

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Parazitologie



Bc. Zuzana Pokrupová

**Ptačí schistosomy a cercáriová dermatitida v České republice: rozšíření, druhová
diverzita a faktory ovlivňující jejich výskyt**

Avian schistosomes and cercarial dermatitis in Czech Republic: distribution, diversity and
factors influencing their occurrence

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitelka: RNDr. Jana Bulantová, Ph.D.

Praha 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 26. 4. 2021

.....

Zuzana Pokrupová

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla věnovat obrovské díky mé školitelce Janě Bulantové za odborné vedení práce, spoustu rad a tipů, a hlavně za obrovskou míru trpělivosti, kterou se mnou měla. Mé díky patří také Romanovi za pomoc s molekulárními metodami, Tomášovi a paní M. Peckové za pomoc se statistikou, panu P. Pummannovi (SZÚ) za rady a pomoc v terénu, panu K. Makoňovi (DESOP) za pomoc s odchycem labutí, dodávání jejich kadaverů a poskytnutí ubytování během terénních výjezdů v Plzni, panu R. Havelkovi (SVSMP) rovněž za poskytnutí ubytování v Plzni, panu J. Durasovi za odborné rady a informace, L. Brůhovi za zaučení na práci programu ArcGIS Online, paní L. Juříčkové za pomoc s určováním vodních plžů a paní J. Humpové za poskytování vnitřností labutí.

Děkuji také všem z helmintologické laboratoře za velmi příjemné prostředí v průběhu práce na DP.

Děkuji rodině a kamarádům za podporu během zpracovávání práce.

Děkuji Lád'ovi za podporu a zpříjemnění posledních měsíců práce.

Abstrakt

Cerkáriová dermatitida (CD) se projevuje jako intenzivně svědivá vyrážka vznikající obvykle po koupání v přírodních nádržích, kde značně znepříjemňuje rekreaci. Následkem může být až nucené uzavírání koupališť kvůli vodě nevhodné ke koupání a CD tak může vést i k finančním ztrátám. Obdobně se může nákaza objevit také u osob, které v přírodních nádržích vykonávají svá povolání (plavčíci na přírodních koupalištích, osoby monitorující vodní organismy nebo kvalitu vody atp.).

Záchyty cercáriové dermatitidy jsou v České republice v současné době čtenější, než tomu bylo v minulosti. Z těchto důvodů se téma ptačích schistosom a CD dostává stále více do popředí zájmu vědců, ale také pracovníků hygienických stanic a zdravotních ústavů, jejichž povinností bude na základě zákona č. 258/2000 Sb. o ochraně veřejného zdraví a související prováděcí vyhlášky č. 238/2011 Sb. schválené v letošním roce i pravidelný monitoring výskytu původců CD na koupalištích.

Pro ucelený přehled o dosavadním výskytu ptačích schistosom a CD na lokalitách v České republice byla za pomoci dat získaných z odborných článků, závěrečných prací studentů vysokých škol, záznamů hygienických stanic a zdravotních ústavů, vlastních sběrů, komunikací s laickou i odbornou veřejností a informací ze sdělovacích prostředků v programu ArcGIS Online vytvořena specializovaná přehledová mapa s vyznačenými záchyty ptačích schistosom a CD. Zároveň byly vytvořeny podklady pro interně dostupnou interaktivní mapu s možností zobrazení podrobných informací o jednotlivých záznamech pro využití v budoucnu.

Výskyt ptačích schistosom a CD je ovlivňován faktory biotického i abiotického charakteru. Prokázaný vliv konkrétních faktorů může být do budoucna využit při uplatňování preventivních opatření sloužících k předcházení výskytu CD na lokalitách. Během zpracovávání diplomové práce byl hodnocen zejména vliv vegetace, rybí obsádky, ale také typu substrátu či hodnot pH.

Součástí diplomové práce byla i charakterizace dosud jen částečně popsaného druhu ptačí schistosomy *Trichobilharzia filiformis*. Díky experimentálním nálezům se podařilo identifikovat vhodného mezihostitele a získat i další informace o mezihostitelské specifitě. Stádia získaná z přirozeně nakažených definitivních hostitelů (labutí *Cygnus olor*) i experimentálně nakažených vodních plžů (kružníků rodu *Gyraulus*) byla podrobena morfologické i molekulárně biologické charakterizaci. Za využití cercárií z experimentálně nakažených plžů byla ověřována jejich schopnost penetrovat kůži savců nebo vyvíjet se v laboratorně chovaném modelovém ptačím hostiteli kachně domácí (*Anas platyrhynchos f. domestica*).

Hlavním přínosem předkládané diplomové práce je ucelený přehled o dosavadním výskytu ptačích schistosom a CD v České republice, o faktorech, které jejich výskyt ovlivňují a souhrn nových poznatků o druhu ptačí schistosomy *T. filiformis*.

Klíčová slova: ptačí schistosomy, cercáriová dermatitida, monitoring, faktory prostředí, *Trichobilharzia filiformis*, experimentální nákazy

Abstract

Cercarial dermatitis (CD) is manifested as a strong itchy rash that usually occurs after bathing in the natural water bodies where it makes recreation uncomfortable. As a consequence, the natural swimming areas can be closed because of inconvenient water quality, what subsequently leads to the financial losses. The infection can also affect people working in the natural water bodies as lifeguards (at the natural swimming areas), people monitoring water organisms or water quality etc.).

Nowadays, CD in Czech Republic occurs more frequently than in the past. For this reason, the topic of avian schistosomes and CD is very attractive not only for scientists, but newly also for employees of hygienic stations and health institutes. Based on the Act No. 258/2000 Coll. on protection of public health and related executive Decree No. 238/2011 Coll. approved this year their duty will be regular monitoring of official natural swimming areas for causative agents of CD.

For the comprehensive overview about the occurrence of the avian schistosomes and CD, up to now, at the localities in the Czech Republic the specialized overview map with the marked catches of avian schistosomes and CD was created in the program ArcGIS Online. This map was made with use the records obtained from the scientific articles, final thesis written by university students, records of hygienic stations and health institutes, field collections done during the work on presented thesis, communication with individual laymen and scientists and from mass media. Also, the dataset for the internally accessible interactive map with the possibility of displaying details about the individual records was created for future utilization.

The occurrence of the avian schistosomes and CD is affected by the factors of biotic and abiotic character. Proven effects of the specific factors can be used as preventive measures reducing occurrence of CD at the localities. Mainly the effect of vegetation, fish type of substrate or pH values was evaluated.

Updated characterization of only partially described species of avian schistosome *Trichobilharzia filiformis* is presented here. Thanks to the experimental infections the suitable intermediate host was identified and the intermediate host specificity was clarified. The stages obtained from the naturally infected definitive hosts (swans *Cygnus olor*) and experimentally infected water snails (genus *Gyraulus*) were characterized in terms of morphology and molecular biology. With the using of cercariae from experimentally infected snails their ability to penetrate the skin of mammals or to develop in a laboratory bred avian model host (domestic duck *Anas platyrhynchos* f. *domestica*) was verified.

The main benefit of this master thesis is a comprehensive overview of current reports of avian schistosomes and CD presence in the Czech Republic, about the factors that affect their occurrence and a summary of the new knowledge about the avian schistosome species *T. filiformis*.

Key words: avian schistosomes, cercarial dermatitis, monitoring, environmental factors, *Trichobilharzia filiformis*, experimental infections

Obsah

ÚVOD.....	1
CÍLE PRÁCE.....	2
1. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	3
1.1. Ptačí schistosomy.....	3
1.1.1. Životní cyklus ptačích schistosom.....	3
1.1.2. Taxonomie a druhová determinace	5
1.1.3. Monitoring ptačích schistosom a jejich diverzity	6
1.1.2. Cerkáriová dermatitida.....	19
1.1.3. Ptačí schistosomy jako původci cercáriové dermatitidy ve světě.....	20
1.1.4. Ptačí schistosomy jako původci cercáriové dermatitidy v ČR	21
1.3. Faktory ovlivňující výskyt ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy	21
1.3.1. Faktory spojené s výskytem mezihostitelských plžů	22
1.3.2. Faktory spojené s definitivními hostiteli	24
1.3.3. Faktory spojené s výskytem konkrétního druhu ptačí schistosomy	25
1.3.4. Faktory ovlivňující výskyt cercáriové dermatitidy	26
1.4. Opatření využívaná při snaze o kontrolu CD	27
1.4.1. Zásahy na úrovni mezihostitelského plže.....	27
1.4.2. Zásahy na úrovni definitivního hostitele	28
1.4.3. Zásahy na úrovni CD	28
1.5. Dosavadní poznatky o druhu <i>Trichobilharzia filiformis</i>.....	28
2. METODIKA	29
2.1. Monitoring ptačích schistosom v České republice.....	29
2.1.1. Zdrojová data.....	29
2.1.2. Práce v programu ArcGIS Online	30
2.2. Sledování faktorů ovlivňujících výskyt ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy.....	31
2.2.1. Modelová lokalita	30
2.2.2. Měření a sledování hydro/biologických parametrů prostředí	33
2.3. Materiál z terénu a jeho zpracování	33
2.3.1. Sběry a vyšetřování vodních plžů na přítomnost ptačích schistosom.....	34
2.3.2. Získávání a pitvy uhynulého ptactva	35
2.3.3. Získávání miracidíí ptačích schistosom.....	35
2.3.4. Experimentální nákazy	36

2.3.5. Histologické zpracování materiálu	41
2.3.6. Molekulárně biologické metody zpracování materiálu	49
3. VÝSLEDKY	53
3.1. Výskyt ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy v České republice	53
3.1.1. Souhrnné výsledky monitoringu z let 1966 - 2020	54
3.1.2. Data z terénu – vlastní výzkum	55
3.1.3. Data z vědecké i nevědecké literatury a osobní komunikace	58
3.2. Zhodnocení faktorů ovlivňujících výskyt ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy.....	60
3.2.1. Sledování abiotických proměnných.....	60
3.2.2. Sledování biotických proměnných.....	64
3.3 Nové poznatky o <i>Trichobilharzia filiformis</i>	66
3.3.1. Data z experimentálních nákaz	66
3.3.2. Stádia <i>T. filiformis</i> z pitvaných labutích	75
3.3.3. Molekulární charakterizace <i>T. filiformis</i>	79
4. DISKUZE	80
4.1. Monitoring ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy.....	80
4.2. Faktory ovlivňující výskyt ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy	83
4.3. Nové poznatky o <i>Trichobilharzia filiformis</i> a možné problémy s identifikací	88
4. ZÁVĚR	93
5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	95
PŘÍLOHY	108

ÚVOD

Zatímco lidské druhy schistosom (Trematoda: Schistosomatidae) představují významné zdravotní riziko pro obyvatele tropických a subtropických oblastí Afriky, Asie a Jižní Ameriky (Chitsulo *et al.*, 2000; Colley *et al.*, 2014), ptačí schistosomy způsobující onemocnění cercáriovou dermatitidou jsou hojně zastoupeny v podmínkách mírného pásma a severských oblastí (Skírnisson a Kolářová, 2008; Soldánová *et al.*, 2013). Vyskytují se na všech kontinentech kromě Antarktidy (Larsen *et al.*, 2004) významně zastoupené jsou zejména v Americe a Evropě, nejčastější jsou přitom druhy *Allobilharzia visceralis* a *Trichobilharzia* spp. (Lashaki *et al.*, 2020).

V České republice jsou nejčastěji nacházeny druhy *Trichobilharzia szidati*, *T. regenti* a *T. franki*, které jsou u nás také nejvýznamnějšími původci cercáriové dermatitidy.

Ptačí schistosomy využívají ke svému vývoji vodní plže jako mezihostitele a obvykle vodního ptáka jako definitivního hostitele. Cercárie uvolněné z mezihostitele mohou kromě ptačí kůže penetrovat i kůži člověka. Ten se tak stává náhodným hostitelem, ve kterém však ptačí schistosomy nedospívají a postupně hynou, často ještě v kůži, za vzniku silné imunitní reakce projevující se intenzivně svědivou vyrážkou zvanou cercáriová dermatitida (Horák *et al.*, 2015; Kolářová *et al.*, 2013).

A právě toto onemocnění je hlavní důvod, proč je ptačím schistosomám věnována vysoká pozornost. Zejména ze strany zdravotních ústavů a pracovišť krajské hygieny v poslední době roste tlak na vytvoření metodiky pro systematický monitoring ptačích schistosom na oficiálních koupalištích, který je zatím prováděn pouze sporadicky. Od letošního roku je jich v platnosti vyhláška č. 238/2011 Sb. a norma ČSN 75 7737, díky kterým bude CD sledována pravidelně. Požadavky se týkají i vzniku centralizované databáze lokalit s potvrzeným výskytem CD, možné predikce přítomnosti ptačích schistosom nebo jejich potlačení volbou vhodných opatření na lokalitě. Pro účinnou kontrolu CD je obvykle potřeba nejprve určit druh ptačí schistosomy, který ji v daném případě způsobuje. Kvůli minimu druhově specifických znaků (zejména pak u nejčastěji monitorovaného stadia – cercárie) nemá morfometrie takřka žádný význam (Jouet *et al.*, 2015) a determinaci založenou pouze na vysoké specifitu ptačích schistosom ke svému mezihostiteli (Kolářová *et al.*, 2010) vystřídal molekularně biologické metody (Dvořák *et al.*, 2002). Výskyt problematických cercárií závisí velkou měrou na přítomnosti a početnosti populace vhodných mezihostitelů. Ta je ovlivňována mnoha faktory prostředí, jako jsou vlastnosti vody, struktura břehů a dna, dostupnost potravy, přítomnost predátorů, konkurentů či parazitů, případně cirkanaální typ managementu na lokalitě (Kolářová *et al.*, 2010; Soldánová *et al.*, 2013). Lze předpokládat, že některé z nich by se do velké míry daly využít pro kontrolu CD. Vzhledem ke specifickým nárokům některých plžů je však velmi složité najít univerzální faktor, který by bylo možné aplikovat na kterékoli lokalitě postižené CD. Situaci však komplikují druhy ptačích schistosom, které nejsou schopny působit CD, případně druhy, u kterých tato informace není známa.

Předkládaná diplomová práce by měla vyplnit zmíněné mezery ve studiu ptačích schistosom a CD 1. vytvořením souborné databáze výskytu ptačích schistosom a CD v ČR pro interaktivní mapu, která bude zatím dostupná pouze pro interní účely; 2. sběrem dat a počátečním zhodnocením cirkunálně proměnlivých faktorů potenciálně ovlivňujících výskyt ptačích schistosom a CD využitelných pro predikci a kontrolu výskytu těchto parazitů na lokalitách určených ke koupání; 3. příspěvkem k charakterizaci druhu *T. filiformis* z hlediska morfologického a molekulárního, také kompletací životního cyklu a schopností působit CD.

CÍLE PRÁCE

Předkládaná diplomová práce se věnuje ptačím schistosomám a cercáriové dermatitidě, která se zejména na přírodních koupalištích po celé ČR pravidelně objevuje. Téma práce zaměřené na monitoring výskytu ptačích schistosom, možnosti budoucí predikce či kontroly jejich přítomnosti na lokalitách a metody ověřující biologii konkrétních druhů ptačích schistosom si klade následující hlavní cíle:

1. Vytvořit databázi s informacemi o výskytu a rozšíření různých druhů ptačích schistosom v ČR od roku 1966 do roku 2020 s využitím dat z literatury i vlastních sběrů, která bude podkladem pro specializovanou přehledovou mapu umístěnou na webových stránkách laboratoře helmintologie PřF UK a interaktivní mapu s prozatím pouze interní dostupností.
2. Charakterizovat faktory potenciálně ovlivňující výskyt ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy a zhodnotit jejich možný význam v predikci a kontrole tohoto parazitárního onemocnění
3. Vyplnit mezery v charakterizaci ptačí schistosomy *Trichobilharzia filiformis* vyskytující se v labutích, včetně její biologie a potenciálu působit cercáriovou dermatitidu.

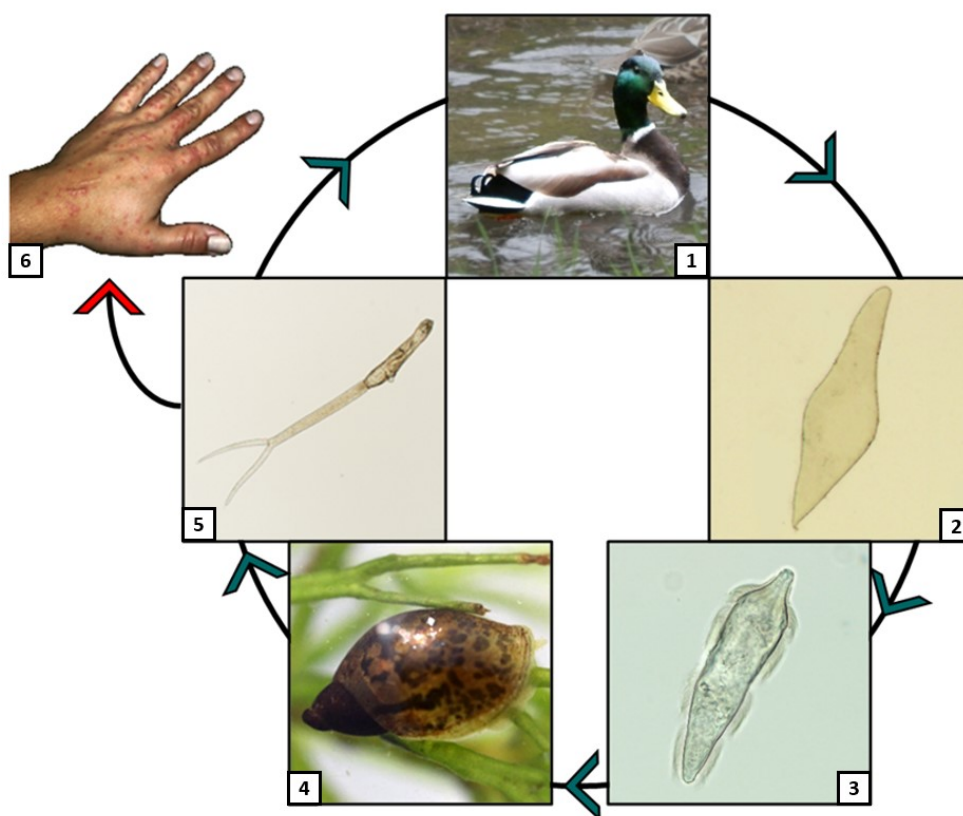
1. LITERÁRNÍ PŘEHLED

Motolice čeledi Schistosomatidae žijí v krevním řečišti savců a ptáků vyskytující se kosmopolitně (Kolářová *et al.*, 2013). Čeleď aktuálně zahrnuje celkem 14 rodů, z nichž 4 využívají jako definitivního hostitele výhradně savce. Nejvýznamnější je rod *Schistosoma* a to především z hlediska působení schistosomózy u člověka a hospodářských zvířat zejména v tropickém podnebném pásu (Whitty *et al.*, 2000). Dalších 10 rodů využívá pro svůj vývoj vodní ptactvo, z nichž v jednom rodě (*Austrobilharzia*) byl zaznamenán druh *A. variglandis*, který je schopen úplného vývoje v ptácích i savcích (Bacha *et al.*, 1982). Mezi výhradně ptačí schistosomy patří v České republice nejvýznamnější rod *Trichobilharzia*, který je častým původcem tzv. cercáriové dermatitidy u lidí ve všech podnebných páslech (Brant a Loker, 2013; Horák *et al.*, 2019; Lashaki *et al.*, 2020).

1.1. Ptačí schistosomy

1.1.1. Životní cyklus ptačích schistosom

Životní cyklus ptačích schistosom zahrnuje vodního plže (nejčastěji z čeledi Lymnaeidae nebo Planorbidae), jenž hraje roli mezihostitele, a obvykle vodního ptáka jako definitivního hostitele (nejčastěji z řádu Anseriformes) (viz Obr. 1 a Tab. 1). Do plže penetruje první larvální stádium – miracidium, které se po penetraci transformuje v mateřskou sporocystu. Uvnitř tohoto stádia se následně vyvíjí sporocysty dceřiné, které mateřskou sporocystu opouští a tvoří se v nich cercárie. Ty jsou poté vylučovány z plže a ve vodním prostředí hledají vhodného definitivního hostitele. Cercárie se penetrací kůže či alimentární cestou dostanou do těla ptáka, kde se z nich stávají schistosomula, jejichž další cesta závisí na druhu schistosomy (Horák, 2002).



Obr. 1 – Obecný životní cyklus ptačích schistosom; 1. definitivní hostitel, 2. vajíčko, 3. miracidium uvolněné z vajíčka ve vodě, 4. meziphostitel, 5. cercárie uvolněná z plže do vody, 6. člověk – náhodný hostitel. Zdroje fotografií: 1-5 vlastní foto, 6 archiv Helminologické laboratoře PřF UK.

Podle definitivní lokalizace dospělých červů je možné rozdělit ptačí schistosomy na nazální a viscerální. Mezi nazální schistosomy patří například druh *T. regenti*, který po penetraci kůže vodního ptáka migruje nervovou soustavou přes míchu do sliznice nosních konch, kde samci a samice dospívají a kopulují. Samička poté klade vajíčka, ze kterých se líhnou miracidia přímo v nosní sliznici (Horák a Adema, 2002; Horák *et al.*, 1998). Viscerální druhy (např. *T. szidati*) po penetraci kůže míří do plic, z nichž se následně krevním řečištěm dostávají do cév mezenteria i vnitřních orgánů – ledvin, jater či střev včetně kloaky (Bourns *et al.*, 1972; Haas a Pietsch, 1991; Horák *et al.*, 2015). Vajíčka těchto druhů odchází z těla hostitele spolu s trusem do vody, kde se z nich uvolňují miracidia.

Tab. 1 – Rody ptačích schistosom a jejich přirození hostitelé (Brant a Loker, 2013; Horák *et al.*, 2015)

Rod	Mezihostitel	Definitivní hostitel
<i>Allobilharzia</i>	Neznámý	Anseriformes (labutě)
<i>Anserobilharzia</i>	Planorbidae	Anseriformes (husy)
<i>Austroilharzia</i>	Nassariidae Batillariidae Littoriniidae Potamididae	Charadriiformes
<i>Bilharziella</i>	Planorbidae	Anseriformes Gruiformes Ciconiformes Podicipediformes
<i>Dendritobilharzia</i>	Planorbidae	Anseriformes Gruiformes Pelicaniformes Gaviiformes
<i>Gigantobilharzia</i>	Physidae	Passeriformes
<i>Jilinoilharzia</i>	???	Anseriformes (Anatidae)
<i>Ornithobilharzia</i>	Batillariidae	Charadriiformes
<i>Macrobilharzia</i>	???	Suliformes
<i>Trichobilharzia</i>	Lymnaeidae Physidae	Anseriformes (Anatidae)

??? – mezihostitel neznámý

1.1.2. Taxonomie a druhová determinace

Aktuálně je po celém světě popsáno kolem 70 druhů ptačích schistosom, které jsou rozděleny do 10 rodů (Brant a Loker, 2013). U mnoha přitom dodnes chybí informace o hostitelském spektru nebo např. schopnosti vyvolávat u lidí cercáriovou dermatitidu. Pro další druhy ptačích schistosom jsou známa pouze larvální stadia nebo sekvence DNA. Na přiřazení k již popsaným druhům nebo kompletnímu popisu nového druhu teprve čekají, stejně jako je tomu v případech, kdy nový druh pozornosti vědců prozatím zcela uniká.

V současné době začíná být pozornost věnována také fylogeografii. Ta je zatím běžně popisována u savčích druhů schistosom (Lawton *et al.*, 2011; Wattwood *et al.*, 2002), pravděpodobně se tak s fylogeografií budeme velmi brzy setkávat i v případě ptačích schistosom. Vnitrodruhová variabilita ptačích schistosom byla pozorována již dříve například u cercárií druhu *T. szidati* vylučovaných z plžů *L. stagnalis* (Korsunen *et al.*, 2012).

1.1.3. Monitoring ptačích schistosom a jejich diverzity

Z důvodu nízké patogenity není rozšíření ptačích schistosom ve světě sledováno v takové míře, jako je tomu u schistosom lidských. Přesto existují práce, které se jejich monitoringu intenzivně věnují, a to obvykle ve spojení s cercáriovou dermatitidou na lokalitách určených k rekreaci (Lashaki *et al.*, 2020), nebo jde o studie zabývající se systematikou, taxonomií a fylogenetikou těchto parazitů (Brant a Loker, 2009). Výrazně přitom převažují metody založené na vyšetřování mezihostitelských plžů, jen výjimečně jde o sledování výskytu ptačích schistosom u ptáků.

Podobně jsou i v České republice dostupná data omezena zejména na záznamy z lokalit významně postižených cercáriovou dermatitidou a vědecké práce s taxonomickým zaměřením (Aldhoun *et al.*, 2012; Kolářová *et al.*, 1992; Kolářová *et al.*, 1997; Rudolfová *et al.*, 2007). Mnoho záznamů o výskytu ptačích schistosom na našem území existuje pouze ve formě závěrečných prací vysokoškolských studentů (Holická, 2009; Rudolfová, 2003) nebo ústních sdělení pracovníků KHS či zdravotních ústavů.

Morfologická podobnost ptačích schistosom a vysoká diverzita této taxonomické skupiny bohužel neumožňuje spolehlivou druhovou (a často ani rodovou) identifikaci některých stadií (zejména larválních) pouze na základě morfologických znaků. Determinace se tak v minulosti často opírala zejména o vysokou hostitelskou specifitu na úrovni mezihostitele, finální lokalizaci v definitivním hostiteli či geografickou distribuci (Horák *et al.*, 2002; Brant a Loker, 2009). Ke spolehlivosti determinace až na druhovou úroveň výrazně přispěly metody molekulární biologie (Dvořák *et al.*, 2002; Aldhoun *et al.*, 2009; Brant a Loker, 2009; Jouet *et al.*, 2009), které však nejsou dostupné pro rutinní vyšetřování lokalit prováděná KHS a ZÚ.

Využití mezihostitelů

Nejčastějším způsobem zjišťování přítomnosti ptačích schistosom na lokalitě je sběr plžů. Z vodních plžů můžeme jejich pitvou získat sporocysty pro odhalení prepatentní fáze infekce (u raných infekcí to však není možné), nebo mohou být ze živých mezihostitelů vyloučeny cercárie, které jsou vhodnější pro určení alespoň do rodu na základě morfologie než sporocysty. Obě stadia nacházející se v plžích je však možné použít pro molekulárně biologickou identifikaci, která je pro determinaci druhu nejspolehlivější.

Determinace ptačích schistosom z plžů na základě mezihostitelské specifity

Mezi první kritéria při identifikaci druhu ptačí schistosomy patří druh mezihostitele, v němž je parazit nalezen. Pro schistosomy obecně platí, že jeden druh je schopný vyvíjet se pouze v jednom či

několika málo příbuzných druhů plžů. V některých případech je možná penetrace miracidii do druhů plžů, kteří nejsou přirozenými hostiteli, obvykle se v nich však nedokážou vyvíjet (Kock, 2001). Někdy může být jeden druh plže přirozeným mezihostitelem pro až tři druhy ptačích schistosom (Aldhoun *et al.*, 2012)

Přestože druh mezihostitelského plže patří mezi velmi významná kritéria alespoň pro předběžné určení druhu ptačí schistosomy (Horák *et al.*, 2002), nelze se na něj spolehnout vždy a předpoklad je nezbytné ověřit nejlépe metodami molekulární biologie.

Determinace ptačích schistosom z plžů na základě morfologie sporocyst

Stádium sporocysty (mateřské či dceřinné) by hypoteticky mohlo být pro morfológickou determinaci ptačích schistosom využito při pitvách mezihostitelských plžů (zvláště pak u časnějších infekcí před vylučováním cercárií), vzhledem k nedostatku druhově a často pravděpodobně i rodově specifických znaků má však toto stadium pro determinaci druhu na základě morfologie takřka nulový potenciál. Mohou však být využity pro molekulární analýzu v případě absence cercárií (Horák *et al.*, 2002).

Determinace ptačích schistosom z plžů na základě morfologie cercárií

Obecně jsou cercárie ptačích schistosom opatřeny pigmentovanými očními skvrnami a ocásky s furkou – jde o tzv. ocelátní furkocercárie (Kolářová *et al.*, 2010). Pro pozorování dalších struktur je obvykle třeba četných zkušeností pozorovatele a využití speciálních barvicích nebo zobrazovacích technik. Přestože lze u některých druhů při podrobném zkoumání na cercáriích najít znaky využitelné k druhové diagnostice v rámci skupiny druhů, stále platí, že cercárie různých druhů, ale i rodů jsou téměř neodlišitelné (Horák *et al.*, 2002; Rudolfová *et al.*, 2005). I přes jejich četná omezení jsou níže uvedené znaky využívány především k popisu nových či dosud nedostatečně popsanych druhů.

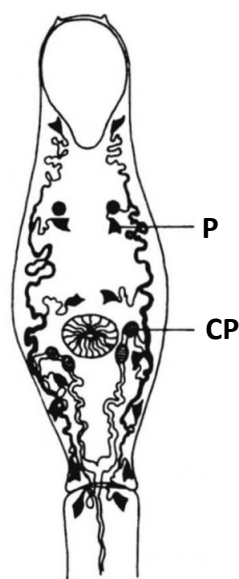
a) Morfometrie

Měření rozměrů cercárií bývá součástí studií popisujících nové druhy. Těla cercárií jsou vysoce kontraktální, a aby bylo možné mezidruhové srovnání, je nezbytné zachovávat jednotný postup při fixaci a standardizaci měření. Pro natažení těla cercárie je nutné použít horkou tekutinu. Nejčastěji je využíván horký formalín (4%, 5% či 10% roztok), případně horká voda či Bakerova fixáž (Aldhoun *et al.*, 2012; Blair a Islam, 1983; Daniell, 1984; Faltýnková *et al.*, 2007; Horák *et al.*, 1998; Kolářová *et al.*, 1999; Rind, 1991; Valdovinos a Balboa, 2008). Přesná identifikace pouze na základě morfometrie cercárií však obvykle není možná kvůli nízké mezidruhové, a naopak vysoké vnitrodruhové variabilitě (Kolářová *et al.*, 2010, Rudolfová *et al.*, 2005).

b) Exkretční soustava

Jedním ze znaků využívaných k determinaci cercárií motolic je charakterizace exkretční soustavy (viz Obr. 3), resp. počet plaménkových buněk (Islam, 1986), viditelných ve světelném mikroskopu pouze u živých, nejlépe právě hynoucích cercárií. Pro charakterizaci exkretční soustavy platí vzorec $2[(\text{počet plaménkových buněk před acetabulem} + \text{počet plaménkových buněk za acetabulem}) + \text{počet plaménkových buněk v ocasním kmeni}] = x$. U většiny druhů ptačích schistosom rodu *Trichobilharzia* a některých druhů rodu *Gigantobilharzia* (Schuster *et al.*, 2013) je vzorec exkretční soustavy - $2[(3 + 3) + 1] = 14$ (Rudolfová *et al.*, 2005). Liší se naopak u druhu *T. corvi*, který má vzorec $2[(3 + 2) + 1] = 12$ či u druhů *T. arcuata* a *T. australis* se vzorcem $2[(3 + 4) + 1] = 16$ (Horák *et al.*, 2002). Tato odlišnost však mohla být způsobena nepřesnou charakterizací exkretční soustavy z důvodu absence specializovaných technik a mikroskopů.

Počet a uspořádání plaménkových nepředstavuje pro determinaci druhu ptačích schistosom hodnotný nástroj. Jednotlivé druhy mají často totožné uspořádání a u starších popisů některých druhů je možná jejich nedokonalá charakterizace.



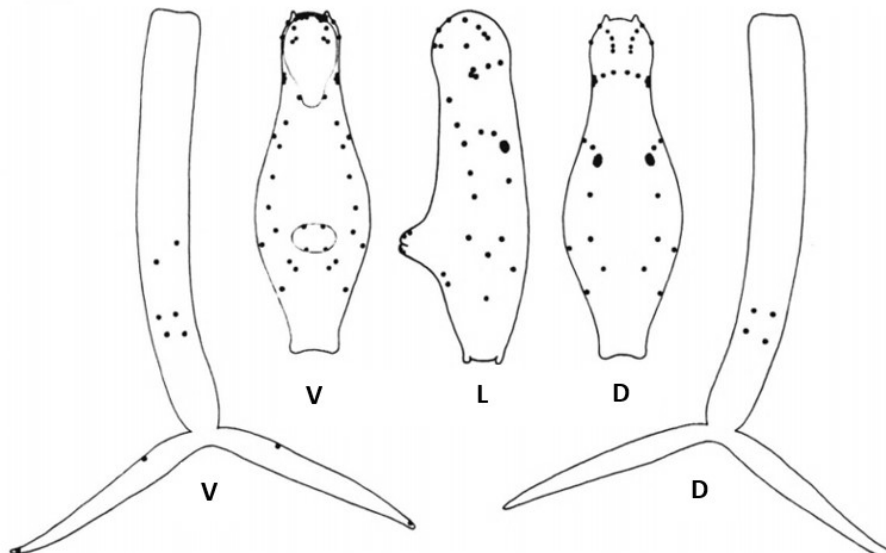
Obr. 3 - Uspořádání plaménkových buněk v různých segmentech těla cercárie druhu *Trichobilharzia regenti*; P – plaménková buňka, CP – ciliární pole. Zdroj: Horák *et al.* (1998)

c) Senzorické papily

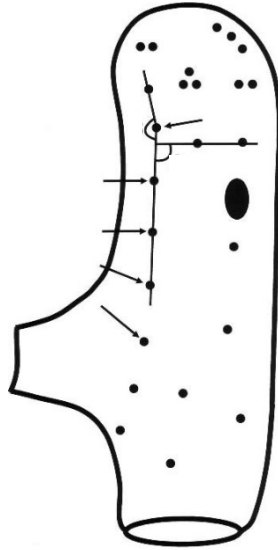
K identifikaci může pomoci sledování počtu a rozmístění senzorických papil na povrchu cercárie (chaetotaxe; viz Obr. 4). Uspořádání senzorických receptorů je obecně evolučně zakonzervované a je tedy vnímáno jako možný taxonomický znak (Kock a Böckeler, 1998). Samy o sobě nejsou senzorické papily viditelné ve světelném mikroskopu, je však možné je vizualizovat pomocí dusičnanu stříbrného (AgNO_3) (Podhorský *et al.*, 2009). Senzorické papily jsou argentofilní

struktury, které dokážou redukovat soli stříbra na kovové stříbro, jenž dá těmto strukturám tmavou barvu. Uspořádání papil je interpretováno na základě univerzální nomenklatury, dle které je tělo cercárie rozděleno na několik částí: hlavová část (C I – C IV), přední část (A I – A III), střední část (M I), zadní část (P I – P II), acetabulum (S), ocas (U) a furka (F) (Kock a Böckeler, 1998; Richard, 1971). Pro identifikaci druhu jsou sledovány papily na ventrální a dorzální straně cercárie a jejich rozmístění při laterálním pohledu.

Přestože chaetotaxe je považována spíše za nevhodnou k určování druhu (např. Blair a Islam, 1983), Podhorský *et al.* (2009) od sebe na základě chaetotaxe dokázal odlišit 3 druhy ptačích schistosom (*T. franki*, *T. szidati* a *T. regenti*) (viz Obr. 5). Výsledky byly následně využity pro vytvoření klíče pro tyto 3 druhy. V případě známého meziphostitelského plže může být chaetotaxe využita spíše pro potvrzení druhu parazita, bez znalosti meziphostitele je možné se na základě klíče určit druh schistosomy.



Obr. 4 – Chaetotaxe cercárií *Trichobilharzia regenti*. V – ventrální pohled; L – laterální pohled; D – dorsální pohled. Zdroj: Horák *et al.* (1998)



Obr. 5 – Schematická kresba chaetotaxe (laterální pohled) zachycující papily pro rozlišení druhů *Trichobilharzia szidati*, *Trichobilharzia regenti* a *Trichobilharzia franki*. Zdroj: Podhorský *et al.* (2009)

Determinace ptačích schistosom z plůžů na základě chování cercárií

Obecně jsou cercárie ptačích schistosom pozitivně fototaktické a zároveň negativně geotaktické. Z plže jsou vylučovány stimulací světlem, v případě druhu *T. szidati* byl pozorován nejvyšší počet vyloučených cercárií mezi 6. a 10. hodinou, tedy za rozbřesku (Soldánová *et al.*, 2016). Cercárie se tak v přírodních vodách koncentrují u hladiny, kde je nejvyšší pravděpodobnost výskytu definitivních hostitelů (Feiler a Haas, 1988; Horák *et al.*, 2015). Výjimku tvoří například druh *T. stagnicola*, jehož cercárie neplavou cíleně za světlem, ale opakovaně plavou k hladině a následně klesají ke dnu (McMullen and Beaver, 1945; Olivier, 1948).

Cercárie ptačích schistosom aktivně plavou ve vodním sloupci a při nepřítomnosti definitivního hostitele přisedají acetabulem k substrátu nebo k povrchové blance na hladině. V této klidové pozici mají tělo téměř rovnoběžné s hladinou, zatímco ocásek s furkou volně visí dolů. Výjimkou jsou cercárie druhu *T. physellae* a *T. stagnicola*, které k povrchové vodní blance nepřisedávají (Olivier, 1948). Naopak menší druhy jako například *D. pulverenta* bývají k povrchům přichyceny velmi pevně a bývá s nimi obtížnější manipulace (Brant a Loker, 2013).

Využití definitivních hostitelů

Přestože získávání cercárií z mezihostitelů je snazší, vhodnějšími stádii pro identifikaci ptačích schistosom na základě morfologických znaků jsou dospělci z definitivních hostitelů. Vyvinutá

pohlavní soustava dospělých parazitů obvykle poskytuje dostatek morfologických znaků pro jejich zařazení minimálně na úroveň rodu. K identifikaci může rovněž dopomoci definitivní lokalizace dospělců či tvar a lokalizace vajíček. Všechna stádia nacházená v definitivním hostiteli (vajíčka, miracidia, schistosomula, dospělce) je možné využít také pro zpracování molekulárně biologickými metodami.

Specifita k definitivnímu hostiteli

Spektrum definitivních hostitelů je pro konkrétní druhy ptačích schistosom širší než spektrum mezihostitelů. Jeden druh schistosomy tak bývá nacházen v různých druzích ptačích hostitelů obvykle jediného řádu – např. nálezy *T. regenti* a *A. brantae* u různých druhů ptáků řádu Anseriformes (Brant *et al.*, 2013; Jouet *et al.*, 2010; Rudolfová *et al.*, 2007). Zároveň jeden druh ptáka může sloužit jako hostitel pro více druhů ptačích schistosom – např. *A. platyrhynchos* je vhodným definitivním hostitelem pro *T. regenti*, *T. szidati*, *Bilharziella polonica* a další druhy různých rodů (např. *Dendritobilharzia* či *Gigantobilharzia*) (Akramova *et al.*, 2010, 2011; Horák *et al.*, 1998; Meuleman *et al.*, 2013; Prüter *et al.*, 2017). U některých zástupců ptačích schistosom může jeden druh parazita infikovat i druhy ptáků z různých řádů. To bylo zjištěno například u druhů ptačích schistosom *T. physellae*, *B. polonica* či *G. acotylea* (Akramova *et al.*, 2010; (Horák *et al.*, 2015; Kolářová *et al.*, 1997; McMullen a Beaver, 1945). Přesto existují výjimky, jako jsou například *A. visceralis*, *T. filiformis* či *T. anseri*, kdy byl pro jeden druh ptačích schistosomy popsán zatím pouze jeden či několik málo blízké příbuzných druhů ptáků (Brant, 2007; Jouet *et al.*, 2015; Kolářová *et al.*, 2006; Szidat, 1938; van Bolhuis *et al.*, 2004). Je zde však otázka, zda tato úzká specifita není způsobena pouze nedostatkem dat z jiných hostitelů. Vyvrátit tuto možnost by mohly experimentální nákazy dalších druhů vodních ptáků. Jedinci stejného druhu ptačí schistosomy mohou být v různých geografických oblastech morfologicky rozdílní (např. *T. regenti* v našich podmínkách vs. na Islandu; Jouet *et al.*, 2010). Tento fakt může být způsoben různým kmenem pozorovaného druhu, případně druhem hostitele.

Určení definitivního hostitele tedy může při determinaci ptačích schistosom sloužit v některých případech jako podpůrný znak, který může pozorovatele navést na správnou cestu při identifikaci ptačí schistosomy a zúžit spektrum možných druhů.

