nejvíce používanou pro detekci protilátek proti *F. magna* je enzymová imunisorbentní analýza (ELISA), kterou lze případně kombinovat s imunoblotem (Kuleš et al., 2021; Novobilský et al., 2007b; Pruvot et al., 2016; Qureshi et al., 1995; Severin et al., 2015). Principem analýzy je vysoce specifická interakce antigenu (cizorodé látky pocházející z organismu *F. magna*) a protilátek v sérech přirozeně či experimentálně infikovaných zvířat. Hladina protilátek se významně zvyšuje již asi dva týdny po infekci zvířat a zhruba od této doby je možné také protilátky detekovat. Naopak nevýhodou je, že protilátky cirkulují v těle hostitele i dlouho po vyléčení nákazy, což vede k falešně pozitivním výsledkům. Komplikací je také nespecifičnost těchto metod, kdy antigeny často zkříženě reagují s protilátkami vytvořenými i proti jiným druhům parazitů (např. motolici *F. hepatica*). Proto je v současné

době vyvíjena snaha o nalezení specifických antigenů umožňující detekci *F. magna* u různých druhů zvířat (Kuleš et al., 2021; Novobilský et al., 2007b).

Výhodou nepřímých metod je možné zachycení nákazy *F. magna* u specifických definitivních hostitelů (také v nepatentních fázích infekce), ale především také u aberantních a nespecifických definitivních hostitelů. Nicméně značnou komplikací je samotný odběr krve, který je realizovatelný spíše u hospodářských zvířat, výjimečně však u volně žijících. Další nevýhodou je nespecifičnost těchto metod. Změněné hladiny jaterních enzymů i hodnoty krevních elementů mohou být u zvěře zapříčiněny i z mnoha jiných důvodů, než je infekce motolicí *F. magna*. Naměřené hodnoty také obvykle neodpovídají intenzitě infekce, ale stejně jako v případě koprologie mohou poskytnout určitou indikaci.

2.3.3. Molekulární metody

Výše zmíněná omezení koprologických a nepřímých diagnostických přístupů vedla k rozvoji molekulárních metod. Ty jsou dnes, mimo mnoha dalších aplikací, běžně využívány k detekci parazitárních organismů v různých typech analyzovaných vzorků (klinických i environmentálních). Princip molekulárních metod je založen na přímém průkazu specifické nukleové kyseliny (DNA) parazita v daném vzorku, což umožňuje také jeho přesné taxonomické zařazení i případnou genotypizaci. Výhodou těchto metod je vysoká rychlost, citlivost a specifičnost, které otevírají mnoho nových příležitostí pro vylepšování diagnostiky nejen v oblasti parazitologie.

Doposud nejpropracovanější molekulární metody jsou založené na **polymerázové řetězové reakci** (z angl. Polymerase Chain Reaction; PCR). Nejčastěji je pro potvrzení infekce *F. magna* využívána konvenční PCR (Bazsalovicsová et al., 2010; Haider et al., 2012; Houszka et al., 2016; Kašný et al., 2012; Králová-Hromadová et al., 2008; Leontovyč et al., 2014; Pecoraro et al., 2022; Sommer et al., 2022), díky které je namnožen a detekován úsek DNA specifický pouze pro tento druh motolice. Je možné analyzovat vzorky DNA získané ze všech stádií *F. magna* (dospělci, nedospělá stádia, larvy, vajíčka), ale i vzorky morfologicky pozměněné jaterní tkáň nebo tkáň plžů. Poté většinou následuje sekvenční analýza získaných PCR produktů, pomocí níž je lze srovnat s referenčními daty uloženými ve veřejně dostupných databázích.

Konvenční PCR je možné kombinovat s enzymatickým štěpením PCR produktů pro tzv. **analýzu polymorfizmu délky restrikčních fragmentů** (z angl. Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP). Pro odlišení *F. magna* od jiných druhů fasciolidních motolic (např. *F. hepatica*) tuto metodu využili Blair & McManus (1989) a Králová-Hromadová et al. (2008), nicméně tento zastaralý diagnostický přístup je v současnosti již překonaný. Novější metodu PCR s následnou **analýzou křivek tání** (z angl. High Resolution Melting; HRM) využili ve své studii pro odlišení jednotlivých haplotypů *F. magna* z různých geografických oblastí Radvánský et al. (2011).

2.4. Jednokroková nested qPCR

2.4.1. Cíl testu

Cílem testu je simultánní detekce dvou zástupců jaterních motolic – konkrétně motolice velké (*F. magna*) a motolice kopinaté (*Dicrocoelium dendriticum*), u přežvýkavé zvěře žijící v intenzivních chovech (obory a farmy) i volně v honitbách. Test byl cíleně navržen pro zachycení DNA ve vzorcích výkalů v průběhu patentní infekce. Jedná se o období, kdy jsou v hostiteli přítomny dospělé motolice, které do trávicího traktu hostitele, produkují svá vajíčka. Ta pak odcházejí spolu s výkaly do vnějšího prostředí a významně tak přispívají k dalšímu šíření infekce.

Při zvolení vhodných extrakčních protokolů (nejsou součástí předložené metodiky), může být pro analýzu využita DNA různého původu, získaná například z infikovaných tkání hostitele nebo mezihostitele, z různých vývojových stádií motolic (dospělci, larvy, vajíčka), popřípadě z prostředí (bahno, voda, vodní rostliny).

Popsaný test tak mimo jiné představuje i vhodný doplňující nástroj pro pravidelné a koordinované monitorování výskytu a šíření motolice *F. magna* ve vytipovaných rizikových oblastech, které je nezbytné pro prevenci a případné tlumení tohoto invazního parazita.

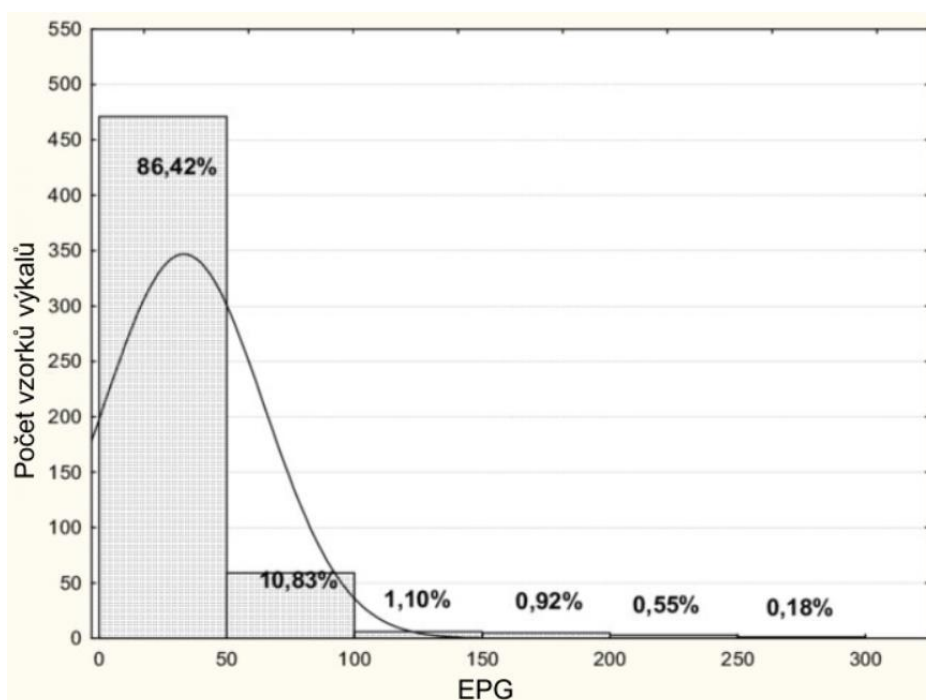
2.4.2. Princip testu

Princip polymerázové řetězové reakce (PCR) spočívá v rychlém namnožení (amplifikaci) konkrétního úseku DNA v laboratorních podmínkách. Při reakci je využíváno

cyklických změn teplot, které umožňují rozvolnění DNA, nasedání primerů, které ohraničují amplifikovaný úsek, a syntézu DNA. Množství vznikajícího produktu se zvyšuje s počtem teplotních cyklů, kterým je reakce podrobena. Pomocí PCR je tak možné získat 2^n kopií DNA, kdy n je počet proběhlých cyklů. Z jedné výchozí molekuly DNA je teoreticky možné získat po proběhnutí 30 cyklů více než 10^9 kopií a ty pak snadno detekovat.

Metoda real-time PCR (označovaná v případě kvantifikace produktů také jako qPCR) využívá speciální přístroj, který kontinuálně zaznamenává množství vznikajícího produktu, a to na konci každého proběhlého cyklu – tj. v reálném čase. Detekce produktu je umožněna díky fluorescenčně značeným sondám, které se váží na amplifikovaný úsek DNA. Hladina fluorescence tak odráží množství vzniklého produktu a tedy i množství výchozí DNA (např. množství DNA motolice *F. magna* přítomné v konkrétním vzorku). Častým problémem qPCR ale je, že se vzrůstajícím počtem teplotních cyklů se zvyšuje pravděpodobnost vazby primerů a sond na nesprávné oblasti DNA, což vede k tvorbě nespecifických produktů především v závěru reakce.

V průběhu vývoje detekčních systémů pro jaterní motolice bylo potvrzeno, že se intenzita infekce kvantifikovaná jako EPG (počet vajíček parazita v 1 gramu výkalů) mohou u zvířete pohybovat ve velmi nízkých hodnotách, což je v souladu s dostupnou literaturou (Obr. 13) (Flirijančić et al., 2007; Novobilský et al., 2007a; Rehbein & Visser, 2022).

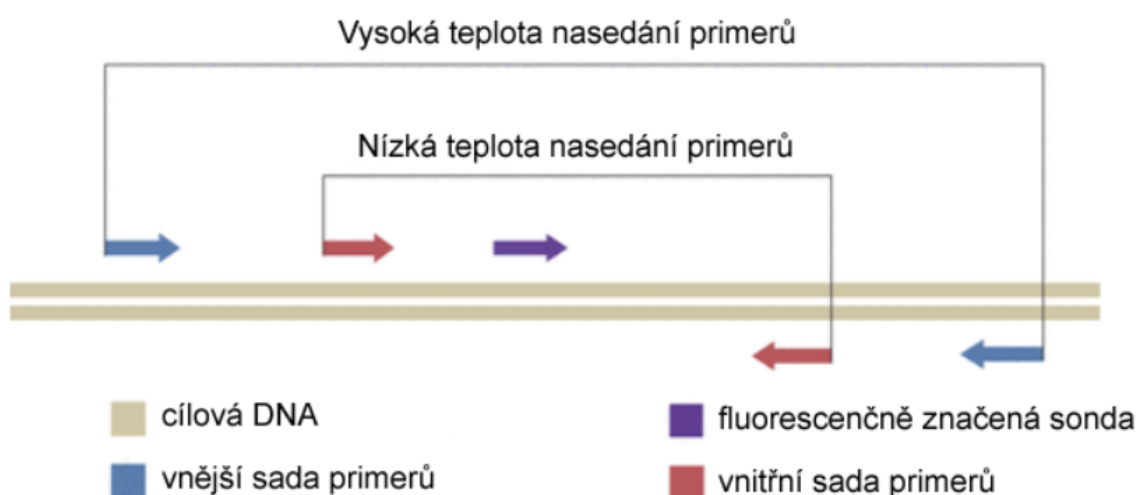


Obrázek 13.: Distribuce vajíček motolice *F. magna* ve vzorcích výkalů jelení zvěře.

