UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA *TRICHINELLA* SPP. U ZVÍŘAT A JEJÍ VÝZNAM PRO PREVENCI TRICHINELÓZY LIDÍ

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Jiří Lamka, CSc.

Hradec Králové, 2013 Lenka Martinková

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

Datum: Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému odbornému garantovi prof. RNDr. Jiřímu Lamkovi, CSc., školiteli MVDr. Karolu Račkovi a Mgr. Bádrovi za pomoc a cenné rady při vypracování bakalářské práce, dále svému manželovi, rodině a pracovnímu kolektivu za trpělivost a podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Trichinelózy je významné parazitární onemocnění lidí a zvířat. Její původce (*Trichinella spiralis*) a některé další příbuzné druhy (*Trichinella pseudospiralis, britovi*, aj.) jsou obligátními parazity, kteří nejsou jednoznačně vázáni na jednoho definovaného hostitele. Byli nalezeni u všech druhů savců a v posledních letech i u ptáků a plazů a volně se mezi nimi přenáší. Mohou být spíše považováni za parazity se specifitou pro svalovou tkáň, ve které dlouhodobě přežívají. V rámci jednoho zvířecího druhu i mezi druhy se šíří jediným způsobem, a to perorálně konzumací masa postižených jedinců. Tímto způsobem se přenáší i na člověka. Proto jsou informace o rozsahu a četnosti výskytu trichinel u volně žijících zvířat tak důležité. Jsou základním předpokladem pro sestavení adekvátních protinákazových opatření, kontrolu přenosu a účinnou ochranu zdraví lidí. A právě tímto směrem byla orientována tato práce. Jejím cílem bylo přispět k poznání incidence trichinelózy u divoce žijících zvířat, především masožravců.

Vzorky svalové tkáně získané od 130 lišek (z 24 okresů), 15 kun (ze 7okresů), 32 jezevců (ze 12 okresů), dvou psíků (ze ě okresů) a dvou lasic (ze ě okresů) byly vyšetřeny na přítomnost trichinel. Tato vyšetření byla provedena dvěma standardními v diagnostice trichinelózy běžně používanými postupy, a sice digestivní a kompresní metodou. V žádné z vyšetřovaných vzorků nebyly larvy trichinel prokázány.

Tyto výsledky byly potvrzeny i v další části práce, primárně zaměřené na ověření detekční spolehlivosti a specifity dvou dalších metodických postupů, a to aglutinačního testu a ELISA testu. Latexovým aglutinačním testem nebyly antigeny *Trichinella* spp. prokázány v žádném z vyšetřovaných vzorků. Dosažené výsledky byly v úplné shodě s výsledky dosažených digestivní a kompresní metodou. Při použití imunoenzymatického testu ELISA, který je založen na průkazu protilátek proti *Trichinella* spp .v masové šťávě, nebyly dosažené výsledky v úplné shodě s výsledky předchozích tří metod detekující antigeny *Trichinella* spp. Odlišné výsledky byly zjištěny u 3 vzorků, u kterých byly zjištěny náznaky možné pozitivity.

Negativní výsledky detekce trichinel u volně žijících masožravců nelze generalizovat na celé jejich populace žijící v České republice. Především proto, že celkové počty vyšetřených zvířat nebyly dostatečně vysoké a jejich regionální původ nepokrýval celý rozsah ČR, především pak oblasti, kde byl výskyt trichinel u jezevců a lišek už doložen (Vsetínsko, Beskydy, Ústí nad Orlicí, Rychnov nad Kněžnou, Liberecko). Dokládají pouze, že úroveň postižení populace lišek, kun a jezevců u nás, především v okresech, ze kterých byla získána zvířata k vyšetření, není příliš vysoká a nepřesahuje doložený evropský průměr.

Abstract

Trichinellosis is one of the most common human and animal illnesses caused by parasites. The causative agents of Trichinellosis are *Trichinella spiralis, pseudospiralis, britovi* and other related species. They are obligate parasites which are not unequivocally bound to single defined host. All species of mammals may be infected by Trichinella and nowadays it shows that even birds or reptiles may be infected. All species of Trichinella may be considered as muscle-specific parasites, because that‘s where they reside over the time. They always spread by new host consuming an infected meat. This is the way to infect animals of the same species, different species or to infect humans. The danger of human infection makes it very important to monitor degree and frequency of Trichinella infestation. Such monitoring is essential for infection prevention, contagion control and effective protection of human health. The aim of this work is to get to know the incidence of Trichinellosis among wild animals, primarily carnivores.

Muscle samples of 130 foxes(from 24 districts), 15 martens (from 7districts), 32 badgers (from 12 districts), two racoon dogs (from 2 districts) and two weasels (from 2 districts) were examined for the presence of Trichinella. Tests were carried out using two standardized methods of Trichinella detection: digestion method and trichinoscopy method. None of these tests showed presence of Trichinella larvae.

These results were also proved in a next section of this work, which is primarily focused on verification of sensitivity and specificity of two other methods of Trichinella detection. Those are agglutination test and ELISA test. Latex agglutination test didn‘t show Trichinella antigens in any of the examined samples. Obtained results were exactly same as those obtained using ingestion method and trichinoscopy method. Results obtained using immunoenzymatic test ELISA (which is based on detection of anti-Trichinella antibodies in the meat juice) weren‘t entirely same as those obtained using previous three methods. Results were different for 3 samples showing possible chance of positivity.

Negative results of Trichinella detection among wild carnivores cannot be generalized for entire population living in the Czech Republic. That is due to insufficient amount of examined samples as well as due to its regional origin which doesn‘t cover entire Czech Republic (especially those regions where Trichinella was already detected among foxes and badgers - Vsetínsko, Beskydy, Ústí nad Orlicí, Rychnov nad Kněžnou, Liberecko). Obtained results only prove that the level of infestation of foxes, martens and badgers (in those regions where animals were obtained for sampling) isn‘t high nor is it higher than EU‘s documented average.

Obsah

Použité zkratky 9
1. Úvod a literární přehled 10
1.1. Definice a objev trichinelózy 10
1.2. Etiologie trichinelózy 10
1.3. Biologie původce trichinelózy 11
1.4. Průběh onemocnění a klinické příznaky 13
1.5. Diagnostika trichinelózy 13
1.6. Epidemiologie trichinelózy 15
1.7. Profylaxe a léčba trichinelózy 17
2. Cíl práce 20
3. Materiál a metodika 21
3.1. Testovaná zvířata 21
3.2. Způsob získávání zvířat 21
3.3. Odběr vzorků 21
3.4. Metody průkazu trichinel 22
3.5. Digestivní metoda 22
3.6. Kompresní metoda – trichinoskopie 23
3.7. Aglutinační test 23
3.8. Imunoenzymatický test ELISA 24
3.9. Provádění testů 25
4. Výsledky 27
5. Zhodnocení výsledků a diskuse 28
6. Závěr 32
7. Literatura 33
8. Internetové zdroje 37
Příloha 1
Příloha 2
Příloha 3

Použité zkratky

ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay – imunoenzymatický test

ČR – Česká republika

OIE - The World Organisation for Animal Health - Světová organizace pro zdraví zvířat

SVÚ – Státní veterinární ústav

1. Úvod a literární přehled

1.1. Definice a objev trichinelózy

Trichinelóza je parazitární onemocnění člověka, hospodářských i v přírodě žijících zvířat. Finální vývojová stádia parazita se formují v kosterní svalovině a jsou infekční po řadu let. K šíření nemoci v rámci jednoho živočišného druhu i mezi druhy dochází výlučně perorálně, pojídáním masa postižených jedinců. v přírodě se jedná o nemocná, uhynulá nebo ulovená zvířata (karnivorismus, kanibalismus a nekrofagie ať již vědomá nebo náhodná). Naprosto běžný je mezidruhový přenos infektu. Jednoznačně platí pro lidi, kteří se mohou nakazit při konzumaci nedostatečně tepelně opracovaného masa nebo masných produktů z jakéhokoli jiného živočišného druhu (prasata, koně, lovná zvěř, atd.) (Jurášek, Dubinský a kol., 1993, Svobodová a Svoboda, 1995, Koudela, 2001, Koudela, 2002). Původce onemocnění byl objeven v roce 1835 Jamesem Pagetem ve svalovině muže, který zemřel na TBC. Podrobněji jej popsal Robert Owen a nazval jej *Trichina spiralis*. Na základě návrhu Alcida Railleta bylo označení rodu změněno na *Trichinella*. Je pravděpodobné, že onemocnění člověka je mnohem starší a spadá do období, kdy ve výživě lidí dominovalo syrové nebo polosyrové maso. V roce 1864 byly larvy trichinel detekovány v mase prasete. V letech 1853 - 1860 byl popsán jejích vývoj a způsob přenosu Rudolfem Leuckartem a Rudolfem Virchowem. Ti také navrhli první preventivní opatření, a sice tepelné zpracování masa určeného k lidské výživě (Koudela, 2002).

1.2. Etiologie trichinelózy

Trichinelózu vyvolávají paraziticti oblí červi. Řadí se do říše živočichů (Animalia), kmene hlístic (Nematoda), třídy Adenophorea, řádu Enoplida, čeledi Trichinellidae, rodu svalovce (*Trichinella*). Dlouhou dobu byl za původce onemocnění považován pouze jeden druh, a sice svalovec stočený – *Trichinella spiralis*. v současné době je monoetiologická povaha onemocnění jednoznačně vyvrácena. Bylo identifikováno dalších 7 druhů a 4 genotypy trichinel. Liší se vlastnostmi, které nemají zásadní taxonomický význam. Například patogenitou, spektrem hostitelů a výskytem a rozšířením v různých částech světa. Praktická

parazitologie je dále člení do dvou skupin podle toho, zda se ve svalovině enkapsulují do kolagenních pouzder (*Trichinella spiralis, Trichinella britovi, Trichinella nelsoni, Trichinella nativa a Trichinella murelli*) nebo leží volně mezi svalovými vlákny (*Trichinella pseudospiralis, Trichinella papue a Trichinella zimbabwensis*). Dospělí jedinci svalovce mají nitkovitý tvar těla kruhového průřezu. Velikost je různá v závislosti na pohlaví. Samičky jsou větší, dosahují délky 3-4 mm, samečci dorůstají do velikosti 1,4-1,6 mm. Povrch tvoří kutikula, která má ochrannou a opornou funkci, probíhá přes ni látková výměna a zprostředkovává interakci parazita a hostitele. Larvy, vyskytující se v kosterní svalovině, dosahují rozměrů okolo 1 mm (Volf, Horák, a kol., 2007). Druhová diferenciace trichinel je možná pouze použitím molekulárních metod amplifikací částí jejich genomu polymerázovou řetězovou reakci (Polymerase chain reaction – PCR). *Trichinella spiralis* je celosvětově rozšířena. *Trichinella britovi* je druh vyskytující se u volně žijících zvířat v Evropě, včetně České republiky (ČR). *Trichinella nelsoni* je typický druh pro Afriku, kde jejím typickým hostitelem je hyena. *Trichinella nativa* se vyskytuje u mrožů, ledních medvědů a polárních lišek v arktických oblastech. Vyskytuje se též v Švédsku a Finsku. *Trichinella pseudospiralis* se nalézá u masožravých ptáků a savců (včetně prasete) v Evropě. *Trichinella papue* se vyskytuje na Papua Nové Guinei u domácích prasat. *Trichinella murelli* je druh vyskytující se u masožravců v Severní Americe. *Trichinella zimbabwensis* byla nedávno popsána u krokodýlů a je infekční i pro savce (Gajadhar a kol., 2008, Gootstein a kol., 2009, Koudela, 2009).

1.3. Biologie původce trichinelózy

Všechny druhy rodu *Trichinella* jsou obligátními endoparazity. Jejich existence i celý vývojový cyklus jsou vázány na jednoho jedince, který plní roli hostitele i mezihostitele. Probíhá ve dvou fázích. V první fázi, střevní, se perorálně přijaté infekční larvy L_1 uvolňují ze svaloviny a zanořují se do sliznice tenkého střeva. Zde v průběhu 30 h pohlavně dospívají. Po kopulaci produkují za 5 dní samičky 1000-1500 larev 2. generace (L_2), které v průběhu migrační fáze penetrují přes střevní sliznici do lymfatického systému. Krví jsou zanášeny do příčně pruhované svaloviny, kde během svalové fáze pronikají do svalových

buněk a postupně se uzavírají do kolagenních pouzder, nebo zůstávají volně mezi svalovými buňkami. Za další 2 až 3 týdny se larvy stávají infekční. Pro specifické imunitní mechanismy hostitele (buněčná a humorální imunita) jsou prakticky nedosažitelné a přežívají v plně infekční formě až několik let i přesto, že jejich pouzdra často kalcifikují. Žádná exogenní vývojová stádia neexistují. Prakticky to znamená, že zdravý jedinec se nemůže infikovat přímo z vnějšího prostředí. Jediná cesta přenosu je perorálně. Většinou se jedná o příjem potravy, a sice svalové tkáně trichinelózních zvířat, která je jediným přirozeným zdrojem finálního vývojového stádia, tj. infekčních forem první generace (L1) (Jurášek, Dubinský a kol., 1993, Koudela, 2001a, Koudela, 2001c, Gajadhar a kol., 2008, Chroust a Forejtek, 2010). Odolnost larev je vysoká. V kadáverech přežívají až 4 měsíce, při 4 °C až 300 dnů (Forejtek, 2006).

Šíření trichinelózy probíhá ve dvou formách:

a) synantropní (domestikální) cyklus - při tomto cyklu dochází k přenosu původce trichinelózy mezi hlodavci a domácími prasaty. Člověk se následně nakazí konzumací svaloviny, nebo tepelně nedostatečně opracovaných produktů z těchto prasat. V některých zemích (Itálie, Francie) byl zaznamenán přenos i ze svaloviny koní, kteří se zřejmě nakazili náhodnou konzumací pozitivních hlodavců (Svobodová a Svoboda, 1995, Koudela, 2001c, Chroust a Forejtek, 2010),

b) sylvatický (lesní) cyklus - tento cyklus se odehrává ve volné přírodě. Zdrojem infekce pro člověka je svalovina divokých prasat, či jiných volně žijících zvířat vnímavých k tomuto onemocnění (např. jezevec lesní). V rámci tohoto cyklu dochází k přenosu trichinel mezi volně žijícími masožravci, jejichž kadávery jsou zdrojem infekce pro divoká prasata a pro hlodavce (Svobodová a Svoboda, 1995, Koudela, 2001c, Babička a Diviš, 2003, Chroust a Forejtek, 2010).

K zavlečení infektu do lidské populace může dojít dvojím způsobem. Buď přímo masem a masnými výrobky připravených z lovné zvěře, nebo přes tzv. synantropní cykly trichinelózy. V tomto případě se trichinelózou

ze synantropních ohnisek primárně nakazí hospodářská zvířata (prasata, koně) a teprve sekundárně jejich masem člověk. Důležité je, že tento vzájemný přesun obou cyklů je zcela spontánní, nepředvídatelný a stěží kontrolovatelný (Koudela, 2001c, Koudela, 2002, Pozio a Darwin Murell, 2006, Gajathar a kol., 2008, Gottstein a kol., 2009).

1.4. Průběh onemocnění a klinické příznaky

Průběh a klinické příznaky tohoto onemocnění jsou dány mnoha faktory. Rozhodující vliv má počet pozřených larev. Průběh taktéž závisí na druhu trichinely, interakci s hostitelem a na zdravotním stavu konzumenta. Inkubační doba se pohybuje v rozmezí 5-25 dní. Onemocnění může probíhat ve třech formách. Bezpříznakově, (po pozření 10-50 larev), jako lehká forma trichinelózy, kdy jsou patrné mírné klinické příznaky (po pozření 50-500 larev) a jako těžká forma trichinelózy, kdy je člověk či zvíře v přímém ohrožení života (pozřeno 1000 a více larev) (Koudela, 2001a). První klinické příznaky se objevují během střevní fáze onemocnění. U člověka je to nausea, bolest břicha či průjem. Ve svalové fázi se larvy postupně usazují ve svalových buňkách a dostavuje se horečka, bolesti svalstva, otoky obličeje a víček. Při silné infekci dochází k tachykardii, bolestivosti svalů na pouhý dotek, třesavka a nehybnost svalů (jazyka, očních svalů), k poruchám krevního obrazu (anemie, eozinofilie) a ve velmi závažných případech až ke smrti. Ta nastává nejčastěji v důsledku poruch srdeční činnosti (Koudela, 2001a, Koudela 2002, Koudela, 2009, Gottstein a kol., 2009, Chroust a Forejtek, 2010). U zvířat toto onemocnění probíhá většinou bez výrazných klinických příznaků. Ty se dostavují v důsledku silné infekce. Zejména se jedná o poruchy trávicího traktu (nechutenství, průjmy, hubnutí a kolikové bolesti), dále imobilita a malátnost. Stejně jako u člověka může i u zvířat onemocnění končit smrtí (Chroust a Forejtrek, 2010, Nemoci prasat, Katedra speciální zootechniky).

1.5. Diagnostika trichinelózy

Diagnostika trichinelózy je založena na využití dvou souborů metod. První zahrnuje postupy přímého průkazu parazita, přesněji jeho finální vývojové

formy, tj. infekčních larev ve svalovině poražených nebo uhynulých zvířat. Detekce ostatních vývojových forem parazita nemá praktický význam a neprovádí se. Druhý soubor reprezentují nepřímé detekční testy, které detekují specifické důsledky parazitární infekce. Jedná se především o průkaz antigenu *Trichinella spp*. v masové trávenině a o průkaz protilátek proti *Trichinella spp.*v masové šťávě či krevních sérech, přičemž druhá zmíněná metoda umožňuje i intravitální diagnostiku (Bien, 2006, Nöckler a kol., 2009, Knoop a kol., 2011, Gross a kol., 2012). V omezeném rozsahu jsou v diagnostice trichinelózy využívány i molekulárně biologické testy. Uplatňují se v menším rozsahu především v odborných studiích nebo při diferenciaci různých druhů trichinel (Pozio a La Rosa, 2003, Gottstein a kol., 2009).

K přímému průkazu parazita jsou v současné době používány dva postupy. Digestivní metoda a kompresní metoda (trichinoskopie). Obě metody jsou použitelné pouze k vyšetření mrtvých, tj. utracených (jatky, domácí porážky), odstřelem získaných, nebo uhynulých zvířat. Pro intravitální diagnostiku jsou nepoužitelné. Digestivní metoda má proti trichinoskopii řadu výhod. Je citlivější, méně pracná a méně časově náročná. Umožňuje vyšetřovat směsné vzorky získané až ze 100 zvířat a prokazovat larvy všech druhů trichinel, včetně těch, které netvoří mikroskopicky zřetelná kolagenní pouzdra (Koudela, 2002, Koudela a Pavlíčková, 2004, EC – European comunity, 2005, Forejtek, 2006, Marucci a kol., 2008, Gajadhar, 2008, OIE manual, 2008, Gottstein a kol., 2009, Koudela, 2009).

Ostatní diagnostické testy jsou spíše ve stádiu vývoje a ověřování. Jedná se především o aglutinační test (Bokken a kol., 2012), který detekuje antigeny *Trichinella spp.* v masové trávenině a v současné době je jeho použití povoleno pouze u jatečných prasat a ELISA test (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) určený k průkazu specifických protilátek v krvi, či masové šťávě invadovaných zvířat (Teunis a kol., 2009). Všeobecně platí, že v detekovatelných koncentracích se tyto protilátky objevují v krvi za tři týdny od okamžiku, kdy svalové larvální stádium nabývá plnou infekčnost (Gajadhar a kol., 2008, Gottstein a kol., 2009). Tento termín platí především pro prasata invadovaná vyšší dávkou larev (33 – 55 larev na 1 g svaloviny). U prasat invadovaných

nízkými dávkami (0,01 – 0,05 larev na 1 g svaloviny) nedochází k detekovatelné protilátkové odpovědi buď vůbec, nebo až za 2 – 3 měsíce (Smith 1987). U nás se vývojem tohoto postupu zabývá Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně (Kovařčík, 2013).

1.6. Epidemiologie trichinelózy

V ČR dominuje druh *Trichinella spiralis*. První lidská epidemie byla zaznamenána v roce 1865 ve Frýdlantu, kde onemocnělo 35 lidí. Během dalších 100 let bylo u nás popsáno kolem 19 výskytů, které postihly více jak 1000 osob. Jednalo se o drobné případy v Praze, Brně, Kolíně či v Jindřichově Hradci. Při poslední registrované epidemii v roce 1954 (Smrdov u Pacova) onemocnělo 11 lidí a 3 lidé zemřeli (Koudela, 2001a). Od roku 2000 bylo na našem území celkem 13 případů výskytu trichinelózy. V roce 2001 poblíž města Frýdek Místek a Znojma. V roce 2002 v okrese Trutnov a Frýdek Místek. Roku 2003 v okrese Děčín a Hradec Králové. Dále v roce 2006 v okrese Rychnov nad Kněžnou (Koudela, 2001b, Koudela a Pavlíčková, 2002, Koudela, 2009). Na přelomu roku 2010/2011 byla potvrzena trichinelóza u třech odlovených kusů divokého prasete v katastrálním území Dolní Dobrouč v okrese Ústí nad Orlicí (Koudela, 2011). Poslední výskyt byl zaznamenán na konci roku 2012 v katastrálním území Paseky nad Jizerou. (Trichinella, Státní veterinární správa). Kromě *Trichinella spiralis* byl v ČR doložen i výskyt *Trichinella britovi* a *Trichinella pseudospiralis* (Koudela, 2001, Koudela 2006, Koudela 2009, Koudela, 2011) (Příloha 3, obr. 1).

Na Slovensku byla nejrozsáhlejší epidemie zjištěna v roce 1998 v oblasti Banské Bystrice. Onemocnělo 336 osob (Förstl a kol., 2001). Několik epidemií bylo popsáno i na východním Slovensku a dále v Rožňavě (rok 1978), Prešově (rok 1980) a Bardějově (rok 1980) (Koudela, 2002). Kromě *Trichinella spiralis* byl na Slovensku potvrzen i výskyt *Trichinella britovi* a na východním Slovensku *Trichinella pseudospiralis* (Hurníková a kol., 2005). K hromadnému výskytu trichinelózy došlo i v dalších evropských zemích. Například v Německu, kde v roce 1982 onemocnělo 400 osob, ve Francii bylo v roce 1998 postiženo taktéž 400 osob a dále v Itálii, kde bylo od roku 1975 zaznamenáno několik výskytů s celkovým počtem 1000 nakažených (Koudela, 2001, Babička a Diviš, 2003).

Časté epidemie byly zaregistrovány v Bulharsku, Bělorusku, Polsku, Ukrajině, Rumunsku a Srbsku (Babička a Diviš, 2003) (Příloha 3, obr. 2).

Jedinečný vývojový cyklus trichinel a způsob jejich přenosu jsou klíčové determinanty určující výskyt a šíření trichinelózy. Dalším významným epidemiologickým faktorem je i existence různých druhů trichinel adaptovaných na různé klimatické podmínky a široké spektrum hostitelů, které zahrnuje téměř nejen všechny druhy savců, především masožravce (rys, vlk, medvěd, jezevec, liška, kočka, pes, tchoř, hyena, levhart, lev, kuna, lasice), všežravce (prase divoké), hlodavce (myši, potkani), mořské savce (mrož) ale, jak ukazují poznatky z posledních let, i ptáky a plazy (Förstl a kol., 2001, Babička a Diviš, 2003, Koudela a Pavlíčková, 2005, Hurníková a kol., 2005, Pozio a Darvin Murell, 2006, Gajadhar a kol., 2008, Gottstein a kol., 2009, Chroust a Forejtek, 2010).

Tyto zvláštnosti parazitů rodu *Trichinella* vysvětlují příčinu jejich celosvětového rozšíření i permanentního výskytu v různých oblastech. V přírodě se trichinelóza udržuje prostřednictvím tzv. sylvatických cyklů šíření. Jejich podstatu tvoří skutečnost, že:

- všechna masožravá a i některá ostatní zvířata v dané oblasti jsou k trichinelové infekci vnímavá,
- některá z nich již invadovaná jsou a jejich svalovina, sloužící jako potrava pro ostatní jedince, obsahuje infekční larvy 1. generace.

Tím se vytváří ne zcela ohraničený, přirozený a trvalý rezervoár trichinelózy, který je často velmi stabilní, rozsáhlý a udržuje se dlouhou dobu. V jeho rámci se trichinely spontánně šíří podle pravidel pro danou oblast platných potravinových řetězců. Na Slovensku jsou těmito ohnisky například Vyhorlat, Slovenské Rudohoří a Východní Beskydy a v ČR byly podobnými lokalitami Strakonicko, Písecko, Pacovsko, Děčínsko a další (Chroust a Forejtek, 2010).

Druhové složení zvířat v rezervoárech se geograficky liší. V Evropě dominují divoká prasata, lišky a jezevci, ale jistý význam je přičítán i drobným hlodavcům, rysům, vlkům a medvědům (Chroust a Forejtek, 2010). V USA

a Kanadě jsou to především medvědi, pumy a vlci a v severských zemích mořští savci, lední medvědi a polární lišky (Koudela 2001c, Koudela, 2009, Gottstein a kol., 2009).

Celkový rozsah výskytu trichinelózy i stupeň postižení druhů zvířat v rezervoárech není stabilní a může se, v závislosti na mnoha faktorech, průběžně měnit. Jako celek si však rezervoárová fauna zachovává pozitivitu, která je bez redukce počtu zvířat prakticky nezničitelná. Sylvatické rezervoáry tak představují stálý zdroj infektu a ohrožují i zdraví lidí a hospodářských zvířat.

1.7. Profylaxe a léčba trichinelózy

Specifická imunoprofylaxe trichinelózy, tj. vakcíny nebo léčebná séra neexistují. Imunitní systém infikovaných zvířat i lidí sice na parazita specificky reaguje (protilátky, buněčná imunita), ale jeho vliv na jednotlivé fáze vývojového cyklu trichinel je minimální. Platí to především pro konečné vývojové stádium parazita, tj. infekční larvy lokalizované ve svalovině, které jsou pro imunitní mechanismy hostitele stěží dostupné. Specifická, přirozenou cestou vzniklá, ani uměle navozená imunita průběh trichinelózy neovlivňuje a není zdrojem odolnosti organismu k reinfekcím. Také léčba trichinelózy je, kromě krátkodobé, enterální fáze, jen málo efektivní a praktikuje se pouze u lidí. Používají se anthelmintika na bázi benzimidazolů. Během svalové fáze ztrácí anthelmintika účinnost. Terapie zůstává omezena na symptomatickou léčbu a tlumení zánětlivých reakcí pomocí kortikosteroidů. (Svobodová a Svoboda, 1995, Förstl a kol., 2001, Babička a Diviš, 2003, Gottstein a kol., 2009). Za těchto okolností existuje vlastně jen jediná možnost prevence onemocnění u člověka. Je to znemožnění průniku parazita do lidského potravního řetězce. Prakticky to znamená nepoužívat v lidské výživě maso a masné výrobky, u kterých není jistá absence živých larev trichinel. Tento efekt je dosažitelný dvěma způsoby:

a) systematickou kontrolou masa všech, k trichinelóze vnímavých, zvířat určených k jatečnému zpracování a výrobě potravin. K tomuto účelu se využívají laboratorní postupy průkazu trichinelózních larev především digestivní metodou. Z důsledného provádění laboratorní diagnostiky se

tak stává základní preventivní prostředek (Babička a Diviš, 2003, Koudela a Pavlíčková, 2004),

b) důsledná devitalizace larev trichinel v mase před jeho konzumním využitím. Zahrnuje postupy založené na experimentálně ověřených poznatcích o schopnostech larev trichinel přežívat při různých teplotách (Svobodová a Svoboda, 1995, Koudela, 2001c, Koudela, 2002).

Larvy trichinel jsou citlivé k působení vyšších teplot. Téměř okamžitě hynou při teplotách nad 62 °C, za 5 minut při 55 °C a za 45 minut při 52 °C (Koudela, 2002.). Proto je k inaktivaci trichinel doporučováno zahřátí na 58 °C po dobu nejméně 2 minut (Gajadhar a kol., 2008). V USA je používána teplota 71 °C po dobu 1 minuty (Koudela, 2001c, Koudela, 2002, Gajadhar a kol., 2008). Prohřátí musí být dokonalé a to v celém průřezu použitého masa.

Larvy trichinel lze devitalizovat i zamrazením. Téměř okamžitě hynou při -28 °C, za několik minut při -20 °C a za 60-120 minut při -15 °C (Koudela, 2001a, Koudela, 2002, Gajadhar a kol., 2008, Gottstein a kol., 2009).

Nevýhodou zamrazování je, že některé druhy trichinel (*Trichinella nativa, Trichinella genotyp G6*) jsou ke zmrazení rezistentní (Pozio a Darwin Murell, 2006). V oblastech s jejich endemickým výskytem proto nelze zmrazovací devitalizační postupy bez rizika aplikovat.

Z uvedených skutečností vyplývá, že běžné kulinářské opracování masa (vaření, pečení, smažení) trichinely plně inaktivuje. Ostatní způsoby zpracování (nasolování, uzení, sušení) nejsou účinné.

V praktické prevenci trichinelózy se devitalizační postupy využívají jen v omezeném rozsahu. Například u zvířat, u kterých byla laboratorně potvrzena trichinelóza (lovná zvěř), nebo u zvířat, která nemohla být z různých důvodů vyšetřena. Platí to především pro oblasti, kde lidé žijí a odchovávají domácí zvířata (prasata) v bezprostředním kontaktu s volnou přírodou a tam, kde je lov a konzum ulovených zvířat součástí běžného životního cyklu.

Dominantní preventivní prostředek je laboratorní diagnostika prováděná u zvířat poražených na jatkách i odlovených a následně vyřazování pozitivních

jedinců. Tato praxe je běžná ve všech zemích a oblastech s pokročilou zemědělskou výrobou a výrobou potravin a s dostatečně rozvinutou diagnostickou základnou (instituce, vybavení, kvalifikovaný personál). Je uplatňována i v zemích EU, kde je její provádění formalizovanou formou návodů a norem zahrnutých ve vyhlášce No 2075/2005 (EC – Europian Community, 2005). Tento dokument je závazný i pro ČR a je u nás plně respektován. Výkonnou institucí je Státní veterinární správa (SVS ČR) a její akreditované diagnostické laboratoře – Státní veterinární ústavy (SVÚ Praha, Jihlava, České Budějovice, Hradec Králové a Olomouc). Počet ročně vyšetřovaných zvířat se pohybuje od 2 do 3 miliónů Trichinely se dosud nepodařilo prokázat u žádného z nich (Harna, 2013).

Také vyšetření ulovených divokých zvířat, především prasat, je SVS ČR definováno každoročně zpřesňovanou „Metodikou kontroly zdraví“ a je hrazeno ze státních prostředků (SVS – MKZ, 2013). Ročně se vyšetřuje přibližně 100 tisíc divokých prasat. Pozitivní případy jsou ojedinělé (viz bod 1.6.).

V rámci komplexní prevenci trichinelózy je třeba zařadit i snahu znemožnit přestup infektu ze sylvatického do synantropního cyklu. Je náročná a zahrnuje řadu provozních i stavebních opatření a úprav. Jejich cílem je úplná izolace stájových provozů od okolního prostředí a znemožnění pasivního zavlečení i aktivního průniku divoce žijících zvířat do stájových provozů. Je klíčovou podmínkou pro formování *Trichinella* – prostých chovů, nebo celých oblastí (Marucci a kol., 2008, Teunis a kol., 2009, Knoop a kol., 2011, Koudela a Janáčková, 2012), o kterých se, jako o skutečně efektní profylaxi trichinelózy uvažuje jak v EU, tak v ČR.

2. Cíl práce

Práce je tématicky zaměřena na problematiku trichinelózy. V epidemiologii této významné parazitózy hraje klíčovou roli sylvatická cykličnost infekce. Její podstatu tvoří permanentní, nekontrolovatelný přenos infektu mezi volně žijícími zvířaty a jeho trvalá perzistence ve zvířecích populacích. Důsledkem je vznik spontánně se udržujících a obnovujících přírodních ohnisek nákazy. Původce trichinelózy se z nich může kdykoli přenést i do populací hospodářských zvířat a významně ohrozit i zdraví lidí.

Poznání rozsahu trichinelózní pozitivity jednotlivých druhů zvířat i jednotlivých zvířat žijících v endemických ložiscích je nedostatečná a často pouze odhadovaná. Tato skutečnost determinuje i účel a zaměření mé bakalářské práce. Jejím cílem je:

- ověřit rozsah výskytu trichinel u lišek, které jsou, vzhledem k tomu, že se jedná o striktní masožravce, považovány za důležitý faktor sylvatických cyklů infekce,
- pokusit se prokázat trichinely i u dalších volně žijících zvířat, a sice u jezevců, lasiček, kun a psíků, jejichž pozitivita a podíl na cirkulaci trichinel v ohniscích jsou vysoce pravděpodobné.

Doplňkovým cílem práce bylo částečné ověření dvou metodických postupů diagnostiky trichinelózy. Jedná se o průkaz larev trichinel v klinických vzorcích aglutinačním testem, který je v současné době používán pro diagnostiku trichinelózy u jatečných prasat a průkaz protilátek proti *Trichinella spp.* v masové tekutině zvířat testem ELISA, který je dosud ve stádiu vývoje a ověřování.

3. Materiál a metodika

3.1. Testovaná zvířata

Do vyšetření zaměřených na identifikaci nosičství bylo zařazeno několik druhů volně žijících zvířat. Jsou to:

- liška obecná (*Vulpes vulpes*); celkem bylo vyšetřeno 130 lišek,
- kuna lesní (*Martes martes*); celkem bylo vyšetřeno 5 kun lesních,
- kuna skalní (*Martes foina*); celkem bylo vyšetřeno 10 kun skalních,
- lasice hranostaj (*Mustela erminea*); celkem byly vyšetřeny 2 lasice,
- psík mývalovitý (*Nyctereutes procyonoides*); celkem byli vyšetřeni 2 psíci,
- jezevec lesní (*Meles meles*); celkem bylo vyšetřeno 32 jezevců.

3.2. Způsob získávání zvířat

- liška obecná: vzorky byly získávány ze zvířat zasílaných na SVÚ Olomouc s primárním cílem diagnostiky vztekliny. Celkem bylo vyšetřeno 130 zvířat, která pocházela z 24 okresů ČR,
- kuna lesní, kuna skalní, lasice hranostaj, psík mývalovitý: vzorky byly získávány od odstřelených a uhynulých zvířat a to od myslivců a lesníků (2 kuny lesní a 1 lasice), nebo od Mgr. Bádra (10 kun skalních, 3 kuny lesní, 1 lasice a 2 psíci),
- jezevec lesní: vzorky byly získávány ze zvířat dodaných na SVÚ Jihlava s cílem vyšetření na trichinelózu (29 jezevců), a od Mgr. Bádra (2 jezevci).

Přehledně je soubor vzorků a jejich původ zachycen v tabulce 1 uvedené v příloze 1.

3.3. Odběr vzorků

Vzorky svaloviny byly odebírány z predilekčních míst, tj. ze svalů, kde je u pozitivních jedinců koncentrace trichinelózních larev nejvyšší. Jsou to:

bráníční pilíře nebo bránice, žvýkací svaly, jazyk a u šelem dolní části předních končetin (předloktí). Odběr byl proveden při pitvě odstřelených zvířat, nebo zvířecích kadáverů. Vzorky byly odebírány v množství 3-25 gramů.

3.4. Metody průkazu trichinel

Ke stanovení trichinel ve vzorcích svaloviny byly použity čtyři metodické postupy. Dva z nich, digestivní metoda a trichinoskopie, představují standartní laboratorní metody a byly prováděny podle závazných návodů formulovaných v metodikách OIE a EU (2008EC – European comunity, 2005, OIE manual) a v pracích Gottstein, B.a kol. (2009) a Gajadhar, A. A. a kol. (2009). Třetí a čtvrtý postup, tj. aglutinace antigenu *Trichinella spp.* v masové trávenině a průkaz protilátek proti *Trichinella spp.* v masové šťávě pomocí imunoenzymatického testu ELISA, byly prováděny podle návodů výrobců příslušných diagnostických souprav. (Bio-Rad laboratories, Inc. a ID vet innovative diagnostics). Ke každému vyšetření byly zařazovány 2 známé kontrolní pozitivní vzorky prasečí svaloviny uvedené v bodě 3.9.

3.5. Digestivní metoda

Podstatou metody je mikroskopický průkaz larev trichinel uvolněných ze svalové tkáně a kolageních pouzder důslednou tripsinací.

Vzorky tkáně byly zbaveny tuku a vaziva, nastříhány na menší kousky, přeneseny do mixéru, a zality 100 ml vodovodní vody předehřáté na teplotu 45 °C. Jejich homogenizace byla prováděna při 18 000 ot/min přerušovaně v intervalech 5-10 s až do úplného rozdrcení tkáně. Homogenát byl přelit do kádinky o objemu 800 ml, a doplněn předehřátým roztokem kyseliny chlorovodíkové (1 ml 25% HCl ve 100 ml vody) o objemu 400 ml, který byl použit k vypláchnutí mixéru. Po přenesení kádinky na magnetickou míchačku bylo přidáno 2,5 g pepsinu (1:100 000 NF). Směs byla míchána 30 minut při teplotě 45 °C. Trávenina byla přelita přes sítko (180-355 μm) do 2 l dělící baňky. Po 30 min sedimentaci bylo do odměrného válce odpuštěno 40 ml tekutiny, která byla ponechána při laboratorní teplotě dalších 10 minut sedimentovat. Po 10 min bylo odsáto horních 30 ml tekutiny a zbývajících 10 ml

bylo přeneseno do Petriho misky a testováno v trichinoskopu MIKRO D10 (Příloha 3, obr. 3) na obsah larev trichinel.

3.6. Kompresní metoda – trichinoskopie

Podstatou metody je vizuální identifikace trichinelových cyst v mechanicky rozdrcené svalové tkáni.

Vzorek ze svalové tkáně o velikosti asi 1 cm^2 byl dále rozdělen na 28 menších částí. Po jejich přenesení na spodní skleněnou desku trichinoskopického kompresoria, která je členěna na 28 samostatných ploch a překrytí horní skleněnou deskou byly všechny dílky tkáně tlakem dosahovaným pomocí dvou svíracích šroubů úplně rozdrceny. Výsledky vyšetření byly hodnoceny mikroskopicky při 50ti násobném zvětšení (Příloha 3, obr. 4). Za pozitivní byly považovány vzorky, ve kterých byly prokázany cysty s enkapsulovanými larvami trichinel.

3.7. Aglutinační test

Podstatou metody je průkaz antigenu trichinel ve svalovině aglutinační sérologickou reakcí. K jejímu provedení byly využity diagnostické soupravy Trichin-L (Trichinella Antigen Test Kit) dodávané firmou Bio-Rad Laboratories Ltd, které obsahují tyto komponenty (Příloha 3, obr. 5):

- aglutinační karty s osmi jamkami,
- ředící roztok,
- pozitivní a negativní kontrolní vzorek,
- suspenzi modře zbarvených latexových partikulí potažených myší monoklonální protilátkou.

Vzorky svaloviny určené k vyšetření byly připravovány stejně jako u digestivní metody (homogenizace, tripsinace, míchání), ale sedimentace finální tráveniny byla nahrazena filtrací přes membránové filtry (150 μm). Po pětiminutové podtlakové filtraci byla filtrační membrána přenesena do 15 ml Falcon zkumavky a rozdrcena tloučkem. Po přidání 0,5 ml ředícího roztoku byly larvální antigeny opakovanými údery tloučku (alespoň 30 s) rozdrceny.

Suspenze získané tímto způsobem ze šesti vzorků byly v množství 50 µl naneseny do šesti jamek aglutinační karty. Do zbývajících dvou jamek byl aplikován pozitivní a negativní kontrolní vzorek. Do všech jamek bylo přidáno 25 µl suspenze latexových částic. Získaná směs byla důkladně promíchána jednorázovou plastovou tyčinkou. Aglutinační karta byla přenesena na pohyblivý sklopný stolek, kde byly vzorky dále promíchávány při frekvenci 30 ot/min. Po deseti minutách a přesunutí aglutinačních karet na rovnou plochu byly hodnoceny výsledky. Tvorba větších i menších barevných shluků latexových částic (aglutinát) a odbarvení reakčního pozadí byly považovány za pozitivní výsledek.

3.8. Imunoenzymatický test ELISA

Podstatou metody je sérologický průkaz specifických protilátek proti *Trichinella spp. v* masové šťávě získané z podezřelé svaloviny. K provedení testu byla využita diagnostická souprava (ID Screen Trichinella Indirect, Multi Species) dodávané firmou ID Vet Innovative diagnostics, které obsahují tyto komponenty (Příloha 3, obr. 6):

- mikroplotny s 96 jamkami potažené antigenem,
- konjugát, tj. antidruhovou (koně, prasata, psi, lišky) protilátku značenou enzymem,
- pozitivní a negativní kontrolní vzorek,
- ředící pufry,
- proplachovací roztok,
- roztok substrátu (TMB – tetramethylbenzidin),
- zastavovací roztok (0,5 M H_2SO_4).

Vyšetření bylo prováděno podle návodu výrobce a sestávalo se z těchto následných kroků:

- do dvou jamek mikrotitrační plotny byla nanesena negativní a do dalších dvou pozitivní kontrola v iniciálním ředění 1:20, do ostatních 92 jamek vyšetřované vzorky v iniciálním ředění 1:2,

- po inkubaci 45 minut, vyprázdnění a propláchnutí jamek byl do každé z nich nanesen roztok konjugátu,
- po inkubaci 30 minut, vyprázdnění a propláchnutí jamek byl do každé z nich nanesen roztok substrátu,
- po inkubaci 15 minut ve tmě byl přidán zastavovací roztok,
- po stabilizaci barevné reakce byla optická denzita (OD) všech testačních jamek hodnocena ve spektrofotometru při 450 nm.

Hodnocení výsledku každého vzorku bylo stanoveno na základě výpočtu procenta pozitivity, tj. SP. Vzorky s SP do 25 % byly považovány za negativní, vzorky s SP od 25 – 30 % za dubiózní a vzorky s SP nad 30 % za pozitivní. Test byl prováděn při teplotě 21 °C (+/- 5 °C). K ředění vzorku byl použit ředící roztok č. 2 a k ředění konjugátu ředící roztok č. 3. K proplachování opakovanému nejméně 3x byl použit proplachovací roztok.

3.9. Provádění testů

Všechna laboratorní vyšetření, pitvy zvířat, odběry vzorků i hodnocení výsledků byly provedeny na odděleních parazitologie a patologie SVÚ Jihlava se souhlasem a odbornou pomocí vedoucích těchto oddělení (MVDr. Karol Račka, MVDr. František Kostka) a ředitele ústavu (MVDr. Ladislav Zámek).

Při práci bylo využito laboratorní vybavení a přístroje používané v parazitologické laboratoři. Byly to:

- sklo (kádinky o objemu 800 ml, dělící baňka o objemu 2000 ml, trychtýř, odměrné válce o objemu 50 ml, Petriho miska, trichinoskopické kompresorium),
- pracovní pomůcky (nůžky, pinzety, sítko, zkumavky, tlouček)
- roztoky a chemikálie (25% roztok HCl, destilovaná voda, Pepsin 1:100 000 NF, číslo šarže 121002)
- přístroje (MICRO D10, mikroskop Axio Scope A1, vývěva KNF Lab Laboport, 3D naklápěcí deska, spektrofotometr Microplate Readr MRX II & Revelation)

- 2 pozitivní kontrolní vzorky svaloviny divokých prasat postižených trichinelózou způsobenou původci *Trichinella britovi* a *Trichinella pseudospiralis*.

4. Výsledky

Trichinelová pozitivita u divoce žijících masožravců byla ověřena na souboru vzorků svalové tkáně získané od 181 zvířat, a to 130 lišek, 15 kun, 2 lasic, 32 jezevců a dvou psíků (Příloha 1, tab. 1). U žádného z těchto jedinců nebyly trichinely prokázány použitím kompresní a digestvní metody a latexové aglutinace. Známky jisté nespecifity vykazoval imunoenzymatický test ELISA (Příloha 2, tab. 2). Věrohodnost těchto výsledků byla potvrzena souběžným vyšetřením kontrolních vzorků (K1, K2) získaných ze trichinela pozitivní svaloviny od divokých prasat (Příloha 2, tab. 2). Oba kontrolní vzorky byly v těchto vyšetření jasně pozitivní (Příloha 3, obr. 7, 8, 10, 11, 12). Pouze u kontrolního vzorku K2 nebyl původce (*Trichinella pseudospiralis*) prokázán kompresní metodou (Příloha 3, obr. 9).

Nebyly zaznamenány žádné zásadní rozdíly v citlivosti a specifitě jednotlivých použitých vyšetřovacích postupů. Výsledky dosažené digestivní metodou (vizuální průkaz larev trichinel) a aglutinačním testem (sérologický průkaz antigenu trichinel) byly úplně shodné. Použitím kompresní metody nebyly prokázány larvy ve svalovině pozitivního prasete K2. Výsledky kompresního vyšetření ostatních vzorků byly shodné s výsledky dvou předchozích metod. Mírné diference byly zaznamenány v případě použití imunoenzymatického testu ELISA, 2 vzorky reagovaly dubiózně a v dalších 3 byla zjištěna téměř pozitivní reakce. Tato skutečnost svědčí o tom, že zvířata postižená trichinelovou infekcí je možné spolehlivě identifikovat pouze latexovou aglutinací. Imunoenzymatický test ELISA, který jsme, na základě doporučení od výrobce, použili pouze k vyšetření vzorků pocházejících z lišek, vykazoval mírnou nespecifitu.

5. Zhodnocení výsledků a diskuse

Trichinelóza je významné parazitární onemocnění, které trvale ohrožuje zdraví člověka nejen po celou dobu jeho civilizačního vývoje, ale s největší pravděpodobností i v historicky mnohem starších obdobích (Förstl a kol., 2001, Chroust a Forejtek, 2010). Původcem je *Trichinella spiralis* a další příbuzné trichinely. Charakteristickým rysem tohoto parazita je druhová nespecifita. Žijí ve svalové tkáni a je téměř lhostejné, kterému živočichu patří (Gajadhar a kol., 2008, Koudela, 2009). V rámci jednoho zvířecího druhu i mezidruhově se šíří zcela pasivně – konzumem invadované svaloviny (Jurášek, Dubinský a kol.,1993, Koudela, 2001a, Koudela, 2001c, Chroust a Forejtek, 2010). Člověk je pouze jedním z článku tohoto permanentního potravinového řetězce. A právě tyto skutečnosti jsou příčinou epidemiologické jedinečnosti trichinelózy. Podstatné je, že zdroje nákazy jsou trvalé a existují zcela mimo rámec vlivu a působení člověka. Jsou to volně žijící zvířata. Masožravci, všežravci i hlodavci. Poznání stupně jejich postižení trichinelózou má proto zásadní význam i pro prevenci onemocnění lidí a je stále aktuálním studijním tématem. Svědčí o tom i publikace zveřejňované v ČR téměř pravidelně v časopise Myslivost (Koudela, Myslivost 2001, Koudela, Pavlíčková, Myslivost 2005, Koudela, Myslivost 2010, Chroust, Forejtek, Myslivost 2010).

I tato práce byla orientována tímto směrem. Cílem bylo identifikovat výskyt trichinel v populacích divoce žijících lišek, kun, lasic, jezevců a psíků, pocházející z různých oblastí ČR. Přestože bylo vyšetřeno celkem 181 zvířat, nebyly trichinely prokázány u žádného z nich.

Negativita těchto výsledků je ve zdánlivém nesouladu s údaji jiných autorů a s běžným nákazovým povědomím často založeným pouze na empirických předpokladech. Obecně je za nejvýznamnější zvířecí druh, který umožňuje šíření trichinelózy a udržování funkce sylvatických rezervoárů považována liška. U nás byla jejich trichinelová pozitivita identifikována na 0,6% (z 1164 vyšetřených). Nejvíce pozitivních lišek pocházelo z okresu Frýdek-Místek, kde byly trichinely současně prokázány i u divokých prasat a jezevce. (Koudela a Pavlíčková, 2005). Na Slovensku byly trichinely zjištěny u 6,2 %, v Polsku 5,7 %, v Nizozemí 3,9 %, v Bělorusku u 18,2 %, ve Finsku dokonce

u 34 %, ale ve Švýcarsku pouze u 0,8 % a v Německu a Rakousku 0,07 % vyšetřovaných lišek (Koudela, 2001b, Koudela a Pavlíčková, 2005, Forejtek, 2006).

O výskytu trichinelové pozitivity u lasiček a kun nejsou k dispozici prakticky žádné číselné údaje, i když je jejich role jako sylvatických nosičů infektu běžně uváděna. Poněkud odlišná je tato situace u jezevců, jejichž význam v epidemiologii trichinelózy vzbuzuje v posledních letech zvýšený zájem. U nás byla trichinelová infekce potvrzena u jezevce z okresu Frýdek. Místek (Koudela, 2010), ale její ojedinělý výskyt, bez kvantitativního zhodnocení, je zmiňován i v jiných, především východoevropských zemí (Rumunsko, Bulharsko, Slovinsko, Polsko, Finsko, Estonsko, Rusko, Itálie) (Koudela, 2010).

Podle mého názoru spočívá hlavní příčina negativních výsledků, které byly zaznamenány u všech, v této práci sledovaných zvířat, především v relativně nízkém počtu testovaných jedinců. Počet 130 lišek, 15 kun, 2 lasiček, 32 jezevců a dvou psíků představuje pouze zlomek celkové populace těchto zvířat žijících na území ČR. V jiných, podobně zaměřených pracích byly počty vyšetřovaných zvířat mnohem vyšší. Například 1164 lišek testovaných v ČR, nebo více jak 7000 lišek prověřovaných v Německu (Koudela a Pavlíčková, 2005).

Dalším důvodem může být skutečnost, že vyšetřovaná zvířata pocházela z omezeného počtu zcela náhodně zvolených oblastí ČR. Přitom, podle údajů Chrousta a Forejtka (2010) platí, že ohniska sylvatických cyklů trichinelózy jsou poměrně stabilní a po řadu let se nemění. Nelze vyloučit, že zvířata, která byla vyšetřována, pocházela právě z oblastí, ve kterých je výskyt trichinelózy minimální.

Přesto se domnívám, že dosažené výsledky mají význam pro celkové poznání výskytu trichinel na území naší republiky. V žádném případě z nich nelze usoudit, že sledované druhy nejsou, vzhledem k negativitě dosažených výsledků, skrytými nosiči sylvatické trichinelózy. Reálný závěr ale je, že úroveň trichinelové pozitivity sledovaných druhů zvířat je v ČR relativně nízká a blíží

se spíše nákazové situaci na západě Evropy (Rakousko, Švýcarsko, Německo, Belgie, Nizozemí, Dánsko, atd.) než ve východoevropských zemích. Pozoruhodná je i úroveň trichinelové pozitivity u divokých prasat (černá zvěř), která má, podle údajů Koudely (2009) v ČR dlouhodobě klesající tendenci. Roční odstřel černé zvěře se u nás pohybuje okolo 110 tisíc kusů (Zemědělství, životní prostředí, Český statistický úřad). Vyšetřuje se kolem 80 tisíc kusů (Forejtek, 2006, Koudela, 2012). Pozitivní nálezy jsou ojedinělé a pohybují se v rozmezí 0,001 – 0,002% (Koudela, 2009, Koudela, 2012). Také vyšetření domácích prasat prováděné zatím povinně při jejich porážce na jatkách (v ČR okolo 3 miliónů ročně) je už několik let zcela negativní. Podobná situace je i ve většině jiných, především západoevropských zemích (Koudela, 2009, Koudela, 2012). Vzhledem k vysokým finančním nákladům, které vyšetření domácích prasat vyžaduje, uvažují země Evropské Unie o změně forem komplexní prevence trichinelózy. Rozhodující ideou je formování *Trichinella* prostých farem a *Trichinella* prostých oblastí. Prasata z těchto lokalit by pak nebylo nutné vyšetřovat (Pozio a Darvin Murell, 2006, Gajdahar, 2008, Gottstein, 2009, Koudela, 2009, Koudela, 2012). Nejdále tento trend postoupil v Dánsku a Belgii (Koudela, 2012).

Tato koncepce přináší řadu změn v organizaci chovu prasat, kontrolních opatření, diagnostických aktivit i vývoj a zdokonalení používaných detekčních metod. Především se počítá s využitím dosud ne zcela akreditovaných technik ELISA (Bien, 2006, Nöckler a kol., 2009, Knoop a kol., 2011, Gross a kol., 2012) a snad i aglutinačního testu (Bokken a kol., 2012). Jejich použitelnost a detekční spolehlivost byla částečně prověřena i v této práci. Výsledky dosažené pomocí detekční soupravy pro aglutinační test byly úplně shodné s výsledky digestivní a trichinoskopické metody. Při použití imunoenzymatického testu ELISA byly při průkazu protilátek proti *Trichinella spp.* ve svalovině lišek (ostatní zvířata jsme netestovali) zaznamenány některé drobné diference. Dva vyšetřované vzorky byly na rozdíl od ostatních metod identifikovány jako dubiózní a u tří byl dokonce zaznamenán náznak pozitivity. Příčina těchto odlišností zůstává nejasná. Může spočívat například v tom, že použité diagnostické soupravy jsou určeny především k průkazu protilátek u prasat, domácích i divokých, a na vzorcích získaných od těchto zvířat byly až

dosud ověřovány (Smith, 1987, Knoop a kol. 2011, Gamito-Santos a kol. 2011). Výrobce sice připouští, že vzhledem k zařazení vícedruhového konjugátu je možné použít soupravy i u koní a bez jednoznačných záruk i u psů a lišek (ID Vet Innovative diagnostics, telefonické sdělení), ale skutečné experimentální ověření různých druhových diagnostických indikacích zůstává stále neúplné.

Dalším důvodem může být i vysoká citlivost ELISA testu hraničící až s jeho specifitou. Při použití této metody u divokých zvířat, která mohou být spontánně invadována rozmanitou, s trichinelami do jisté míry příbuznou parazitární faunou, může být tento faktor velmi významný.

Vyloučit se nedá ani fakt, že u lišek invadovaných nízkým množstvím trichinel nemusí dojít k plnému rozvoji onemocnění doprovázenému přítomností larev ve svalovině (pozitivní parazitologický nález), ale jejich imunitní reakce je dostačující k navození třeba i nízkých hladin specifických protilátek, prokazatelných ELISA testem.

Pro zakládání nových Trichinella prostých chovů a oblastí bude určitě důležité iniciální ověření incidence sylvatické trichinelózy v jejich okolí i následná permanentní kontrola stupně trichinelózní pozitivity volně žijících zvířat, především lišek (Koudela 2005, Koudela 2012). Domnívám se, že právě v tomto směru by mohly i výsledky této práce najít své praktické uplatnění.

6. Závěr

Cíle stanovené v zadání práce byly dosaženy. V pokusech zaměřených na vyhodnocení přirozeného výskytu trichinel u volně žijících zvířat, především masožravců a posouzení druhového složení případných sylvatických ohnisek této nákazy byly začleněny tyto počty jedinců: 130 lišek obecných z 24 okresů, 10 kun skalních a 5 kun lesních ze 7 okresů, 32 jezevců lesních z 12 okresů, 2 psíci mývalovití ze 2 okresů a dvě lasice hranostaj ze 2 okresů. Ve svalovině (bránice, jazyk, žvýkací svaly, svaly předloktí) z žádného z těchto zvířat nebyla larvální stádia trichinel prokázána. Negativita výsledků byla doložena oběma základními metodickými postupy, a sice digestivní a kompresní metodou. Stejné výsledky byly dosaženy i při použití latexového aglutinačního testu. Drobné neshody ve výsledcích byly zaznamenány při stanovení protilátek proti *Trichinella* spp. *v* masové šťávě imunoenzymatickým testem ELISA. Na rozdíl od předchozích tří metod byly výsledky ELISA testu ve dvou případech dubiózní a ve třech případech mírně pozitivní.

7. Literatura

1. BABIČKA, C., DIVIŠ, V.: Nepodceňujme trichinelózu., Myslivost, červen 2003

2. BIEN, J.: The use fulness of ELISA for diagnosis of trichinellosis in pigs and wild board., Wiad Parazytol., 52, 2006 (3), s. 205-212

3. BOKKEN, G. C., BERGWERFF, A. A., KNAPEN, F.: a novel bead-based assai to detect specific antipody respouses against *Toxoplasma gondii* and *Trichinella spiralis* simultaneously in sera of experimentally infected swine., Vet. Res., 36, 2012, s. 1-8

4. EC (European Community), 2005., Regulation (EC) No 2075/2005 of the European Parliament and of the Council of 5 December 2005 laying down specific rule sof officia controls for Trichinella in meat. Off. J. EC, L338, s. 60-82

5. Forejtek, P.: Trichinelóza černé zvěře – stále aktuální problém myslivosti., Myslivost, 1, 2006, s. 30

6. FÖRSTL, M., ČERMÁKOVÁ, Z., VESELSKÝ, Z.: Nový výskyt svalovce stočeného na našm území., Myslivost, září 2001

7. GAJADHAR, A. A., POZIO, E., GAMBLE, H. R., NÖCKLER, K., MADOX-HYTTEL, CH., FORBES, L. B., VALLEE, I., ROSSI, P., MARINCULIČ, A., BOIREAU, P.: Tichinella diagnostics and kontrol: Mandatory and best practices for ensuring food safety., Vet. Parazitol., 1, 2008, s. 1-9

8. GAMITO-SANTOS, J. A., BLANCO-CIUDAD, J., SUÁREZ-LÓPEZ, I., SERRANO-AGUILERA, F. J., PÉREZ-MARTIN, J. E.: Serological detection of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in wild boar by ELISA using an excretor-secretor antigen and a crude antigen., Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol., 70, 2011, s. 49-57

9. GOTTSTEIN, B., POZIO, E., NÖCKLER, K.: Epidemiology, diagnosis, treatment and kontrol of Trichinelosis., Clin. Mikrobiol. Rev, 22, 2009, s. 127-145

10. GROSS, S., GREINER, M., MAYER-SCHOLL, A., KÄSBOHRER, A., ELLERBROEK, L., NÖCKLER, K., MŰLLER-GRAF, C.: Surveillance systems for status monitoring of *Trichinella*-free declared pig farms: concepts and thein conZidence for freedom from dinase., Berl Munch Tierarztl Woxhenschr, 125 (11-12), 2012, s. 485-493

11. HARNA, J.: Ústní sdělení, 2013

12. HURNÍKOVÁ, Z., ŠNABEL, V., POZIO, E., REITEROVÁ, K., HRCKOVÁ, G., HALÁSKOVÁ, D., DUBINSKÝ, P.: First rekord of *Trichinella pseudospiralis* in the Slovak Republic found in domestic focus., Veterinary Parasitology, 128, 2005, s. 91-98

13. CHROUST, K., FOREJTEK, P.: Trichinelóza., Myslivost, 10, 2010, s. 38

14. JURÁŠEK, V., DUBINSKÝ, P.: Veterinárna parazitologia., Príroda a.s. Bratislava 1993, s. 304-306

15. KNOOP, E. V., FILTER, M., NÖCKLER, K.: Evaluation of ELISA for the detection of *Trichinella* antibodies in swine: results from a ring trial., Arch. Lebensmittel hyg., 62, 2011, s. 181-187

16. KOUDELA, B.: Aktuální výskyt trichinelózy u černé zvěře., Myslivost, červen 2001a

17. KOUDELA, B.: Nové poznatky o trichinelóze v České Republice., Myslivost, říjen 2001b

18. KOUDELA, B.: Trichinelóza v Evropě., Vesmír, 80, 2001c, s. 156-161

19. KOUDELA, B.: Školení veterinárních lékařů provádějících vyšetření masa a zvěřiny na přítomnost parazitů *Trichinella spp*. Jihlava 2002, s. 6-16

20. KOUDELA, B.: Jak dále pří vyšetřování černé zvěře na trichinelózu., Myslivost, 4, 2009, s. 46

21. KOUDELA, B.: Trichinelóza jezevců., Myslivost, 12, 2010, s. 48

22. KOUDELA, B., HARNA, J.: Trichinelóza černé zvěře v České republice. Přednáška. Seminář „Černá zvěř-stále aktuální problém“. Žďár nad Sázavou, 14. října 2011

23. KOUDELA, B., JANÁČKOVÁ, B.: Budoucnost vyšetřování domácích prasat na přítomnost larev trichinel., Veterinářství, 62, 2012, s. 236-240

24. KOUDELA, B., PAVLÍČKOVÁ, Z.: Další nález trichinelózy černé zvěře., Myslivost, říjen 2002

25. KOUDELA, B., PAVLÍČKOVÁ, Z.: Trichinelóza volně žijících masožravců v ČR., Myslivost, 2005

26. KOUDELA, B., PAVLÍČKOVÁ, Z.: Vyšetření černé zvěře na trichinelózu., Myslivost, únor 2004

27. KOUDELA, B., RAČKA, K., HARNA, J.: Neobvyklé nálezy trichinel u divokých prasat odlovených v Dolní Dobrouči., Myslivost, 3, 2011, s. 46

28. KOVAŘČÍK, K.: Ústní sdělení, 2013

29. MARUCCI, G., PEZZOTI, P., POZZIO, E.: Ring trial among National Reference Laboratories for parasites to detect *Trichinella spiralis* larvae in pork samplec according to the EU directive 2075/2005., Vet. Parasitol. (2008), doi 10.016/j.vetpar 2008.10047

30. NÖCKLER, K., RECKINGER, S., BROGLIA, A., MAYER-SCHOLL, A., BAHN, P.: Evaluation of a Western Blot and ELISA for the detection of anti-*Trichinella*-IgG in pig sera., Vet parasitol., 163, 2009 (4), s. 341-347

31. OIE-Manual of diagnostic tests and vaccines for terestrial animals (mammals, birds and bees)., Sixth Edition. (1)., 2008, s. 344-351

32. POZZIO, E., DARVIN MURELL, K.: Systematics and epidemiology of *Trichinella*., Adv. Parasitol., 63, 2006, s. 367-439

33. POZZIO, E., LA ROSA, G.: PCR-derived methods for the identification of *Trichinella* parazites from animal and human samples. Methods Mol. Biol., 216, 2003, s. 299-309

34. SMITH, H. J.: Evaluation of the ELISA for the Serological Diagnosis of Trichinosis in Canadian Swine., Can J Vet Res, 51, 1987, s. 194-197

35. SVOBODOVÁ, V., SVOBODA, M.: Klinická parazitologie psa a kočky., ČAVLMZ, Brno, 1995, s. 165-167

36. SVS-MKZ: Metodika kontroly zdraví a nařízení vakcinace na rok 2013., SVS ČR, č. j. 10307/2013 MZE 17212, s. 11

37. TEUNIS, P., FONVILLE, M. T. M., DÖPFER, D. D. V., EIJCK, I. A. J. M., MOLINA, V. GUARNERA, E., van der GISEN, J. W. B.: Usefulness of serosurveillance for *Trichinella* infections in animal populations., Vet. Parasitol, 159, 2009, s. 345-349

38. VOLF, P., HORÁK, P.: Paraziti a jejich biologie., Praha, Triton, 2007, s. 205-208

8. Internetové zdroje

1. Nemoci prasat, Katedra speciální zootechniky: http://ksz.af.czu.cz/predmety/chovprasat2ks/index.html. Přístup 12.1.2013

2. Trichinella, Státní veterinární správa - http://www.svscr.cz/index.php?art=5782. Přístup 13.1.2013

3. Zemědělství, životní prostředí, Český statistický úřad: http://www.czso.cz/csu/redakce.nsf/i/archiv_publikaci. Přístup 9.5.2013

Příloha 1

Tab. 1: Přehled a původ vyšetřovaných vzorků

Číslo vzorku	Zvíře	Katastrální území [KÚ]	KÚ [číslo]	Okres	Dat. vyšetření	Původ
1.	liška obecná	Zlín	63556	ZL	7.2.2012	SVÚ Ol [1]
2.	liška obecná	Přímětice	73612	ZN	23.1.2012	SVÚ Ol
3.	liška obecná	Nová Bělá	70494	OV	23.1.2012	SVÚ Ol
4.	liška obecná	Leskovec nad Moravicí	68001	BR	23.1.2012	SVÚ Ol
5.	liška obecná	Leskovec nad Moravicí	68001	BR	23.1.2012	SVÚ Ol
6.	liška obecná	Rohy	74053	TR	23.1.2012	SVÚ Ol
7.	liška obecná	Jindřichov u Hranic	66034	PR	23.1.2012	SVÚ Ol
8.	liška obecná	Petrovice u Karviné	72035	KI	24.1.2012	SVÚ Ol
9.	liška obecná	Kelč Nové Město	66475	VS	24.1.2012	SVÚ Ol
10.	liška obecná	Odry	70908	NJ	24.1.2012	SVÚ Ol
11.	liška obecná	Dolní Vilémovice	63034	TR	24.1.2012	SVÚ Ol
12.	liška obecná	Velké Těšany	60105	KM	24.1.2012	SVÚ Ol
13.	liška obecná	Korytná	66969	UH	24.1.2012	SVÚ Ol
14.	liška obecná	Dudín	63370	JI	24.1.2012	SVÚ Ol
15.	liška obecná	Staměřice	75349	PR	25.1.2012	SVÚ Ol
16.	liška obecná	Poříčí u Litomyšle	72605	SY	25.1.2012	SVÚ Ol
17.	liška obecná	Bohuňovice u Litomyšle	60642	SY	25.1.2012	SVÚ Ol
18.	liška obecná	Horky	64211	SY	25.1.2012	SVÚ Ol
19.	liška obecná	Cerekvice nad Loučnou	61749	SY	25.1.2012	SVÚ Ol
20.	liška obecná	České Heřmanice	62256	UO	25.1.2012	SVÚ Ol
21.	liška obecná	Voděrady u Č. Heřmanic	78423	UO	25.1.2012	SVÚ Ol
22.	liška obecná	Přísnotice	73626	BO	25.1.2012	SVÚ Ol
23.	liška obecná	Lanžhot	67911	BV	25.1.2012	SVÚ Ol
24.	liška obecná	Komorní Lhotka	66881	FM	26.1.2012	SVÚ Ol
25.	liška obecná	Chlebovice	65115	FM	26.1.2012	SVÚ Ol
26.	liška obecná	Razová	73998	BR	26.1.2012	SVÚ Ol
27.	liška obecná	Skotnice	74856	NJ	26.1.2012	SVÚ Ol
28.	liška obecná	Míkovice nad Olšavou	69407	UH	26.1.2012	SVÚ Ol
29.	liška obecná	Medlov u Zborovic	79166	KM	27.1.2012	SVÚ Ol
30.	liška obecná	Vlčí Doly	78134	KM	27.1.2012	SVÚ Ol
31.	liška obecná	Rudoltice u Lanškrouna	74350	UO	27.1.2012	SVÚ Ol
32.	liška obecná	Skuhrov u Č. Třebové	74904	UO	27.1.2012	SVÚ Ol
33.	liška obecná	Sklené u Svitav	74824	SY	6.2.2012	SVÚ Ol
34.	liška obecná	Opatovec	71150	SY	6.2.2012	SVÚ Ol
35.	liška obecná	Bulhary	61616	BV	6.2.2012	SVÚ Ol
36.	liška obecná	Baška	60106	FM	6.2.2012	SVÚ Ol
37.	liška obecná	Kunčice pod Ondřejníkem	67709	FM	6.2.2012	SVÚ Ol
38.	liška obecná	Oborná	61323	BR	6.2.2012	SVÚ Ol
39.	liška obecná	Blahutovice	60496	NJ	6.2.2012	SVÚ Ol

40.	liška obecná	Žilina u N. Jičína	70751	NJ	6.2.2012	SVÚ Ol
41.	liška obecná	Hodice	64027	JI	6.2.2012	SVÚ Ol
42.	liška obecná	Dobromilice	62736	PV	6.2.2012	SVÚ Ol
43.	liška obecná	Orlová	71236	KI	7.2.2012	SVÚ Ol
44.	liška obecná	Ratiboř u Vsetína	73984	VS	7.2.2012	SVÚ Ol
45.	liška obecná	Stará Ves u Bílovce	75396	NJ	7.2.2012	SVÚ Ol
46.	liška obecná	Kladeruby n. Osl.	66490	TR	7.2.2012	SVÚ Ol
47.	liška obecná	Vrbovec	78612	ZN	7.2.2012	SVÚ Ol
48.	liška obecná	Janová	65702	VS	8.2.2012	SVÚ Ol
49.	liška obecná	Janová	65702	VS	8.2.2012	SVÚ Ol
50.	liška obecná	Trnávka u Lip. n. Bečvou	76831	PR	8.2.2012	SVÚ Ol
51.	liška obecná	Bílý Potok	60466	JE	8.2.2012	SVÚ Ol
52.	liška obecná	Vápenná	77690	JE	8.2.2012	SVÚ Ol
53.	liška obecná	Bítov u Bílovce	60487	NJ	9.2.2012	SVÚ Ol
54.	liška obecná	Bludovice u N. Jičína	60583	NJ	9.2.2012	SVÚ Ol
55.	liška obecná	Albrechtice u Č. Těšína	60012	KI	9.2.2012	SVÚ Ol
56.	liška obecná	Věřňovice	78035	KI	9.2.2012	SVÚ Ol
57.	liška obecná	Chlebičov	65114	OP	9.2.2012	SVÚ Ol
58.	liška obecná	Bohuslavice u Hlučína	60652	OP	9.2.2012	SVÚ Ol
59.	liška obecná	Oldřišov	71011	OP	9.2.2012	SVÚ Ol
60.	liška obecná	Stěbořice	75543	OP	9.2.2012	SVÚ Ol
61.	liška obecná	Hlavnice	63903	OP	9.2.2012	SVÚ Ol
62.	liška obecná	Neplachovice	64081	OP	9.2.2012	SVÚ Ol
63.	liška obecná	Březová u Uh. Brodu	61470	UH	9.2.2012	SVÚ Ol
64.	liška obecná	Havřice	63806	UH	9.2.2012	SVÚ Ol
65.	liška obecná	Ivanovice na Hané	65584	VY	9.2.2012	SVÚ Ol
66.	liška obecná	Prosiměřice	73346	ZN	10.2.2012	SVÚ Ol
67.	liška obecná	Ratiboř u Vsetína	73984	VS	10.2.2012	SVÚ Ol
68.	liška obecná	Nedvězí u Zábřeha	70236	SU	10.2.2012	SVÚ Ol
69.	liška obecná	Bukovice u Písařova	72064	SU	10.2.2012	SVÚ Ol
70.	liška obecná	Bukovice u Písařova	72064	SU	10.2.2012	SVÚ Ol
71.	liška obecná	Pohořelice	72486	BV	10.2.2012	SVÚ Ol
72.	liška obecná	Nejdek u Lednice	67983	BV	10.2.2012	SVÚ Ol
73.	liška obecná	Vilémov u Litovle	78200	OL	13.2.2012	SVÚ Ol
74.	liška obecná	Místek	63482	FM	13.2.2012	SVÚ Ol
75.	liška obecná	Jamnice	65663	OP	13.2.2012	SVÚ Ol
76.	liška obecná	Hněvošice	64014	OP	13.2.2012	SVÚ Ol
77.	liška obecná	Tavíkovice	76525	ZN	13.2.2012	SVÚ Ol
78.	liška obecná	Třebenice na Moravě	76963	TR	13.2.2012	SVÚ Ol
79.	liška obecná	Opatov na Moravě	71147	TR	13.2.2012	SVÚ Ol
80.	liška obecná	Dolní Libina	68283	SU	13.2.2012	SVÚ Ol
81.	liška obecná	Rájec u Zábřeha	73888	SU	13.2.2012	SVÚ Ol
82.	liška obecná	Zvole u Zábřeha	79409	SU	13.2.2012	SVÚ Ol
83.	liška obecná	Uhelná	77271	JE	13.2.2012	SVÚ Ol
84.	liška obecná	Rejvíz	79316	JE	13.2.2012	SVÚ Ol
85.	liška obecná	Čistá u Litomyšle	62400	SY	13.2.2012	SVÚ Ol

86.	liška obecná	Svatý Kopeček	66928	OL	14.2.2012	SVÚ Ol
87.	liška obecná	Dětmarovice	62596	KI	14.2.2012	SVÚ Ol
88.	liška obecná	Oslavička	70801	TR	14.2.2012	SVÚ Ol
89.	liška obecná	Klučov	66666	TR	14.2.2012	SVÚ Ol
90.	liška obecná	Račice	73737	VY	14.2.2012	SVÚ Ol
91.	liška obecná	Plumlov	72196	PV	14.2.2012	SVÚ Ol
92.	liška obecná	Krásná pod Lys. Horou	67339	FM	15.2.2012	SVÚ Ol
93.	liška obecná	Bernartice nad Odrou	60285	NJ	15.2.2012	SVÚ Ol
94.	liška obecná	Dol. Újezd u Lip. n. Bečvou	63032	PR	15.2.2012	SVÚ Ol
95.	liška obecná	Česká Ves	62190	JE	15.2.2012	SVÚ Ol
96.	liška obecná	Hynčina	65041	SU	15.2.2012	SVÚ Ol
97.	liška obecná	Charvátská Nová Ves	65068	BV	15.2.2012	SVÚ Ol
98.	liška obecná	Lažany u Litomyšle	69839	SY	15.2.2012	SVÚ Ol
99.	liška obecná	Kamenec u Poličky	66241	SY	15.2.2012	SVÚ Ol
100.	liška obecná	Hrabová u Dubicka	64654	SU	17.2.2012	SVÚ Ol
101.	liška obecná	Kolšov	66861	SU	17.2.2012	SVÚ Ol
102.	liška obecná	Chvalkovice na Hané	65518	VY	17.2.2012	SVÚ Ol
103.	liška obecná	Šerkovice	76237	BO	17.2.2012	SVÚ Ol
104.	liška obecná	Oblekovice	70861	ZN	17.2.2012	SVÚ Ol
105.	liška obecná	Bernartice u Javorníka	60282	JE	17.2.2012	SVÚ Ol
106.	liška obecná	Strážnice na Moravě	75665	HO	17.2.2012	SVÚ Ol
107.	liška obecná	Voděrady u Č. Heřmanic	78423	UO	17.2.2012	SVÚ Ol
108.	liška obecná	Přerov	73471	PR	22.2.2012	SVÚ Ol
109.	liška obecná	Kozlovice	67177	FM	27.2.2012	SVÚ Ol
110.	liška obecná	Krásná pod Lys. Horou	67339	FM	27.2.2012	SVÚ Ol
111.	liška obecná	Branky	60940	VS	27.2.2012	SVÚ Ol
112.	liška obecná	Vratimov	78560	OV	27.2.2012	SVÚ Ol
113.	liška obecná	Kunčičky	71424	OV	27.2.2012	SVÚ Ol
114.	liška obecná	Brumovice u Opavy	61310	OP	27.2.2012	SVÚ Ol
115.	liška obecná	Štěpánkovice	76339	OP	27.2.2012	SVÚ Ol
116.	liška obecná	Vávrovice	77719	OP	27.2.2012	SVÚ Ol
117.	liška obecná	Straník	75613	NJ	27.2.2012	SVÚ Ol
118.	liška obecná	Buchlovice	61562	UH	27.2.2012	SVÚ Ol
119.	liška obecná	Mladcová	63617	ZL	27.2.2012	SVÚ Ol
120.	liška obecná	Drahotuše	63194	PR	27.2.2012	SVÚ Ol
121.	liška obecná	Staměřice	75349	PR	28.2.2012	SVÚ Ol
122.	liška obecná	Jevišovice	65935	ZN	28.2.2012	SVÚ Ol
123.	liška obecná	Valašské Klobouky	77631	ZL	28.2.2012	SVÚ Ol
124.	liška obecná	Troubky	76869	KM	28.2.2012	SVÚ Ol
125.	liška obecná	Petrov nad Desnou	71979	SU	28.2.2012	SVÚ Ol
126.	liška obecná	Grygov	63626	OL	28.2.2012	SVÚ Ol
127.	liška obecná	Grygov	63626	OL	28.2.2012	SVÚ Ol
128.	liška obecná	Otín	716511	JI	28.2.2012	SVÚ Ol
129.	liška obecná	Číchov	623750	TR	28.2.2012	SVÚ Ol
130.	liška obecná	Čechtín	618918	TR	28.2.2012	SVÚ Ol
131.	Kuna skalní	Synkov	761818	RK	12.1.2008	Faf HK [2]

132.	Kuna skalní	Mančice u Rašovic	739529	KH	20.1.2009	Faf HK
133.	Kuna skalní	Mančice u Rašovic	739529	KH	20.1.2009	Faf HK
134.	Kuna skalní	Nové Město n. Met.	706442	NA		Faf HK
135.	Kuna skalní	Ouliště		HK	15.4.2008	Faf HK
136.	Kuna skalní	Černilov	620238	HK	30.12.2007	Faf HK
137.	Kuna skalní	Moravský Lačnov	760994	SY	1.7. 2008	Faf HK
138.	Kuna skalní	Nové Město n. Met.	706442	NA		Faf HK
139.	Kuna skalní	Zbraslav na Moravě	791806	BO	8.11.2009	Faf HK
140.	Kuna skalní	Nové Město n. Met.	706442	NA	4.1.2008	Faf HK
141.	Kuna lesní	Černilov	620238	HK	30.12.2007	Faf HK
142.	Kuna lesní	Bohuslavice - N. M. n. Met.	706442	NA	17.9.2008	Faf HK
143.	Kuna lesní	Jaroslav		RK	21.10.2007	Faf HK
144.	Kuna lesní	Karasín	794970	ZR	5.3.2012	Vl [3]
145.	Kuna lesní	Karasín	794970	ZR	5.3.2012	Vl
146.	Lasice hranostaj	Nové Město n. Met.	706442	NA		Faf HK
147.	Lasice hranostaj	Olešínky	794074	ZR	30.6.2012	Vl
148.	Jezevec lesní	Osečnice	712809	RK	2.8.2009	Faf HK
149.	Jezevec lesní	Krňovice	769410	HK	2.11.2007	Faf HK
150.	Jezevec lesní	Nahořany	701190	NA	20.5.2010	Faf HK
151.	Jezevec lesní	Maleč	690597	HB	18.2.2013	SVÚ Ji [4]
152.	Jezevec lesní	Radošov	738514	TR	7.1.2013	SVÚ Ji
153.	Jezevec lesní	Zbinohy	791466	JI	27.12.2012	SVÚ Ji
154.	Jezevec lesní	Charvátská Nová Ves	650684	BV	3.12.2012	SVÚ Ji
155.	Jezevec lesní	Cetoraz	617679	PE	26.11.2012	SVÚ Ji
156.	Jezevec lesní	Bezděkov	718408	JI	26.11.2012	SVÚ Ji
157.	Jezevec lesní	Bezděkov	718408	JI	27.11.2012	SVÚ Ji
158.	Jezevec lesní	Horní Lipka	643360	UO	16.11.2012	SVÚ Ji
159.	Jezevec lesní	Mrákov	666238	DO	19.11.2012	SVÚ Ji
160.	Jezevec lesní	Třešňovské Háje	644480	UO	13.11.2012	SVÚ Ji
161.	Jezevec lesní	Jamné nad Orlicí	656623	UO	12.11.2012	SVÚ Ji
162.	Jezevec lesní	Maleč	690597	HB	8.11.2012	SVÚ Ji
163.	Jezevec lesní	Onšov	594580	ZN	8.11.2012	SVÚ Ji
164.	Jezevec lesní	Třešňovské Háje	644480	UO	8.11.2012	SVÚ Ji
165.	Jezevec lesní	Dolní Libchavy	629553	UO	11.10.2012	SVÚ Ji
166.	Jezevec lesní	Janov	656950	SY	22.10.2012	SVÚ Ji
167.	Jezevec lesní	Janov	656950	SY	23.10.2012	SVÚ Ji
168.	Jezevec lesní	Janov	656950	SY	24.10.2012	SVÚ Ji
169.	Jezevec lesní	Onšov	594580	ZN	18.10.2012	SVÚ Ji
170.	Jezevec lesní	Žichlínek	796913	UO	15.10.2012	SVÚ Ji
171.	Jezevec lesní	Třešňovské Háje	644480	UO	15.10.2012	SVÚ Ji
172.	Jezevec lesní	Dolní Lipka	629588	UO	12.10.2012	SVÚ Ji
173.	Jezevec lesní	Kunčice u Letohradu	680656	UO	4.10.2012	SVÚ Ji
174.	Jezevec lesní	Třešňovské Háje	644480	UO	2.10.2012	SVÚ Ji
175.	Jezevec lesní	Králíky	672556	UO	1.10.2012	SVÚ Ji
176.	Jezevec lesní	Leština u Herálce	680478	HB	4.10.2012	SVÚ Ji
177.	Jezevec lesní	Hnanice	640000	ZN	8.10.2012	SVÚ Ji

178.	Jezevec lesní	Kamenice	662551	JI	31.10.2012	SVÚ Ji
179.	Jezevec lesní	Kamenice	662551	JI	25.10.2012	SVÚ Ji
180.	Psík mývalovitý	Ouliště		HK	12.4.2009	Faf HK
181.	Psík mývalovitý	Libavá		OL	1.7. 2008	Faf HK
K1 [5]	Prase divoké	Velký Uhřínov	773484	RK	21.9. 2006	SVÚ Ji
K2 [6]	Prase divoké	Dolní Dobrouč	628913	UO	16.12.2010	SVÚ Ji

1 - SVÚ Ol - Státní veterinární ústav Olomouc (MVDr. Harna), 2 - Faf HK - Farmaceutická fakulta v Hradeci Králové (Mgr. Bádr), 3 - Vl - samostatně získané vzorky, 4 - SVÚ Ji - Státní veterinární ústav Jihlava (MVDr. Račka), 5 - K1 - kontrolní pozitivní vzorek (*Trichinella britovi*), 6 - K2 - kontrolní pozitivní vzorek (*Trichinella pseudospiralis*)

Příloha 2

Tab. 2: Výsledky jednotlivých vyšetření

Číslo vzorku	Zvíře	Kompresní metoda	Trávicí metoda	Latexová aglutinace 1	Test ELISA
1.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
2.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
3.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
4.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
5.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
6.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
7.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
8.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
9.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
10.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
11.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
12.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
13.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
14.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
15.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
16.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
17.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
18.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
19.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
20.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
21.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
22.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	pozitivní
23.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
24.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
25.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	pozitivní
26.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
27.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
28.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
29.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
30.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
31.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
32.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
33.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
34.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
35.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
36.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	dubiózní
37.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
38.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
39.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
40.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní

41.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
42.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
43.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
44.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
45.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
46.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
47.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
48.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
49.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
50.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
51.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
52.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
53.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
54.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	pozitivní
55.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
56.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
57.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
58.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
59.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
60.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
61.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
62.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
63.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
64.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
65.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
66.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
67.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
68.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
69.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
70.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
71.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
72.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
73.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
74.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
75.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
76.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
77.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
78.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
79.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
80.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
81.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
82.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
83.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
84.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
85.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
86.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní

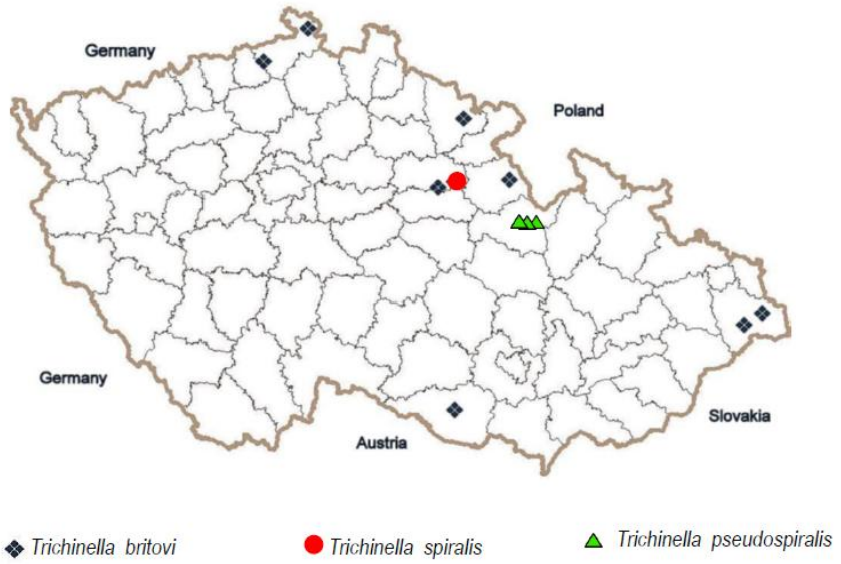
87.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
88.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
89.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	dubiózní
90.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
91.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
92.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
93.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
94.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
95.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
96.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
97.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
98.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
99.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
100.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
101.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
102.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
103.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
104.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
105.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
106.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
107.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
108.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
109.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
110.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
111.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
112.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
113.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
114.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
115.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
116.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
117.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
118.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
119.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
120.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
121.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
122.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
123.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
124.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
125.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
126.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
127.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
128.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
129.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
130.	liška obecná	negativní	negativní	negativní	negativní
131.	Kuna skalní	negativní	negativní	negativní	
132.	Kuna skalní	negativní	negativní	negativní	

133.	Kuna skalní	negativní	negativní	negativní
134.	Kuna skalní	negativní	negativní	negativní
135.	Kuna skalní	negativní	negativní	negativní
136.	Kuna skalní	negativní	negativní	negativní
137.	Kuna skalní	negativní	negativní	negativní
138.	Kuna skalní	negativní	negativní	negativní
139.	Kuna skalní	negativní	negativní	negativní
140.	Kuna skalní	negativní	negativní	negativní
141.	Kuna lesní	negativní	negativní	negativní
142.	Kuna lesní	negativní	negativní	negativní
143.	Kuna lesní	negativní	negativní	negativní
144.	Kuna lesní	negativní	negativní	negativní
145.	Kuna lesní	negativní	negativní	negativní
146.	Lasice hranostaj	negativní	negativní	negativní
147.	Lasice hranostaj	negativní	negativní	negativní
148.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
149.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
150.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
151.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
152.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
153.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
154.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
155.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
156.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
157.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
158.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
159.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
160.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
161.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
162.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
163.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
164.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
165.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
166.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
167.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
168.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
169.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
170.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
171.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
172.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
173.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
174.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
175.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
176.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
177.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní
178.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní

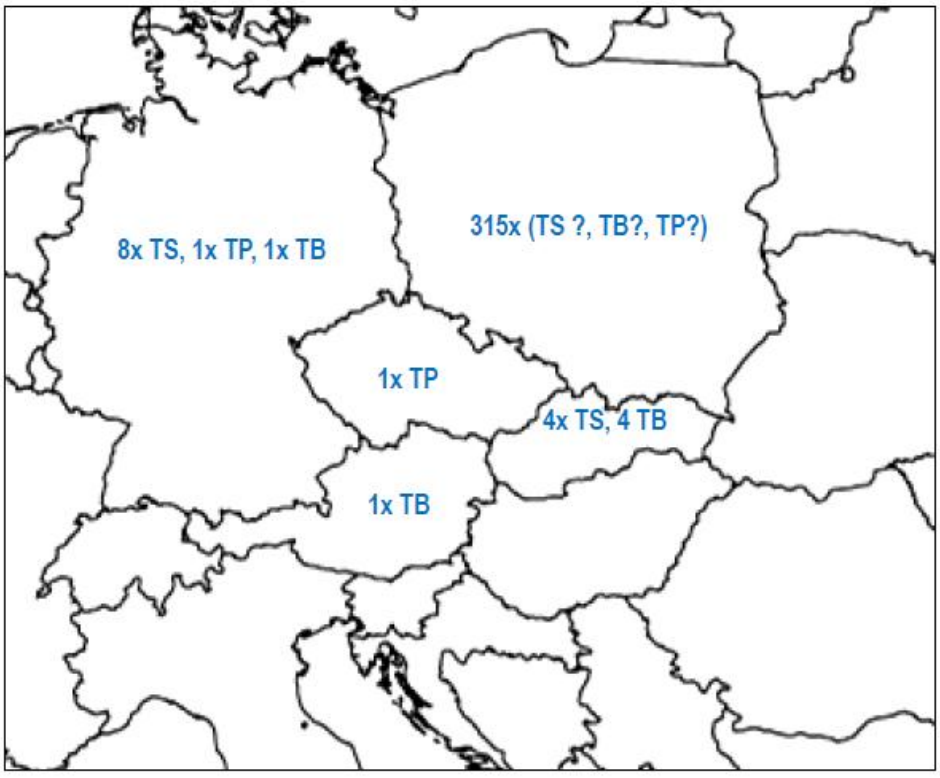
179.	Jezevec lesní	negativní	negativní	negativní	
180.	Psík mývalovitý	negativní	negativní	negativní	
181.	Psík mývalovitý	negativní	negativní	negativní	
K1[2]	Prase divoké	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní
K2[3]	Prase divoké	pozitivní	pozitivní	pozitivní	pozitivní

1 - při vyšetření latexovou aglutinací byly vzorky slévány do směsí po 10 a pak vyšetřovány, 2 - K1 - kontrolní pozitivní vzorek (*Trichinella britovi*), 3 – K2 - kontrolní pozitivní vzorek (*Trichinella pseudospiralis*)

Příloha 3

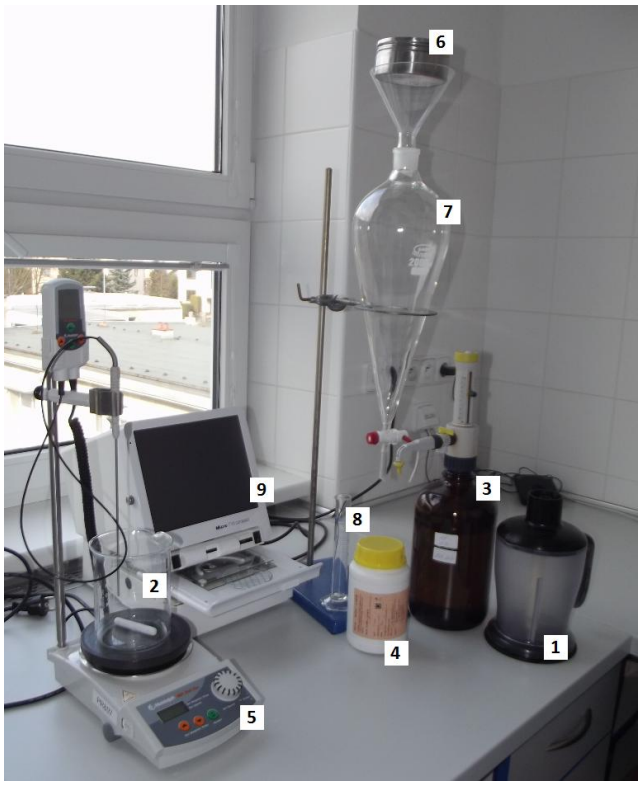


Obr. 1: Výskyt trichinel v České republice (převzato z přednášky Koudela, Harna, 2011)

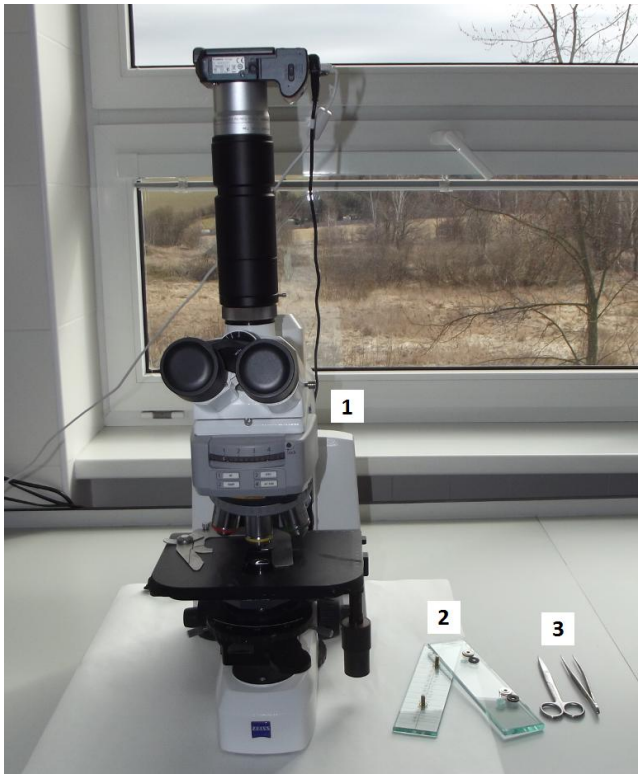


Obr. 2: Výskyt trichinel u černé zvěře v Evropě v roce 2010 (převzato z přednášky Koudela, Harna, 2011)

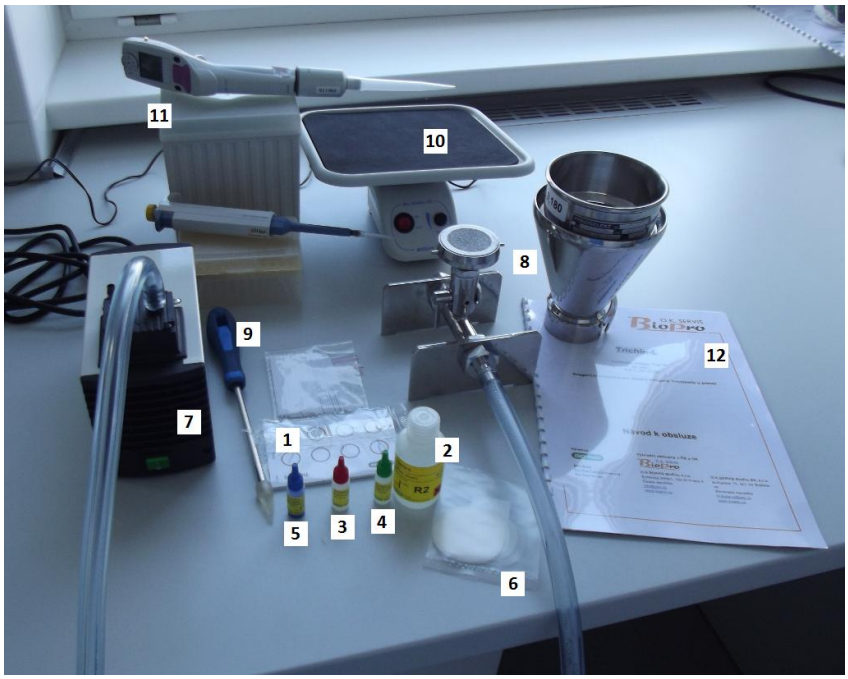
Vysvětlivky: TB - *Trichinella britovi*, TP - *Trichinella pseudospiralis*, TS - *Trichinella spiralis*



Obr. 3: Aparatura pro digestivní metodu (1 - mixér, 2 - kádinka s míchadlem, 3 - zásobník pro HCl, 4 - pepsin, 5 - magnetická míchačka s automatickým regulátorem teploty, 6 - kovové sítko, 7 - dělící baňka, 8 - odměrný válec, 9 - trichinoskop MICRO D10)



Obr. 4: Aparatura pro kompresní metodu (1 - mikroskop Axio Scope A1, 2 - skleněné kompresorium, 3 - pinzeta a nůžky)

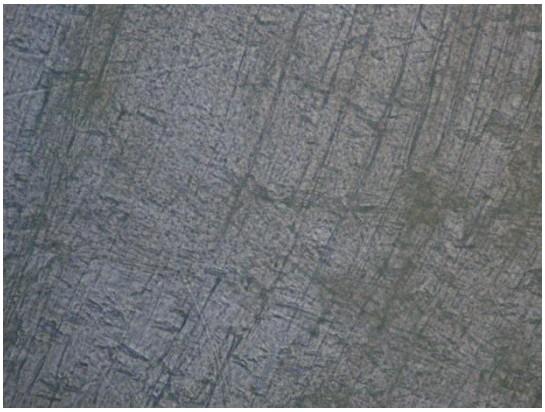


Obr. 5: Aparatura a reagencie pro aglutinační test (1 - aglutinační karty, 2 - ředící roztok, 3 - pozitivní kontrola, 4 - negativní kontrola, 5 - suspenze latexových partikulí, 6 – membránové filtry, 7 – vývěva KNF Lab Laboport, 8 - filtrační aparát, 9 - tlouček, 10 - 3D naklápěcí deska, 11 - pipety, 12 - návod k obsluze)

Obr. 6: Komponenty pro test ELISA (1 - mikroplotna, 2 - konjugát, 3 - pozitivní kontrola, 4 - negativní kontrola, 5 - ředící pufry, 6 - roztok substrátu, 7 - proplachovací roztok, 8 - zastavovací roztok, 9 - návod k použití)

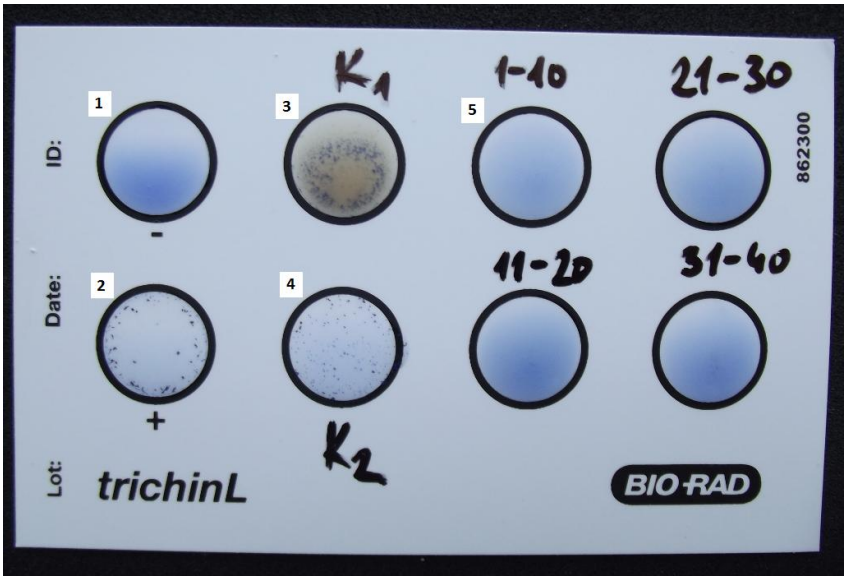
Obr. 7: Kontrolní pozitivní vzorek K1 - *Trichinella britovi*, kompresní metoda

Obr. 8: Kontrolní pozitivní vzorek K1 - *Trichinella britovi*, digestivní metoda

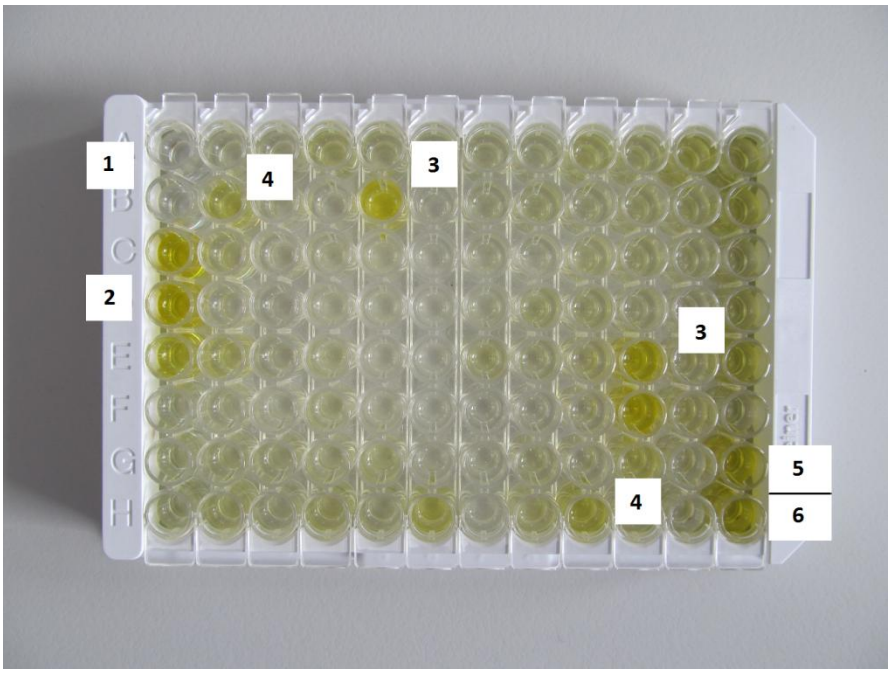


Obr. 9: Kontrolní pozitivní vzorek K2 - *Trichinella pseudospiralis*, kompresní metoda

Obr. 10: Kontrolní pozitivní vzorek K2 - *Trichinella pseudospiralis*, digestivní metoda



Obr. 11: Výsledky vyšetření aglutinačním testem (1 - negativní kontrola, 2 - pozitivní kontrola, 3 - kontrolní pozitivní vzorek K1, 4 - kontrolní pozitivní vzorek K2, 5 - vyšetřované vzorky ve skupinách po 10)



Obr. 12: Výsledky vyšetření imunoenzymatickým testem ELISA (1 - negativní kontrola, 2 - pozitivná kontrola, 3 - pozitivně reagující vzorky, 4 - dubiózně reagující vzorky, 5 - kontrolní pozitivni vzorek K1, 6 - kontrolní pozitivní vzorek K2