Determinace ptačích schistosom z ptáků na základě lokalizace

Na základě místa finální lokalizace v ptačím hostiteli mohou být druhy ptačích schistosom rozděleny na nazální a viscerální. Mezi nazální druhy patří *T. regenti* a dalších 7 druhů (např. *T. australis* či *T. arcuata*) (Islam, 1986; Horák *et al.*, 1998). Dospělci všech těchto druhů obývají pouze sliznici nosních konch a je tedy nemožné je mezi sebou na základě lokalizace rozlišit. K viscerálním druhům jsou řazeny v našich podmínkách časté druhy *T. franki* a *T. szidati*, z dalších druhů jsou to

například *T. anseri*, *T. filiformis*, *T. mergi*, *A. visceralis*, *D. pulverulenta*, *G. acotylea* (Akramova *et al.*, 2010; Jouet *et al.*, 2015; Kolářová *et al.*, 2006, Kolářová *et al.*, 2013; Szidat, 1938; Vusse, 1980). Dospělá stádia viscerálních druhů žijí v dospělosti v cévách vnitřních orgánů ptáků. Mohou se vyskytovat v mezenteriálních cévách (*A. visceralis*, *T. anseri*), v cévách tlustého či různých částech tenkého střeva (*T. franki*, *B. polonica*, *G. huronensis*), jater (*T. franki*) či ve stěně střeva (*T. szidati*) (Chanová *et al.*, 2007; Jouet *et al.*, 2015b; Kolářová *et al.*, 2006; Müller a Kimming, 1994; Najim, 1956; Rudolfová *et al.*, 2007). Netypickou definitivní lokalizaci má rod *Dendritobilharzia*, jehož zástupci (např. *D. pulverulenta*) se v dospělosti nachází v arteriích (Brant *et al.*, 2011; Vusse, 1980), zatímco většina ostatních druhů obývá především žíly a vlasečnice. Tato nezvyklá lokalizace však může být způsobena nedostatkem dat pro jiné druhy ptačích schistosom.

Před dosažením místa své definitivní lokalizace mají schistosomula nazálních a viscerálních druhů odlišnou migraci. Schistosomula nazálních druhů (popsáno u *T. regenti*) migrují periferními nervy a centrální nervovou soustavou ptáků, schistosomula viscerálních druhů můžeme najít v krevním řečišti, odkud se dostávají do plic a následně opět vstupují do cév a migrují k místu své definitivní lokalizace. Výjimkou u viscerálních druhů je *B. polonica*, jejíž schistosomula pravděpodobně migrují stejně jako u nazálních druhů nervovou soustavou (Prüter *et al.*, 2017). Zde se však mohlo jednat pouze o náhodnou lokalizaci.

Určení místa lokalizace nalezeného druhu ptačí schistosomy je vhodným doprovodným znakem, který může zúžit spektrum možných druhů. Téměř identická lokalizace u různých druhů je však poměrně běžná, nelze se tedy spoléhat jen na ni.

Získávání stadií ptačích schistosom z definitivních hostitelů

Jediným způsobem pro získání dospělců ptačích schistosom je pitva definitivních hostitelů. Může jít o ptáky usmrcené přímo pro účely výzkumu ptačích schistosom nebo obecně parazitů (Horák *et al.*, 1998), ulovené jedince získané od myslivců (Rudolfová *et al.*, 2007), zraněné ptáky uhynulé či utracené v záchranných stanicích pro volně žijící živočichy, nebo o čerstvě nalezené kadávery. Parazitologická pitva zaměřená na ptačí schistosomy je časově náročná, proto bývají ptáci někdy zamrazeni do doby, než je možné provést jejich pitvu (Jouet *et al.*, 2015; Kolářová *et al.*, 2010). Při pitvách bývá kladen důraz především na orgány a jejich cévy, v nichž je výskyt hledaných druhů pravděpodobný na základě vlastních zkušeností či informací z popisů jednotlivých druhů. Obvykle jsou prohlíženy stěny a cévy střev včetně mezenteriálních cév, játra, ledviny, plíce, srdce a nosní sliznice. Izolace dospělců probíhá prostřednictvím seškrabů, homogenizace či výplachů cév. Izolace dospělých červů je však kvůli jejich délce, extrémně tenkému tělu a těsnému kontaktu s hostitelskou tkání velmi náročná. Často tak bývají získány pouze jejich fragmenty (Ashrafi a Brant, 2020; Kolářová *et al.*, 2006; Kolářová *et al.*, 2010; Prüter *et al.*, 2017). Při pitvě mražených ptáků se při hledání

dospělých červů nelze spoléhat na jejich pohyb, ani na soudržnost tkání, které již mohou být v pokročilejší fázi rozkladu.

Vajíčka ptačích schistosom mohou být získána intravitálně z trusu či nosní dutiny ptáků (Akramova *et al.*, 2010; Horák *et al.*, 1998) nebo postmortálně pitvou z nosní či střevní sliznice, mezenterálních cév, plic, jater, ledvin i srdce (Akramova *et al.*, 2010; Kolářová *et al.*, 2010). Pitvou hostitele mohou být izolována vajíčka viscerální druhů ptačích schistosom z vnitřních orgánů, ale i nasálních druhů z nosní sliznice. Při pitvě jsou části tkáně z podezřelých oblastí střevní (po seškrabu) či nosní sliznice nebo orgánového parenchymu připravena do podoby roztlakového preparátu prohlíženého pod mikroskopem. Kromě pitvy mohou být vajíčka nazálních druhů získána také laváží nosní dutiny fyziologickým roztokem (Kolářová *et al.*, 2010; Horák *et al.*, 2002; Skirnisson a Kolářová, 2008). V případě pitvy mraženého hostitele je možné izolovat vajíčka obsahující nevylíhlá miracidia.

Při získávání vajíček s živými miracidii se tato miracidia ihned po kontaktu s vodou líhnou díky změně osmolarity (Samuelson *et al.*, 1984). Spolu s trusem jsou vylučována vajíčka viscerálních druhů ptačích schistosom, jejichž počet je však nízký, a je proto potřeba vyšetřit celý objem trusu, který je k dispozici. Pro zvýšení efektivity je možné trus zpracovat například formol-éterovou sedimentační metodou (Appleton, 1983; Appleton, 1986), což je však v praxi možné jen pro určité aplikace. Cílené líhnutí miracidii z je prováděno v koncentračních lahvích izolovaných od světla, na jejichž hrdlo je z boku namířeno světlo z lampy. Po vylíhnutí miracidia plavou ke zdroji světla (Dinguirard *et al.*, 2018). Takto získaná živá miracidia mohou být využita nejen pro intravitální diagnostiku infekce ptáka viscerálními schistosomami pomocí molekulárně biologických metod, pro experimentální nákazy nebo pro experimenty s orientací a hledáním meziphostitele (Kalbe *et al.*, 1997; Marszewska *et al.*, 2018; Skirnisson *et al.*, 2009).

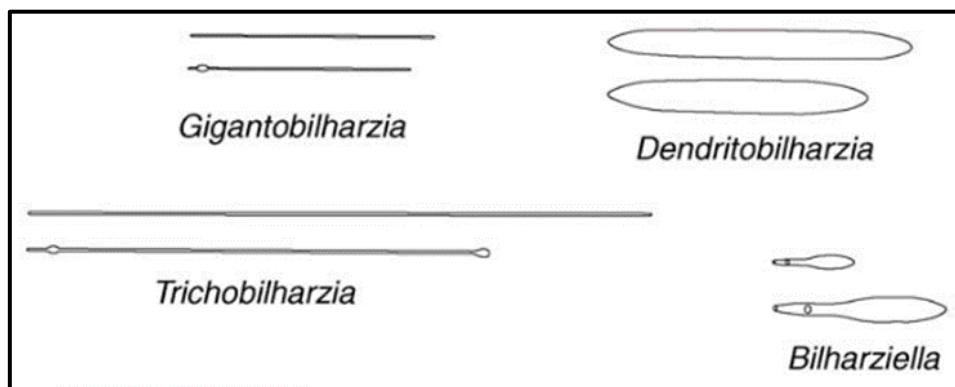
Determinace na základě morfologie dospělců

Přestože není jednoduché získat z tkáně celé červy, uvádí se, že pro diagnostiku ptačích schistosom jsou dospělá stádia, jejichž některé vnitřní i povrchové struktury bývají druhově specifické, nejvhodnější (Ashrafi a Brant, 2020; Blair and Islam, 1983). Jednotlivé rody je často možné rozlišit i na první pohled v mikroskopu, a to podle tvaru jejich těla, které může být například dlouhé, nitkovité s uniformní šířkou po celé délce těla, nebo naopak krátké a široké či krátké s předním koncem užším, než je zadní část těla (viz Obr. 6). Dalšími znaky může být přítomnost či absence přísavky (Brant *et al.*, 2013; Kolářová *et al.*, 2006; Loker a Brant, 2006; Schuster *et al.*, 2014). Khalil (2002) vytvořil na základě morfologie těla klíč k jednotlivým rodům.

Pro konkrétnější zařazení ptačí schistosomy je využívána vnitřní morfologie jedinců, a to především na předním konci obou pohlaví. Mezi takové znaky patří například uložení opětovného spojení dvou větví střeva vůči orgánům pohlavní soustavy (*vesicula seminalis* či *receptaculum*

seminis; Brant a Loker, 2009; Horák, *et al.*, 2002; Skírnisson *et al.*, 2012). Dalšími znaky, které jsou důležité pro rozlišení druhů ptačích schistosom, jsou povrchové struktury tegumentu, délka *canalis gynaecophorus* vzhledem k délce těla (ten však může chybět), umístění genitální papily u samců, počet varlat a velikost a tvar vnitřních orgánů (Horák *et al.*, 2002). Určení druhu na základě měření rozměrů, především délky těla, obvykle není možné. Kromě obtížné izolace celého červa z hostitelské tkáně je stejně jako u cercárií potřeba brát v úvahu kontraktilitu těla. Zároveň je nutné myslet i na vnitrodruhovou variabilitu, kdy byly zaznamenány rozdíly v morfologii těla v závislosti na druhu hostitele, geografické lokalizaci či ročním obdobím (Bayssade-Dufour *et al.*, 2006; Jouet *et al.*, 2010). Také byla popsána variabilita ve velikosti jedinců získaných z ptáků z přírody, kteří jsou větší než ti z experimentálně nakažených hostitelů (Skírnisson *et al.*, 2012).

Dospělci ptačích schistosom jsou tedy vhodná stádia pro determinaci v případě, že není možnost použít molekulárně biologické metody, je však nezbytné mít k dispozici obě pohlaví.




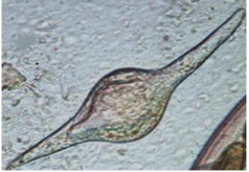

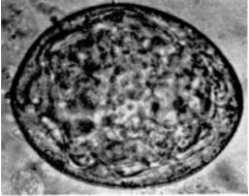

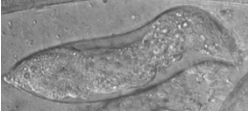
Obr. 6 – Variabilita morfologie těla dospělců vybraných rodů ptačích schistosom (upraveno dle Loker a Brant, 2006)

Determinace na základě morfologie vajíček

Vajíčka ptačích schistosom nabývají různých tvarů (viz Tab. 2), které mohou usnadnit identifikaci druhu motolice. Je pak možné odlišit od sebe druhy s rozdílnými vajíčky v případě podobné lokalizace a výskytu ve stejném hostiteli. Skírnisson *et al.* (2008) rozlišil na základě velikosti a tvaru vajíček 7 druhů ptačích schistosom.

I přes očividné výhody pozorování vajíček ptačích schistosom by se diagnostika neměla omezovat pouze na tento znak. Vajíčka některých druhů si mohou být navzájem velmi podobná (Horák, 2002; Ivo, 1960; Szidat, 1938). V souvislosti s vývojem miracidia uvnitř vajíčka se mění velikost a často i tvar vajíček, což identifikaci také komplikuje. Nicméně jejich tvar může sloužit alespoň jako rychlý předběžný nástroj pro determinaci různých druhů vyskytujících v jednom hostiteli (Akramova *et al.*, 2010; Horák *et al.*, 2002).

Tab. 2 – Vybrané tvary vajíček ptačích schistosom.

Tvar vajíčka	Příklady zástupců	Zdroj
vřetenovitý		
	<i>Trichobilharzia regenti</i>	Skírnisson <i>et al.</i> , 2011
	<i>Trichobilharzia anseri</i>	Jouet <i>et al.</i> , 2015b
protáhlý		
	<i>Trichobilharzia mergi</i>	Kolářová <i>et al.</i> , 2013
oválný		
	<i>Trichobilharzia filiformis</i>	Szidat, 1938
kulatý		
	<i>Dendrobilharzia pulverulenta</i>	Horák <i>et al.</i> , 2019
nepravidelný		
	<i>Allobilharzia visceralis</i>	Brant, 2007

Morfologie miracidíí

Miracidia schistosom se líhnou ihned po kontaktu s vodou, což je mezi motolicemi unikátní. K druhové determinaci ptačích schistosom na základě miracidíí bývaly v minulosti využívány různé struktury a znaky, a to především uspořádání ciliárních (epidermálních) destiček, penetrační žlázy a počet klastrů zárodečných buněk. U rodu *Trichobilharzia* je obvyklý počet ciliárních destiček 22 uspořádaných podle vzorce 6:9:4:3 (Horák *et al.*, 2002). Tento vzorec se může lišit – například u druhu *T. corvi* platí 6:7:5:4 (Blair a Islam, 1983), druh *G. acotylea* má vzorec 6:8:4:2=20 (Akramova *et al.*, 2010). Penetrační žlázy, které obvykle bývají tři, se mohou lišit svými rozměry (Baugh, 1963). Rozdíl však můžeme pozorovat i v počtu žlaz, které jsou pak rozděleny na centrální a periferní (Blair a Islam, 1983). Posledním zmíněným znakem využívaným k identifikaci jsou zárodečné buňky, které jsou uspořádány do klastrů, jejichž počet se u různých druhů může měnit. Uspořádání zárodečných buněk se však mění v závislosti na kontrakci těla miracidia, proto tento znak není pro identifikaci zcela vhodný (Horák *et al.*, 2002; Simon-Martin a Simon-Vicente, 1999).

I přes přítomné mezidruhové rozdíly v morfologii těla miracidia nepředstavuje pro identifikaci ptačích schistosom významné stádium a není k tomu běžně využíváno. Je otázkou, zda by nebylo možné využít ultrastrukturu terebratoria pozorovanou skenovacím elektronovým mikroskopem, čehož bývá využito při identifikaci lidských druhů schistosom. Stejně jako v případě jiných stadií je potřeba do popisu nových druhů zařadit i miracidium. To však v mnoha původních popisech chybí.

Krev a sérum definitivních hostitelů

Kromě využití konkrétních stadií je možné detekovat parazita například i intravitálně v krvi a krevním séru hostitele. Z krve je získávána cirkulující DNA (circulating free DNA; cfDNA) ptačích schistosom (viz str. 19). Krevní sérum může být využito pro imunodiagnostické metody, které pracují na principu vazby protilátky s antigenem. Například metoda nepřímé imunofluorescence s využitím protilátek proti tzv. gut-associated antigenům (GAA), které jsou tvořeny pouze v přirozeném hostiteli, může být nápomocná při detekci nákazy ptačími schistosomami (Kouřilová a Kolářová, 2002). Pro možnost imunodiagnostiky byla testována i metoda ELISA a Western blot. Vhodnými pro tyto účely se jeví cercariální protilátky IgY (Turjanicová *et al.*, 2015). Tyto metody mají výhodu ve své sensitivitě, omezující však mohou být zkřížené reakce mezi protilátkami či antigeny různých druhů nejen ptačích schistosom.

1.2.3.3. Využití parazitární DNA

Pro přesnou a spolehlivou druhovou determinaci nejen ptačích schistosom je kombinace pozorování morfologie a molekulárně biologických metod. Pokud však nastane situace, kdy je

morfologie těla ptačích schistosom nepoužitelná kvůli nízké vysoké podobnosti, jsou molekulárně biologické metody nezbytné (Aldhoun *et al.*, 2009). Jejich podstatou je práce s DNA získanou z jakéhokoliv stadia ptačí schistosomy, případně může být ve formě environmentální nebo cirkulující DNA. Jsou to metody nenáročné na množství materiálu, kvalitní vzorek DNA je možné získat například pouze z fragmentů těl dospělých červů (Jouet *et al.*, 2009). Nově se rozvíjející metody dokonce pracují pouze s DNA uvolněnou například ve vodě (viz níže str. 19) a není tedy nutné nalézet a využít jedince ptačí schistosomy. Molekulárně biologické metody obvykle vykazují vysokou sensitivitu i specificitu. Omezujícím faktorem je čerstvost materiálu. V rozkládajícím se živočišném materiálu degraduje i parazitární DNA, je proto nutné použít jedince čerstvě izolované či vyloučené z hostitele, případně jedince z hostitelů, kteří byli krátce po úhynu zamrazeni (Jouet *et al.*, 2009; Nagy, 2010).

Druhová determinace ze stadií

Pro izolaci DNA přímo z ptačí schistosomy je možné využít všechna stadia. Po její izolaci a zvolení vhodných molekulárních markerů podle cílového úseku DNA, je parazitární DNA amplifikovaná prostřednictvím metody PCR (Polymerase Chain Reaction). Produkty bývají následně analyzovány na gelové elektroforéze a pro konkrétní identifikaci jsou podrobeny sekvenaci. Výsledné sekvence jsou pak porovnány s referenčními sekvencemi ve veřejně dostupných databázích (např. GenBank - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Pro tyto účely je často využívána oblast Internal Transcribed Spacer ribozomální DNA (ITS rDNA), která zahrnuje částečnou sekvenci ribozomální podjednotky 18S, celou podjednotku ITS1, 5.8S a ITS2 a částečnou sekvenci 28S (Dvořák *et al.*, 2002). Využíván je také gen pro cytochromoxidázu I (COI) (Lockyer *et al.*, 2003; Lopatkin *et al.*, 2010; Prüter *et al.*, 2017) nebo tandemově repetitivní sekvence, která je pro ptačí schistosomy označena ToSau3A (Hertel *et al.*, 2002; Schets *et al.*, 2010; Schets *et al.*, 2008). Dvořák *et al.* (2002) navrhl pro ITS oblasti specifické primery a oblasti ITS1, 5.8S a ITS2 byly využity pro rozlišení druhů *T. szidati*, *T. regenti* a *T. franki* a jejich genetickou analýzu. U druhu *T. franki* je dokonce tak vysoká genetická vnitrodruhová variabilita mezi jedinci získanými z různých druhů mezihostitelů, že může být ITS využito k rozlišení různých haplotypů (Jouet *et al.*, 2010). Obecně je nejvhodnější používat při sekvenaci DNA oblast ITS, která je pro ptačí schistosomy v databázi GenBank zastoupena nejvíce a není tak problém s porovnáním získaných sekvencí vlastní analýzou s těmi v databázi (Dvořák *et al.*, 2012; Kane a Rollinson, 1994; Rudolfová *et al.*, 2005). Gen pro COI je v rámci druhu vysoce konzervativní a je vhodným markerem například pro fylogenetické analýzy (Jouet *et al.*, 2010). Jeho zastoupení v GenBank je však výrazně menší než u ITS. Tandemově repetitivní sekvence Sau3 vykazuje nízkou mezidruhovou variabilitu a její využití je tedy vhodné spíše pro determinaci rodu.

Druhová determinace na základě environmentální DNA

Kromě izolace DNA přímo z těl parazitů je možné využít i jeho zbytkovou DNA z prostředí. V současné době začíná být pozornost zaměřena na metody využívající environmentální DNA (eDNA), která se do vody dostává například díky výměškům cercárií či po jejich úhynu, je získávána především ze vzorků vody, kde se sledované organismy vyskytují. To je výhodou oproti metodám, při nichž je nutný zdlouhavý sběr jedinců ptačích cercárií. Nevýhodou může být její rychlý rozklad ve vodě. Ten je zpomalen, je-li DNA zachycena v sedimentu (Buxton *et al.*, 2018). Monitoring za využití parazitární eDNA je dnes často prováděn v případě lidských druhů schistosom, pro ptačí schistosomy byl tento přístup zaveden teprve nedávno. Schets *et al.* (2008, 2010) detekovali DNA ptačích schistosom ve vzorcích vody z rybníků za využití tandemově repetitivní sekvence DNA ToSau3A prostřednictvím klasické PCR metody a sekvenace amplifikované DNA. V současné době je pro analýzu eDNA nejčastěji využívána metoda real-time PCR, která v porovnání s klasickou PCR metodou umožňuje rychlejší analýzu. Při této metodě se na amplifikovanou DNA vážou fluorescenční sondy a je tedy možné ji sledovat v reálném čase (Bustin *et al.*, 2005). V případě ptačích schistosom byla real-time PCR na vzorcích vody poprvé použita Jothikumarem *et al.* (2015) na jezerech, kde byly dříve zaznamenány případy CD, dále ji s pozitivním výsledkem použil například Rudko *et al.* (2019). Nyní se na trhu objevují již první komerční kity pro detekci eDNA *Trichobilharzia* sp. prostřednictvím real-timePCR (Sylphium). To do budoucna umožní rychlé vyšetření vody na eDNA ptačích schistosom rodu *Trichobilharzia*.

Druhová determinace na základě volná cirkulující DNA

CfDNA se vyskytuje v tělních tekutinách všech živočichů a při využití pro identifikaci je podrobena klasickému postupu (izolace → amplifikace → sekvenace). Pro schistosomy (a obecně pro krevní parazity) může být využití cfDNA užitečné z důvodu přímého kontaktu parazitů s krví hostitele. Ullah *et al.* (2020) použili tuto metodu pro detekci *Schistosoma japonicum* v séru králíků a myši za použití úseku ITS2 rDNA. V případě ptačích schistosom metodu využívající cfDNA využil Šteiger (2018), který detekoval DNA *T. szidati* a *T. regenti* v krevním séru kachen *Anas platyrhynchos* a dokonce *T. szidati* v séru lidí. Využitá může být hemolymfa plžů infikovaných ptačími schistosomami. Šteiger (2018) detekoval cfDNA v hemolymfě plžů infikovaných druhy ptačích schistosom *T. szidati* a *T. regenti*.

Druhová determinace založená na DNA barcodingu

Pro identifikaci různých druhů organismů je využíván DNA barcoding, který je založen na analýze krátkých úseků DNA. Ty jsou po amplifikaci pomocí PCR metod a sekvenaci porovnávány

s databází, kde jsou tyto krátké sekvence pro DNA barcoding uloženy. Vstupní materiál pro izolaci DNA může pocházet jak přímo z parazitů, tak je možné rovněž využít eDNA. Pro použití při identifikaci živočichů je nejčastěji využívána sekvence genu pro COI (Bass *et al.*, 2015). Pro identifikaci ptačích schistosom tuto metodu použil Rudko *et al.*, (2019), který tak determinoval druhy prostřednictvím DNA z miracidii a cercárií. Výhodou metody je její nenáročnost na typ vstupního materiálu. DNA barcoding zatím není pro ptačí schistosomy běžně využívaná metoda, proto její nevýhodou je relativně nízký počet dat v databázi.

1.1.2. Cercáriová dermatitida

Onemocnění zvané cercáriová dermatitida (CD) je alergická reakce způsobená průnikem cercárií některých druhů ptačích ale i savčích schistosom (včetně lidských) do kůže člověka (viz Obr. 7; Macháček *et al.*, 2018). Název CD se používá především v souvislosti s ptačími schistosomami. V anglicky psané literatuře se pro onemocnění vžilo také označení „swimmer’s itch“, setkat se můžeme i s dalšími variacemi jako například „schistosome dermatitis“ či „koganbyo“ (Cort, 1928; Hunter *et al.*, 1951). V případě ptačích schistosom transformované cercárie po penetraci kůže hynou (Kolářová *et al.*, 2012; Macháček *et al.*, 2018). Kolem uhynulých těl cercárií se vytváří zánět, což je doprovázeno intenzivně svědivou vyrážkou, která se obvykle objeví během několika hodin po napadení cercáriemi (Olivier, 1949). Prvním projevem cercáriové dermatitidy jsou makuly, které přibližně 10-15 hodin po nákaze střídají papuly. Na nich se 2-3 dny po nákaze objevují váčky naplněné tekutinou. Sedm dní po nákaze jsou viditelné už pouze strupy, později na kůži zůstávají dočasné pigmentované skvrny (Macháček *et al.*, 2018; Olivier. 1949). Vážné případy mohou doprovázet i další příznaky, mezi které patří například horečka, kašel, průjem či zvětšení spádových lymfatických uzlin. U naivního jedince napadeného cercáriemi ptačích schistosom bývají příznaky CD mírnější či chybí úplně, zatímco lidé s opakovanou nákazou mívají nástup reakce rychlejší a s každým dalším kontaktem s infekčními cercáriemi intenzivnější (Olivier, 1947; Kolářová *et al.*, 2012; Macháček *et al.*, 2018).



Obr. 7 – Cerkáriová dermatitida (upraveno dle Macháček *et al.*, 2018)

1.1.3. Ptačí schistosomy jako původci cercáriové dermatitidy ve světě

Druhy ptačích schistosom, které byly prokázány jako původci CD u lidí, patří do šesti rodů (Kolářová *et al.*, 1997; Kolářová, 2007; Horák *et al.*, 2015). Jejich výskyt je kosmopolitní s výjimkou Antarktidy (Lawton *et al.*, 2014). Cerkárie ptačích schistosom působící CD se mohou vyskytovat v prostředí se sladkou i slanou vodou. Mezi rody využívající pro svůj vývoj sladkovodní plže patří *Anserobilharzia*, která byla nalezena v Evropě, USA a Kanadě, *Bilharziella* vyskytující se pouze v Evropě a s CD nejčastěji spojovaný rod *Trichobilharzia* s nálezy po celém světě kromě Antarktidy. Druhy těchto ptačích schistosom využívají pro svůj vývoj sladkovodní plže především z čeledí Lymnaeidae a Planorbidae, méně pak Physidae. Jako definitivní hostitelé jim slouží nejčastěji vodní ptactvo řádu Anseriformes (vrubozobí), nálezy jsou však i z řádů Ciconiiformes (brodiví), Coraciiformes (srostloprstí), Gaviiformes (potáplice), Gruiformes (krátkokřídlí) a Podicipediformes (potápky), jejichž zástupci žijí v blízkosti vodních ploch. Zajímavé jsou záchyty ptačích schistosom z jedinců řádu Galliformes (hrabaví), a Passeriformes (pěvci), kteří obvykle nejsou vázáni na vodní prostředí (Horák *et al.*, 2015).

Mezi rody ptačích schistosom využívající mořské či brakické druhy plžů patří rod *Austroilharzia*, který byl nalezen v Africe, Austrálii, Asii a Severní i Jižní Americe a vyvíjí se v plžích čeledí Batillaridae, Littoriniidae, Nassariidae a Potamididae, a rod *Ornithobilharzia* s nálezy po celém světě a s mezihostitelskými plži čeledi Batillaridae. Oba tyto rody využívají jako definitivní hostitele ptáky řádu Charadriiformes (dlouhokřídlí).

Zajímavou přízpusobivost vykazuje kosmopolitně rozšířený rod *Gigantobilharzia*, který se může vyvíjet v plžích žijících ve sladké (plži čeledí Hydrobiidae, Physidae, Planorbidae a Thiaridae), mořské i brakické vodě (plži skupiny Opisthobranchia) (Grodhaus a Keh, 1958; Kolářová *et al.*, 1997; Rollinson a Chappel, 2001; Al-Kandari *et al.*, 2012; Kolářová *et al.*, 2012; Horák *et al.*, 2015).

Historie výskytu cercáriové dermatitidy sahá do roku 1887, kdy byly poprvé zaznamenány příznaky u lidí koupajících se v jezeře v Japonsku. Název onemocnění byl uveden jako koganbyo, nebyla však známa jeho příčina (Fujii, 1887, cit. Oda, 1973). V roce 1928 byly v Michiganském jezeře v USA jako původci onemocnění prokázány cercárie ptačích schistosom (Cort, 1928). Od té doby jsou případy cercáriové dermatitidy hlášeny z různých částí světa. První případy v Evropě jsou uváděny z britského města Cardiff (Matheson, 1930), z Německa (Vogel, 1930) a z Francie (Brumpt, 1931).

1.1.4. Ptačí schistosomy jako původci cercáriové dermatitidy v ČR

Rod *Trichobilharzia* nejčastěji působí CD i v České republice, přičemž nejčastěji nacházenými druhy jsou *T. franki*, *T. szidati* a *T. regenti*. Na našem území byl nalezen i druh *Bilharziella polonica* (Kolářová *et al.*, 1997; Rudolfová *et al.*, 2007) a zástupci rodu *Gigantobilharzia* (*G. vittensis*, *G. acotylea* a *Gigantobilharzia* sp.) (Sitko *et al.*, 2006; Aldhoun *et al.*, 2012). V ptačích v ČR byl nalezen druh *Ornithobilharzia canaliculata*, jehož cercárie jsou sice schopny působit CD, u nás však riziko nehrozí z důvodu absence vhodných mezihostitelů, kterými pro tento druh jsou mořské druhy plžů (Kolářová *et al.*, 1997). Druh *O. canaliculata* se k nám dostal pravděpodobně s migrujícími ptáky (rybáči).

První záznam cercáriové dermatitidy z České republiky, který je spojován přímo s cercáriemi ptačích schistosom, je z roku 1966 z rybníka Apollo u Břeclavi a rybníka Olšovec na Blansku (Hrubý, 1976). Do roku 1997 bylo zdokumentováno pouze několik případů tohoto onemocnění, poté se dostalo cercáriové dermatitidě a biologii ptačích schistosom větší pozornosti (Kolářová *et al.*, 1997). Přestože se CD u napadených lidí může projevovat různě závažnými problémy i značným nepohodlím, nepatří mezi život ohrožující onemocnění a není proto ani systematicky sledována. Aktuálně je výskyt CD na území ČR sledován kromě výzkumných institucí také Státním zdravotním ústavem (SZÚ) pomocí dotazníku umístěném od roku 2009 na webových stránkách (Kožíšek *et al.*; Pumann *et al.*, 2019). Od roku 2021 vyšla v platnost změna vyhlášky č. 238/2011 Sb. a norma ČSN 75 7737, na jejichž základě budou pracovníci hygienických stanic monitorovat CD povinně a je tedy pravděpodobné, že se v budoucnu bude počet záznamů CD zvyšovat.

1.3. Faktory ovlivňující výskyt ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy

V rámci výzkumů zabývajících se výskytem ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy je pozornost zaměřena i na faktory, které jejich výskyt na lokalitách mohou ovlivňovat. Ty jsou zároveň sledovány i pro účely předkládané diplomové práce. Jde o mnohorozměrný problém, v němž hrají důležitou roli abiotické a biotické faktory, primárně ovlivňující výskyt a početnost mezihostitelů a definitivních hostitelů, jejichž přítomnost je základním předpokladem pro výskyt parazita. Neméně důležitý je i samotný parazit a jeho druhová specifika.

V případě CD je povědomí o jejím výskytu limitováno rozpoznáním a nahlášením klinických příznaků u napadených lidí. To je ovlivněno osvětou laické veřejnosti, která v případě povědomí o problematice CD případy aktivně hlásí například prostřednictvím dotazníku umístěného na webových stránkách SZÚ. Osvěta souvisí také s informovaností lidí o nejrizikovějších vodních plochách.

1.3.1. Faktory spojené s výskytem mezihostitelských plžů

Výskyt cercárií na konkrétní lokalitě závisí primárně na aktuální přítomnosti nakažených plžů. Faktory ovlivňující výskyt mezihostitelských plžů mohou být abiotického i biotického charakteru (Yigezu *et al.*, 2018).

Abiotické faktory

Jedním z takových faktorů související s intenzitou slunečního svitu může být zastínění vodní plochy okolní vegetací. Vodní plži se vyskytují spíše ve vodách méně zastíněných, kde díky slunečným světlu, které proniká k vodním rostlinám, vznikají příznivé podmínky pro růst perifytonu (přisedlé řasy a biofilm). Ten je pak součástí potravy plžů (Camara *et al.*, 2012; Yigezu *et al.*, 2018).

Teplota vody patří rovněž mezi základní faktory ovlivňující vodní plže. Je to faktor, který je proměnlivý jak během roku, tak i během dne. Teplota má vliv především na růst vodních plžů, rozmnožování a v případě infekce motolicemi i na schopnost vylučování a vývoje cercárií (Al-Jubury *et al.*, 2020; Schalie a Berry, 1973). Ovlivnění konkrétními teplotami se liší pro plže vyskytující se v různých oblastech světa. Pro ty žijící v tropech a subtropích bylo pozorováno teplotní optimum pro přežívání a růst mezi 30 a 35 °C (Parashar a Rao, 1988). Naopak u plžů vyskytujících se v našich podmínkách je to přibližně mezi 18 a 25 °C (Schalie a Berry, 1973). Teplotní preference se však mohou lišit u různých druhů se stejným rozšířením. Například pro plže *P. corneus* byla optimální teplota pro růst 20,5 °C, pro druh *P. planorbis* to bylo 19 °C. Minimální teplota pro růst planorbidních plžů je 5 °C, při které druh *P. corneus* roste velmi pomalu, druh *P. planorbis* téměř vůbec, zatímco horní hranice je pravděpodobně 25 °C (Costil, 1993).

S teplotou se pojí i množství rozpuštěného kyslíku ve vodě. Plicnatí plži dýchají vzdušný a jsou tedy tolerantnější k hypoxii než předožábří, kteří k životu kyslík ve vodě potřebují (Brown *et al.*, 1998). Při nízké koncentraci kyslíku ve vodě plicnatí plži častěji vyplouvají k hladině pro čerpání kyslíku, přičemž bylo pozorováno, že u plžů čeledi Physidae jsou tyto výstupy k hladině četnější než u čeledi Planorbidae (Koopman *et al.*, 2016).

Faktorem ovlivňujícím život vodních plžů je i pH vody, které se obvykle v rámci lokality příliš nemění. Vodní plži jsou vysoce citliví k pH vody, ve které žijí. Optimální hodnota pH pro

většinu sladkovodních plžů je v rozmezí 6 až 9. Velmi nízké pH (4,6 – 4,7) má negativní vliv na vývoj, růst i rozmnožování plžů (Malek, 1958). Økland (1992) při svém výzkumu na kyselých jezerech zjistil, že pod pH 5,2 se již plži ve vodě nenachází. Druhy *P. planorbis* a *A. vortex* byli často nalézáni ve vodách kyselého (pH = 5 - 6,2) i neutrálního pH (7). V mírně kyselé vodě (pH ≥ 6) byl pozorován i druh *R. auricularia* či *P. corneus*, který se zároveň v menší míře vyskytoval i v neutrálním pH. Naopak vysoký počet jedinců druhu *P. acuta* byl pozorován v rybnících s pH 8,5. (Spyra, 2017).

Další faktor představuje typ (frakce) substrátu dna a litorálu, který různé druhy vodních plžů preferují. Často bývají preferovány nezapojené kameny. Na kamenitém dně byla nalézána například *P. acuta* (Böbneck, 2011). V rámci jiného výzkumu byli pozorováni jedinci druhů *Stagnicola catascopium* a *Physa* sp. se vyskytovaly převážně částech rybníka s balvanů (Leighton *et al.*, 2000). Naopak *L. stagnalis*, *R. auricularia* či *P. carinatus* se obvykle nachází na lokalitách s bahnitě-písčitém litorálem (Böbneck, 2011).

Biotické faktory

Mezi faktory biologického charakteru patří přítomnost predátorů vodních plžů ve vodních plochách, kterými mohou být vodní obratlovci, především ryby, či bezobratlí. Pro rod *Physella* byl pozorován jako přirozený predátor menší druh dravé ryby slunečnice pestré (*Lepomis gibbosus*), která má původ v Americe a Kanadě a v našich podmínkách se chová invazně. Při experimentech prováděných v uměle vytvořených jezírkách vykazovali plži *Physella* sp. antipredační chování, vyhledávali úkryt v substrátu (Turner, 1996). Mezi bezobratlé predátory vodních plžů patří například pijavky. Experimentálně byla zaznamenána predace čerstvě vylíhlých vodních plžů druhem pijavky *Glossiphonia complanata* (Brönmark, 1992). Obvyklým predátorem vodních plžů jsou také pijavky druhu *Haemopsis sanguisuga*. Potvrzena byla i schopnost predace vodních plžů mohutnatkou druhu *Sphaerodema urinator* (Younes *et al.*, 2016; Younes *et al.*, 2017). Jinými bezobratlými živočichy, u nichž byla prokázána schopnost predace vodních plžů malých velikostí, jsou například larvy šídla (Anisoptera), larvy motýlic (Zygoptera), bodule (Naucoridae) či potápníci (Dytiscidae). Predátoři vodní plže ovlivňují buď přímou predací, přičemž preferují infikované plže, nebo nepřímo pouze svou přítomností. To způsobí, že se plž stáhne do ulity a případně hledá úkryt pod kameny. V takovém stavu nemohou přijímat potravu, což vede k nižší rychlosti růstu jedinců a snížení dostupné energie pro vývoj cercárií (Cobbaert *et al.*, 2010; Haggerty *et al.*, 2020; Turner a Chislock, 2007).

Výskyt vodních plžů ovlivňuje také přítomnost vodních makrofyt, kteří v rostlinách zároveň hledají úkryt a slouží jim i jako podklad pro snůšky. Samotné vodní rostliny i perifyton rostoucí na jejich povrchu slouží jako potrava pro vodní plže. Například výzkum provedený v africkém státě

Senegal prokázal, že na vodních plochách s porosty růžkatce *Ceratophyllum* spp. je vyšší hustota vodních plžů druhů *Bulinus* spp. a *Biomphalaria pfeifferi*, kteří jsou zdrojem cercárií lidských schistosom, než tam, kde vodní vegetace přítomna nebyla (Haggerty *et al.*, 2020). Zároveň bylo zjištěno, že za přítomnosti *Ceratophyllum* spp. je zvýšena produkce cercárií na jednoho plže. Tyto rostliny s drobnými členitými listy se často vznášejí těsně pod hladinou, kde je dostatek světla pro růst perifytonu, kterým se vodní plži živí a jsou tedy v lepší kondici než ti, kteří žijí ve vodách s absencí perifytonu kvůli nedostatku ponořených makrofyt (Haggerty *et al.*, 2020; Underwood *et al.*, 1991). Přítomnost vodní vegetace ovlivňuje také lidská činnost (např. přítomnost skládky odpadu či zemědělství v blízkosti). Eutrofizace antropogenního původu, kdy je zvýšena koncentrace dusíku a fosforu ve vodě, má pozitivní vliv na růst rostlinné biomasy a tím vytváří vhodné podmínky nejen pro vodní plže, ale i vodní ptactvo, které je následně zdrojem miracidí ptačích schistosom pro plže (Johnson *et al.*, 2008; Soldánová *et al.*, 2013). Zároveň je podpořen růst vodních plžů a ti se tak díky své velikosti stávají odolnějšími vůči predátorům (Chase, *et al.*, 2003). Zvýšený výskyt plžů na místech ovlivněných lidskou činností může být také způsoben sníženou přítomností jiných druhů vodních živočichů, kteří by mohli být potenciálními predátory či kompetitivními druhy (Yigezu *et al.*, 2018; Younes *et al.*, 2017).

1.3.2. Faktory spojené s definitivními hostiteli

Pro zdárný vývoj ptačích schistosom jsou kromě mezihostitelů důležití i definitivní hostitelé. Alespoň občasná, přestože krátkodobá přítomnost ptačích definitivních hostitelů na lokalitě je nezbytná zejména pro dlouhodobé udržení ptačích schistosom. Ptáci produkují stadia zodpovědná za infekci mezihostitelských plžů a zároveň se zde mohou nakazit cercáriemi vylučovanými plži. Důležitější roli však představují jako hostitelé zodpovědní za šíření těchto parazitů na nová místa. Stěhovaví ptáci během roku migrují na velké vzdálenosti, a ani ti, kteří podobné cesty nepodstupují, obvykle nezůstávají během roku věrní pouze na jediné vodní ploše. K zanesení ptačích schistosom na novou (mnohdy značně vzdálenou) lokalitu je přítom dostatečný i jen krátkodobý pobyt jedince v patentní periodě na místě s vhodným spektrem mezihostitelských plžů (Brant a Loker, 2009). I ve vnitrozemských státech včetně České republiky je proto možné při pitvách definitivních hostitelů nalézt druhy ptačích schistosom (např. *Ornithobilharzia canaliculata* z rybáka *Sterna hirundo*) využívající ke svému vývoji pouze mořské druhy mezihostitelských plžů (Kolářová *et al.*, 1997). Vhodnou lokalitou například pro odpočinek migrujících ptáků je taková, která má z hlediska jejich migračních tras vhodnou pozici. Důležitá je rovněž hojnost a dobrá dostupnost potravy vodních ptáků.