(Flirijančić et al., 2007; upraveno)

Z toho důvodu byla pro analýzu vzorků výkalů použita nested PCR, což je modifikace konvenční PCR. Má vyšší citlivost a specifčnost díky dvěma po sobě jdoucím sériím PCR, a proto je vhodnější pro detekci vzorků s nízkým množstvím vstupní DNA. Při první PCR jsou využívány vnější primery, které amplifikují širší oblast cílové DNA. Vzniklý produkt je následně převeden do nové zkumavky, kde probíhá druhá PCR s vnitřními primery. Ty jsou navrženy přímo dovnitř již amplifikovaného úseku. Provedení reakce je ale složitější a manipulace s produkty první PCR značně zvyšuje riziko kontaminace.

Proto je v diagnostice často využívána tzv. jednokroková nested PCR, při níž obě kola PCR probíhají uzavřeně v jedné zkumavce. Jednotlivé reakce jsou fyzicky odděleny například velmi rozdílnou teplotou nasedání vnějších a vnitřních primerů (Obr. 14).



Obrázek 14.: Schéma testu pro detekci DNA motolice *F. magna*, který využívá jednokrokovou nested qPCR. (Wang et al., 2020; upraveno)

2.4.3. Detekční cíle testu

Primery a sondy pro oba druhy motolic byly navrženy na základě sekvencí veřejně přístupných v sekvenční databázi GenBank. Po vzájemném porovnání různých dostupných sekvencí pomocí nástroje BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), byly selektovány druhově specifické oblasti DNA *in silico*. Jako vhodné se ukázaly repetitivní sekvence vnitřního transkribovaného mezerníku (z angl. internal transcribed spacer, ITS), které oddělují geny ribozomální DNA a běžně se využívají pro druhovou determinaci motolic (Bazsalovicsová et al., 2010; Karamon et al., 2015; Králová-Hromadová et al., 2008).

Vzájemná kompatibilita a fyzikální vlastnosti primerů a sond včetně těch pro interní amplifikační kontrolu (IAC) byly zkontrolovány pomocí nástroje OligoAnalyzer Tool.

Sekvence sond a primerů využité pro jednokrokovou nested qPCR:

Cíl	Označení	Sekvence primerů/sond	Velikost
<i>Fascioloides</i>	Nested_ITS2_Fw	5'- TCGGCTCGTGTGTCGATGAAGAGC -3'	24 bp
	Nested_ITS2_Rev	5'- GGTAATCACGTCTGAACCGAGGTCAGGA -3'	28 bp
	Fm_ITS2_Fw	5'-GGTTGGTAACCAGTTATCGT-3'	20 bp
	Fm_ITS2_Rev	5'-TCAGATACATGACCAAGCCT-3'	20 bp
	Fm_ITS2_Probe	5'-HEX-CGTTCCACTACTGTCGCTTTATCGTCG-BHQ1-3'	26 bp
<i>Dicrocoelium</i>	Dd_ITS1_Fw	5'-GGTGCCTACCTGTCTGAT-3'	18 bp
	Dd_ITS1_Rev	5'-CTCATTGAGCCTAGTACCGT-3'	20 bp
	Dd_ITS1_Probe	5'-6FAM-CCTGCCTGCCCTGTTGTG-BHQ1-3'	19 bp
IAC	IAC_Fw	5'-AACCCCTAAACCGGATGATA-3'	20 bp
	IAC_Rev	5'-GTTTAGAATGTTTTCTCCCGTAC-3'	23 bp
	IAC_Probe	5'-Cy5-CTCACCTCCCCGCCCAATACTG-BHQ3-3'	22 bp

Pomocí vnějších primerů pro *F. magna* (Nested_ITS2_Fw a Nested_ITS2_Rev) je amplifikována část oblasti repetitivní sekvence 5,8S-ITS2-28S v rozsahu 7–529 párů bází (z angl., base pair; bp) (Sequence ID: EF534992.1) s výslednou délkou amplikonu 523 bp. Vnitřní primery pro *F. magna* (Fm_ITS2_Fw a Fm_ITS2_Rev) následně amplifikují pouze část oblasti ITS2 v rozsahu 323–460 bp (Sequence ID: EF534992.1), délka amplikonu je pak 138 bp.

Primery pro *D. dendriticum* (Dd_ITS1_Fw a Dd_ITS1_Rev) amplifikují část oblasti repetitivní sekvence ITS1 v rozsahu 238–343 bp (Sequence ID: KF734772.1) s výslednou délkou amplikonu 106 bp. Systém pro detekci *D. dendriticum* byl zároveň přidán do reakce, aby sloužil pro odhalení případných falešně pozitivních výsledků generovaných při detekci *F. magna* (viz kapitola 2.4.11 Ověření validity).

Do každé reakce je doporučeno přidání interní amplifikační kontroly (IAC). Tato kontrola slouží k odhalení falešně negativních výsledků vzniklých v důsledku inhibice a zároveň funguje jako pozitivní kontrola qPCR. Při přípravě IAC byla použita synteticky vytvořená sekvence složená z DNA sekvencí dvou vyhynulých druhů – konkrétně se jedná o mitochondriální DNA vakovlka tasvánského (*Thylacinus cynocephalus*, Sequence ID: FJ515781.1) a ptáka moa (*Dinornis struthoides*, Sequence ID: AY326187.1). Tato kontrolní syntetická sekvence o délce 150 bp byla převzata z publikace Mikel et al. (2016). Takto připravený konstrukt je zcela arteficiální a podobná sekvence se nevyskytuje v žádném známém živočišném, rostlinném, či bakteriálním druhu.

2.4.4. Předmět a působnost

V kapitole 2.4 je popsán nově vyvinutý a optimalizovaný test využívající principu jednokrokové nested qPCR, která má vyšší citlivost a specifitu díky dvěma kolům amplifikace a je vhodná pro zachycení i velmi nízkých koncentrací DNA. Tento test je závazný pro izolaci DNA z výkalů přežvýkavé zvěře, kvalitativní i kvantitativní detekci dvou veterinárně významných druhů jaterních motolic – *F. magna* a *D. dendriticum*. Jedná se o multiplexní test s interní amplifikační kontrolou (IAC), který slouží k simultánní detekci vybraných oblastí genomové DNA (ITS) obou cílových parazitů. Test je využitelný jako doplňující diagnostický nástroj pro plošný monitoring zmiňovaných druhů jaterních motolic.

2.4.5. Podstata testu

Triplexní diagnostický test využívající princip jednokrokové nested kvantitativní polymerázové řetězové reakce s interní amplifikační kontrolou (IAC). Kvalitativní detekce probíhá prostřednictvím odečtení fluorescenčního signálu oproti negativní kontrole. Kvantifikace probíhá podle kalibrační křivky vytvořené z desítkových ředění cílové DNA o známé koncentraci.

2.4.6. Přístroje a pomůcky

- Uzavíratelné ZIP sáčky (Secupack)
- Sáček na laboratorní odpad (Carl Roth)

- Odběrová nádobka na vzorky Q Path (VWR International)
- Láhev s modrým uzávěrem 250 ml (Simax) na PBS
- Homogenizátor Retsch MM200 (Retsch)
- Centrifuga 5804 (Eppendorf), případně Centrifuga MiniSpin (Eppendorf)
- Centrifuga na proužky PCR mikrozkušavek (Eppendorf)
- Centrifuga 5430 na 96-jamkové PCR destičky (Eppendorf)
- Analytické váhy Denver (Merci)
- Autokláv 2540 ELC (Tuttenauer) pro sterilizaci PBS pufry
- Vortex Lab Dancer (IKA)
- Sterilní lžičky (Fisher Scientific)
- Sada pipet (Eppendorf):
 - s rozsahem nastavitelným od 1 000–5 000 μ l
 - s rozsahem nastavitelným od 100–1 000 μ l
 - s rozsahem nastavitelným od 10–100 μ l
 - s rozsahem nastavitelným od 0,5–10 μ L
 - 8kanálová pipeta s rozsahem od 1–10 μ l
 - automatická pipeta Multipette E3 s rozsahem 1–50 000 μ l
- Špičky k pipetám s příslušným rozsahem (Biotix; Eppendorf)
- Sterilní mikrozkušavky o objemu 1,5 ml (Eppendorf)
- Proužek PCR mikrozkušavek (SSIbio)
- Rukavice vyšetřovací nitrilové (SemperCare)
- Mraznička (-20 °C) na uchování vzorků výkalů, extrahované DNA a chemikálií
- LightCycler 480 Instrument II (Roche)
- 96jamkové PCR destičky – LightCycler 480 Multiwell Plate 96 (Roche); případně LightCycler 8-Tube Strips (Roche)
- Optické fólie – LightCycler 480 Sealing Foil (Roche)

2.4.7. Chemikálie a roztoky

- Quick-DNA Fecal/Soil Microbe MiniPrep kit (Zymo Research; kat. č. D6010)
 - Souprava slouží pro extrakci DNA z výkalů nebo půdy a je určena pro jednoduchou a rychlou izolaci DNA ve vysoké kvalitě bez obsahu

inhibitorů. Vzorčky, včetně obsažených tkání a buněk, jsou rychle a efektivně lyzovány pomocí kuliček BashingBeads. K izolaci DNA je využita technologie založená na Zymo-Spin kolonkách. Získaná DNA je následně filtrována, aby se odstranily látky, které mohou inhibovat PCR. Kit je možné skladovat při pokojové teplotě.

- Luna Universal Probe qPCR Master Mix (New England Biolabs; kat.č. M3004X)
 - Master Mix je doporučeno skladovat při teplotě -20 °C a neměl by být dlouhodobě vystavován světlu. Za těchto podmínek je stabilní po dobu 24 měsíců. Master mix je zároveň stabilní nejméně po 30 cyklů zmrazení a rozmrazení. V případě skladování Master Mixu při teplotě 4 °C bez dlouhodobého vystavování světlu je jeho použitelnost deklarována po dobu jednoho měsíce.
- Uracil-DNA Glycosylase – UDG (Thermo Scientific; kat. č. EN0362)
 - Každá qPCR obsahuje UDG, aby se zabránilo kontaminaci vzorků produkty vzniklými v předešlých reakcích a vzniku falešně pozitivních výsledků. UDG je doporučena skladovat při teplotě -20 °C.
- Primery a sondy (Merck)
 - Primery i sondy jsou dodávány v lyofilizovaném stavu. Podle návodu uvedeného výrobcem jsou na pracovišti rozpuštěny v PCR ultračisté vodě tak, aby výsledná zásobní koncentrace byla 100 pmol/μl. Pracovní roztok sond (20 pmol/μl) je následně připraven zředěním zásobního roztoku sond pětkrát v PCR ultračisté vodě. Při přípravě reakční směsi se tedy používají koncentrace primerů 100 pmol/μl a koncentrace sond 20 pmol/μl. Zásobní i pracovní roztoky primerů i sond jsou uloženy v mrazničce při teplotě -20 °C.
- Ultračistá PCR H₂O (Top-Bio; kat. č. P340)
 - Používá se pro ředění všech komponent pro qPCR, lze skladovat při pokojové teplotě.
- Pufrovaný fyziologický roztok – PBS (Merck; kat. č. P4417-50TAB)
 - Pufr se používá při izolaci DNA. Po rozpuštění jedné tablety ve 200 ml deionizované vody vznikne 0,01 M fosfátový pufř obsahující 0,0027 M chlorid draselný a 0,137 M chlorid sodný, mající pH 7,4 při 25 °C. Roztok je následně možné sterilizovat v autoklávu. Tablety lze skladovat při pokojové teplotě

a používat do data minimální trvanlivosti. Namíchaný roztok PBS je možné skladovat při teplotě 15 až 30 °C po dobu 24 měsíců.

- Plasmidový konstrukt nesoucí IAC sekvenci
 - Interní amplifikační kontrola (IAC) je roztok obsahující plasmidový konstrukt, který nese umělou sekvenci syntetizovanou *de novo* firmou Sigma-Aldrich. Tato sekvence byla klonována do vektoru pJET1.2/blunt pomocí CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Scientific; kat. č. K123120) a ten byl následně transformován do kompetentních buněk *Escherichia coli* kmene DH10B (Thermo Scientific; kat. č. K123120), jak je popsáno v publikaci Reslova et al. (2021). Po selekci pozitivních kolonií (inzerty ověřeny konvenční PCR a sekvenováním) a jejich pomnožení v tekutém médiu byly plasmidové konstrukty z buněk izolovány pomocí soupravy NucleoBond Xtra (Macherey-Nagel; kat. č. 740410). U izolovaných plasmidů byla změřena koncentrace a čistota pomocí přístroje Nanodrop 8000 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Počet kopií byl vypočten podle vzorce: $\text{kopie}/\mu\text{l} = X \text{ ng} * 6,022 \times 10^{23} \text{ molekul/mol} / [(N * 660 \text{ g/mole}) * 1 \times 10^9 \text{ ng/g}]$, kde X je koncentrace plasmidu [ng/μl] a N je délka dsDNA [tj. plasmid s umělou sekvencí]. Podle toho byl naředěn zásobní roztok obsahující 1×10^{10} kopií konstruktů a z něj byl desítkovým ředěním připraven pracovní roztok obsahující 1×10^5 kopií konstruktů. K ředění zásobního i pracovního roztoku byl použit TE pufr (Roti-Stock; kat. č. R.1052.1) s přidavkem čisté DNA z rybích spermii (Serva Electrophoresis; kat. č. 1858001) o koncentraci 50 ng/μl. Oba roztoky je doporučeno skladovat při teplotě -20 °C.

2.4.8. Vzorkování, manipulace se vzorkem a jeho příprava

Jedním z hlavních cílů bylo vyvinout postup umožňující intravitální diagnostiku, která by nebyla podmíněna smrtí vyšetřovaného zvířete. Pro tyto účely je prováděn sběr vzorků výkalů v terénu pověřenou osobou. Ideálními místy jsou krmná zařízení, migrační stezky, prezimovací obůrky či obory, kde se zvěř více koncentruje. Vhodné je získávat co nejčerstvější vzorky, protože při jejich vyschnutí může docházet k porušení integrity vajíček i DNA parazita. Nicméně nalezení čerstvých výkalů ve volné přírodě je mnohdy ztíženo kvůli vzrostlé vegetaci, vlivům počasí nebo jiným faktorům. Vhodným obdobím pro sběr výkalů jsou z těchto důvodů

zimní měsíce se stabilní sněhovou pokrývkou, kdy je možné i snáze přiřadit výkaly k jednotlivým druhům zvěře. Optimální je sbírat vzorky pocházející od jednotlivých kusů zvěře, proto jsou přednostně voleny výkaly jasně separované od ostatních. Do strategie sběru vzorků je vhodné zahrnout časovou či prostorovou stratifikaci, aby se minimalizovalo riziko vícenásobného odběru výkalů od stejného zvířete.

Pro vlastní test je odebíráno 5 g čerstvých výkalů, minimálně však 1 g. Každý vzorek je vložen do uzavíratelného sáčku, který je označen identifikačním číslem vzorku, druhem hostitele (pokud lze rozpoznat), místem a datem odběru vzorku. Následně jsou odebrané vzorky co nejrychleji dopraveny do laboratoře a do jejich dalšího zpracování uloženy při -20 °C.

Pomocí navrženého testu je možné analyzovat také směsné vzorky výkalů pocházející od více jedinců. Samozřejmě lze testovat i vzorky, které jsou odebírány přímo z rekta ulovené, uhynulé či imobilizované zvěře.

2.4.9. Izolace DNA z výkalů

Komerční kit pro izolaci DNA ze vzorků výkalů přežvýkavců byl zvolen na základě již optimalizovaných a v laboratoři zavedených detekčních systémů pro gastrointestinální hlístice přežvýkavců (konkrétně pro rody *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus* a druhy *Nematodirus battus*, *Chabertia ovina* a *Ashworthius sidemi*) uvedené v publikaci Reslová et al. (2021). Cílem bylo použít shodný protokol pro izolaci tak, aby byl univerzální a získaná DNA mohla být využita i pro další detekční systémy, což se pak projeví na ceně analýz (viz kapitola 5. Ekonomické aspekty). Kit je vhodný i z toho důvodu, že zahrnuje krok mechanické homogenizace vzorku kuličkami, což zajišťuje efektivní uvolnění DNA z vajíček motolic, která mají velmi odolný obal.

- Izolace DNA z výkalů je prováděna pomocí komerčního kitu Quick-DNA Fecal/Soil Microbe MiniPrep kit (Zymo Research) dle návodu výrobce pouze s drobnými odchylkami (např. přidání pufru PBS pro lepší naředění výkalů).
- Před vlastní izolací je nutné připravit sterilní PBS pufr a nechat rozmrazit vzorky výkalů při pokojové teplotě.

Protokol pro izolaci DNA z výkalů:

1. Rozmrazené vzorky výkalů (optimálně 5 g) rozdrtit a ručně promíchat přímo v odběrovém sáčku.
2. Z ručně homogenizovaného vzorku odebrat sterilní lžičkou 1 g (váženo na analytických vahách) do odběrové nádoby; přidat 4 ml roztoku BBB/PBS (v poměru 1:4 – tj. 800 µl pufru BashingBead Buffer a 3 200 µl pufru PBS) a důkladně rozpustit třepáním v ruce.
3. Odebrat 1,2 ml rozpuštěného vzorku do zkumavky s kuličkami (ZR BashingBead Lysis Tube); do zkumavky s negativní izolační kontrolou (NIC) přidat místo vzorku 1,2 ml roztoku BBB/PBS.
4. Vzorky mechanicky lyzovat po dobu 10 min pomocí homogenizátoru Retsch MM200 a následně centrifugovat po dobu 1 min při 10 000× g.
5. Přenést 400 µl supernatantu na filtr (Zymo-Spin III-F Filter) umístěný ve sběrné zkumavce a centrifugovat po dobu 1 min při 8 000× g.
6. K filtrátu ve sběrné zkumavce přidat 1 200 µl lyzačního pufru (Genomic Lysis Buffer) a důkladně promíchat.
7. Přenést 800 µl na kolonku (Zymo-Spin IIC Column) umístěnou v čisté sběrné zkumavce, centrifugovat po dobu 1 min při 10 000× g; vylít filtrát ze sběrné zkumavky a použít znovu.
8. Opakovat předchozí krok.
9. Kolonku umístit do čisté sběrné zkumavky a přidat 200 µl předmývacího pufru (DNA Pre-Wash Buffer); centrifugovat po dobu 1 min při 10 000× g.
10. Na kolonku přidat 500 µl promývacího pufru (g-DNA Wash Buffer); centrifugovat po dobu 1 min při 10 000× g.
11. Kolonku přenést do čisté 1,5 ml zkumavky a přidat 50 µl elučního pufru (DNA Elution Buffer); nechat stát po 1 min a následně centrifugovat po dobu 30 sec při 10 000× g.
12. Pro aktivaci umístit přečišťovací filtr (Zymo-Spin III-HRC Filter) do čisté sběrné zkumavky a přidat 600 µl roztoku (Prep Solution); centrifugovat po dobu 1 min při 10 000× g.
13. Pro přečištění nanést eluovanou DNA (z kroku 11) na aktivovaný filtr (z kroku 12) umístěný v čisté 1,5 ml zkumavce; centrifugovat po dobu 3 min při 8 000× g.
14. Výsledkem izolace je 50 µl DNA, kterou uchováváme zmraženou při -20 °C.

2.4.10. Postup vlastního testu

- Provedení testu nevyžaduje žádná zvláštní bezpečnostní opatření ani kontrolu okolních podmínek.
- Vstupní množství DNA potřebné pro jednokrokovou nested qPCR je 10 µl, protože každý izolovaný vzorek DNA je testován v duplikátu.
- Kalibrace měřicího přístroje LightCycler 480 Instrument II před testem je zajištěna vnitřním testem, který je součástí softwarového vybavení.

Příprava reakční směsi pro jednokrokovou nested qPCR:

1. Všechny komponenty, které byly zamrazeny je potřeba po rozmrazení důkladně promíchat pomocí vortexu a krátce centrifugovat.
2. Namíchat reakční směs v 1,5 ml zkumavce pro potřebný počet vzorků (počítat s analýzou vzorků v duplikátech a s kontrolami):

Složka	1 reakce	100 reakcí
Luna Universal Probe qPCR Master Mix	10 µl	1000 µl
Nested ITS2_Fw (100 pmol/µl)	0,015 µl	1,5 µl
Nested ITS2_Rev (100 pmol/µl)	0,015 µl	1,5 µl
Fm ITS2_Fw (100 pmol/µl)	0,05 µl	5 µl
Fm ITS2_Rev (100 pmol/µl)	0,05 µl	5 µl
Dd ITS1_Fw (100 pmol/µl)	0,05 µl	5 µl
Dd ITS1_Rev (100 pmol/µl)	0,05 µl	5 µl
IAC_Fw (100 pmol/µl)	0,05 µl	5 µl
IAC_Rev (100 pmol/µl)	0,05 µl	5 µl
Fm ITS2_Probe (20 pmol/µl)	0,1 µl	10 µl
Dd ITS1_Probe (20 pmol/µl)	0,1 µl	10 µl
IAC_Probe (20 pmol/µl)	0,1 µl	10 µl
IAC plasmid 10 ⁵	0,1 µl	10 µl
UDG	0,4 µl	40 µl
Ultračistá PCR H ₂ O	3,87 µl	387 µl
Celkem	15 µl na 1 reakci	

3. Vše důkladně promíchat pomocí vortexu.
4. Reakční směs lze opakovaně zamrazovat i rozmrazovat a uchovávat při teplotě -20 °C, nejdéle však po dobu šesti měsíců.

Provedení jednokrokové nested qPCR pomocí přístroje LightCycler 480:

1. Reakční směs i vzorky DNA vyndat z mrazničky a nechat samovolně rozpustit. Obojí následně důkladně promíchat pomocí vortexu a krátce centrifugovat.
2. Pipetovat 15 µl reakční směsi do jednotlivých jamek 96jamkové PCR destičky a přidat 5 µl DNA. Je nutné pipetovat s velkou přesností, neboť odchylky v objemu reakce ovlivní analýzu.
3. Jako negativní kontrola je do reakce vždy přidána ultračistá PCR H₂O v ekvivalentním množství k vzorku (tj. 5 µl); jako pozitivní kontrola může být do reakce přidána DNA izolovaná z dospělců motolic *F. magna* a *D. dendriticum*.
4. Opatrně nalepit optickou folii na destičku a dbát na to, aby nedošlo ke zkřížené kontaminaci mezi jednotlivými vzorky.
5. Centrifugovat 96jamkovou PCR destičku po dobu 2 min při 2000× g.
6. Umístit 96jamkovou PCR destičku do LightCycler 480 přístroje ve správné orientaci a spustit následující program:

Program	Počet cyklů	Analýza	Ramp Rate	Aquisition Mode
Prevence kontaminace	1 cyklus	37 °C; 10 min	4.40 °C/sec	None
Úvodní denaturace	1 cyklus	95 °C; 2 min	4.40 °C/sec	None
1. Denaturace	15 cyklů	95 °C; 15 sec	4.40 °C/sec	None
1. Annealing/Extenze		70 °C; 45 sec	2.20 °C/sec	None
2. Denaturace	37 cyklů	95 °C; 15 sec	4.40 °C/sec	None
2. Annealing/Extenze		62 °C; 45 sec	2.20 °C/sec	Single
Chlazení	1 cyklus	40 °C; 30 sec	2.20 °C/sec	None

7. Pro kanály FAM a HEX vyhodnotit výsledky pomocí LightCycler software (verze LCS480 1.5.1.62) analýzou „Fit points“. Nastavit hodnoty pozadí (Noiseband) na 0,6500 a prahových hodnot (Threshold) na 1,2000. Pro oba kanály zapnout univerzální kompenzaci fluorescenčních barev – Universal CC FAM (510) – VIC (580) [465-510,533-580]. Pro kanál Cy5 detekující IAC použít analýzu druhého derivačního maxima „2nd Derivative Max“.

2.4.11. Ověření validity

Negativní izolační kontrola (NIC)

Provádí se společně s izolací DNA ze vzorků výkalů a slouží pro kontrolu kontaminace reagensů použitých během izolace. Zároveň slouží pro kontrolu kontaminace vzorků DNA z okolního prostředí. Místo homogenizovaného vzorku výkalu je do procesu izolace použito ekvimolární množství roztoku BBB/PBS, tj. 1,2 ml. Jedna NIC musí být použita na každou sérii izolací, přičemž jedna série zahrnuje maximálně 15 vzorků.

Pozitivní izolační kontrola

Tato kontrola není prováděna.

Replikáty

Každý vzorek je testován nejméně dvakrát, tzn. v duplikátu.

Interní amplifikační kontrola (IAC)

Interní amplifikační kontrola (IAC) je přidávána do každé reakce a slouží k odlišení skutečně negativních a falešně negativních výsledků vzniklých v důsledku inhibice reakce.

Negativní nested qPCR kontrola (NTC)

Jako kontrola kontaminace reagensů pro qPCR (z angl. no template control, NTC) je místo izolované DNA do reakce přidána ultračistá PCR H₂O v ekvivalentním množství, tj. 5 µl. NTC musí být použita při každém testu.

Pozitivní nested qPCR kontrola

Jako pozitivní kontrola slouží DNA izolovaná z dospělců motolic druhů *F. magna* a *D. dendriticum* o známé koncentraci, která je do testu začleněna minimálně v případě použití nově namíchané reakční směsi. Zároveň jako pozitivní kontrola každé reakce slouží IAC, protože plasmidový konstrukt nesoucí IAC sekvenci, primery amplifikující IAC i sonda jsou součástí každé reakční směsi.

Specifičnost

Specifičnost primerů a sond byla vyhodnocena *in silico* pomocí nástroje BLAST a zohledněna již při jejich návrhu tak, aby nevykazovaly shodu se sekvencemi jiných druhů organismů. Následně byla specifičnost prakticky ověřena na DNA celé řady parazitů (běžně se vyskytujících u domácích i volně žijících přežvýkavců), kteří byli

determinování na základě morfometrických měření. DNA byla izolována z dospělců a následně byla testována v duplikátech v koncentraci 2 ng na reakci, přičemž koncentrace byla stanovena pomocí fluorometru Qubit. Jednalo se o zástupce motolic: *Fasciola hepatica*, *Calicophoron daubneyi*, *Parafasciolopsis fasciolaemorpha*; i hlístic: *Haemonchus contortus*, *Ashworthius sidemi*, *Capillaria* spp., *Chabertia ovina*, *Oesophagostomum venulosum*, *Oesophagostomum columbianum*, *Bunostomum* spp., *Nematodirus filicollis*, *Nematodirus battus*, *Ostertagia leptospicularis*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus capricola*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichuris ovis*, *Trichuris discolor*, *Cooperia pectinata*, *Cooperia curticei*, *Spiculopteragia asymmetrica*, *Spiculopteragia houdemeri* a *Spiculopteragia spiculoptera*.

V případě detekčního systému pro *F. magna* bohužel dochází ke křížové reakci s DNA motolice *D. dendriticum*. Systém nespecificky zachytává DNA *D. dendriticum* do koncentrace 200 pg na reakci, nicméně soudě podle reálných vzorků pro *F. magna* není zisk DNA pomocí Quick-DNA Fecal/Soil Microbe MiniPrep kitu v takové koncentraci pro *D. dendriticum* reálně očekávatelný. Aby se přesto vyloučily možné falešně pozitivní výsledky v případě extrémně vysokých intenzit infekce, respektive počtu vajíček produkovaných motolicí *D. dendriticum*, byl do testu přidán i detekční systém právě pro tuto motolici. V případě detekčního systému pro *D. dendriticum* nebyla nalezena žádná křížová reakce s jinými druhy testovaných parazitů.

Detekční limit

Detekční limit byl nejprve testován individuálně pro každý systém a následně byl ověřen v multiplexu. Pro testy byly použity koncentrační řady DNA od 2 ng do 200 ag na reakci. V případě testu smíšené infekce byla DNA obou druhů motolic smíchána a naředěna stejným způsobem. Dále byla smíšené infekce testována pro jeden cíl v nadbytku a pro druhý ve stopovém množství. Detekční limit pro oba cíle byl následně stanoven na 10 fg.

Citlivost

Citlivost testu byla stanovena na základě vyšetření reálných vzorků výkalů pocházejících od jelenů, daňků a jelenců z tří oborních chovů. Byly testovány pouze vzorky (N = 36), které byly určeny jako pozitivní pro vajíčka motolic *F. magna*/*F. hepatica* pomocí sedimentační metody. Medián u těchto vzorků byl stanoven na 14 EPG s maximální hodnotou 117 EPG a minimem 2 EPG. Z těchto vzorků bylo jednokrokovou nested qPCR

potvrzeno 21 vzorků jako pozitivních na přítomnost DNA *F. magna*. Žádný vzorek nebyl pozitivní pro *D. dendriticum*. Ve všech vzorcích byl jasný signál pro IAC, tudíž nedocházelo k inhibici reakce. Citlivost testu ve srovnání se standardní sedimentační metodou je tedy 58 %, avšak vstupní množství vyšetřovaného materiálu je mnohonásobně menší (1 g vs. 10 g výkalů). Citlivost je možné zvýšit duplicitní izolací DNA, což se ale projeví na ceně analýz (viz kapitola 5. Ekonomické aspekty).

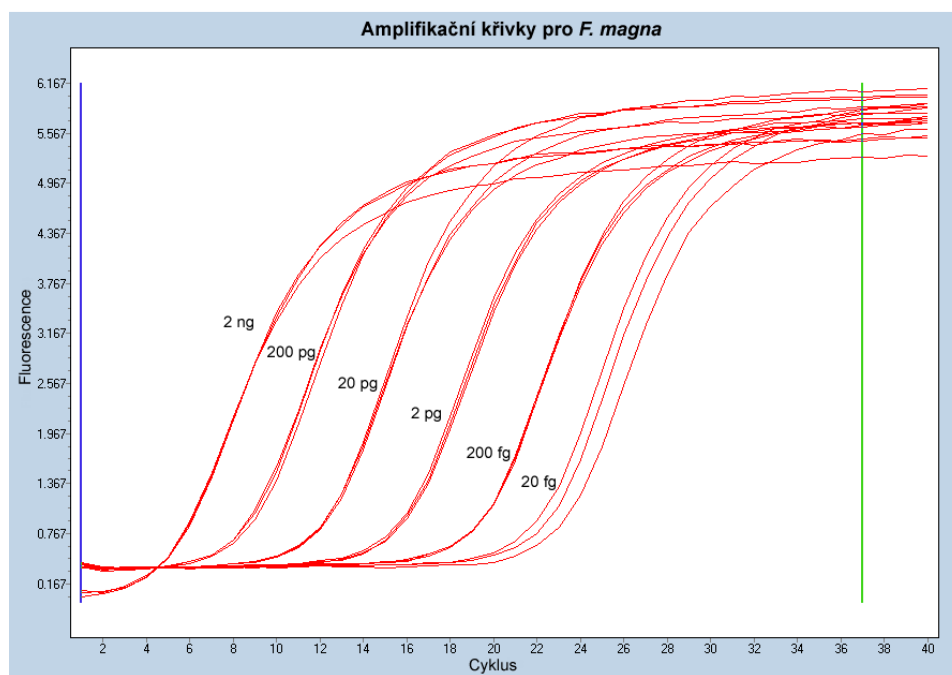
2.4.12. Zpracování dat a interpretace výsledků

Kvalitativní hodnocení se provádí podle následující tabulky a je platné pouze pro přístroj LightCycler 480 Instrument II:

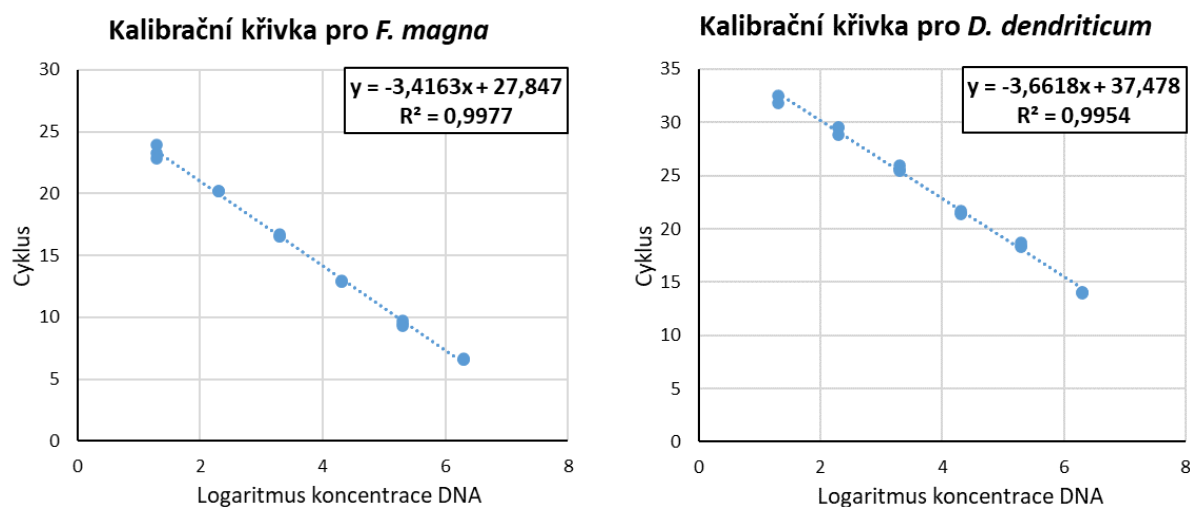
Fluorescence <i>D. dendriticum</i> (Kanál FAM)	Fluorescence <i>F. magna</i> (Kanál HEX)	Fluorescence IAC (Kanál Cy5)	Celkový výsledek
Negativní	Negativní	Negativní	Reakce je inhibována
Negativní	Negativní	Pozitivní	Vzorek je negativní pro <i>D. dendriticum</i> Vzorek je negativní pro <i>F. magna</i>
Negativní	Pozitivní	Negativní	Vzorek je negativní pro <i>D. dendriticum</i> Vzorek je pozitivní pro <i>F. magna</i>
Negativní	Pozitivní	Pozitivní	Vzorek je negativní pro <i>D. dendriticum</i> Vzorek je pozitivní pro <i>F. magna</i>
Pozitivní	Negativní	Negativní	Vzorek je pozitivní pro <i>D. dendriticum</i> Vzorek je negativní pro <i>F. magna</i>
Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Vzorek je pozitivní pro <i>D. dendriticum</i> Vzorek je negativní pro <i>F. magna</i>
Pozitivní (CP>18,5)	Pozitivní	Negativní	Vzorek je pozitivní pro <i>D. dendriticum</i> Vzorek je pozitivní pro <i>F. magna</i>
Pozitivní (CP<18,5)	Pozitivní	Negativní	Vzorek je pozitivní pro <i>D. dendriticum</i> Vzorek nelze pro <i>F. magna</i> vyhodnotit
Pozitivní (CP>18,5)	Pozitivní	Pozitivní	Vzorek je pozitivní pro <i>D. dendriticum</i> Vzorek je pozitivní pro <i>F. magna</i>
Pozitivní (CP<18,5)	Pozitivní	Pozitivní	Vzorek je pozitivní pro <i>D. dendriticum</i> Vzorek nelze pro <i>F. magna</i> vyhodnotit

Vzorek je považován za pozitivní, pokud je pozitivní v obou opakování. Pokud je reakce inhibována, je nutné buď opakovat test se zředěnou izolovanou DNA nebo zopakovat celou izolaci DNA ze vzorku výkalu, pokud je k dispozici.

Data lze v případě potřeby vyhodnotit i kvantitativně. Relativní množství cílové DNA ve vzorku lze vypočítat pomocí kalibrační křivky vytvořené z desítkových ředění dané DNA o známé koncentraci (Obr. 15 a 16). Amplifikace ředící řady by pak měla být součástí testu.



Obrázek 15.: Amplifikační křivky generované pomocí jednokrokové nested qPCR pro ředící řady cílové DNA motolice *F. magna* o známé koncentraci.



Obrázek 16.: Kalibrační křivky vytvořené z naměřených hodnot pro cílovou DNA o známé koncentraci. Pomocí vzorců je možné vypočítat relativní množství DNA v neznámých vzorcích.

3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

V předložené metodice jsou uvedeny diagnostické postupy, závěry z vlastního sledování i praktické připomínky a doporučení, které současně vycházejí ze studia odborné literatury (české i zahraniční) i z vlastní výzkumné činnosti autorů zaměřené na diagnostiku invazního parazita *F. magna*.

Metodika dále obsahuje nově navržený a doposud nepublikovaný jednokrokový diagnostický test využívající nested qPCR pro přímou detekci DNA motolice velké *F. magna* a motolice kopinaté *D. dendriticum* z výkalů definitivních hostitelů. Jedná se o komplexní postup zahrnující sběr, uchovávání a přípravu vzorku, izolaci DNA a vlastní qPCR detekci. Předložený test byl vyvíjen s ohledem na jeho budoucí rutinní diagnostické uplatnění. Byla proto provedena kompletní optimalizace, otestována specifická a citlivost diagnostického systému. V testu byl zaveden systém kontrol, včetně interní amplifikační kontroly, která zaručuje vyloučení falešně negativních výsledků způsobených přítomností inhibitorů v reakci. Dále byl stanoven detekční limit a vypracován postup pro vyhodnocení získaných dat. Jednokrokový nested qPCR test nebyl dosud pro detekci helmintů využit a představuje tak nový, vysoce citlivý a druhově specifický diagnostický přístup využitelný nejen v oblasti parazitologie.

S pomocí postupů popsaných v metodice bude možné získat přesné epizootologické údaje o motolici *F. magna*, díky kterým bude možné lépe vyhodnotit skutečný význam tohoto invazního parazita a případně předejít ekologickým rizikům či ekonomickým ztrátám s ním spojeným.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Publikace je určena všem pracovníkům v oblasti péče o zvěř v intenzivních chovech i v honitbách. Cílovými skupinami jsou zejména myslivecké spolky, obory, farmové chovy, dále pak orgány veterinární správy, pracovníci veterinárních ústavů, veterinární lékaři a v neposlední řadě pracovníci v diagnostických laboratořích či odborníci podílející se na vývoji diagnostických metod. Publikace je využitelná rovněž v pedagogické činnosti ke vzdělávání studentů středních škol a univerzit.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

5.1. Parazitologická pitva

Náklady na vybavení laboratoře pro parazitologickou pitvu jsou v porovnání s ostatními metodami zanedbatelné a pohybují se řádově v desítkách korun na vzorek. Zahrnují pouze jednorázový nákup pitevních nástrojů, a dále náklady na základní laboratorní materiál a chemikálie (např. zkumavky, sáčky, mikroskopická sklíčka, vodu, PBS pufr, ethanol) a ochranné pomůcky. Náklady na přístroje, jako je stereoskopický či standardní světelný mikroskop, snímací kamera s odpovídajícím softwarem, chladnička nebo mraznička apod., nejsou započítány, neboť jsou předpokládaným vybavením laboratoře využívající tuto diagnostickou metodu.

Náklady na pořízení základních pitevních nástrojů*:

Položka	Obvyklá cena
Pitevní nůž	400 Kč
Chirurgické nůžky	120 Kč
Skalpel	100 Kč
Preparační jehla	80 Kč
Nerezová špachtle se lžičkou	100 Kč
Nerezový tác	1 000 Kč
Pinzeta anatomická	60 Kč
Celkem	1 960 Kč

5.2. Sedimentační metoda

Podobně jako v případě vybavení laboratoře pro parazitologickou pitvu jsou i náklady potřebné pro zavedení sedimentační metody nízké a pohybují se řádově v desítkách korun na vzorek. Zahrnují víceméně jednorázové náklady na laboratorní sklo (kádinky, odměrné válce, míchací tyčinky), základní materiál (mikroskopická sklíčka, čajové sítko, zkumavky, sáčky apod.), chemikálie (vodovodní vodu, PBS pufr, ethanol, methylenová modř) a ochranné pomůcky. Náklady na přístroje, jako je stereoskopický či světelný mikroskop, snímací kamera

s odpovídajícím softwarem, chladnička nebo mraznička apod., nejsou započítány, neboť jsou předpokládaným vybavením laboratoře využívající tuto diagnostickou metodu.

Náklady na pořízení drobného hmotného majetku nezbytného k provádění uvedené metody*:

Položka	Obvyklá cena
Centrifuga	45 000 Kč
Analytické váhy	40 000 Kč
Sada pipet – 4 ks	30 000 Kč
Celkem	115 000 Kč

5.3. ELISA

Náklady na zavedení diagnostické metody založené na ELISA do laboratoře zahrnují základní laboratorní sklo (odměrné válce, lahve), spotřební laboratorní materiál (96jamkové destičky, špičky, zkumavky, plastové pipety), chemikálie potřebné pro reakci (např. PBS pufr, peroxidázou značené protilátky, kyselina sírová, TMB substrát, Tween 20 apod.) a ochranné pomůcky. Dále jsou náklady spojené s nákupem drobného hmotného majetku (např. pipety, analytické váhy, třepačka mikrotitračních destiček). Náklady na přístroje, jako je například termostat, fotometr, mraznička a chladnička, nejsou započítány, neboť jsou předpokládaným vybavením laboratoře využívající tento diagnostický přístup.

Náklady na materiál a chemikálie potřebné na vyšetření jednoho vzorku dle uvedené metody*:

Položka	Obvyklá cena
Peroxidázou značené protilátky, substrát, chemikálie	80 Kč
Spotřební materiál (špičky, destičky, zkumavky, rukavice atd.)	20 Kč
Celkem	100 Kč

Kalkulace zahrnuje analýzu vzorku v duplikátu i průměrné náklady na pozitivní a negativní kontroly a slepého vzorku.

Náklady na pořízení drobného hmotného majetku nezbytného k provádění uvedené metody*:

Položka	Obvyklá cena
Třepačka mikrotitračních destiček	30 000 Kč
Analytické váhy	40 000 Kč
Sada pipet – 4 ks	30 000 Kč
Celkem	100 000 Kč

5.4. Konvenční PCR následovaná sekvenční analýzou

Náklady na zavedení konvenční PCR do laboratoře je možné rozdělit do dvou kategorií. V první kategorii jsou náklady nezbytné pro pořízení spotřebního materiálu a souprav na izolaci DNA a chemikálií. Náklady na přístroje (thermocycler, mraznička apod.) nejsou započítány, neboť jsou předpokládaným vybavením laboratoře využívající tento diagnostický přístup. Sekvenování PCR produktu je obvykle zadáváno ve formě služby externí firmě.

Náklady na materiál a chemikálie potřebné na vyšetření jednoho vzorku dle uvedené metody*:

Položka	Obvyklá cena
Izolace DNA (cena kitu)	150 Kč
Přečištění PCR produktu (cena kitu)	80 Kč
Spotřební materiál (špičky, zkumavky, rukavice atd.)	50 Kč
PCR reakce (reakční směs s jedním párem primerů) a gelová agarózová elektroforéza (pufry, DNA ladder, fluorescenční barvivo)	100 Kč
Sangerovo sekvenování	120 Kč
Celkem	500 Kč

Náklady na pořízení drobného hmotného majetku nezbytného k provádění uvedené metody*:

Položka	Obvyklá cena
Centrifuga	45 000 Kč
Vortex	8 000 Kč
Elektroforetická vana se zdrojem napětí	50 000 Kč
Sada pipet – 4 ks	30 000 Kč
Celkem	133 000 Kč

5.5. Jednokroková nested qPCR

Náklady na zavedení jednokrokové nested qPCR do laboratoře je možné rozdělit do dvou kategorií. V první kategorii jsou náklady nezbytné pro pořízení spotřebního materiálu, souprav na izolaci DNA a chemikálií. Další náklady jsou spojené s nákupem drobného hmotného majetku, který je nutný pro provádění metody (pipety, centrifuga, vortex apod.). Náklady na přístroje, jako je thermocycler, autokláv, mraznička či mechanický homogenizátor, nejsou započítány, neboť jsou předpokládaným vybavením laboratoře využívající metodiku.

Náklady na materiál a chemikálie potřebné na vyšetření jednoho vzorku dle uvedené metody*:

Položka	Obvyklá cena
Izolace DNA (cena kitu)	170 Kč
Spotřební materiál (špičky, zkumavky, sáčky, rukavice, destičky atd.)	100 Kč
PCR reakce (enzymy, všechny čtyři sady primerů a tři sondy)	80 Kč
Celkem	350 Kč

Kalkulace zahrnuje analýzu vzorku v duplikátu i průměrné náklady na pozitivní a negativní kontroly.

Náklady na pořízení drobného hmotného majetku nezbytného k provádění uvedené metody*:

Položka	Obvyklá cena
Centrifuga	45 000 Kč
Vortex	8 000 Kč
Analytické váhy	40 000 Kč
Sada pipet – 4 ks	30 000 Kč
Celkem	123 000 Kč

* Všechny ceny jsou aktuální k datu vydání metodiky a zahrnují DPH.

5.6. Ekonomický přínos pro uživatele metodiky

Paraziti způsobují u zvířat, která se volně se pohybují v honitbách nebo jsou chovaná v oborách a na farmách více či méně závažné infekce. Ty mohou u napadených jedinců významně ovlivňovat zdravotní stav, produkci (snížená mléčná a masná produkce, množství zvěřiny, kvalita trofejí apod.), reprodukční úspěch (zhoršení zabřezávání, zvýšená mortalita mláďat) a celkovou životní pohodu (welfare). Při posuzování vlivu parazitózy je vždy nutné zohlednit řadu faktorů jako především druh hostitele a dále jeho věk, intenzitu infekce, management honitby či chovu, environmentální i geografické podmínky a podobně. Situaci komplikuje fakt, že jeden hostitel může být běžně napadený hned několika různými druhy parazitů současně, kdy každý druh může vykazovat odlišnou míru patogenity. Rychlá a spolehlivá diagnostika je tedy klíčová pro pravidelné a koordinované monitorování výskytu veterinárně významných druhů parazitů. V návaznosti na to je možné provést opodstatněnou a cílenou léčbu i vhodně nastavit potřebná preventivní opatření.

Vytvořená metodika významně napomůže při spolehlivém odhalování nákazy způsobené invazní motolicí *F. magna* a to zejména u volně žijících přežvýkavců. Nejspolehlivější diagnostika fascioloidózy je v současné době založena na parazitologické pitvě jater, která je však podmíněná smrtí vyšetřovaného zvířete, což není v mnoha případech žádoucí. Intravitální diagnostika se provádí většinou pomocí pracného a časově náročného vyšetřování výkalů sedimentační metodou, nicméně pro přesné stanovení druhu je nutné provést další molekulární analýzy. Představená metodika zahrnuje také nový standardizovaný postup detekce DNA tohoto druhu motolice přímo z výkalů specifických definitivních hostitelů, a to pomocí jedнокrokové nested qPCR. Věříme, že relativně nízké náklady nutné na vyšetření jednoho vzorku a jednoduchost celého procesu přispějí k zavedení tohoto testu do diagnostické praxe. Díky tomu se ušetří nejen čas (analýza 96 reakcí zároveň), ale i náklady spojené s testem, protože zmíněný diagnostický přístup umožňuje simultánně detekovat mimo *F. magna* i další gastrointestinální parazity (např. motolicí *D. dendriticum*).

Právě invazní motolice *F. magna* patří mezi významné patogenní parazity, kteří u zvěře vyvolávají infekce s výrazně negativním dopadem, což se promítá do celkové ekonomiky chovu. Přímé ztráty na jednom kusu zvěře v důsledku fascioloidózy lze odhadnout na 800 – 1 000 Kč (snížená kvantita i kvalita zvěřiny; parazitovaná játra je vždy potřeba celá konfiskovat) a řádově na nižší desítky tisíc Kč v případě úhynu kvalitní trofejní zvěře na tuto parazitózu. V intenzivních chovech zvěře (obory a farmy) pak náklady ještě narůstají díky

snazšímu šíření parazita. Zvěř infikovanou *F. magna* lze léčit s využitím medikovaných krmných směsí s anthelmintiky. Úspěšně provedený antiparazitární zásah ve farmových chovech zvěře tak může, podle velikosti chovu a po odečtení nákladů na léčivo, představovat finanční zisk i v hodnotách vyšších desítek tisíc Kč a v oborách s poplatkovým lovem může být tento zisk ještě výraznější. Avšak praktická účinnost tohoto zásahu je v plošném měřítku a z dlouhodobého hlediska diskutabilní. Včasné odhalení parazita a zabránění rozvoje fascioloidózy, respektive prevence zavlečení *F. magna* do intenzivního chovu zvěře patří mezi klíčová opatření, která mohou ušetřit značné finance. Ekonomická nákladnost preventivních opatření (např. monitoring motolice *F. magna* a zamezení přístupu zvěře k rizikovým oblastem jejího výskytu) sice mohou, v závislosti na velikosti honitby či obory, respektive farmy, dosáhnout 4 000 – 5 000 Kč, ale v konečném důsledku mohou ušetřit i nižší stovky tisíc Kč v důsledku úhynů trofejních kusů zvěře na tuto invazní parazitózu a udržet tak rentabilitu chovu zvěře.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Arundel, J. H., & Hamir, A. N. (1982). *Fascioloides magna* in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 58, 35–36.
- Bazsalovicsová, E., Králová-Hromadová, I., Špakulová, M., Reblánová, M., & Oberhauserová, K. (2010). Determination of ribosomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) interspecific markers in *Fasciola hepatica*, *Fascioloides magna*, *Dicrocoelium dendriticum* and *Paramphistomum cervi* (Trematoda), parasites of wild and domestic ruminants. *Helmintologia*, 47, 76–82.
- Bazsalovicsová, E., Králová-Hromadová, I., Štefka, J., Minárik, G., Bokorová, S., & Pybus, M. (2015). Genetic interrelationships of North American populations of giant liver fluke *Fascioloides magna*. *Parasites & Vectors*, 8, 288.
- Bazsalovicsová, E., Špakulová, M., Juhásová, L., Miholics, Š., Rajský, D., & Králová-Hromadová, I. (2016). A long-term survey of *Fascioloides magna* in red deer (*Cervus elaphus*) in Slovakia (Danube floodplain forests) during the period of 2005 – 2015. *Helmintologia*, 53, 243–247.
- Becker, A. C., Kraemer, A., Epe, C., & Strube, C. (2016). Sensitivity and efficiency of selected coproscopical methods-sedimentation, combined zinc sulfate sedimentation-flotation, and McMaster method. *Parasitology Research*, 115, 2581–2587.
- Blair, D., & McManus, D. P. (1989). Restriction enzyme mapping of ribosomal DNA can distinguish between fasciolid (liver fluke) species. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 36, 201–208.
- Blažek, K., & Gilka, F. (1970). Contribution to the knowledge of the pigment found in infection with *Fascioloides magna*. *Folia Parasitologica*, 17, 165–170.
- Boomker, J., & Dale-Kuys, J. C. (1977). First report of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 44, 49–52.
- Boray, J. C. (1969). Experimental fascioliasis in Australia. *Advances in Parasitology*, 7, 95–210.
- Boray, J. C., & Pearson, I. G. (1960). The anthelmintic efficiency of tetrachlorodifluoroethane in sheep infested with *Fasciola hepatica*. *Australian Veterinary Journal*, 36, 331–337.
- Böhm, M., White, P. C., Daniels, M. J., Allcroft, D. J., Munro, R., & Hutchings, M. R. (2006). The health of wild red and sika deer in Scotland: an analysis of key endoparasites and recommendations for monitoring disease. *Veterinary Journal*, 171, 287–294.
- Campbell, W. C. (1960). Nature and possible significance of the pigment in fascioloidiasis. *Journal of Parasitology*, 46, 769–775.
- Chroustová, E. (1979). Experimental Infection of *Lymnaea palustris* snails with *Fascioloides magna*. *Veterinary Parasitology*, 5, 57–64.
- Conboy, G. A., O'Brien, T. D., & Stevens, D. L. (1988). A natural infection of *Fascioloides magna* in a llama (*Lama glama*). *Journal of Parasitology*, 74, 345–346.
- Conboy, G. A., & Stromberg, B. E. (1991). Hematology and clinical pathology of experimental *Fascioloides magna* infection in cattle and guinea pigs. *Veterinary Parasitology*, 40, 241–255.
- Conceição, M. A., Durão, R. M., Costa, I. H., & da Costa, J. M. (2002). Evaluation of a simple sedimentation method (modified McMaster) for diagnosis of bovine fascioliasis. *Veterinary Parasitology*, 105, 337–343.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., & Genchi, C. (2006). A dual anthelmintic treatment strategic scheme for the control of fasciolosis in dairy sheep farms. *Parasitology Research*, 99, 700–705.

- Crossland, N. O. (1976). The effect of the molluscicide N-tritylmorpholine on transmission of *Fasciola hepatica*. *Veterinary Record*, 98, 45–48.
- Cwiklinski, K., McEvoy, A., López Corrales, J., Jewhurst, H., Calvani, N. E. D., De Marco Verissimo, C., Dorey, A. L., Keane, O. M., Dalton, J. P., & Lalor, R. (2023). *Fasciola hepatica* antioxidant and protease-inhibitor cocktail recombinant vaccines administered five times elicit potent and sustained immune responses in sheep but do not confer protection. *Veterinary Parasitology*, 323, 110049.
- Demiaszkiewicz, A. W., Kuligowska, I., Pyziel, A. M., Lachowicz, J., & Kowalczyk, R. (2015). Extension of occurrence area of the American fluke *Fascioloides magna* in south-western Poland. *Annals of Parasitology*, 61, 93–96.
- Dunkel, A. M., Rognlie, M. C., Johnson, G. R., & Knapp, S. E. (1996). Distribution of potential intermediate hosts for *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* in Montana, USA. *Veterinary Parasitology*, 62, 63–70.
- Erhardová-Kotrlá, B. (1971). The occurrence of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) in Czechoslovakia. Prague; *Academia*, 155.
- Fairweather, I., & Boray, J. C. (1999). Fasciolicides: efficacy, actions, resistance and its management. *Veterinary Journal*, 158, 81–112.
- Faltýnková, A., Horáčková, E., Hirtová, L., Novobilský, A., Modrý, D., & Scholz, T. (2006). *Radix peregra* a new intermediate host of *Fascioloides magna* (Trematoda) in Europe? Field and experimental evidence. *Acta Parasitologica*, 51, 87–90.
- Filip-Hutsch, K., Pyziel-Serafin, A. M., Hutsch, T., Bulak, K., Czopowicz, M., Merta, D., Kobielski, J., & Demiaszkiewicz, A. W. (2022). The occurrence of *Fascioloides Magna* (Bassi, 1875) in the wild cervid population in the Lower Silesian Wilderness - Epidemiological and pathological aspects. *Journal of Veterinary Research*, 66, 381–387.
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008a). Cutting sections of paraffin-embedded tissues. CSH Protocols, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008b). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. CSH Protocols, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008c). Paraffin embedding tissue samples for sectioning. CSH Protocols, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Flirijančić, T., Opačak, A., Marinculić, A., Janicki, Z., Puškadija, Z., Bošković, I., & Antunović, B. (2007). Occurrence of fascioloidosis in red deer (*Cervus elaphus*) in Baranjaregion in eastern Croatia. *Agriculture*, 13, 226–229.
- Foreyt, W. J. (1988). Evaluation of clorsulon against immature *Fascioloides magna* in cattle and sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 49, 1004–1006.
- Foreyt, W. J. (1996). Susceptibility of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) to experimentally-induced *Fascioloides magna* infections. *Journal of Wildlife Diseases*, 32, 556–559.
- Foreyt, W. J., & Todd, A. C. (1974). Efficacy of radoxanide and oxcyclozanide against *Fascioloides magna* in naturally infected cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 35, 375–377.
- Foreyt, W. J., & Todd, A. C. (1976). Development of the large American liver fluke, *Fascioloides magna*, in white-tailed deer, cattle, and sheep. *Journal of Parasitology*, 62, 26–32.
- Foreyt, W. J., & Todd, A. C. (1972). The occurrence of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica* together in the livers of naturally infected cattle in south Texas, and the incidence of the flukes in cattle, white-tailed deer, and feral hogs. *Journal of Parasitology*, 58, 1010–1011.

- Glöer, P., & Sîrbu, I. (2005). New freshwater molluscs species found in the Romanian fauna. *Heldia*, 6, 229–238.
- Grabner, D. S., Mohamed, F. A., Nachev, M., Méabed, E. M., Sabry, A. H., & Sures, B. (2014). Invasion biology meets parasitology: a case study of parasite spill-back with Egyptian *Fasciola gigantica* in the invasive snail *Pseudosuccinea columella*. *PLoS One*, 9, e88537.
- Haider, M., Hörweg, C., Liesinger, K., Sattmann, H., & Walochnik, J. (2012). Recovery of *Fascioloides magna* (Digenea) population in spite of treatment programme? Screening of *Galba truncatula* (Gastropoda, Lymnaeidae) from Lower Austria. *Veterinary Parasitology*, 187, 445–451.
- Halasz, T., Tari, T., Nagy, E., Nagy, G., & Cshivicsik, A. (2023). Hatchability of *Fascioloides magna* eggs in cervids. *Pathogens*, 12, 741.
- Hammami, H., Mezghani-Jarraya, R., Damak, M., & Ayadi, A. (2011). Molluscicidal activity of various solvent extracts from *Solanum nigrum* var. *villosum* L. aerial parts against *Galba truncatula*. *Parasite*, 18, 63–70.
- Houszka, M., Piekarska, J., Podkowik, M., Gorczykowski, M., & Bania, J. (2016). Morphology and molecular study of *Fascioloides magna* – a growing threat to cervids (Cervidae) in Poland. *Journal of Veterinary Research*, 60, 435–439.
- Huňová, K., Kašný, M., Hampl, V., Leontovyč, R., Kuběna, A., Mikeš, L., & Horák, P. (2012). *Radix* spp.: Identification of trematode intermediate hosts in the Czech Republic. *Acta Parasitologica*, 57, 273–284.
- Hörweg, C., Prosl, H., Wille-Piazzai, W., Joachim, A., & Sattmann, H. (2011). Prevalence of *Fascioloides magna* in *Galba truncatula* in the Danube backwater area east of Vienna, Austria. *Wiener tierärztliche Monatsschrift*, 98, 261–267.
- Janicki, Z., Konjević, D., & Severin, K. (2005). Monitoring and treatment of *Fascioloides magna* in semi-farm red deer husbandry in Croatia. *Veterinary Research Communications*, 29, 83–88.
- Juhász, A., & Majoros, G. (2023). A proposed ectochory of *Galba truncatula* snails between wallow sites enhances transmission of *Fascioloides magna* at gemenc, in Hungary. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 21, 219–223.
- Juhász, A., & Stothard, J. R. (2023). The giant liver fluke in Europe: A review of *Fascioloides magna* within cervids and livestock with considerations on an expanding snail-fluke transmission risk. *Advances in Parasitology*, 119, 223–257.
- Karamon, J., Larska, M., Jasik, A., & Sell, B. (2015). First report of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*) infection in farmed fallow deer (*Dama dama*) in Poland - pathomorphological changes and molecular identification. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 59, 339–344.
- Kaufmann, J. (1996). Parasites of Cattle. In: Parasitic infections of domestic animals. A diagnostic manual. *Birkhäuser, Basel*.
- Kašný, M., Beran, L., Siegelová, V., Siegel, T., Leontovyč, R., Beránková, K., Pankrác, J., Košťáková, M., & Horák, P. (2012). Geographical distribution of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*) in the Czech Republic and potential risk of its further spread. *Veterinární Medicína*, 57, 101–109.
- Konjević, D., Bujanić, M., Beck, A., Beck, R., Martinković, F., & Janicki, Z. (2021). First record of chronic. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 15, 173–176.
- Konjević, D., Bujanić, M., Erman, V., Gudan Kurilj, A., Živičnjak, T., Severin, K., Tomić, S., & Martinković, F. (2017). New data on wild boar (*Sus scrofa* L.) a dead-end host for large American liver fluke (*Fascioloides magna*). *Helminthologia*, 54, 77–80.

- Konjević, D., Janicki, Z., Calmels, P., Jan, D. S., Marinculić, A., Šimunović, M., Pavlak, M., Krapinec, K., & Poljak, Z. (2018). Evaluation of factors affecting the efficacy of treatment against *Fascioloides magna* in wild red deer population. *Veterinaria italiana*, *54*, 33–39.
- Králová-Hromadová, I., Bazsalovicsová, E., Štefka, J., Špakulová, M., Vávrová, S., Szemes, T., Tkach, V., Trudgett, A., & Pybus, M. (2011). Multiple origins of European populations of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae), a liver parasite of ruminants. *International Journal for Parasitology*, *41*, 373–383.
- Králová-Hromadová, I., Špakulová, M., Horáčková, E., Turčeková, L., Novobilský, A., Beck, R., Koudela, B., Marinculić, A., Rajský D., & Pybus, M. (2008). Sequence analysis of ribosomal and mitochondrial genes of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae): Intraspecific variation and differentiation from *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology*, *94*, 58–67.
- Kuleš, J., Lovrić, L., Gelemanović, A., Beer Ljubić, B., Rubić, I., Bujanić, M., & Konjević, D. (2021). Complementary liver and serum protein profile in wild boars infected by the giant liver fluke *Fascioloides magna* using tandem mass tags quantitative approach. *Journal of Proteomics*, *247*, 104332.
- Leontovych, R., Košťáková, M., Siegelová, V., Melounová, K., Pankrác, J., Vrbová, K., Horák, P., & Kašný, M. (2014). Highland cattle and *Radix labiata*, the hosts of *Fascioloides magna*. *BMC Veterinary Research*, *10*, 41.
- Lockyer, A. E., Jones, C. S., Noble, L. R., & Rollinson, D. (2004). Trematodes and snails: an intimate association. *Canadian Journal of Zoology*, *82*, 251–269.
- Lorenzo, M., Ramiriz, P., Mendez, M., Alonso, M., & Ramos, R. (1989). Reporte de *Fascioloides magna*, Bassi, 1875, parasitando un wapiti (*Cervus canadensis*) en Cuba. *Revista cubana de ciencias veterinarias*, *20*, 263–266.
- Lotfy, W. M., Brant, S. V., DeJong, R. J., Le, T. H., Demiaszkiewicz, A., Rajapakse, R. P., Perera, V. B., Laursen, J. R., & Loker, E. S. (2008). Evolutionary origins, diversification, and biogeography of liver flukes (Digenea, Fasciolidae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *79*, 248–255.
- Loyacano, A. F., Williams, J. C., Gurie, J., & DeRosa, A. A. (2002). Effect of gastrointestinal nematode and liver fluke infections on weight gain and reproductive performance of beef heifers. *Veterinary Parasitology*, *107*, 227–234.
- Majoros, G., & Sztojkov, V. (1994). Appearance of the large American liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) (Trematoda: Fasciolata) in Hungary. *Parasitologia Hungarica*, *27*, 27–38.
- Malcicka, M. (2015). Life history and biology of *Fascioloides magna* (Trematoda) and its native and exotic hosts. *Ecology and Evolution*, *5*, 1381–1397.
- Marinculić, Džakula, N., Janicki, Z., Hardy, Z., Lučinger, S., & Živičnjak, T. (2002). Appearance of American liver fluke (*Fascioloides magna*, Bassi, 1875) in Croatia - a case report. *Veterinarski arhiv*, *72*, 319–325.
- Mathewos, M., Endale, H., & Kebamo, M. (2023). Coprological and postmortem assessment and economic significance of bovine fasciolosis in cattle slaughtered at Tarcha Municipal Abattoir, Southern Ethiopia. *Parasite Epidemiology and Control*, *22*, e00316.
- Mathieu, A., Thacker, C., Teske, I., Jenkins, E., Wagner, B., Macbeth, B., Raverty, S., & Pybus, M. (2022). *Fascioloides magna* in free-ranging rocky mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis*). *Journal of Wildlife Diseases*, *58*, 592–598.

- McClanahan, S. L., Stromberg, B. E., Hayden, D. W., Averbeck, G. A., & Wilson, J. H. (2005). Natural infection of a horse with *Fascioloides magna*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *17*, 382–385.
- Mezghani-Jarraya, R., Hammami, H., Ayadi, A., & Damak, M. (2009). Molluscicidal activity of *Hammada scoparia* (Pomel) Iljin leaf extracts and the principal alkaloids isolated from them against *Galba truncatula*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *104*, 1035–1038.
- Mikel, P., Vašíčková, P., Tesařík, R., Malenovská, H., Kulich, P., Veselý, T., & Králík, P. (2016). Preparation of MS2 phage-like particles and their use a potential process control viruses for detection and quantification of enteric RNA viruses in different matrices. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1911.
- Mirčeta, J., Pelić, M., Božić, B., Petrović, J., Urošević, M., Stankov, B., & Bugarski, D. (2018). Prevalence of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*, bassi, 1875) in red deer (*Cervus elaphus*) in the region of floodplain forests of northern Serbia. *Archives of Veterinary Medicine*, *11*, 17–26.
- Murray, D. L., Cox, E. W., Ballard, W. B., Whitlaw, H. A., Lenarz, M. S., Custer, T. W., Barnett, T. & Fuller, T. K. (2006). Pathogens, nutritional deficiency, and climate influences on a declining moose population. *Wildlife Monographs*, *166*, 1–30.
- Ndlela, B., & Chimbari, M. J. (2000). A preliminary assessment of the potential of the Muschovy duck (*Cairina maschata*) as a biocontrol agent of schistosomiasis intermediate host snails. *Central African Journal of Medicine*, *46*, 271–275.
- Novobilský, A., Horáčková, E., Hirtová, L., Modrý, D., & Koudela, B. (2007). The giant liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi 1875) in cervids in the Czech Republic and potential of its spreading to Germany. *Parasitology Research*, *100*, 549–553.
- Novobilský, A., Kašný, M., Mikeš, L., Kovařík, K., & Koudela, B. (2007). Humoral immune responses during experimental infection with *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica* in goats and comparison of their excretory/secretory products. *Parasitology Research*, *101*, 357–364.
- Novobilský, A., Kašný, M., Pankrác, J., Rondelaud, D., Engström, A., & Höglund, J. (2012). *Lymnaea fuscus* (Pfeiffer, 1821) as a potential intermediate host of *Fascioloides magna* in Europe. *Experimental Parasitology*, *132*, 282–286.
- Novobilský, A., & Koudela, B. (2005). Terapie a prevence fascioloidózy spárkaté zvěře – review. *Veterinářství*, *55*, 98–102.
- Pecoraro, H. L., Stenger, B. L. S., Rice, L. E., & Webb, B. T. (2022). Gross and histologic description of trematodosis in fetal and neonatal beef calves in North Dakota and Minnesota. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *34*, 870–873.
- Phiri, A. M., Phiri, I. K., Sikasunge, C. S., Chembensofu, M., & Monrad, J. (2006). Comparative fluke burden and pathology in condemned and non-condemned cattle livers from selected abattoirs in Zambia. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, *73*, 275–281.
- Plötz, C., Rehbein, S., Bamler, H., Reindl, H., Pfister, K., & Scheuerle, M. C. (2015). *Fascioloides magna* – epizootiology in a deer farm in Germany. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, *128*, 177–182.
- Prchal, L., Vokrál, I., Kašný, M., Rejšková, L., Zajíčková, M., Lamka, J., Skálová, L., Lecová, L., & Szotáková, B. (2016). Metabolism of drugs and other xenobiotics in giant liver fluke (*Fascioloides magna*). *Xenobiotica*, *46*, 132–140.
- Prepelitchi, L., Kleiman, F., Pietrokovsky, S. M., Moriena, R. A., Racioppi, O., Alvarez, J., & Wisnivesky-Colli, C. (2003). First report of *Lymnaea columella* Say, 1817 (Pulmonata: Lymnaeidae) naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, *98*, 889–891.

- Presidente, P. J., McCraw, B. M., & Lumsden, J. H. (1980). Pathogenicity of immature *Fascioloides magna* in white-tailed deer. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 44, 423–432.
- Pruvot, M., Lejeune, M., Kutz, S., Hutchins, W., Musiani, M., Massolo, A., & Orsel, K. (2016). Better alone or in ill company? The effect of migration and inter-species comingling on *Fascioloides magna* infection in elk. *PLoS One*, 11, e0159319.
- Pursglove, S. R., Prestwood, A. K., Ridgeway, T. R., & Hayes, F. A. (1977). *Fascioloides magna* infection in white-tailed deer of southeastern United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 171, 936–938.
- Pybus, M. J. (1990). Survey of hepatic and pulmonary helminths of wild cervids in Alberta, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 26, 453–459.
- Pybus, M. J. (2001). Liver Flukes. In: *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. Iowa State University Press.
- Pybus, M. J., Butterworth, E. W., & Woods, J. G. (2015). An expanding population of the giant liver fluke (*Fascioloides magna*) in elk (*Cervus canadensis*) and other ungulates in Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, 51(2), 431–445.
- Qureshi, T., Craig, T. M., Drawe, D. L., & Davis, D. S. (1989). Efficacy of triclabendazole against fascioloidiasis (*Fascioloides magna*) in naturally infected white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 25, 378–383.
- Qureshi, T., Drawe, D. L., Davis, D. S., & Craig, T. M. (1994). Use of bait containing triclabendazole to treat *Fascioloides magna* infections in free ranging white-tailed deer. *Journal of Wildlife Diseases*, 30, 346–350.
- Qureshi, T., Wagner, G. G., Drawe, D. L., Davis, D. S., & Craig, T. M. (1995). Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis of excretory-secretory proteins of *Fascioloides magna* and *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 58, 357–363.
- Radvanský, J., Bazsalovicsová, E., Králová-Hromadová, I., Minárik, G., & Kádaši, L. (2011). Development of high-resolution melting (HRM) analysis for population studies of *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae), the giant liver fluke of ruminants. *Parasitology Research*, 108, 201–209.
- Rajský, D., Čorba, J., Várady, M., Špakulová, M., & Cabadaj, R. (2002). Control of fasciolosis (*Fascioloides magna* Bassi, 1875) in red deer and roe deer. *Helmintologia*, 39, 67–70.
- Rapsch, C., Schweizer, G., Grimm, F., Kohler, L., Bauer, C., Deplazes, P., Barun, U., & Torgerson, P. R. (2006). Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *International Journal for Parasitology*, 36, 1153–1158.
- Rehbein, S., & Visser, M. (2022). Sika deer (*Cervus nippon*) are not "dead-end hosts" of the Giant liver fluke, *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) Ward, 1917. *Journal of Wildlife Diseases*, 58, 194–197.
- Rehbein, S., Visser, M., Hamel, D., & Reindl, H. (2021). Occurrence of the giant liver fluke, *Fascioloides magna*, in sympatric wild ungulates in one area in the Upper Palatinate Forest (northeastern Bavaria, Germany). *Parasitology Research*, 120, 553–561.
- Reiss, A. K. (2021). Der Amerikanischer Riesenleberegel (*Fascioloides magna*) im Gebiet Donau-Auen – eine Analyse nach Absetzen des Entwurmungsregimes *Veterinärmedizinische Universität Wien*.
- Reslová, N., Škorpíková, L., Kyriánová, I. A., Vadlejch, J., Höglund, J., Skuce, P., & Kašný, M. (2021). The identification and semi-quantitative assessment of gastrointestinal nematodes in faecal samples using multiplex real-time PCR assays. *Parasites & Vectors*, 14, 391.

- Rinaldi, L., Biggeri, A., Musella, V., De Waal, T., Hertzberg, H., Mavrot, F., Torgerson, P. R., Selemetas, N., Coll, T., Bosco, A., Grissoto, L., Cringoli, G., & Catelan, D. (2015). Sheep and *Fasciola hepatica* in Europe: the GLOWORM experience. *Geospatial Health*, 9, 309–317.
- Rondelaud, D., Novobilský, A., Vignoles, P., Treuil, P., Koudela, B., & Dreyfuss, G. (2006a). First studies on the susceptibility of *Omphiscola glabra* (Gastropoda: Lymnaeidae) from central France to *Fascioloides magna*. *Parasitology Research*, 98, 299–303.
- Rondelaud, D., Vignoles, P., Dreyfuss, G., & Mage, C. (2006b). The control of *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae) by the terrestrial snail *Zonitoides nitidus* on acid soils. *Biological control*, 39, 290–299.
- Sargison, N. D., Shahzad, K., Mazeri, S., & Chaudhry, U. (2019). A high throughput deep amplicon sequencing method to show the emergence and spread of *Calicophoron daubneyi* rumen fluke infection in United Kingdom cattle herds. *Veterinary Parasitology*, 268, 9–15.
- Severin, K., Martinković, F., Janicki, Z., Marinculić, A., Slavica, A., Žele, D., Vengušt, G., Džaja, P., & Konjević, D. (2015). Indirect ELISA and Western blotting as tools to diagnose fascioloidosis in a population of free-ranging red deer (*Cervus elaphus*). *Veterinarski arhiv*, 85, 563–576.
- Severin, K., Mašek, T., Janicki, Z., Konjević, D., Slavica, A., Marinculić, A., Martinković, F., Vengušt, G., & Džaja, P. (2012). Liver enzymes and blood metabolites in a population of free-ranging red deer (*Cervus elaphus*) naturally infected with *Fascioloides magna*. *Journal of Helminthology*, 86, 190–196.
- Shury, T. K., Pybus, M. J., Nation, N., Cool, N. L., & Rettie, W. J. (2019). *Fascioloides magna* in Moose (*Alces alces*) from Elk Island National Park, Alberta. *Veterinary Pathology* 56, 476–485.
- Slavica, A., Florijančić, T., Janicki, Z., Konjević, D., Severin, K., Marinculić, A., & Pintur, K. (2006). Treatment of fascioloidosis (*Fascioloides magna*, Bassi, 1875) in free ranging and captive red deer (*Cervus elaphus* L.) at eastern Croatia. *Veterinarski arhiv*, 76, 9–18.
- Sommer, M. F., Drdlicek, J., Müller, M., Thelemann, A., & Just, F. T. (2022). *Fascioloides magna* and other liver parasites in cloven-hoofed game from northeastern Bavaria, Germany: occurrence and pathological findings with special emphasis on red deer (*Cervus elaphus*). *European Journal of Wildlife Research*, 68, 73.
- Stiles, C., Bujanić, M., Martinković, F., Šošarić Zuckermann, I.-C., & Konjević, D. (2021). Severe pulmonary fascioloidosis in a wild Mouflon (*Ovis musimon*) - a case report. *Helminthologia*, 58, 394–399.
- Sukhdeo, M. V., & Sukhdeo, S. C. (2002). Fixed behaviours and migration in parasitic flatworms. *International Journal for Parasitology*, 32, 329–342.
- Swales, W. (1935). The life cycle of *Fascioloides magna* (Bassi, 1875), the large liver fluke of ruminants in Canada with observations on the bionomics of the larval stages and the intermediate hosts, pathology of *fascioloidiasis magna*, and control measures. *Canadian Journal of Research*, 12, 177–215.
- Šefrová, H., & Laštůvka, Z. (2005). Catalogue of alien animal species in the Czech Republic. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 4, 151–170.
- Thienpont, D., Rochete, F., & Vanprijjs, O. F. (2003). Diagnosing helminthiasis through coprological examination. *Jansen animal health*.
- Trailović, S. M., Marinković, D., & Kulišić, Z. (2016). Diagnosis and therapy of liver fluke (*Fascioloides magna*) infection in fallow deer (*Dama dama*) in Serbia. *Journal of Wildlife Diseases*, 52, 319–326.

- Vaca, D., & Kašný, M. (2012). Motoličnatost spárkaté zvěře stále aktuální. *Svět myslivosti*, 5, 18–21.
- Valero, M. A., Perez-Crespo, I., Periago, M. V., Khoubbane, M., & Mas-Coma, S. (2009). Fluke egg characteristics for the diagnosis of human and animal fascioliasis by *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Acta Tropica*, 111, 150–159.
- Vannatta, J. T., & Moen, R. (2016). Distribution of lymnaeid snail hosts of the giant liver fluke in Northeastern Minnesota. Technical Report. *University of Minnesota Duluth*.
- Vignoles, P., Dreyfuss, G., & Rondelaud, D. (2018). Consequences of invasion by *Pseudosuccinea columella* on the dynamics of native lymnaeids living on the acid soils of central France. *Molluscan Research*, 38, 287–295.
- Vignoles, P., Novobilský, A., Rondelaud, D., Bellet, V., Treuil, P., Koudela, B., & Dreyfuss, G. (2006). Cercarial production of *Fascioloides magna* in the snail *Galba truncatula* (Gastropoda: Lymnaeidae). *Parasitology research*, 98, 462–467.
- Wang, J., Cai, K., Zhang, R., He, X., Shen, X., Liu, J., Xu, J., Qiu, F., Lei, W., Wang, J., Li, X., Gao, Y., Jiang, Y., Xu, W., & Ma, X. (2020). Novel one-step single-tube nested quantitative real-time PCR assay for highly sensitive detection of SARS-CoV-2. *Analytical Chemistry*, 92, 9399–9404.
- Wolf-Spengler, M. L., & Isseroff, H. (1983). Fascioliasis: bile duct collagen induced by proline from the worm. *Journal of Parasitology*, 69, 290–294.
- Zafra, R., Buffoni, L., Pérez-Caballero, R., Molina-Hernández, V., Ruiz-Campillo, M. T., Pérez, J., Martínez-Moreno, Á., & Martínez-Moreno, F. J. (2021). Efficacy of a multivalent vaccine against *Fasciola hepatica* infection in sheep. *Veterinary Research*, 52, 13.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ A DALŠÍCH VÝSLEDKŮ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Škorpíková, L., Ilgová, J., Vadlejch, J., Magdálek, J., Plhal, R., Drimaj, J., Mikulka, O., Kašný, M., & Reslová, N. (2023). Monitoring of alien parasites *Ashworthius sidemi* and *Fascioloides magna* in wild ruminants in the Czech republic using real-time PCR. *27th Helminthological Days*. ISBN 978-80-908308-3-7.
- Drimaj, J., Škorpíková, L., Ilgová, J., Kašný, M., Reslová, N., & Vadlejch, J. (2023) Motolice velká poznává Evropu. A pomalu se zabydluje... *Svět myslivosti: měsíčník pro myslivce a přátele přírody*, 24, 34-36. ISSN, 1212-8422.
- Reslová, N., Škorpíková, L., Kyriánová, I. A., Vadlejch, J., Höglund, J., Skuce, P., & Kašný, M. (2021). The identification and semi-quantitative assessment of gastrointestinal nematodes in faecal samples using multiplex real-time PCR assays. *Parasites & Vectors*, 14, 391. ISSN 1756-3305.

8. DEDIKACE

Uvedená certifikovaná metodika je výstupem projektu číslo SS05010070 s názvem: „Šíření invazních druhů parazitů a jejich drtivé dopady na biologickou rozmanitost původních druhů přežvýkavců“. Tento projekt je spolufinancován se státní podporou Technologické agentury ČR v rámci Programu Prostředí pro život.

Autoři publikace s vyjádřením podílů na vypracování metodiky

¹Mgr. Lucie Škorpíková, Ph.D. (podíl práce 70 %)

¹Mgr. et Mgr. Jana Ilgová, Ph.D. (podíl práce 10 %)

²doc. Ing. Jaroslav Vadlejch, Ph.D. (podíl práce 5 %)

¹RNDr. Martin Kašný, Ph.D. (podíl práce 5 %)

³Ing. Jakub Drimaj, Ph.D. (5 %)

¹Mgr. Nikol Reslová, Ph.D. (5 %)

¹Ústav botaniky a zoologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Česká republika

²Katedra zoologie a rybářství, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 00 Praha, Česká republika

³Ústav ochrany lesů a myslivosti, Lesnická a dřevařská fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika