

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA BIOCHEMICKÝCH VĚD



DIPLOMOVÁ PRÁCE

**ZAVEDENÍ DIAGNOSTIKY GASTROINTESTINÁLNÍCH
HLÍSTIC POMOCÍ RT-PCR**

Bc. KRISTÝNA BEZDÍČKOVÁ

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. PETRA MATOUŠKOVÁ, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2023

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí diplomové práce doc. Ing. Petře Matouškové, Ph.D. za výběr zajímavého tématu, její odborný dohled, cenné rady a poskytnuté materiály. Chtěla bych poděkovat také celé katedře biochemických věd za předané znalosti a možnost pracovat v jejich laboratořích na zajímavých experimentech.

Prohlášení

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, 2023

Bc. Kristýna Bezdíčková

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Kristýna Bezdíčková

Školitel: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Název diplomové práce: Zavedení diagnostiky gastrointestinálních hlístic pomocí RT-PCR

Gastrointestinální hlístice mohou způsobovat různě závažná onemocnění hospodářských zvířat. Jedinci bývají často nakaženi několika druhy parazitů najednou. Vzhledem k tomu, že symptomy bývají podobné, onemocnění se nazývá jako parazitická gastroenteritida. Nejen, že hlístice ohrožují zdraví zvířat, ale také mohou mít velký dopad na ekonomiku celé farmy. Diagnostika nebývá jednoduchá. Kromě morfologických a koprologických metod je možné využít biochemickou či molekulární analýzu, která bývá citlivější a přesnější.

V našem případě jsme zkoušeli diagnostikovat gastrointestinální hlístice pomocí molekulární metody RT-PCR. V diplomové práci jsme se zaměřili na 6 druhů hlístic (*Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus spp.*, *Nematodirus battus*, *Chabertia ovina* a *Ashworthius sidemi*). Materiálem byly vzorky trusu od ovcí, ze kterých jsme vyizolovali gDNA. Kontrolním materiálem byla gDNA získaná z vajíček *H. contortus* a gDNA získaná z celých těl parazitů. Zkoušena byla RT-PCR s využitím fluorescenčního barviva SYBR Green I a TaqMan sondy. Výsledky analýzy s využitím barviva SYBR Green I i TaqMan sondy byly v korelaci. Ve zkoušce zkřížené reaktivity primery Hco ITS2 určené pro *H. contortus* ovšem amplifikovaly také gDNA jiných parazitů. Ostatní primery amplifikovaly zejména gDNA té hlístice, na kterou byly navrženy. Kromě primerů Hco ITS2 byly testovány také referenční geny GAPDH, NCBP a FARB, které se ukázaly jako nevhodné pro tento typ stanovení.

Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Kristýna Bezdíčková

Supervisor: doc. Ing. Petra Matoušková, Ph.D.

Title of diploma thesis: Implementation of the diagnosis of gastrointestinal nematodes using RT-PCR

Gastrointestinal nematodes can cause various diseases in farm animals. Individuals are often infected with several types of parasites at once. Since the symptoms tend to be similar, the disease is called parasitic gastroenteritis. Not only do nematodes threaten the animal health, but they can also have a major impact on the economy of the entire farm. Diagnosis is not always easy. In addition to morphological and coprological methods, biochemical or molecular analysis can be used, which tends to be more sensitive and accurate.

We tried to diagnose gastrointestinal nematodes using the molecular RT-PCR method. In the thesis we focused on 6 species of nematodes (*Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus spp.*, *Nematodirus battus*, *Chabertia ovina* and *Ashworthius sidemi*). The material used was feces samples from sheep from which we isolated gDNA. The control material was gDNA isolated from *H. contortus* eggs and gDNA obtained from whole parasite bodies. RT-PCR was tested using the fluorescent dye SYBR Green I and TaqMan probe. The results of the analysis using the dye SYBR Green I and the TaqMan probe were correlated. However, in the cross-reactivity test, the Hco ITS2 primers designed for *H. contortus* also amplified the gDNA of other parasites. The other primers mainly amplified the gDNA of the nematode for which they were designed. In addition to the Hco ITS2 primers, the reference genes GAPDH, NCBP and FARB were also tested, but turned out to be unsuitable for this type of determination.

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Teoretická část.....	10
2.1 Paraziti ovcí.....	10
2.1.1 <i>Haemonchus contortus</i> (Vlasovka slezová).....	12
2.1.2 <i>Teladorsagia circumcincta</i>	17
2.1.3 <i>Trichostrongylus</i>	18
2.1.4 <i>Nematodirus battus</i>	20
2.1.5 <i>Chabertia ovina</i>	21
2.1.6 <i>Ashworthius sidemi</i>	22
2.2 Diagnostika parazitóz	23
2.2.1 Klinické příznaky hemonchózy.....	23
2.2.2 Postmortální vyšetření.....	25
2.2.3 Koprologické vyšetření.....	26
2.2.4 Imunologické vyšetření.....	27
2.2.5 Molekulární vyšetření	28
3. Cíl práce.....	33
4. Experimentální část.....	34
4.1 Materiál	34
4.1.1 Biologický materiál.....	34
4.1.2 Chemikálie, reagentie, kity	34
4.2 Technické vybavení a pomůcky	35
4.2.1 Přístroje.....	35
4.2.2 Pomůcky.....	35
4.3 Pracovní postupy	36

4.3.1	Izolace vajíček <i>Haemonchus contortus</i> z trusu ovcí.....	36
4.3.2	Izolace gDNA z <i>Haemonchus contortus</i>	37
4.3.3	Izolace gDNA z celých těl parazitů	38
4.3.4	Zpracování výkalů a izolace gDNA	39
4.3.5	Real-Time PCR (RT-PCR)	40
4.3.6	TaqMan PCR.....	41
4.3.7	Stanovení účinnosti primeru Hco_ITS2.....	43
4.3.8	Stanovení účinnosti referenčních genů FARB, NCBP a GAPDH	44
4.3.9	Testování zkřížené reaktivity	45
4.3.10	Metoda EPG	46
5.	Výsledky	48
5.1	Izolace gDNA z vajíček a L1 larev <i>Haemonchus contortus</i>	48
5.2	Izolace gDNA ze vzorku trusu s testováním dvou způsobů homogenizace.....	48
5.3	Testování efektivity sady primerů Hco_ITS2	49
5.4	Testování zkřížené reaktivity primerů	51
5.4.1	Sada primerů Hco_ITS2.....	52
5.4.2	Sada primerů Tel_ITS2	53
5.4.3	Sada primerů Tri_ITS1.....	53
5.4.4	Sada primerů Cha_COI	54
5.5	Zkoušení TaqMan sondy.....	54
5.5.1	Efektivita TaqMan sondy	56
5.5.2	Testování zkřížené reaktivity při použití TaqMan sondy	57
5.6	Testování efektivity referenčních genů FARB, NCBP a GAPDH	58
5.7	Testování Hco_ITS2, FARB, NCBP a GAPDH.....	59
5.8	Porovnání RT-PCR s využitím SYBR Green I a TaqMan sondy	61
6.	Diskuze	63
7.	Závěr	67

8. Seznam použitých zkratk	68
9. Zdroje	69
10. Seznam obrázků	73
11. Seznam tabulek	74
12. Přílohy	75
12.1 Sekvence používaných prumerů	75

1. Úvod

Hospodářská zvířata bývají často napadena různými parazity, kteří mohou způsobit více či méně závažná onemocnění. Častými původci těchto onemocnění jsou gastrointestinální hlístice (GIN). Tyto hlístice, parazitující u hospodářských zvířat, patří do řádu Strongylida a čeledi Trichostrongylidae. Jedná se o nejpočetnější skupinu hlístic způsobující parazitickou gastroenteritidu, která je jednou z hlavních příčin snížené produktivity u ovcí a koz. Nákaza ve většině případů neohrožuje zvířata přímo na životě, ale spíše představuje závažný ekonomický problém pro chov. Infekce se vyskytuje v závislosti na teplotě a vlhkosti. V některých oblastech vykazuje sezónní charakter. Nejvíce jsou ohrožena mláďata, oslabení jedinci, zvířata s poruchou imunity nebo zvířata vystavená stresu. U nakažených jedinců se mohou v jejich trávicím traktu skrývat až tisíce červů, což následně vede ke zvýšené kontaminaci pastvy.

Jelikož tyto parazity disponují různými vlastnostmi a adaptačními mechanismy, není možná jejich úplná eradikace. Je důležité udržovat jejich množství na přijatelné úrovni. Parazitologické hlístice jsou kontrolovány zejména pomocí anthelmintické léčby, která nemůže být příliš finančně náročná, aby neovlivňovala celkovou ekonomiku chovu. K terapii bylo vyvinuto několik druhů syntetických anthelmintik, které mají různý mechanismus účinku. I tak se na ně poměrně ve velkém rozšířila anthelmintická rezistence (AR), která nyní představuje velký problém ve veterinární parazitologii.

Přežvýkavci ve většině případů bývají nakaženi několika druhy parazitů najednou. V tomto případě není diagnostika vůbec jednoduchá, neboť symptomy mohou být velmi podobné. Identifikace může být založena na morfologii hlístic. Jelikož však mezi jednotlivými parazity nejsou velké rozdíly, může být pro nezkušené jedince identifikace pomocí morfologických rysů obtížná. Tradiční metodou je koprologie, ani zde nejsou rozdíly mezi jednotlivými vajíčky nikterak velké. Byly proto postupem času vyvinuty dokonalejší techniky, které se opírají o biochemickou či molekulární analýzu.

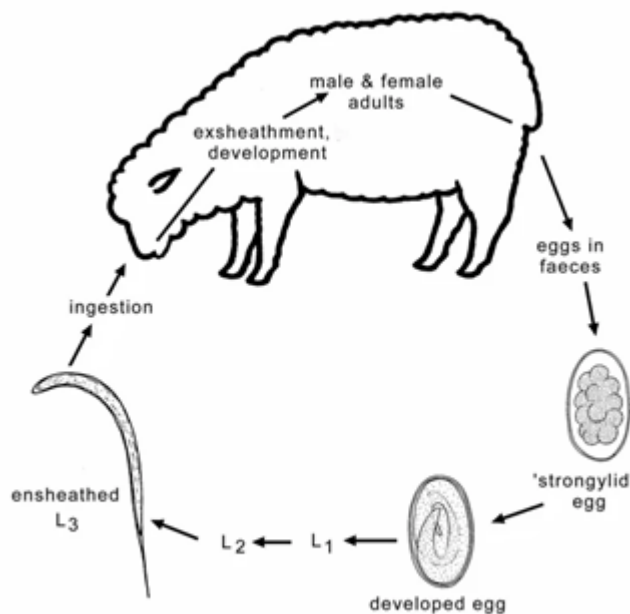
2. Teoretická část

2.1 Paraziti ovcí

Gastrointestinální hlístice mohou způsobovat závažná onemocnění všech hospodářských zvířat včetně ovcí. Pasoucí se přežvýkavci většinou bývají nakaženi několika druhy GIN najednou, což se poté projevuje zvýšenou závažností klinických příznaků. Kombinace těchto infekcí je považována za parazitickou gastroenteritidu. Míra nákazy je spjata s hustotou osazení pastvy či klimatickými podmínkami. Teploty a srážky mají přímý vliv na vývoj a přežití jednotlivých vývojových stádií hlístic. Manifestace onemocnění a jeho závažnost závisí také na imunitě a výživě konkrétního hostitele. Obecně platí, že závažnější klinické příznaky se vyskytují u zvířat, která mají v trávicím traktu větší nálož hlístic. Nejnáchylnější k propuknutí onemocnění jsou zejména tři velké skupiny zvířat; mladá s nevyvinutou imunitou, dospělá imunokompromitovaná a zvířata, která jsou vystavena velkému množství larev ve stádiu L3. Nákaza nemusí být však patrná ani při pravidelné kontrole zvířat, dokud se nerozvine do těžké klinické formy. Tito parazité nejen že znepríjemňují život samotných přežvýkavců, ale mají také významný vliv na produkci a způsobují celosvětově onemocnění velkého socioekonomického významu. Finanční a zemědělské ztráty způsobené parazity mají podstatný dopad na ziskovost celé farmy (Roeber et al., 2013; Vadlejch et al., 2018; Balic et al., 2000; Taylor, 2012; Zajac, 2006; O'Connor et al., 2006; Reslová et al., 2021).

Nejčastěji jsou malí přežvýkavci, zejména ovce a kozy, infikovány rody *Haemonchus*, *Teladorsagia* a *Trichostrongylus*. V menší míře parazitují na ovcích také zástupci rodů *Nematodirus* a *Cooperia* a zástupci nadčeledi Strongyloidea (např. rod *Chabertia*), kteří způsobují onemocnění pouze ve výjimečných případech. Všechny tyto druhy se řadí mezi GIN. Životní cykly těchto háďátek probíhají, až na výjimky (např. *Nematodirus spp.*), podobným způsobem. Většina druhů GIN má jednoduchý, přímý životní cyklus bez mezihostitele. Pohlavně dimorfní dospělí jedinci se nachází v trávicím traktu přežvýkavců. Oplodněné samice produkují velké množství vajíček, které se dostávají trusem ven z těla. Vajíčka strongylidů měřící obvykle 70–150 μm se líhnou během 1–2 dnů. V závislosti na klimatických podmínkách se v prostředí z vajíček nejprve líhnou larvy L1. Poté

se larvy vyvíjí v druhé stádium (L2) a třetí stádium (L3), které je vysoce infekční. Larvy ve stádiu L3 jsou zapouzdřené do pochvy. Pochva chrání larvy L3 před vnějšími nepříznivými podmínkami. Hostitel se infikuje požitím larev ve vysoce infekčním stádiu L3. Při průchodu žaludkem ztrácí L3 svůj ochranný obal a přechází, v závislosti na druhu, do histotropní fáze, než se vyvine ve stádium L4 a předdospělých stádií. V případě nepříznivých podmínek (např. na konci pastevního období) procházejí larvy obdobím zástavy vývoje, tzv. hypobiózy, která je typická pro rody *Haemonchus* a *Teladorsagia*. Hypobiotické larvy pak obnoví svou aktivitu a vývoj na jaře v případě rodu *Haemonchus* nebo na podzim v případě rodu *Teladorsagia* (Roeber et al., 2013; Reslová et al., 2021).



Obrázek 1: Životní cyklus GIN u malých přežvýkavců

Male and female adults – dospělí samečci a samičky, eggs in faeces – vajíčka ve výkalech, strongylid egg – strongylidní vajíčko, developed egg – vyvinuté vajíčko, L1 – larvy prvního stádia, L2 – larvy druhého stádia, ensheathed L3 – opouzdřené larvy třetího stádia, ingestion – pozření, exsheathment, development – odpouzdření, vývoj

(Roeber et al., 2013)

Parazitické hlístice hospodářských zvířat jsou kontrolovány především pomocí anthelmintické léčby. I při optimálně načasovaném ošetření je tento typ léčby poměrně nákladný, a ne vždy plně účinný. Nadměrné a časté používání anthelmintik navíc vedlo k podstatným problémům s anthelmintickou rezistencí v populaci hlístic. Rezistence vůči anthelmintickým sloučeninám u gastrointestinálních parazitů ovcí je v současné době velmi rozšířená a druhy rezistentní vůči jednomu a více lékům jsou běžné po celém světě. V evropských zemích se vyskytuje zejména rezistence vůči benzimidazolům (BZ). Je tedy zapotřebí celosvětově zvýšit zájem o vývoj lepších prostředků kontroly těchto parazitů (Roeber et al., 2013; Dolinská et al., 2014; Lanková et al., 2018).

2.1.1 *Haemonchus contortus* (Vlasovka slezová)

Rod *Haemonchus spp.* byl poprvé popsán v roce 1803 Karlem Rudolphim. Taxonomicky se řadí tento rod do nadčeledi Trichostrongylidae. Paraziti rodu *Haemonchus spp.* jsou spolu s rodem *Teladorsagia spp.* nejvíce patogenními hlísticemi malých přežvýkavců, avšak mohou infikovat také ostatní druhy hospodářských zvířat. Tento rod zahrnuje nejméně 12 druhů. Nejčastějšími druhy jsou *H. contortus* a *H. placei*. Zatímco první jmenovaný je typický parazit pasoucích se malých přežvýkavců, druhý jmenovaný infikuje zejména skot. *H. contortus* je globálně rozšířen a parazituje ve slezu již zmíněných malých přežvýkavců, ale i jiných nedomestikovaných přežvýkavců. Mezi méně časté druhy patří *H. similis* nebo *H. longistipes*, který byl popsán jako parazit velbloudů (Arsenopoulos et al., 2021).

H. contortus patří mezi krevsající parazity. Způsobuje onemocnění zvané hemonchóza. Infekce tímto parazitem vede k anémii, zejména kvůli jeho způsobu výživy, a následně dochází k příležitostné smrti infikovaných zvířat. Jeho životní cyklus je přímý a přenáší se na pastvě horizontálně pomocí larev L3. Má dvoufázový životní cyklus, žije volně a parazituje ve slezu hostitele. Podrobněji je životní cyklus popsán v kapitole 2.1 Paraziti ovcí. *Haemonchus spp.* má jedinečnou vlastnost, která se týká inhibovaného vývoje, nazývaného hypobióza. Tato vlastnost se aktivuje například v chladném počasí, kdy jsou omezené možnosti přenosu larev. Hypobióza se může objevit také při vysokých teplotách, kdy hrozí riziko sucha (Arsenopoulos et al., 2021).

2.1.1.1 Morfologie

Dospělý parazit má štíhlé, dopředu se zužující válcovité tělo. Malá ústní dutina je na dorzální straně vybavena výrazným zubem lancetového typu pro sání kapilární krve ze stěny hostitelova žaludku. Tělo hlístice má bělavě žlutou barvu, požitá krev mu však dodává načervenalý vzhled (Naeem et al., 2021).

U tohoto parazita je taky možné pozorovat poměrně výrazný pohlavní dimorfismus. Průměrná délka samice je 18–30 mm. Samec bývá štíhlejší a jeho průměrná délka se pohybuje v rozmezí 10–20 mm. U samic můžeme makroskopicky pozorovat ovinutou bílou dělohu kolem jejich červeného střeva, zatímco samci mají zcela červenou barvu. Dále samec nese laločnatou genitální burzu na konci ocasu. Samice má vulvulární váčky směrem k zadnímu konci pokryté výrazným jazykovitým, hladkým nebo hrbolatým výběžkem. Vajíčka tohoto parazita jsou velká $88\text{--}104 \times 47\text{--}56 \mu\text{m}$, obvykle mívají elipsovitý tvar a blastomery ve vajíčku vyplňují téměř celý prostor (Naeem et al., 2021; Prantlová Rašková and Wagnerová, 2013; Arsenopoulos et al., 2021).



Obrázek 2: Vajíčko *Haemonchus contortus* pod mikroskopem

(Prantlová Rašková and Wagnerová, 2013)

2.1.1.2 Výskyt

Postupná změna klimatu je spojena s pozorovatelnými změnami v geografickém rozšíření bezobratlých po celém světě. GIN jsou k takovým změnám zvláště citlivé, protože část životního cyklu je dokončena mimo tělo hostitele. Přežití a vývoj závisí na klimatu. Vlhkost a teplota hrají klíčovou roli v přežití larev a tím pádem i v rozšíření výskytu infekce (Rose et al., 2016; Arsenopoulos et al., 2021).

Obecně lze říct, že infekce je nerovnoměrně rozšířena po celém světě. Nákaza převládá spíše v tropických, subtropických, teplých mírných a letních dešťových oblastech než v chladných, studených mírných a suchých místech (Arsenopoulos et al., 2021).

H. contortus je nejdůležitějším parazitickým druhem, který se vyskytuje u ovcí v tropických a subtropických oblastech. Mezi tyto oblasti patří tropické oblasti Afriky a Ameriky, Karibik, tropické ostrovy Tichého oceánu, jižní a jihovýchodní Asie, jih USA a severní část Austrálie. Larvy zde však nepřežívají na pastvinách dlouhou dobu, ačkoliv jim teplota umožňuje vývoj po celý rok. Chybí zde vlhkost, která není dostatečná v období sucha. V oblastech s vyšší nadmořskou výškou, kdy je vláha dostatečná, se doba přežití a vývoje larev prodlužuje (O'Connor et al., 2006; Arsenopoulos et al., 2021).

Parazit se také vyskytuje ve středomořských klimatických oblastech. Tyto regiony se vyznačují horkými a suchými letními podmínkami, ale i chladnými zimními podmínkami. Za tohoto klima je však vývoj všech volně žijících stádií pozastaven. Populace larev proto dosahují svého vrcholu na podzim a na jaře. V případě mírných teplot během zimy může dojít k přežití larev L3 (Arsenopoulos et al., 2021).

V oblastech mírného pásma, do kterého můžeme řadit také Českou republiku, představuje *H. contortus* zejména sezónní hrozbu. Infekce se vyskytuje především v období od jara do poloviny léta, neboť právě v tomto ročním úseku převládá dostatečná teplota a srážky, které jsou potřebné k šíření infekce. Zároveň také zimní měsíce nejsou dostatečně chladné, aby zabránily přežití infekčních larev (Besier et al., 2016).

V případě chladných oblastí, kdy teplota je příliš nízká pro přežití a vývoj larev, dochází k jejímu zastavení až do nástupu mírnějších podmínek prostředí. Riziko hemonchózy je za těchto klimatických podmínek obvykle nízké, omezené na teplejší měsíce roku (Arsenopoulos et al., 2021).

2.1.1.3 Léčba a anthelmintická rezistence

Existují různé přístupy k léčbě hemonchózy. Jednou z běžných praktik je pravidelné odčervování všech stád ovcí pomocí anthelmintik. Tento způsob je však poměrně nákladný a velmi rychle může docházet k nárůstu anthelmintické rezistence. Další možností je cílená léčba, kdy se ošetří pouze nakažené stádo. Dalším přístupem, kdy se maximálně sníží náklady na léčbu, je cílená selektivní léčba. V tomto případě jsou anthelmintika podána pouze jedinci, který vykazuje známky infekce. Poslední dvě zmíněné strategie jsou náročné na pracovní sílu, která musí pozorovat jednotlivá stáda a konkrétní zvířata zvlášť (Naeem et al., 2021).

Vzhledem k možnému úhynu zvířat je důležité zahájit včasnou a správnou léčbu. Naštěstí existuje několik anthelmintických skupin, které působí na různé druhy parazitů. Řadíme sem benzimidazoly (např. albendazol), imidazothiazoly (např. levamisol), makrocyclické laktony (např. ivermektin), salicylanidy (např. klosantel), deriváty aminoacetonitrilu (např. monepantel), sporoindoly (např. derquantel). Farmaceutické přípravky mohou zahrnovat výše uvedené látky jako jednotlivé aktivní složky nebo v kombinacích. Neexistuje však žádná záruka, že všechny chemikálie budou stejně účinné v kterémkoli regionu, kvůli rozšířenému výskytu rezistence na anthelmintika (Arsenopoulos et al., 2021; Besier et al., 2016).

První moderní širokospektrální anthelmintikum, patřící do skupiny benzimidazolů, thiabendazol, bylo uvedeno pro komerční použití na počátku 60. let 20. století a ukázalo se, že je bezpečné, snadno aplikovatelné a vysoce účinné (> 95 %) proti širokému spektru hlavních parazitů přežvýkavců. Následovaly další benzimidazoly, z nichž některé se již běžně nepoužívají (parbendazol, cambendazol a oxibendazol). Současná léčiva této skupiny (albendazol, fenbendazol, oxfendazol, mebendazol) jsou dostupná od konce 70. let 20. století. Zástupci této skupiny působí na hlístice na buněčné úrovni, především inhibicí polymerace mikrotubulů, což nakonec způsobí buněčnou smrt. Vzhledem k dlouhé době dostupnosti a častému používání je rezistence hlístic vůči benzimidazolům celosvětově rozšířena již řadu let. V některých endemických oblastech hemonchózy je rezistence velmi závažná a tyto látky účinkují pouze v kombinaci s jinými anthelmintiky (Besier et al., 2016).

Dalšími používanými skupinami jsou imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny. Tyto skupiny představují druhá moderní širokospektrální anthelmintika. Mají stejný mechanismus účinku. Působí jako agonisté na nikotinové acetylcholinové receptory helmintů.

Nejrozšířenějším lékem z této skupiny u malých přežvýkavců je levamisol. Přestože rezistence je velmi běžná u mnoha rodů hlístic, výsledky testů naznačují, že *H. contortus* zůstal vnímavý k levamizolu po delší dobu než k jiným hlavním lékům. To však již neplatí v hlavních endemických oblastech a je třeba očekávat nárůst rezistence na tuto látku (Besier et al., 2016).

Použití ivermektinu, patřící do skupiny makrocyclických laktonů, na počátku 80. let 20. století, zavedlo novou etapu v boji proti většině druhů a všem stádiím háďátek a také proti některým ektoparazitům. Hlavní způsob účinku, je zde takový, že dochází k narušení nervového přenosu vlivem navázání ivermektinu na glutamát-chloridové kanály a zvýšenému přísunu chloridových iontů, což následně vede ke smrti parazita. Rezistence na ivermektin je rozšířená v populacích *H. contortus* v endemických oblastech (Besier et al., 2016).

V boji proti GIN je možné použít také anthelmintikum monopantel. Jedná se o derivát aminoacetonitrilu. Tato látka byla uvedena na trh v roce 2009. Původně byl monopantel využíván jako alternativa k léčbě ovcí, u kterých se vyskytla multirezistence. Již v roce 2013 byly hlášeny dva druhy parazitů rezistentní na toto antiparazitikum. Konkrétně těmito druhy byly *Teladorsagia circumcincta* a *Trichostrongylus colubriformis*. Později se rezistence rozšířila také do Nizozemí, Nového Zélandu, Uruguaye, Austrálie, Brazílie a Spojeného království (Albuquerque et al., 2017; Niciura et al., 2020).

Kromě jednosložkových anthelmintik se vyrábí široká škála anthelmintik kombinovaných. Tyto přípravky však nejsou schváleny ve všech státech. Hlavním smyslem těchto přípravků je zajistit účinnost proti helmintům rezistentním vůči jedné či více látkám. Jak se očekávalo, rezistence vůči kombinacím anthelmintik je mnohem méně častá než vůči jednotlivým složkám, ale případy rezistence se vyskytují dokonce i vůči kombinacím tří nebo více účinných látek (Besier et al., 2016).

2.1.1.4 Očkování

Teprve nedávno byly vyrobeny vakcíny proti infekci způsobené *H. contortus*. Pro použití u ovcí byla vyrobena účinná vakcína s použitím latentního antigenu H11, což je protein gastrointestinálního traktu *H. contortus* a H-gal-GP, které byly extrahovány z dospělých jedinců *H. contortus*. Oba tyto antigeny jsou schopny vyvolat ochrannou

imunitu, jsou-li podány samostatně. Klinické studie potvrdily účinnost vakcíny Barbervax[®], která byla vyvinuta ve Výzkumném ústavu Moredun v Edinburghu. Po podání vakcíny došlo ke zvýšení hladin imunoglobulinů a zároveň ke snížení počtu vajíček ve stolici u imunizovaných zvířat. Antigeny H11 a H-gal-HP jsou izolovány z živých jedinců *H. contortus*, nacházejících se v abomasu živých ovcí, protože parazity nelze získat kultivací in vitro. Za další nevýhodu je považován nepříliš ekonomicky výhodný postup. Vakcína se nyní vyrábí v Austrálii, kde byla koncem roku 2014 licencována pro komerční použití (Arsenopoulos et al., 2021; Adduci et al., 2022).

2.1.2 *Teladorsagia circumcincta*

Dalším významným parazitem ovcí a koz je *Teladorsagia circumcincta*. Tato hlístice je podobně jako *H. contortus* zodpovědná za významné ekonomické ztráty u ovcí. *T. circumcincta* se neživí krví. Potravou jsou zbytky slizniční tkáně a buněčné sekrety slezu. Její hlavní patogenní účinky jsou způsobeny larválními stádii této hlístice. Samičky jsou méně plodné, jejich obvyklá produkce vajíček se pohybuje kolem 100–200 vajíček na samici za den. Životní cyklus je stejný jako u ostatních GIN. Celý cyklus GIN je detailněji popsán v kapitole 2.1 Paraziti ovcí. Infekční larvy L3 jsou pozřeny přežvýkavcem a jejich další larvální vývoj pokračuje v žaludečních žlázách. Dochází k tvorbě uzlů v abomasální sliznici a rozsáhlému poškození parietálních buněk, což následně vede k poklesu produkce kyseliny chlorovodíkové. Díky tomu dochází ke zvýšení pH v abomasu, které způsobí selhání přeměny pepsinogenu na aktivní formu pepsin, což má za následek zvýšené hladiny pepsinogenu v plazmě a snížené trávení bílkovin. Únik makromolekul a proteinů přes poškozený epitel vede k hypoproteinémii. Závažnost nákazy závisí na dalších současně probíhajících infekcích, výživovém stavu hostitele a také na imunitní odpovědi. Mezi hlavní klinické příznaky patří anorexie, intermitentní průjem s dehydratací, která může vést až ke smrti zvířete (Stear et al., 2019; Roeber et al., 2013; Venturina et al., 2013).

Dospělí jedinci mají štíhlé tělo a jeho barva je obvykle červenohnědá. Vyskytuje se zde pohlavní dimorfismus. Průměrná velikost se tedy u obou pohlaví liší. Samičky jsou dlouhé 6–12 mm. Samečci jsou pak o zhruba 20 % menší (Venturina et al., 2013).

T. circumcincta je všudypřítomný parazit, který je zodpovědný za sezónní propuknutí parazitické gastroenteritidy, zejména u jehňat odstavených na jaře. Jeho nejvýznamnější výskyt je v chladnějších oblastech mírného pásma, včetně velké části Spojeného království a Nového Zélandu (Venturina et al., 2013).

Léčba nakažených ovcí probíhá pomocí anthelmintik. Stejně jako u *H. contortus*, i u *T. circumcincta* je rezistence na anthelmintika celosvětově velmi rozšířená. Kontrola nad tímto parazitem je tedy náročná (Cortés et al., 2020).

2.1.3 Trichostrongylus

Mezi GIN má významný ekonomický, lékařský a veterinární dopad také *Trichostrongylus*. Bylo popsáno více než 30 druhů tohoto parazita. Většina z nich byla nalezena zejména u býložravců, zhruba 10 z nich bylo hlášeno také u lidí. Nejčastěji nákaza postihuje hospodářská zvířata, jako jsou kozy, ovce a skot. Onemocnění vyvolané touto hlísticí se nazývá trichostrongylóza. Mezi klinické příznaky se řadí průjem, úbytek hmotnosti a ztráty produkce u hospodářských zvířat (Gholami et al., 2015; Ghatee et al., 2020).

Trichostrongylóza je rozšířena téměř po celém světě. Byla hlášena u hospodářských zvířat z různých geografických oblastí, včetně jihovýchodní Asie, Středního východu, Afriky, Evropy i australského kontinentu. Onemocnění se může vyskytnout také u lidí. Tyto případy byly zaznamenány např. v Itálii, Francii, Maroku, Brazílii, Karibiku a Austrálii (Ghatee et al., 2020).

Akutní závažné infekce u mladých zvířat mohou být smrtelné. Vzhledem k tomu, že většina infekcí je smíšená s jinými gastrointestinálními oblymi červy, není vždy lehké posoudit, jak právě *Trichostrongylus* přispěl k závažnosti infekce (Junquera, 2022a).

Dospělí červi mají štíhlé hnědočervené tělo. Obvykle je jejich délka 5–10 mm v závislosti na konkrétním druhu. Vajíčka mívají rozměry 70–90 × 35–45 μm, jsou podlouhlého oválného tvaru a obsahují 16–32 blastomer. Životní cyklus je i zde přímý, jednoduchý a bez mezihostitele. Hospodářská zvířata se mohou nakazit infekčními larvami na pastvě, u člověka je nejčastější příčinou onemocnění pozření kontaminované zeleniny či vody (Junquera, 2022a; Ghatee et al., 2020; Prantlová Rašková and Wagnerová, 2013).



Obrázek 3: Vajíčka *Trichostrongylus axei* pod mikroskopem

(Prantlová Rašková and Wagnerová, 2013)

Klinická diagnostika infekce je založena na nálezů vajíček v trusu býložravců. Morfologické metody pro klasifikaci *Trichostrongylus spp.* jsou však relativně spolehlivé pouze pro samce tohoto rodu, navíc jsou pracné a nemohou být použity pro identifikaci samic a vajíček. Většina vajíček čeledi Trichostrongylidae, kromě rodu *Nematodirus*, je od sebe nerozeznatelná. Také morfologie vajíček *Trichostrongylus* a měchovců je relativně podobná a je obtížné je odlišit. S nástupem molekulárních technik v posledních letech bylo vyřešeno mnoho problémů v identifikaci. Několik technik založených na DNA analýze může rozlišovat různé druhy *Trichostrongylus*, včetně všech fází životního cyklu a pohlaví (Ghatee et al., 2020; Gholami et al., 2015).

Proti dospělým červům a larvám je účinné velké množství širokospektrých anthelmintik, např. benzimidazoly, levamisol a také několik makrocyclických laktonů. Dále je možné použití úzkospektrálních anthelmintik, např. tetrahydropyrimidiny, které jsou účinné proti dospělým červům, ovšem nemusí působit proti larvám a dalším druhům parazitů, které často infikují hospodářská zvířata současně s rodem *Trichostrongylus*. Často také komerční produkty obsahují směsi dvou nebo dokonce více účinných látek různých chemických tříd. To se provádí za účelem zvýšení šance, že alespoň jedna aktivní složka je účinná proti *Trichostrongylus* a dalším GIN, které si vytvořily rezistenci na dané látky. Existují však i četné

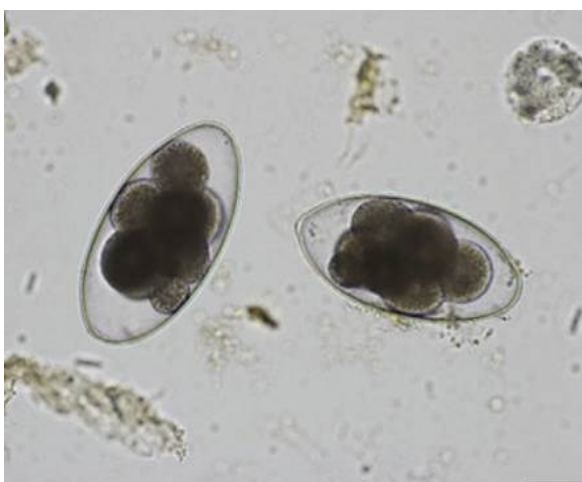
zprávy o rezistenci rodu *Trichostrongylus* k nejběžnějším anthelmintikům, které jsou zmíněny výše (Junquera, 2022a).

2.1.4 *Nematodirus battus*

Nematodirus battus je dalším parazitem ovcí. Způsobuje onemocnění zvané nematodiróza. Tato sezónní hlístice vyvolává zejména na jaře akutní onemocnění u jehňat. Dochází u nich k průjmům, ztrátě produkce a potenciální smrti díky dehydrataci po těžkých hypersenzitivních reakcích v tenkém střevě (Melville et al., 2020a; Melville et al., 2020b).

N. battus má přímý vývojový cyklus podobně jako ostatní GIN. Na rozdíl od jiných GIN infikujících domestikované přežvýkavce se infekční stádia larev L3 vyvíjejí spíše ve vajíčku než volně na pastvě. Vyvinuté L3 nadále zůstávají uzavřené ve vajíčku během chladných zimních měsíců. Jakmile se podmínky prostředí stanou optimálními pro přežití larev, tj. průměrná denní a noční teplota vyšší než 10 °C po dobu alespoň 10ti dnů, dojde k synchronnímu líhnutí, což má za následek uvolnění velkého množství infekčních larev na pastvě v období jara. Líhnutí larev se také většinou shoduje s dobou, kdy narozená jehňata začínají sama pást travu, což pro ně může být zničující (Melville et al., 2020b).

Dospělí samci dosahují rozměrů 10–15 mm a samice 15–23 mm. Tělo bývá u předního konce zúženější. Silnostěnná vajíčka bývají velká 140–230 × 70–130 μm, mají elipsovitý tvar a obsahují 6–8 blastomer (Prantlová Rašková and Wagnerová, 2013).



Obrázek 4: Vajíčka *Nematodirus* spp. pod mikroskopem (Verocai and Chaudhry, 2020)

Nákaza je nejvíce rozšířená v mírných oblastech. Tato hlístice má endemický výskyt v mnoha částech severní Evropy. Představuje nejvýznamnější ekonomickou a sociální zátěž pro chov ovcí ve Spojeném království (Melville et al., 2020b).

Léčba se provádí zejména pomocí benzimidazolových anthelmintik, kvůli jejich vysoké bezpečnosti u mladých zvířat a také kvůli prodlouženému účinku proti druhu *Nematodirus*. Avšak ostatně jako u většiny hlístic, i zde se v britských populacích *N. battus* vyskytla rezistence vůči benzimidazolům (Melville et al., 2020b).

2.1.5 *Chabertia ovina*

Chabertia ovina je parazitující hlístice vyskytující se u ovcí a koz, nalézt ji můžeme také u ostatních volně žijících přežvýkavců. Rozšířená je po celém světě, častější je však v oblastech s mírným klimatem. Způsobuje nákazu zvanou chabertióza. Sama o sobě není tato nemoc vysoce nebezpečná, závažnost příznaků stoupá, pokud je zvíře nakaženo dalšími druhy GIN (Junquera, 2022b).

Životní cyklus je i u tohoto parazita přímý. Vývoj larev na pastvě může probíhat i za poměrně nízkých teplot (~5 °C). Za vlhkého počasí mohou larvy přežít na pastvě až 10 měsíců. I po této době jsou vysoce infekční. Po vniknutí larev do trávicího traktu se larvy přichytí na stěnu tenkého střeva a živí se tkáněmi. O týden později se oddělí a migrují do slepého střeva, kde dokončí vývoj v dospělce. Poté se přesunou do cílového místa, kterým je tlusté střevo. Zde dochází k oplodnění samiček a kladení velkého množství vajíček. Období mezi začátkem infekce a vylučováním vajíček do okolí je zhruba 7 týdnů (Junquera, 2022b).

Dospělí jedinci jsou dlouzí 10–20 mm, přičemž samičky bývají větší než samečci. Tělo je podobně jako u ostatních GIN pokryto kutikulou, která je pružná, ale poměrně tuhá. *Ch. ovina* nepatří mezi krevsající parazity. Vajíčka jsou velká 90–105 × 50–55 μm, obvykle se uvnitř vajíčka nachází 16–32 blastomer. Paraziti poškozují výstelku střeva, na kterou se přichytí. Často také mění místa přichycení, čímž vznikají rozsáhlé léze. Dochází ke krvácení, které může být významné u masivních infekcí. Vysoce infikovaná zvířata vykazují průjem, anémii, ztrátu hmotnosti, snížení produkce, v nejzávažnějších případech mohou uhynout (Junquera, 2022b; Prantlová Rašková and Wagnerová, 2013).



Obrázek 5: Vajíčko *Chabertia ovina* pod mikroskopem

(Prantlová Rašková and Wagnerová, 2013)

Proti dospělým červům a larvám je účinná řada širokospektrých anthelmintik, např. několik benzimidazolů, levamisol a makrocyclických laktonů. Ne všechny jsou však účinné na všechna larvální stádia. Rezistence *Ch. ovina* k nejpoužívanějším anthelmintikům není tak častá, jako je tomu u jiných GIN (Junquera, 2022b).

2.1.6 *Ashworthius sidemi*

Ashworthius sidemi byl poprvé nalezen u jelena sika (*Cervus nippon*) žijícího na ruském Dálném východě. Do Evropy se rozšířil od 2. poloviny 20. století. Jeho zavlečení lze vysvětlit dovozem jelena sika z Asie do evropských zemí včetně České republiky (Kuznetsov et al., 2018; Lehrter et al., 2016).

A. sidemi je krevsající hlístice parazitující v abomasu. Způsobuje onemocnění zvané ashworthióza. Je to velká hlístice typicky červené barvy, která je dána způsobem výživy, tj. sáním krve. Tělo je štíhlé, protáhlé, bez segmentace. Délka těla samce se pohybuje kolem 24–26 mm a samice 34–44 mm. Životní cyklus je podobný jako u ostatní GIN, tedy přímý, bez mezhospitele. Intenzita infekce se zvyšuje s přibývajícím množstvím zvířat na pastvě či ve stádě (Lehrter et al., 2016; Drozd et al., 2000; Kuznetsov et al., 2018).

Zatímco *H. contortus* je považován za typickou hlístici parazitující v gastrointestinálním traktu malých domácích přežvýkavců a některého skotu, *A. sidemi* je přítomen zejména u volně žijících přežvýkavců. U hospodářských zvířat experimentální studie prokázala

přítomnost *A. sidemi* u ovcí a terénní studie odhalila tuto hlístici u skotu. Infekce *A. sidemi* způsobuje chronický zánět slezu, negativně ovlivňuje tvorbu abomasálního hleny a postupně dochází ke zhoršení zdravotního stavu až k úhynu zvířat. I když je tato nákaza typická pro jelenovité v Asii, postupně se rozšiřuje i mezi přežvýkavce v Evropě, což značí poměrně vysokou potenciální hrozbu, jak pro volně žijící zvířata, tak pro hospodářská zvířata (Lehrter et al., 2016; Kuznetsov, 2022).

2.2 Diagnostika parazitóz

Přesná a rychlá diagnostika je důležitá při podezření na hemonchózu či jinou infekci způsobenou GIN, neboť tyto nákazy jsou významným ekonomickým problémem v chovu ovcí. Bez časně diagnostiky a vhodné léčby může docházet k vysoké úmrtnosti. V některých případech mohou být klinické příznaky nespecifické a náhlé úhyny mohou být mylně přičítány infekci způsobené GIN, zatímco skutečnou příčinou může být nákaza např. motolicemi či protozoi. Za těchto okolností může být nastavená léčba nesprávná a nepřiměřená skutečnému stavu (Besier et al., 2016).

Mezi postupy používané k detekci klinického onemocnění způsobeného *H. contortus* se řadí pravidelná kontrola vzhledu zvířat, kdy se kontroluje zejména anémie, dále kontrola počtu vajíček v trusu a také postmortální vyšetření vybraných jedinců. Vše je součástí integrovaného řízení parazitů, jehož hlavním cílem je zabránit rozsáhlému parazitismu. V současné době se také k diagnostice čím dál častěji využívají molekulární metody, které mohou být velmi přesné a rychlé (Besier et al., 2016).

2.2.1 Klinické příznaky hemonchózy

Klinické příznaky hemonchózy jsou spojeny především s anémií, která vzniká v důsledku sání krve. Aktivita sání krve začíná larvami L4 a pokračuje dospělými helminty ve slezu, což potenciálně vede ke klinickému projevu anémie přibližně 10–12 dní po infekci. Každý dospělý parazit dokáže vysát asi 30–50 μ l krve denně. Intenzita účinků hemonchózy závisí na stupni infekce, odpovědi imunitního systému a aktivaci hematopoézy hostitele (Arsenopoulos et al., 2021).

Podle stupně infekce a odpovědi imunitního systému hostitele lze hemonchózu rozdělit do tří forem: hyperakutní, akutní a chronickou. Hyperakutní forma je vzácná a je charakterizována velmi vysokou infekční zátěží. Smrt postižených zvířat může nastat náhle, bez počátečních příznaků. U těchto zvířat je převládajícím příznakem výrazná bledost sliznic, zejména spojivek. Pokud není včas zahájena antiparazitární léčba, objevují se známky hypoproteinémie, především generalizovaný podkožní edém. Častým příznakem je také otok čelisti. Průjem není považován za typický příznak hemonchózy (Arsenopoulos et al., 2021).

Akutní forma hemonchózy je charakterizována anémií infikovaných zvířat s občasným výskytem úmrtí obvykle 4–6 týdnů po počáteční infekci. V časném stadiu infekce nemá tato nákaza přímou souvislost se sníženou užitkovostí. Pokud však nákaza trvá déle, dochází ke snížení produkce mléka, snížení průměrného denního přírůstku a snížení produkce vlny (Arsenopoulos et al., 2021).

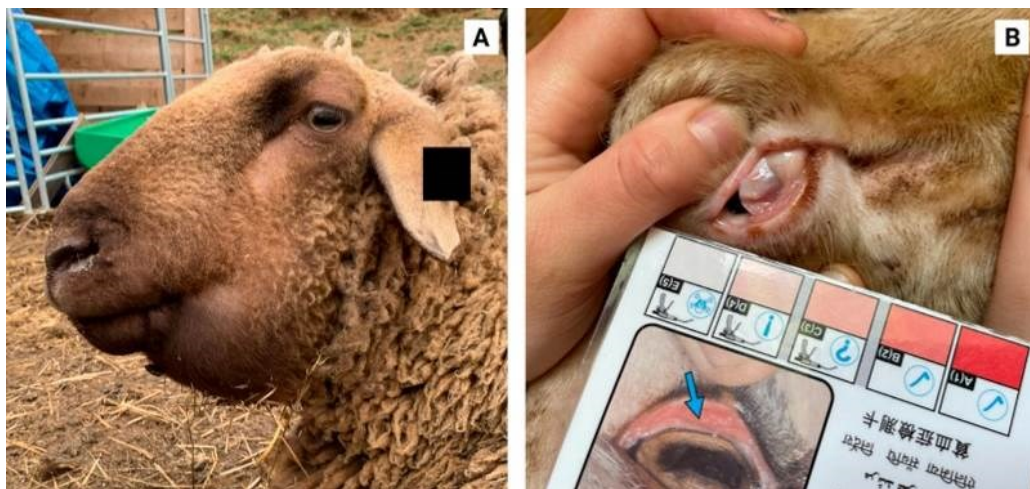
Infekce, která probíhá dlouhodobě, a je spjata s nízkou náloží parazitů v trávicím traktu, se nazývá chronická. Tato forma může být klinicky nerozpoznatelná. Nástup příznaků pak může být spojen se sníženou funkcí imunity. Tato forma je často výsledkem neúspěšné anthelmintické léčby, kdy parazité jsou částečně rezistentní k dané léčbě. Symptomy chronické hemonchózy jsou podobné jako u podvýživy. Dochází k hubnutí, snížené produkci a výskytu chudokrevnosti u některých zvířat (Arsenopoulos et al., 2021).

Tabulka 1: Souhrn klinických příznaků nákazy H. contortus

Hyperakutní	Těžká anémie, náhlá úmrtí, bledost sliznic, slabost, neochota k pohybu, podkožní otoky, suchá, tmavá stolice sníženého množství
Akutní	Fáze I: Smrt postižených zvířat, mírná anémie u přeživších zvířat Stádium II: Dočasné zotavení v důsledku aktivace hematopoetického procesu hostitelem Stádium III: Těžká a přetrvávající anémie způsobená nedostatkem železa
Subakutní	Snížení rychlosti růstu, snížení produkce mléka, masa, vlny
Dlouholetý	Vlastnosti podvýživy, např. nízké skóre tělesné kondice, snížená rychlost růstu, snížená produkce mléka, masa, vlny

(Arsenopoulos et al., 2021)

Za zmínku stojí také systém FAMACHA (*Faffa Malan Chart*), který slouží k diagnostice hemonchózy. Tento systém porovnává stupeň bledosti spojivek se závažností anémie. Rozsah anémie se hodnotí na pětibodové škále, od 1 do 5. Nižší číslo odpovídá normální červené spojivce, vyšší číslo naopak silně bledé spojivce. Tento systém je velmi přesný k diagnostice hemonchózy v tropických a subtropických oblastech. Naopak není moc použitelný v oblastech s mírným klimatem, neboť v těchto zemích jsou ovce často nakaženy také jinými parazity (Arsenopoulos et al., 2021).



Obrázek 6: Diagnostika hemonchózy dle systému FAMACHA

A – submandibulární edém u nakažené ovce, B – hodnocení sliznic systémem FEMACHA
(Adduci et al., 2022)

2.2.2 Postmortální vyšetření

V případě úhynu přežvýkavce, může i posmrtné vyšetření pomoci k diagnostice hemonchózy. Diagnostika hemonchózy u hyperakutní formy je založená na dvou nálezech. Tím prvním je detekce dospělých *H. contortus* v abomasu, tím druhým je makroskopické pozorování petechií na žaludeční sliznici. Při akutní formě infekce se uhynulá zvířata jeví jako silně anemická, s bledými sliznicemi, ascitem a submandibulárním edémem, což jsou známky těžké hypoproteinémie, která je důsledkem aktivity sání krve *H. contortus*. Žaludeční sliznice je i zde plná petechií a jsou na ni viditelné přichycené hlístice. Chronickou hemonchózu je poměrně těžké potvrdit pomocí posmrtného vyšetření. V takových případech se nákaza

diagnostikuje nálezem malého množství parazitů ve slezu v návaznosti na anamnézu zvířete, jako je snížená produkce, podvýživa, neprospívání (Arsenopoulos et al., 2021).



Obrázek 7: Dospělí jedinci Haemonchus spp. na sliznici žaludku

(Arsenopoulos et al., 2021)

2.2.3 Koprologické vyšetření

Laboratoře jsou často žádány, aby diagnostikovaly různé druhy helmintóz a vyhodnotily zátěž parazity. Ačkoli jsou dostupné různé diagnostické postupy, nejpoužívanější jsou metody koprologické. K takovému vyšetření se používá vzorek stolice, ve kterém se stanovuje druh a počet vajíček. Pro laboratorní diagnostiku infekce lze použít kvalitativní nebo kvantitativní parazitologické testy. Kvalitativní metody poskytují informace o přítomných druzích, zatímco kvantitativní metody poskytují údaje o zátěži infekce. Obojí může být důležitým nástrojem při zjišťování zdravotního stavu stáda a stanovení vhodného ošetření a kontrolních opatření. Vyšetření trusu na vajíčka parazitů se může lišit od jednoduchého přímého nátěru až po složitější metody zahrnující centrifugaci a použití flotačních tekutin. Flotační metody pracují na principu separace vajíček od fekálních zbytků pomocí flotačních roztoků s různými specifickými hmotnostmi, které vyplavují vajíčka červů na povrch suspenze (Cringoli et al., 2004; Pereckienė et al., 2007).

Techniky kvantitativní, založené na počítání vajíček, vyhodnocují množství vajíček v jednom gramu trusu (EPG). Jsou prováděny pomocí mikroskopického vyšetření alikvotu fekální suspenze ze známého množství vzorku trusu. Řadíme sem McMasterovu techniku, která byla vyvinuta jedním z velkých dobrodinců ve veterinárním výzkumu v Austrálii. Jedná se o standardní, nejuniverzálnější koprologickou metodou, která se využívá k počítání vajíček v trusu. V literatuře však lze nalézt mnoho variant McMasterovy techniky. Tyto variace berou v úvahu laboratorní faktory, jako je flotační roztok, ředění vzorku, doba flotace a výběr plochy sklíčka, která má být zkoumána. Na těchto faktorech závisí spolehlivost McMasterovy techniky. Vzhledem k široké škále modifikací McMasterovy metody se musí parazitologické laboratoře rozhodnout, kterou metodu zvolit jako nejvhodnější pro zamýšlený účel. Problémy však mohou nastat při analýze a porovnávání výsledků různých laboratoří na stejných vzorcích. Existuje potřeba poskytnout určitý stupeň standardizace čtených modifikací McMasterovy metody (Cringoli et al., 2004; Pereckienė et al., 2007).



Obrázek 8: McMasterova komůrka

(Prantlová Rašková and Wagnerová, 2013)

2.2.4 Imunologické vyšetření

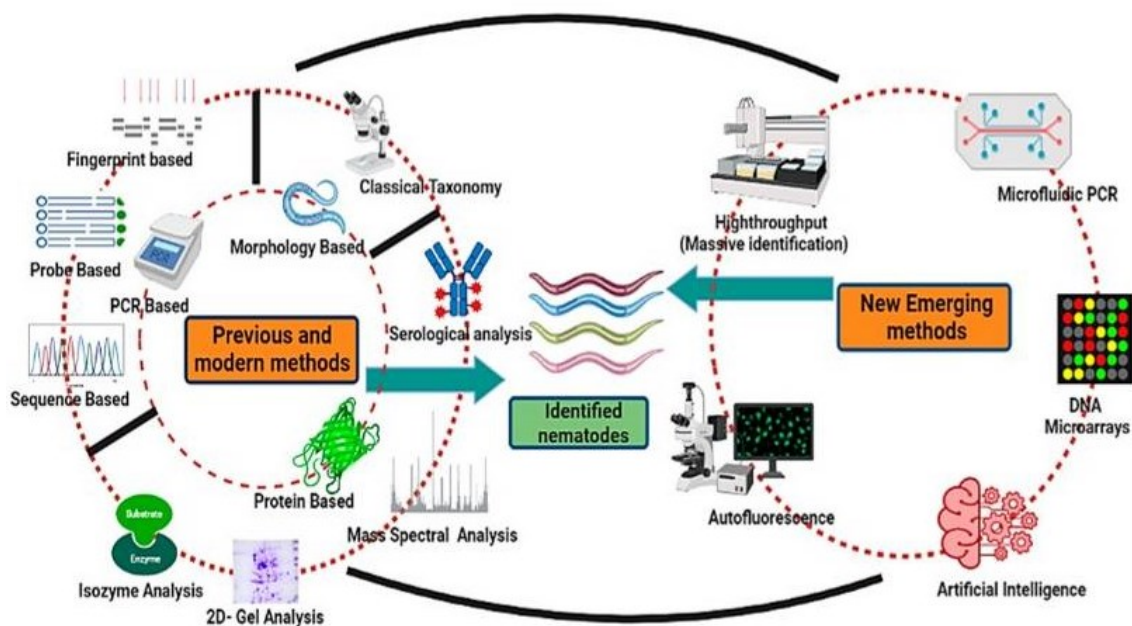
K diagnostice onemocnění způsobené GIN je možné využití sérologických testů. Ty mohou být vysoce informativní zejména pro stanovení infekce způsobené *Haemonchus spp.* Byly publikovány studie o imunologických metodách používaných k diagnostice hemonchózy prostřednictvím specifické detekce IgG protilátek. Obecně tyto

techniky nenalezly široké uplatnění zejména kvůli jejich nízké specifitě a také kvůli vysokým hladinám protilátek, které mohou přetrvávat dlouho po vyléčení zvířete. Kromě toho má hostitel tendenci vykazovat klinické příznaky dané infekce dlouho předtím, než se titry protilátek zvýší na detekovatelné hladiny. Mezi imunologické metody řadíme testy zkoumající specifické IgG a non-IgG protilátky proti *Haemonchus spp.*, dále reakci hostitele na infekci, jako je eozinofilie a eozinofilní peroxidáza, mastocyty a mastocytóza, proliferace T buněk a změny v profilech cytokinů jako markerů infekce. Specifické protilátky je možné detekovat a kvantifikovat pomocí ELISA nebo Western blotu. Tyto techniky zahrnují cílové antigeny (např. parazitární extrakt) imobilizované na pevném nosiči, následně dochází k inkubaci s tělesnými tekutinami infikovaného jedince (např. sérem) obsahujícími antigen-specifické protilátky. Pro detekci následuje inkubace se specificky značenou sekundární protilátkou a přidání vhodného substrátu (Zarlenga et al., 2016).

2.2.5 Molekulární vyšetření

Vzhledem k tomu, že morfologická identifikace se ukázala jako nedostatečně účinná, neboť neexistují dostatečné morfologické rozdíly mezi jednotlivými hlísticemi, bylo zapotřebí vyvinout dokonalejší metody. Nejprve se k diagnostice GIN začaly využívat četné molekulární a biochemické metody „první generace“. Mezi nejoblíbenější techniky této doby se řadí štěpení restričním enzymem následované elektroforézou na agarózovém gelu, Southern blotting, repetitivní DNA hybridizační sondy ve spojení se Southern bloty nebo dot bloty. Jejich nízká senzitivita a specifita však přispěla k jejich nahrazení technikami založenými na polymerázové řetězové reakci (PCR) (Bhat et al., 2022; Zarlenga et al., 2016).

Dokonalejší molekulární a biochemické identifikační metody jsou v poslední době nejvyužívanějšími technikami k identifikaci hlístic. Představují výrazné zlepšení v této oblasti, poskytují citlivost, správnost a úsporu času. Na základě molekulární biologie a potřeby identifikovat taxony se objevují nově vznikající metody, jako jsou techniky PCR, sondové (RT-PCR a multiplexní PCR) a metody otisku prstu (Bhat et al., 2022).



Obrázek 9: Přehled různých metod identifikace hlístic

Previous and modern methods – dřívější a moderní metody, Fingerprint based – na základě otisku prstů, Classical Taxonomy – klasická taxonomie, Serological analysis – sérologická analýza, Mass Spectral Analysis – analýza hmotnostní spektrometrií, 2D-Gel Analysis – 2D-gelová analýza, Isozyme Analysis – analýza isozymu, Sequence Based – na základě sekvence, Probe Based – na základě sondy, PCR Based – na základě PCR, Morphology Based – na základě morfologie, Protein Based – na základě proteinu, Identified nematodes – identifikované hlístice, New Emerging methods – nově vznikající metody, Highthroughput (Massive identification) – masivní identifikace, Microfluidic PCR – mikrofluidní PCR, DNA Microarrays – DNA na čipu, Artificial Intelligence – umělá inteligence, Autofluorescence – autofluorescence

(Bhat et al., 2022)

2.2.5.1 Metody založené na PCR

Metody založené na PCR (*Polymerase chain reaction*) jsou důležitými a spolehlivými nástroji, které umožňují klasifikaci a charakterizaci různých druhů hlístic. Technologie založené na DNA, jako je polymerázová řetězová reakce v reálném čase a multiplexní tandemová PCR, jsou účinné při předběžném screeningu strongyloidních háďátek u hospodářských zvířat. Ve srovnání s tradičními diagnostickými procesy přinesly technologie

detekce založené na PCR revoluci v oblasti diagnostiky hlístic. Ty se používají kvůli jejich lepší citlivosti, specifičnosti, rychlosti, relativní snadnosti použití a hospodárnosti. Pomocí této techniky lze vytvořit mnoho kopií specifického DNA templátu *in vitro*. Identifikace konkrétního druhu v rámci rozmanité řady hlístic je skutečně průlomová a byla nejprve stanovena pomocí omezených poměrů čisté DNA a později ověřena identifikací jednotlivých parazitů z velkého množství různých druhů hlístic (Bhat et al., 2022).

Základním cílem real-time PCR je detekce specifické DNA sekvence ve vzorku. Dochází zde ke vzniku amplifikovaných produktů během reakčního procesu s použitím fluorescenční technologie. Amplifikované produkty můžeme při této metodě sledovat v reálném čase. Schopnost sledovat průběh amplifikace DNA v reálném čase závisí na chemii a použitím přístrojovém vybavení. V této technice se využívá fluorescenční sonda, která vysílá fluorescenční signál v závislosti na amplifikované DNA (Ahmed et al., 2011).

Další dvě techniky využívající principu polymerázové řetězové reakce jsou multiplexní PCR a kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT-PCR). Toto jsou dvě detekční metody založené na sondě. Multiplexní PCR se často využívá v různých biologických a lékařských studiích, protože umožňuje současnou amplifikaci mnoha fragmentů DNA v rámci jedné reakce. QPCR je polymerázová řetězová reakce, která využívá detekci fluorescence, což umožňuje přesnou znalost o počtu vytvořených kopií pro každý cyklus PCR v reálném čase (Bhat et al., 2022).

V současné době existuje nepřehledné množství komerčních i nekomerčních metod pro izolaci nukleové kyseliny, která se dále využívá k PCR vyšetření. Bez ohledu na zvolenou metodu je však zapotřebí mít na paměti možnou přítomnost enzymatických inhibitorů v biologických vzorcích (Zarlenga et al., 2016).

2.2.5.2 Metody založené na otisku prstů

Do této skupiny řadíme metodu RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – polymorfismus délky restrikčních fragmentů). Jedná se o jednu z prvních molekulárních technik, která byla použita k odlišení jednotlivých druhů hlístic v závislosti na použití různých restrikčních enzymů, které pomáhají při trávení celé genomové DNA (gDNA) nebo konkrétního amplifikovaného produktu. Restrikční endonukleázy jsou enzymy bakteriálního původu, které rozpoznávají a tráví specifické sekvence DNA. Rozdíly mezi druhy lze zjistit,

když v restričním místě je polymorfismus DNA nebo v místě, kde existuje větší mutace (Bhat et al., 2022; McKeand, 1998).

Další technikou spadající do této skupiny je RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – náhodná amplifikace polymorfni DNA). Jedná se o poměrně jednoduchou, nákladově nenáročnou metodu, která se může provádět v jednoduché laboratoři. Tato metoda náhodně amplifikuje gDNA v různých místech genomu, tudíž není zapotřebí předchozí znalost zkoumaného genomu. Obvykle následuje tradiční elektroforetická analýza. Tato metoda nevyžaduje žádné speciálně navržené primery či hybridizační sondy (Bhat et al., 2022; Babu et al., 2021).

Dále sem řadíme také AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* – polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů). AFLP je technika, kterou můžeme využít pro analýzu jakéhokoliv organismu bez předchozí informace o sekvenci. Ani zde není zapotřebí specifických primerů. Metoda vyžaduje pouze malé množství templátu, avšak jedná se o poměrně náročnou metodu. Obvykle se zde využívá dvou restričních enzymů, které štěpí DNA. Následně vzniká velké množství fragmentů, ze kterých se pomocí PCR vyselektuje pouze část. Zkoumá se zde přítomnost či nepřítomnost fragmentů o určité délce (Bhat et al., 2022; Paun and Schönswetter, 2012).

2.2.5.3 PCR-SSCP

PCR-SSCP (*Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism* – polymerázová řetězová reakce-jednovláknový konformační polymorfismus) je jednou z nejjednodušších a pravděpodobně nejcitlivějších metod používaných k detekci mutací. Princip metody je založen na elektroforetické pohyblivosti jednořetězcové molekuly DNA, která je závislá na její struktuře a velikosti. I jediná změna nukleotidové sekvence může ovlivnit konformaci jednořetězcových DNA, což vede ke změně elektroforetické pohyblivosti v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu. Tato technika se účinně používá ke studiu genetických variací u parazitů. V případě analýzy velkého množství vzorků je tato technika vhodnou alternativou ke konvenční PCR. PCR-SSCP je technika, která dokáže rozlišovat fragmenty DNA lišící se o jedinou nukleotidovou sekvenci a je tedy užitečná při rozlišování jednotlivých druhů parazitů (Ahmed et al., 2011).

2.2.5.4 DNA Microarrays

DNA mikročipy jsou tvořeny malými molekulami DNA, které jsou vyrobeny a následně umístěny na mikroskopická sklíčka nebo silikonové čipy, nebo jsou na těchto podkladech přímo vyrobeny. DNA, mRNA nebo cDNA z buněk, tkání a organismů musí být označeny a hybridizovány s DNA mikročipy pomocí konkrétních fluorescenčních molekul. Následně je fluorescenční bodový obraz zachycen a statisticky vyhodnocován v konfokálním skeneru. V jediné analýze je možné sledovat velké množství genetických vlastností. Tato metoda je vhodná k rozlišení různých druhů parazitů. Byla popsána její užitečnost při identifikaci GIN. Dosud však nebyla publikována žádná studie o analýze jednotlivých druhů hlístic. Mikročipy mají však potenciál v budoucnu vytvořit standardizovanou a jednotnou metodu detekce pro širokou škálu patogenů (Bhat et al., 2022).

2.2.5.5 Mikrofluidní PCR technika

Miniaturizovaný systém se v současné době používá stále častěji. Mohou se takto provádět různé techniky založené na PCR, jako je běžná PCR, či RT-PCR. Mikrofluidní digitální PCR může být taktéž účinná pro detekci červů. Vzorek je zde umístěn do velkého množství samostatných bioreaktorů, kdy následně v každém z nich dochází k různé amplifikační reakci. Fluorescenční sonda a primery jsou přizpůsobeny k předpokládanému cíli. Tento vývoj v technologii rozšiřuje počet reakcí PCR, které lze provádět, přičemž se buď zkoumá velký počet vzorků, které však nejsou tak detailněji analyzovány nebo se kontroluje menší počet vzorků podrobněji (Bhat et al., 2022).

2.2.5.6 Sekvenační analýza

Sekvenační analýza zahrnuje metody, které se snaží získat informaci o nukleotidové sekvenci specifického úseku jaderné DNA, mitochondriální DNA nebo celého genomu. Pro diagnostické účely mnoho studií nejvíce preferuje ribozomální DNA či COX1 (cyklooxygenázu 1). Právě tato COX1 obsahuje mnoho variabilních oblastí, podle kterých lze rozlišovat parazity na úrovni druhů i poddruhů. Nové vysoce výkonné sekvenační technologie umožňují získávat velké množství dat za krátký čas. Ačkoliv sekvenování může pomoci v identifikaci jednotlivých parazitů, problémem bývá výběr konkrétního lokusu DNA, který je specifický pro daný druh (Bogale et al., 2020; Porazinska et al., 2009).

3. Cíl práce

Cílem mé diplomové práce bylo vyzkoušet, zda je možné využít RT-PCR k diagnostice GIN v trávicím traktu ovcí.

Pro vyhodnocení závěru bylo nutné provedení těchto kroků:

- Izolace vajíček z trusu ovcí a následná izolace gDNA z vajíček
- Izolace gDNA z dospělých parazitů
- Izolace gDNA z trusu ovcí
- Provedení RT-PCR s vyizolovanou gDNA
- Zhodnocení výsledků

4. Experimentální část

4.1 Materiál

4.1.1 Biologický materiál

Trus získaný od ovcí

gDNA izolovaná z dospělců získaných od Dr. Kašného, Masarykova Univerzita, Brno
Haemonchus contortus, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus spp.*, *Nematodirus battus*, *Chabertia ovina*

Vajíčka *H. contortus* – vlastní izolace

4.1.2 Chemikálie, reagenty, kity

Chlorid sodný – Sigma-Aldrich

Redestilovaná voda

DEPC (diethylpyrocarbonát) – Sigma-Aldrich

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát – Penta Chemicals

Cukr krupice

Sada primerů Hco ITS2_F + R, Tel ITS2_F + R, Ash ITS1_F + R, Tri ITS1_F + R, Nem_SSU_F + R, Cha_COI_F + R, Hco_FARB_F + R, Hco_NCBP_F + R, Hco_GAPDH_F + R – Generi Biotech

Hco ITS2_FAM – Generi Biotech

Xceed SG RT-PCR – Applied Biosystems

Gb Easy PCR Master Mix – Generi Biotech

Quick DNA Fecal/ Soil Microbe MiniPrep™ Kit – Zymo Research

QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook – QIAGEN

4.1.2.1 Příprava pufrů a roztoků

0,1 M Fosfátový pufr (250 ml)

Pro přípravu 0,1 M fosfátového pufru bylo zapotřebí dvou roztoků. První roztok vznikl rozpuštěním 7,16 g hydrogen fosforečnanu disodného dodekahydrátu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) ve 100 ml DEPC vody. Druhý roztok byl připraven obdobně, rozpuštěním 3,12 g dihydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve 100 ml DEPC vody. Pro přípravu 0,1 M fosfátového pufru o pH 7,2 bylo smícháno 90 ml prvního roztoku se 35 ml

druhého roztoku a doplněno do 250 ml DEPC vodou. Nakonec bylo přidáno 1,75 g chloridu sodného. Takto připravený roztok byl autoklávován při 121 °C.

Modifikovaný Sheatherův flotační roztok

Do 2 l kádinky bylo nalito přibližně 600 ml destilované vody. Do zahřáté vody bylo přisypáno asi 0,5 kg cukru a důkladně rozpuštěno. Výsledná hustota, která měla být 1,27 g/cm³, byla měřena pomocí hustoměru.

4.2 Technické vybavení a pomůcky

4.2.1 Přístroje

Automatické pipety – Research Plus, Eppendorf

Centrifuga – 5415 D, Eppendorf

Centrifuga – 5804 R, Eppendorf

Kuličkový homogenizátor – FastPrep24, M.G.P.

Kuličkový homogenizátor – HG-24, Biobase Biotech Co

Třepačka

UV transluminátor – Alliance Q9, Uvitec Cambridge

Multifunkční modulární reader SPARK – Tecan, Schoeller

Mrazicí boxy – Vxe Series Jouan, Thermo Fisher Scientific

Real-Time PCR analyzátor – QuantStudio6 Flex, Applied Biosystems

Vortex – Vortex V-1, BioSan

Mikroskop – Nikon Eclipse TS 100

Laboratorní váha – M-Prove, Sartorius

Mikrovlnná trouba – Zanussi

Horizontální elektroforéza – Thermo Scientific™ Owl™ EasyCast™ B1A Mini Gel

4.2.2 Pomůcky

Laboratorní sklo (odměrné válce, lžičky, Erlenmayerovy baňky), špičky Eppendorf, mikrozkušavky Eppendorf, falkony, PCR destička, stripy, parafilm, pinzeta, síta, misky, McMasterova komůrka, kovová tyčinka, fix, sáčky, stojany na mikrozkušavky, rukavice

4.3 Pracovní postupy

4.3.1 Izolace vajíček *Haemonchus contortus* z trusu ovcí

Nejprve bylo nutné vyizolovat vajíčka *H. contortus* z trusu ovcí, která byla následně použita k dalším analýzám. Izolace vajíček ze stolice byla provedla pomocí soustavy 3 sít o průměru ok 250, 100 a 25 μm .

Před začátkem izolace bylo zapotřebí převést trus tuhé konzistence do konzistence kašovitě. Stolica vložená do kádinky byla zalita studenou kohoutkovou vodou a následně rozmixována. Každé síto bylo položeno na misku a na vrchní síto s největším rozměrem ok byl nalit kašovitý trus, který byl pasírován rukou a několikrát promyt vodou. Filtrát z prvního síta byl přelit do druhého síta a také byl jemně pasírován. Poté byl filtrát z druhého síta přemístěn na třetí síto s nejmenšími rozměry ok a byl neustále proplachován vodou, dokud filtrát nebyl čistý. Vajíčka zůstala přichycena na povrchu třetího síta. Celý obsah tohoto povrchu byl přenesen do několika 50 ml zkumavek, které byly tímto obsahem naplněny do poloviny a následně doplněny studenou kohoutkovou vodou.

Takto upravené zkumavky byly centrifugovány na 1 600 rpm po dobu 3 min. Po centrifugaci byl supernatant jedním tahem vylit a k sedimentu byl přidán modifikovaný Sheatherův flotační roztok do $\frac{3}{4}$ zkumavky a celé to bylo promícháno kovovou tyčinkou. Následně byla zkumavka doplněna flotačním roztokem až po okraj a promíchána otočením dnem vzhůru. Opět bylo centrifugováno, tentokrát na 1 000 rpm po dobu 3 min. Vajíčka plavala na povrchu, kde vypadala jako světlý povlak. Byly odebrány 3 ml supernatantu s vajíčky pomocí 1 ml pipety do 15 ml zkumavky. Po odebrání vajíček byla nádobka opět doplněna flotačním roztokem a celý proces byl zopakován.

Následoval krok přečištění vajíček. Z každé zkumavky byly odebrány z vrchu 2 ml supernatantu do nové 15 ml zkumavky. Ta byla doplněna flotačním roztokem a stočena na 1 000 rpm po dobu 3 min. Z každé zkumavky byl odebrán supernatant o objemu 2 ml a byl přemístěn do 15 ml zkumavky. Bylo vypláchnuto vodou také víčko. Zkumavka byla doplněna vodou, dobře promíchána a stočena na 1 600 rpm po dobu 3 min. Poté byl vylit supernatant jedním tahem, byla přidána trocha vody a byla slita stejná vajíčka z různých zkumavek do jedné společné. Ta byla doplněna vodou až po okraj a centrifugována na 1 600 rpm po dobu 3 min. Tento krok byl opakován až do úplného vymytí flotačního roztoku. Všechn

supernatant byl odstraněn a byly přidány 2 ml studené kohoutkové vody, vše bylo promícháno a následně byla vajíčka spočítána.

K počítání vajíček bylo zapotřebí podložní sklíčko a mikroskop. Na podložní sklo bylo uděláno 5 kapek o objemu 10 μ l. Pod mikroskopem byla spočítána vajíčka v jedné kapce. Poté byl vypočítán jejich průměr a došlo k přepočítání na 1 ml suspenze. Podle celkového objemu suspenze byl zjištěn celkový počet vajíček.

4.3.2 Izolace gDNA z *Haemonchus contortus*

Izolace gDNA z vajíček a L1 larev *H. contortus*, konkrétně citlivého kmenu ISE (*Inbred Susceptible Edinburg*), byla prováděna pomocí izolačního kitu QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. Vyizolovaná DNA byla později využívána jako kontrolní materiál k některým PCR reakcím.

Nejprve bylo zapotřebí vytemperovat všechny vzorky na pokojovou teplotu (15–25 °C). Danými vzorky byly L1 larvy a dva vzorky vajíček, přičemž v jednom bylo 500 vajíček a ve vzorku druhém 10 vajíček.

K uvedeným vzorkům bylo do mikrozkušavky přidáno 180 μ l pufru ATL a 20 μ l proteinázy K. Vše bylo vortexováno a inkubováno ve třepací vodní lázni při teplotě 56 °C, dokud nebyla tkáň zcela lyzována. Doba lýzy je závislá na druhu tkáně. V našem případě trvala 84 min. Po uplynutí této doby byl vzorek krátce centrifugován, aby se odstranily kapičky z víka.

Ke vzorku bylo připipetováno 200 μ l pufru AL. Vše bylo promícháno pulzním vortexováním po dobu 15 s a inkubováno při 70 °C po dobu 10 min. Krátce centrifugováno, aby se odstranily kapky z víka. Bylo nezbytné, aby se vzorek a pufr AL důkladně promíchaly, aby se získal homogenní roztok. Po přidání pufru AL se může vytvořit bílá sraženina, která se rozpustí během inkubace při 70 °C.

Následně bylo přidáno 200 μ l ethanolu (96–100 %), promícháno pulzním vortexováním a krátce centrifugováno. Je nezbytné, aby byly vzorek, pufr AL a ethanol důkladně promíchány.

Směs byla opatrně přenesena, včetně případné sraženiny, na QIAamp Mini kolonku, umístěnou ve sběrné zkumavce o objemu 2 ml. Bylo centrifugováno při 6 000 g po dobu

1 min. Sběrná zkumavka s filtrátem byla vyhozena. Dále byla tatáž QIAamp Mini kolonka umístěna do nové sběrné 2 ml zkumavky.

Opatrně bylo otevřeno víko kolonky QIAamp Mini a bylo přidáno 500 µl pufru AW1. Opět bylo centrifugováno při 6 000 g po dobu 1 min a poté byla kolonka přemístěna do nové sběrné zkumavky. Filtrát byl zlikvidován.

Dále bylo na stejnou kolonku nanášeno 500 µl pufru AW2. Tentokrát centrifugace probíhala při 20 000 g po dobu 3 min. Aby se zajistil minimální přenos pufru AW2, bylo doporučeno přendat kolonku do 2 ml zkumavky, která není součástí balení, a centrifugovat 1 min při maximálních otáčkách.

K eluci gDNA z kolonky bylo zapotřebí přidat 200 µl pufru AE, následovala inkubace při pokojové teplotě po dobu 1 min a poté bylo centrifugováno při 6 000 g po dobu 1 min. K dokonalé eluci gDNA bylo zapotřebí tento krok zopakovat. Vyeluovaná nukleová kyselina byla nasáta a vypuštěna na stejnou kolonku, opět následovala centrifugace za stejných podmínek.

Po ukončené izolaci proběhlo změření koncentrace vyizolované gDNA, abychom zjistili výtěžek nukleové kyseliny. Měření koncentrace bylo provedeno pomocí multifunkčního modulárního readeru SPARK od firmy Schoeller. Tento přístroj měří koncentraci nukleové kyseliny na základě její absorpce.

4.3.3 Izolace gDNA z celých těl parazitů

Obdobně jako probíhala izolace gDNA z vajíček a larev *H. contortus*, byla prováděna také izolace gDNA z celých těl parazitů. Vyizolovaná gDNA z těchto dospělých hlístic, skladovaných v 70 % ethanolu, sloužila jako referenční templát pro náš experiment. Daná gDNA byla extrahována z těla jednoho jedince daného druhu. Konkrétně těmito druhy byly *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus*, *Chabertia*, *Ashworthius* a *Nematodirus*. I zde byl použit kit QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook a izolace probíhala stejným způsobem, který je popsán v kapitole 4.3.2 Izolace gDNA z *Haemonchus contortus*.

4.3.4 Zpracování výkalů a izolace gDNA

Pro experimentální analýzu byly použity výkaly od ovcí, které byly záměrně nakaženy nejběžnějším parazitem ovcí *H. contortus*. Poté těmto ovcím byly podány anthelmintika a účinnost odčervení byla sledována pomocí koprologické metody EPG a pomocí RT-PCR. Trus od ovcí byl sbírán do sáčků, které byly pečlivě označeny a uchovány v hlubokomrazícím boxu.

Před vlastní analýzou bylo zapotřebí nechat vzorky rozmrazit při pokojové teplotě. Na analytických vahách bylo do sáčku odváženo zhruba 5 g trusu a rozmělněno rukou. Ze zhomogenizovaného vzorku byl do zkumavky o objemu 20 ml odebrán 1 g trusu. Ke vzorku bylo přidáno 800 μ l BashingBead Buffer a 3 200 μ l PBS. Výkaly byly důkladně rozpuštěny v roztoku pomocí vortexu. Na 1 000 μ l špičce byl ustříhnut konec v místě zužení a bylo odebráno 1 200 μ l trusu rozpuštěného v roztoku do ZR BashingBead Lysis Tube s kuličkami. Poté následovala homogenizace na kuličkovém homogenizátoru dvakrát po dobu 30 s. Mezi cykly se nechávala krátká pauza, aby se vzorky příliš nezahřály. Nezpracovaný trus se řádně označil a uschoval do mrazícího boxu pro případnou další analýzu.

Zbytek izolace probíhal za sterilních podmínek. Na každý vzorek bylo zapotřebí měnit rukavice, aby se zabránilo kontaminaci mezi vzorky.

Homogenizované vzorky byly centrifugovány při 10 000 g po dobu 1 min. Přibližně 400 μ l supernatantu bylo nanášeno na Zymo-Spin III-F Filter, který byl umístěn v čisté sběrné zkumavce. Následovala centrifugace při 8 000 g po dobu 1 min.

K filtrátu ve sběrné zkumavce bylo připipetováno 1 200 Genomic Lysis Buffer a špičkou důkladně promícháno. Dále bylo přeneseno 800 μ l materiálu na Zymo-Spin IIC Column v čisté sběrné zkumavce a centrifugováno při 10 000 g po dobu 1 min. Nový filtrát byl odlit, sběrná zkumavka osušena papírovou utěrkou a celý krok byl zopakován.

Zymo-Spin IIC Column byl umístěn do nové sběrné zkumavky, bylo na něj nanášeno 200 μ l DNA Pre-Wash Bufferu a odstředováno při 10 000 g po dobu 1 min. Na tutéž kolonku bylo přidáno 500 μ l gDNA Wash Bufferu, centrifugováno při 10 000 g po dobu 1 min a sběrná zkumavka s filtrátem byla vyhozena. Stejná kolonka byla umístěna do čisté 1,5 ml zkumavky a přímo na její povrch bylo opatrně napipetováno 50 μ l DNA Elution Bufferu, následovalo

odstředění při 10 000 g po dobu 30 s. Ve filtrátu se v tuto chvíli nacházela vyeluovaná gDNA. Bylo však zapotřebí ji přečistit.

K tomuto kroku bylo nutné si nejprve předpřipravit poslední kolonku. Zymo-Spin III-HRC Filter byl umístěn do nové sběrné zkumavky a bylo na něj nanášeno 600 µl Prep Solution a centrifugováno při 10 000 g po dobu 3 min. Eluovaná gDNA byla nanášena na tento aktivovaný filtr, který byl umístěn v čisté 1,5 ml zkumavce a bylo odstřeďováno při 12 000 g po dobu 3 min. Filtrátem byla gDNA, která je vhodná pro molekulární analýzu. Daná nukleová kyselina byla přepipetována do malých PCR zkumavek a 10x naředěna. Vše bylo důkladně a řádně popsáno a umístěno do mrazícího boxu v laboratoři.

4.3.5 Real-Time PCR (RT-PCR)

Tato metoda se řadí mezi jednu z nejpoužívanějších technik v molekulární biologii. V našem případě byla použita kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase, označována jako RT-PCR. Hlavní předností této techniky je schopnost detekovat amplifikované produkty v průběhu celého procesu, nikoli až na jejím konci. Detekce je založena na použití fluorescenční látky či sondy, která se specificky váže na vznikající produkt. Hladina fluorescence poté vypovídá o množství DNA ve vzorku.

Metoda PCR se skládá ze 3 fází, které se neustále cyklicky opakují. Prvním krokem je denaturace, při které se využívá vysoké teploty kolem 95 °C po dobu 20–30 s. V této fázi dochází k rozdělení dvoušroubovice DNA na jednotlivá vlákna. Jako druhý v pořadí je annealing, kde se teplota snižuje na 55–65 °C, což umožňuje nasednutí specifických primerů na jednořetězcovou molekulu DNA. Poslední fází je extenze, která probíhá za teploty kolem 75 °C. Hlavní roli zde hraje DNA polymeráza, jejíž úkolem je syntéza komplementárního vlákna DNA.

Pro tuto metodu bylo důležité mít dobře vyizolovanou gDNA, která byla použita jako templát. Dále k provedení RT-PCR bylo zapotřebí připravit si primery, které jsou běžně dodávány v lyofilizovaném stavu. V našem experimentu jsme primery ředily na finální koncentraci 100 nM. Vždy byl použit specifický primer F a R (*forward and reverse*). Pracovní koncentrace směsi F i R primeru byla 2,5 µM. Dalšími složkami důležitými k provedení PCR jsou deoxyribolukleotidy (dATP, dCTP, dGTP a dTTP), teplotně stabilní Taq polymeráza,

MgCl₂, pufr a voda. V našem případě byly tyto složky komerčně dostupné v SG Mixu (Xceed SG RT-PCR). Všechny komponenty jsou zde obsaženy v optimálním množství a koncentraci. Navíc je zde fluorescenční barvivo SYBR Green I pro stanovení v reálném čase.

Reakční směs pro 1 vzorek se skládala z 10,0 µl Xceed SG RT-PCR, 0,8 µl primerů (F + R) a 4,2 µl redestilované vody. Toto množství se pipetovalo vždy do jedné jamky či jednoho stripu, proto je vždy nutné si přepočítat, jaké množství směsi bude zapotřebí pro všechny vzorky. Reakční směs o objemu 15 µl byla pipetována do mikrotitrační destičky nebo stripů a následně bylo přidáno 5 µl templátu. Vždy součástí každé PCR reakce pro každý set primerů byla negativní kontrola (NTC), kdy do reakční směsi místo templátu byla pipetována redestilovaná voda. Následovalo zavíčkování, důkladné promíchání pomocí vortexu a krátké stočení. Každý vzorek byl měřen v duplikátu.

Tabulka 2: Přehled teploty a času v jednotlivých fázích RT-PCR

Fáze	Teplota [°C]	Čas [s] x [min]
aktivace DNA polymerázy	95	10 min
denaturace	98	15 s
annealing	57 nebo 60	20 s
extenze	72	20 s
analýza křivky tání	60–95	každých 0,5 °C = 5 s

4.3.6 TaqMan PCR

V naší práci byla použita také TaqMan PCR. Jedná se o metodu, kde se do reakční směsi přidává kromě primerů ještě krátký oligonukleotidový řetězec, který je na jednom konci opatřen fluorescenční značkou a na druhém konci zhášedčem. Pokud jsou oba konce v bezprostřední vzdálenosti, dochází k potlačení fluorescence. V okamžiku, kdy DNA polymeráza při syntéze dorazí ke značenému nukleotidu, dojde k odštěpení fluorescenční sondy do roztoku a je možné měřit fluorescenci.

V tomto případě se reakční směs skládala z gb Easy PCR Master Mixu, který podobně jako SG Mix obsahoval potřebné komponenty v ideálním množství a koncentraci, dále primerů (F + R) o finální koncentraci 200 nM, sondy o finální koncentraci 200 nM a redestilované vody. Celkově v reakční směsi byla tedy koncentrace primerů a sondy shodná (200 nM). Celkové složení směsi pro 1 vzorek je názorně ukázáno v tabulce 3.

Tabulka 3: Složení mastermixu při koncentraci sondy i primerů 200 nM

Složka	Objem pro 1 vzorek [μl]
gb Easy PCR Mix	10,0
Taq Man sonda (5 μ M)	0,8
primery (F + R) (2,5 μ M)	1,6
redestilovaná voda	2,6
celkem	15,0

Kromě tohoto složení byly vyzkoušeny také jiné koncentrace sondy a primerů. V prvním případě jsme snížili množství sondy i primerů o polovinu. To znamená, že koncentrace obou složek byly 100 nM. Celkové složení PCR směsi je popsáno v tabulce 4.

Tabulka 4: Složení mastermixu při koncentraci sondy i primerů 100 nM

Složka	Objem pro 1 vzorek [μl]
gb Easy PCR Mix	10,0
Taq Man sonda (5 μ M)	0,4
primery (F+R) (2,5 μ M)	0,8
redestilovaná voda	3,8
celkem	15,0

Ve druhém případě jsme koncentraci sondy ponechali na 200 nM a koncentraci primerů snížili na 100 nM. Složení PCR směsi v tomto případě je popsáno v tabulce 5.

Tabulka 5: Složení mastermixu při koncentraci sondy 200 nM a primerů 100 nM

Složka	Objem pro 1 vzorek [μ l]
gb Easy PCR Mix	10,0
Taq Man sonda (5 μ M)	0,8
primery (F + R) (2,5 μ M)	0,8
redestilovaná voda	3,4
celkem	15,0

Následně bylo napipetováno 15 μ l dané reakční směsi do mikrotitrační destičky a k tomu bylo přidáno 5 μ l templátu. Do jamky s NTC kontrolou bylo přidáno místo templátu 5 μ l redestilované vody. Následovalo zavíčkování, důkladné promíchání a krátké stočení. Vše bylo měřeno v duplikátech. Podmínky jednotlivých fází RT-PCR zůstaly stejné jako u výše zmíněné metody bez využití fluorescenční sondy (kapitola 4.3.5 Real-Time PCR).

4.3.7 Stanovení účinnosti primerů Hco_ITS2

Před provedením vlastní PCR reakce je vždy vhodné stanovit její účinnost neboli efektivitu. PCR reakce se 100 % účinností probíhá jen v ojedinělých případech, ve většině reakcí je účinnost nižší. Účinnost PCR reakce je možné vypočítat ze sklonu standardní křivky. Na efektivitě celé reakce hraje důležitou roli také efektivita primerů. V tomto případě záleží na schopnosti primerů nasedat na jednovláknovou DNA. V naší práci byla testována účinnost primerů Hco_ITS2 při teplotě annealingu 57 °C a 60 °C.

K testování byla jako templát použita gDNA získaná z 500ti vajíček rodu *H. contortus*. Původní koncentrace této gDNA byla 13,23 ng/ μ l. K experimentu jsme využily 5 koncentrací, kdy každá následující byla 10x méně koncentrovanější. Počáteční koncentrace nebyla použita. PCR směs byla složena z 10,0 μ l SG Mixu, 0,8 μ l primerů Hco_ITS2 o koncentraci

2,5 μM a 4,2 μl redestilované vody. Vždy 15 μl PCR směsi bylo napipetováno do stripu a přidáno 5 μl templátu. Součástí reakce byla také NTC kontrola. Vše bylo měřeno v duplikátech. Podmínky reakce jsou popsány v tabulce 2 (kapitola 4.3.5 Real-Time PCR). Příprava jednotlivých templátů a jejich koncentrace jsou uvedeny v tabulce 6.

Tabulka 6: Příprava a koncentrace templátů pro stanovení efektivity *Hco_ITS2*

Templát	Objem vody [μl]	Objem gDNA [μl]	Celková koncentrace
E 500	0	50	13,23 ng/ μl
2	45	5 z předchozí konc.	1,323 ng/ μl
3	45	5 z předchozí konc.	0,1323 ng/ μl
4	45	5 z předchozí konc.	132,3 pg/ μl
5	45	5 z předchozí konc.	13,23 pg/ μl
6	45	5 z předchozí konc.	1,323 pg/ μl

4.3.8 Stanovení účinnosti referenčních genů FARB, NCBP a GAPDH

Kromě *Hco_ITS2* primerů byly využity také jiné referenční geny *H. contortus*. Konkrétně těmito geny byly FARB, NCBP a GAPDH. Byla u nich stanovena jejich efektivita. Účinnost byla stanovena podobným způsobem jako u sady primerů *Hco_ITS2*.

Jako templát byla i zde použita gDNA vyizolovaná z 500ti vajíček rodu *H. contortus*. Výchozí koncentrace této gDNA byla 13,23 ng/ μl . Účinnost se testovala s 5ti koncentracemi, kdy každá následující byla 5x méně koncentrovanější než předchozí. PCR směs byla složena z 10,0 μl SG Mixu, 0,8 μl příslušného referenčního genu o koncentraci 2,5 μM a 4,2 μl redestilované vody. Reakce probíhala v mikrotitrační destičce. Do příslušné jamky bylo napipetováno 15 μl PCR směsi a 5 μl naředěného templátu. Měření probíhalo v duplikátech. Součástí byla také NTC kontrola. Podmínky reakce jsou popsány v tabulce 2 (kapitola 4.3.5 Real-Time PCR). Příprava jednotlivých templátů a jejich koncentrace jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Příprava a koncentrace templátů pro stanovení efektivity FARB, NCBP a GAPDH

Templát	Objem vody [μ l]	Objem gDNA [μ l]	Celková koncentrace
E 500	0	100	13,23 ng/ μ l
2	80	20 z předchozí konc.	2,646 ng/ μ l
3	80	20z předchozí konc.	529,2 pg/ μ l
4	80	20 z předchozí konc.	105,84 pg/ μ l
5	80	20 z předchozí konc.	21,168 pg/ μ l

4.3.9 Testování zkřížené reaktivity

Do našeho experimentu jsme se rozhodli zahrnout také zkoušku zkřížené reaktivity mezi jednotlivými primery. Jako templát jsme využili vyizolovanou gDNA z dospělých jedinců *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus spp.*, *Teladorsagia circumcinta* a *Chabertia ovina* a gDNA vyizolovanou z 1 vzorku trusu. Primery na *Ashworthius sidemi* a *Nematodirus battus* jsme použili pouze na gDNA vyizolovanou ze vzorku trusu. Předpokládali jsme, že primery budou amplifikovat pouze gDNA toho druhu parazita, na který jsou navrženy.

Nejprve bylo zapotřebí připravit si PCR směs pro každý typ sady primerů v požadovaném množství. Pro 1 vzorek se PCR směs skládala z 10,0 μ l SG Mixu, 0,8 μ l příslušných primerů (F + R) o koncentraci 2,5 μ M a 4,2 μ l redestilované vody. PCR směs o objemu 15 μ l s daným typem primerů byla rozpipetována do 11ti jamek v mikrotitrační destičce. Ke každému typu primerů (Hco_ITS2, Tel_ITS2, Tri_ITS1, Cha_COI) bylo přidáno 5 μ l gDNA *H. contortus*, *Trichostrongylus spp.*, *T. circumcinta* a *Ch. ovina* a gDNA ze vzorku trusu. K ostatním 2 primerům (Ash_ITS1 a Nem_SSU) bylo přidáno 5 μ l gDNA vyizolované ze vzorku trusu. Vše bylo prováděno v duplikátech a součástí každé sady primerů byla NTC kontrola. Mikrotitrační destička byla zavíčkovaná, promíchána a krátce stočena. Podmínky PCR reakce jsou popsány v tabulce 2 (kapitola 4.3.5 Real-Time PCR). V tabulce 8 je popsána příprava mastermixu pro jeden typ primerů. Takto byla připravována reakční směs pro každý typ primerů (Hco_ITS2, Tel_ITS2, Tri_ITS1, Cha_COI). Master mix pro primery Ash_ITS1

a Nem_SSU byly připravovány stejným způsobem, jen celkové množství bylo menší, neboť daná směs byla použita pouze pro jeden vzorek a negativní kontrolu.

Tabulka 8: Složení a výpočet mastermixu pro 1 typ primerů

Složka	Objem pro 1 vzorek [μ l]	Objem celkem [μ l]
SG Mix	10,0	110,0
primer (F + R) (2,5 μ M)	0,8	8,8
redestilovaná voda	4,2	46,2
celkem	15,0	165

4.3.10 Metoda EPG

Metoda EPG (*eggs per gram*) patří mezi jednu z nejpoužívanějších koprologických metod. Zjišťuje se zde množství vajíček v 1 g trusu. Tato kvantifikační metoda pomáhá určit intenzitu infekce u ovcí. Postup je podobný jako u flotace, avšak suspenze se nakonec vlije do McMasterovy komůrky, kde se počítají jednotlivé druhy vajíček ve čtvercích.

K této metodě bylo zapotřebí nachystat si McMasterovu počítací komůrku, nasycený roztok NaCl, třecí misku, sítko a 100 ml odměrný válec.

Nejprve byly odváženy 3 g trusu, které se důkladně rozetřely v třecí misce se 20 ml nasyceného roztoku NaCl. Suspenze byla následně přelita přes sítko do 100 ml odměrného válce a válec byl doplněn roztokem NaCl až do objemu 45 ml. Vše bylo řádně promícháno a zhruba z poloviny odměrného válce byla odebrána suspenze a naplněna do dvou políček počítací komůrky.

Takto připravená komůrka se nechala 2–3 min stát a následně pod mikroskopem, pod zvětšením 10x, byla počítána všechna vajíčka v prostoru omezeném počítacími mřížkami. Vajíčka ležící na okraji počítacího prostoru se taktéž započítávají do součtu vajíček uvnitř mřížky. Z každého vzorku trusu byla počítána 4 políčka, celkově na jeden vzorek bylo tedy potřeba si připravit 2 McMasterovy komůrky.

Následně bylo zapotřebí přepočítat, jaké množství vajíček se nachází v 1 g trusu. Každé nalezené vajíčko pod mikroskopem znamená 50 vajíček v 1 g trusu. Celkově se tedy počet vajíček zjistil sečtením vajíček ve 4 políčkách x 50.

U ovcí s nákazou do 1 000 vajíček v 1 g trusu se nález interpretuje jako mírná invaze. Při nálezu 1 000–2 000 vajíček v 1 g trusu se hovoří o invazi s klinickými příznaky, kdy je třeba zahájit anthelmintickou léčbu. Při infekci vyšší než 2 000 vajíček v 1 g trusu se jedná o silnou invazi.

5. Výsledky

5.1 Izolace gDNA z vajíček a L1 larev *Haemonchus contortus*

Pro zkušební účely a ověřování efektivitu primerů bylo nejprve zapotřebí vyizolovat gDNA z *H. contortus*, zejména citlivého kmene ISE. Vyizolovala jsem gDNA z 10 vajíček, 500 vajíček a L1 larev. Měření koncentrace bylo provedeno pomocí multifunkčního modulárního readeru SPARK od firmy Schoeller. Jednotlivé vyizolované koncentrace gDNA jsou popsány v tabulce 9.

Tabulka 9: Koncentrace vyizolované gDNA

Vzorek	Koncentrace [ng/μl]
L1	73,40
E10	0,59
E500	13,23

5.2 Izolace gDNA ze vzorku trusu s testováním dvou způsobů homogenizace

Při prvním pokusu izolace gDNA ze vzorku trusu byly testovány dva způsoby homogenizace. Trus č. 1 byl rozdělen na dvě poloviny. Izolace byla prováděna stejným způsobem až do fáze homogenizace. V prvním případě bylo homogenizováno pomocí obyčejné třepačky. Doba homogenizace trvala 10 min. Druhou možností bylo použití kuličkového homogenizátoru, na kterém homogenizace probíhala dvakrát po dobu 30 s. Mezi cykly byla krátká pauza, aby se vzorek příliš nezahřál. Zbytek izolace u obou vzorků probíhal standardním způsobem, který je popsán v kapitole 4.3.4 Zpracování výkalů a izolace gDNA.

Po izolaci byla získaná gDNA 10x naředěna a umístěna do PCR zkumavek. Zkumavky byly popsány 1A a 1B. U zkumavky 1A byla použita k homogenizaci třepačka. U zkumavky 1B

probíhala homogenizace pomocí kuličkového homogenizátoru. Koncentrace gDNA v obou vzorcích byla změřena pomocí multifunkčního modulárního readeru SPARK. Po změření bylo zjištěno, že způsob homogenizace nemá na výtěžnost nukleové kyseliny vliv. V obou případech bylo množství gDNA téměř shodné. Výsledky jsou zpracovány v tabulce 10.

Tabulka 10: Koncentrace gDNA po homogenizaci dvěma způsoby

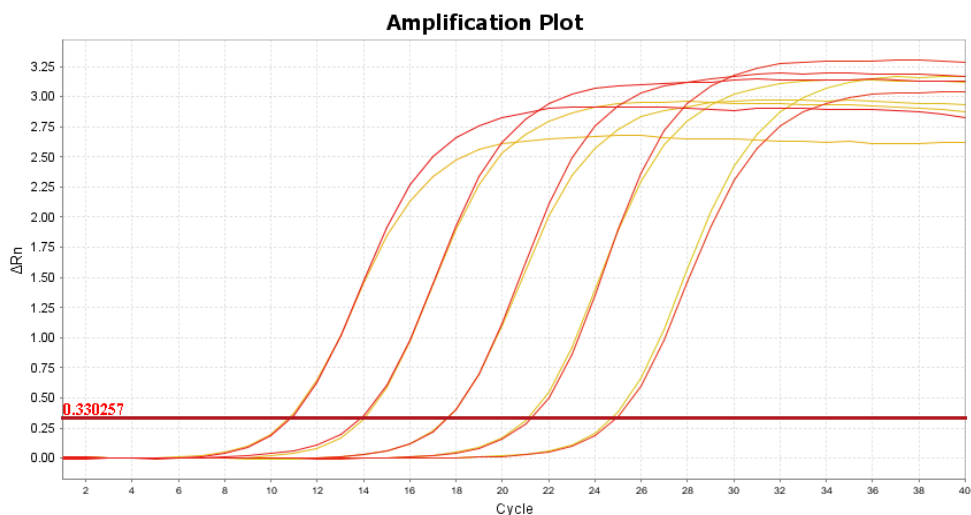
Vzorek	Koncentrace [ng/μl]
1A	111,05
1B	111,64

5.3 Testování efektivity sady primerů Hco_ITS2

Pro testování efektivity sady primerů Hco_ITS2 byla templátem gDNA vyizolovaná z 500ti vajíček rodu *H. contortus*. Pro testování bylo použito 5 koncentrací gDNA, které byly řaděny desítkovou řadou. Byly zkoušeny 2 teploty nasedání primerů (annealingu). Nejprve byla pro tuto fázi zvolena teplota 60 °C. V dalším pokusu byla teplota snížena na 57 °C. Doba trvání této fáze byla 20 s.

V případě vyšší teploty účinnost primerů dosahovala 89 %. Tato hodnota nebyla příliš vysoká, proto byla zkoušena také teplota annealingu 57 °C, u které byla očekávána efektivita lepší.

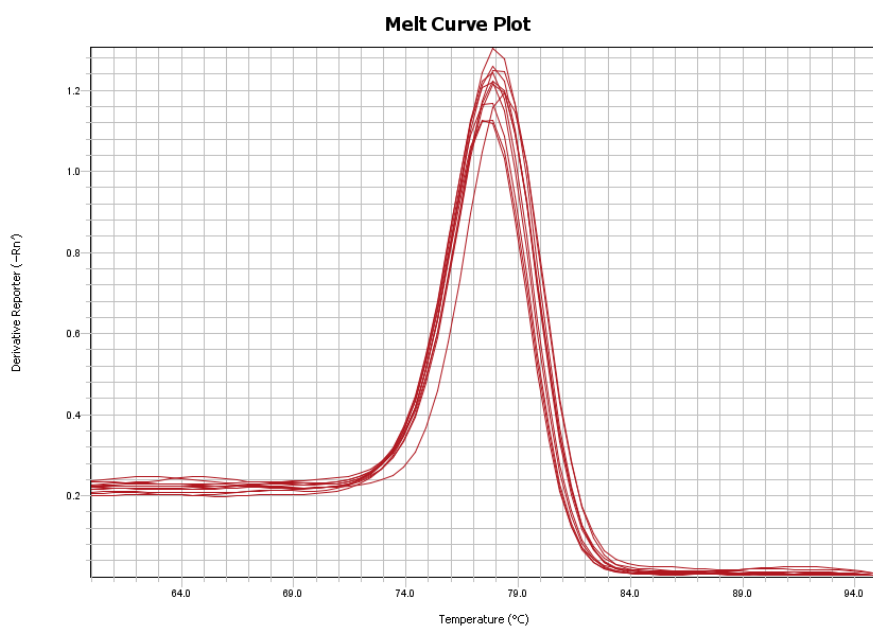
Ve druhém případě byla teplota druhé fáze PCR reakce přenastavena na 57 °C. Záznam reakce je patrný na obrázku 10, kde můžeme vidět nárůst fluorescence v závislosti na počtu cyklů. Je zde zobrazeno 5 koncentrací. Vždy daná hladina byla měřena v duplikátu. Dvojice duplikátů je vyznačena červenou a žlutou křivkou.



Obrázek 10: Záznam RT-PCR při teplotě annealingu 57 °C

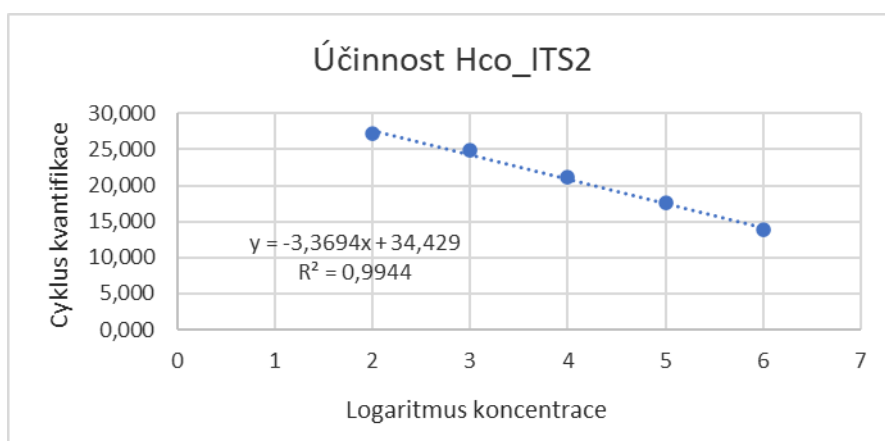
Amplification Plot – graf amplifikace, Cycle – cyklus

Součástí měření byla také křivka teploty tání (*melting curve*), která ukazuje teplotu tání jednotlivých PCR produktů. Nespecifické PCR produkty obvykle mívají nižší teplotu tání než PCR produkty specifické. Pomocí křivky tání zjistíme změnu intenzity fluorescence při různých teplotách. V našem případě můžeme na obrázku 11 vidět stejné křivky teploty tání, ve všech hladinách koncentrací vzniká tedy jeden totožný produkt. Teplota tání tohoto PCR produktu je kolem 78 °C.



Obrázek 11: Křivka teploty tání PCR produktů

Pro výpočet účinnosti byl vytvořen graf závislosti detekovaného kvantifikačního cyklu na logaritmu koncentrace (relativní hodnoty vypočítané z ředící řady). Na ose y jsou zaznamenané cykly, v nichž byla překročena hranice detekce (*threshold line*), na ose x jsou vyobrazeny logaritmy jednotlivých hladin koncentrací z ředící řady. Pro výpočet účinnosti byla použita směrnice získané přímkou ($y = -3,3694x + 34,4327$) a vypočítána byla dle rovnice $Eff = 10^{-(1/-3,3694)} - 1$. Účinnost při 57°C dosahovala 98 %, což je velmi dobrý výsledek. Proto v následných PCR reakcích byla použita tato nižší teplota annealingu. Na obrázku 12 je znázorněn graf s vypočítanou rovnicí a korelačním koeficientem, který je v tomto případě 0,9944.



Obrázek 12: Graf pro výpočet účinnosti primerů Hco_ITS2

5.4 Testování zkřížené reaktivity primerů

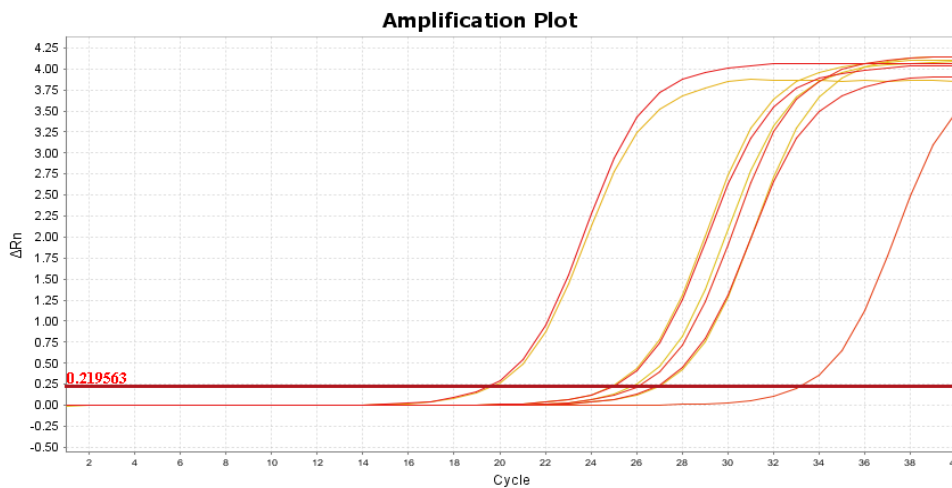
Při tomto experimentu jsme použily primery Hco_ITS2, Tel_ITS2, Tri_ITS1 a Cha_COI. Templátem zde byla vyizolovaná gDNA z dospělých jedinců *H. contortus*, *T. circumcincta*, *Trichostrongylus* a *Ch. ovina*. Použitá koncentrace gDNA těchto parazitů je uvedena v tabulce 11. Každý z primerů byl použit se všemi templáty. Očekávalo se, že dané primery budou reagovat pouze s tím templátem, na který jsou navrženy. K detekci fluorescence zde bylo použito barvivo SYBR Green I.

Tabulka 11: Koncentrace gDNA ostatních parazitů

Templát	Koncentrace [ng/μl]
<i>H. contortus</i>	2,538
<i>T. circumcinta</i>	0,608
<i>Trichostrongylus</i>	0,243
<i>Ch. ovina</i>	1,866

5.4.1 Sada primerů Hco ITS2

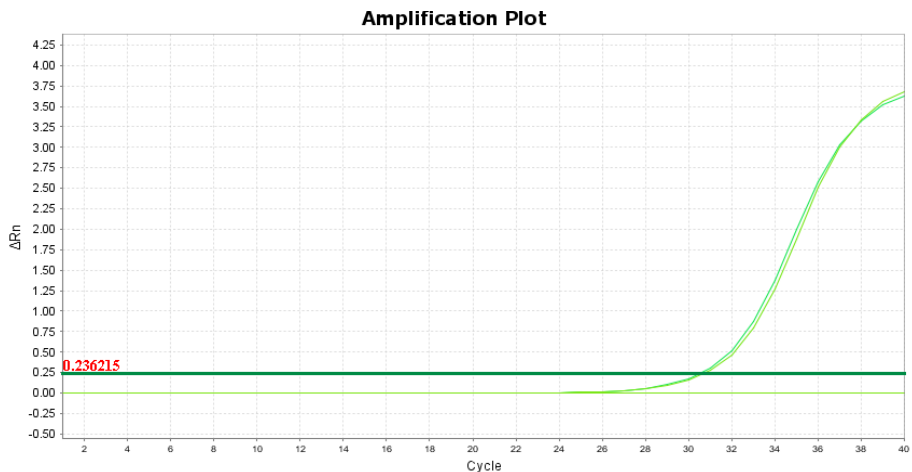
Na obrázku 13 můžeme pozorovat záznam PCR amplifikace s použitými primery Hco ITS2. Tyto primery částečně amplifikovaly kromě gDNA *H. contortus* také gDNA ostatních parazitů. Pravděpodobně cílové oblasti jsou u různých parazitů z určité části shodné a primery nasedají také na jiný templát, než na který jsou navrženy a dochází tak k nespecifické amplifikaci.



Obrázek 13: Záznam RT-PCR při použití primerů Hco ITS2

5.4.2 Sada primerů Tel_ITS2

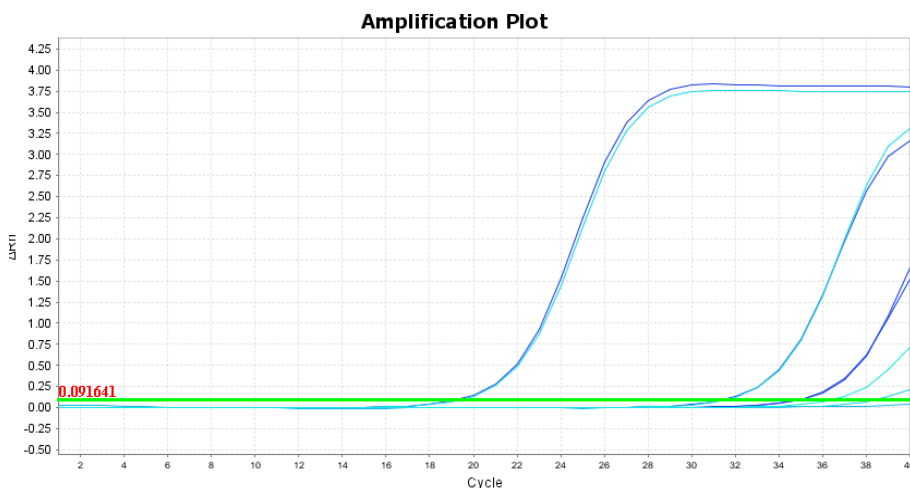
U tohoto parazita nebyla žádná zkřížená reaktivita pozorována. Primery amplifikovaly pouze gDNA *T. circumcinta*. Tyto primery představují vzorový příklad, jak by správně měla amplifikace vypadat. Na obrázku 14 vidíme záznam amplifikace, včetně nulové odezvy v kontrolní reakci bez templátu.



Obrázek 14: Záznam RT-PCR při použití primerů Tel_ITS2

5.4.3 Sada primerů Tri_ITS1

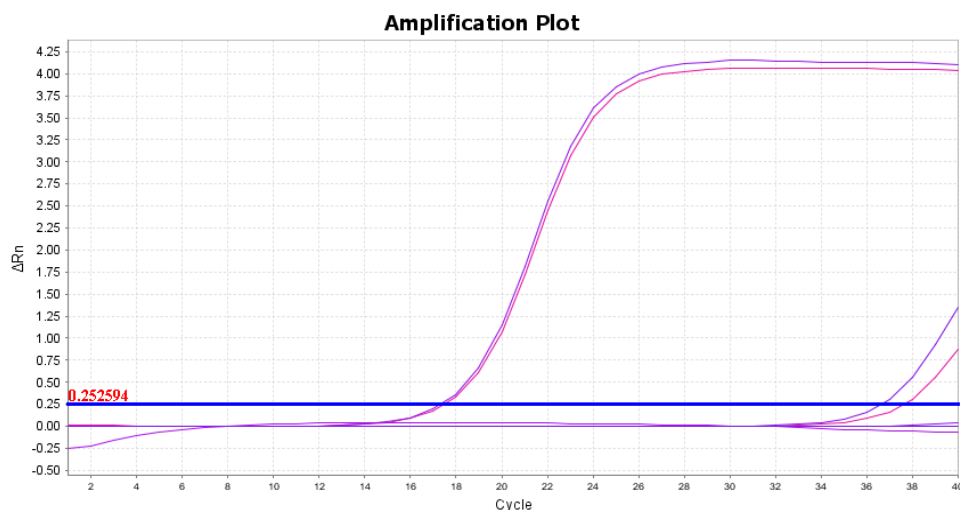
U tohoto parazita můžeme na obrázku 15 vidět, že primery amplifikovaly nejen gDNA rodu *Trichostrongylus*, ale částečně také ostatní gDNA. Nejvíce je však správně detekovaná gDNA rodu *Trichostrongylus*. Není zde tak velká zkřížená reaktivita jako u primerů Hco_ITS2. Primery na detekci tohoto parazita by se daly použít k dalším experimentům.



Obrázek 15: Záznam RT-PCR při použití primerů Tri_ITS1

5.4.4 Sada primerů Cha_COI

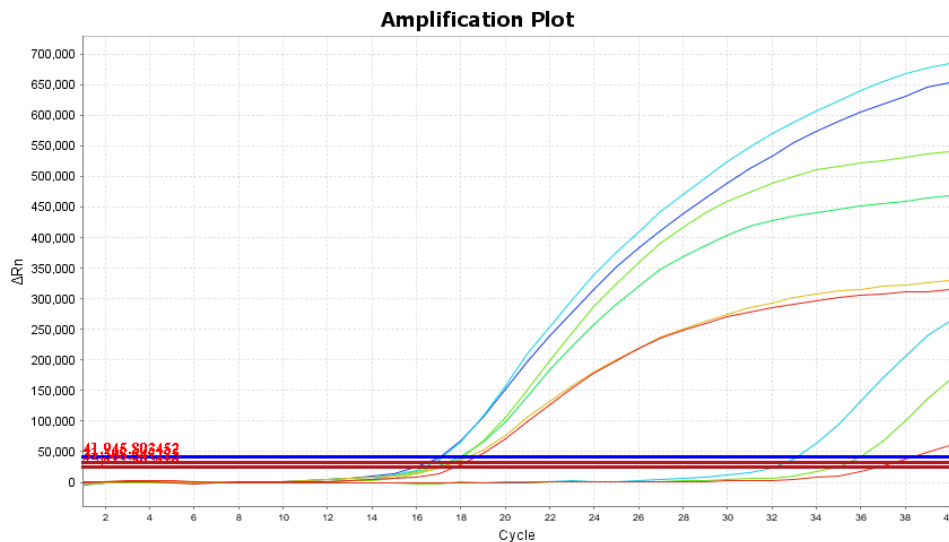
U této sady primerů dopadla amplifikace také velmi dobře, primery detekovaly zejména gDNA *Ch. ovina*. Na obrázku 16 je v pokročilých cyklech vidět, že dochází k částečné amplifikaci také jiné gDNA, je to však již na hranici meze detekce, není to tedy nic, co by mělo zásadně ovlivňovat analýzu. Také tyto primery by se daly k dalším pokusům použít.



Obrázek 16: Záznam RT-PCR při použití primerů Cha_COI

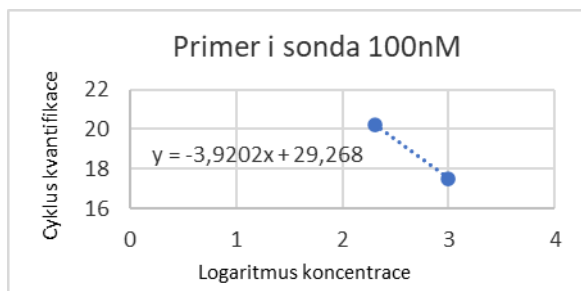
5.5 Zkoušení TaqMan sondy

Protože při testu zkřížené reaktivity amplifikovaly primery Hco_ITS2 také ostatní gDNA, bylo následně vyzkoušeno zvýšení specifity RT-PCR použitím TaqMan sondy místo fluorescenčního barviva SYBR Green I. Byly testovány různé koncentrace primerů Hco_ITS2 a sondy. Nejprve byla ponechána finální koncentrace primerů jako v ostatních experimentech, tedy 100 nM a k tomu byla přidána 100 nM sonda. Ve druhém případě byla koncentrace primerů ponechána stejná a koncentrace sondy byla zvýšena na 200 nM. Ve třetím případě se zvýšila i koncentrace primerů na 200 nM. K tomu byla jako templát použita gDNA *H. contortus*, vyizolovaná z 500ti vajíček. Byla naředěna 1 000x a 10 000x. Koncentrace tedy byla 132,3 pg/μl a 13,23 pg/μl. Z těchto dvou koncentrací byla vypočítána „účinnost“. Nejedná se však o skutečnou účinnost, jelikož dvě ředění ke zjištění efektivity nejsou dostatečné. Na obrázku 17 je znázorněn průběh PCR reakce. Jednotlivé křivky ukazují různé poměry koncentrací primerů a sondy, které jsou popsány výše.

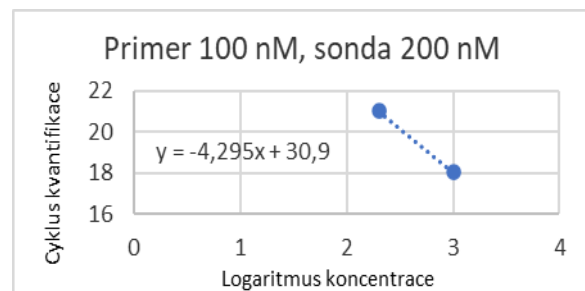


Obrázek 17: Záznam RT-PCR při použití různých koncentrací primerů Hco_ITS2 a FAM

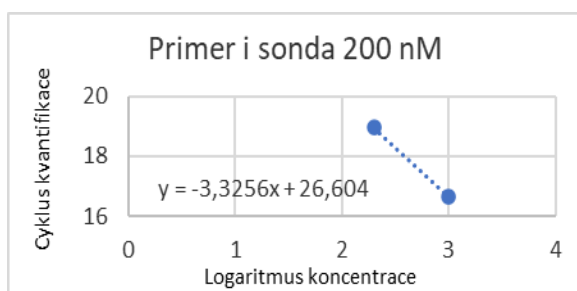
Případ, kde byla koncentrace primerů i sondy 100 nM, ukazuje obrázek 18. Zde byla „účinnost“ vypočítána na 80 %. Na obrázku 19 je znázorněna koncentrace primerů 100 nM a sondy 200 nM. V tomto případě byla „účinnost“ stanovena na 71 %. Na obrázku 20 je znázorněna třetí možnost, tedy koncentrace primerů i sondy 200 nM. Zde „účinnost“ dosahovala 100 %. Tento poměr koncentrací vycházel tedy ze všech možností nejlépe. Pro další analýzy s využitím TaqMan sondy byla vždy zvolena právě tato koncentrace sady primerů a sondy.



Obrázek 18: Testování koncentrace primerů i sondy 100 nM



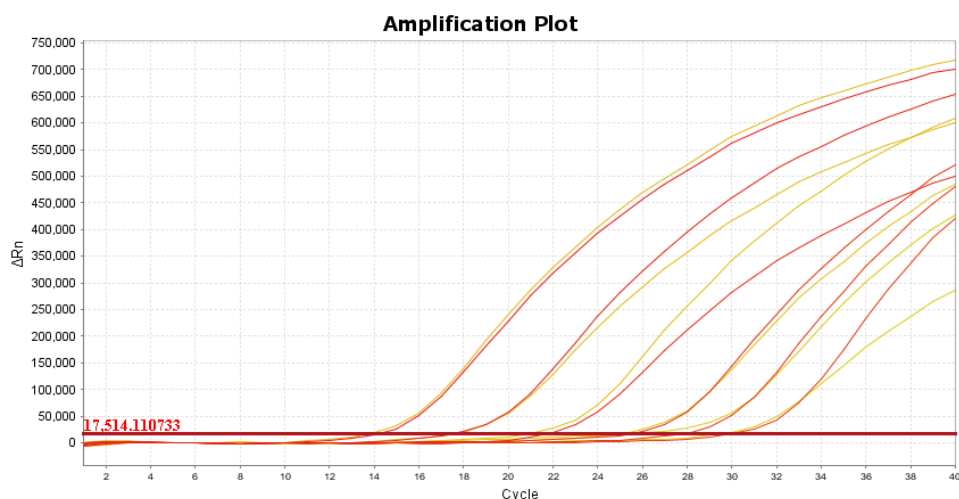
Obrázek 19: Testování koncentrace primerů 100 nM a sondy 200 nM



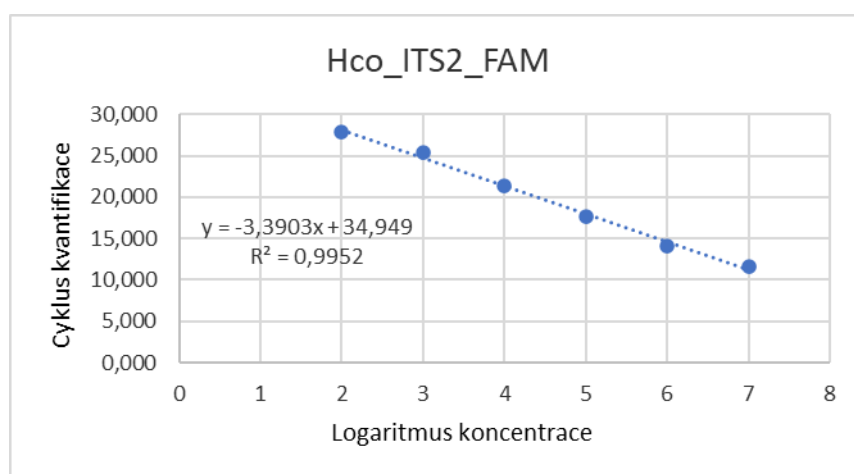
Obrázek 20: Testování koncentrace primerů i sondy 200 nM

5.5.1 Efektivita TaqMan sondy

Stejně jako byla testována efektivita primerů Hco_ITS2 s využitím fluorescenčního barviva SYBR Green I, byla důkladně testována také efektivita TaqMan sondy s primery Hco_ITS2. Finální koncentrace primerů a sondy byla tedy 200 nM. Jako templát bylo použito 6 desítkových ředění gDNA vyzolované z 500ti vajíček *H. contortus*. Počáteční koncentrace byla 13,23 ng/μl. Následně bylo 6 ředění použito pro výpočet účinnosti. Ta byla vypočítána z rovnice přímky $y = -3,3903x + 34,949$ s korelačním koeficientem 0,9952. Efektivita dosahovala 97 %. Na obrázku 21 je znázorněn průběh PCR reakce. Na obrázku 22 je graf, použitý pro výpočet účinnosti.



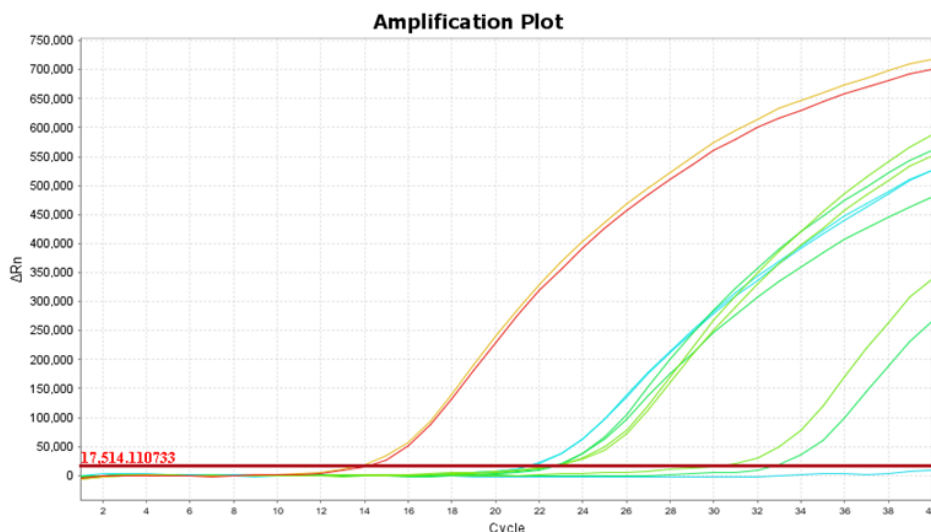
Obrázek 21: Záznam PCR reakce při testování efektivity TaqMan sondy



Obrázek 22: Výpočet efektivity TaqMan sondy

5.5.2 Testování zkřížené reaktivity při použití TaqMan sondy

Všechny primery, kromě Hco ITS2, vykazovaly dobrou specifitu ve zkřížené reakci při použití barviva SYBR Green I. Abychom zvýšily specifitu i u primerů Hco ITS2, bylo vyzkoušeno použití TaqMan sondy. Pro testování zkřížené reaktivity při použití TaqMan sondy byla jako templát použita gDNA *H. contortus* o koncentraci 1,323 ng/μl. Dalším templátem byla gDNA z ostatních parazitů, konkrétně z *T. circumcinta*, *Trichostrongylus* a *Ch. ovina*. Koncentrace těchto templátů jsou uvedeny v tabulce 11 (kapitola 5.4 Testování zkřížené reaktivity primerů). Finální koncentrace primerů i sondy byly 200 nM. TaqMan sonda je specifická sonda, která by měla vykazovat signál pouze při amplifikaci gDNA *H. contortus*. Očekávali jsme, že v případě použití ostatních výše zmíněných templátů, nebude patrná žádná amplifikace. Záznam PCR reakce můžeme vidět na obrázku 23. Červená a žlutá křivka zde představuje amplifikaci gDNA *H. contortus*. Ostatní zelené a tyrkysově zelené křivky značí gDNA jiných parazitů. Vše bylo měřeno v duplikátu. Ze záznamu je patrné, že k největší amplifikaci došlo u gDNA získané z *H. contortus*. Došlo však i k amplifikaci gDNA *T. circumcinta*, *Trichostrongylus* i *Ch. ovina*. V našem experimentu tedy použití SYBR Greenu I ani TaqMan sondy není vysoce specifické pro gDNA *H. contortus*.

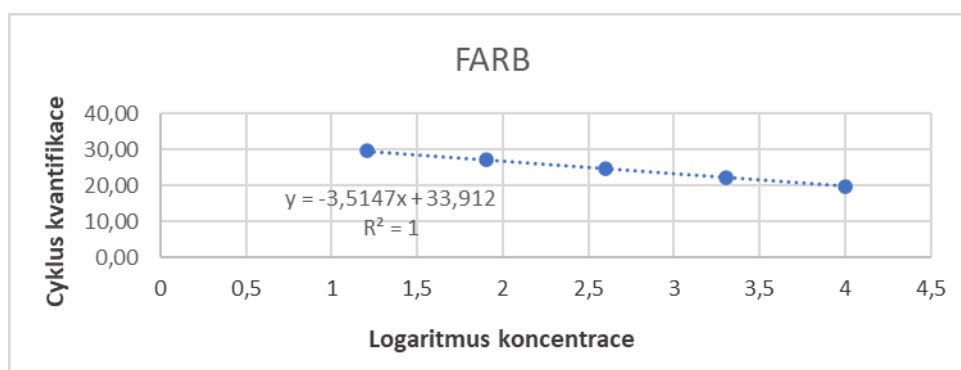


Obrázek 23: Záznam RT-PCR při testování zkřížené reakce s použitím TaqMan sondy

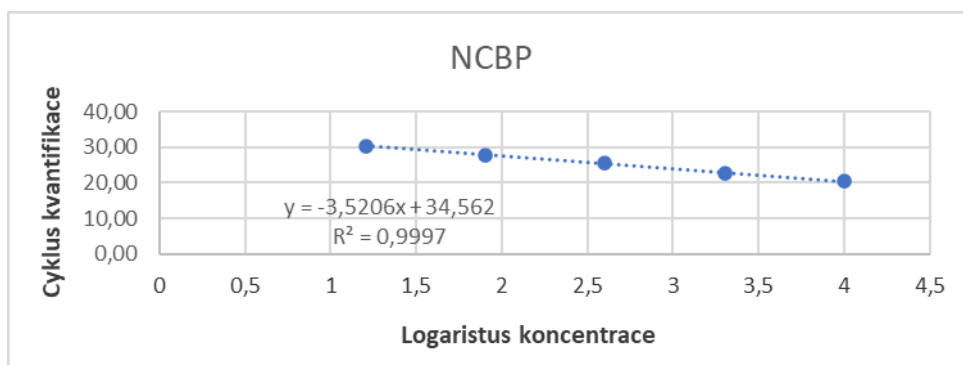
5.6 Testování efektivity referenčních genů FARB, NCBP a GAPDH

Jelikož sada primerů Hco_ITS2 s využitím fluorescenčního barviva SYBR Green I ani TaqMan sondy nebyla dostatečně specifická, aby amplifikovala pouze gDNA *H. contortus*, byly testovány také referenční geny FARB, NCBP a GAPDH. Na úvod byla zkoušena také jejich efektivita. Testování probíhalo stejným způsobem jako testování účinnosti primerů Hco_ITS2. Jako templát byla použita gDNA vyizolovaná z vajíček *H. contortus*. Jednotlivé koncentrace jsou popsány v tabulce 7 (kapitola 4.3.8 Stanovení účinnosti referenčních genů FARB, NCBP a GAPDH).

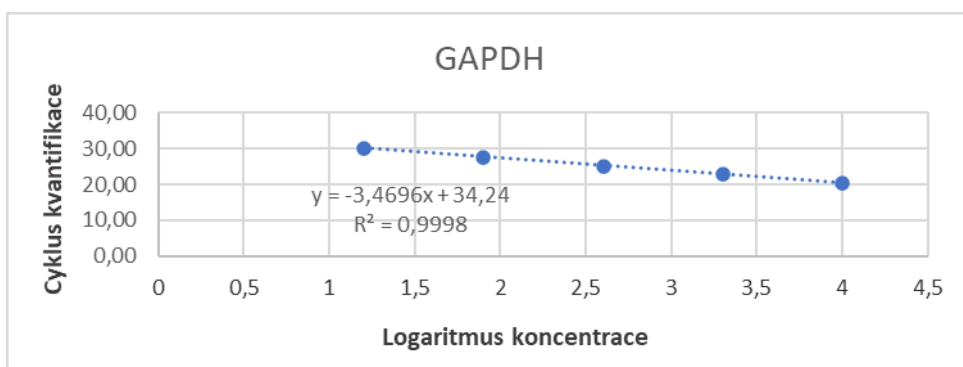
Efektivita referenčního genu FARB byla vypočítána ze sestavené rovnice přímky $y = -3,5147x + 33,912$ s korelačním koeficientem 1. Efektivita tohoto genu byla 93 %. Efektivita genu NCBP byla vypočítána z rovnice přímky $y = -3,5206x + 34,562$, korelační koeficient byl 0,9997. U tohoto genu byla účinnost 92 %. U GAPDH byla zjištěna rovnice přímky $y = -3,4696x + 34,24$, korelační koeficient byl 0,9998. Účinnost dosahovala 94 %. Všechny tyto hodnoty představují vysoká čísla. Tyto referenční geny se běžně v laboratořích molekulární analýzy používají, nicméně v jiných aplikacích (pro normalizaci dat při stanovení hladin mRNA různých genů). Na obrázcích 24, 25 a 26 jsou znázorněny grafy počítaných efektivit.



Obrázek 24: Stanovení efektivity referenčního genu FARB



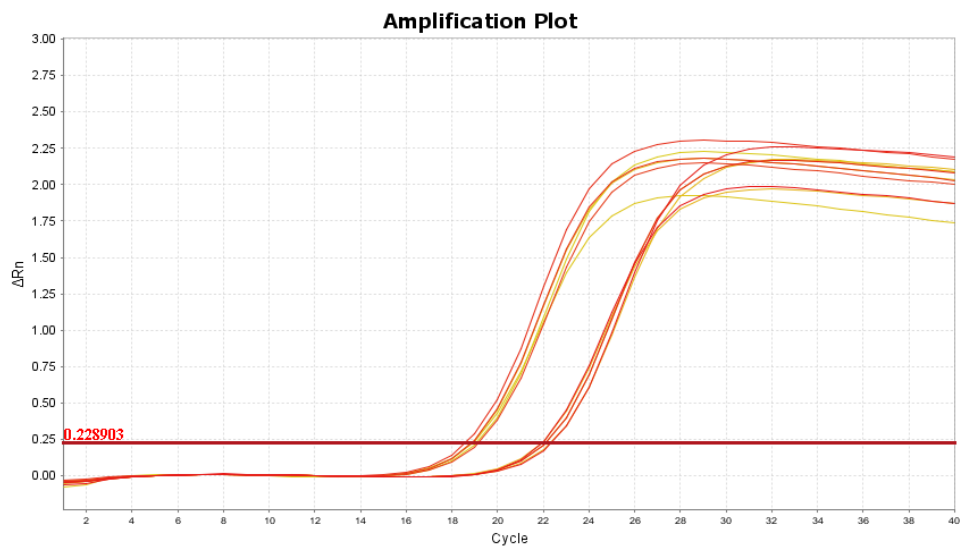
Obrázek 25: Stanovení efektivity referenčního genu NCBP



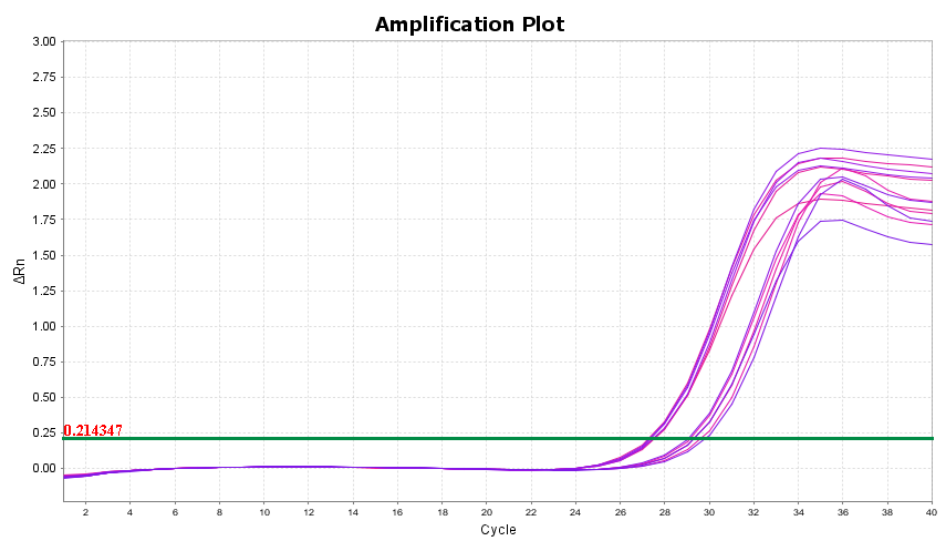
Obrázek 26: Stanovení efektivity referenčního genu GAPDH

5.7 Testování Hco_ITS2, FARB, NCBP a GAPDH

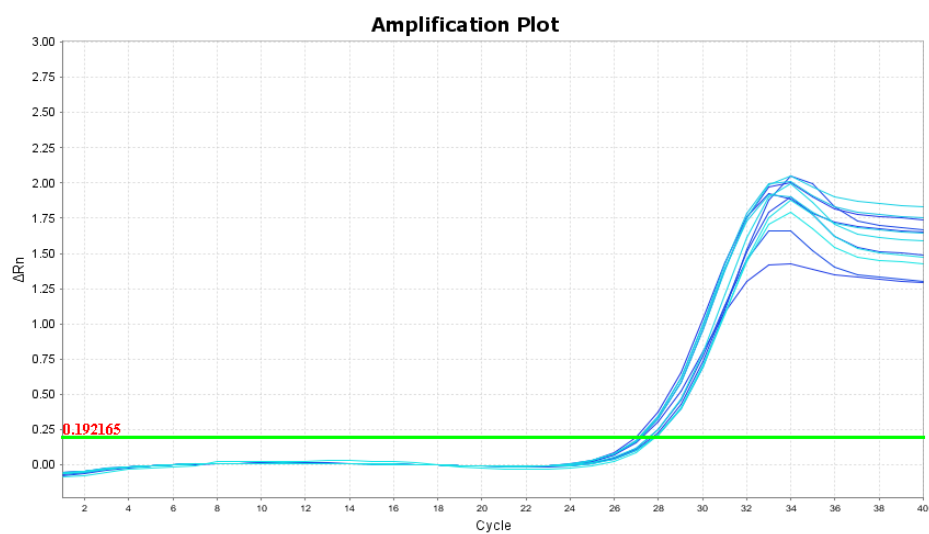
Tomuto experimentu předcházela izolace gDNA. K trusu byla uměle přidána vajíčka *H. contortus* v množství 1 000 a 10 000. Izolace byla prováděna v tripletech a probíhala podle návodu uvedeného v kapitole 4.3.4 Zpracování výkalů a izolace gDNA. Vyizolovaná gDNA byla následně 10x naředěna. Takto připravená gDNA sloužila jako templát pro testování genů Hco_ITS2, FARB, NCBP a GAPDH. Koncentrace 1 000 a 10 000 vajíček měla poukázat, jaká bude amplifikace při dvou různých hladinách. Na obrázcích 27, 28, 29, 30 je patrná amplifikace jednotlivých genů.



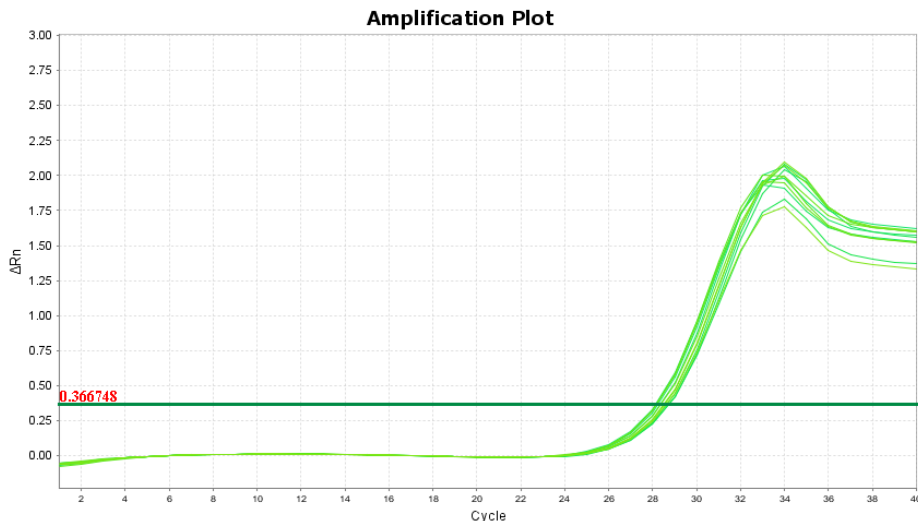
Obrázek 27: Záznam amplifikace genu ITS2



Obrázek 28: Záznam amplifikace genu FARB



Obrázek 29: Záznam amplifikace genu NCBP



Obrázek 30: Záznam amplifikace genu GAPDH

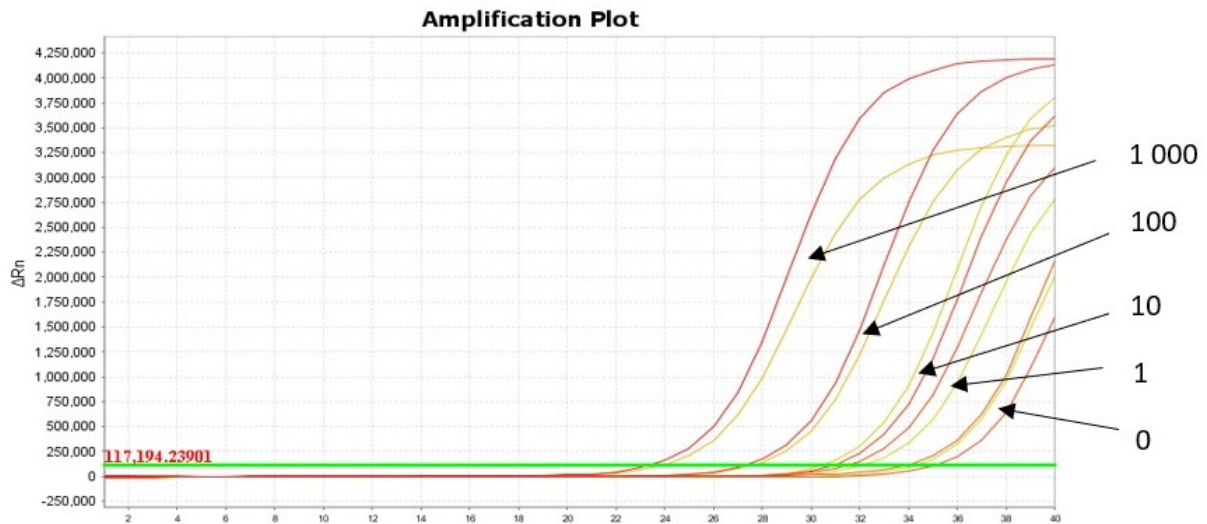
Z výše uvedených obrázků je patrné, že k dalším analýzám není možné použít referenční geny GAPDH a NCBP. U těchto genů není žádný rozdíl v amplifikaci dvou rozdílných hladin. Naopak u genů ITS2 a FARB je zřetelný odlišný průběh amplifikace gDNA vyizolované z 1 000 a 10 000 vajíček. Ze získaných hladin byl vypočten poměr mezi jednotlivými vzorky, který by ideálně měl odpovídat rozdílu deseti (v koncentrovanějším vzorku bylo 10x více vajíček). Pro primery Hco ITS2 tento poměr odpovídal 9,07x, pro primery FARB pouze 3,75x. Z vypočtených poměrů tedy vyplývá, že pouze primery Hco ITS2 jsou vhodné pro detekci *H. contortus* v trusu ovcí.

5.8 Porovnání RT-PCR s využitím SYBR Green I a TaqMan sondy

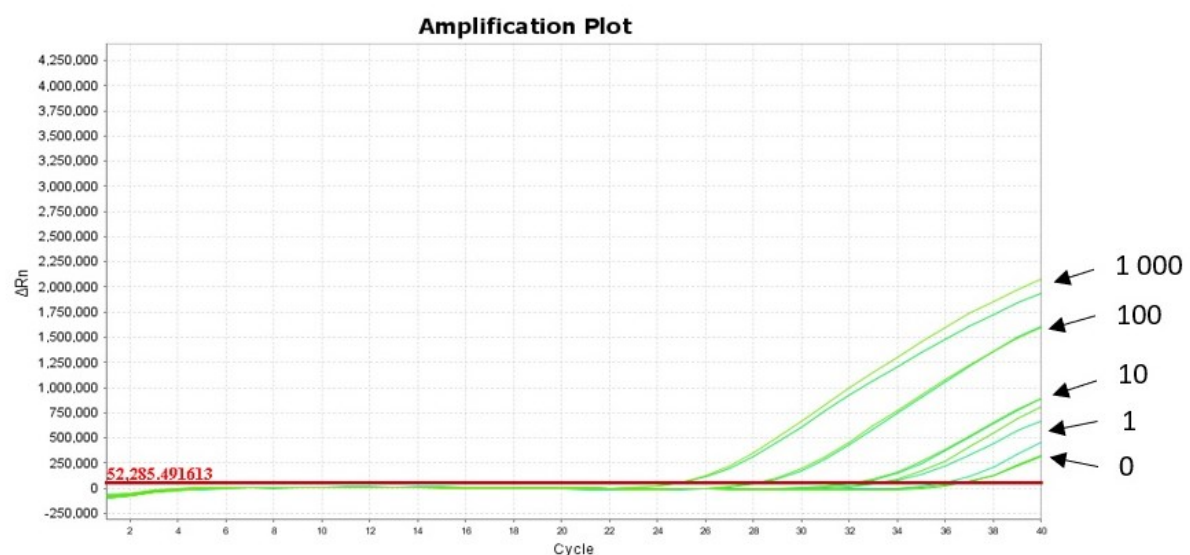
Z předchozího kapitoly je zřejmé, že primery pro referenční geny nejsou vhodné k dalším pokusům. I přes zkříženou reaktivitu jsme se tedy nadále zabývaly pouze sadou primerů Hco ITS2. V následující analýze jsme porovnávaly obě metody detekce při využití primerů Hco ITS2. V prvním případě bylo k detekci použito fluorescenční barvivo SYBR Green I. Ve druhém případě byla do reakce přidána TaqMan sonda.

Experimentu předcházela izolace gDNA z vajíček *H. contortus*, která byla uměle přidána ke vzorku trusu. Do trusu jsme odděleně přidaly 1 000, 100, 10, 1 a žádné vajíčko. Jedno vajíčko bylo přidáno s pomocí mikroskopu. Z kapky suspenze byla odsáta přebytečná vajíčka. Jedno vajíčko, které zůstalo na podložním sklíčku bylo spláchnuto ke vzorku trusu.

Obrázek 31 ukazuje metodu, kdy k detekci gDNA bylo využito barvivo SYBR Green I. Na obrázku 32 je znázorněna reakce s využitím TaqMan sondy. Ze záznamů je patrné, že oba způsoby detekce jsou v korelaci. Detekční limit se u obou metod nachází v rozmezí 10–100 vajíček na gram trusu. U metody s využitím SYBR Green I je zaznamenaná křivka v negativní kontrole ve stejné oblasti jako u templátu izolované z čistého trusu (bez přídavku vajíček), pro správnou detekci by tedy bylo zapotřebí použít „korekční faktor“.



Obrázek 31: Záznam RT-PCR s využitím SYBR Green I



Obrázek 32: Záznam RT-PCR s využitím TaqMan sondy

6. Diskuze

Přežvýkavci bývají napadeni různými parazity, kteří způsobují více či méně závažná onemocnění. Nejčastějšími původci jsou gastrointestinální hlístice. Mezi ně se řadí také *Haemonchus contortus*, česky vlasovka slezová, která je parazitem malých přežvýkavců žijících v různých klimatických podmínkách po celé zeměkouli. Infekce nejen, že ohrožuje zdraví zvířat, ale také způsobuje závažné ekonomické problémy celé farmy. Dochází k rychlému poklesu produkce užitkových surovin. Například v Austrálii jsou finanční ztráty způsobené parazitickými hlísticemi vyčísleny na miliardu dolarů. Další desítky miliard jsou využity k léčbě zvířat. Terapie je uskutečňována pomocí anthelmintických přípravků. Jejich dlouhodobé užívání však vede k anthelmintické rezistenci, která znesnadňuje terapii a prohlubuje ekonomické ztráty. V současné době je anthelmintické rezistenci věnována vysoká pozornost v různých státech Evropy. Je zapotřebí vyvinout alternativní způsob kontroly parazitických hlístic (Skorpikova et al, 2020; Pařčo and Modrý, 2021; Rashid et al., 2019).

Infekce ovcí a koz jsou nejčastěji diagnostikovány základními koprologickými metodami. Využívá se zde vzorku trusu obsahující hledaná vajíčka, která se následně hodnotí mikroskopicky. Vajíčka jsou však často morfologicky nerozlišitelná, a proto tyto metody neumožňují zařazení do nižší taxonomické úrovně. Vhodnějšími metodami jsou molekulární techniky, založené na PCR. Kromě vyšší ceny molekulárních metod, přináší tato analýza mnoho výhod, jako je úspora času nebo vysoká přesnost. Navíc technika RT-PCR je v současné době považována za rutinní metodu ve větších molekulárních laboratořích (Pařčo and Modrý, 2021; Reslová et al., 2021).

V naší práci jsme se zaměřili zejména na hlavní druhy hlístic parazitujících u ovcí. Kromě toho jsme zmínili také *Ashworthius sidemi*. Jedná se o parazita, který je morfologicky velmi podobný *H. contortus*. Do Evropy byl zavlečen prostřednictvím jelena sika v polovině 20. století. Postupně se však *A. sidemi* rozšířil také mezi ostatní volně žijící přežvýkavce. V současné době byl tento parazit experimentálně prokázán také u ovcí (Reslová et al., 2021). Častým parazitem ovcí je také parazit *N. battus*, jehož vajíčka jsou však dostatečně morfologicky odlišitelná od ostatních druhů GIN, proto jsme se diagnostikou této hlístice pomocí molekulární metody tolik nezabývali.

Cílem bylo vyzkoušet diagnostiku jednotlivých GIN z trusu ovcí pomocí RT-PCR. Celá práce navazovala na článek vydaný Reslovou et al., 2021, kde testovali identifikaci GIN ve vzorcích stolice ovcí pomocí multiplexních testů RT-PCR.

Ačkoli se molekulární metody založené na PCR jeví jako vysoce specifické pro detekci DNA parazita, existují doposud pouze tři studie, zabývající se diagnostikou infekcí GIN přímo z trusu (Höglunda et al., 2019; Sweeny et al., 2011; Roeber et al., 2012). Zdá se, že hlavní důvod tkví zejména v přítomnosti fekálních inhibitorů. Diagnostika GIN pomocí molekulárních metod se doposud týká především extrahovaných vajíček. Neustálé zdokonalování extrakce gDNA z trusu, a tak eliminace fekálních inhibitorů, umožňuje vyizolovat gDNA, která je nadále vhodná k analýzám založeným na PCR. V současnosti tato technologie představuje doplněk ke koprologickým metodám (Reslová et al., 2021).

Ve studii Höglunda et al. detekovali dva zástupce GIN, konkrétně *H. contortus* a *T. circumcincta*, pomocí metody ddPCR (*Droplet Digital PCR*). Výsledky byly následně porovnávány s mikroskopickou detekcí vajíček. Mezi výsledky získanými oběma metodami byla zjištěna podstatná shoda (Höglund et al., 2019).

Sweeny et al. ve svém článku srovnávali PCR s McMasterovou mikroskopickou technikou. Pomocí těchto metod identifikovali *T. circumcincta*, *Trichostrongylus spp.*, *H. contortus*, *Oesophagostomum spp.* a *Ch. ovina*. Mezi těmito dvěma diagnostickými testy byla zjištěna vysoká úroveň shody. Pouze 0,1 % vzorků bylo pomocí PCR vyhodnocena jako negativní a podle McMasterovy metody pozitivní. Naopak tomu bylo u 2,1 % vzorků. PCR testy v tomto pokusu však nebyly schopny detekovat kvantitu, na určení závažnosti infekce bylo zapotřebí využít flotační metodu (Sweeny et al., 2011).

Roeber et al. vytvořili několik studií zabývajících se diagnostikou GIN. V roce 2012 vyvinuli tandemovou multiplexní PCR (TM-PCR), která měla za úkol detekovat *Haemonchus spp.*, *T. circumcincta*, *Trichostrongylus spp.*, *Oesophagostomum spp.*, *Ch. ovina* a *Cooperia curticei* z trusu. Tato metoda se ukázala jako příslib pro rutinní použití v praxi (Roeber et al., 2012).

V práci jsme testovali sady primerů navržené k diagnostice nejběžnějších GIN parazitujících u ovcí. U *H. contortus* byla použita sada primerů Hco_ITS2 a referenční geny FARB, NCBP a GAPDH. Dalšími sadami primerů ostatních parazitů byly Tel_ITS2, Tri_ITS1,

Cha_COI, Ash_ITS1 a Nem_SSU pro detekci *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus spp.*, *Chabertia ovina*, *Ashworthius sidemi* a *Nematodirus battus*. Pravděpodobně nejdůležitějším experimentem v diplomové práci bylo testování zkřížené reaktivity, při níž jsme zjistili, že k diagnostice konkrétních hlístic v trusu, je možné využití sady primerů Tel_ITS2, Tri_ITS1 a Cha_COI, jelikož vykazují vysokou specifitu ke svým templátům. U primerů Tel_ITS2 došlo k amplifikaci pouze gDNA *T. circumcincta*. U primerů Tri_ITS1 a Cha_COI došlo k nejméně k amplifikaci gDNA, na kterou byly dané primery navrženy. Byla zde však také částečně amplifikována gDNA ostatních parazitů, avšak až v pokročilých cyklech, tudíž by použití těchto primerů v dalších experimentech bylo možné. Pomocí těchto sad primerů je tedy vhodná diagnostika hlístic *T. circumcincta*, *Trichostrongylus* a *Ch. ovina*. Nicméně i zde by se mohlo stát, kdyby převažovala infekce parazitem, jehož gDNA byla také částečně amplifikována, že by mohla být detekce falešně pozitivní. Naopak primery Hco_ITS2 nejsou ve směsi gDNA dostatečně specifické, dochází k výrazné amplifikaci také jiných gDNA. Pravděpodobně cílové sekvence nejsou dostatečně rozdílné. Za účelem zvýšení specifičnosti jsme místo detekčního barviva SYBR Green I použili TaqMan sondu. I zde však došlo k amplifikaci také dalších druhů hlístic. Při porovnání těchto dvou metod detekce nebyly nalezeny žádné významnější rozdíly, obě metody amplifikace byly v korelaci. Kromě primerů Hco_ITS2 byly zkoušeny také referenční geny FARB, NCBP a GAPDH běžně používané pro normalizaci při klasickém RT-PCR. U těchto genů byla testována amplifikace dvou hladin gDNA *H. contortus*, kdy druhá hladina byla 10x koncentrovanější. Amplifikace referenčních genů NCBP a GAPDH se jevila jako nevhodná, neboť nebyl žádný rozdíl v amplifikaci. U genu FARB byla u koncentrovanějšího vzorku pozorována detekce v nižších cyklech, ale poměr mezi dvěma hladinami nebyl dostatečný (pouze 3,75x).

V článku Reslové et al. porovnávali multiplexní testy RT-PCR s koprologickou metodou EPG. Pomocí RT-PCR byly detekovány stejné hlístice jako v naší diplomové práci (*H. contortus*, *T. circumcincta*, *Trichostrongylus spp.*, *N. battus*, *Ch. ovina* a *A. sidemi*). V článku byly využívány stejné sady primerů. K zobrazení byly použity duálně značené hydrolyzační sondy FAM, HEX TxRd a Cy5. Jako referenční kontrola zde byla použita gDNA vyizolovaná z dospělých jedinců každého druhu a vnitřní kontrola zajištěna pomocí přidávané plasmidové DNA, která obsahovala stejnou sekvenci, na kterou bylo cíleno v multiplexním testu. Citlivost byla nejprve testována v samostatných reakcích pro každého parazita, následně byla ověřena

v multiplexní směsi. Při vyhodnocování dat byla významná shoda v závažnosti infekce zjištěné oběma metodami. Bylo prokázáno, že u tří vzorků, které byly koprologicky negativní, byla infekce pomocí molekulární metody prokázána. Dva z těchto tří vzorků byly podle RT-PCR silně pozitivní, byla u nich zjištěna závažná infekce. Možným vysvětlením podle vědců by mohlo být vysoké zastoupení vyvíjejících se larválních stádií v období odběru vzorků. Molekulární techniky se tedy jeví jako citlivější. V článku však není uvedeno, zda byl proveden test zkřížené reaktivity jednotlivých sad primerů, který byl v naší práci rozhodující. Není tedy zřejmé, zda primery Hco ITS2 správně amplifikovaly pouze gDNA *H. contortus*. Jedná se o poměrně důležitou zkoušku, která by mohla výsledky celého článku změnit.

7. Závěr

V diplomové práci jsme identifikovali nejznámější GIN parazitující u ovcí pomocí metody RT-PCR. V běžné praxi se infekce těmito parazity stanovuje pomocí koprologických metod, které však nejen že jsou náročné na čas, ale také vyžadují zkušené odborníky k hodnocení jednotlivých druhů vajíček pod mikroskopem. Molekulární metoda RT-PCR se v současnosti jeví jako velmi přesná a citlivá, proto jsme se rozhodli vyzkoušet tuto techniku v laboratoři. Hlístice byly detekovány přímo z trusu ovcí. Pomocí izolačního kitu jsme byli schopni získat gDNA, která byla vhodná k amplifikaci. Ta probíhala za využití různých sad primerů (Hco_ITS2, Tel_ITS2, Tri_ITS1, Cha_COI, Ash_ITS1 a Nem_SSU), které byly navrženy na detekci jednotlivých parazitů. Primery Tel_ITS2, Tri_ITS1 a Cha_COI vykazovaly poměrně dobrou specifitu ke svým teplátům. Sada primerů Hco_ITS2 však ve velkém amplifikovala také gDNA ostatních parazitů. Proto byly zkoušeny také referenční geny FARB, NCBP a GAPDH. U těchto primerů byl však nedostatečný, anebo žádný rozdíl v amplifikaci dvou různých hladin gDNA. Zvýšit specifitu primerů Hco_ITS2 jsme zkusili pomocí dvou různých metod detekce. Kromě fluorescenčního barviva SYBR Green I jsme použili také hydrolyzační TaqMan sondu, která by měla specificky detekovat pouze gDNA *H. contortus*. Obě metody však amplifikovaly také ostatní gDNA, tudíž pro využití v multiplexní analýze nejsou vhodné. Cílové sekvence sady primerů Hco_ITS2 pravděpodobně nejsou dostatečně odlišné od sekvencí ostatních parazitů.

8. Seznam použitých zkratek

AFLP – polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů

AR – anthelmintická rezistence

BZ – benzimidazoly

cDNA – komplementární DNA

COX1 – cyklooxygenáza 1

dATP – deoxyadenosintrifosfát

dCTP – deoxycytidintrifosfát

ddPCR – digitální kapková PCR

dGTP – deoxyguanosintrifosfát

dTTP – deoxythymidintrifosfát

EPG – počet vajíček v 1 gramu trusu

gDNA – genomová DNA

GIN – gastrointestinální hlístice

L1, L2, L3, L4 – larvální stádia *H. contortus*

mRNA – mitochondriální RNA

NTC – negativní kontrola

PCR – polymerázová řetězová reakce

PCR-SSCP – polymerázová řetězová reakce-jednovláknový konformační polymorfismus

RAPD – náhodná amplifikace polymorfní DNA

RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů

RT-PCR – polymerázová řetězová reakce v reálném čase

TM-PCR – tandemová multiplexní PCR

9. Zdroje

Adduci I, Sajovitz F, Hinney B, Lichtmannsperger K, Joachim A, Wittek T and Yan S. Haemonchosis in Sheep and Goats, Control Strategies and Development of Vaccines against *Haemonchus contortus*. *Animals*. 2022; 12(18):2339. doi: 10.3390/ani12182339.

Ahmed M, Singh MN, Bera AK, Bandyopadhyay S and Bhattacharya D. Molecular basis for identification of species/isolates of gastrointestinal nematode parasites. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2011; 4(8):589-93. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60152-1.

Albuquerque ACA, Bassetto CC, Almeida FA and Amarante AFT. Development of *Haemonchus contortus* resistance in sheep under suppressive or targeted selective treatment with monepantel. *Veterinary Parasitology*. 2017;246,112-117. doi: 10.1016/j.vetpar.2017.09.010.

Arsenopoulos KV, Fthenakis GC, Katsarou EI and Papadopoulos E. Haemonchosis: A Challenging Parasitic Infection of Sheep and Goats. *Animals*. 2021;11(2):363. doi: 10.3390/ani11020363.

Babu KN et al. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Derived Techniques. *Molecular Plant Taxonomy. Methods in Molecular Biology*. 2021;2222,219-247. doi: 10.1007/978-1-0716-0997-2_13.

Balic A, Bowles VM and Meeusen E. The immunobiology of gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Advances in Parasitology*. 2000;45,181-241. doi:10.1016/S0065-308X(00)45005-0.

Besier RB, Kahn LP, Sargison ND and Wyk JA. Chapter Six-Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Advances in Parasitology*. 2016;93,181-238. doi:10.1016/bs.apar.2016.02.024.

Bhat KA, Mir RA, Farooq A, Manzoor M, Hami A, Allie KA, Wani SM, Khan MN, Sayyed RZ, Poczai P, Almalki WH, Zargar SM and Shah AA. Advances in Nematode Identification: A Journey from Fundamentals to Evolutionary Aspects. *Diversity*. 2022;14(7):536. doi: 10.3390/d14070536.

Bogale M, Baniya A and DiGennaro P. Nematode Identification Techniques and Recent Advances. *Plants*. 2020;9(10):1260. doi: 10.3390/plants9101260.

Cortés A, Wills J, Su X et al. Infection with the sheep gastrointestinal nematode *Teladorsagia circumcincta* increases luminal pathobionts. *Microbiome*. 2020;8,60. doi: 10.1186/s40168-020-00818-9.

Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Capelli G and Scala A. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and

Dicrocoelium dendriticum in sheep. *Veterinary Parasitology*. 2004;123(1–2),121-131. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.05.021.

Dolinská M, Ivanišinová O, Königová A et al. Anthelmintic resistance in sheep gastrointestinal nematodes in Slovakia detected by in-vitro methods. *BMC Veterinary Research*. 2014;10,233. doi:10.1186/s12917-014-0233-4.

Drozd J, Demiaszkiewicz AW and Lachowicz J. Aswortioza - nowa parazytoza dzikich przeżuwaczy. *Medycyna Weterynaryjna*. 2000; 56(1), 32-35, Warszawa.

Eysker M and Ploeger H. Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitology*. 2000;120(7),109-119. doi: 10.1017/S0031182099005752.

Ghatee MA, Malek Hosseini SAA, Marashifard M. et al. Phylogenetic analysis of Trichostrongylus vitrinus isolates from southwest Iran. *Parasites & Vectors*. 2020;13,553. doi: 10.1186/s13071-020-04438-y.

Gholami S, Babamahmoodi F, Abedian R, Sharif M, Shahbazi A, Pagheh A and Fakhar M. Trichostrongylus colubriformis: Possible Most Common Cause of Human Infection in Mazandaran Province, North of Iran. *Iranian Journal of Parasitology*. 2015;10(1), 110-115.

Höglund J, Elmahalawy ST, Halvarsson P and Gustafsson K. Detection of Haemonchus contortus on sheep farms increases using an enhanced sampling protocol combined with PCR based diagnostics. *Veterinary Parasitology*. 2019;276. doi: 10.1016/j.vpoa.2019.100018.

Junquera P, Chabertia ovina, parasitic roundworm of sheep and goats. Biology, prevention and control. *Parasitipedia*. 2022b. [Citováno dne 15.12.2022] https://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2633&Itemid=2911.

Junquera P, Trichostrongylus spp, parasitic roundworms of cattle, sheep, goats, pigs and horses. Biology, prevention and control. *Parasitipedia*. 2022a. [Citováno dne 15.12.2022] https://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2628&Itemid=2908.

Kuznetsov D, Romashova N and Romashov B. The first detection of Ashworthius sidemi (Nematoda, Trichostrongylidae) in roe deer (Capreolus capreolus) in Russia. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*. 2018;14,200-203. doi: 10.1016/j.vprsr.2018.11.003

Kuznetsov, D. The First Detection of Abomasal Nematode Ashworthius sidemi in Fallow Deer (Dama dama) in Russia. *Acta Parasitologica*. 2022;67,560–563. doi: 10.1007/s11686-021-00452-x.

Lanková S, Langrová I, Jankovská I, Knížková I, Kunc P and Vadlejch J. Postup helmintologické pitvy a postmortální detekce helmintů vyskytujících se u domácích přežvýkavců v České republice. 2018. ISBN 978-80-7403-208-0.

Lehrter V, Jouet D, Liénard E, Decors A, Patrelle C. *Ashworthius sidemi* Schulz, 1933 and *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) in cervids in France: integrative approach for species identification. *Infection, Genetics and Evolution*. 2016;46,94-101. doi: 10.1016/j.meegid.2016.10.027.

McKeand JB. Molecular diagnosis of parasitic nematodes. *Parasitology*. 1998;117,87-96. doi: 10.1017/s0031182099004096.

Melville LA, Redman E, Morrison AA et al. Large scale screening for benzimidazole resistance mutations in *Nematodirus battus*, using both pyrosequence genotyping and deep amplicon sequencing, indicates the early emergence of resistance on UK sheep farms. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2020a;12,68-76. doi: 10.1016/j.ijpddr.2020.03.001.

Melville LA, Van Dijk J, Mitchell S, Innocent G and Bartley DJ. Variation in hatching responses of *Nematodirus battus* eggs to temperature experiences. *Parasites & Vectors*. 2020b;13(1):494. doi: 10.1186/s13071-020-04368-9.

Naeem M, Iqbal Z and Roohi N. Ovine haemonchosis: a review. *Tropical Animal Health and Production*. 2021;53,19. doi:10.1007/s11250-020-02439-8.

Niciura S, Cruvinel G, Moraes C, Chagas A, Esteves S, Benavides M and Amarante A. In vivo selection for *Haemonchus contortus* resistance to monepantel. *Journal of Helminthology*. 2020;94. doi: 10.1017/S0022149X19000221.

O'Connor LJ, Walkden-Brown SW and Kahn LP. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*. 2006;142(1-2). doi: 10.1016/j.vetpar.2006.08.035.

Paun O and Schönswetter P. Amplified fragment length polymorphism: an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic, and epigenetic studies. *Methods in Molecular Biology*. 2012;862:75-87. doi: 10.1007/978-1-61779-609-8_7.

Pereckienė A, Kaziūnaitė V, Vyšniauskas A, Petkevičius S, Malakauskas A, Šarkūnas M and Taylor MA. A comparison of modifications of the McMaster method for the enumeration of *Ascaris suum* eggs in pig faecal samples. *Veterinary Parasitology*. 2007;149(1-2),111-116. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.04.014.

Porazinska DL, Giblin-Davis RM, Faller L, Farmerie W, Kanzaki N, Morris K, Powers TO, Tucker AE, Sung W and Thomas WK. Evaluating high-throughput sequencing as a method for metagenomic analysis of nematode diversity. *Molecular Ecology Resources*. 2009;9:1439-1450. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02611.x.

Prantlová Rašková V and Wagnerová P. *Obrazový atlas parazitů pro praktická cvičení z Veterinární parazitologie*. České Budějovice, D Print, 2013.

Reslova N, Skorpikova L, Kyrianova IA et al. The identification and semi-quantitative assessment of gastrointestinal nematodes in faecal samples using multiplex real-time PCR assays. *Parasites & Vectors*. 2021;14,391. doi: 10.1186/s13071-021-04882-4.

Roeber F, Jex AR and Gasser RB. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasites & Vectors*. 2013;6,153. doi: 1186/1756-3305-6-153.

Roeber F, Jex AR, Campbell AJD, Nielsen R, Anderson GA, Stanley KK and Gasser RB. Establishment of a robotic, high-throughput platform for the specific diagnosis of gastrointestinal nematode infections in sheep. *International Journal for Parasitology*. 2012;42,1151-1158. doi: 10.1016/j.ijpara.2012.10.005.

Rose H, Caminade C, Bolajoko MB, Phelan P, van Dijk J, Baylis M, Williams D and Morgan ER. Climate-driven changes to the spatio-temporal distribution of the parasitic nematode, *Haemonchus contortus*, in sheep in Europe. *Global Change Biology*. 2016;22(3):1271-85. doi: 10.1111/gcb.13132.

Stear MJ, Piedrafita D, Sloan S, Alenizi D, Cairns C and Jenvey CJ. *Teladorsagia circumcincta*. *WikiJournal of Science*. 2019;2(1):4. doi: 10.15347/WJS/2019.004.

Sweeny JPA, Robertson ID, Ryan UM, Jacobson C and Woodgate RG. Comparison of molecular and McMaster microscopy techniques to confirm the presence of naturally acquired strongylid nematode infections in sheep. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2011;180,62-6. doi: 10.1016/j.molbiopara.2011.07.007.

Taylor MA. Emerging parasitic diseases of sheep. *Veterinary Parasitology*. 2012;189(1),2-7. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.03.027.

Vadlejch J, Burešová E and Langrová I. Zjišťování anthelmintické účinnosti biologicky aktivních látek rostlin. 2018. ISBN: 978-80-213-2912-6.

Venturina VM, Gossner AG and Hopkins J. The immunology and genetics of resistance of sheep to *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Research Communications*. 2013;37,171–181. doi: 10.1007/s11259-013-9559-9.

Verocai GG, Chaudhry UN and Lejeune M. Diagnostic Methods for Detecting Internal Parasites of Livestock. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2020;36(1):125-143. doi: 10.1016/j.cvfa.2019.12.003.

Zajac AM. Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics, and diagnosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 2006;22(3):529-41. doi: 10.1016/j.cvfa.2006.07.006.

Zarlenga DS, Hoberg EP and Tuo W. Chapter Five - The Identification of *Haemonchus* Species and Diagnosis of Haemonchosis. *Advances in Parasitology*. 2016;93,145-180. doi: 10.1016/bs.apar.2016.02.023.

10. Seznam obrázků

Obrázek 1: Životní cyklus GIN u malých přežvýkavců	11
Obrázek 2: Vajíčko <i>Haemonchus contortus</i> pod mikroskopem	13
Obrázek 3: Vajíčka <i>Trichostrongylus axei</i> pod mikroskopem.....	19
Obrázek 4: Vajíčka <i>Nematodirus spp.</i> pod mikroskopem	20
Obrázek 5: Vajíčko <i>Chabertia ovina</i> pod mikroskopem	22
Obrázek 6: Diagnostika hemonchózy dle systému FAMACHA.....	25
Obrázek 7: Dospělí jedinci <i>Haemonchus spp.</i> na sliznici žaludku	26
Obrázek 8: McMasterova komůrka.....	27
Obrázek 9: Přehled různých metod identifikace hlístic	29
Obrázek 10: Záznam RT-PCR při teplotě annealingu 57 °C	50
Obrázek 11: Křivka teploty tání PCR produktů.....	50
Obrázek 12: Graf výpočtu účinnosti primerů Hco_ITS2.....	51
Obrázek 13: Záznam RT-PCR při použití primerů Hco_ITS2	52
Obrázek 14: Záznam RT-PCR při použití primerů Tel_ITS2	53
Obrázek 15: Záznam RT-PCR při použití primerů Tri_ITS1	53
Obrázek 16: Záznam RT-PCR při použití primerů Cha_COI	54
Obrázek 17: Záznam RT-PCR při použití různých koncentrací primerů Hco_ITS2 a FAM	55
Obrázek 18: Testování koncentrace primerů i sondy 100 nM.....	55
Obrázek 19: Testování koncentrace primerů 100 nM a sondy 200 nM.....	55
Obrázek 20: Testování koncentrace primerů i sondy 200 nM.....	55
Obrázek 21: Záznam PCR reakce při testování efektivity TaqMan sondy.....	56
Obrázek 22: Výpočet efektivity TaqMan sondy	56
Obrázek 23: Záznam RT-PCR při testování zkřížené reakce s použitím TaqMan sondy	57
Obrázek 24: Stanovení efektivity referenčního genu FARB.....	58
Obrázek 25: Stanovení efektivity referenčního genu NCBP.....	59
Obrázek 26: Stanovení efektivity referenčního genu GAPDH.....	59
Obrázek 27: Záznam amplifikace genu ITS2.....	60
Obrázek 28: Záznam amplifikace genu FARB	60
Obrázek 29: Záznam amplifikace genu NCBP.....	60
Obrázek 30: Záznam amplifikace genu GAPDH.....	61
Obrázek 31: Záznam RT-PCR s využitím SYBR Green I	62
Obrázek 32: Záznam RT-PCR s využitím TaqMan sondy	62

11. Seznam tabulek

Tabulka 1: Souhrn klinických příznaků nákazy <i>H. contortus</i>	24
Tabulka 2: Přehled teploty a času v jednotlivých fázích RT-PCR.....	41
Tabulka 3: Složení mastermixu při koncentraci sondy i primerů 200 nM	42
Tabulka 4: Složení mastermixu při koncentraci sondy i primerů 100 nM	42
Tabulka 5: Složení mastermixu při koncentraci sondy 200 nM a primerů 100 nM.....	43
Tabulka 6: Příprava a koncentrace templátů pro stanovení efektivity Hco_ITS2.....	44
Tabulka 7: Příprava a koncentrace templátů pro stanovení efektivity FARB, NCBP a GAPDH	45
Tabulka 8: Složení a výpočet mastermixu pro 1 typ primerů	46
Tabulka 9: Koncentrace vyizolované gDNA.....	48
Tabulka 10: Koncentrace gDNA po homogenizaci dvěma způsoby	49
Tabulka 11: Koncentrace gDNA ostatních parazitů	52

12. Přílohy

12.1 Sekvence používaných primerů

Primer	Sekvence (5'-3')	Druh
Hco_ITS2_F Hco_ITS2_R	CGTGATGTTATGAAATTGTAAC CTCAGGTTGCATTATACAAAT	<i>H. contortus</i>
Tel_ITS2_F Tel_ITS2_R	TACTACAGTGTGGCTAACATA TTCATTGAGTACATTCAAATAGTAG	<i>T. circumcinta</i>
Tri_ITS1_F Tri_ITS1_R	GCAATAATACCGCCTCATCG CATAATGGCGTCTAGGCGAG	<i>Trichostrongylus</i>
Cha_COI_F Cha_COI_R	CACAGGTGTTAAGGTTTTTAG CAACCTAGAATTTGACAATACTAC	<i>Ch. ovina</i>
Hco_NCBP_F Hco_NCBP_R	CCGAGCAGATACCGAAAATGC CGAAGCCTGCATCATAGTCCA	<i>H. contortus</i>
Hco_FARB_F Hco_FARB_R	TGCCAAGGACTATGCCAAGT TGAGTGCGTCGATCTTTCCC	<i>H. contortus</i>
Hco_GAPDH_F2 Hco_GAPDH_R2	ACGAGACCTACAATGCAGCC GCGAGACAGTTGGTGGTACA	<i>H. contortus</i>