Ptáci také preferují místa s klidnými oblastmi vhodnými pro jejich hnízdění, kde následně budou vhodné podmínky pro vyvedení mláďat. Více náchylní k infekci bývají mladí ptáci než dospělci, kteří již infekci ptačími schistosomami v minulosti prodělali a jejich imunita v případě reinfekce zasáhne (Van Bolhuis *et al.*, 2004; Guth *et al.*, 1979). To dokazuje například výzkum

v Michiganu, při němž byla patentní infekce potvrzena u 46,3 % nedospělých ptáků řádu Anseriformes, zatímco u dospělých byla prevalence 12 % (Guth *et al.*, 1979). Rizikovější z hlediska možnosti výskytu CD jsou tedy především lokality, kde vodní ptáci hnízdí.

Existují dosud neprokázané domněnky o tom, že i přímá interakce člověka s vodním ptactvem může ovlivnit přítomnost ptačích schistosom. Lidé běžně krmí především labutě a kachny přítomné na vodních plochách v městské zástavbě, což by mohlo mít za následek stahování ptactva z okolních lokalit (např. řek) a jejich setrvání na lokalitě, kde mají přísun krmiva od lidí, i během zimy. Zároveň se ptáci agregují u břehu v místě krmení, které je často i místem vstupu do vody pro rekreanty. Z trusu a z nosní sliznice ptáků se uvolňují miracidia, která infikují přítomné vodní plže a zvyšují tak jejich promořenost, a tedy i riziko výskytu CD na místech, kde se lidé koupou (Duras *et al.*, 2014).

Častější výskyt ptačích schistosom souvisí také s globálním oteplováním, které bývá dáno do souvislosti také se zvyšujícími se počty případů cercáriové dermatitidy. Tento jev má za následek přezimování jindy migrujícího ptactva v místě hnízdění po celý rok (Cotton, 2003). Zároveň je s oteplováním podpořen růst vodních makrofyt a řas, jež jsou zdrojem potravy pro vodní plže i ptactvo (Horák a Kolářová, 2011). Ptačí schistosomy tak mají oba potřebné hostitele k dispozici po celý rok a mohou vytvořit více generací (Mas-Coma *et al.*, 2009). Jejich schopnost infikovat hostitele však závisí na ročním období. Při nízké teplotě vody larvy přestávají být aktivní a pravděpodobnost infikování hostitele je nízká. V tomto ohledu mají výhodu cercárie, které mohou infikovat definitivního hostitele alimentární cestou, kdy pták v rámci obživy záměrně či spolu s rostlinnou potravou pozře i infikovaného plže (Pech, nepublikováno).

1.3.3. Faktory spojené s výskytem konkrétního druhu ptačí schistosomy

Výskyt ptačích schistosom a jejich udržení se na lokalitě ovlivňuje například hostitelská specifita. Ta je v případě mezihostitelů vysoká (viz dále), a je proto nutná přítomnost konkrétní skupiny či dokonce druhu vodních plžů na lokalitě. Naopak druhové spektrum definitivních hostitelů přítomných na lokalitě je pro ptačí schistosomy obvykle méně omezující. V definitivním hostiteli mohou některé ptačí schistosomy díky své dlouhověkosti přežívat velmi dlouho a za přítomnosti vhodných mezihostitelů tak mohou na lokalitě cyklovat i po několik let (Brant a Loker, 2013). Pro udržení životního cyklu na lokalitě, ale také pro výskyt a intenzitu cercáriové dermatitidy je důležité množství vylučovaných cercárií z mezihostitelských plžů. To je v případě druhů obývajících velké druhy plžů velmi vysoké, například *T. szidati* vyvíjející se v plžích druhu *L. stagnalis* mohou za den vyprodukovat i více než 26000 cercárií (Soldánová *et al.*, 2016). Pro možnost výskytu CD je pak zásadní, zda přítomný druh ptačí schistosomy je schopný penetrace lidské kůže.

1.3.4. Faktory ovlivňující výskyt cercáriové dermatitidy

Informace o výskytu CD jsou vázány na koupající se osoby, které byly tímto onemocněním postiženy a situaci se zároveň rozhodly řešit s lékaři, hygienickými stanicemi nebo zdravotními ústavy. Jde zejména o závažnější případy objevující se u citlivých osob, nebo u lidí kteří onemocnění již v minulosti prodělaly a jejich imunitní systém zasahuje proti cercáriím v kůži rychleji než u naivních (Horák a Kolářová, 2001; Macháček *et al.*, 2018). Mnoho případů především lehčí povahy onemocnění pozornosti uniká.

Na intenzitu napadení kůže cercáriemi ptačích schistosom má vliv chování lidí a čas strávený ve vodě. Vyšší šance nákazy je především u lidí, kteří tráví čas ve vodě plaváním či broděním, a to především v místech se zvýšeným výskytem vodních plžů (typicky pásma litorálu s ponořenými či částečně ponořenými makrofyty a pozvolna se svažujícím dnem, kde jsou vyšší teploty vody). Kromě rekreatů byli také zaznamenány nákazy lidí provozujících vodní sport (Duras, 2014), poměrně často bývají napadené i osoby, jejichž náplň povolání pobyt v litorálu vodní plochy přímo vyžaduje. V tropech to jsou obvykle rybáři či farmáři pěstující například rýži (Chvátalová *et al.*, 2013; Savitri *et al.*, 2017), v našich podmínkách se s CD při výkonu povolání setkávají zejména lidé provádějící hydrologický, botanický či faunistický průzkum, výjimkou nejsou ani případy, kdy byli CD postiženi i pracovníci kontrolující (zejména v letních měsících) kvalitu vody v nádrži či plavčící na přírodních koupalištích.

Z hlediska CD jsou nejrizikovější letní měsíce, kdy je větší část dne světlo, je teplé počasí a teplejší než v jiných obdobích je i voda, což vytváří ideální podmínky nejen k pobytu velkého množství lidí u vody, ale i pro výskyt vodních plžů v blízkosti břehů a produkci cercárií (Valdovinos a Balboa, 2008). Významnou roli hraje také denní doba. Nejvíce jsou cercárie ptačích schistosom uvolňovány v ranních a dopoledních hodinách, kdy na hladinu začíná dopadat sluneční světlo. V kombinaci s omezenou délkou života cercárií v ohřívající se vodě to může vést i ke sníženému riziku CD při koupání ve večerních hodinách. To bylo potvrzeno výzkumem na jezeře v Michiganu, kde v časovém rozmezí od 8 do 10 hodin a od 10 do 14 hodin byla zaznamenána vyšší incidence CD než ve večerních hodinách od 18 do 20 hodin (Verbrugge *et al.*, 2004). Tato situace však mohla být způsobena vyšším počtem lidí na lokalitě v dopoledních a odpoledních hodinách.

Výskyt CD na lokalitách může ovlivňovat i vítr. Působením větru, který může cercárie přichycené k povrchové blance na vodní hladině zanést i několik kilometrů od místa, kde byly vyloučeny, se však CD může objevit i tam, kde se v blízkosti místa infekce lidí vodní plži nevyskytují (Leighton *et al.*, 2000; Verbrugge *et al.*, 2004). Bez ohledu na části litorálu s nebo bez potvrzené přítomnosti plžů se tak stává výrazně rizikovým místem pro infekci CD stává návětrná strana vodní plochy. Vliv má přitom i rychlost větru. Vyšší pravděpodobnost nákazy CD nastává při slabém větru

než při vanutí větru vysokou rychlostí (Skrabulis *et al.*, 2020). Je však otázkou, zda tento jev není způsobem nižší koncentrací lidí a kratšího času stráveného ve vodě za větrného počasí.

V poslední době se pozornost některých vědeckých týmů obrací k často přehlíženému faktu, že cercárie mohou stejně tak jako jiné vodní organismy sloužit jako potrava pro predátory a filtrátory, pro které jsou atraktivní kořisti díky jejich vysokým zásobám gylokogenu. Predátory mohou být různé bezobratlí či malé druhy ryb (Kaplan *et al.*, 2009; Morley, 2012; Rohr *et al.*, 2015). Přítomnost a početnost takovýchto organismů ve vodě může snížit množství cercárií ve vodě, což by mohlo negativně ovlivnit i pravděpodobnost vzniku cercáriové dermatitidy. Tyto informace mohou být využity v managementu vodní plochy, na kterou mohou v rámci omezení výskytu CD nasadit potenciální tyto predátory a filtrátory jako biologickou zbraň proti cercáriím.

1.4. Opatření využívaná při snaze o kontrolu CD

1.4.1. Zásahy na úrovni mezihostitelského plže

Redukce vodních plžů na vodních plochách určených k rekreaci lidí může být uskutečňována například sečením ponořené vodní vegetace, na které jsou plži přichyceni. K tomu je například na Velkém Boleveckém rybníce v Plzni využíván harvestor, jenž každý od jara do podzimu napomáhá redukci veduce vegetace (Duras *et al.*, 2013). Jiným možným opatřením, kterého je využíváno, je trávení vodních plžů síranem měďnatým či jinými chemikáliemi obsahujícími pro plže jedovatou měď (Brackett, 1939; McMullen a Brackett, 1948; Horák *et al.*, 2002). Při tomto přístupu však nastává problém hromadění mědi ve vodě, a kromě vodních plžů může tak způsobovat úhyn dalších organismů a činit tak vodní plochu nevhodnou ke koupání lidí. Zároveň byla zjištěna částečná rezistence vodních plžů k síranu měďnatému (Blankespoor *et al.*, 1985; Horák *et al.*, 2002). Plži mohou být redukováni také přímou mechanickou likvidací za použití bran či rotačních kultivátorů, které taženy traktorem či člunem a rozrývají tak dno ve vodní ploše. Aplikace tohoto přístupu vedla k redukci CD například na jezeře Annecy ve Francii či Cultus v Kanadě (Léger, 2008; Leighton *et al.*, 2000). Možnou alternativou je ruční sbírání plžů z vegetace, kamenů, spadáných větví či kůry z okolních stromů apod. (Graefe *et al.*, 1973) Je však otázkou, do jaké míry je toto opatření účinné, protože kompletní vysbírání plžů z vodní plochy je prakticky nemožné. Testována byla také možnost redukce sporocyst ptačích schistosom vyvíjející se v hepatopankreatu plže nasazením antagonistických druhů motolic, jejichž vývojové stadium redie je dravé, a kromě hepatopankreatu plže, v němž se rovněž vyvíjí, se živí i právě larvami jiných druhů přítomných ve stejném plži. Toho bylo využito například za použití echinostomních motolic požírajících sporocysty ptačích schistosom (Basch a DiConza, 1975; Lie a Owyang, 1973; Lim a Heyneman, 1972).

1.4.2. Zásahy na úrovni definitivního hostitele

Opatření využívaná ke kontrole CD na lokalitách se mohou pojit i s vodním ptactvem, z něhož jsou vylučována vajíčka či miracidia ptačích schistosom. Doporučováno například bývá lov či zastrasování vodních ptáků. To však nelze praktikovat za každých okolností – například v průběhu rekreační sezóny (Soldánová *et al.*, 2013). Návštěvníci přírodních koupacích vodních ploch také často přítomné vodní ptáky krmí a ti se tak stahují na místa, kde se lidé koupou. Na lokalitách se proto často můžeme setkat s informační tabulí o cercáriové dermatitidě a žádostí o nekrmení vodního ptactva (Soldánová *et al.*, 2013). Použita může být i léčba vodních ptáků anthelmintiky (praziquantel), která se ukázala být funkčním prostředkem na jezerech v Michiganu (Blankespoor a Reimink, 1991).

1.4.3. Zásahy na úrovni CD

Samotní návštěvníci koupacích vodních ploch se mohou chránit speciálními repelentními krémy či krémy s obsahem niklosamidu. Tato ochrana však není stoprocentní, a i přes aplikaci krémů se CD objevit může (Chamot, 1998; Wulff *et al.*, 2007). Nejlepším opatřením, jak se CD vyhnout, je nekoupat se ve vodě s výskytem ptačích schistosom, a to především v ranních hodinách, kdy je výskyt cercárií nejpravděpodobnější (viz kap. 1.3.4.).

1.5. Dosavadní poznatky o druhu *Trichobilharzia filiformis*

I dnes jsou stále nacházeny nové druhy ptačích schistosom, které často nejsou popsány, protože jsou známy pouze z některých stadií. Jedním takovým druhem je *Trichobilharzia filiformis*. Ten je známý již od roku 1938, kdy byl popsán jako druh *Pseudobilharziella filiformis* (Szidat, 1938). Byl nalezen v labutích velkých (*Cygnus olor*), kde se nacházeli dospělci a vajíčka. Dospělci *T. filiformis* se nachází v cévách tenkého střeva a slepých střev. Jejich tělo se podobá ostatním druhům ptačích schistosom rodu *Trichobilharzia*. Samci mají filiformní tvar těla se subterminálně uloženou ústní přísavkou na předním konci. *Canalis gynaecophorus* je dlouhý 0,39 mm. Rozvětvení střeva u samců je před vyústěním pohlavní soustavy. Oválná varlata má uspořádána za sebou. Zadní konec těla je rozšířený. Tělo samic je rovněž filiformní s rozšířeným zadním koncem, přední část těla zatím nebyla nalezena (Szidat, 1938). Vajíčka *T. filiformis* byla nacházena ve střevním epitelu, kde se nachází mezi střevními klky, ne však ve stěně střeva. Typické jsou shluky velkého vajíček ve střevě. V průběhu vývoje miracidia vajíčka rostou (Szidat, 1938). V souvislosti s *T. filiformis* byly zaznamenány patologie u labutí (*C. olor*) a to především záněty ve stěnách střevních cév, či histologické léze ve stěně střeva, v játrech a plicích. Kolem vajíček se ve stěnách střeva vytváří granulomy, totéž bylo zaznamenáno i v plicích (van Bolhuis *et al.*, 2004). Z literatury jsou známa tedy pouze stadia z definitivního hostitele, žádný záznam o cercáriích a mezihostitelích *T. filiformis* zatím není znám.

2. METODIKA

2.1. Monitoring ptačích schistosom v České republice

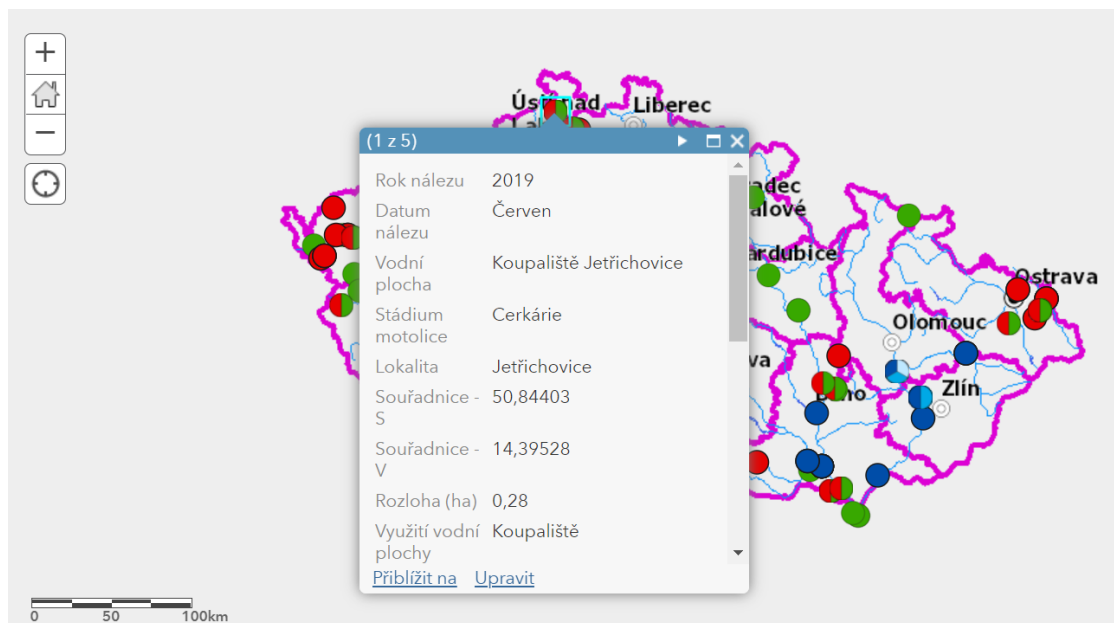
Monitoring ptačích schistosom na území ČR v pojetí předkládané diplomové práce zahrnuje sledování výskytu všech stadií těchto motolic z definitivních hostitelů i mezihostitelů, ale i údajů o výskytu cercárie dermatitidy u lidí. Sloučením dostupných dat z minulosti s výsledky vlastního šetření ukončeného k září roku 2020 vznikla souhrnná databáze umožňující sestavení interaktivní online mapy poskytující přehled o výskytu ptačích schistosom a cercárie dermatitidy od počátku sledování až do současnosti. S narůstajícím zájmem o problematiku cercárie dermatitidy ze strany hygienických stanic, zdravotních ústavů, provozovatelů koupališť i ostatní veřejnosti byla vytvořena přehledová mapa vycházející z této databáze, která je umístěna na webových stránkách helmintologického týmu (www.helminthology.cz). Do budoucna je uvažováno i o zpřístupnění celého kompilátu v interaktivní podobě veřejnosti, v současnosti je dostupná pouze na vyžádání.

2.1.1. Zdrojová data

Data pro přehledovou i interaktivní mapu byla čerpána především z vědeckých článků, závěrečných prací studentů vysokých škol a vlastních sběrů vzorků na lokalitách (viz kap. 2.3.1.). V rámci terénních výjezdů byly voleny lokality, kde byly paraziti již dříve zaznamenáni ať už přímo (nálezy stádií ptačích schistosom) či nepřímo (případy cercárie dermatitidy), dále na lokality s podezřením na výskyt ptačích schistosom případně na lokality v okolí míst s potvrzeným výskytem ptačích motolic. Mnoho dat bylo posbíráno i boveveckých rybnících v Plzni, na které byla část práce zaměřena z důvodu studia faktorů ovlivňujících výskyt ptačích schistosom (viz kap. 2.2.). V některých případech šlo o výjezd na žádost provozovatele koupaliště, majitele vodní plochy či pracovníků hygienických stanic. Pro zmapování výskytu ptačích schistosom a CD sloužily také nálezy ptačích schistosom z pitev uhynulého vodního ptactva nalezeného v blízkosti, nebo přímo na konkrétních vodních nádržích. Informace o nalezených plících pozitivních na ptačí schistosomy nebo na podezření na cercárie dermatitidu u koupajících se lidí nám byly poskytovány rovněž pracovníky zdravotních ústavů a hygienických stanic, kteří na lokalitách (obvykle oficiálních koupalištích) prováděli vlastní šetření. Méně důvěryhodným zdrojem dat pak byly novinové články informující o nákaze cercáriemi v konkrétních koupacích vodách.

Různá forma, rozsah i důvěryhodnost zdrojové informace vyžadovala, aby byl u každého záznamu pro bod v mapě uveden zdroj informace, na základě kterého mohou i sami uživatelé mapy posoudit spolehlivost záznamů. Získaná data zahrnující datum nálezu, název vodní plochy i lokality, v níž se nachází, souřadnice, využití vodní plochy, výskyt CD, druh a stadium nalezené ptačí schistosomy a způsob jejího určení, hostitele, pozorovanou vegetaci a přítomné živočichy, typ litorálu a zdroje záznamů byla zanesena do tabulek v programu MS Excel a sloužila jako templát pro

vytvoření bodů v interaktivní mapě i mapách přehledových (viz dále kap. 2.1.2). Po rozkliknutí každého z bodů ve výsledné mapě se uživateli zobrazí tabulka zahrnující všechny údaje uvedené v původní excelovské tabulce, přičemž pro každý záznam (např. z různých let nebo sběrů) existuje jeden list tabulky (viz Obr. 8).



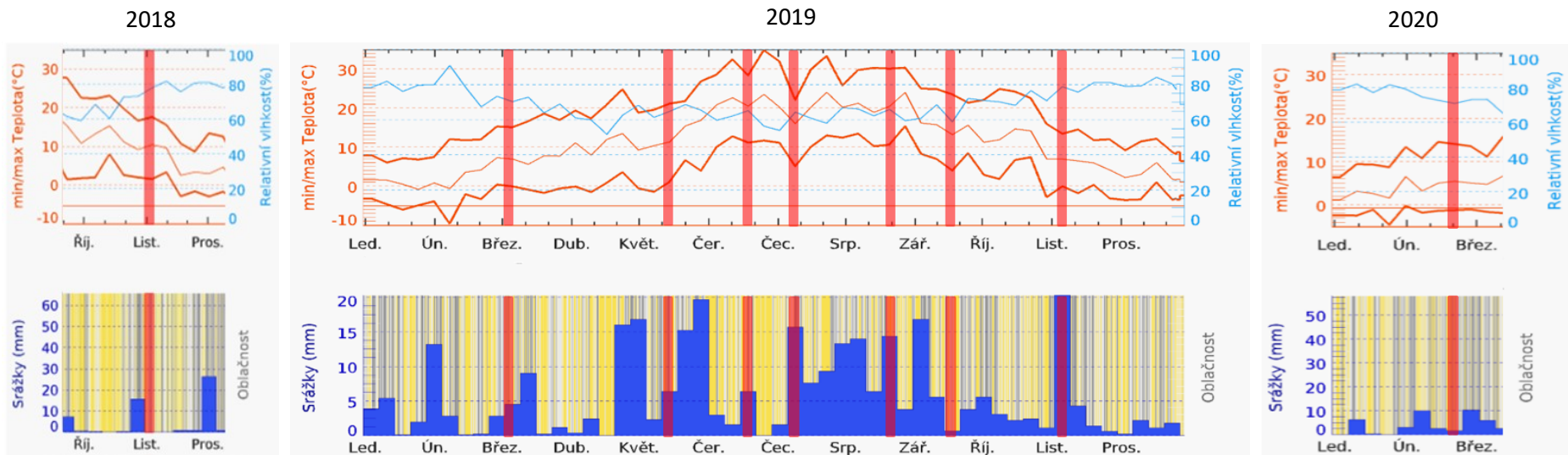
Obr. 8 – Vzorová tabulka zobrazená po rozkliknutí bodu v interaktivní mapě v programu ArcGIS Online se záznamy ptačích schistosom a CD v České republice z let 1960-2020

2.1.2. Práce v programu ArcGIS Online

Pro tvorbu interaktivní mapy byl využit program ArcGIS Online (<https://www.arcgis.com/index.html>), do kterého byly z Geoportálu ČÚZK (Český úřad zeměměřický a katastrální) vloženy mapy České republiky s hranicemi krajů a okresů, názvy měst a vodstvo ČR. Zdrojová data z MS Excel byla převedena do formátu TXT (textový dokument). Takto vytvořené dokumenty byly nahrány do ArcGIS Online. Podle souřadnic uvedených u dat v tabulkách byly v mapě automaticky rozmístěny body zobrazující konkrétní nálezy. Jednotlivým stádiím a CD byla přiřazena barva, která je zároveň reprezentuje v legendě. Pro lokality s výskytem více různých stádií případně CD spolu s minimálně jedním stádiem parazita byly vytvořeny v grafickém editoru GIMP 2.10.8 bodové znaky rozdělené na výseče tvořené různými barvami podle již zvolených barev pro stádia a CD.

2.2. Sledování faktorů ovlivňujících výskyt ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy

Pravděpodobnost výskytu ptačích schistosom, případně projevů cercáriové dermatitidy je ovlivněna mnoha okolnostmi. Kvůli druhové rozmanitosti ptačích schistosom i jejich možných hostitelů zatím není možné stanovit obecně platný klíč pro spolehlivé rozpoznání rizikových lokalit. Pro lepší porozumění pravděpodobnosti výskytu ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy však byla pro účely diplomové práce zvolena modelová lokalita s více vodními tělesy na malém území, na které po dobu od konce října 2018 do konce února 2020 probíhal terénní výzkum (viz kap. 2.2.1.). V průběhu celého roku byly na jednotlivých vodních plochách sledovány vybrané faktory biotického i abiotického charakteru (viz kap. 2.2.2.), u kterých následně proběhlo hodnocení vlivu na výskyt ptačích schistosom. V období od června do září, kdy bývá teplé a slunné počasí, byly výjezdy na terénní sběry uskutečňovány každý měsíc, v chladnějších měsících s nižší pravděpodobností výskytu vodních plžů a zároveň z důvodu zamrznutí rybníků v zimních měsících pouze 1x v každém období (jaro, podzim, zima). Celkem proběhlo devět výjezdů, každý v rozmezí max. 5 dní, které zahrnovaly sběr dat z celkem osmi rybníků, které jsou součástí jediné rybníční soustavy. Jednotlivé výjezdy jsou vyznačeny na grafech v Obr. 9, kde jsou zároveň patrné i teploty či srážky.



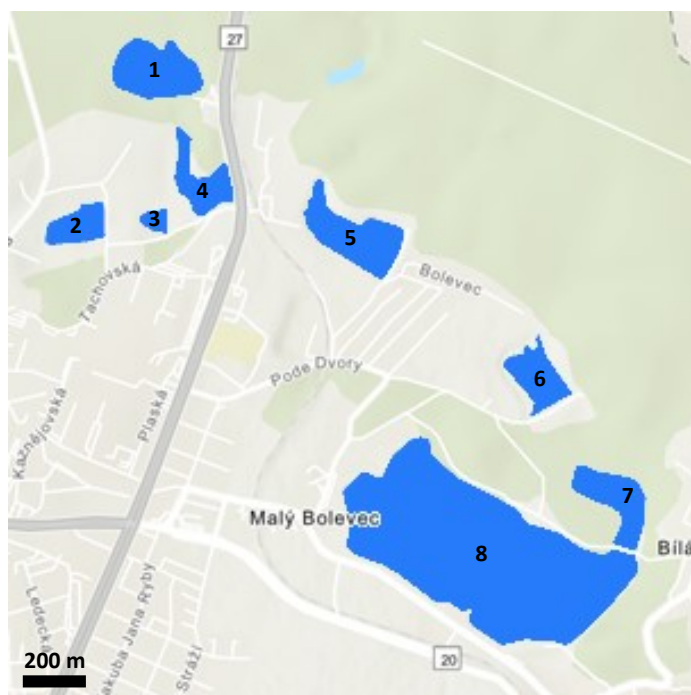
Obr. 9 – Grafy počasí se zobrazením jednotlivých výjezdů (svíslé červené pruhy) na rybníky Bolevecké rybníční soustavy v průběhu sledovaného období. Vrchní grafy zobrazují minimální, maximální a průměrnou teplotu a relativní vlhkost, na spodních grafech je zobrazeno množství srážek a oblačnost. Grafy upraveny dle: <https://www.meteoblue.com/>

2.2.1. Modelová lokalita

Vhodná modelová lokalita byla vybrána na základě následujících kritérií:

- vzájemná poloha rybníků – upřednostněna byla ucelená soustava rybníků na malé ploše, s předpokladem stejného podloží i stejných klimatických podmínek během každého sběru.
- možnost provést sběry na rybnících a zpracovat materiál v krátkém časovém úseku
- potřebné zázemí pro co nejrychlejší zpracování plžů na místě
- možnost získat informace o historii rybníků, jejich managementu, plánovaných zásazích, rybí obsádce, využití pro rekreaci apod. od jejich správců
- přítomnost vodního ptactva a vodních plžů
- výskyt cercáriové dermatitidy na lokalitě v minulosti

Po posouzení těchto kritérií byla pro výzkum zvolena plzeňská Bolevecká rybníční soustava (vzdálenost od Prahy 92 km), jejíž rybníky (Šídlůvský, Nováček, Třemošenský, Senecký, Košinář, Malý a Velký Bolevecký) se nacházejí na ploše 2 km² a propojuje je Bolevecký potok. V bezprostřední blízkosti soustavy, nicméně mimo samotnou kaskádu spojenou Boleveckým potokem, se nachází Kamenný rybník, který byl do výzkumu rovněž zařazen pro porovnání výsledků s ostatními rybníky. Celá rybníční soustava je veřejně přístupná a spadá pod Správu veřejného statku města Plzeň (www.svsmp.cz). Podle dostupných informací je většina rybníků v čele s největším Velkým Boleveckým využívána především k rekreaci a z hlediska cercáriové dermatitidy pro nás tedy představují hodnotné lokality. Zároveň mají funkci rybochovnou, přičemž obsádky jsou regulovány na všech rybnících kromě Kamenného, který nebyl od r. 1996 loven z důvodu blízkosti přírodní rezervace s chráněnými rostlinami. Z důvodu vypuštění rybníka nebyl výzkum na rybníku Košinář proveden v období od května do září 2019. Soustava rybníků je zobrazena na Obr. 10 a charakteristiky rybníků v Tab. 3.

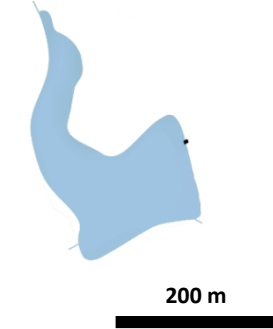
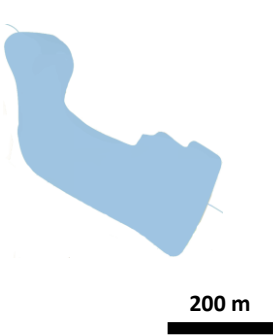
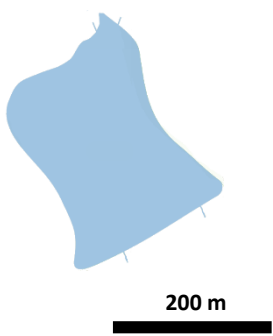
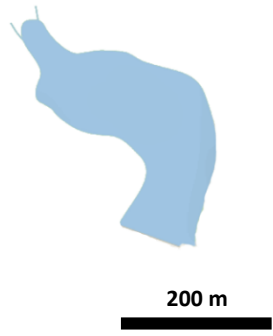
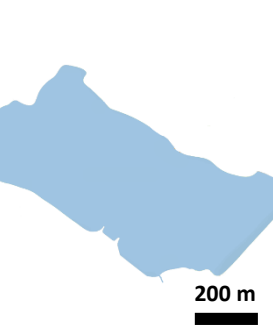


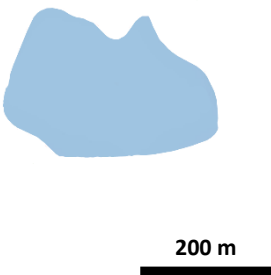
Obr. 10 – Bolevecká rybníční soustava v Plzni zvolená výzkum faktorů ovlivňujících výskyt ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy. Plochy rybníků jsou zvýrazněné modře.

Legenda: 1 – Kamenný rybník, 2 – Šídlovský rybník, 3 – Nováček, 4 – Třemošenský rybník, 5 – Senecký rybník, 6 – Košinář, 7 – Malý Bolevecký rybník, 8 – Velký Bolevecký rybník

Tab. 3 – Charakteristika jednotlivých rybníků Bolevecké rybníční soustavy.

Název	Charakteristika	Silueta
Šídlovský rybník	<p>Rozloha: 2,9 ha</p> <p>Využití: rekreace, chov ryb</p> <p>Charakteristika: bez ponořené vegetace, ryby: kapr, amur, štika; v roce 2019 částečné vypuštění bez výlovu</p> <p>- přítomnost kachen</p>	<p>200 m</p>
Nováček	<p>Rozloha: 0,88 ha</p> <p>Využití: retence vody a krajínovorná funkce, chov ryb</p> <p>Charakteristika: v minulosti rybník s porosty jmnolistých rostlin → vypuštění, nasazení velkých ryb (kapr, amur) → bez jmnolistých rostlin</p> <p>- přítomnost labutí, kachen</p>	<p>100 m</p>

<p>Třemošenský rybník</p>	<p>Rozloha: 3,26 ha Využití: rekreace, chov ryb Charakteristika: vypuštění v roce 2016 → růst ponořených jemnolistých rostlin → nasazení ryb kapr, amur) → redukce rostlin - přítomnost labutí, kachen</p>	
<p>Senecký rybník</p>	<p>Rozloha: 7,42 ha Využití: rekreace, chov ryb Charakteristika: odbahnění v roce 2016 → od té doby klesá pH (až na 4,19); problém se znovunapuštěním - přítomnost labutí, kachen</p>	
<p>Košinář</p>	<p>Rozloha: 6,38 ha Využití: rekreace, chov ryb Charakteristika: rákosí ze dvou stran, v dubnu roku 2019 vypuštěn → problém se znovunapuštěním</p>	
<p>Malý Bolevecký rybník</p>	<p>Rozloha: 4,2 ha Využití: rekreace, chov ryb Charakteristika: obklopen rákosím, hladina v létě pokryta stulíkem, každoroční výlov ryb el. agregátem - přítomnost labutí, kachen, volavek</p>	
<p>Velký Bolevecký rybník</p>	<p>Rozloha: 53.3 ha Využití: rekreace, chov ryb Charakteristika: hlavní rekreační rybník; v minulosti špatná kvalita vody → snaha o zlepšení → redukce ryb, nasazení dravých ryb → růst jemnolistých ponořených rostlin → kosení; každoroční odlov ryb el. agregátem - přítomnost labutí, kachen, lysek, kormoránů apod.</p>	

<p>Kamenný rybník</p>	<p>Rozloha: 5,2 ha Využití: rekreace, chov ryb Charakteristika: lokalizován u rašeliniště, proto má odlišnou kvalitu vody od ostatních; bez ponořených rostlin, ze dvou stran obklopen rákosím, ryby: bílá ryba i dravci</p>	
------------------------------	---	--

2.2.2. Měření a sledování hydro/biologických parametrů prostředí

Na boleveckých rybnících byly zaznamenávány hodnoty pH, vodivosti, teploty a chlorofylu a za použití kombinovaného pH metru (pH/EC/TDS/T Combo tester, Hanna Instruments) a fluorometru (AquaFluor Handheld Fluorometer/Turbidimeter, Turner Designs). Voda pro analýzu byla odebírána na předem určených čtyřech místech rovnoměrně rozmístěných po obvodu rybníka vždy v takové vzdálenosti od břehu, kde byla výška hladiny 1 metr. Používána byla 0,5l nádoba, která byla hrdlem dolů ponořena do vody a v hloubce 30 cm obrácena hrdlem nahoru, aby mohla do nádoby natéct voda. Poté byla nádoba z vody vyjmuta. Zaznamenávání byli také obratlovci, kteří by mohli mít vliv na výskyt ptačích schistosom, a to především ryby (býložravé vs. dravé) a vodní ptactvo. Zároveň byla pozorována vodní vegetace v oblasti litorálu (zastoupení splývavých nebo ponořených jemnolistých rostlin a částečně ponořených tuholistých rostlin typu rákos). Sledování vybraných skupin živočichů a vegetace na konkrétních lokalitách bylo prováděno s cílem odhalit možné souvislosti s výskytem či naopak nepřítomností konkrétních druhů plžů, sloužících jako možní mezipřenositelé ptačích schistosom.

Nasbíraná data byla posléze využita ke statistickému vyhodnocení v programu GraphPad Prism (verze 8). Data byla vyhodnocena metodou korelace, kde byla závislost dvou proměnných zhodnocena pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Za statisticky významné byly považovány výsledky s p-hodnotou $p < 0,05$.

2.3. Materiál z terénu a jeho zpracování





V terénu byly získávány vodní plži, kteří byli následně vyšetřováni na přítomnost cercárií ptačích schistosom (viz kap. 2.3.1.), uhynulé vodní ptactvo, které bylo následně pitváno na přítomnost vajíček, dospělců a schistosomul ptačích schistosom (viz kap. 2.3.2), a trus labutí, ve kterém byla hledána miracidia ptačích schistosom (viz kap. 2.3.3.).

2.3.1. Sběry a vyšetřování vodních plžů na přítomnost ptačích schistosom

Plži byli sbíráni v litorálním pásmu ručně nebo za použití cedníku do uzavíratelných nádob označených podle jednotlivých kvadrantů rybníka. K vyšetření na přítomnost ptačích schistosom v patentní fázi infekce byli plži individuálně přemístěni do průhledných skleněných nádob o objemu 0,2 l, v případě malých jedinců (několik mm až cca 2 cm) do kultivačních či mikrotitračních destiček naplněných vodou. Plži ze skupiny Prosobranchia a někdy i některé druhy ze skupiny Pulmonata (především druhy čeledi Physidae) byli vyšetřováni v rámci druhu hromadně v jedné nádobě. V těchto nádobách byli plži ponecháni přes noc pro případné vyloučení cercárií motolic. Další den ráno bylo vylučování cercárií motolic stimulováno umělým světlem ze stolní lampy. Poté byl pod mikroskopem určen morfotyp vyloučených cercárií. Druhy ptačích schistosom byly uchovávány v 96% čistém ethanolu pro následnou molekulární analýzu a 4% formaldehydu k morfologické charakterizaci. Formaldehyd byl pro fixaci červů horký. Vyšetření plži, kteří byli negativní na přítomnost ptačích schistosom, byli usmrceni zamražením. Plži pozitivní na ptačí schistosomy byli umístěni do skleněných akvárií o objemu 8 l s molitanovým filtrem pro možnost dalšího využití cercárií.

Stejný postup sběru a vyšetřování byl volen i při sběru plžů na Bolevecké rybníční soustavě. Vyšetřované rybníky byly před sběrem rozděleny na čtyři části – hráz, oblasti nalevo a napravo od hráze při pohledu z hráze směrem na rybník a oblast rybníka naproti hrázi. S těmito oblastmi korespondovala i odběrová místa vody zmíněná v kapitole 2.2.2. Po ukončení vyšetření byla všem jedincům osušena ulita a následně byla označena lakovým popisovačem. Plži byli poté vráceni zpět do té části rybníka, v níž byli nalezeni. Značení bylo následující: pro jednotlivé výjezdy byla zvolena čísla 1-9, přítomné cercárie, které plži vylučovali, byly označeny dle jejich morfotypu počátečními písmeny (S – schistosomní cercárie; E – echinostomní cercárie; X – xifidiocercárie) a 0 pro negativní nález. Pro označení místa nálezu byly zvoleny piktogramy (viz Tab. 4). Při sběrech v rámci dalších výjezdů mohli tedy být znovu nalezeni a mohla být zhodnocena případná změna v jejich nákaze motolicemi.

Tab. 4 – Piktogramy, zakreslené na ulity vodních plžů, značící jednotlivá místa nálezů vodních plžů při terénních sběrech na Bolevecké rybníční soustavě

Hráz	
Břeh vlevo od hráze	
Břeh vpravo od hráze	
Oblast naproti hrázi	

Stejný postup sběru a vyšetřování byl volen i při sběru plžů na ostatních lokalitách mimo modelovou kaskádu pouze s tím rozdílem, že plži využití pro tento účel byli v případě negativního nálezu ptačích schistosom usmrceni zamražením. Plži pozitivní na ptačí schistosomy byli umístěni do skleněných akvárií o objemu 8 l s molitanovým filtrem pro možnost dalšího využití cercárií.

2.3.2. Získávání a pitvy uhynulého ptactva

Ve spolupráci se záchrannou stanicí DESOP byli získáváni uhynulí ptáci, především labutě, a to zejména z plzeňské Bolevecké rybníční soustavy a okolí (např. řeka Berounka, Mže či Radbuza). Ptáci, kteří v některých případech byli čerstvě uhynulí, jindy zamražení, přičemž se lišili různým stupněm rozkladu, případně byli dodány pouze vnitřnosti, byly následně pitvány pro zjištění přítomnosti parazitů se zaměřením na ptačí schistosomy. Výsledky z pitev byly zaznamenávány do pitevního protokolu (vzor viz Příloha 3).

Při pitvách byl kladen důraz hlavně na ty orgány, v nichž byla největší pravděpodobnost výskytu různých stádií a druhů ptačích schistosom. Těmito orgány jsou nosní sliznice, která byla po vyjmutí a natrhání pinzetami prohlížena v Petriho misce s použitím binokulární lupy, případně světelného mikroskopu. Dále byla pod lupou prohlížena mícha, kterou bylo třeba nejdříve z páteře vypreparovat postupným odstříháváním obratlů v kloubním spojení. Po otevření břišní dutiny ptáka byly vyjmuty a prohlíženy na přítomnost různých vývojových stádií ptačích schistosom plíce, játra, ledviny, střeva a mezenteriální cévy. Všechny orgány kromě střev byly rozstříhány na fragmenty velké přibližně 2 cm², přes síto promyty vodou do 2l nádoby, v níž se suspenze nechala cca 10 minut dekantovat. Následně byla přebytečná voda slita a opět doplněna. Toto se 3x opakovalo a po posledním slití přebytečné vody byla dekantovaná suspenze přelita do skleněné nádoby o objemu 0,2 l, kde opět proběhla dekantace. Po cca 10 minutách byla opět slita přebytečná voda a usazenina byla postupně prohlížena v Petriho miskách pod binokulární lupou. Střevo bylo po odstranění mezenteriálních cév podélně prostříženo, promyto vodou a jeho sliznice byla prohlížena prostřednictvím stěrů krycím sklíčkem. Stírána byla vždy oblast 2-3 cm s odstupem asi 5 cm a vyšetřována za použití světelného mikroskopu. V případě nálezu většího množství vajíček ptačí schistosomy (vyšší desítky vajíček na jednom stěru) bylo okolí této oblasti po kontrole stereomikroskopem vystřiženo a vloženo do Bouinovy fixáže k dalšímu zpracování.

Veškerá stadia ptačích schistosom nalezená při pitvách byla uložena do 96% ethanolu nebo 4% formaldehydu k pozdějšímu zpracování.

2.3.3. Získávání miracidíí ptačích schistosom

Pro získání miracidíí ptačích schistosom byl sbírán čerstvý trus labutí na plzeňské Bolevecké soustavě rybníků. Pro zjištění infekce u konkrétních ptáků byly labutě vylákány na břeh, delší dobu pozorovány případně odchyťvány za asistence členů spolku DESOP, během odchyty se labutě obvykle vyprázdnily a trus byl odebrán ihned po jeho vyloučení. Pokud to bylo možné, byly labutím odečteny čísla ornitologických kroužků. Při nedostatku individuálních vzorků byl trus sbírán hromadně od více labutí do jedné nádoby. Po převezení do laboratoře byl rozsuspendován v

kohoutkové vodě ve 2l nádobách. Cca 2 minuty probíhala dekantace, poté byla slita voda z nádoby přibližně do poloviny svého objemu a opět doplněna. To se 2x opakovalo a po slítí vody v posledním kroku byla suspenze přelita do koncentrační lahve s dlouhým úzkým hrdlem obalené hliníkovou fólií pro zabránění přístupu světla. Na odhalené hrdlo lahve bylo z boku svíceno stolní lampou. Přítomná miracidia ptačích schistosom, která se po kontaktu s vodou líhla z vajíček, byla pozitivně fototaktická a plavou za světlem k hrdlu lahve, kde byla Pasteurovou pipetou sbírána do Petriho misky. Část miracidii byla následně využita pro k nákaze různých druhů vodních plžů (viz kap. 2.3.4.), část byla uložena do 96% čistého EtOH k druhové determinaci molekulárně biologickými metodami, část do horkého 4% formaldehydu pro následné morfologické měření. Trus je nutné vyšetřit bezodkladně (nejlépe maximálně do druhého dne při uchování v lednici), aby nedošlo k úhynu miracidii v něm přítomných.

2.3.4. Experimentální nákazy

K experimentálním nálezům bylo přistoupeno z důvodu snahy o nalezení vhodného mezihostitelského plže, ověření schopnosti působit cercáriovou dermatitidu u lidí a pokusu zavedení cyklu v laboratorních podmínkách pro možnost získání různých stádií parazita pro další pokusy. To probíhalo u druhů ptačích schistosom, pro které tyto informace dosud chyběly.

Experimentální nákazy vodních plžů

Pro experimentální nákazy miracidii ptačích schistosom vyloučenými z trusu labutí (viz kap. 2.3.3) přítomných na Bolevecké soustavě rybníků byli z důvodu vybrání vodní plži z čeledi Planorbidae (*Anisus* sp., *Gyraulus* sp., *Hippeutis* sp., *Planorbarius corneus*, *Planorbella duryi* a *Planorbis planorbis*) získaní z přírodních nádrží nebo akvakultur a plži čeledi Lymnaeidae (*Lymnaea stagnalis*) z laboratorních chovů. Planorbidní druhy plžů byly zvoleny na základě nálezů cercárií v plžích *Anisus vortex* (Aldhoun *et al.*, 2012) a *Gyraulus parvus* (Duras, 2015, nepublikováno), *Gyraulus* sp. (Bulantová, nepublikováno) a dřívějších zkušeností s nákazou vodních plžů miracidii z trusu labutí (Bulantová, nepublikováno). Zmíněné cercárie a miracidia byla prostřednictvím molekulárních analýz identifikována jako totožný druh. Plži z čeledi Lymnaeidae byli nakažováni pro kontrolu neschopnosti vývoje miracidii tohoto druhu v lymnaeidních plžích. U plžů z přírodních vodních ploch proběhla nejprve kontrola, zda nejsou v patentní fázi infekce ptačími schistosomami či jinými druhy motolic (prepatentní fázi infekce nelze rozpoznat bez usmrcení plžů). Jedinci nevyklučující žádné parazity byli rozmístěni do mikrotitračních nebo kultivačních destiček s jamkami naplněnými vodou. Pro jedince o velikosti do přibližně 0,5 cm byly použity 96jamkové mikrotitrační destičky, plži do cca 1 cm byli umístěni do destiček pro kultivace s 24 jamkami a jedinci do cca 1,5 cm do 12jamkových destiček. Do každé jamky s plžem byla přidána 3 miracidia, následně

byla destička přiklopena víkem, zatemněna hliníkovou fólií a ponechána přes noc. Druhý den ráno byli plži přemístěni do skleněných akvárií o objemu 8 l s odstátou vodou a molitanovým akvariijním vzduchovým filtrem, kde byli chováni po dobu experimentu. Akvária s plži byla uložena v místnosti s teplotou 22 °C a světelným režimem nastaveným na střídání světla a tmy po 12 hodinách.

Po třech týdnech od nákazy byla akvária zatemněna pro zabránění nechtěnému vylučování cercárií během světelné periody a pro lepší stimulaci světlem při následných pokusech. Po 4 tpi (týdnech po infekci) byli plži opět vloženi do mikrotitračních či kultivačních destiček a přibližně po hodině svícení stolní lampou na destičky bylo kontrolováno případné vylučování cercárií. Tento postup byl opakován každý následující týden a byl prováděn postupně celkem u čtyřech skupin nakažených plžů *Gyraulus* sp. s počty nakažovaných plžů 1. skupina – 192 plžů, 2. skupina – 158 plžů, 3. skupina – 24 plžů a 4. skupina – 24 plžů, dále u dvou skupin *P. duryi* s počty plžů 40 a 13, dvou skupin *P. planorbis* s počty plžů rovněž 40 a 13 a po jedné skupině u druhů *Anisus* sp. (24 plžů), *Hippeutis* sp. (24 plžů), *P. corneus* (13 plžů) a *L. stagnalis* (24 plžů). Celkové počty nakažovaných vodních plžů jsou zaznamenány v tabulce 5. Druhy plžů, kteří nevylučovali žádné cercárie, byli po 12 týdnech od nákazy pitváni pro potvrzení jejich neúspěšné nákazy. Cercárie vyloučené z plžů *Gyraulus* sp. byly u výše zmíněných čtyřech skupin počítány za využití binokulární lupy. Počítání probíhalo vždy po noci, kdy byli plži do mikrotitračních destiček umístěni večer před tím, a následně po klasické stimulaci světlem pro navození rozednění (viz výše). Vyloučené cercárie z nakažených jedinců nejen výše zmíněných čtyřech skupin, ale i dalších nakažovaných plžů rodu *Gyraulus* byly využity k experimentálním nakažám (viz níže) a morfologickým (viz str. 40-41) a molekulárním analýzám (viz kap. 2.3.6.). Jedinci z 1. a 2. skupiny plžů *Gyraulus* sp. byli pitváni 15. týden po nakažce a pitvy jedinců dalších dvou skupin proběhly po dvou týdnech od doby, kdy plži přestali vylučovat cercárie, byly pitváni pro kontrolu úspěšnosti nákazy. Pitvy byly provedeny rozdrčením plžů mezi dvěma podložními sklíčky za současného pozorování pod lupou. Nakažení plži byli foceni fotoaparátem Canon DS 126 181.

U jedinců z první skupiny byla sledována také preference různého substrátu v chovných nádržích. V prvních osmi týdnech nákazy byli ponecháni v akváriu s většími kameny (cca 10 cm), poté byly kameny nahrazeny šterkem. V průběhu experimentů byli plži počítáni a vylučováni 1x týdně.

Tab. 5 – Celkové počty nakažovaných plžů

Druh plže	Počet nakažovaných jedinců
<i>Anisus</i> sp.	24
<i>Gyraulus</i> sp.	694
<i>Hippeutis</i> sp.	24
<i>Planorbarius corneus</i>	13
<i>Planorbella duryi</i>	53
<i>Planorbis planorbis</i>	53
<i>Lymnaea stagnalis</i>	24

Experimentální nákazy kachen

Pro zjištění, zda je možné zavést do laboratoře cyklus druhu ptačí schistosomy získaného z trusu labutí, byly nakažovány kachny *Anas platyrhynchos f. domestica*. Kachny byly vystaveny cercáriím získaným z úspěšné experimentální nákazy plžů rodu *Gyraulus* (viz výše). Pro nákazu kachen starých 5-7 dní bylo využito 100 cercárií/kachnu. Celkem bylo nakažováno pět kachen. Tři kachny byly nakažovány klasickou cestou penetrace cercárií do kůže nohou. K nádobě s vodou s cercáriemi byly kachny s ponořenými nohama fixovány po dobu jedné hodiny (dle Meuleman *et al.*, 1984). Poté byly prohlíženy plovací blány pro kontrolu možné přítomnosti petechií, které by signalizovali úspěšný vstup cercárií do kůže kachen. Dvě kachny byly nakažovány alimentárně. Pro tento účel byly pomocí pinzety lehce rozdrceni nakažení plži *Gyraulus* sp. a s trochou vody v Petriho misce byly podávány kachnám Pasteurovou pipetou. Počet plžů byl zvolen na základě toho, jaké bylo předpokládané množství infekceschopných cercárií uvnitř plžů zjištěné předchozími experimenty (viz výše str. 37). Kachny byly dále podle účelu utráceny v anestezii použitím izofluranu a následnou dekapitací v různých intervalech po infekci.

Pro sledování přítomnosti transformovaných cercárií v kůži na nohou byla kachna usmrcena jednu hodinu po naze. Stažená kůže z prstů včetně plovacích blan byla fixována Bouinovou fixací k histologickému zpracování (viz kap. 2.3.5.). Za účelem sledování možné migrace schistosomul byly další tři kachny usmrceny 3, 5 a 7 dpi (=dní po infekci). Následně proběhla jejich pitva, při níž byly prohlíženy především plíce, ale také játra, ledviny a mícha na přítomnost schistosomul. Orgány byly vloženy do Petriho misek s fyziologickým roztokem a dvěma pinzetami natrhány na malé fragmenty. V roztoku byla následně za použití stereomikroskopu hledána schistosomula.

Ke zjištění úspěšné nákazy byl od 14. dpi vyšetřován trus poslední kachny na přítomnost miracidíí. Po 56 dnech byla kachna usmrcena a vypitvána pro kontrolu přítomnosti schistosomul, dospělců či vajíček motolice. Prohlíženy byly mozkové pleny, mícha, plíce, játra, ledviny, slezina a sliznice a submukóza tenkého i tlustého střeva a slepých střev. Všechny orgány s výjimkou střev byly

umístěny do fyziologického roztoku v Petriho miskách, natrhány na malé části a prohlíženy stereomikroskopem. Játra byla ještě před tímto procesem podrobena výplachu fyziologickým roztokem pomocí injekční stříkačky s jehlou pro případnou izolaci neporušených dospělců motolice. Střeva byla prohlížena stejným způsobem, který je popsán v kapitole 2.3.2.

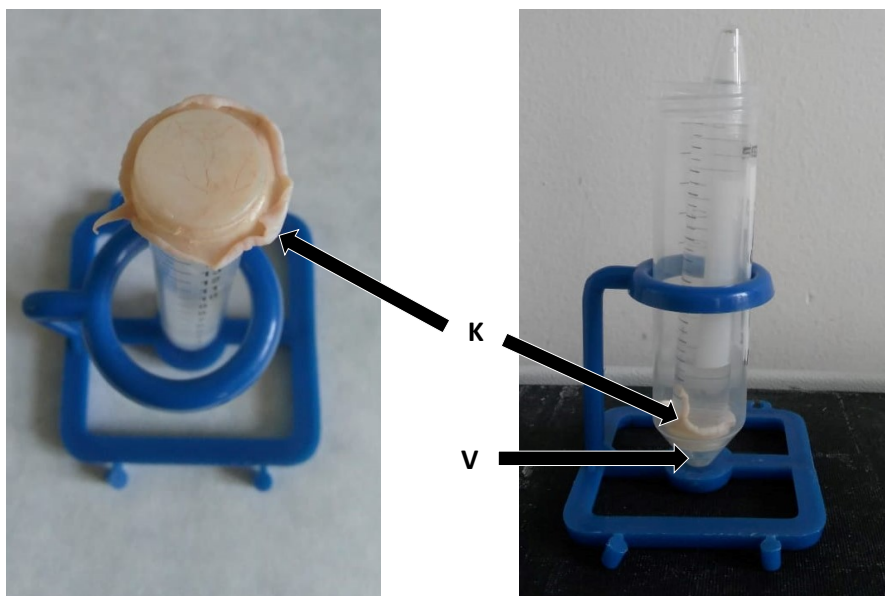
Pokusy s ochotou cercárií penetrovat kůži savců

Myši kmene SKH-1 a BALB/c byly cercáriemi z úspěšně nakažených plžů *Gyraulus* sp. nakažovány pro zjištění schopnosti penetrace cercárií do savčího hostitele. Dvě dospělé holé myši kmene SKH-1 byly nakažovány infekční dávkou 50 cercárií, které byly uspany isofluranem a usmrceny přerušením krční páteře a míchy. U myši byla odstřižena část kůže ze zad (z místa za hlavou myši), která byla připevněna pomocí nitě k hrdlu 15ml centrifugační zkumavky naplněné vodou s cercáriemi. Zkumavka přetočena hrdlem dolů a zakryta hliníkovou folií. Ucho myši kmene BALB/c bylo vystaveno nákaze cercáriemi v množství 20 kusů. Myš byla uspana intraperitoneálně podaným anestetikem, jehož složení je popsáno níže, v množství 100 µl. Hlava uspané myši byla bokem položena na 1,5ml zkumavku tak, aby bylo ucho ponořeno ve vodě s cercáriemi (sestava viz Obr. 11). Takto byla myš ponechána 1 h. Po další hodině byla usmrcena (viz výše) a ustřižené ucho vloženo do Bouinovy fixáže. Pro nákazu byla rovněž využita dvě pětidenní holata myši BALB/c. Při nakažování byla jedna z myši položena břichem, druhá zády na 1,5ml zkumavku s vodou obsahující 50 cercárií. Po usmrcení (viz výše) byla část kůže, která byla vystavena nákaze, ustřižena a vložena do Bouinovy fixáže pro následné histologické zpracování.

Po nákaze všech myši byly zbylé cercárie ve zkumavkách počítány přemístěním do Petriho misky a za využití stereomikroskopu. Všechny vzorky kůže byly následně zpracovány histologickými metodami (viz kap. 2.3.5.).

Složení 1 ml anestetika:

- Rometar (Bioveta) – 0,1 ml
- Narketan 10 (Vétoquinol) – 0,2 ml
- sterilní fyziologický roztok (Mayrhafer Pharmazeutika) – 0,7 ml



Obr. 11 – Sestava pro pokus ochoty cercárií vyloučených z experimentálně nakažených plžů *Gyraulus* sp. penetrovat savčí kůži (využita kůže holých myší kmene SKH-1)
 K – myší kůže upevněná na hrdle 15ml plastové zkumavky; V – voda s cercáriemi

Experimentální nákaza lidí

Pro zjištění schopnosti cercárií z plžů rodu *Gyraulus* po experimentální naze (viz výše) působit cercáriovou dermatitidu u lidí, byly uskutečněny experimentální nákazy dvou lidských dobrovolníků. Pro nákazu byla Petriho miska obsahující 100 cercárií ve vodě upevněna papírovou lepící páskou na spodní stranu předloktí ruky. Nákaza trvala jednu hodinu, po kterou byl nakažovaný dobrovolník v klidu s rukou položenou na podkladu. Pod Petriho misku byla umístěna větší Petriho miska pro případ nechtěného vytlačení či vylití vody s cercáriemi. Po skončení nákazy byly spočítány cercárie či jejich zbytky a kůže dobrovolníků byla po několik dní sledována.

Zpracování cercárií z plžů *Gyraulus* sp. pro morfologickou charakterizaci

Cercárie vyloučené experimentálně nakaženými plži *Gyraulus* sp. byly fixovány pro účely morfometrie a barveny pro zvýraznění penetračních žláz a sensorických papil.

Morfometrická charakterizace cercárií

Pro měření rozměrů těla byly cercárie po vyloučení fixovány horkým 4% formalínem. Po přesunutí na podložní sklíčko byly pozorovány ve světelném mikroskopu za využití kamery Olympus DP72 a měřeny pomocí programu QuickPHOTO MICRO.

Barvení penetračních žláz cercárií

Acidofilní cirkumacetabulární žlázy byly barveny alizarinem, který má afinitu k vápníku.

Příprava barvicího roztoku: Zásobní roztok alizarinu byl připraven za varu jako nasycený vodný roztok. Pro barvení byl využit jeho 2% roztok.

Postup: K živým cercáriím ve vodě byl přidán zásobní roztok alizarinu v poměru 4:1 (voda s cercáriemi:alizarin) a suspenze byla 3-5 minut ponechána k obarvení žláz cercárií. Následně byly cercárie přemístěny na podložní sklo a pozorovány ve světelném mikroskopu.

Bazické postacetabulární penetrační žlázy byly barveny lithiumkarmínem.

Příprava barvicího roztoku: Pro přípravu lithiumkarmínu bylo ve 100 ml nasyceného vodného roztoku uhličitanu lithného (Li_2CO_3) za varu rozpuštěno 2,5 g karmínu (Sigma Aldrich). K barvení cercárií byl použit 1% zásobní roztok.

Postup: Vyloučené cercárie byly přemístěny na hodinové sklo a fixovány 70% ethanolem po dobu 2 minut. Následně k nim byl přidán roztok lithiumkarmínu v poměru 1:1. Po 10minutové inkubaci byly cercárie přemístěny na podložní sklo a pozorovány ve světelném mikroskopu.

Barvení senzorických papil cercárií

Senzorické papily cercárií byly barveny dusičnanem stříbrným, který barví argentofilní struktury.

Příprava barvicího roztoku: Pro barvení cercárií byl připraven 1% roztok dusičnanu stříbrného (AgNO_3 ; Sigma Aldrich).

Postup: K cercáriím s odstátou kohoutkovou vodou na hodinovém skle byl přidán stejný objem roztoku AgNO_3 a na 10 minut byla suspenze zakryta hliníkovou folií. Po této inkubaci byly cercárie několikrát promyty kohoutkovou vodou a na 10 minut vystaveny světlu ze svítilny (KL 1500 LCD, Olympus). pro zvýraznění struktur stříbrem. Pro pozorování ve světelném mikroskopu byly nabarvené cercárie přesunuty na podložní sklíčko do kapky 20% vodného roztoku glycerolu.

2.3.5. Histologické zpracování materiálu

Pro pozorování přítomnosti, vývoje a přesné lokalizace různých stadií ptačích schistosom v tělech hostitelů byly vybrané tkáně ptáků a plžů histologicky zpracovávány s využitím různých typů barvicích technik pro zvýraznění požadovaných struktur.

Odběr tkáně

Histologicky byly zpracovávány tkáně z přirozených i experimentálních infekcí obratlovců i plžů (viz kap. 2.3.2. a 2.3.4.). Pro pozdější snazší manipulaci byly ploché vzorky kůže nebo uší před fixací v Bouinově tekutině srolovány a na koncích zpevněny nití proti možnému rozvolnění. V případě zpracování plžů byla pomocí ostrých hodinářských pinzet nejprve odstraněna ulita a tělo plže bylo posléze umístěn do Bouinovy tekutiny.

Tkáň fixovaná v Bouinově fixáži a uložená v 5ml mikrozkuvkách byla za současného míchání na třepačce proplachována 70% ethanolem přibližně 6 hodin s výměnami ethanolu po cca 45 minutách (proplach trval tak dlouho, dokud se tekutina zbarvovala dožluta).

Při zalévání vzorků fixovaných 4% formalínem byly vzorky nejprve propírány vodou, která byla 3x po jedné hodině vyměněna. Po proplachu následovalo odvodnění 30% a 50% ethanolem vždy 3x po 30 minutách. Další postup byl stejný pro vzorky fixované oběma typy fixáží a shrnuje ho tabulka 6.

Všechny roztoky byly ke vzorkům přidávány v alespoň 10násobném množství vzhledem k objemu vzorku. Pro finální zalití vzorků parafínem do bločků o rozměrech 2,5 x 2,5 x 2,5 cm byla použita silikonová forma předem nahřátá v termostatu s teplotou nastavenou na 56 °C. Pomocí nahřáté pinzety byly jednotlivé vzorky přemístěny do jamek s čistým parafínem a za pomoci hodinářské pinzety a preparační jehly byly vzorky umístěny do rohu jamky a natočeny orientovány podle potřeby. Do jamek byl na jednu stranu umístěn také papírový štítek s identifikací vzorku. Poté byla forma se vzorky přesunuta na led, kde parafín přibližně po jedné hodině zatuhl.

Tab. 6 – Postup zalévání vzorků do parafinu

Úkon	Chemikálie	Čas
Odvodnění	EtOH 70 %	3x 30 min
	EtOH 96 %	3x 30 min
	EtOH 100 %	3x 30 min
Projasnění	xylén	2x 15 min
Prosycení – při 56 °C	xylén-parafín	15 min
	parafín I	1 h
	parafín II	12 h (přes noc)
	parafín III	1 h
Zalítí do bločku	čistý parafín	ihned
Zchlazení na ledu	-	cca 1 h

Krájení parafínových bločků

Vzniklé parafínové bločky byly krájeny na mikrotomu (Shandon Finesse ME). Výsledné řezy o tloušťce 4-6 μm byly pro napnutí položeny na hladinu vody o teplotě cca 40 °C a následně umístěny na vysoce přilnavá podložní sklíčka SuperFrost Plus (Thermo Scientific). Po zaschnutí a pevném přilnutí řezů k podložním sklíčkům byly vzorky sušeny na plotýnce o teplotě 40 °C, kde byla sklíčka ponechána 1-2 dny do doby, než bylo přistoupeno k barvení.

Barvení parafínových řezů

Vzorky byly barveny různými barvicími technikami pro zvolení těch, které budou pro pozorování požadovaných struktur nejvhodnější. Před samotným barvením došlo nejprve k deparafinaci a zavodnění řezů na sklíčku dle protokolu (viz Tab. 7) společného pro všechny typy barvení.

Tab. 7 – Postup deparafinace a zavodnění parafinových řezů

Úkon	Chemikálie	Čas
Deparafinace	xylén I	10 min
	xylén II	10 min
Zavodnění	EtOH 100 %	5 min
	EtOH 96 %	5 min
	EtOH 80 %	5 min
	EtOH 70 %	5 min
	voda	5 min

Barvení hematoxylin-eosinem

Přehledové barvení kombinací hematoxylinu a eosinu (viz Tab. 8) patří mezi základní barvicí techniky v histologii. Hematoxylin je bazické barvivo, které barví bazofilní struktury (např. jádra) tmavě fialově. Eosin naopak růžově až červeně barví eosinofilní struktury (např. cytoplasma či svalovina). Pro tento typ barvení byl využit Ehrlichův hematoxylin.

Složení zásobních roztoků:

Ehrlichův hematoxylin:

- 2 g hematoxylinu
- 100 ml 96% etanol
- 100 ml destilované vody
- 10 ml ledové kyseliny octové
- 100 ml glycerinu
- 3 g síranu hlinito-draselného ($KAl(SO_4)_2$)
- 0,4 g jodičnanu sodného ($NaIO_3$)

Eosin Y:

- 1 g eosinu Y
- 100 ml 96% ethanol

Před samotným barvením byl Ehrlichův hematoxylin přefiltrován a byl připraven pracovní roztok eosinu Y naředěním zásobního 70% ethanolem na 0,1% roztok. K 50 ml výsledného roztoku byly přidány 3 kapky ledové kyseliny octové.

Tab. 8 – Postup barvení hematoxylin-eosinem:

Úkon	Chemikálie	Čas
Barvení	hematoxylin	10 min
Promývání	tekoucí voda	cca 5 min
Diferenciace	kyselý EtOH (100 ml 70% EtOH + 3 kapky koncentrované HCl)	2-3 ponoření (za současné kontroly pod mikroskopem)
Promývání	voda	5 min
Barvení	eosin Y	1-2 min
Pro odstranění přebytků eosinu při přebarvení je možné preparát ponořit do 96% ethanolu		
Promývání	destilovaná voda	30 s

Barvení Malloryho trichromem

Malloryho trichrom (barvení viz Tab. 9), který je používám zejména pro barvení svalů a kolagenu, je složen ze tří barviv – anilin, oranž G a kyselý fuchsin. Tato barviva barví jádra oranžově až hnědě, kolagen zeleně až modře a svalová vlákna červeně. Zvolen byl v rámci optimalizace barvení vzorků. Zároveň byl předpoklad zvýraznění svalové vrstvy u parazitů.

Složení zásobních roztoků:

Anilin + oranž G:

- 0,5 g anilinová modř
- 2 g oranž G
- 1 g kyselina fosfowolframová
- 8 ml ledové kyseliny octové
- 100 ml destilované vody

Kyselý fuchsin

- 1 g kyselého fuchsinu
- 100 ml destilované vody
- 1 ml ledové kyseliny octové

Před samotným barvením nebylo třeba roztoky dále upravovat.

Tab. 9 – Postup barvení Malloryho trichromem:

Úkon	Chemikálie	Čas
Barvení	kyselý fuchsin	30 s
Promývání	tekoucí voda	1 min
Diferenciace	1% kys. fosfowolframová	30 s (poté byla slita ze sklíčka bez oplachu)
Barvení	směs anilin-oranž G	10 min
Promývání	voda	30 s

Barvení Massonovým trichromem

K barvení Massonovým trichromem (viz Tab. 10), které je využíváno k odlišení buněk od okolní pojivové tkáně, byly opět využity 3 základní složky – Harrisův hematoxylin, červené barvivo obsahující kyselý fuchsin a zelené barvivo obsahující světlou zeleň. Díky těmto barvivům se jádra barví modře až černě, cytoplazma červeně, kolagen zeleně a elastická vlákna fialově. Massonův trichrom byl využit společně s předchozími popsány trichromy pro jejich porovnání a následné zhodnocení, která metoda bude přinášet lepší výsledky barvení.

Složení zásobních roztoků:

Weigertův železitý hematoxylin

Roztok A: 1 g hematoxylinu
100 ml 96% EtOH

Roztok B: 0,6 g chloridu železitého
0,75 ml kyseliny chlorovodíkové
95 ml destilované vody

Červený barvicí roztok

1% Poceau de xylidin
0,5% kyselý fuchsin
1% kyselina octová

Zelený barvicí roztok

1% světlá zeleň
1% kyselina octová

Před samotným barvením nebylo třeba roztoky dále upravovat.

Tab. 10 – Postup barvení Massonovým trichromem:

Úkon	Chemikálie	Čas
Barvení	Weigertův hematoxylin	5 min
Promývání	tekoucí voda	několik sekund (do zmodrání řezů)
Diferenciace	kyselý ethanol (50 ml 70% EtOH + 3 kapky koncentrované HCl)	20-30 s (za současné kontroly pod mikroskopem)
Oplach	destilovaná voda	Několik sekund
Barvení	červený barvicí roztok	20 s
Promývání	destilovaná voda	dle potřeby
Diferenciace	1% kys. fosfowolframová	15 min
Barvení	zelený barvicí roztok	10 min
Oplach	destilovaná voda	Několik sekund

Barvení Gomoriho trichromem

Pro barvení dle Gomoriho (viz Tab. 11) je využíván hematoxylin a Gomoriho trichrom. Používán je především pro barvení svalů. Při použití tohoto typu barvení jsou jádra barvena tmavě modře, kolagen zeleně a svalová vlákna červeně. Barvivo bylo opět využito pro porovnání všech tří typů trichromových barvení vzorků a zároveň byl předpoklad obarvení svalové vrstvy parazitů a tím jejich zvýraznění na řezech.

Složení zásobních roztoků:

Weigertův železitý hematoxylin (viz Massonův trichrom)

Gomoriho trichrom

0,6 g Chromotrope 2R

0,3 g Fast Green FCF

1 ml ledové kyseliny octové

0,8 g kyseliny fosfowolframové

100 ml destilované vody

Tab. 11 – Postup barvení Gomoriho trichromem:

Úkon	Chemikálie	Čas
Barvení	Weigertův hematoxylin	10 min
Promývání	tekoucí voda	2 min
Barvení	Gomoriho trichrom	15 min
Diferenciace	kyselý ethanol (50 ml 70% EtOH + 3 kapky koncentrované HCl)	1-2 min
Promývání	destilovaná voda	2 min

Montování preparátů

Pro zamontování vzorků do média, které není mísitelné s vodou (kanadský balzám, DPX), bylo nutné je odvodnit a projasnit. Postup, totožný pro vzorky barvené všemi způsoby, je shrnut v tabulce 12. Po obarvení, odvodnění a projasnění byly vytvořeny trvalé preparáty jejich zamontováním. K tomu byly využity dva typy montovacích médií – kanadský balzám (Roth) a DPX (Sigma Aldrich). Médium bylo na vzorky kápnuto před zaschnutím xylenu z posledního kroku projasnění, následně bylo přiloženo krycí sklíčko, preparát byl zatížen pro rovnoměrné rozptření montovacího média a ponechán na rovné ploše k zaschnutí (několik dní až týdnů). Po zaschnutí byla sklíčka očištěna od přebytků montovacího média a v případě použití kanadského balzámu rámována lakem na nehty.

Tab. 12 – Postup odvodnění a projasnění vzorků:

Úkon	Chemikálie	Čas
Odvodnění	voda	5 min
	EtOH 70 %	5 min
	EtOH 80 %	5 min
	EtOH 96 %	5 min
	EtOH 100 %	5 min
Projasnění	xylén I	5 min
	xylén II	5 min

2.3.6. Molekulárně biologické metody zpracování materiálu

Pro zjištění či kontrolu druhové příslušnosti ptačích schistosom nalezených v terénu i získaných při experimentálních infekcích byly vybrány vzorky ptačích schistosom podrobeny molekulární analýze. Tyto postupy byly aplikovány na cercárie nalezené v plžích na různých lokalitách, cercárie z experimentálně nakažených plžů, dospělci a vajíčka nalezená při pitvách labutí a miracidia získaná z trusu labutí na Bolevecké rybníční soustavě. Analyzováni byli rovněž vodní plži z přírody a akvakultur, kteří byli použiti pro experimentální nákazy. V případě cercárií, miracidíí a vodních plžů šlo o čerstvý materiál, který byl ihned po získání uložen do 96% čistého ethanolu pro molekulární analýzu, případně ihned nefixovaný využit pro izolaci DNA. Dospělci a vajíčka byla získána z labutí, které byly nalezeny v přírodě v různém stádiu rozkladu a ihned po nálezů byly zamrazeny. Materiál určený pro molekulární analýzu byl před analýzou co nejvíce zbaven nečistot a zbytků tkání hostitele.

Izolace DNA

V případě některých vzorků plžů šlo o izolaci z nefixované tkáně, kterou se podařilo takto zpracovat ihned po odebrání, ostatní materiál pro izolaci DNA byl fixován v 96% čistém ethanolu. Před samotnou izolací byl veškerý ethanol odstraněn odpařením z otevřené mikrozkušavky. Izolace byla provedena pomocí komerčně dostupného kitu (Exgene™ Tissue SV *plus* mini, GeneAll®) podle protokolu výrobce. Po dokončení izolace byla měřena koncentrace izolované DNA na spektrofotometru (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, nebo NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer). Vzorky, které nebyly dále zpracovány ihned po izolaci DNA, byly uloženy v mrazícím boxu při teplotě -20 °C.

Amplifikace DNA

Izolovaná DNA byla amplifikována prostřednictvím PCR. Reakce probíhaly v přístroji C 1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) v reakční směsi o objemu 25 µl či 50 µl (viz Tab. 13). V případě ptačích schistosom byly použity primery *its4Trem* a *its5Trem* (Dvořák *et al.*, 2002), které jsou uvedeny v tabulce 14. Díky nim byly amplifikovány oblasti ITS zahrnující částečnou sekvenci 18S rDNA a 28S rDNA a úplnou sekvenci ITS-1, 5,8S rDNA a ITS-2.

Pro molekulární analýzu plžů byly použity geny kódující oblast ITS-2 s primery ITS-2 RIXO a ITS-2 NEWS (Almeyda-Artigas *et al.*, 2000) a oblast 16S s primery 16Sfor a 16Srev (Simon *et al.*, 1991) (viz Tab. 15). Amplifikace DNA v rámci PCR probíhaly na základě podmínek uvedených v tabulkách 16 a 17. Teplota pro uchování vzorků v přístroji po skončení reakce byla nastavena na 4 °C. Po reakci byly vzorky analyzovány na gelové elektroforéze.

Tab.13 – Složení reakční směsi pro PCR probíhající v 25 µl a 50 µl

Reagencie	Množství	Množství
EmeraldAmp® MAX PCR Master Mix (TaKaRa)	12,5 µl	25 µl
10mM primer forward	0,5 µl	1 µl
10mM primer reverse	0,5 µl	1 µl
Templátová DNA	cca 50 ng	cca 100 ng
Ultračistá deionizovaná voda	Doplnění do objemu 25 µl	Doplnění do objemu 50 µl

Tab. 14 – Použité primery pro amplifikaci parazitární DNA

Název primeru	Amplifikovaná oblast DNA	Sekvence
its5Trem	ITS	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
its4Trem		5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

Tab. 15 – Použité primery pro amplifikaci DNA vodních plžů

Název primeru	Amplifikovaná oblast DNA	Sekvence
ITS-2 RIXO	ITS-2	5'-TGTGTCGATGAAGAACGCAG-3'
ITS-2 NEWS		5'-TTCTATGCTTAAATTCAGGGG-3'
16Sfor	16S	5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'
16Srev		5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'

Tab. 16 – Podmínky PCR pro amplifikaci ITS oblasti parazitární DNA

Teplota	Čas	Počet cyklů
95 °C	5 min	1
95 °C	60 s	35
50 °C	45 s	
72 °C	120 s	
72 °C	10 min	1

Tab. 18 – Podmínky PCR reakce pro amplifikaci DNA vodních plžů

ITS-2			16S		
Teplota	Čas	Počet cyklů	Teplota	Čas	Počet cyklů
94 °C	10 min	1	95 °C	10 min	1
94 °C	30 s	30	50 °C	120 s	1
50 °C	30 s		72 °C	90 s	1
72 °C	60 s		93 °C	15 s	4
72 °C	7 min	1	50 °C	15 s	
-	-	-	72 °C	90 s	25
-	-	-	93 °C	5 s	
-	-	-	50 °C	8 s	
-	-	-	72 °C	60 s	
-	-	-	72 °C	10 min	1

Gelová elektroforéza a purifikace DNA

Pro provedení gelové elektroforézy byl připraven 1,5% agarózový gel, do kterého bylo přidáno barvivo SYBR™ Green I (Invitrogen™) vázající se na nukleovou kyselinu. Použit byl celý objem PCR produktů, případně jeho polovina při následné purifikaci DNA přímo z PCR produktu. Jako DNA standard sloužil HyperLadder™ 1kb (Bioline) a reakce probíhala za napětí 120 V. Po separaci jednotlivých nukleových kyselin byl výsledek fotografován a vyhodnocován za použití UV lampy.

V případě pozorování jediného produktu na gelu z elektroforézy byla volena přímá purifikace DNA z PCR produktů, pro kterou byl rovněž využit kit Expin™ Combo GP (GeneAll®) a DNA byla purifikována podle příslušného protokolu.

Při pozorování více různě velkých produktů na gelu z elektroforézy byly sterilním skalpelem vyříznuty produkty požadované velikosti, z nichž byla následně za použití komerčně dostupného kitu Expin™ Combo GP (GeneAll®) purifikována DNA dle přiloženého protokolu pro extrakci DNA z gelu.

Koncentrace DNA ve výsledném roztoku byla měřena na spektrofotometru (NanoDrop ND–1000 Spectrophotometer, nebo NanoDrop™ One/OneC Microvolume UV-Vis Spectrophotometer). Vzorky, které nebyly ihned dále zpracovány, byly uchovávány při -20 °C.

Příprava vzorků na sekvenaci

Vzorky na sekvenační analýzu byly připravovány do celkového objemu 8 μ l. Součástí výsledného vzorku bylo 5 ng/100 bp PCR produktu, ultračistá deionizovaná voda, která naředila DNA na požadovanou koncentraci, a 0,3 μ l 10mM primeru. Vzorky byly posílány k sekvenaci do laboratoře sekvenace DNA (Biocev).

Analýza výsledků sekvenace

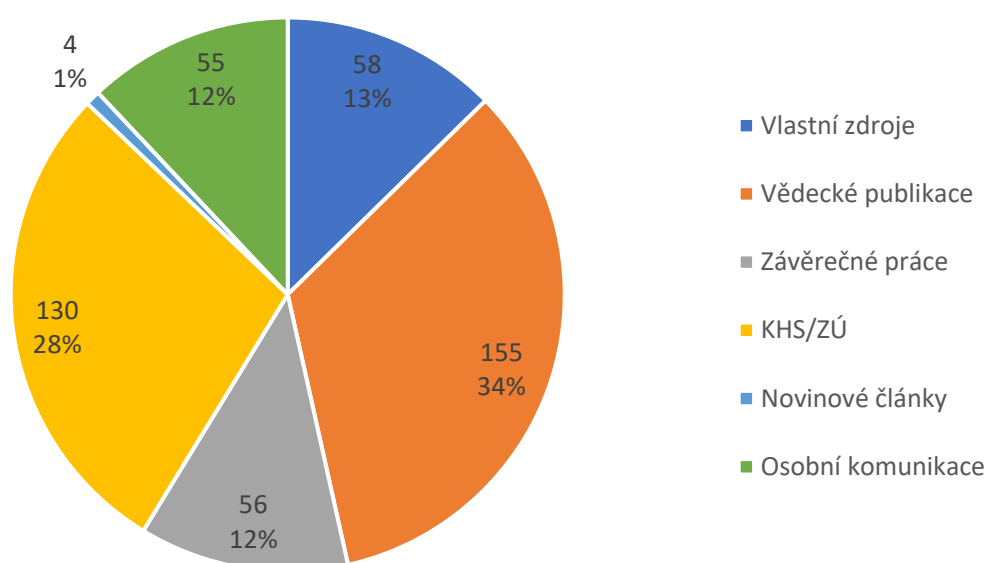
Ze sekvenační analýzy byla získána pro každý vzorek dvě čtení, která tvořila komplementární sekvence. Ty byly složeny dohromady a následně dále upravovány. Úpravy sekvencí, které zahrnovaly zkrácení obou konců o nekvalitní úseky a opravy chyb uvnitř sekvencí, byly prováděny v programu Geneious (Biomatters). Výsledné sekvence byly porovnány se sekvencemi v online databázi NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) za použití nástroje BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

3. VÝSLEDKY

3.1. Výskyt ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy v České republice

Data pro zhotovení přehledové i interaktivní mapy (kompletní data viz Příloha 1) zahrnují záznamy z časového období od r. 1966 do r. 2020 s údaji z literatury i vlastního pozorování (viz Obr. 12). Zastoupení jednotlivých zdrojů je shrnuto v tabulce 18. Obecně převažovaly záznamy cercárií ptačích schistosom, nálezy stádií z definitivních hostitelů a záchyty CD byly méně časté. Nejčastějším zdrojem záznamů byly vědecké publikace, naopak nejméně záznamů bylo z novinových článků.

Obr. 12 – Absolutní počet a podíl různých zdrojů záznamů výskytu ptačích schistosom a CD za



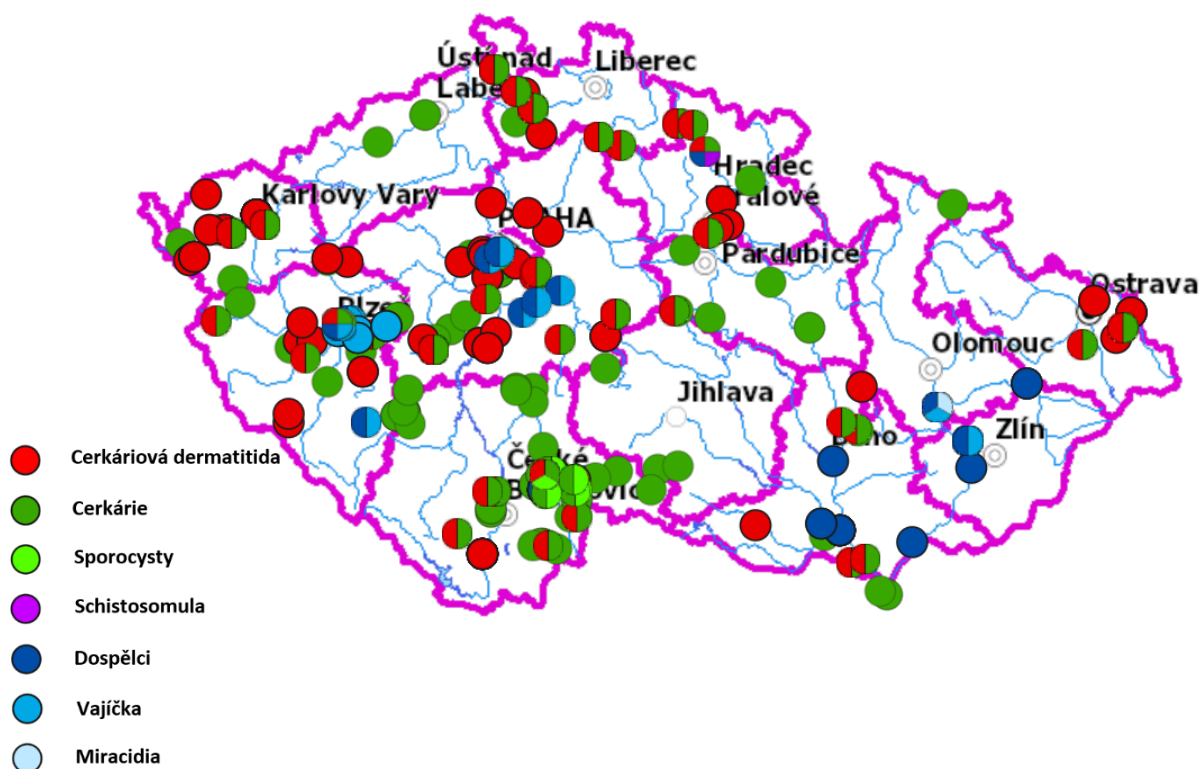
období od r. 1966 do r. 2020 v České republice použitých pro vytvoření přehledové mapy

Tab. 18 – Počet záznamů ptačích schistosom a CD v České republice v období 1960-2020 získaných z různých zdrojů

	Stádia z plžů	Stádia z ptáků	Záznamy CD
Vlastní sběry	22	36	x
Vědecké publikace	87	48	37
Závěrečné práce	48	8	x
KHS/ZÚ	9	x	124
Osobní komunikace	34	10	17
Novinové články	x	x	4

3.1.1. Souhrnné výsledky monitoringu z let 1966 - 2020

Na základě všech získaných záznamů byla v programu ArcGIS Online vytvořena přehledová mapa (viz Obr. 13) a mapa interaktivní, která je prozatím pouze interní. Interaktivní mapa umožňuje náhled do pozadí jednotlivých nálezů. Při rozkliknutí bodů, které jsou opět různě rozlišené, se zobrazí tabulka s informacemi o konkrétním nálezů včetně příslušného zdroje. K dubnu 2021 bylo do mapy doplněno 462 záznamů celkem ze 179 lokalit. Kompletní data jsou zaznamenána v Příloze 1.



Obr. 13 – Přehledová mapa České republiky s nálezy ptačích schistosom a cercariové dermatitidy mezi lety 1966 a 2020.

3.1.2. Data z terénu – vlastní výzkum

Data z vyšetřování vodních plžů

Mezi lety 2018-2020 bylo vyšetřeno celkem 6878 jedinců vodních plžů ze skupin Pulmonata i Prosobranchia na 34 lokalitách, mezi které je zahrnuto i vyšetřování plžů z Bolevecké rybníční soustavy, kde probíhaly sběry opakovaně. Z plicnatých byly nacházeni zástupci čeledí Lymnaeidae, Physidae a Planorbidae, z předožábrých pak Bithyniidae, Hydrobiidae a Valvatidae. Plži vylučující cercárie ptačích schistosom byli nalezeni na 16 lokalitách a patřili do čeledí Lymnaeidae (28 infikovaných jedinců; druhy *Lymnaea stagnalis*, *Radix auricularia*, *Radix labiata* a *Radix* sp.) a Planorbidae (2 infikovaní jedinci; druh *Anisus* sp. a *Gyraulus* sp.). Tyto záznamy jsou uvedeny v Tab. 19. Nalezené cercárie byly podrobeny molekulární analýze pro spolehlivé zařazení do druhu. Cercárie, u kterých nebyla získána sekvence DNA, byly určeny na základě specifity k mezipřítelstevskému plži, v němž byly nalezeny a označeny jako cf (= confer; tzn. připomínající tento druh).

V rámci sledování faktorů ovlivňujících výskyt ptačích schistosom byli plži sbíráni na plzeňské Bolevecké rybníční soustavě v průběhu devíti výjezdů od října roku 2018 do února roku 2020. Celkem bylo na plzeňské Bolevecké rybníční soustavě od října 2018 do února 2020 vyšetřeno 1719 plžů, z nichž devět bylo pozitivních na cercárie dvou druhů ptačích schistosom (celková prevalence 0,5 %). Šlo o pět plovatek *L. stagnalis* vylučujících *T. szidati* (celková prevalence 0,9 %) z rybníků Třemošenský (prevalence 7,9 %) a Velký Bolevecký (prevalence 0,5 %) a čtyři jedince druhu *R. auricularia* s *T. franki* (celková prevalence 1,6 %) z rybníků Šídlovský (prevalence 3 %) a Velký Bolevecký (prevalence 1,2 %). Počty a prevalence plžů z výjezdů, kde byli nalezeni jedinci pozitivní na ptačí schistosomy, jsou rovněž zaznamenány v Tab. 19 a označeni tmavě šedou barvou.

Tab. 19 – Lokality (n = 16) s potvrzeným výskytem cercárií ptačích schistosom z celkem 34 prověřovaných lokalit. Tmavě šedě jsou zvýrazněny výjezdy na plzeňskou Boleveckou rybníční soustavu v rámci sledování faktorů ovlivňujících výskyt ptačích schistosom v období od října 2018 do února 2020.

Lokalita	Druh plže	Druh ptačí schistosomy	Počet nalezených jedinců	Počet infikovaných jedinců / prevalence
Rybník Marvánek – Říčany	<i>Radix auricularia</i>	<i>Trichobilharzia cf. franki</i>	51	1 / 2 %
Rybník Jureček – Říčany	<i>Radix auricularia</i>	<i>Trichobilharzia cf. franki</i>	30	2 / 6,7 %
			257	2 / 0,8 %
Jezero Michal – Sokolov	<i>Radix auricularia</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	1	1 / 100 %

Kolovský rybník – Karlovy Vary	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	213	4 / 7,5 %
			210	7 / 3,3 %
			158	1 / 0,6 %
Rybník Vejsplachy – Vrchlabí	<i>Radix auricularia</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	83	2 / 2,4 %
Vodní nádrž Slunečná – Vrchlabí	<i>Radix auricularia</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	294	3 / 1 %
Rybník Sv. Kateřina - Trutnov	<i>Radix labiata</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	191	2 / 1 %
Tůň v Modřanech – Praha	<i>Anisus sp.</i>	<i>Trichobilharzia sp.</i>	14	1 / 7,1 %
Rohozenský velký rybník – Chrudim	<i>Radix auricularia</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	2	2 / 100 %
Rybník Šanda – Chrudim	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Trichobilharzia cf. szidati</i>	213	4 / 1,9 %
Rybník – Tachov	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	185	3 / 1,6 %
Šídlovský rybník	<i>Radix auricularia</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	41	3 / 7,3 %
	<i>Gyraulus sp.</i>	<i>Trichobilharzia sp.</i>	3	1 / 33,3 %
Rybník Nováček	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	50	1 / 2 %
Třemošenský rybník	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	8	1 / 12,5 %
			8	2 / 25 %
Rybník Košinář– Plzeň	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	242	3 / 1,2 %
Velký Bolevecký rybník – Plzeň	<i>Lymnaea stagnalis</i>	<i>Trichobilharzia szidati</i>	52	1 / 1,9 %
			55	1 / 1,8 %
	<i>Radix auricularia</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	36	1 / 2,8 %

Data z pitev vodního ptactva

Na přítomnost ptačích schistosom bylo vyšetřováno i vodní ptactvo. Parazitologickou pítvou se zaměřením na ptačí schistosomy bylo vyšetřeno celkem 34 labutí velkých (*Cygnus olor*) získaných z plzeňské Bolevecké rybníční soustavy a okolí, tři labutě nalezené v Praze, jedna kachna divoká (*Anas platyrhynchos*) z rybníku Sv. Kateřina v Trutnově a jedna lyska černá (*Fulica atra*) z Velkého Boleveckého rybníka v Plzni. Z toho bylo 29 ptáků pozitivních na ptačí schistosomy (viz Tab. 20).

Pozitivní nálezy byly u labutí a kachny, pitva lysky přítomnost ptačích schistosom neprokázala. Nacházena byla především vajíčka a dospělci ptačích schistosom, v případě kachny byla nalezena i schistosomula v plicích. Druhy ptačích schistosom nalezené u pitvaných ptáků byly *Trichobilharzia filiformis* u 27 labutí (prevalence 79,4 %), *Allobilharzia visceralis* u 26 labutí (prevalence 76,5 %), *Trichobilharzia franki* u jedné labutě (prevalence 2,9 %) a jedné kachny (prevalence 100 %) a *Trichobilharzia regenti* u šesti labutí (prevalence 17,6 %). Celková prevalence u labutí tedy byla 82,4 %. Mezi labutěmi byla ve 25 případech prokázána koinfekce i více než dvěma druhy ptačích schistosom. Koinfekce dvěma druhy ptačích schistosom se vyskytla u 21 labutí, koinfekce třema druhy u čtyřech labutí (viz Tab. 21).

Tab. 20 – Nálezy ptačích schistosom při parazitologických pitvách vodního ptactva z různých lokalit v letech 2018-2020

Okres	Hostitel	Druh ptačí schistosomy	Stadium ptačí schistosomy	Počet jedinců nakažených daným druhem parazita
Plzeň	<i>Cygnus olor</i>	<i>Allobilharzia cf. visceralis</i>	dospělci; vajíčka	25
		<i>Trichobilharzia cf. filiformis</i>	vajíčka	26
		<i>Trichobilharzia cf. franki</i>	vajíčka	1
		<i>Trichobilharzia cf. regenti</i>	vajíčka	4
Praha	<i>Cygnus olor</i>	<i>Allobilharzia. cf. visceralis</i>	dospělci; vajíčka	1
		<i>Trichobilharzia cf. filiformis</i>	vajíčka	1
		<i>Trichobilharzia cf. regenti</i>	vajíčka	2
Trutnov	<i>Anas platyrhynchos</i>	<i>Trichobilharzia franki</i>	dospělci; vajíčka; schistosomula	1

Tab. 21 – Koinfekce různými druhy ptačích schistosom u pitvaných vodních ptáků z různých lokalit z let 2018-2020

Lokalita	Hostitel	<i>A. visceralis</i> + <i>T. filiformis</i>	<i>A. visceralis</i> + <i>T. regenti</i>	<i>A. visceralis</i> + <i>T. filiformis</i> + <i>T. regenti</i>
Plzeň	<i>C. olor</i>	20x	1x	3x
Praha	<i>C. olor</i>	-	-	1x

3.1.3. Data z vědecké i nevědecké literatury a osobní komunikace

Data z vědeckých článků

Pro vytvoření přehledové i interaktivní mapy byla využita data z vědeckých článků. Články z let 1960-2013 jsou s počtem 155 záchytů ve zdrojích dat nejzastoupenější. Z těchto dat bylo 87 záznamů z vodních plžů, 48 z ptáků a 20 záznamů cercáriové dermatitidy. Mezi plži převažovala skupina Lymnaeidae (70 záznamů, 80,5 % z celkového počtu všech skupin plžů) s druhy ptačích schistosom *T. szidati* a *T. ocellata* (57 záznamů), *T. franki* (7 záznamů), *T. regenti* (2 záznamy) a *Trichobilharzia* sp. (2 záznamy). Ve dvou případech nebyl druh ptačí schistosomy uveden. V menší míře byli zastoupeni plži čeledi Planorbidae (16 záznamů, 18,4 % z celkového počtu všech skupin plžů) s druhy *Gigantobilharzia vittensis* (1 záznam), *Bilharziella polonica* (8 záznamů) a neznámý druh ptačí schistosomy (7 záznamů). Nejméně bylo plžů z čeledi Physidae (1 záznam, 1,1 % z celkového počtu všech skupin plžů) s druhem ptačí schistosomy *Gigantobilharzia* sp. Záznamy z vodního ptactva zahrnovaly široké spektrum hostitelů především z řádu Anseriformes (35 záznamů, 72,9 % z celkového počtu všech skupin ptáků) s druhy ptačích schistosom *B. polonica* (24 záznamů), *T. regenti* (6 záznamů) a *Dendritobilharzia pulverulenta* (5 záznamů). Dalšími zastoupenými řády ptáků byly Gruiformes (8 záznamů, 16,7 % z celkového počtu všech skupin ptáků) s druhy ptačích schistosom *D. pulverulenta* (4 záznamy) a *Gigantobilharzia acotylea* (4 záznamy), řád Charadriiformes (2 záznamy, 4,2 % z celkového počtu všech skupin ptáků) s druhem ptačí schistosomy *Ornithobilharzia canaliculata* (2 záznamy), řád Pelecaniformes (1 záznam, 2,1 % z celkového počtu všech skupin ptáků) s druhem ptačí schistosomy *B. polonica* a Podicipediformes (2 záznamy, 4,2 % z celkového počtu všech skupin ptáků) s druhem ptačí schistosomy *B. polonica* (2 záznamy).

Data ze závěrečných prací studentů VŠ

Do map bylo zahrnuto i 68 údajů z výzkumů osmi studentů vysokých škol s nálezy z let 1997-2017. I mezi těmito daty převažují záznamy z vodních plžů (57 záznamů) a to především z čeledi Lymnaeidae (46 záznamů, 80,7 % z celkového počtu všech skupin plžů) s druhy ptačích schistosom *T. szidati* (21 záznamů), *T. franki* (8 záznamů), *T. regenti* (5 záznamů), *Trichobilharzia* sp. (3 záznamy) a v devíti případech není druh schistosomy uveden. Méně zástupců vodních plžů bylo z čeledi

Planorbidae (9 záznamů, 15,8 % z celkového počtu všech skupin plžů) s druhy ptačích schistosom *Gigantobilharzia vittensis* (1 záznam), *Gigantobilharzia* sp. (3 záznamy), schistosoma příbuzná rodům příbuzný *Dendritobilharzia* a *Gigantobilharzia*, druhy Schistosomatidae gen. sp., Schistosomatidae gen. sp. 1 a Schistosomatidae gen. sp. 2 (vždy po jednom záznamu) a v jednom případě neuvedený druh ptačí schistosomy. Nejméně bylo plžů z čeledi Physidae (2 záznamy, 3,5 % z celkového počtu všech skupin plžů) s druhem ptačí schistosomy *Gigantobilharzia* sp. (2 záznamy). Zastoupení byli rovněž ptáci (11 záznamů) řádu Anseriformes s nalezenými druhy ptačích schistosom *T. szidati* (4 záznamy), *T. regenti* (4 záznamy) a *T. filiformis* (3 záznamy). Zmínky o cercáriové dermatitidě v těchto typech prací chybí.

Data z hygienických stanic a zdravotních ústavů

Údaje z hygienických stanic a zdravotních ústavů z let 2009-2020 čítají 130 záchyťů z nichž 10 patřilo nálezům cercárií ptačích schistosom v plžích čeledi Lymnaeidae (devět záznamů) a čeledi Planorbidae (jeden záznam). Druhy ptačích schistosom jsou ve většině případech omezeny na *Trichobilharzia* sp., v jednom případě je druh z plže *Radix* sp. udán jako *T. regenti*. Zbylé záznamy (121) pak patřily cercáriové dermatitidě.

Data z novinových článků

Z novinových článků publikovaných na internetu byly čtyři záznamy cercáriové dermatitidy. Tyto záznamy jsou zároveň zařazeny i v jiných kategoriích zdrojů (KHS, osobní komunikace). Pro tyto typy sdělovacích prostředků jsou typické výrazné epidemie CD, které vzbuzují pozornost nejen u pracovníků hygienických stanic, kteří případy vyšetřují, ale také u novinářů. V případě, že jsou informace o takových případech podpořeny i například hygienickými stanicemi, mohou být novinové články jako zdroje záznamů o výskytu CD spolehlivé.

Data získaná osobní komunikací

Celkem bylo získáno 50 záznamů o výskytu ptačích schistosom díky osobní komunikaci s odbornou i laickou veřejností. 30 z těchto záznamů se týkaly cercárií z vodních plžů převážně čeledi Lymnaeidae, méně Planorbidae, 9 z vodních ptáků a 11 bylo záznamů CD. Záznamy byly získány především komunikací s odbornou veřejností a je tedy předpoklad, že jsou spolehlivé. Určení druhu nalezené ptačí schistosomy byly ve většině případů pouze na základě morfologie a hostitele. Rovněž mezihostitelé byly určování jen dle morfologie ulity.

3.2. Zhodnocení faktorů ovlivňujících výskyt ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy

Pro zhodnocení faktorů sloužila Bolevecká rybníční soustava (viz kap. 2.2.1.). Kromě sběrů vodních plžů byly na každém z rybníků měřeny parametry jako teplota vzduchu a vody, pH a vodivost vody, množství chlorofylu a ve vodě a její průhlednost a pozorován vodní rostliny, typ substrátu a živočichové (ptáci a ryby). Souhrn nejdůležitějších výsledků získaných analýzou těchto dat je níže v kapitole 3.2.1. a 3.2.2., kompletní přehled všech naměřených parametrů lze najít v příloze 2. Výsledky ze rybníku Košinář v období od května do září 2019 nejsou k dispozici z důvodu jeho vypuštění v dubnu 2019

3.2.1. Sledování abiotických proměnných

Pro zhodnocení souvislosti s výskytem vodních plžů za pomoci statistických analýz byly jako abiotické faktory využity měřené parametry vody. Těmito parametry byly teploty vzduchu a vody, pH, vodivost, množství chlorofylu-a a průhlednost vody.

Teplota vzduchu a teplota vody: Dle předpokladu byli vodní plži nejvíce nacházeni v letních, a tedy nejteplejších měsících s teplotami vzduchu cca od 17 do 28 °C a vody cca od 20 do 27 °C. V průběhu letních měsíců bylo z tohoto důvodu uskutečněno nejvíce výjezdů (každý měsíc od června do září). Při měření teploty vody během jednoho výjezdu v červenci byly hodnoty na Nováčku a Třemošenském rybníku naměřeny o 3-4 °C vyšší (cca 24 °C) než na ostatních rybnících. Na tyto rybníky dopadá z důvodu menšího zastínění okolními stromy sluneční svit po větší část dne, než je tomu u dalších rybníků. Výkyv teplot byl pozorován i při květnovém výjezdu (nejvyšší teplota 15,9 °C na Šídlovském rybníku, nejnižší 12,6 °C na Velkém Boleveckém rybníku) a v září (nejvyšší teplota 20,6 °C na Nováčku, nejnižší 17,2 °C na Malém Boleveckém rybníku). V průběhu ostatních výjezdů se teploty vody na všech lokalitách lišily průměrně o 1,8 °C.

pH: Nejvíce plžů bylo nalezeno při neutrálním či slabě zásaditým pH, takové pH zároveň bylo nejčastější (viz. Tab. 22). Naopak při nízkém pH (pod 6) nebyli nalezeni žádní plži. Tato situace se objevila na Seneckém rybníku, který byl roce 2016 vypuštěn a odbahněn. Od jara 2019 se zde radikálně snížilo pH ze slabě zásaditého (8,31) na kyselé (4,19) a vodní plži, ale i další živočichové z rybníka vymizeli. V průběhu sledovaného období (tedy od října 2018 do února 2020) se pH mírně měnilo na Malém Boleveckém a Kamenném rybníku, kde byl sledován trend snižování pH. Na výskyt vodních plžů to však pravděpodobně vliv nemělo. Na ostatních rybnících se hodnoty pH v průběhu roku příliš neměnily (průměrná odchylka 1,5) a zároveň byly velmi podobné i mezi rybníky (průměrná odchylka 1,2).

Tab. 22 - Průměrně naměřené hodnoty pH acelkové počty vodních plžů z rybníků Bolevecké rybníční soustavy při výzkumu faktorů ovlivňující výskyt vodních plžů v období od října 2018 do února 2020

Název rybníku	Průměrné pH	Počet plžů
Šídlovský rybník	7,8	261
Nováček	7,7	135
Třemošenský rybník	7,7	287
Senecký rybník	5,6	36
Košinář *	6,6	31
Malý Bolevecký rybník	7,2	209
Velký Bolevecký rybník	7,7	682
Kamenný rybník	7,6	82

* v období květen-září 2019 byl výzkum přerušen z důvodu vypuštění rybníka

Vodivost: Hodnoty vodivosti vody v rybnících (viz Tab. 23) se pohybovaly mezi 249 a 755 $\mu\text{S/cm}$, přičemž nejvyšší hodnoty byly naměřeny na Nováčku (536-755 $\mu\text{S/cm}$), nejnižší na Kamenném rybníku (249-293 $\mu\text{S/cm}$), na kterém zároveň bylo nacházeno obvykle velmi malé množství vodních plžů (především plži čeledi Physidae). Během sledovaného období byla pozorována změna hodnoty vodivosti na rybnících Nováček, Malý Bolevecký, kde v listopadu 2018 byly hodnoty nejnižší, v únoru 2020 naopak nejvyšší. V období mezi těmito měsíci byla vodivost víceméně konstantní. Souviset by to mohlo s pH, které v listopadu 2018 bylo na obou rybnících vyšší než v únoru 2020. Na Seneckém rybníce byl v menší míře pozorován trend zvyšování vodivosti v průběhu sledovaného období. Opět by zde mohla být souvislost s pH.

Tab. 23 - Průměrně naměřené hodnoty vodivosti a celkové počty vodních plžů z rybníků Bolevecké rybníční soustavy při výzkumu faktorů ovlivňující výskyt vodních plžů v období od října 2018 do února 2020

Název rybníku	Průměrná vodivost ($\mu\text{S/cm}$)	Počet plžů
Šídlovský rybník	671	261
Nováček	663	135
Třemošenský rybník	497	287
Senecký rybník	595	36
Košinář *	584	31
Malý Bolevecký rybník	542	209
Velký Bolevecký rybník	436	682
Kamenný rybník	262	82

* v období květen-září 2019 byl výzkum přerušen z důvodu vypuštění rybníka

Chlorofyl-a a průhlednost: Chlorofyl-a se ve vodě nacházel v množství 4,42-30,37 µg/l s průměrně naměřenými hodnotami 8,03 µg/l. Průhlednost byla mezi 30 a 190 cm. Pozorována byla korelace mezi množstvím chlorofylu-a a průhledností vody, což je očekávatelný jev vyskytující se na přírodních vodních plochách. Tyto parametry na sobě byly nepřímo závislé. Na průhlednost vody může mít dále vliv také rybí obsádka kdy například kaprovité ryby ryjí ve dně a tím snižují průhlednost. Při velkém množství ryb dochází k eutrofizaci vody, což průhlednost také snižuje. Naopak vodní makrofyta mají příznivý vliv na průhlednost vody. Makrofyta vytěží živiny z vody namísto řas, které tak ve vodě nenarostou. Zároveň jsou na nich přisedlé organismy filtrující vodu. V rámci výzkumu nebyla pozorována souvislost mezi výskytem vodních plžů a chlorofylem-a (viz Tab. 24) či průhledností vody.

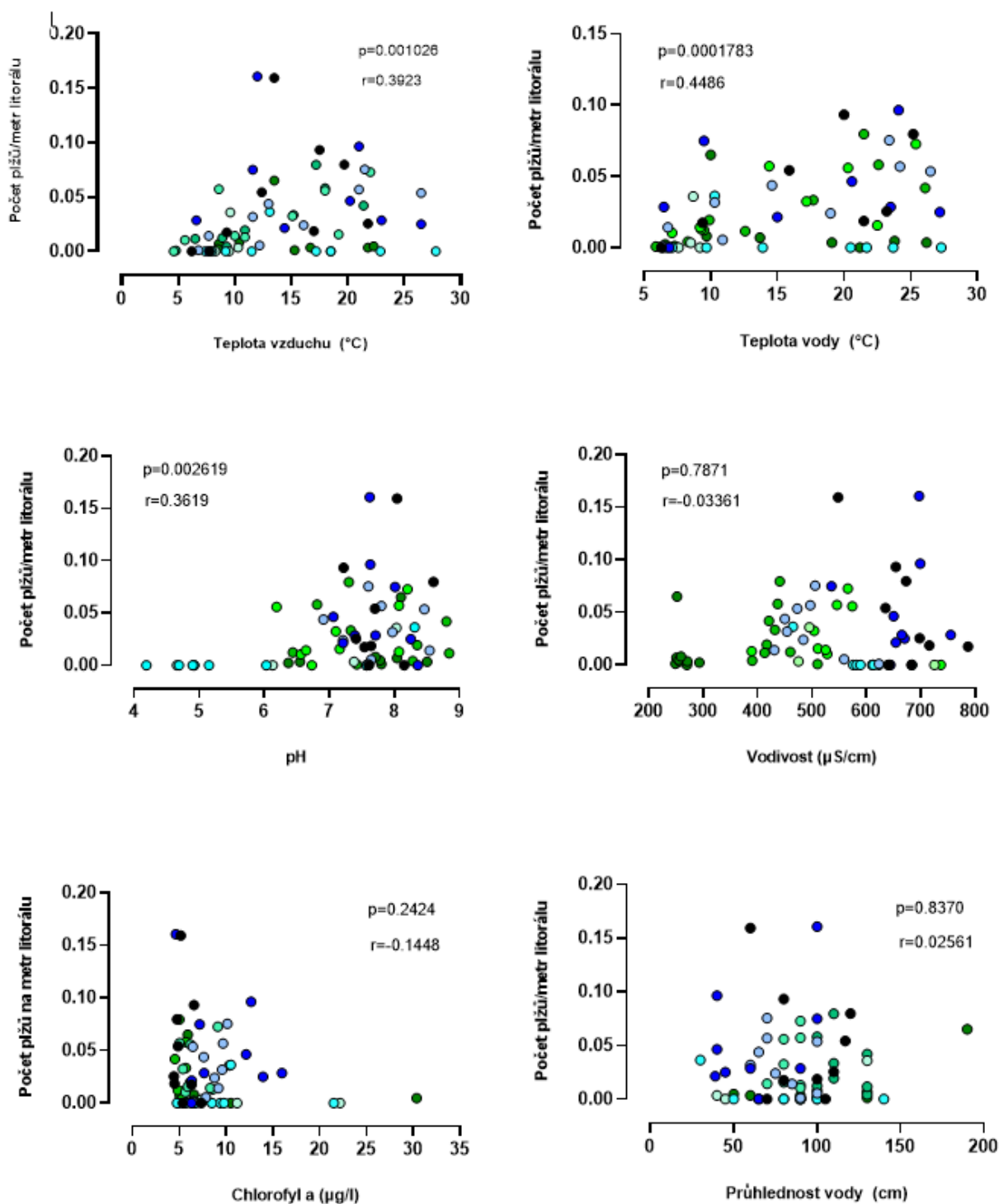
Tab. 24 - Průměrně naměřené hodnoty chlorofylu-a a celkové počty vodních plžů z rybníků Bolevecké rybníční soustavy při výzkumu faktorů ovlivňující výskyt vodních plžů v období od října 2018 do února 2020

Název rybníku	Průměrné hodnoty chlorofylu-a (µg/l)	Počet plžů
Šídlovský rybník	5,48	261
Nováček	9,64	135
Třemošenský rybník	8,41	287
Senecký rybník	9,28	36
Košinář *	12,77	31
Malý Bolevecký rybník	6,57	209
Velký Bolevecký rybník	5,44	682
Kamenný rybník	9,48	82

* v období květen-září 2019 byl výzkum přerušen z důvodu vypuštění rybníka

Statistické zhodnocení vybraných faktorů

Všechny měřené kvantitavní faktory byly statisticky zpracovány a byla zhodnocena souvislost mezi těmito faktory a výskytem vodních plžů (viz Obr. 14). Signifikantní korelace ($p < 0,05$) mezi výskytem vodních plžů a jednotlivými proměnnými byla pozorována u pH ($p = 0,003$), teploty vody ($p = 0,0002$) a teploty vzduchu ($p = 0,001$). Naopak asociace mezi výskytem plžů a vodivostí, chlorofylem-a a průhledností vody statisticky významná nebyla ($p > 0,05$). To může být způsobeno relativně krátkým obdobím (říjen 2018-únor 2020) studia vlivu těchto faktorů na vodní plže.



Obr. 14 – Grafické zobrazení korelací výskytu vodních plíží v rybnících Bolevecké rybníční soustavy na teplotě vzduchu a vody, pH, vodivosti, chlorofylu a a průhlednosti vody. P-hodnota je značena písmenem **p**, **r** značí Spearmanův korelační koeficient. Hladina statistické významnosti je $p=0,05$.

Legenda:

- Šídlovský rybník
- Nováček
- Třemošenský rybník
- Senecký rybník
- Košinář
- Malý Bolevecký rybník
- Velký Bolevecký rybník
- Kamenný rybník

3.2.2. Sledování biotických proměnných

Na lokalitách byla sledována přítomnost vodních rostlin různých morfotypů, různého typu a frakce substrátu v litorálu rybníků a spektra živočichů, kteří na lokalitách pobývají a mohou mít vliv na přítomnost ptačích schistosom. Tyto potenciální faktory byly pozorovány i na dalších rybnících v České republice v rámci terénních výjezdů mimo Boleveckou soustavu spojených se sběrem vodních plžů za účelem zjištění přítomnosti ptačích. Nejsou však zahrnuty do statistických analýz, která se v této diplomové práci týká pouze dat z bolevecké soustavy.

Význam vodních rostlin

U různých druhů vodních plžů byla zaznamenána preference pobytu na různých typech vodních rostlin. Rostliny plžům poskytovaly nejen zdroj obživy, ale také například vhodný podklad pro kladení snůšek. Vodní makrofyta rostoucí v litorálním pásmu rybníků byla z hlediska preferencí plžů pro účely diplomové práce rozdělena do dvou základních skupin:

1. **Ponořené jemnolisté rostliny:** Z jemnolistých rostlin rostoucích pod hladinou se v rybnících nacházel stolístek (*Myriophyllum* spp.), růžkatec (*Ceratophyllum* spp.) a vodní mor kanadský (*Elodea canadensis*). Na těchto rostlinách byly nalézány především drobní plži čeledi Planorbidae (např. *Gyraulus* sp.). Zároveň v rámci chovu a experimentů prováděných v akváriích v laboratoři (viz kap. 2.3.4.) byla pozorována silná vazba těchto plžů na drobnolisté rostliny, na jejichž listy zároveň kladli snůšky vajíček, ačkoli měli k dispozici i jiný typ podkladu (např. stěny akvária). Afinita k jemnolistým rostlinám byla na jedné lokalitě zaznamenána i u plžů *R. auricularia*.

2. **Částečně ponořené „tuholisté“ rostliny:** Na rostlinách jako je rákos *Phragmites* spp. či orobinec *Typha* spp. byla zaznamenána vysoká afinita plžů druhu *L. stagnalis* či *P. corneus*. Plži druhu *L. stagnalis* se rovněž vyskytovali na spodní straně listů leknínů *Nymphaea alba* či stulíků *Nuphar lutea*, kde zároveň byly pozorovány jejich snůšky. Na těchto rostlinách byli v menší míře nacházeni i plži druhu *R. auricularia*.

Význam typu substrátu

Přítomnost vodních plžů byla vázána i na substráty různých frakcí, které pro plže mohly znamenat různé výhody při získávání potravy, ochraně před predátory, ukládání snůšek či pohybu. Pro účely diplomové práce byly jednotlivé frakce substrátu rozděleny dle velikosti do následujících kategorií: velmi jemná frakce – cca 0,002-0,063 mm (bahno), cca 0,06-2 mm (písek), cca 2-60 mm (štěrk), cca 60-200 mm (kameny) a cca >200 mm (balvany). Zároveň byl zaznamenáván i spadlý materiál ze stromů (listí, větve, kůra), na kterém mohou být vodní plži přichyceni.

Bahno: V oblastech rybníků s bahnitým litorálem se často nacházeli plži *R. auricularia* a částečně i *Bithynia* sp. Obvykle přisedali k různým předmětům jako jsou větve, kůra stromů či kameny (viz dále), ani jejich nálezy z holého bahnitého dna však nebyly vzácné.

Písek a štěrk: Na souvislé písečné ploše obvykle žádní plži nalézání nebyli. Písek se často nacházel v místech, kde rostly i částečně ponořená vodní makrofyta, vyskytovaly se zde tedy druhy *L. stagnalis*, *P. corneus* či *R. auricularia*. V případě experimentů prováděných v akváriích v laboratoři plži rodu *Gyraulus* vykazovali preferenci písku či štěrku jako substrátu před většími kameny.

Kameny a balvany: Na svrchní straně nezapojených menších kamenů (o délce strany cca do 200 mm) se často vyskytovali plži čeledi Physidae a na spodní části kamenů byli nalézání hlavně plži *Bithynia* sp. Zástupci druhu *R. auricularia* byli nacházeni na nezapojených balvanech (>200 mm) především na hrázích rybníků.

Spadaný materiál: Plži *Bithynia* sp. či *Gyraulus* sp., ale i *R. auricularia* rovněž byli nacházeni převážně na spodní straně spadaného materiálu jako jsou větve, borka či listy z okolních stromů.

Význam přítomnosti vodního ptactva a různého spektra ryb

Kromě vodní vegetace a substrátu byla na lokalitách sledována také přítomnost vodního ptactva a ryb. Zatímco výskyt ptáků je v souvislosti s ptačími schistosomami spojen přímo díky tomu, že jsou možnými definitivními hostiteli, ryby významně ovlivňují populaci vodních plžů, kteří mohou být součástí jejich potravy, rovněž mohou požírat vodní rostliny, rozrývat dno a způsobovat zákal ve vodě. To vše může významně ovlivnit schopnost ptačích schistosom udržet se na lokalitě dlouhodobě.

Vodní ptactvo: Na rybnících s prokázaným výskytem ptačích schistosom v plžích byly vždy alespoň po část roku pozorováni vodní ptáci. Na Velkém Boleveckém rybníce se ptáci (zejména labutě) vyskytují po celý rok a ptáci z okolních lokalit využívají rybník i jako zimoviště. Při odečítání kroužků labutí byl zaznamenán pohyb po různých lokalitách včetně zahraničních, což může znamenat zdroj dalších druhů ptačích schistosom. Vodní ptáci se vyskytovali na všech rybnících Bolevecké rybniční soustavy během sledovaného období alespoň při jednom z výjezdů. Z vlastního pozorování to byly především kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) a labutě velké (*Cygnus olor*), na Velkém Boleveckém rybníku byly vždy přítomny také lysky černé (*Fulica atra*) a kormoráni velcí (*Phalacrocorax carbo*), na Malém Boleveckém se vyskytovaly volavky popelavé (*Ardea cinerea*). Kromě těchto mnou pozorovaných ptáků v rámci výzkumu na lokalitách bylo zaznamenáváno jinými pozorovateli mnoho dalších hnízdících i nehnízdících druhů. Těmito druhy byly například ptáci z řádu Anseriformes – polák velký (*Aythya ferina*), polák chocholačka (*Aythya fuligula*), rzohlávka rudozobá (*Netta rufina*), hohol severní (*Bucephala clangula*), husa velká (*Anser anser*), labuť zpěvná (*Cygnus cygnus*) či kopřivka obecná (*Anas strepera*), dále také ptáci z řádu Gaviiformes s druhem potáplice severní

(*Gavia arctica*) a ptáci z řádu Podicipediformes s druhy potápka roháč (*Podiceps cristatus*) či potápka žlutorohá (*Podiceps auritus*). Pro výskyt ptačích schistosom mají význam především ptáci z řádu Anseriformes (hlavně kachny a labutě, případně poláci).

Spektrum ryb: Protože rybníky bolevecké soustavy jsou využívány především k rekreaci, je kladen tlak na vysokou kvalitu vody. S tím souvisí i množství a spektrum ryb, které je kontrolováno především na Velkém Boleveckém rybníce, kde každoročně probíhá monitoring. Je zde snaha především o regulaci kaprovitých ryb – cejn velký (*Abramis brama*), perlín ostrobřichý (*Scardinius erythrophthalmus*) a plotice obecná (*Rutilus rutilus*), pomocí nasazování ryb dravých – např. bolen dravý (*Leuciscus aspius*) či štika obecná (*Esox lucius*). Přítomny byly také další druhy ryb – kapr obecný (*Cyprinus carpio*), tolstobik bílý (*Hypophthalmichthys molitrix*), tolstobec pestrý (*Hypophthalmichthys nobilis*), úhoř říční (*Anguilla anguilla*), okoun říční (*Perca fluviatilis*), amur bílý (*Ctenopharyngodon idella*), sumec velký (*Silurus glanis*) či candát obecný (*Sander lucioperca*). Obsádka ostatních rybníků je méně přísně kontrolována a spektrum ryb je nižší. Obsádku na Šídlovském rybníku tvoří kapr, amur a štika, na Nováček byly na jaře 2019 vysazeny trofejní ryby, především kapr a amur, na Třemošenském rybníku byli přítomni kapr a amur, na Košináři byli až do vypuštění a odlovení na jaře 2019 přítomni rovněž převážně kapři a amuři, na Malém Boleveckém rybníku se nacházeli plotice, perlín, cejn, úhoř, okoun, štika, bolen a lín obecný (*Tinca tinca*) a na Kamenném rybníce se vyskytovali štiky, okouni, kapři, plotice, perlíni a cejni. Kamenný rybník nebyl od roku 1996 loven z důvodu okolní přírodní rezervace. Senecký rybník byl bez obsádky. Na výskyt ptačích schistosom mohou mít vliv především dravé ryby, pro které mohou vodní plži představovat součást potravy a tím může docházet k redukci plžů. Omezující pro plže může být i zakalená voda, což mohou způsobovat například ryby ryjící ve dně.

3.3 Nové poznatky o *Trichobilharzia filiformis*

Při pitvách labutí a vyšetřování čerstvého trusu na přítomnost ptačích schistosom byla pravidelně nacházena různá stadia *T. filiformis*, která byla následně využita k dalším experimentům s cílem vyplnit mezery v doposud publikované charakterizaci tohoto druhu se zaměřením na zjištění vhodného mezihostitele, popisu larválního vývoje a potenciálu působit CD u lidí. Z tohoto hlediska byla velmi významná miracidia získaná z trusu a použita pro experimentální nákazy vodních plžů, ze kterých byly následně získány informace o sporocystách i cercáriích.

3.3.1. Data z experimentálních nákaz

Miracidii získanými z trusu labutí (viz kap. 2.3.3.) byli experimentálně nakažováni vodní plži různých druhů. Úspěšně infikovaní plži vylučovali cercárie, které byly využity pro nákazy kachen za

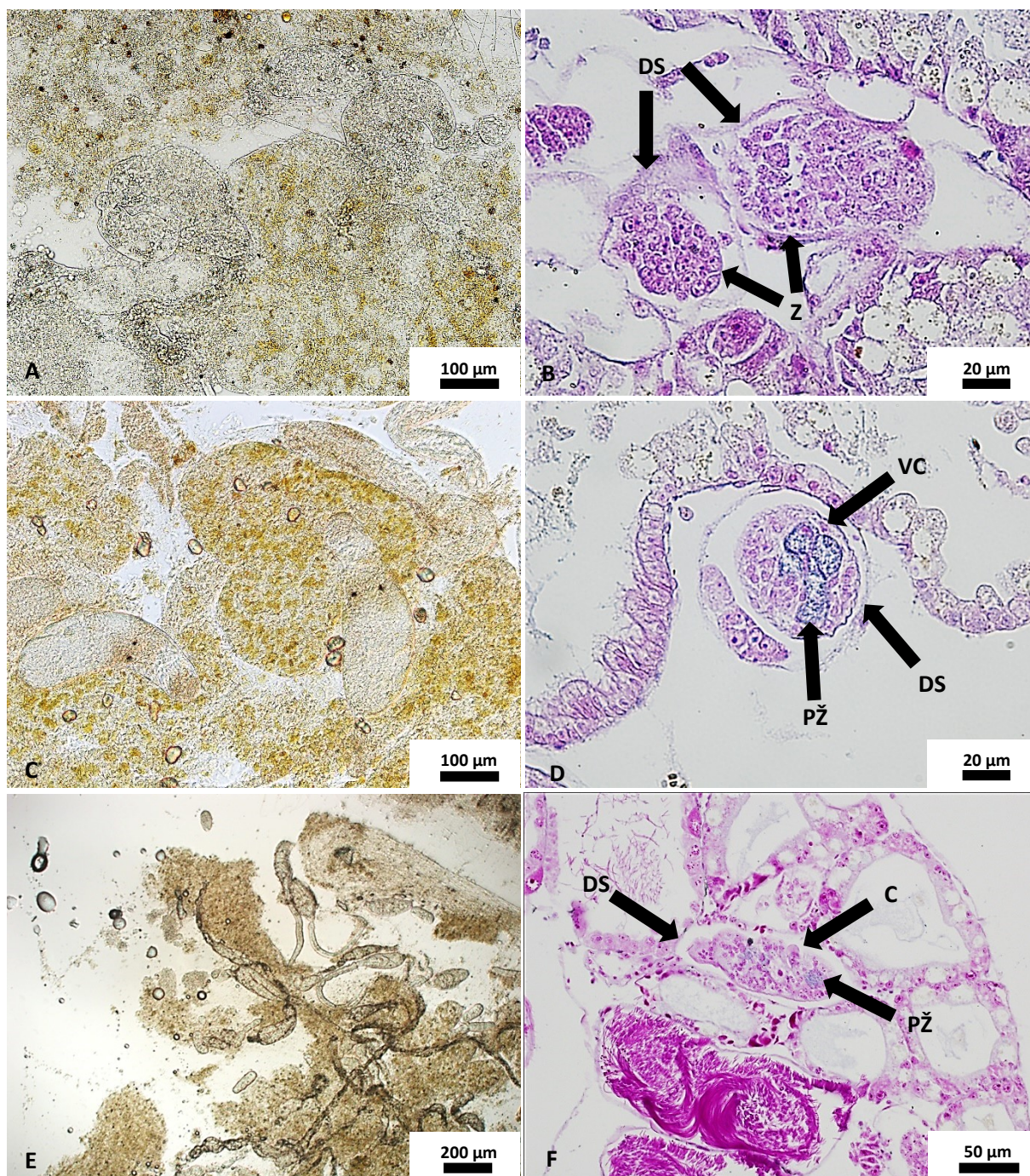
účelem pokusu o zavedení cyklu *T. filiformis* v laboratoři, myší pro zjištění schopnosti penetrace kůže savčího hostitele a lidských dobrovolníků pro zjištění schopnosti působit cercáriovou dermatitidu.

Experimentální nákazy vodních plžů

Během sběrů vodních plžů na boveveckých rybnících, z nichž pocházely labuť nakažené *T. filiformis*, byla zjištěna absence plžů rodu *Anisus*, ve kterých byl výskyt cercárií *T. filiformis* předpokládán. Miracidiím získaným z trusu labutí byly proto experimentálně vystaveny jiné druhy vodních plžů, které se na lokalitách s pozitivními ptáky vyskytovaly. Těmito druhy byly *Gyraulus* sp., *Planorbarius corneus* a *Planorbis planorbis* z čeledi Planorbidae. Dále byly pro nákazy zvoleny následující druhy vodních plžů: *Anisus* sp. a *Hippeutis* sp. jako další možní hostitelé z čeledi Planorbidae, *Planorbella duryi* z čeledi Planorbidae jako potenciální mezihostitel, kterého lze snadno chovat v akvakultuře a *Lymnaea stagnalis* z čeledi Lymnaeidae pro případ, že by předpoklad o druhové příslušnosti nebyl správný. Všechny druhy planorbidních plžů využité pro nákazu byly podrobeny molekulární analýze pro potvrzení druhové determinace. Druhy *P. corneus* a *P. duryi* byli potvrzeni prostřednictvím sekvenace oblasti ITS-2 rDNA. Na základě analýzy 16S rDNA byl určen druh *P. planorbis* (GenBank: MK168772) a pouze do rodu byl určen *Gyraulus* sp. (GenBank: LC428936). U plžů *Anisus* sp. a *Hippeutis* sp. se DNA nepodařilo izolovat a byli tedy určeni pouze na základě morfologie. Plži *L. stagnalis* pocházeli z laboratorních chovů, proto u nich molekulární analýza nebyla nutná. Molekulární analýze pro ověření druhu byla rovněž podrobena miracidia využitá k nákaze plžů.

Sledování vývoje sporocyst *T. filiformis* v mezihostiteli

Vývoj *T. filiformis* uvnitř mezihostitelského plže byl sledován pomocí roztlakových preparátů v týdnech 3, 4 a 5 po nákaze. Pitvy plžů začaly ve 3. tpi, kdy byly v hepatopankreatu plže pozorovány dceřinné sporocysty se zárodky cercárií (viz Obr. 15A, B). 4. tpi byly v uvnitř sporocyst pozorovány cercárie již s vyvíjejícími se penetračními žlázami a znatelně formovaným ocáskem viz Obr. 15C, D), v 5. tpi byly v hepatopankreatu plžů již plně vyvinuté cercárie, které dceřinné sporocysty a následně i plže po stimulaci světlem opouštěly (viz Obr. 15E, F).



Obr. 15 – Vývoj sporocyst a cercárií v hepatopankreatu plžů *Gyraulus* sp. **A), B)** 3. tpi – roztakový (A) a histologický (B) preparát hepatopankreatu s dceřinými sporocystami se zárodky cercárií; **C), D)** 4. tpi – roztakový (C) a histologický (D) preparát hepatopankreatu s vyvíjejícími se cercáriemi (po roztlačení byly cercárie volně v hepatopankreatu) na obr. C a uvnitř dceřině sporocysty na obr. D; **E), F)** 5. tpi – roztakový (E) a histologický (F) preparát hepatopankreatu s plně vyvinutými cercáriemi. Modře obarvené jsou penetrační žlázy cercárií. Histologické preparáty jsou barveny hematoxylin-eosinem.

C – plně vyvinutá cercárie; DS – dceřiná buňka; PŽ – penetrační žlázy; VC – vyvíjející se cercárie;
Z – zárodek cercárie

Makroskopické odlišení infikovaných a zdravých plžů *Gyraulus* sp.

U živých, experimentálně nakažených plžů rodu *Gyraulus* byl zaznamenán rozdíl mezi barvou hepatopankreatu nakažených (viz Obr. 16) a nenakažených jedinců pozorovatelný přes ulitu (viz Obr. 16B). Jedinci s vyvíjejícími se sporocystami a cercáriemi měli světle hnědý až bílý hepatopankreas, zatímco hepatopankreas zdravých plžů byl jednoduše hnědý a kompaktní. Pod binokulární lupou mohl být rovněž zaznamenán pohyb parazitů uvnitř plže, obrysy sporocyst i oční skvrny cercárií. Světlý hepatopankreas byl pozorován i u plžů, kteří nevyučovali cercárie, přestože byli nakaženi. Toho bylo využito pro rychlé stanovení nakažených plžů včetně těch, kteří byli v prepatentní periodě nákazy.



Obr. 16 – A) nakažený jedinec se světlým hepatopankreatem s viditelnými sporocystami, **B)** nenakažený jedinec s hnědým, kompaktně zbarveným hepatopankreatem.

Sledování patentní periody nákazy *T. filiformis* u plžů *Gyraulus* sp.

Nákaza vodních plžů miracidii byla prokázána pouze u plžů *Gyraulus* sp. Ti začali po nasvícení vylučovat cercárie v 5. tpi. V případě ostatních druhů nakažovaných plžů byla 12. tpi provedena jejich pitva, při níž paraziti v plžích nebyli prokázáni ani v jednom případě. Cercárie *T. filiformis* byly z plžů *Gyraulus* sp. vylučovány v nízkých počtech – průměrný počet byl 12 cercárií/plže, maximální počet byl 97 cercárií/plže, minimální 1 cercárie/plže. Při opakovaných kontrolách každý týden byla patentní fáze infekce pozorována po dobu maximálně 18 týdnů. V rámci prvních dvou experimentálních nálezů byli plži pitevně vyšetřeni 15. tpi. Potvrzena tak byla infekce i u některých plžů, kteří cercárie nevyučovali – obsahovali živé, ovšem prázdné sporocysty bez vyvíjejících se cercárií. Plži z dalších dvou experimentálních nálezů byli pitevně vyšetřeni až po

úplném skončení vylučování cercárií. Příslušnost vyloučených cercárií k druhu *T. filiformis* byla ověřena molekulárními metodami.

Behaviorální a morfologická charakterizace cercárií *T. filiformis*

Vyloučené cercárie z plžů *Gyraulus* sp. byly sledovány z hlediska chování a morfologicky charakterizovány prostřednictvím měření, pozorování obarvených penetračních žláz a zaznamenávání obarvených senzorických papil (chaetotaxe).

Chování cercárií

Cercárie *T. filiformis* byly z plžů vylučovány po stimulaci světlem. Při pokusech vylučování cercárií během noci nebyly obvykle pozorovány žádné uvolněné cercárie. Zároveň při umístění cercárií do skleněné nádoby a svícení na jednu stranu nádoby vykazovaly cercárie pozitivní fototaxi.

Cercárie *T. filiformis* extrémně pevně přisedávali k různým povrchům. Při vyloučení cercárií z plže do jamky na mikrotitrační či kultivační destičce přisedaly acetabulem k povrchové blance vodní hladiny i k povrchu jamky, nejčastěji do místa styku hladiny a stěny jamky a rozhraní stěny a dna jamky, kde byla jejich adheze velmi pevná. Při nabírání cercárií automatickou pipetou adherovaly i ke stěnám plastové špičky, což působilo značné problémy při manipulaci s cercáriemi.

Měření cercárií *T. filiformis*

Cercárie *T. filiformis* (Obr. 17) mají oválné tělo s pigmentovanými očními skvrnami v přední polovině těla. Uprostřed je acetabulum. Ocásek je tvořen ocasním kmenem a furkou. Na první pohled jsou odlišné například od cercárií *T. szidati* nebo *T. regenti* především celkově menšími rozměry, v poměru k délce mají širší tělo, ocasní kmen je delší v poměru k tělu a furka naopak kratší vzhledem ke kmeni. Na cercáriích standardně fixovaných horkým 4% formaldehydem bylo proměřováno několik ukazatelů, z nichž šest bylo měřeno na těle cercárie, tři na jejím ocásku (viz Tab. 25). Pro měření bylo použito 30 cercárií z experimentálních nákaz plžů rodu *Gyraulus*.



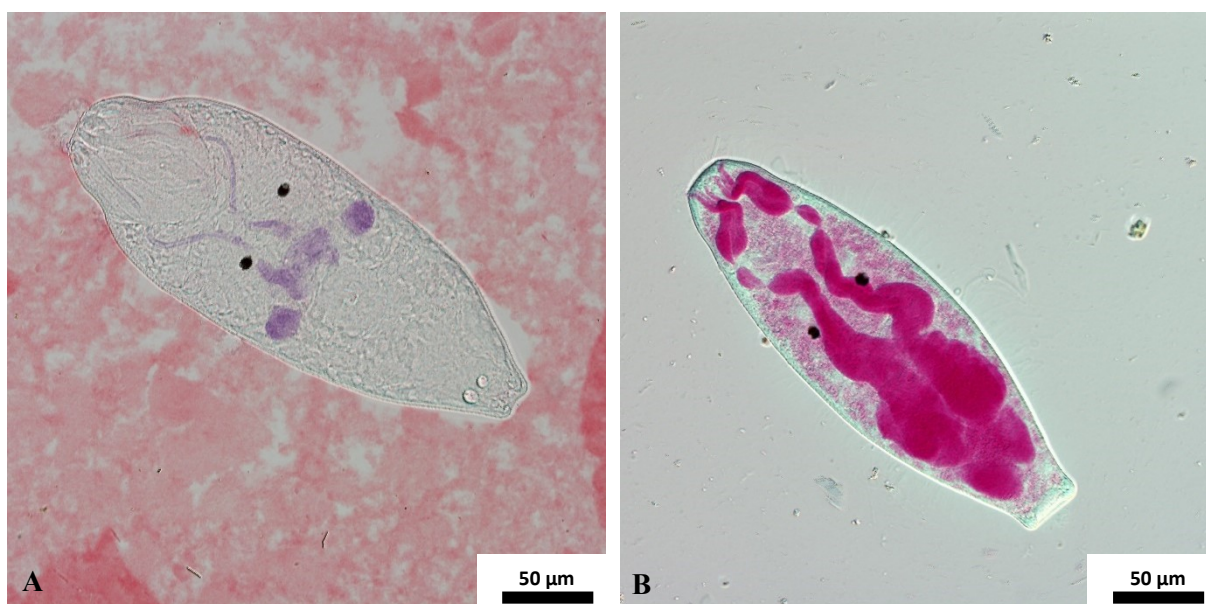
Obr. 17 – Cercárie *Trichobilharzia filiformis* vyloučená z plže *Gyraulus* sp. po experimentální nákaze miracidii získanými z labutě *Cygnus olor*.

Tab. 25 – Hodnoty měření cercárií *Trichobilharzia filiformis* vyloučených z plže *Gyraulus* sp. po experimentální nákaze miracidii získanými z labutě *Cygnus olor*, n = 30.

Část těla	Naměřené hodnoty ± SD (μm)
Celková délka	686,7 ± 38,2
Délka těla	204,3 ± 15,2
Maximální šířka těla	73,3 ± 11,5
Průměr očních skvrn	6,8 ± 0,4
Vzdálenost přední konec-oční skvrny	81,8 ± 5,0
Průměr acetabula	26,5 ± 4,2
Vzdálenost přední konec-acetabulum	119,9 ± 9,6
Délka ocasního kmene	363,0 ± 38,5
Maximální šířka ocasního kmene	33,0 ± 4,5
Délka furky	148,5 ± 23,0

Charakterizace penetračních žláz cercárií *T. filiformis*

Pro zvýraznění a popis penetračních žláz bylo barveno dohromady 50 cercárií. Cirkumacetabulární žlázy barvené alizarinem (viz kap. 2.3.4., str. 41) byly obtížně barvitelné pravděpodobně z důvodu rychlé sekrece obsahu žláz cercáriemi ještě před jejich umístěním na sklíčko. Obarveny tak byly především dukty a vývody žláz. Pozorovány byly dva páry cirkumacetabulárních žláz (viz Obr. 18A), jejichž vývody ústily na hlavovém konci těla. Postacetabulární žlázy (viz Obr. 18B) byly barveny lithiumkarmínem (viz kap. 2.3.4., str. 41) a vyskytovaly se v zadní části těla cercárie v počtu tří párů. I lithiumkarmínem byly obarveny zároveň vývody penetračních žláz. Vývody procházely tělem od žláz směrem k hlavovému orgánu, kde se nacházelo jejich vyústění ven z těla. Žlázy zabírají přibližně ¼ objemu těla cercárie.



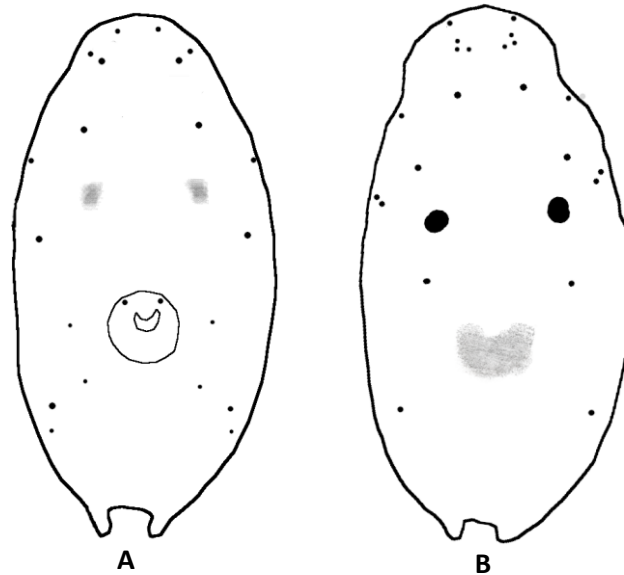
Obr. 18 – Barvení penetračních žláz cercárií *Trichobilharzia filiformis* **A**) částečně vyprázdněné cirkumacetabulární žlázy a jejich vývody obarvené alizarinem, **B**) postacetabulární žlázy a jejich vývody barvené lithiumkarmínem

Chaetotaxe cercárií *T. filiformis*

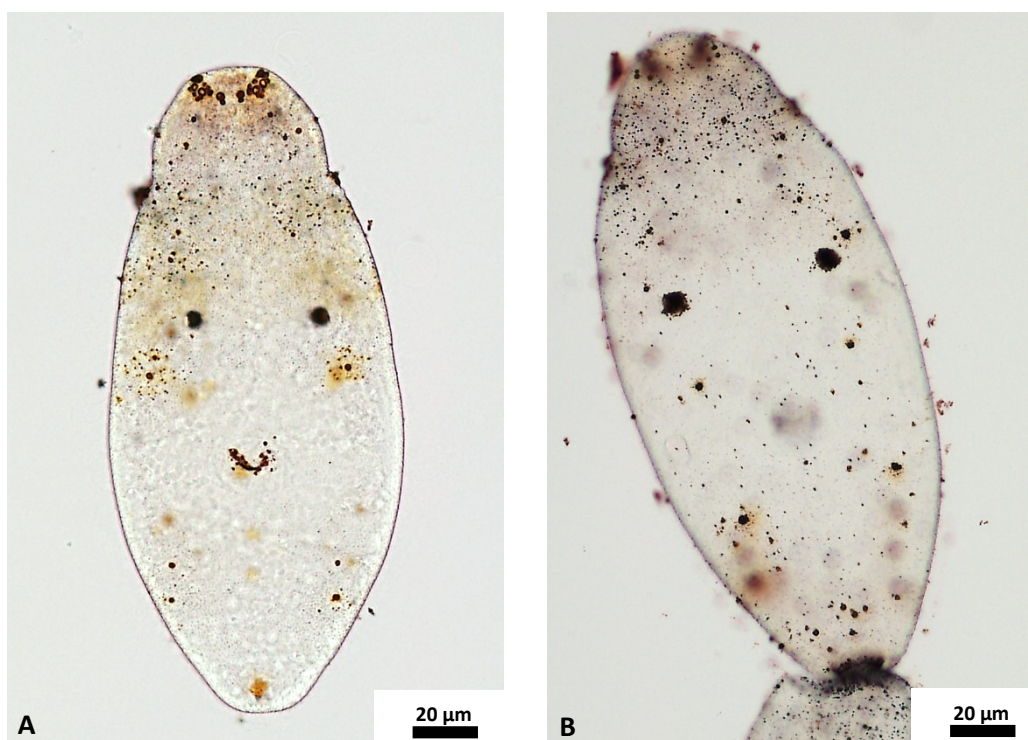
Senzorické papily byly barveny dusičnanem stříbrným (viz kap. 2.3.4., str. 40). Na základě barvení 90 cercárií *T. filiformis* byl vytvořen schematický obrázek rozmístění papil na těle cercárie z ventrálního a dorzálního pohledu (viz Obr. 19). Na ventrální straně těla byly v přední oblasti (C I-IV) zaznamenány čtyři papily, na dorzální straně těla bylo v této oblasti šest papil. V prostřední oblasti (A I-III) byly na ventrální straně tři papily, na dorzální čtyři. V oblasti M I byla na ventrální straně jedna papila, dorzální strana byla bez papil a v oblasti v zadní části těla cercárie (P I-II) nebyly na ventrální ani dorzální straně žádné papily (viz Obr. 20). Pohled z boku se nepodařilo zachytit z důvodu pevného přichycení cercárií ke sklíčku a jejich neúspěšného natočení při pozorování a fotodokumentaci. Ani papily na ocasním kmeni a furce se nepodařilo spolehlivě zaznamenat kvůli obarvení velkého množství jiných struktur. Počty papil v jednotlivých oblastech těla cercárie jsou zaznamenány v tabulce 26.

Tab. 26 – Počet papil v jednotlivých oblastech těla cercárie *Trichobilharzia filiformis* (oblasti dle Kock and Böckeler, 1999).

Oblast těla cercárie	Papily na ventrální straně	Papily na dorsální straně
C I	1	1
C II	2	3
C III	0	2
C IV	1	0
A I	1	3
A II	0	0
A III	2	1
M I	1	0
P I	3	1
P II	0	0



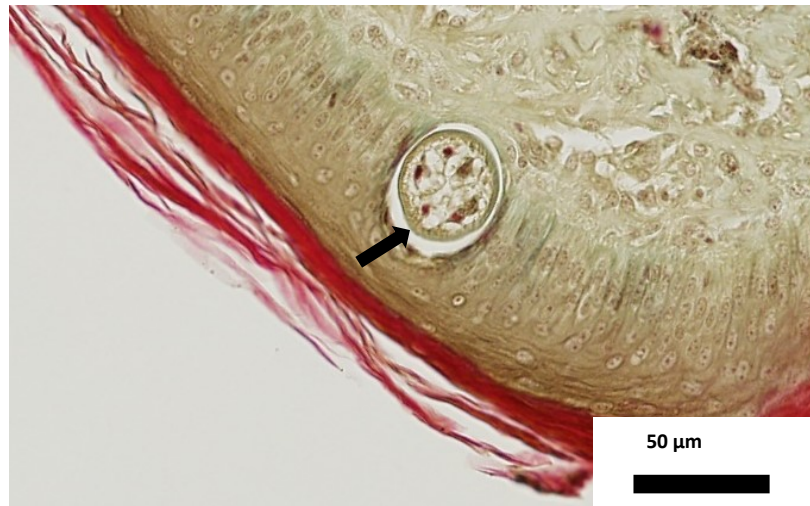
Obr. 19 – Senzorické papily cercárií *Trichobilharzia filiformis* – schematický obrázek. A) ventrální pohled, B) dorzální pohled.



Obr. 20 – Sensorické papily cercárií *Trichobilharzia filiformis* barvené dusičnanem stříbrným;
A) ventrální pohled, B) dorzální pohled

Experimentální nákazy kachen cercáriemi *T. filiformis*

Z experimentální nákazy pěti kachen *A. platyrhynchos f. domestica* byla úspěšná pouze krátkodobá infekce, která potvrdila schopnost penetrace i do jiného druhu ptáka než labutě. Vyšetřování histologických preparátů kůže z nohou infikované kachny cercáriemi *T. filiformis* potvrdilo přítomnost schistosomul 1 hodinu po infekci. Při počítání zbylých cercárií po nákaze kachny (100 cercárií) se v nakažovací nádobě nacházelo 23 živých jedinců, 29 samotných těl a 65 ocásků. Už to signalizovalo pravděpodobnou úspěšnou penetraci cercárií. Transformované cercárie v kůži prostupovali vrstvy *stratum spinosum*, *stratum basale* a částečně zasahovali do dermis (viz Obr. 21). U některých penetrovaných cercárií byl pozorován i dosud neodlomený ocásek. U kachen nakažených za účelem prokázání schopnosti *T. filiformis* migrovat a vyvíjet se v kachně se při pitvě 3., 5. a 7. dpi prokázat přítomnost schistosomul nepodařilo. Negativní byl i výsledek u dlouhodobého experimentu, kdy od 14. do 56. dpi nebyla zachycena žádná miracidia v trusu kachny a nalezeni nebyli ani dospělci či vajíčka při pitvě kachny 56. dpi.



Obr. 21 – Histologický řez kůží plovací blány kachny po nákaze cercáriemi *T. filiformis*, 1 hpi. Penetrovaná cercárie (černá šipka) ve vrstvě *stratum basale*. Červeně obarvená je vrstva *stratum corneum*. Barvení Gomoriho trichromem.

Experimentální nákaza myší cercáriemi *T. filiformis*

Při vyšetřování histologických preparátů ucha a kůže myší BALB/c a SKH-1 po experimentálních nákazách, které proběhly za účelem zjištění schopnosti cercárií *T. filiformis* penetrovat kůži savčího hostitele, byly všechny preparáty negativní na přítomnost transformovaných cercárií. To bylo potvrzeno i po kontrole ocásků a těl cercárií v nakažovací nádobě, jejichž množství se po nákaze 50 a 100 cercáriemi nezměnilo.

Experimentální nákaza lidí cercáriemi *T. filiformis*

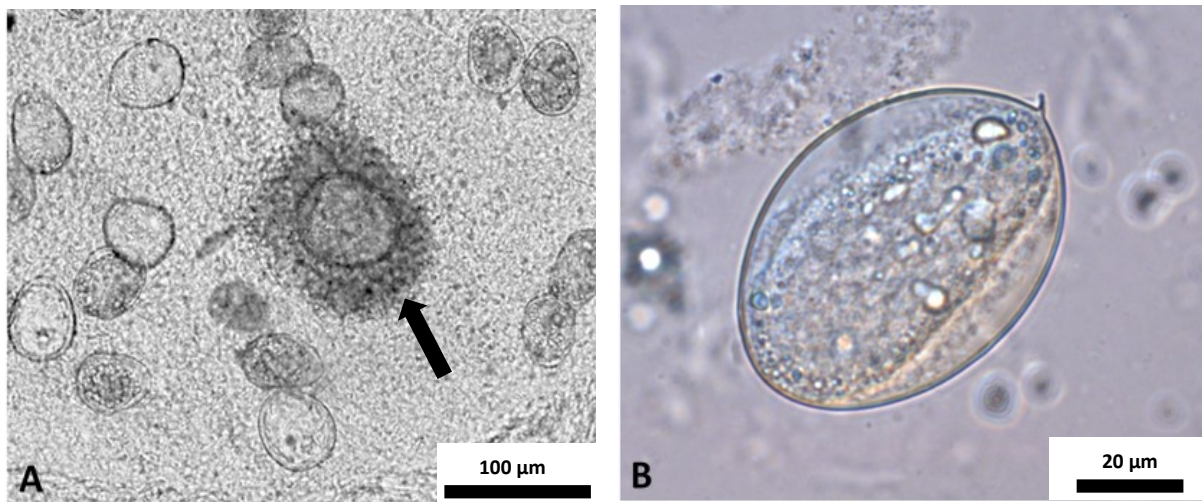
Výsledky experimentálních nákaz lidí za účelem prokázání schopnosti *T. filiformis* působit cercáriovou dermatitidu byly rovněž negativní. S tím korespondovaly i výsledky z počítání cercárií po ukončení nákazy 100 cercáriemi, jejichž počet byl stále stejný. Zároveň většina cercárií byla živá s neodděleným ocáskem od těla. Na kůži vystavené cercáriím nebyly pozorovány žádné stopy po penetraci a dobrovolníci rovněž nepocítovali žádné nepohodlí spojené s možnou penetrací cercárií.

3.3.2. Stádia *T. filiformis* z pitvaných labutích

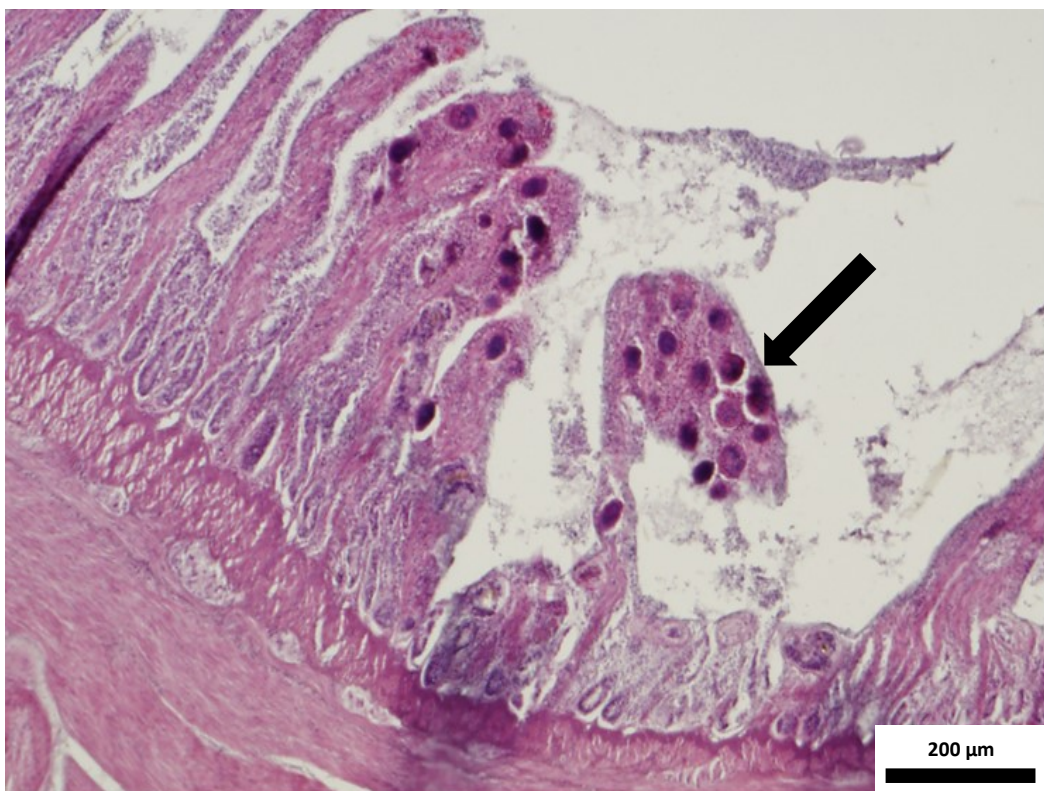
Z pitev 34 labutí získaných převážně z Plzně a okolí bylo 29 infikovaných ptačími schistosomami a z toho 27 *T. filiformis*. *T. filiformis* byla nacházena ve formě vajíček ve sliznici tenkého střeva po celé jeho délce. Vajíčka byla ve střevě lokalizována ve shlucích (až stovky vajíček na jednom stěru sklíčkem), což pravděpodobně signalizovalo přítomnost dospělých samic v jejich blízkosti.

Nalezená vajíčka *T. filiformis*

Vajíčka (Obr. 22 a 23) byla oválného tvaru s krátkým výběžkem na širším pólu (viz Obr. 22B). Byla u nich prokázána změna velikosti v závislosti na různém stupni vývoje. Vajíčka, v nichž byla zárodky miracidii v časně fázi vývoje, byla menší s průměrně naměřenými hodnotami 56 μm na délku a 40 μm na šířku. Vajíčka s plně vyvinutým miracidie měřila na délku 77 μm a na šířku 49 μm . Měření byla provedena u 35 vajíček s vyvinutým miracidie a 35 s nevyvinutým zárodkem. Některá vajíčka byla obklopena výrazným zánětem (viz Obr. 22A).



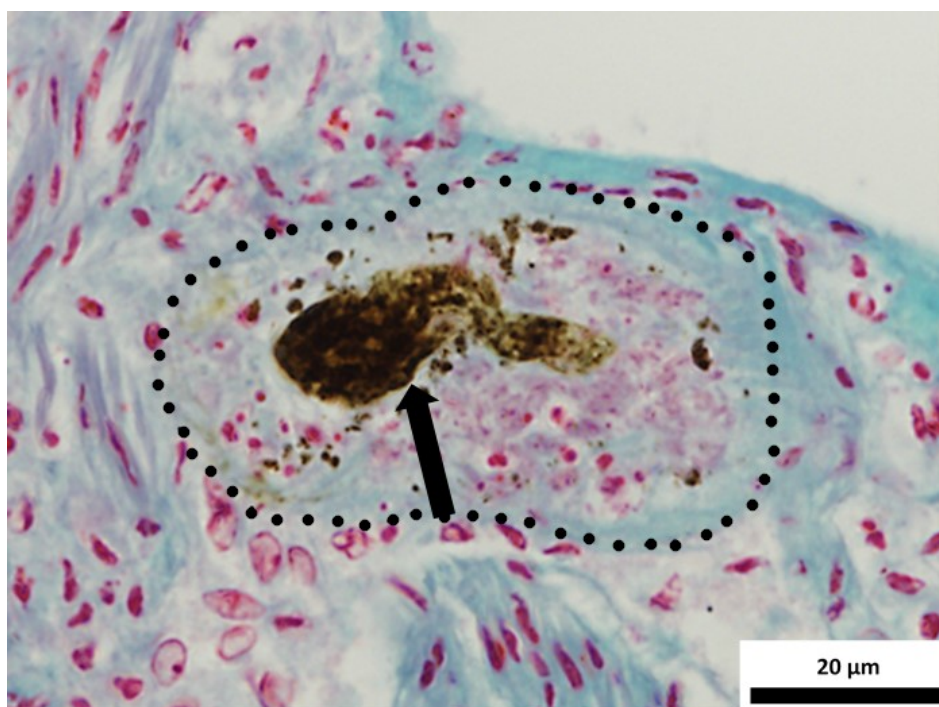
Obr. 22 – Vajíčka *Trihobilharzia filiformis* ve sliznici střeva *Cygnus olor*; **A)** vajíčko obklopené zánětem (šipka); **B)** detail vajíčka obsahující vyvíjející se miracidium



Obr. 23 – Vajíčka *Trichobilharzia filiformis* na histologickém řezu střeva labutě; šipka – klk střeva s vajíčky

Nalezení dospělci

Přestože byli velmi špatně pozorovatelní, přítomnost dospělců *T. filiformis* byla prokázána díky jejich hnědě zbarvenému střevu, které je naplněno natrávenou krví a byli vidět i v binokulární lupě na fragmentech střeva pitvaných labutí. Na histologických řezech zpracovaných z fragmentů střev s velkým počtem vajíček *T. filiformis* ve sliznici byli dospělci nejlépe zvýrazněni barvením Malloryho a Gomoriho trichromem (viz Obr. 24) a nacházeli se v submukóze střeva. Pokusy o izolaci dospělců z tkáně byly neúspěšné kvůli jejich velmi malé velikosti, těsnému spojení s hostitelskou tkání, snadnému přetržení, ale i z důvodu lýze tkáně kvůli přemrazení labutí a často i jejich pokročilého stadia rozkladu. Byly tak získány pouze fragmenty těl, na základě kterých nebylo možné popsat morfologii těl dospělců. Ta ovšem byla částečně posána již dříve (viz kap. 1.5.).



Obr. 24 – Dospělec *Trichobilharzia filiformis* (vyznačený tečkami) s viditelným střevem s natrávenou krví (šipka) na histologickém řezu střeva labutě; Barvení Gomoriho trichromem.

Ptačí schistosomy nalézané spolu s *T. filiformis*

Ve sliznici tenkého střeva (především v jeho první polovině) se vyskytovala také vajíčka druhu *A. visceralis*. Jejich dospělci se nacházeli v mezenteriálních cévách a byli větší a lépe izolovatelní než dospělci *T. filiformis*. Velmi často se jednalo o koinfekce těchto dvou druhů (viz kap. 3.1.2.). Tvar vajíček *A. visceralis* byl nepravidelný, podlouhlý se zašpičatělými konci a na jednom z pólů byla zakončena výběžkem (viz Obr. 25).



Obr. 25 – Vajíčko *Allobilharzia filiformis* ve stěru sliznice přední části tenkého střeva labutě velké (*Cygnus olor*) z plzeňské Bolevecké rybniční soustavy, která byla pitvána na přítomnost ptačích schistosom

3.3.3. Molekulární charakterizace *T. filiformis*

Sekvence DNA byla již dříve popsána z plžů *Anisus vortex*, druh však nebyl řazen k *T. filiformis* (viz níže). Vajíčka ze střeva labutí, která byla dle tvaru, lokalizace a definitivního hostitele určena jako *T. filiformis*, a miracidia z trusu labutí byla podrobena molekulární analýze a dle porovnání výsledné sekvence s databází GenBank bylo zjištěno, že tento druh již v databázi existuje pod názvem Avian schistosomatid sp. I4 isolate AvM a označením JF734335 a byl získaný z cercárií získaných z plže *Anisus vortex* (Aldhoun *et al.*, 2012). Zároveň sekvence korespondovala se sekvencí DNA z cercárií z plžů *Gyraulus parvus* z Velkého Boleveckého rybníka (Duras, Leontovyč, 2015, nepublikováno). Pro molekulární charakterizaci byly využity čtyři izoláty vajíček pitvaných labutí a devět izolátů miracidii získaných z trusu labutí a následných cercárií, které se vyvíjely v experimentálním hostiteli po nákaze těmito miracidii.

4. DISKUZE

Při zpracovávání diplomové práce byl uskutečněn monitoring ptačích schistosom, který je v následující kapitole diskutován spolu s navržením efektivního postupu při sběru a vyšetřování vodních plžů. Dále jsou zhodnoceny a diskutovány faktory, které mohou ovlivňovat výskyt ptačích schistosom v přírodních vodních plochách a jsou navržena opatření pro snížení rizika výskytu CD. V neposlední řadě se diplomová práce věnuje druhu ptačí schistosomy *Trichobilharzia filiformis* a níže jsou diskutovány možné potíže při jejím získávání a identifikaci.

4.1. Monitoring ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy

Cercáriová dermatitida byla na území České republiky poprvé zaznamenána v roce 1966 (Hrubý, 1976), je však pro vědecké výzkumy stále atraktivním tématem. Sledování přírodních koupacích vod na přítomnost plžů vylučujících cercárie ptačích schistosom je v současné době stále více žádané zejména ze strany hygienických stanic, zdravotních ústavů a provozovatelů přírodních koupališť, a to hlavně z důvodu rostoucího počtu hlášení cercáriové dermatitidy od rekreujících se lidí. Lokální epidemie CD se v České republice vyskytují dlouhodobě a na některých lokalitách i opakovaně (Chvátalová *et al.*, 2013; Duras *et al.*, 2014). Systematicky dokumentovány jsou však obvykle jen ty, které byly nahlášeny přes dotazník SZÚ, který je přístupný od roku 2009 (<http://szu.cz/modules/forms/index.php?id=11>; Pumann *et al.*, 2019), a ověřeny v terénu. Ostatní záznamy o výskytu CD evidované hygieniky, zdravotními ústavy, praktickými lékaři či přímo postiženými osobami, které dotazník SZÚ nevyplnily tak unikají. To byla hlavní motivace pro vytvoření mapy, která se snaží relevantní záznamy o výskytu CD v České republice centralizovat a zároveň je doplnit o informace o výskytu původců CD – ptačích schistosom bez ohledu na to, zda na konkrétní lokalitě CD zaznamenána byla či nikoli. Díky přehledovým mapám prezentovaným na konferencích hygieniků a vodohospodářů se ukázalo, že je o připravovanou interaktivní mapu, která by mohla být do budoucna přístupna vybraným skupinám osob na webových stránkách laboratoře helmintologie PřF UK, velký zájem. Záznamy z této interaktivní mapy mohou sloužit především jako vítaný zdroj informací o výskytu ptačích schistosom a CD na konkrétních lokalitách v minulosti a napomoci tak provozovatelům oficiálních přírodních koupališť, pracovníkům hygienických stanic, zdravotních ústavů a dalších zainteresovaných veřejných institucí zorientovat se při hodnocení možných rizik pro koupající se v následující sezóně. V případě zpřístupnění mapy i pro širokou veřejnost mohou rekreující se osoby či osoby s pracovní náplní vyžadující pobyt v litorálu vodních ploch zvážit koupání na lokalitě, případně využití rozšířeného spektra ochranných pomůcek pro práci. Od letošního roku je již platná nová vyhláška č. 238/2011 Sb., na základě které bude monitoring CD probíhat pravidelně. Díky tomu existuje předpoklad, že záznamy z oficiálních přírodních koupališť budou přibývat, což může napomoci při výzkumu a hodnocení možných

rizikových faktorů i dynamiky přítomnosti infekce ve spojitosti s pozměněným managementem lokality.

Relevance zdrojů při získávání dat pro interaktivní mapu

Nejvíce zastoupenými zdroji pro zmíněnou mapu jsou vědecké články (viz. kap. 3.1.). Ty jsou zdrojem informací o výskytu různých stadií ptačích schistosom včetně dospělců z definitivních hostitelů. Zdroje tohoto typu se týkají i vzdálenější minulosti, a spíše než monitoringu cercárií na velkém počtu lokalit sloužících ke koupání se zabývají výzkumem konkrétních druhů motolic. Záznamy z tohoto zdroje obvykle přibývají velmi pomalu, v případě článků staršího data vydání chybí navíc často ověření nalezeného ptačí schistosomy molekulárně biologickými metodami. Velmi hodnotným zdrojem informací o výskytu ptačích schistosom jsou i závěrečné práce studentů vysokých škol, a to především z důvodu vyšetření velkého množství lokalit za poměrně krátký časový interval a přesného určení nalezených ptačích schistosom pomocí molekulárně biologických metod, které jsou v těchto pracech obvykle využity. Naopak informace z hygienických stanic a Státního zdravotního ústavu, které v poslední době přibývají a nabývají tak na důležitosti, jsou postavené na hlášení podezření na CD přímo od postižených lidí, a jsou proto velmi aktuální. Není však možné se spoléhat na všechny takto získané záznamy. V některých případech je již zpočátku CD vyloučena, u jiných je pro ověření potřeba kontaktovat postižené osoby a na některých hlášených lokalitách se nepodaří původce prokázat. Každoročně přinášejí záchyty z nových lokalit, ale i z lokalit postižených již v minulosti. Záznamy z těchto zdrojů přibývají zejména v letních měsících, kdy je na koupalištích největší koncentrace lidí. Na rozdíl od vědeckých článků však obvykle neobsahují informace o původcích. Ti byli zjišťováni pouze v některých případech, a to buď pracovníky hygienických stanic či zdravotních ústavů (obvykle bez poskytnutí materiálu pro molekulární analýzu, pouze s protokolem o druhu plže vylučujícím ocelátní furkocercárie), nebo při výjezdech organizovaných pro potřeby této diplomové práce za účelem objasnění původce CD včetně druhového určení.

Druh nalezené ptačí schistosomy není vždy možné určit s jistotou, díky mezihostitelské specifitě je však možné jej v některých případech alespoň odhadnout. Zároveň ne každý záznam je plně relevantní. U postiženého se může jednat o jiný typ vyrážky, která je pro laika s CD snadno zaměnitelná. V mapě jsou zaznamenány i údaje z novinových článků, které však mohou být považovány za plně důvěryhodné pouze v případech, kdy jsou podpořeny zhodnocením odborníky. I to je důvod uvedení zdrojů v tabulkách u jednotlivých záchytů v interaktivní mapě.

Optimalizace postupu při vyšetřování plžů

Plži, kteří jsou obvyklými mezipřenositeli ptačích schistosom (čeled' Lymnaeidae, méně pak Planorbidae) byli na přítomnost ptačích schistosom vyšetřováni individuálně. Mnohem vzácnější nálezy z České republiky pocházejí z plžů čeledi Physidae (Rudolfová, 2003; Rudolfová *et al.*, 2005). Plži skupiny Prosobranchia mají v souvislosti s ptačími schistosomami zanedbatelný význam, přestože zde stále existuje riziko, že jde o důsledek nedostatku informací. Proto se obvykle těmto skupinám při vyšetřování nevěnuje stejná pozornost jako druhům z předchozích skupin plžů. Poslední dvě jmenované skupiny byly proto na cercárii vyšetřovány hromadně po družích. Teprve při pozitivním nálezu cercárií (přestože v žádném z případů nešlo o ocelátní furkocercárii) byli plži rozmístěni individuálně pro nalezení zdroje cercárií.

Zhodnocení ideálních podmínek pro sběr plžů na lokalitě

Úspěšnost sběru vodních plžů může být do velké míry ovlivněna počasím a denní dobou, kdy je výjezd uskutečněn. Vodní plži jsou u břehů, kde jsou následně sbíráni, hojnější především v letních měsících při slunečném počasí s vyššími teplotami. Ne vždy je však možné čekat na slunečné a teplé počasí a je nutné uskutečnit sběry plžů i za zhoršených podmínek, což následně může ovlivnit výsledky sběru. Z našeho pozorování je patrné, že za deštivého počasí jsou vodní plži méně aktivní a zdržují se spíše při dně, kde jsou kvůli zhoršené průhlednosti vody hůře vidět. Zároveň z vlastních zkušeností během výzkumu vyplývá, že je ideální začít se sběry plžů až v pozdních dopoledních hodinách (cca mezi 10. a 11. hodinou), kdy jsou plži aktivnější než ranních hodinách, kdy jich bylo nacházeno méně. Tuto skutečnost spolu s ostatními parametry, díky kterým by bylo možné lépe standardizovat nejvhodnější roční a denní dobu i povětrnostní podmínky, je však do budoucna potřeba ověřit.

Specifika cirkanuálních sběrů

Mezi letními a zimními sběry jsou velmi velké rozdíly – v zimě může počet nalezených vodních plžů klesnout až na nulu (viz Příloha 2). Sběry vodních plžů, které jsou uskutečňovány během celého roku včetně zimních měsíců, mohou být komplikovány teplotami pod bodem mrazu, jako tomu bylo v případě výzkumu na boleveckých rybnících, kde kvůli zamrzlé hladině v některých termínech nebylo možné plánovaný sběr realizovat. Termíny výjezdů proto byly operativně upravovány podle aktuálního stavu na lokalitě. Z těchto zkušeností vyplývá, že není možné (např. pro normu či vyhlášku) přesně definovat termín, kdy je vhodné začít s vyšetřováním.

Specifika opakovaného monitoringu na veřejně přístupných lokalitách

Při provádění dlouhodobého výzkumu na jedné lokalitě, která není plně pod kontrolou výzkumníka, je nezbytné být ve spojení se správcem lokality a udržovat si po dobu jejího sledování povědomí o zásazích, které mohou vodní nádrž významně ovlivnit. Jde například o vypouštění nádrže, její odbahnování, výlov nebo nasazování ryb či celkovou revitalizaci. Některé zásahy mohou kompletně změnit podmínky v nádrži včetně zastoupení mezihostitelů, definitivních hostitelů i samotných parazitů. Sledování vývoje lokalit, které prošly kompletní revitalizací a jsou nanovo osidlovány faunou i flórou mohou přinést zajímavé poznatky o efektech využitelných v budoucnu pro predikci přítomnosti ptačích schistosom, potažmo CD, případně vést k jejich eliminaci.

4.2. Faktory ovlivňující výskyt ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy

Vliv pH na výskyt ptačích schistosom a CD

Je známo, že pH má vliv na výskyt vodních plžů (Spyra, 2017). Zároveň jsou jeho hodnoty obvykle stabilní v rámci vodní plochy, v některých případech však může po významných zásazích dojít ke kolísání, které má velký vliv na výskyt různých vodních živočichů včetně plžů. Tento stav nastal na Seneckém rybníce, kde v průběhu našeho výzkumu pH prudce klesalo až na hodnoty, které vytváří podmínky natolik nevhodné, že plži neprosperují a populace vymizí (z hodnoty 8,31 až na 4,19). Příčinou bylo pravděpodobně odbahnění rybníka v roce 2016, kdy se póry v jílovitém podloží, které po odbahnění vysychalo, dostávala na povrch voda. Ta se odpařovala a zanechávala po sobě krystalky solí, jež byly následně deštěm smyty do zbylé vody v rybníce (Duras, písemná komunikace). Vodní plži tak byli na Seneckém rybníce v rámci výzkumu na Bolevecké soustavě rybníků nalezeni pouze při podzimním výjezdu 2018 při pH vody 8,31, při následujících sběrech plži nacházení nebyli. Je tedy zřejmé, že snížení pH v přírodních vodní ploše je z hlediska výskytu cercáriové dermatitidy výhodné a lidé se v takové vodě nemusí bát koupat, protože však jde o nepředvídatelný faktor, nedá se řízeně nastolit pro redukci CD i na dalších lokalitách.

Vliv vodních rostlin na výskyt ptačích schistosom a CD

Vodní rostliny mohou hrát důležitou roli v přítomnosti různých druhů vodních plžů (viz kap. 3.2.2.). Na základě pozorování na Velkém Boleveckém rybníce, kde byly v minulosti problémy s cercáriovou dermatitidou, byla preference vodních plžů na typ vodních rostlin potvrzena. Na tomto rybníce bylo dříve přítomno velké množství jemnolistých vodních rostlin, na nichž se vyskytovali plži rodu *Gyraulus*, kteří byli zdrojem infekčních cercárií působících na lokalitě rozsáhlou epidemií CD. Tito plži vykazovali vysokou afinitu k jemnolistým vodním rostlinám i v rámci laboratorních experimentů. V současné době jsou jemnolisté rostliny na rybníce redukovány kosením (mimo jiné i

pro zlepšení podmínek pro rekreaci) a plži *Gyraulus* sp. zde nejsou nacházeni v tak velkých počtech. Zdá se tedy, že redukce některého typu vodních rostlin tedy opravdu může (přímo či nepřímo) vést k redukci původce CD. Na lokalitě roste mimo jiné rákos a orobinec, které naopak vytváří vhodné podmínky pro plže *L. stagnalis*, jejichž počty v posledních letech stoupají. Hojně se zde vyskytoval i druh *R. auricularia*. I tyto druhy jsou však na Velkém Boleveckém rybníce potvrzeným zdrojem infekčních cercárií (druhy *Trichobilharzia szidati* a *Trichobilharzia franki*). Je tedy zřejmé, že na každý typ vegetace je vázán jiný druh plže. Při převažujícím typu vegetace má šanci prosadit se i jiný druh meziphostitele, a tedy i parazita. To však neplatí pro druh *R. auricularia*, který vykazuje vysokou přizpůsobivost a nenáročnost na typ vodních rostlin či substrátu v rybníku a má tedy dobré předpoklady pro osidlování nově napuštěných či zrevitalizovaných nádrží.

Vliv typu substrátu na výskyt ptačích schistosom a CD

Na početnost populace vodních plžů v přírodních vodních plochách by mohl mít vliv i typ a frakce substrátu. Zatímco na písčném litorálu bez rostlin a úkrytů v podobě kamenů nebo materiálu spadaneho ze stromů se plži vyskytují spíše výjimečně, na členitém dně s nezapojenými kameny, které mohou sloužit jako úkryty pro snůšky či samotné plže před predátory, jsou obvykle nacházeni častěji. V rámci zpracovávání diplomové práce to bylo pozorováno i na Boleveckých rybnících, kde na nezapojených kamenech (frakce cca od 50 mm do 200 mm) byli nacházeni převážně plži rodu *Bithynia*, druhu *Physella acuta* či *R. auricularia*. Na Malém Boleveckém rybníce byli hojně nacházeni plži i na bahnitěm substrátu, kde jako úkryt posloužil spadaný materiál z okolních stromů. Oblasti pláží s pískem (frakce 0,06-2 mm) však byly obvykle plžů prosté. Z laboratorních experimentů byla zjištěna u plžů rodu *Gyraulus* preference šterkovitého substrátu (frakce 5 mm), na kterém plži lépe prospívali než v přítomnosti větších kamenů (frakce do 100 mm).

Znalost jednotlivých druhů meziphostitelských plžů a toho, který substrát konkrétní frakce preferují či odmítají, by do budoucna mohla být spolu s ostatními faktory využita v praxi pro omezení rozvoje populace plžů již při úvahách o stavbě, revitalizaci či úpravě stávajících vodních ploch, u kterých se předpokládá, že by mohly sloužit ke koupání. Může být rovněž nápomocná v případech, kdy jsou plochy preferované plži pouze na omezeném prostoru. Cílený zásah na taková místa (např. částečné snížení hladiny pouze pod úroveň vrstvy nezapojených kamenů, ve které se plži zdržují) pak bývají velmi efektivním nástrojem pro redukci celkové populace meziphostitelských plžů a tím i cercáriové dermatitidy (Jezero Michal, Bulantová, osobní komunikace).

Vliv způsobu nákazy vodních ptáků na výskyt ptačích schistosom a CD

Kromě vodních plžů je pro výskyt ptačích schistosom na lokalitě zásadní i přítomnost vodních ptáků, kteří vylučují vajíčka nebo miracidia ptačích schistosom do vodního prostředí. Z důvodu krátkověkosti miracidii dochází k nálezům plžů pouze tehdy, pokud je na lokalitě přítomen pták

v patentní fázi infekce. Ta však trvá pouze omezenou dobu. Plži nakažení ptačími schistosomami však obvykle vylučují cercárie po zbytek života. Kromě klasické cesty nákazy definitivního hostitele penetrací cercárií do kůže přichází v zimním období do úvahy i nákaza alimentární cestou v případě pozření nakažených plžů s dostatečně vyvinutými cercáriemi cíleně, nebo spolu s vodními rostlinami, které ptákům slouží jako potrava (Pech, 2013). Pravděpodobně díky těmto nálezům mohou vodní ptáci vylučovat vajíčka i v zimním období (např. labuť na Velkém Boleveckém rybníce, u kterých byla líhnoucí se miracidia sbírána během celého roku) a cyklus ptačích schistosom tak nemusí být přerušeno ani u druhů, které v definitivním hostiteli žijí jen několik týdnů. To, jestli je kontinuální vylučování vajíček *T. filiformis* v trusu labutí velkých způsobeno délkou jejich přežívání v definitivním hostiteli, nebo kontinuálními nálezami alimentární cestou, však zbývá ověřit experimentálně.

Význam kroužkování ptáků pro výzkum ptačích schistosom

Ptáci se obvykle kroužkují z důvodů poznání jejich migračních cest, hnízdních zvyklostí nebo délky dožití. Informace z kroužkovaných ptáků však mohou být za určitých okolností být využity i v parazitologii. Díky kroužkovacímu protokolu lze dohledat stáří ptáka i jeho pohyb (pokud byl dokumentován díky zpětným hlášením). Informace o pohybu konkrétních značených a vyšetřovaných jedinců mohou být užitečné při odvozování místa získání infekce či o lokalitách, kam mohla být ptáky infekce nově zanesena. Ptáci přitom migrují jak mezi blízkými vodními plochami, tak na velké vzdálenosti. Na lokalitu mohou přinést ptačí schistosomy i ze zahraničí včetně takových, pro které je mezihostitelem mořský plž (Kolářová *et al.*, 1997).

V případě této diplomové práce umožňovalo odečítání individuálního značení labutí ornitologickými kroužky zjistit více o intravitálně i postmortálně vyšetřovaných ptácích. V případě opakovaného vyšetřování trusu od jednotlivých kroužkovaných ptáků pak bylo možné stanovit nejen to, zda je pták pozitivní na konkrétní druh viscerální ptačí schistosomy, ale i jestli je infekce stejným či jiným druhem přítomna i s odstupem několika měsíců či dokonce let. Kroužkování tedy může přinést zajímavá data o parazitofauně konkrétních jedinců či populací v čase, ne vždy a u všech druhů ptáků je však podobný typ pozorování proveditelný.

Vliv ryb na výskyt ptačích schistosom a CD

Ryby přítomné ve sledované nádrži mohou výskyt ptačích schistosom, případně CD ovlivňovat několika způsoby. Při velkém množství zejména kaprovitých ryb na lokalitě je voda více eutrofizovaná (Jagtman *et al.*, 1990). Býložravé ryby navíc působí zákal vody vířením bahna ze dna rybníka, kde hledají potravu. Zároveň požírají vegetaci, která je velmi důležitá pro vodní plže. Tento stav je obvykle možné zvrátit nasazením dravých ryb, které zredukuje populaci menších druhů kaprovitých ryb či mladých jedinců velkých druhů. Tím napomáhají zlepšování či udržení kvality

vody (Jagtman *et al.*, 1990). Strategie s významnou redukcí ryb (především cejnů, plotic, kaprů, karasů či perlínů) a nasazením omezeného množství především dravých ryb byla úspěšně provedena například na Velkém Boleveckém rybníce v rámci zlepšení kvality vody (Duras, 2019). Ten však následně zarostl vegetací, která je v současné době pravidelně sečena. Pro redukcii plžů se využívá nasazování amura černého (*Mylopharyngodon piceus*) či lína obecného (*Tinca tinca*), pro které jsou vodní plži přirozenou součástí jejich potravy (Ben-Ami a Heller, 2001; Nasab *et al.*, 2005). Právě líni byli nasazováni například na koupaliště Michal v Sokolově v roce 2016 pro redukcii vodních plžů, a tedy i předcházení výskytu CD, která na lokalitě působila problémy. Souvislost nízkého počtu nalezených vodních plžů s přítomností dravých ryb byla pozorována v průběhu našeho výzkumu například na Kamenném rybníce, kde se vyskytovaly především dravé ryby – štiky a okouni. Pro spolehlivé konstatování této souvislosti by však bylo potřeba provádět výzkum v delším časovém období. Cerkárie nejen ptačích schistosom mohou být rybami predovány, což může napomoci k částečné redukcii ptačích schistosom (Heinclová, 2018).

Vliv stáří lokality na výskyt ptačích schistosom a CD

V posledních letech se stále více ukazuje, že na výskyt CD by mohlo mít význam stáří lokality a její sukcesní stadium. Tento fenomén by mohl být vysvětlen tak, že na nových či znovu napuštěných lokalitách například po revitalizaci se začínají nejdříve objevovat pionýrské druhy plžů jako jsou plži čeledi Physidae či rodu *Bithynia*, ale také druhy *R. auricularia* a *Gyraulus* sp. (Beran, 2002). Pokud mají tyto druhy ideální podmínky pro svůj rozvoj (bez přítomnosti významných patogenů, predátorů či konkurenčních druhů plžů), mohou na lokalitě zcela převládnout. V případě, že se na lokalitu dostane ptačí schistosoma, pro kterou je tento plž vhodným mezihostitelem, počet nakažených plžů bývá vyšší než na déle se vyvíjejících lokalitách s vyšší diverzitou plžů i ostatních organismů. Jako příklad z vlastního výzkumu může být uveden Kolovský rybník u Karlových Varů, kde žijí téměř pouze plži druhu *L. stagnalis* a je u nich vysoká prevalence nákazy ptačí schistosomou *T. szidati*. Naopak na Velkém Boleveckém rybníku je spektrum plžů vyšší (kromě *L. stagnalis* zde jsou například druhy plžů *R. auricularia* či *P. corneus*) a prevalence nákazy ptačími schistosomami je nižší. Obvykle vyšší prevalence u plžů může být také důsledkem druhově chudého biotopu v raném sukcesním stadiu, ve kterém chybí kompetitoři (např. dravé echinostomní cercárie redukující sporocysty ptačích schistosom; Basch a DiConza, 1975).

Nové či revitalizované vodní plochy jsou často budované za účelem koupání a nejsou na ně proto vysazovány ryby, které by mohly zhoršovat kvalitu vody, ale i negativně ovlivňovat populaci vodních plžů. Dosavadní zkušenosti z těchto typů nádrží navštívených za účelem sběru dat pro diplomovou práci ukazují, že problémy s CD se obvykle začínají objevovat v první až druhé koupací sezóně po založení nebo revitalizaci, což odpovídá stadiu vývoje, kdy dojde k rozvoji vodní vegetace a

zároveň osídlení lokality vodními ptáky, kteří jsou zdrojem nákazy pro plže. Nastíněnou hypotézu je však do budoucna potřeba ověřit vhodnými statistickými nástroji na co největším počtu vzorových lokalit.

Vliv chování lidí na výskyt CD

Výskyt cercáriové dermatitidy závisí i na chování lidí na lokalitě. V teplejších měsících automaticky začíná spolu s počtem rekreujících se lidí přibývat zároveň případů CD. Ohroženější jsou lidé, kteří se brodí či plavou spíše u břehů rybníka, nebo na mělčinách, kde se vodní plži, vylučující infekční cercárie, vyskytují. Rizikové oblasti rybníka představují také místa s porostem vodních rostlin, kde se vodní plži shromažďují (viz 3.2.2.). Z těchto míst jsou nejčastěji postižené děti, které si v porostech vodních rostlin u vyhrátého břehu vodní plochy hrají a tráví ve vodě často delší dobu než dospělí. Avšak i v případě, že lidé využívají pouze vyhrazené pláže s pískem, kde se vodní plži vyskytují velmi zřídka, mohou CD zaznamenat, a to z důvodu působení větru, který může cercárie přichycené na vodní hladině zanést kamkoliv (Verbrugge *et al.*, 2004). Hlášení na podezření CD přicházejí i od lidí koupajících se v chladných měsících. Přestože tato hlášení nejsou ověřená, nelze je vyloučit. Před koupáním se na lokalitě je vhodné sledovat, zda se zde objevily případy CD. Také při vstupu do vody dbát na to, aby v bezprostředním okolí nebyly vodní rostliny, ve kterých se plži zdržují. Pokud by vzniklo podezření na možný výskyt CD, je lepší do vody vůbec nevstupovat.

Během práce na diplomovém projektu byly nalezeny ptačí schistosomy na třech rybnících Bolevecké rybníční soustavy, z nichž především dva slouží primárně k rekreaci. Šlo o druhy *Trichobilharzia szidati* a *Trichobilharzia franki*, které způsobují cercáriovou dermatitidu. V poslední době však případy CD hlášeny nebývají, což může být způsobeno nízkým počtem ptačích schistosom v rybnících, případně tím, že se lidé koupou na bezpečných místech bez vegetace a s minimem vodních plžů. Příčinou může být i například dobrá informovanost lidí o předchozí velké epidemii na Velkém Boleveckém rybníku a nepovažují za nutné hlásit lehké případy (Pumann, 2021 – osobní komunikace).

Návrhy opatření pro redukcí výskytu CD

Pro omezení výskytu CD byla doposud publikována opatření jako je zabránění výskytu vodního ptactva na lokalitě, a to například jejich plašením, odstřelem či znemožněním jejich hnízdění redukcí porostů okolo nádrže (Blankespoor a Reimink, 1991), léčba ptáků anthelmintiky (praziquantel; Reimink *et al.*, 1995) či například nasazování přirozených predátorů vodních plžů (Ledford a Kelly, 2006).

Na základě sledování různých faktorů a jejich vlivu na vývoj CD na různých lokalitách v čase se ukazuje, že velmi účinné by mohlo být i částečné nebo celkové vypouštění nádrží na zimu, což může mít vliv na redukcí populace plžů díky proschnutí a následnému promrznutí původně litorálního

pásma s jejich nejvyšším výskytem. Nadějně se zdá být i kosení a odstraňování ponořené jemnolisté vegetace, ve které se některé druhy plžů zdržují. U dlouhodobě sledovaných nově založených nebo revitalizovaných lokalit se zdá, že CD naopak po několika problémových sezónách ustoupila spolu s přirozeným zvýšením diverzity vodních organismů včetně plžů, a to s sebou nese i osídlení lokality jejich predátory, konkurenty či patogeny. Zároveň zde vzniká prostor pro osídlení plžů dalšími druhy motolic, které mohou napomoci sporocysty ptačích schistosom aktivně redukovat (Lie a Owyang, 1973). Výše uvedené závěry zatím vycházejí z dlouhodobých pozorování pouze omezeného množství lokalit po celé České republice. Ačkoliv jsou některé z efektů empiricky velmi nápadné (např. CD, která se objevila na rybnících Velký Bolevecký a Třemošenský po jejich revitalizaci, časem však sama ustoupila) do budoucna je nezbytné najít vhodnou metodu, jak je ověřit.

4.3. Nové poznatky o *Trichobilharzia filiformis* a možné problémy s identifikací

Nalezení mezipřehostitele pro *T. filiformis*

V rámci intravitálního i postmortálního vyšetřování definitivních hostitelů ptačích schistosom bylo nejvíce materiálu z labutí (*Cygnus olor*). V nich byly pravidelně zjišťovány různé druhy ptačích schistosom (viz kap. 3.1.2.), z nichž nejčastěji byl nacházen druh *Trichobilharzia filiformis*. Ten dosud nebyl plně popsán, proto byl následně zvolen jako vhodný objekt zájmu této diplomové práce. Druh původně řazený do rodu *Pseudobilharziella* byl popsán Szidatem v 1938 v labutích velkých *C. olor* v Německu. Nalezení a popsání byli dospělí samci z cév kolem střeva a vajíčka ze sliznice střeva labutí. Další záznam o nálezu této motolice pochází až z labutí *C. olor* z Nizozemí (Van Bolhuis *et al.*, 2004). V České republice byl druh *T. filiformis* zachycen několikrát, vždy při parazitologických pitvách labutí a určen pouze na základě morfologie dospělců a vajíček, lokalizace a specifita k definitivnímu hostiteli (Rudolfová a Horák, 2001; Sitko *et al.*, 2006). Informace o možném mezipřehostiteli i molekulární data chyběla.

Z materiálu získaného pro účely předkládané diplomové práce byla osekvenována DNA pocházející z vajíček ze seškrabů střevní sliznice labutí, miracidii líhnutých z čerstvého trusu labutí posbíraného na plážích Velkého Boleveckého rybníka a cercárii získaných z plžů rodu *Gyraulus* při experimentální nákaze miracidii. Cercárie byly sekvenovány pro kontrolu, zda druh použitých miracidii a vyloučených cercárii souhlasí a nejedná se o smíšenou infekci různými druhy ptačích schistosom. Výsledné sekvence byly porovnány s databází a odpovídaly sekvencím získaným ze vzorků cercárii z plžů *Anisus vortex*, které byly autory studie zaměřené na cercárie z malých planorbidiálních plžů označeny jako „Avian schistosomatid sp. I4 isolate AvM“ (Aldhoun *et al.*, 2012). Zatímco původní popisné morfologické práce zaměřené na dospělce a vajíčka neobsahovaly data z molekulárních analýz, novodobá studie pracovala s cercáriemi, ze kterých sice byla získána sekvence, ovšem, tu nebylo s čím porovnat a ani na základě morfologických dat je nebylo možné blíže zařadit.

Přestože byl *A. vortex* nalezen v přírodě jako přirozený hostitel vylučující cercárie *T. filiformis*, experimentální nákazy překvapivě úspěšné nebyly. Důvodem by mohl být například fakt, že některé druhy schistosom mají širší spektrum mezihostitelských plžů, z nichž však jsou někteří pro vývoj cercárií vhodnější.

Molekulární a morfologická analýza vzorků vajíček využitých pro tuto diplomovou práci tak propojila tradiční popisné morfologické práce a molekulárně biologický přístup. Umožnila přiřazení dospělců k sekvencím cercárií z mezihostitelů, kteří byli až do této doby pro druh *T. filiformis* zcela neznámí. Dalším vodítkem, které napovědělo, že mezihostiteli *T. filiformis* budou drobní planorbidní plži byli již dříve nalezení plži rodu *Gyraulus* přirozeně nakažení cercáriemi se stejnou sekvencí (Chanová, Leontovyč, Bulantová, nepublikováno). Na základě těchto dat byly během prací na diplomovém projektu provedeny experimentální nákazy s několika druhy zejména planorbidních plžů, z nichž úspěšně nakonec dopadla pouze infekce *Gyraulus* sp. (viz kap. 3.3.1.).

Komplikace při zavádění chovu nového laboratorního plže

V helmintologické laboratoři PřF UK již jsou zkušenosti s chovem plžů čeledi Lymnaeidae, nikoli však s plži čeledi Planorbidae, do které patří i rod *Gyraulus*, jež je předmětem výzkumu. Plži využití pro experimentální nákazy pocházeli z akvárií se známými podmínkami, přesto jich však zpočátku velké množství uhynulo. V případě nákazy 192 plžů však došlo během prvních osmi týdnů k úhynu více než poloviny plžů. Zpětně se zdá, že to mohlo být způsobeno typem substrátu, který byl plžům poskytnut. V prvních osmi týdnech byli v akváriu pouze větší kameny (frakce cca 10 cm), ty byly následně vyměněny za štěrk (frakce cca 5 mm), který plžům *Gyraulus* sp. vyhoval více. Po této změně substrátu bylo zaznamenáno zpomalení úhynu plžů. Díky hojnému výskytu v akváriích lze předpokládat, že by plži rodu *Gyraulus* mohli být vhodným modelem plže. Například druh *Planorbella duryi*, jehož chov v akváriích je rovněž snadný, není jako model vhodný, protože jejich infekce miracidii *T. filiformis* byly neúspěšné.

Komplikace při manipulaci s cercáriemi *T. filiformis*

Cercárie *T. filiformis* vylučované *Gyraulus* sp. jsou v porovnání například s cercáriemi druhů *T. szidati* z plovatek rozměrově menší. Délka celého těla cercárie je u *T. filiformis* průměrně 687 μm oproti 965 μm u *T. szidati* (Podhorský *et al.*, 2009). S průměrnou délkou 684 μm jsou na tom podobně například cercárie druhu *Dendritobilharzia loossi*, využívající rovněž malé planorbidní plže jako mezihostitele. Na základě literatury se zdá, že by mohlo jít o přizpůsobení se parazita velikosti mezihostitelského plže. Oproti druhům *T. szidati* a *T. regenti* mají dále cercárie *T. filiformis* širší tělo v poměru k jeho délce (viz kap. 3.3.1.). I poměr délky těla a ocásku se mezi těmito druhy liší – u

cerkárií *T. filiformis* byl pozorován delší ocasní kmen oproti tělu a zároveň kratší furka oproti ocasnímu kmeni.

Cerkárie *T. filiformis* vykazovali ve srovnání s *T. regenti* a *T. szidati* vysokou přilnavost k různým povrchům. Jakákoli manipulace s nimi proto byla velmi obtížná. V jamce mikrotitrační destičky, v níž byly cercárie z plže vylučovány, cercárie velmi pevně adherovaly především do míst styku stěny se dnem jamky. Výjimkou nebyla ani adheze ke stěně plastové špičky na automatické pipetě. Omezující pro práci s cercáriemi bylo i množství, ve kterém byly z plžů vylučovány. Průměrně bylo jedním plžem vylučováno 12 cercárií, maximálně 97, což je v porovnání s tisíci vylučovanými cercáriemi například druhu *T. szidati* z plžů *L. stagnalis* zanedbatelné množství (Soldánová *et al.*, 2016). Tento fakt je způsoben malými rozměry plžů rodu *Gyraulus* (cca 3-5 mm) oproti zmíněnému druhu *L. stagnalis* (4-5 cm) a byl shledán omezujícím i v případě jiných výzkumů, pro jejichž uskutečnění byli využíváni malí planorbidní plži (Aldhoun *et al.*, 2012).

Při barvení senzorických papil cercárií jsou často barveny i jiné struktury, které znesnadňují pozorování chaetotaxe (Kock and Böckeler, 1999; Richard, 1971). V případě cercárií *T. filiformis* nebyly papily na ocásku popsány právě kvůli četným jiným strukturám, které byly rovněž obarveny. Chaetotaxe u *T. filiformis* se rovněž nepodařilo pozorovat zboku cercárií z důvodu vysoké přilnavosti cercárií acetabulem (viz kap. 3.3.1.) ke krycímu či podložnímu sklíčku. To znemožňovalo natočení cercárií do vhodné polohy bez jejich poničení. Pozorovány tak byly pouze papily na ventrální a dorzální straně cercárií. V porovnání například s cercáriemi *D. loossi*, které na první pohled mohou svou morfologií i specifitě k mezipříteli cercárie *T. filiformis* připomínat, mají cercárie *T. filiformis* celkově menší počet papil (11 na ventrální a 11 na dorzální straně u *T. filiformis* vs. 12 na ventrální a 12 na dorzální straně u *D. loossi*) a zřetelně se liší i jejich uspořádání na těle cercárií (Akramova *et al.*, 2011). Rozlišení druhů *T. filiformis* a *D. loossi* je tedy možné i bez použití molekulárně biologických metod, a to na základě chaetotaxe, která stále představuje užitečný nástroj pro druhovou diferenciaci.

Specifita k definitivnímu hostiteli

Ptačí schistosoma druhu *T. filiformis* byla dosud nacházena pouze u labutí velkých (*C. olor*). V rámci experimentálních nálezů kachen při pokusu o zavedení cyklu v laboratoři byla prostřednictvím histologických metod prokázána schopnost penetrace cercárií *T. filiformis* do kůže kachních nohou (viz. kap. 3.3.1.). I přes úspěšnou penetraci však nebyla v kachních nohách pozorována žádná další stadia. Prezentované výsledky ukazují, že kachny nepředstavují vhodného definitivního hostitele pro *T. filiformis*. Řešením pro ověření délky života dospělých červů, životního cyklu a jeho zavedení do kontrolovaných podmínek by mohla být experimentální nákaza trvale hendikepovaných labutí chovaných v kontrolovaných podmínkách některých záchranných stanic pro volně žijící zvířata.

Ochota cercárií penetrovat savčí kůži

Dalšími experimentálními hostiteli byly laboratorní myši a lidští dobrovolníci. V žádném z případů experimentálních nálezů nebyla penetrace kůže cercáriemi pozorována. To potvrzuje výsledky experimentů s lidskými dobrovolníky prováděných s cercáriemi *T. filiformis* již dříve (Bulantová, nepublikováno). Rovněž byla obava, že příčinou epidemie CD na Velkém Boleveckém rybníku je krmení labutí, které jsou na tomto rybníku častým hostitelem *T. filiformis*, a jejich přítomnost na rybníce. To se však nepotvrdilo. Nabízí se proto závěr, že cercárie druhu *T. filiformis* nedokážou působit cercáriovou dermatitidu u lidí.

Smíšené infekce u labutí

Při parazitologických pitvách labutí byla nalezena především vajíčka *T. filiformis*, která svým tvarem, velikostí, lokalizací a nápadnou početností odpovídala původnímu popisu (Szidat, 1938). Velké množství vajíček ve sliznici střeva (v řádu stovek) představuje výhodu pro jejich určení (molekulárně biologickými metodami i na základě morfologie). Izolace dospělců *T. filiformis*, kteří byli lokalizováni (oproti vajíčkům) až v submukóze střeva, byla naopak velmi obtížná z důvodu jejich dlouhého a velmi tenkého těla a těsného spojení s tkání střeva. Obdobná situace je známá například i u druhu *T. szidati*, jehož dospělé je téměř nemožné získat jinak než ve formě drobných fragmentů nevyhovujících pro získání potřebných morfometrických dat (Horák *et al.*, 2002).

Přesto se z mezenteriálních cév labutí nakažených *T. filiformis* dařilo získávat množství dospělých ptačích schistosom. Až molekulární analýza těchto dospělců však ukázala, že jde o dospělé druhu *Allobilharzia visceralis*. Díky jejich lokalizaci i v porovnání s *T. filiformis* větším rozměrům (Kolářová *et al.*, 2006; Szidat, 1938) je mnohem snazší je izolovat. Vajíčka *A. visceralis* se navíc vyskytují v podobné lokalizaci jako vajíčka *T. filiformis*, jsou však mnohem méně početná (v řádu jednotek na labuť) a řídce rozptýlená po sliznici střeva. Důvodem je pravděpodobně odlišná lokalizace dospělců *A. visceralis*, jejichž samice kladou vajíčka do mezenteriálních cév, odkud jsou do střevní sliznice zanášena cévním řečištěm. Oproti tomu samice *T. filiformis* produkují vajíčka do početných shluků přímo v submukóze střeva, odkud se dostávají do vrstvy sliznice.

Spolu s častou koexistencí těchto dvou druhů ptačích schistosom v jednom hostiteli to bez využití nástrojů molekulární biologie nebo podrobného studia morfologie může mít za následek záměnu dospělců *A. visceralis* za *T. filiformis*. Často byla v labutích nacházena pouze vajíčka *T. filiformis* spolu s dospělci *A. visceralis*, přičemž díky produkci životaschopných vajíček byli velmi pravděpodobně přítomni i dospělci *T. filiformis* a vajíčka *A. visceralis*, které je však těžší odhalit z důvodů uvedených výše.

Vajíčka ptačích schistosom navíc během svého vývoje ve tkáni hostitele mění svoji velikost (Horák *et al.*, 2002). V některých případech proto může být pouze na základě vajíček složité určit, zda je přítomen pouze jediný druh ptačí schistosomy, jehož vajíčka jsou v různém stadiu vývoje velikostně (a někdy i tvarově) odlišná, nebo jestli se jedná o více druhů (Rudolfová 2003).

Na základě původních popisů je možné rozlišit tyto dva druhy dle tvaru a velikosti vajíček, v případě dospělců je rozlišení i s původními popisy těžší z důvodu nedostatečné charakterizace obou pohlaví u *T. filiformis*. Pro spolehlivé určení jsou proto ideální molekulárně biologické metody. V případě jejich provádění je však třeba brát ohled na stav materiálu. Pro úspěšnou izolaci parazitární DNA je nutné použít materiál z čerstvě uhynulé nebo utracené labutě, případně z ptáků, kteří byli po úhytu/utracení okamžitě zamrazeni. Bohužel, uhynulí ptáci jsou v přírodě nacházeni náhodně a v různém stadiu rozkladu. Pokročilé rozkladné procesy tak v některých případech izolaci parazitů a jejich DNA komplikuje, nebo dokonce znemožňuje. Odpovídá tomu i malé množství úspěšně sekvenovaných vzorků vajíček a dospělců. V této práci byla molekulární analýza provedena na 18 vzorcích s vajíčky *T. filiformis*, úspěšná však byla pouze v případě čtyř vzorků. U dospělců určených předběžně jako *A. visceralis*, se podařilo získat DNA ze tří fragmentů izolovaných z různých labutí z celkového počtu 12 vzorků.

4. ZÁVĚR

Předkládaná diplomová práce poskytuje ucelený přehled o výskytu a rozšíření ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy v České republice v období mezi lety 1966-2020 v podobě interaktivní mapy, která je aktuálně přístupná pouze interně, a souhrnné přehledové mapy umístěné na webových stránkách helmintologické laboratoře PřF UK. Dále se pokouší shrnout a zhodnotit faktory potenciálně ovlivňující výskyt ptačích schistosom i cercáriové dermatitidy, kterou někteří z těchto parazitů způsobují u lidí. Snaží se nastínit možné využití těchto faktorů při omezování výskytu ptačích schistosom zejména na lokalitách využívaných pro koupání a rekreaci. Dostupnost materiálu na sledované lokalitě umožnila rovněž blíže charakterizovat jeden z druhů ptačích schistosom (*Trichobilharzia filiformis*), u kterého se podařilo vyplnit mezery ve znalostech o biologii, možných mezihostitelích i schopnosti napadat savčí hostitele a s tím spojeného potenciálu pro působení cercáriové dermatitidy.

Hlavní cíle dosažené v této práci jsou následující:

- Na základě dostupných zdrojů v podobě odborných článků, závěrečných prací studentů vysokých škol, záznamů hygienických stanic a zdravotních ústavů, ústních sdělení, zpráv ve sdělovacích prostředcích i vlastního šetření byla vytvořena specializovaná interaktivní mapa (prozatím dostupná jen pro interní účely) poskytující přehled o výskytu a distribuci ptačích schistosom a cercáriové dermatitidy v České republice mezi lety 1966 a 2020. V online režimu je po rozkliknutí konkrétního bodu možné zobrazit podrobnější záznamy včetně historie dokumentovaných záchytů, zjištěného druhu a stadia ptačí schistosomy, informací o metodách, jakými byly paraziti určeni, i zdroje, ze kterého záznam pochází. Na základě stejných dat byla dále vytvořena přehledová, veřejně umístěná mapa na stránkách helmintologické laboratoře PřF UK (www.helminthology.cz) pro všeobecné využití odbornou i ostatní veřejností.
- Na modelové lokalitě jsme se snažili zjistit, zda je realizovatelný výzkum ptačích schistosom na veřejných lokalitách. Modelová lokalita s osmi rybníky s rozdílnou historií, rozlohou, využitím i typem hospodaření byla zvolena vhodně a přinesla množství zajímavých dat. Jako nejdůležitější faktory byly diskutovány vliv vegetace, rybí obsádky, typu substrátu či hodnotami pH, z nichž je mnoho výstupů. Ty je třeba správně statisticky uchopit a vyhodnotit pro odhalení významu konkrétních faktorů nebo zásahů do chodu lokality tak, aby do budoucna bylo možné využít je pro predikci výskytu ptačích schistosom na lokalitách a zároveň i pro stanovení účinných opatření pro kontrolu cercáriové dermatitidy na vodních plochách určených ke koupání.

- Díky propojení původních morfologických popisů s daty získanými molekulárně biologickými metodami se podařilo přiřadit konkrétní izolát ptačí schistosomy z *Anisus vortex* k dospělcům *T. filiformis* z labutí velkých (*Cygnus olor*). Experimentálními nákazami se navíc podařilo prokázat dalšího vhodného mezihostitele pro tuto ptačí schistosomu – plže rodu *Gyraulus*. Nepodařilo se prokázat dlouhodobý úspěšný vývoj *T. filiformis* v experimentálně nakažených kachnách, jako jediný známý definitivní hostitel tak zůstává labuť velká (*C. olor*). Kromě nového podrobného morfologického popisu cercárií *T. filiformis* obsahuje diplomová práce i data o vývoji a produkci cercárií v mezihostitelských plžích a diskutuje i jejich nízký potenciál působit u savčích hostitelů včetně lidí cercáriovou dermatitidu.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Akramova, F. D., Azimov, D. A., Shakarboev, E. B. (2010). The morphology and biology of the trematode *Gigantobilharzia acotylea* (digenea, schistosomatidae). *Vestnik Zoologii*, 44(5), 1–10.
- Akramova, F. D., Azimov, D. A., Shakarboev, E. B. (2011). Morphology, biology and taxonomy of *Dendritobilharzia loossi* Skrjabin, 1924 (Trematoda: Bilharziellidae), a parasite of pelecanus onocrotalus (Pelecanidae) and *Anas platyrinchos* (Anatidae). *Parasite*, 18(1), 39–48.
- Aldhoun, J., Faltýnková, A., Karvonen, A., Horák, P. (2009). Schistosomes in the North: A unique finding from a prosobranch snail using molecular tools. *Parasitology International*, 58(3), 314–317.
- Aldhoun, J. A., Podhorský, M., Holická, M., Horák, P. (2012). Bird schistosomes in planorbid snails in the Czech Republic. *Parasitology International*, 61(2), 250–259.
- Al-Jubury, A., Kania, P., Bygum, A., Buchmann, K. (2020). Temperature and light effects on *Trichobilharzia szidati* cercariae with implications for a risk analysis. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 62(1), 1–9.
- Al-Kandari, W. Y., Al-Bustan, S. A., Isaac, A. M., George, B. A., Chandy, B. S. (2012). Molecular identification of *Austroilharzia* species parasitizing *Cerithidia cingulata* (Gastropoda: Potamididae) from Kuwait Bay. *Journal of Helminthology*, 86, 470–478.
- Almeyda-Artigas, R. J., Bargues, M. D., Mas-Coma, S. (2000). ITS-2 rDNA Sequencing of *Gnathostoma* species (Nematoda) and elucidation of the species causing human gnathostomiasis in the Americas. *The Journal of Parasitology*, 86(3), 537.
- Appleton, C. C. (1983). Studies on *Austroilharzia terrigalensis* (Trematoda: Schistosomatidae) in the Swan Estuary, Western Australia: infection in the definitive host, *Larus novaehollandiae*. *International Journal of Parasitology*, 13(3), 249–259.
- Appleton, C. C. (1986). Occurrence of avian Schistosomatidae (Trematoda) in South African birds as determined by a faecal survey. *South African Journal of Zoology*, 21(1), 60–67.
- Ashrafi, K., Brant, S. (2020). An efficient method for collecting the full-length adults, fragments, and eggs of *Trichobilharzia* spp. from the liver of definitive hosts. *Parasitology Research*, 119(3), 1167–1172.
- Attwood, S. W., Upatham, E. S., Meng, X. H., Qiu, D. C., Southgate, V. R. (2002) The phylogeography of Asian Schistosoma (Trematoda: Schistosomatidae). *Parasitology*. 125(2), 99–112.
- Bacha, J. W., Roush, R., Icardi, S. (1982). Infection of the gerbil by the avian schistosome *Austroilharzia variglandis* (Miller and Northup 1926; Penner 1953). *The Journal of Parasitology*, 68(3), 505–507.
- Basch, P. F., DiConza, J. J. (1975). Predation by echinostome rediae upon schistosome sporocysts in vitro. *Journal of Parasitology*, 61, 1044–1047.

- Bass, D., Stentiford, G. D., Littlewood, D. T. J., Hartikainen, H. (2015). Diverse applications of environmental DNA methods in parasitology. *Trends in Parasitology*, 31(10), 499–513.
- Baugh, S. C. (1978). The miracidium of *Trichobilharzia indica* Baugh, 1963 and its hatching. *Revista Iberica di Parasitologia*, 38, 73-93.
- Bayssade-Dufour, C., Jouet, D., Rudolfova, J., Horák, P., Ferté, H. (2006). Seasonal morphological variations in bird schistosomes. *I3(3)*, 205–214.
- Ben-Ami, F., Heller, J. (2001). Biological control of aquatic pest snails by the black carp *Mylopharyngodon piceus*. *Biological Control*, 22(2), 131–138.
- Beran, L. (2002). Vodní měkkýši České republiky – rozšíření a jeho změny, stanoviště, šíření, ohrožení a ochrana, červený seznam. *Sborník přírodovědného klubu v Uh. Hradišti, Supplementum 10*, 258 pp.
- Bourns, T. K., Ellis, F. C., Rau, M. E. (1973). Migration and development of *Trichobilharzia ocellata* (Trematoda: Schistosomatidae) in its duck hosts. *Canadian Journal of Zoology*, 51(10), 1021–1030.
- Böðneck, U. (2011). New records of freshwater and land molluscs from Lebanon. *Zoology in the Middle East*, 54(1), 35–52.
- Blair, D., Islam, K. S. (1983). The life-cycle and morphology of *Trichobilharzia australis* n. sp. (Digenea: Schistosomatidae) from the nasal blood vessels of the black duck (*Anas superciliosa*) in Australia, with a review of the genus *Trichobilharzia*. *Systematic Parasitology*, 5, 89–117
- Blankespoor, H. D., Cameron, S. C., Cairins, J. Jr. (1985). Resistance of pulmonate snail populations to repeated treatments of copper sulfate. *Environmental Management*, 9, 455-458.
- Blankespoor, H. D., Reimink, R. L. (1991). The control of swimmer's itch in Michigan: past, present and future. *Michigan Academy*, 24, 7–23.
- Brackett, S. (1939). Methods for controlling schistosome dermatitis. *Journal of the American Medical Association*, 113, 117-121.
- Brant, S. V., Bochte, C. A., Loker, E. S. (2011). New intermediate host records for the avian schistosomes *Dendritobilharzia pulverulenta*, *Gigantobilharzia huronensis*, and *Trichobilharzia querquedulae* from North America. *The Journal of Parasitology*, 97(5), 946–949.
- Brant, S. V. (2007). The occurrence of the avian schistosome *Allobilharzia visceralis* Kolářová, Rudolfová, Hampl et Skírnisson, 2006 (Schistosomatidae) in the tundra swan, *Cygnus columbianus* (Anatidae), from North America. *Folia Parasitologica*, 54(2), 99–104.
- Brant, S. V., Jouet, D., Ferte, H., Loker, E. S. (2013). *Anserobilharzia* gen. n. (Digenea, Schistosomatidae) and redescription of *A. brantae* (Farr & Blankemeyer, 1956) comb. n. (syn. *Trichobilharzia brantae*), a parasite of geese (Anseriformes). *Zootaxa*, 3670(2), 193–206.
- Brant, S. V., Loker, E. S. (2009). Molecular systematics of the avian schistosome genus *Trichobilharzia* (Trematoda: Schistosomatidae) in North America. *The Journal of Parasitology*, 95(4), 941-963.

- Brant S. V., Loker ES. (2013). Discovery-based studies of schistosome diversity stimulate new hypotheses about parasite biology. *Trends in Parasitology*, 29, 449–459.
- Brönmark, C. (1992). Leech predation on juvenile freshwater snails: effects of size, species and substrate. *Oecologia*, 91(4), 526–529.
- Brown, K. M., Alexander, J. E., Thorp, J. H. (1998). Differences in the ecology and distribution of lotic pulmonate and prosobranch gastropods. *American Malacological Bulletin*, 14(2), 91–101.
- Brown, R., Soldánová, M., Barrett, J., Kostadinova, A. (2011). Small-scale to large-scale and back: larval trematodes in *Lymnaea stagnalis* and *Planorbium corneum* in Central Europe. *Parasitology Research*, 108(1), 137–150.
- Brumpt E. (1931). *Cercaria ocellata* déterminant la dermatite des nageurs, provient d'une bilharzie des canards. *Comptes rendus de l'Académie des Sciences*, 193, 612–614.
- Bulantová J., Chanová M., Houžvičková L., Horák P. (2011). *Trichobilharzia regenti* (Digenea: Schistosomatidae): Changes of body wall musculature during the development from miracidium to adult worm. *Micron*, 42, 47–54
- Buxton, A. S., Groombridge, J. J., Griffiths, R. A. (2018). Seasonal variation in environmental DNA detection in sediment and water samples. *PLoS ONE*, 13(1), 1–14.
- Camara, I. A., Bony, Y. K., Diomandé, D., Edia, O. E., Konan, F. K., Kouassi, C. N., Gouréne, G., Pointier, J. P. (2012). Freshwater snail distribution related to environmental factors in Banco National Park, an urban reserve in the Ivory Coast (West Africa). *African Zoology*, 47(1), 160–168.
- Chamot, E., Toscani L., Rougemont A. (1998). Public health importance and risk factors for cercarial dermatitis associated with swimming in Lake Lemman at Geneva, Switzerland. *Epidemiology and Infection*, 120, 305–314.
- Chanová, M., Vuong, S., Horák, P. (2007). *Trichobilharzia szidati*: The lung phase of migration within avian and mammalian hosts. *Parasitology Research*, 100(6), 1243–1247.
- Chase, J. M. (2003). Strong and weak trophic cascades along a productivity gradient. *Oikos*. 101, 187–195.
- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A. (2000). The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica*, 77, 41–51.
- Chvátalová, M., Pumann, P., Kožíšek, F., Heligová, H. (2013). Onemocnění z přírodních koupacích vod v České republice. *Sborník Konference Vodárenská Biologie 2013*, 152–157.
- Cobbaert, D., Bayley, S. E., Greter, J. L. (2010). Effects of a top invertebrate predator (*Dytiscus alaskanus*; Coleoptera: Dytiscidae) on fishless pond ecosystems. *Hydrobiologia*, 644(1), 103–114.
- Colley, D. G., Bustinduy, Secor A. L., King Ch. W. E. (2014). Human schistosomiasis. *Lancet*, 383, 2253–2264.

- Cort, W. W. (1928). Schistosomes dermatitis in the United States (Michigan). *JAMA*, 90(13), 1027-1029.
- Cotton, P. A. (2003). Avian migration phenology and global climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21), 12219–12222.
- ČSN 75 7737 Kvalita vod - Stanovení původců cercáriové dermatitidy ve vodním prostředí. *Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví*, 2021, 24 s. Třídící znak 757737.
- Daniell, D. L. (1985). Occurrence of swimmers' itch in northeast Indiana. *Indiana Academy of Science*, 94, 629–632.
- Dinguirard, N., Heinemann, C., Yoshino, T. P. (2018). Mass isolation and in vitro cultivation of intramolluscan stages of the human blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Journal of Visualized Experiments*, 131, 1–8.
- Dvořák, J. (2000). Morfologie, životní cykly a taxonomie vybraných druhů trichobilharzií. Diplomová práce, PřF UK.
- Dvořák, J., Vaňáčková, Š., Hampl, V., Flegr, J., Horák, P. (2002). Comparison of european *Trichobilharzia* species based on ITS1 and ITS2 sequences. *Parasitology*, 124(3), 307-313.
- Duras, J. (2019). Jindřich Duras: Jak Velký Bolevecký rybník zvítězil nad sinicemi. [online] 29.8. [cit. 5.1.2020]. Dostupné z: <https://ekolist.cz/cz/publicistika/nazory-a-komentare/jindrichn-duras-jak-velky-bolevecky-rybnik-zvitezil-nad-sinicemi>
- Duras, J., Chanová, M., Pumann, P., Koubová, R. (2014). Cercáriová dermatitida a jak k ní přistupovat. *Sborník Konference Vodárenská Biologie 2014*, 150–162.
- Egrtová, I. (2016). Výskyt a identifikace cercárií a dalších vývojových stádií motolic u plovatky bahenní (*Lymnaea stagnalis*) na kařezských rybnících. Bakalářská práce, ZČU v Plzni.
- Faltýnková, A. (2005). Larval trematodes (Digenea) in molluscs from small water bodies near České Budějovice, Czech Republic. *Acta Parasitologica*, 50, 49-55.
- Feiler, W., Haas, W. (1988). Host finding in *Trichobilharzia ocellata* cercariae: swimming and attachment to the host. *Parasitology*, 96, 493–505.
- Graefe, G., Aspöck, H., Picher, O. (1973). Auftreten von Bade-Dermatitis in Österreich und Möglichkeiten ihrer Bekämpfung. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*, 225, 398–405.
- Grodhaus, G., Keh, B. (1958). The marine, dermatitis-producing cercariae of *Austroilharzia variglandis* in California (Trematoda: Schistosomatidae). *The Journal of Parasitology*, 44, 633–638.
- Guth, D. B., Blankespoor, D. H., Reimink, L. R., Johnson, C. W. (1979). Prevalence of dermatitis producing schistosomes in natural bird populations of lower Michigan. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 46(1), 58–63.
- Haggerty, C. J. E., Bakhoun, S., Civitello, D. J., Leo, G. A. De, Jouanard, N., Ndione, R. A., Remais, J. V., Riveau, G., Senghor, S., Sokolow, S. H., Sow, S., Wolfe, C., Wood, L., Jones, I.,

- Chamberlin, A. J., Id, J. R. R. (2020). Aquatic macrophytes and macroinvertebrate predators affect densities of snail hosts and local production of schistosome cercariae that cause human schistosomiasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 14(7).
- Haas, W., Pietsch, U. (1991). Migration of *Trichobilharzia ocellata* schistosomula in the duck and in the abnormal murine host. *Parasitology Research*, 77(7), 642–644.
- Heinclová, P. (2018). The effect of direct predation by fish on cercarial populations of selected trematode species (Digenea). Diplomová práce, PřF JČU.
- Hertel, J., Hamburger, J., Haberl, B., Haas, W. (2002). Detection of bird schistosomes in lakes by PCR and filter-hybridization. *Experimental Parasitology*, 101(1), 57–63.
- Holická, M. (2009). Ptačí schistosomy v plžích a volně žijících ptácích v Evropě. Diplomová práce, PřF UK.
- Horák, P., Kolářová, L., Adema, C. M. (2002). Biology of the schistosome genus *Trichobilharzia*. *Advances in Parasitology*, 52, 155–233.
- Horák, P., Kolářová, L., Dvořák, J. (1998). *Trichobilharzia regenti* n. sp. (Schistosomatidae, Bilharziellinae), a new nasal schistosome from Europe. *Parasite*, 5(4), 349–357.
- Horák, P., Kolářová, L. (2011). Snails, waterfowl and cercarial dermatitis. *Freshwater Biology*, 56(4), 779–790.
- Horák, P., Kolářová, L. E. (2001). Bird schistosomes: Do they die in mammalian skin? *Trends in Parasitology*, 17(2), 66–69.
- Horák, P., Mikeš, L., Lichtenbergová, L., Skála, V., Soldánová, M., Brant, S. V. (2015). Avian schistosomes and outbreaks of cercarial dermatitis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(1), 165–190.
- Hrubý, M. (1976). Contribution to the occurrence of cercarial dermatitis. *Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica*, 6, 17–21.
- Hunter, G. W., Ritchie, L. S., Tanabe, H. (1951). The epidemiology of schistomy dermatitis ('koganbyo') in Japan. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 45, 103–112.
- Islam, K. S. (1986). The morphology and life-cycle of *Trichobilharzia arcuata* n. sp. (Schistosomatidae: Bilharziellinae) a nasal schistosome of water whistle ducks (*Dendrocygna arcuata*) in Australia. *Systematic Parasitology*, 8(2), 117–128.
- Jagtman, E., Hoper, S. H., Meijer, M. L., van Donk, E. (1988). The role of fish stock management in the control of eutrophication in shallow lakes in The Netherlands. *Management of Freshwater Fisheries*, 328–343.
- Johnson, P. T. J., McKenzie, V. J. (2009). Effects of environmental change on helminth infections in amphibians: exploring the emergence of *Ribeiroia* and *Echinostoma* infections in North America. *Toledo R., Fried B. (eds) The Biology of Echinostomes. Springer, New York, NY.* 249–280.

- Jothikumar, N., Mull, B. J., Brant, S. V., Loker, E. S., Collinson, J., Secor, W. E., Hill, V. R. (2015). Real-time PCR and sequencing assays for rapid detection and identification of avian schistosomes in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(12), 4207–4215.
- Jouet, D., Fert, H., Hologne, C., Kaltenbach, M. L., Depaquit, J. (2009). Avian schistosomes in French aquatic birds: A molecular approach. *Journal of Helminthology*, 83(2), 181–189.
- Jouet, D., Kolářová, L., Patrelle, C., Ferté, H., Skírnisson, K. (2015). *Trichobilharzia anseri* n. sp. (Schistosomatidae: Digenea), a new visceral species of avian schistosomes isolated from greylag goose (*Anser anser* L.) in Iceland and France. *Infection, Genetics and Evolution*, 34, 298–306.
- Jouet, D., Skírnisson, K., Kolářová, L., Ferté, H. (2010). Final hosts and variability of *Trichobilharzia regenti* under natural conditions. *Parasitology Research*, 107(4), 923–930.
- Kalbe, M., Haberl, B., Haas, W. (1997). Miracidial host-finding in *Fasciola hepatica* and *Trichobilharzia ocellata* is stimulated by species-specific glycoconjugates released from the host snails. *Parasitology Research*, 83(8), 806–812.
- Kane, R. A., Rollinson, D. (1994). Repetitive sequences in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma intercalatum* and *Schistosoma mattheei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 63(1), 153–156.
- Kaplan, A. T., Rebhal, S., Lafferty, K. D., Kuris, A. M. (2009). Small estuarine fishes feed on large trematode cercariae: Lab and field investigations. *The Journal of Parasitology*, 95(2), 477–480.
- Khalil, L. F. (2002). Family Schistosomatidae Stiles and Hassall, 1898. Gibson DI, Jones A, Bray RA (eds) *Keys to the trematoda*, CAB International, Wallingford and The Natural History Museum, London, 1, 419–432.
- KHS LK (2009). Zákaz koupání na přírodním koupališti v Zákupcech. [online] KHS LK [cit. 24.4.2021]. Dostupné z: https://www.khslbc.cz/tisk_zpravy/tisk_zpravy_2009/TZ-Sdeleni_zakaz_Zakupy.pdf
- KHS LK (2015) Výskyt larvárních stádií parazitů vyloučených z plžů na přírodním koupališti v Zákupcech. [online] KHS LK [cit. 24.4.2021]. Dostupné z: https://www.khslbc.cz/tisk_zpravy/tisk_zpravy_2015/TZ_%20cerkarie.pdf
- Kock, S. (2001). Investigations of intermediate host specificity help to elucidate the taxonomic status of *Trichobilharzia ocellata* (Digenea: Schistosomatidae). *Parasitology*, 123(1), 67-70.
- Kock, S., Böckeler, W. (1999). Observations on cercarial chaetotaxy as a means for the identification of European species of *Trichobilharzia* Skrjabin and Zakharow, 1920 (Digenea: Schistosomatidae). *Systematic Parasitology*, 43(3), 159–166.
- Kolářová, L. (2007). Schistosomes causing cercarial dermatitis: A mini-review of current trends in systematics and of host specificity and pathogenicity. *Folia Parasitologica*, 54(2), 81–87.
- Kolářová, L., Horák, P., Fajfrlík, K. (1992). Cercariae of *Trichobilharzia szidati* Neuhaus, 1952 (Trematoda: Schistosomatidae): the causative agent of cercarial dermatitis in Bohemia and Moravia. *Folia Parasitologica*, 39(4), 399-400.

- Kolářová, L., Horák, P., a Sitko, J. (1997). Cercarial dermatitis in focus: Schistosomes in the Czech Republic. *Helminthologia*, 34(3), 127–139.
- Kolářová, L., Horák, P., Skírnisson, K. (2010). Methodical approaches in the identification of areas with a potential risk of infection by bird schistosomes causing cercarial dermatitis. *Journal of Helminthology*, 84(3), 327–335.
- Kolářová, L., Horák, P., Skírnisson, K., Marečková, H., Doenhoff, M. (2012). Cercarial dermatitis, a neglected allergic disease. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 45(1), 63–74.
- Kolářová, L., Rudolfová, J., Hampl, V., Skírnisson, K. (2006). *Allobilharzia visceralis* gen. nov., sp. nov. (Schistosomatidae-Trematoda) from *Cygnus cygnus* (L.) (Anatidae). *Parasitology International*, 55(3), 179–186.
- Kolářová, L., Skírnisson, K., Ferté, H., Jouet, D. (2013). *Trichobilharzia mergi* sp. nov. (Trematoda: Digenea: Schistosomatidae), a visceral schistosome of *Mergus serrator* (L.) (Aves: Anatidae). *Parasitology International*, 62(3), 300–308.
- Koopman, K. R., Collas, F. P. L., van der Velde, G., Verberk, W. C. E. P. (2016). Oxygen can limit heat tolerance in freshwater gastropods: differences between gill and lung breathers. *Hydrobiologia*, 763(1), 301–312.
- Korsunen, A., Chrisanfova, G., Lopatkin, A., Beer, S. A., Voronin, M., Ryskov, A. P., Semyenova, S. K. (2012). Genetic differentiation of cercariae infrapopulations of the avian schistosome *Trichobilharzia szidati* based on RAPD markers and mitochondrial *cox1* gene. *Parasitology Research*, 110(2), 833–841.
- Kouřilová, P., Kolářová, L. (2002). Variations in immunofluorescent antibody response against *Trichobilharzia* and *Schistosoma* antigens in compatible and incompatible hosts. *Parasitology Research*, 88(6), 513–521.
- Kozohorský, P. (2015). Koupaliště Michal o víkendu zavře kvůli podezření na parazity ve vodě. [online] iDnes.cz [cit. 24.4.2021].
- Dostupné z: https://vary.idnes.cz/sokolovske-koupaliste-michal-zavira-kvuli-podezreni-na-parazity-ve-vode-lq6-/vary-zpravy.aspx?c=A150612_151041_vary-zpravy_slv
- Kožíšek, F., Jelíková, H., Pumann, P. Dotazník "Zdravotní problémy vzniklé v důsledku koupání nebo kontaktu s koupací vodou" [online]. [cit. 5.1.2020]. Dostupné z: www.szu.cz/modules/forms/index.php?id=11
- Kožíšek, F., Pumann, P., Javoříková, E., Procházková, P. (2008). Diseases and Epidemics Associated with Recreational Bathing in the Czech Republic. *Hygiena*, 53(3), 108–109.
- Krčmářová, V. (2017). Ultrastrukturální interakce larev ptačích schistosom *Trichobilharzia regenti* s imunitními buňkami nervového systému hostitele. Diplomová práce, PřF UK.
- Larsen, A. H., Bresciani, J., Buchmann, K. (2004). Increasing frequency of cercarial dermatitis at higher latitudes. *Acta Parasitologica*, 92, 30–35.
- Lashaki, E. K., Teshnizi, S. H., Gholami, S., Fakhar, M., Brant, S. V., Dodangeh, S. (2020). Global

- prevalence status of avian schistosomes: A systematic review with meta-analysis. *Parasite Epidemiology and Control*, 9, e00142.
- Lawton, S. P., Hirai, H., Ironside, J. E., Johnston, D. A. and Rollinson, D. (2011). Genomes and geography: Genomic insights into the evolution and phylogeography of the genus *Schistosoma*. *Parasites and Vectors*, 4(131), 1–11.
- Ledford, J. J. a Kelly, A. M. (2006). A comparison of black carp *Mylopharyngodon piceus*, redear sunfish *Lepomis microlophus*, and blue catfish *Ictalurus furcatus* as biological controls of snail populations. *North American Journal of Aquaculture*, 68(4), 339-34.
- Léger, N. (2008). We tried to prevent cercarial dermatitis in the lake of Annecy (France). *Multidisciplinary for Parasites, Vectors and Parasitic Diseases (Mas-Coma, S., ed.)*, 159-164.
- Leighton, B. J., Zervos, S., Webster, J. M. (2000). Ecological factors in schistosome transmission, and an environmentally benign method for controlling snails in a recreational lake with a record of schistosome dermatitis. *Parasitology International*, 49(1), 9–17.
- Leontovyč, R. (2011). Druhové spektrum plžů rodu Radix a jejich význam v přenosu motolic v ČR. Diplomová práce, PřF UK.
- Lie, K. J., Owyang, C. K. (1973). A field trial to control *Trichobilharzia brevis* by dispersing eggs of *Echinostoma audyi*. *Southeast Asian Tropical Medicine and Public Health*, 4, 208.
- Lim, H. K., Heyneman, D. (1972). Intramolluscan inter-trematode antagonism: A review of factors influencing the host–parasite system and its possible role in biological control. *Advances in Parasitology*, 10, 191–268.
- Lockyer, A. E., Olson, P. D., Østergaard, P., Rollinson, D., Johnston, D. A., Attwood, S. W., Southgate, V. R., Horak, P., Snyder, S. D., Le, T. H., Agatsuma, T., McManus, D. P., Carmichael, A. C., Naem, S., Littlewood, D. T. J. (2003). The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of *Schistosoma* Weinland, 1858. *Parasitology*, 126(3), 203–224.
- Loker, E. S., Brant, S. V. (2006). Diversification, dioecy and dimorphism in schistosomes. *Trends in Parasitology*, 22(11), 521–528.
- Lopatkin, A. A., Chisanfova, G. G., Voronin, M. V., Zazornova, O. P., Beer, S. A., Semyenova, S. K. (2010). Polymorphism of the cox1 gene in cercariae isolates of bird schistosomes (Trematoda:Schistosomatidae) from ponds of Moscow and Moscow region. *Russian Journal of Genetics*, 46(7), 873–880.
- Macháček, T., Turjanicová, L., Bulantová, J., Hrdý, J., Horák, P., Mikeš, L. (2018). Cercarial dermatitis: a systematic follow-up study of human cases with implications for diagnostics. *Parasitology Research*, 117(12), 3881–3895.
- Malek, A. E. (1958). Factors conditioning the habitat of bilharziasis intermediate hosts of the family Planorbidae. *Bulletin WHO*, 18, 785-818.
- Marszewska, A., Cichy, A., Bulantová, J., Horák, P., Zbikowska, E. (2018). *Potamopyrgus*

- antipodarum* as a potential defender against swimmer's itch in European recreational water bodies – experimental study. *PeerJ*, 6, 1–17.
- Matheson S. (1930): Notes on *Cercaria elvae* Miller as the probable cause of an outbreak of dermatitis in Cardiff. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 23, 421.
- Mas-Coma, S., Valero, M. A., Bargues, M. D. (2009). Climate change effects on trematodiasis, with emphasis on zoonotic fascioliasis and schistosomiasis. *Veterinary Parasitology*, 163(4), 264–280.
- McMullen, D. B., Beaver, P. C. (1945). Studies on schistosome dermatitis. IX. The life cycles of three dermatitis-producing schistosomes from birds and a discussion of the subfamily Bilharziellinae (Trematoda: Schistosomatidae). *American Journal of Hygiene*, 42, 128–154.
- McMullen, D. B., Brackett, S. (1948). Studies on schistosome dermatitis. X. Distribution and epidemiology in Michigan. *American Journal of Hygiene*, 47, 259–270.
- Meuleman, E. A., Huyer, A. R., Mooij, J. H. (1984). Maintenance of the life cycle of *Trichobilharzia ocellata* via the duck *Anas platyrhynchos* and the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Netherlands Journal of Zoology*, 34(3), 414–417.
- Mudra, R., Doležilková, J. (2015). Determinace cercárií vyloučených z plžů v koupací oblasti Brušperk. [online] ZÚ OVA [cit. 24.4.2021]. Dostupné z: <https://zuova.cz/Home/Clanek/cerkarie-brusperk>
- Müller, V., Kimmig, P. (1994). *Trichobilharzia franki* n. sp. a causative agent of swimmer's itch in south western Germany. *Applied Parasitology*, 35, 12–31.
- Morley, N. J. (2012). Cercariae (Platyhelminthes: Trematoda) as neglected components of zooplankton communities in freshwater habitats. *Hydrobiologia*, 691(1), 7–19.
- Nagy, Z. T. (2010). A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. *Organisms Diversity and Evolution*, 10(1), 91–105.
- Najim, A. T. (1956). Life history of *Gigantobilharzia huronensis* Najim, 1950. A dermatitis-producing bird blood-fluke (Trematoda-Schistosomatidae). *Parasitology*, 46(3–4), 443–469.
- Nedvěd, J. (2013). Bolevák není vhodný ke koupání, přemnožené larvy mohou zalézt pod kůži. [online] iDNES.cz [cit. 24.4.2021]. Dostupné z: https://www.idnes.cz/plzen/zpravy/larvy-v-boleveckem-rybniku.A130711_103747_plzen-zpravy_ban
- Nováková, E. (2015). Výskyt a identifikace cercárií v plovatce bahenní a dalších vývojových stádií motolic v Lužanském rybníku. Bakalářská práce, ZČU v Plzni.
- Oda T. 1973. Schistosome dermatitis in Japan. *Progress of Medical Parasitology in Japan*, 5, 5–63.
- Økland, J. (1992). Effects of acidic water on freshwater snails: results from a study of 1000 lakes throughout Norway. *Environmental Pollution*, 78(1–3), 127–130.
- Olivier, L. (1949). Schistosome dermatitis, a sensitization phenomenon. *American Journal of Epidemiology*, 49(3), 290–302.
- Parashar, B. D., Rao, K. M. (1988). Effect of temperature on growth, reproduction and survival of the

- freshwater planorbid snail, *Gyraulus convexiusculus*, vector of echinostomiasis. *Hydrobiologia*, 164(2), 185–191.
- Pech, V. (2013). Perorální infekce ptáků a savců neuropatogenní motolicí *Trichobilharzia regenti*. Diplomová práce, PřF UK.
- Podhorský, M., Hůzová, Z., Mikeš, L., Horák, P. (2009). Cercarial dimensions and surface structures as a tool for species determination of *Trichobilharzia* spp. *Acta Parasitologica*, 54(1), 28–36.
- Prüter, H., Sitko, J., Krone, O. (2017). Having bird schistosomes in mind—the first detection of *Bilharziella polonica* (Kowalewski 1895) in the bird neural system. *Parasitology Research*, 116(3), 865–870.
- Pumann, P., Kožíšek, F., Jeligová, H., Kothan, F. (2019). Deset let internetového dotazníku nemoci z koupání. *Sborník Konference Vodárenská Biologie 2019*, 84–89.
- Reimink, R. L., DeGoede, J. A., Blankespoor, H. D. (1995). Efficacy of praziquantel in natural populations of mallards infected with avian schistosomes. *The Journal of Parasitology*, 81, 1027–1029.
- Richard, J. (1971). La chétotaxie des cercaires valeur systématique et phylétique. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, Série A, Zoologie*, 67, 1–179.
- Rohr, J. R., Civitello, D. J., Crumrine, P. W., Halstead, N. T., Miller, A. D., Schotthoefer, A. M., Stenoien, C., Johnson, L. B., Beasley, V. R. (2015). Predator diversity, intraguild predation, and indirect effects drive parasite transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(10), 3008–3013.
- Rollinson, R., Chappel, L. H. (2001). Flukes and snails re-visited. Part of *Parasitology*. Cambridge University Press, 123.
- Rudko, S. P., Turnbull, A., Reimink, R. L., Froelich, K., Hanington, P. C. (2019). Species-specific qPCR assays allow for high-resolution population assessment of four species avian schistosome that cause swimmer's itch in recreational lakes. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 9, 122–129.
- Rudolfová, J. (2003). Nové nálezy ptačích schistosom a fylogenetická analýza vybraných druhů. Diplomová práce, PřF UK.
- Rudolfová, J., Hampl, V., Bayssade-Dufour, C., Lockyer, A. E., Littlewood, D. T. J., Horák, P. (2005). Validity reassessment of *Trichobilharzia* species using *Lymnaea stagnalis* as the intermediate host. *Parasitology Research*, 95(2), 79–89.
- Rudolfová J., Horák P. (2001). Occurrence of bird schistosomes in the Czech Republic. Proceedings of the Tenth Helminthological Days, Dolní Vestonice, 4-8 June 2001. Abstracts of papers. *Helminthologia*, 38, 175.
- Rudolfová, J., Littlewood, D. T. J., Sitko, J., Horák, P. (2007). Bird schistosomes of wildfowl in the Czech Republic and Poland. *Folia Parasitologica*, 54(2), 88–93.
- Rudolfová, J., Sitko, J., Horák, P. (2002). Nasal schistosomes of wildfowl in the Czech Republic.

- Parasitology Research*, 88, 1093–1095.
- Říčany, (2017) - Marvánek: Cerkárie na Marvánku prokázány! [online] Říčany [cit. 24.4.2021].
Dostupné z: <https://info.ricany.cz/mesto/marvanek-koupani-na-vlastni-nebezpeci->
- Samuelson J. C., Quinn John J., C. J. P. (1984). Hatching, chemokinesis, and transformation of miracidia of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology*, 70(3), 321–331.
- Savitri, D. A., Jember, U., Nurdian, Y., Jember, U. (2017). The potential outbreaks of zoonotic cercarial dermatitis in agroindustry areas need the application based on agromedicine.
- Schets, F. M., Lodder, W. J., De Roda Husman, A. M. (2010). Confirmation of the presence of *Trichobilharzia* by examination of water samples and snails following reports of cases of cercarial dermatitis. *Parasitology*, 137(1), 77–83.
- Schets, F. M., Lodder, W. J., van Duynhoven, Y. T. H. P., de Roda Husman, A. M. (2008). Cercarial dermatitis in the Netherlands caused by *Trichobilharzia* spp. *Journal of Water and Health*, 6(2), 187–195.
- Schuster, R. K., Aldhoun, J. A., O'Donovan, D. (2014). *Gigantobilharzia melanoidis* n.sp. (Trematoda: Schistosomatidae) from *Melanoides tuberculata* (Gastropoda: Thiaridae) in the United Arab Emirates. *Parasitology Research*, 113(3), 959–72.
- Sckrabulis, J. P., Flory, A. R., Raffel, T. R. (2020). Direct onshore wind predicts daily swimmer's itch (avian schistosome) incidence at a Michigan beach. *Parasitology*, 147(4), 431–440.
- Simon-Martin, F., Simon-Vicente, F. (1999). The life cycle of *Trichobilharzia salmanticensis* n. sp. (Digenea: Schistosomatidae), related to cases of human dermatitis. *Research and Reviews in Parasitology*, 59(1–2), 13–18.
- Simon, Chris; Franke, Adrian, Martin, A. (1991). The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification. *Molecular Techniques in Taxonomy*, 57, 329–355.
- Sitko, J., Faltýnková A., Scholz, T. (2006). Checklist of the trematodes (Digenea) of birds of the Czech and Slovak Republics. *Academia*, 111.
- Skírnisson, K., Kolářová, L. (2008). Diversity of bird schistosomes in anseriform birds in Iceland based on egg measurements and egg morphology. *Parasitology Research*, 103(1), 43–50.
- Skírnisson, Karl, Kolářová, L., Horák, P., Ferté, H., Jouet, D. (2012). Morphological features of the nasal blood fluke *Trichobilharzia regenti* (Schistosomatidae, Digenea) from naturally infected hosts. *Parasitology Research*, 110(5), 1881–1892.
- Soldánová, M., Faltýnková, A., Scholz, T., Kostadinova, A. (2011). Parasites in a man-made landscape: contrasting patterns of trematode flow in a fishpond area in Central Europe. *Parasitology*, 138(6). 789–807.
- Soldánová, M., Kuris, A. M., Scholz, T., Lafferty, K. D. (2012). The role of spatial and temporal heterogeneity and competition in structuring trematode communities in the great pond snail, *Lymnaea stagnalis* (L.). *Journal of Parasitology*, 98(3), 460–71.

- Soldánová, M., Selbach, C., Kalbe, M., Kostadinova, A., Sures, B. (2013). Swimmer's itch: Etiology, impact, and risk factors in Europe. *Trends in Parasitology*, 29(2), 65–74.
- Soldánová, M., Selbach, C., Sures, B. (2016). The early worm catches the bird? Productivity and patterns of *Trichobilharzia szidati* cercarial emission from *Lymnaea stagnalis*. *PLoS ONE*, 11(2), 1–21.
- Spyra, A. (2017). Acidic, neutral and alkaline forest ponds as a landscape element affecting the biodiversity of freshwater snails. *Die Naturwissenschaften*, 104(9–10), 73.
- Sylphium Webshop. Trichobilharzia sp. eDNA qPCR detection kit. [online] Sylphium Webshop [cit. 24.4.2021]. Dostupné z: <https://sylphium.com/webshop/product/trichobilharzia-sp-edna-qpcr-detection-kit/>
- Szidat, L. (1938). *Pseudobilharziella filiformis* n. sp., eine neue Vogelbilharzie aus dem Höckerschwan, *Cygnus olor* L. *Zeitschrift Für Parasitenkunde*, 49(1), 1–9.
- Šteiger, V. (2018). Molekulární diagnostika ptačích schistosom při nákaze přirozených i náhodných hostitelů. Diplomová práce, PřF UK.
- Toman, P. (2014) - Na Rolavě byl vyhlášen zákaz koupání. [online] Karlovarský deník.cz [cit. 24.4.2021]. Dostupné z: https://karlovarsky.denik.cz/zpravy_region/na-rolave-byl-vyhlasen-zakaz-koupani-20140730.html
- Turjanicová, L., Mikeš, L., Pecková, M., Horák, P. (2015). Antibody response of definitive hosts against antigens of two life stages of the neuropathogenic schistosome *Trichobilharzia regenti*. *Parasites and Vectors*, 8(1).
- Turner, A. M. (1996). Freshwater snails alter habitat use in response to predation. *Animal Behaviour*, 51(4), 747–756.
- Turner, A. M., Chislock, M. F. (2007). Dragonfly predators influence biomass and density of pond snails. *Oecologia*, 153(2), 407–415.
- Ullah, H., Qadeer, A., Giri, B. R. (2020). Detection of circulating cell-free DNA to diagnose *Schistosoma japonicum* infection. *Acta Tropica*, 211.
- Underwood, A. J. (1986) The analysis of competition by field experiments. *Kikkawa J, Anderson DJ (eds) Community Ecology Pattern and Process. Blackwell Scientific Publications, Melbourne*, 240-268.
- Valdovinos, C., Balboa, C. (2008). Cercarial dermatitis and lake eutrophication in south-central Chile. *Epidemiology and Infection*, 136(3), 391–394.
- Van Bolhuis, G. H., Rijks, J. M., Dorrestein, G. M., Rudolfova, J., Van Dijk, M., Kuiken, T. (2004). Obliterative endophlebitis in mute swans (*Cygnus olor*) caused by *Trichobilharzia* sp. (Digenea: Schistosomatidae) infection. *Veterinary Pathology*, 41(6), 658–665.
- Vande Vusse, F. J. (1980). A review of the genus *Dendritobilharzia* Skrjabin and Zakharow 1920 (Trematoda: Schistosomatidae). *The Journal of Parasitology*, 66(5), 814-22.

- Verbrugge, L. M., Rainey, J. J., Reimink, R. L., Blankespoor, H. D. (2004). Prospective study of swimmer's itch incidence and severity. *The Journal of Parasitology*, 90(4), 697–704.
- Vogel, H. (1930). Cercarien-dermatitis in Deutschland. *Klinische Wochenschrift*, 9(19), 883-886.
- Vyhláška č. 238/2011 Sb. o stanovení hygienických požadavků na koupaliště, sauny a hygienické limity písku v pískovištích venkovních hracích ploch. *Sbírka zákonů*, 10.8.2011.
- Vyhřídálová, T. (2016). Složení společenstev larválních stádií motolic (Digenea) u vybraných zástupců plicnatých plžů čeledi Planorbidae. Bakalářská práce, PřF JČU.
- Whitty, C. J. M., Mabey, D. C., Armstrong, M., Wright, S. G., Chiodini, P. L. (2000). Presentation and outcome of 1107 cases of schistosomiasis from Africa diagnosed in a non-endemic country. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(5), 531–534.
- Wulff, C., Haerberlein, S., Haas, W. (2007). Cream formulations protecting against cercarial dermatitis by *Trichobilharzia*. *Parasitology Research*, 101, 91–97.
- Yigezu, G., Mandefro, B., Mengesha, Y., Yewhalaw, D., Beyene, A., Ahmednur, M., Abdie, Y., Kloos, H., Mereta, S. T. (2018). Habitat suitability modelling for predicting potential habitats of freshwater snail intermediate hosts in Omo-Gibe river basin, Southwest Ethiopia. *Ecological Informatics*, 45, 70–80.
- Younes, A. A., Hanaa, E. S., Fathia, G., Marwa, M. (2016). *Sphaerodema urinator* duforas (Hemiptera: Belostomatidae) as a predator of *Fasciola* intermediate host, *Lymnaea natalensis* krauss. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 26(2), 191–196.
- Younes, A., El-Sherief, H., Gawish, F., Mahmoud, M. (2017). Biological control of snail hosts transmitting schistosomiasis by the water bug, *Sphaerodema urinator*. *Parasitology Research*, 116(4), 1257–1264.

PŘÍLOHY

Příloha 1

Záznamy ptačích schistosom a CD na území České republiky z let 1966-2020 za využití různých zdrojů včetně vlastního vyšetřování

Příloha 2

Přehled naměřených parametrů a nalezených vodních plžů v rámci sledování faktorů ovlivňujících výskyt ptačích schistosom v období od října 2018 do února 2020

Přílohy 1 a 2 jsou z důvodu velikosti tabulek umístěny na CD přiloženém k diplomové práci.

Příloha 3

Vzor pitevního protokolu pro záznamy výsledků z pitev vodních ptáků

Pitevní protokol

Druh živočicha:

Identifikace (č. kroužku):

Původ živočicha:

Pohlaví:

Stáří:

Stav kadáveru:

Lokalita nálezů:

Vodní plocha:

Datum nálezů:

Datum úhynu:

Datum pitvy:

Pitvu provedl:

Stav zvířete:

Parazitologické nálezy:

Závěr: