

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-15-0004****Difylobotrióza - novo sa objavujúca, rybami prenášaná zoonóza v Európe: molekulárna diagnostika, pôvod a rozšírenie parazita**Zodpovedný riešiteľ **RNDr. Ivica Hromadová, CSc.**Príjemca **Parazitologický ústav SAV**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Parazitologický ústav SAV Košice

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Pri zbere biologického materiálu v zahraničí (výlov a pitvy rýb; zber a fixácia parazitov) spolupracovali kolegovia z nasledujúcich zahraničných pracovísk:

- Dr. Marta Kołodziej-Sobocińska, Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences, Białowieża, POĽSKO
- Dr. Egil Karlsbakk, Department of Biological Sciences, University of Bergen, Bergen, NÓRSKO
- Dr. Karl Skírnisson, Institute for Experimental Pathology, University of Iceland, Reykjavík, ISLAND
- Dr. Angelika Linowska, Department of Hydrobiology, Ichthyology and Biotechnology, West Pomeranian University of Technology, Szczecin, POĽSKO
- Dr. Isabel Blasco Costa, Muséum d'histoire naturelle, Geneva, ŠVAJČIARSKO
- Dr. Andrea Gustinelli, Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Bologna, TALIANSKO

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Nie sú.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Sumár výstupov za celú dobu riešenia projektu:

- Publikácie v domácom odbornom časopise (nekarentové): 1
- Publikácie v karentovaných časopisoch: 11
- Publikácie odoslané do tlače v 2020: 1

Poznámka: pdf formáty publikácií boli zaslané mejlom projektovému manažérovi

- Abstrakty z medzinárodných konferencií: 14

Poznámka: väčšina príspevkov bola vo forme prednášok v anglickom jazyku na medzinárodných konferenciách

- Pozvané prednášky na zahraničných pracoviskách: 1
- Obhájené dizertačné práce na danú tému: 1

**** PUBLIKÁCIE NEKARENTOVANÉ**

• (1) RADAČOVSKÁ, Alžbeta - BAZSALOVICSOVÁ, Eva - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, Ivica. Difyllobothrióza. In Poľovníctvo a rybárstvo, 2017, roč. 69, č.5, s. 88-89. Typ: BDF.

**** PUBLIKÁCIE KARENTOVANÉ**

• (1) KUČHTA, Roman - OROS, Mikuláš - FERGUSON, Jayde - SCHOLZ, Tomáš. Diphyllbothrium nihonkaiense tapeworm larvae in salmon from North America. In Emerging Infectious Diseases, 2017, vol. 23, no. 2, p. 351-353. Typ: ADCA. (2016: 8.222 - IF, Q1 - JCR, Q1 – SJR).

• (2) BAZSALOVICSOVÁ, Eva - RADAČOVSKÁ, Alžbeta - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, Ivica - MINÁRIK, Gabriel - ŠOLTYS, Katarína - KUČHTA, Roman - ŠTEFKA, Jan. Development of microsatellite loci in zoonotic tapeworm Dibothriocephalus latus (Linnaeus, 1758), Lühe, 1899 (syn. Diphyllbothrium latum) using microsatellite library screening. In Molecular and Biochemical Parasitology, 2018, vol. 225, p. 1-3. Typ: ADCA. (2017: 1.744 - IF, Q3 - JCR, Q2 – SJR).

• (3) OROSOVÁ, Martina - ŠPAKULOVÁ, Marta. Tapeworm chromosomes: their value in systematics with instructions for cytogenetic study. In Folia Parasitologica, 2018, vol. 65, art. no. 0001. Typ: ADCA. (2017: 1.505 - IF, Q3 - JCR, Q3 - SJR).

• (4) RADAČOVSKÁ, Alžbeta - BAZSALOVICSOVÁ, Eva - LINOWSKA, Angelika - KOŁODZIEJ-SOBOCIŃSKA, Marta - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, Ivica. Endohelminths of European Perch (*Perca fluviatilis*) from Selected Localities in Poland with an Emphasis on Search of the Broad Fish Tapeworm *Dibothriocephalus latus*. In Acta Parasitologica, 2019, vol. 64, no. 3, p. 544-550. Typ: ADCA. (2018: 0.968 - IF, Q4 - JCR, Q3 - SJR).

• (5) RADAČOVSKÁ, Alžbeta - BAZSALOVICSOVÁ, Eva - BLASCO COSTA, Isabel - OROSOVÁ, Martina - GUSTINELLI, A. - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, Ivica. Occurrence of *Dibothriocephalus latus* in European perch from Alpine lakes, an important focus of diphyllbothriosis in Europe. In Revue Suisse de Zoologie, 2019, vol. 126, no. 2, p. 219-225. Typ: ADCA. (2018: 0.630 - IF, Q4 - JCR, Q2 – SJR).

• (6) RADAČOVSKÁ, Alžbeta - BAZSALOVICSOVÁ, Eva - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, Ivica. Results on search for the broad fish tapeworm *Dibothriocephalus latus* (Linnaeus, 1758), (syn. *Diphyllbothrium latum*) (Cestoda: Diphyllbothriidea), in the Danube River. In Helminthologia, 2019, vol. 56, no. 3, p. 256-260. Typ: ADDA. (2018: 0.731 - IF, Q3 - JCR, Q2 - SJR).

• (7) JUHÁSOVÁ, Ľudmila - RADAČOVSKÁ, Alžbeta - BAZSALOVICSOVÁ, Eva - MIKLISOVÁ, Dana - BINDZÁROVÁ-GEREĽOVÁ, Marcela - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, Ivica. A study of the endohelminths of the European perch *Perca fluviatilis* L. from the central region of the Danube river basin in Slovakia. In Zookeys, 2019, vol. 899, p. 47-58. Typ: ADCA. (2018: 1.143 - IF, Q2 - JCR, Q2 - SJR).

• (8) KUČHTA, Roman - RADAČOVSKÁ, Alžbeta - BAZSALOVICSOVÁ, Eva - VIOZZI, Gustavo - SEMENAS, Liliana - ARBETMAN, Marina - SCHOLZ, Tomáš. Host Switching of Zoonotic Broad Fish Tapeworm (*Dibothriocephalus latus*) to Salmonids, Patagonia. In Emerging Infectious Diseases, 2019, vol. 25, no. 11, p. 2156-2158. Typ: ADCA. (2018: 7.185 - IF, Q1 - JCR, Q1 – SJR).

• (9) BARČÁK, Daniel - YONEVA, Aneta - SEHADOVÁ, Hana - OROS, Mikuláš - GUSTINELLI, Andrea - KUČHTA, Roman. Complex insight on microanatomy of larval "human broad tapeworm" *Dibothriocephalus latus* (Cestoda: Diphyllbothriidea). In Parasites & vectors, 2019, vol. 12, no.1, art. no. 408. Typ: ADMA. (2018: 3.031 - IF, Q1 - JCR, Q1 - SJR).

• (10) BAZSALOVICSOVÁ, Eva - MINÁRIK, Gabriel - ŠOLTYS, Katarína - RADAČOVSKÁ, Alžbeta - KUHN, Jesper A. - KARLSBAKK, Egil - SKÍRNISSON, Karl - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, Ivica. Development of 14 microsatellite markers for zoonotic tapeworm *Dibothriocephalus dendriticus* (Cestoda: Diphyllbothriidea). In Genes, 2020, 11, 782. Typ: ADMA. (2019: IF - 3.759, Q2 - JCR, Q1 – SJR).

• (11) BAGRADE, Guna - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, Ivica – BAZSALOVICSOVÁ, Eva – RADAČOVSKÁ, Alžbeta - KOŁODZIEJ-SOBOCIŃSKA, Marta. The first records of *Spirometra erinaceieuropaei* (Cestoda: Diphyllbothriidae), a causative agent of human sparganosis, in Latvian wildlife. Parasitology Research, 2020, <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06957-0>. ISSN 0932-0113. Typ: ADCA. (2019: 1.641 - IF, Q3 - JCR, Q1 – SJR).

**** PUBLIKÁCIE ODOSLANÉ DO TLAČE V 2020**

• OROSOVÁ, Martina – MARKOVÁ, Anna – PROVAZNÍKOVÁ, Irena – OROS, Mikuláš – RADAČOVSKÁ, Alžbeta – ČADKOVÁ, Zuzana – MAREC, František. Molecular cytogenetic analysis of a triploid population of the human broad tapeworm, *Dibothriocephalus latus* (Diphylobothriidea). Zasláné do tlače do časopisu *Parasitology*, December 2020.

** ABSTRAKTY Z KONFERENCIÍ

- (1) OROS, M. – CHOUDHURY, A. – SCHOLZ, T. – KUČHTA, R. Monozoic tapeworms of freshwater fishes in North America: an update and perspectives. In Book of Abstracts, The 91st Annual Meeting of the American Society of Parasitologists, July 11 – July 14, 2016, Edmonton, Alberta, Canada, p. 45.
- (2) KUČHTA, R. – SCHOLZ, T. – OROS, M. – CHOUDHURY, A. How many species are causing diphylobothriosis in North America? In Book of Abstracts, The 91st Annual Meeting of the American Society of Parasitologists, July 11 – July 14, 2016, Edmonton, Alberta, Canada, p. 69.
- (3) KOLENIČOVÁ, A. – BAZSALOVICSOVÁ, E. - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, I. – MINÁRIK, G. Vývoj polymorfných STR markerov u pásomnice *Diphylobothrium latum* (Cestoda: Diphylobothriidea). Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu. XII. ročník, Košice, 6. a 7. september 2017, str. 42-44.
- (4) OROS, M. – BARČÁK, D. – KUČHTA, R. Scanning electron microscopic observation of *Diphylobothrium latum* (Cestoda). Abstract Book, 9th International Workshop for Cestode Systematics and Phylogeny, August 5-10, 2017, Rostock, Germany.
- (5) KOLENIČOVÁ, A. – BAZSALOVICSOVÁ, E. - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, I. The strategy of microsatellite design of *Diphylobothrium latum*. Book of Abstracts, 7th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology, June 8-9, 2017, Riga, Latvia, p. 54.
- (6) KOLENIČOVÁ, A. – BAZSALOVICSOVÁ, E. - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, I. Current status of distribution and future research perspectives of *Diphylobothrium latum* and *Diphylobothrium dendriticum* in Europe. Book of Abstracts, 7th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology, June 8-9, 2017, Riga, Latvia, p. 25.
- (7) KOLENIČOVÁ, Alžbeta - BAZSALOVICSOVÁ, Eva - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, Ivica - MINÁRIK, Gabriel - ŠTEFKA, Jan. Development of polymorphic microsatellite loci for broad fish tapeworm *Dibothriocephalus latus* (syn. *Diphylobothrium latum*). In XIII. Slovak and Czech Parasitological Days. Parasites in the Heart of Europe 2. May 21-25, 2018, Košice, Slovakia. p. 4. ISBN 978-80-968473-9-6.
- (8) BARČÁK, Daniel - SEHADOVÁ, H. - OROS, Mikuláš. CLSM observation of plerocercoid morphology: interspecific differences of two species of *Dibothriocephalus* (Cestoda). In 24th Helminthological Days, 7-11 May, 2018, Rejčkov, Czechia. p. 8., ISBN 978-80-7444-057-1.
- (9) KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, Ivica - RADAČOVSKÁ, Alžbeta - BAZSALOVICSOVÁ, Eva. Current data on distribution of the broad fish tapeworm *Dibothriocephalus latus*. In Programme & Abstracts, 25th Helminthological Days, Rejčkov, Czech Republic, May 6-10, 2019, p. 27.
- (10) KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, Ivica - RADAČOVSKÁ, Alžbeta - BAZSALOVICSOVÁ, Eva. Occurrence of *Dibothriocephalus latus* (syn. *Diphylobothrium latum*) (Cestoda: Diphylobothriidea) in selected localities in Europe. In Abstracts, The XXV Congress of the Polish Parasitological Society, September 9-12, 2019, Warsaw, Poland. Published in: *Annals of Parasitology*, vol. 65, suppl., p. 214.
- (11) RADAČOVSKÁ, Alžbeta - BAZSALOVICSOVÁ, Eva - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, Ivica - ŠTEFKA, Jan. Preliminary data on migratory routes of the broad fish tapeworm *Dibothriocephalus latus*. In Programme & Abstracts, 25th Helminthological Days, Rejčkov, Czech Republic, May 6-10, 2019, p. 44.
- (12) RADAČOVSKÁ, Alžbeta - BAZSALOVICSOVÁ, Eva - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, Ivica. Genetic interrelationships and origin of the *Dibothriocephalus latus* (syn. *Diphylobothrium latum*) (Cestoda: Diphylobothriidea) – first insight. In Abstracts, The XXV Congress of the Polish Parasitological Society, September 9-12, 2019, Warsaw, Poland. Published in: *Annals of Parasitology*, vol. 65, suppl., p. 220.
- (13) BAZSALOVICSOVÁ, Eva - RADAČOVSKÁ, Alžbeta - OROSOVÁ, Martina - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, Ivica. Prevalence of *Dibothriocephalus latus* (Cestoda: Diphylobothriidea) in European perch from six subalpine lakes. In Abstract Book, The 8th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology, October 9-11, 2019,

Copenhagen, Denmark.

• (14) RADAČOVSKÁ, Alžbeta - BAZSALOVICSOVÁ, Eva - KRÁLOVÁ-HROMADOVÁ, Ivica. Search for the broad fish tapeworm *Dibothriocephalus latus* in the Danube River. In Abstract Book, The 8th Conference of the Scandinavian-Baltic Society for Parasitology, October 9-11, 2019, Copenhagen, Denmark.

** POZVANÁ PREDNÁŠKA NA ZAHRANIČNOM PRACOVISKU MIMO KONFERENCIE

• (1) KOLENIČOVÁ (RADAČOVSKÁ) Alžbeta. Enjoying new adventures with *Diphyllobothrium* tapeworms. Pozvaná prednáška prezentovaná dňa 23.5.2017 počas pobytu na zahraničnom pracovisku Mammal Research Institute, Polish Academy of Sciences, Białowieża, Poľsko.

** OBHÁJENÁ DIZERTAČNÁ PRÁCA NA DANÚ TÉMU

• (1) RADAČOVSKÁ Alžbeta. Dizertačná práca s názvom "Molecular genetics of tapeworms of the genus *Dibothriocephalus*" bola napísaná v anglickom jazyku a obhájená 28.8.2020 na Univerzite veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach v študijnom programe Parazitárne choroby zvierat.

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky projektu mali v prevažnej miere charakter základného výskumu a sú medzinárodne významné, časť výsledkov je lokálneho významu a je aplikovateľná v praxi.

MEDZINÁRODNÝ VÝZNAM VÝSLEDKOV ZÁKLADNÉHO VÝSKUMU

• originálne navrhnuté polymorfné mikrosatelitové lokusy boli aplikované v projekte pri detekcii pôvodu a vzájomných genetických vzťahov populácií *D. latus* a *D. dendriticus* z rôznych oblastí Európy, Severnej aj Južnej Ameriky. Dizajn mikrosatelitov oboch druhov bol publikovaný v renomovaných medzinárodných časopisoch, čo znamená možnosť ich aplikácie aj vedeckými tímami v zahraničí;

• oba modelové druhy (*D. latus* a *D. dendriticus*) boli za posledných viac ako 100 rokov výskumu študované prevažne na lokálnej úrovni. Parazitológovia z rôznych krajín Európy, Severnej a Južnej Ameriky, sa pri svojich výskumoch zameriavali na opis morfológie, hostiteľov a výskytu modelových pásomníc iba v lokálnych oblastiach. Vo vedeckej obci už dlhší čas rezonovali otázky o pôvode týchto pásomníc a viedli sa diskusie o tom, či Európa predstavuje pôvodný kontinent ich výskytu. Doteraz však nebolo realizované komplexné štúdium, ktoré by zahŕňalo populácie zo všetkých kontinentov výskytu týchto pásomníc, a ktoré by vhodne zvolenými metódami (predovšetkým molekulárnymi) vedelo tieto otázky zodpovedať. Vďaka zberom materiálu oboch druhov pásomníc z rôznych oblastí výskytu, ako aj vďaka snahe autorského kolektívu zabezpečiť potrebný materiál prostredníctvom širokej medzinárodnej spolupráce, sa podarilo realizovať komplexné populačno-genetické štúdium *D. latus* aj *D. dendriticus* a zodpovedať otázky o ich pôvode a introdukcii. Z toho aspektu možno výsledky považovať za významné z globálneho hľadiska;

• z hľadiska základného výskumu sú medzinárodne významné aj výsledky o detailnej štruktúre chromozómov, lokalizácii ribozomálnych lokusov a mikroanatómii prednej časti plerocerkoidov modelových pásomníc. Originálne zistené poznatky odhalili doteraz nepublikované údaje o jedinečnej molekulárno-cytogenetickej štruktúre *D. latus* a jeho špecifického evolučného postavenia v rámci difylobotriidných pásomníc. Bola zistená detailná štruktúra prednej časti lariev pásomníc podporujúca teóriu o jej funkčnom význame pri migrácii a prichytení v hostiteľskom organizme.

VÝSLEDKY APLIKOVATEĽNÉ DO PRAXE

• výsledky projektu umožnili získať aktuálne údaje o výskyte plerocerkoidov *D. latus* v ostrižoch z Dunaja. Viac ako 50 rokov starý nález (Čatár a kol., 1967) nákazy *D. latus* u človeka na Slovensku, u ktorého sa v kazuistike udávala konzumácia surových ostrižov odlovených v Dunaji, viedla k záverom o autochtónnej nákaze človeka pásomnicou *D. latus* na Slovensku, ako aj o cirkulácii parazita v prírodných podmienkach krajiny. Viacero autorov zo Slovenska aj zahraničia citovalo spomínanú publikáciu vo svojich vedeckých prácach a uvádzalo výskyt *D. latus* v Dunaji a na Slovensku bez novších experimentálnych dôkazov. Po vyše pol storočí sme na základe rozsiahleho ichtyoparazitologického prieskumu realizovaného na piatich lokalitách v slovenskej časti rieky Dunaj zistili aktuálne údaje a nepotvrdili nález *D. latus* v danom prostredí.

• okrem Slovenska sme na základe najnovších výsledkov aktualizovali aj mapu výskytu *D. latus* v Európe. Súčasný poznatky o distribúcii pásomnice sú ovplyvnené jednak lepšími diagnostickými metódami (molekulárna genotypizácia), ako aj historicky zmenenými

stravovacími návykmi. Konkrétne pokles konzumácie surových rýb v Škandinávii a Pobaltí viedol k zníženiu až eliminácii výskytu parazita na severe Európy, zatiaľ čo rastúca popularita rybných filetov pripravených zo surových ostriožov v subalpskej oblasti viedla k nárastu prevalencie difylobotriózy v alpských regiónoch Švajčiarska, Francúzska a Talianska.

- výsledky nášho štúdia jednoznačne preukázali nutnosť aplikácie molekulárnych metód pri diagnostike a presnej taxonomickej identifikácii všetkých vývinových štádií parazita (vajíčka, plerocerkoidy, dospelé pásomnice) a rozšírili spektrum markerov potrebných pre molekulárnu genotypizáciu o druhovo-špecifické mikrosatelitové lokusy.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Hlavným cieľom projektu bolo získať nové údaje o biogeografii a pôvode zoonózných pásomníc *Dibothriocephalus latus* a *D. dendriticus*, pôvodcov difylobotriózy človeka. V populačno-genetickom štúdiu oboch druhov pochádzajúcich z rôznych lokalít Európy, Severnej a Južnej Ameriky boli aplikované originálne navrhnuté mikrosatelitové lokusy a vybrané mitochondriálne gény. Geneticky najviac diverzifikovanými boli populácie z Európy, čo poukázalo, že Európa je pôvodným kontinentom výskytu študovaných pásomníc. V rámci Európy vykazovali najvyššiu mieru polymorfizmu populácie z Ruska (*D. latus*) a Nórska (*D. dendriticus*). V kontraste s tým bola u severoamerických populácií zistená redukcia genetickej variability naznačujúca introdukciiu *D. latus* a *D. dendriticus* do Severnej Ameriky z Európy prostredníctvom infikovaných medzihostiteľov (ryby) alebo definitívnych hostiteľov (človek). Nápadná homológia genetickej štruktúry juhoamerických populácií poukázala na nedávnu introdukciiu pásomníc na tento kontinent, ktorý možno považovať z hľadiska ich výskytu za najmladší. U *D. latus* bola zistená triploidná sada chromozómov ($3n=27$) podporená FISH metódou s použitím ribozomálnej sondy, ktorá odhalila prítomnosť ribozomálnych lokusov na troch chromozómoch tripletu č. 7. Mikroanatómia prednej časti larválnych štádií *D. latus* a *D. ditremus* študovaná pomocou konfokálneho mikroskopu nepreukázala prítomnosť druhovo-špecifických znakov v štruktúre nervového a vylučovacieho systému a frontálnych žliaz. Medzidruhové rozdiely boli zaznamenané vo veľkosti povrchových receptorov oboch druhov. V rámci ichtyoparazitologického prieskumu nebol na Slovensku nájdený pôvodca difylobotriózy v rybách v prírodnom prostredí Dunaja.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The main aim of the project was to gain new data on geographic distribution and origin of zoonotic tapeworms *Dibothriocephalus latus* and *D. dendriticus*, the causative agents of diphylobothriosis in human. Originally designed polymorphic microsatellite loci and selected mitochondrial genes were applied in the population genetic study of both species coming from different localities in Europe, North and South America. European populations of both species were detected to be the most diverse, what indicated that Europe is the original continent of model tapeworms. Within Europe, populations from Russia (*D. latus*) and Norway (*D. dendriticus*) displayed the highest level of genetic polymorphism. Lower level of genetic variation was determined for *D. latus* and *D. dendriticus* from North America, where both species were evidently introduced from Europe along with its intermediate (fish) or definitive (human) hosts. Finally, a striking genetic homogeneity of populations from South America implies recent introduction of *D. latus* and *D. dendriticus* to this continent. *D. latus* was characterized by triploid set of chromosomes ($3n=27$). This finding was supported by the fluorescent in situ hybridization (FISH) method with ribosomal probe; three ribosomal loci were detected on three chromosomes of triplet no. 7. Species-specific markers were not detected in microanatomy of neural and excretory system of *D. latus* and *D. ditremus* studied by confocal microscopy. However, the interspecific differences between both diphylobothriid species were found in a size of their receptors. Causative agents of diphylobothriosis were not revealed during ichthyoparasitological examinations of fish from local environment in Danube River, Slovakia.