

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta lesnická a dřevařská

Katedra myslivosti a lesnické zoologie



Parazitární onemocnění trichinelóza – charakteristika a vyhodnocení známých dostupných detekčních metod

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Martin Janáček

Vedoucí práce: doc. PaedDr. Jan Farkač, CSc.

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta lesnická a dřevařská

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Martin Janáček

Lesní inženýrství

Název práce

Parazitární onemocnění trichinelóza – charakteristika a vyhodnocení známých dostupných detekčních metod.

Název anglicky

Early trichinosis disease – characteristics and evaluation of known available detection methods.

Cíle práce

Charakteristika a vyhodnocení známých dostupných metod detekce parazitárního onemocnění trichinelózy ve vzájemné souvislosti, znakový popis nejvíce rozšířených jednotlivých genotypů rodu *Trichinella* na území České republiky a v okolních státech.

Metodika

1. Charakteristika trichinelózy
2. Možnosti přenosu a šíření
3. Prevence a léčebná opatření
4. Využití jednotlivých známých a dostupných detekčních metod ve vzájemných souvislostech
5. Vyhodnocení úspěšnosti jednotlivých detekčních metod v návaznosti na ekonomické aspekty a současnou legislativu
6. Znakový popis dosud detekovaných jednotlivých genotypů rodu *Trichinella* pro území České republiky

Doporučený rozsah práce

60 stran textu + fotografické přílohy + tabulky

Klíčová slova

Trichinelóza, svalovec stočený, cizopasník, detekční metoda, hostitel, hlístice, parazitóza.

Doporučené zdroje informací

- Alonso M., Herrero B., Vieites J. M. & Espiñeira M. 2011: Real-time PCR assay for detection of *Trichinella* in meat. *Food Control*, 22: 1333-1338.
- Bednář M., Souček A. & Vávra J. 1994: Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie. Praha: Triton. 226 pp.
- Bowman D. D. 2009: *Georgis' parasitology for veterinarians*. 9th edition. St. Louis: Elsevier Health Services. 451 pp.
- Gajadhar A. A., E. Pozio, Gamble H. R., Nockler K., Maddox-Hyttel C., Forbes L. B., Vallee I., Rossi P., Marinculic A. & Boireau P. 2009: *Trichinella* diagnostics and control: mandatory and best practices for ensuring food safety. *Veterinary Parasitology* 159: 197-205.
- Gamble H., Bessonov A., Cuperlovic K., Gajadhar A., Knapen F. Van, Noeckler K., Schenone H. & Zhu X. 2000: International Commission on Trichinellosis: Recommendations on methods for the control of *Trichinella* in domestic and wild animals intended for human consumption. *Veterinary Parasitology*, 93: 393-408.
- Gottstein B., Pozio E. & Nöckler K. 2009: Epidemiology, diagnosis, treatment, and control of trichinellosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 22: 127-145.
- Gunn A. & Pitt S. J. 2012: *Parasitology: an integrated approach*. 1st edition. Chichester: John Wiley & Sons Ltd. 442 pp.
- Koudela B., Harna J. & Pijáček M. 2011: Monitoring of animal trichinellosis in the Czech Republic – the past and present. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 17: 55.
- Pozio E., Gomez Morales M. A. & Dupouy-Camet J. 2003: Clinical aspects, diagnosis and treatment of trichinellosis. *Expert review of anti-infective therapy*, 1: 471-482.
- Pozio E. & Murrell K. D. 2006: Systematics and Epidemiology of *Trichinella*. *Advances in Parasitology*, 63: 367-439.
-

Předběžný termín obhajoby

2015/16 LS – FLD

Vedoucí práce

doc. PaedDr. Jan Farkač, CSc.

Garantující pracoviště

Katedra myslivosti a lesnické zoologie

Elektronicky schváleno dne 25. 3. 2015

Ing. Vlastimil Hart, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 30. 10. 2015

prof. Ing. Marek Turčáni, Ph.D.

Děkan

V Praze dne 06. 03. 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma „Parazitární onemocnění trichinelóza – charakteristika a vyhodnocení dostupných detekčních metod“ vypracoval samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a použil jen prameny, které uvádím v seznamu použitých zdrojů.

Jsem si vědom, že zveřejněním diplomové práce souhlasím s jejím zveřejněním dle zákona č. 111/1998 Sb. O vysokých školách v platném znění, a to bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Praze dne 18. března 2014

Bc. Martin Janáček

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu diplomové práce panu doc. PaedDr. Janu Farkačovi, CSc., za odbornou pomoc, připomínky, čas a cenné rady, které mně ochotně poskytl při zpracování této práce.

Abstrakt

Trichinelóza je celosvětově závažné parazitární onemocnění přenosné na člověka. Původce této choroby je *Trichinella* spp., řazena do kmene parazitických hlístic Nematoda. V současné době je známých 12 genotypů trichinel, ovšem nejvýznamnější pro ČR a okolní státy je *T. spiralis*, *T. britovi* a *T. pseudospiralis*.

Lidé se mohou nakazit pozřením syrového nebo nedostatečně tepelně upraveného masa infikovaného zvířete. Léčba je velmi náročná a může skončit i smrtelně, proto je kladen vysoký důraz na prevenci, především kontrolu těl jatečných zvířat určených k lidské spotřebě. Nejznámější a také zákonem schválená je metoda trávicí, kdy se uměle simuluje situace v žaludku hostitele v laboratorních podmínkách. Ovšem metod na vyšetření přítomnosti parazita, či specifikaci genotypu je mnoho.

Tato práce se zabývá srovnáním známých a dostupných metod detekce původce trichinelózy a znakovým popisem nejvýznamnějších genotypů trichinel.

Klíčová slova

Trichinelóza, svalovec stočený, cizopasník, detekce parazita, hostitel, hlístice

Abstract

Trichinellosis is a worldwide serious disease transmittable from animals to humans. The disease agent is *Trichinella* spp., which belongs to the phylum of parasitic nematoda called Nematodes. There are 12 genotypes of *Trichinella* currently known but the most important for the Czech Republic and neighboring countries are *T. spiralis*, *T. britovi* and *T. pseudospiralis*.

Man can be infected by ingestion of raw or undercooked meat of infected animals. Treatment is very expensive and can be fatal, therefore a great emphasis is placed on prevention, especially control of animal carcasses which are intended for human consumption. The most famous method, also approved by law, is the digestive method, however there are many other methods for testing the presence of a parasite or for specification of genotype.

This paper mainly deals with comparison of known and available methods of detection of trichinosis originators. Furthermore this paper gives character description of major genotypes of *Trichinella*.

Keywords

Trichinellosis, *Trichinella spiralis*, parasite, detection of the parasite, host, nematodes

Obsah

1.	ÚVOD	11
2.	CÍL PRÁCE	12
3.	CHARAKTERISTIKA RODU TRICHINELLA	12
3.1.	Původce	12
3.1.1.	Zástupci rodu <i>Trichinella</i>	12
3.1.2.	Epidemiologie rodu <i>Trichinella</i>	15
3.1.3.	Stavba těla parazita	17
3.1.4.	Životní cyklus	18
3.2.	Historie a současnost onemocnění	20
3.2.1.	Historie ve světě	20
3.2.2.	Historie a současnost v ČR a SR	21
3.2.3.	Současnost ve světě	23
3.2.4.	Méně obvyklý zdroj nákazy v Evropských zemích	25
3.3.	Současná legislativa	26
3.4.	Živočišné druhy vnímavé k infekci	27
3.5.	Postup v pozitivním případě	28
4.	MOŽNOSTI PŘENOSU A ŠÍŘENÍ	31
4.1.	Vnímané druhy zvířat	31
4.2.	Riziko onemocnění	31
4.3.	Inkubační doba	32
4.4.	Protilátky a imunita	32
4.5.	Odolnost trichinel	32
5.	LÉČBA A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ	35
5.1.	Klinické příznaky	35
5.1.1.	Umělá invaze trichinel praseti domácím	35
5.1.2.	Klinické příznaky u člověka	35
5.2.	Diagnostika	37
5.2.1.	Diagnostika z krve	37
5.2.2.	Diagnostika z biopsie	38
5.3.	Terapie	38
5.4.	Prevence	39
6.	VYUŽITÍ JEDNOTLIVÝCH ZNÁMÝCH A DOSTUPNÝCH METOD DETEKCE VE VZÁJEMNÝCH SOUVISLOSTECH	40

6.1. Detekce a identifikace parazita – přímé metody	40
6.1.1. Trichinoskopie (kompresní metoda).....	40
6.1.2. Referenční metoda (trávicí metoda)	42
6.1.3. Alternativa trávicí metody	45
6.1.4. Metoda polymerázové řetězové reakce PCR.....	46
6.2. Detekce specifických protilátek – nepřímé metody	47
6.2.1. Imunofluorescence	48
6.2.2. Western blot	48
6.2.3. ELISA test	49
6.2.4. Radioimunoanalýza (RIA)	51
6.2.5. Další imunologické metody.....	51
6.2.6. Sekvenování DNA.....	53
7. VYHODNOCENÍ ÚSPĚŠNOSTI JEDNOTLIVÝCH DETEKČNÍCH METOD V NÁVAZNOSTI NA EKONOMICKÉ ASPEKTY A SOUČASNOU LEGISLATIVU VE VZÁJEMNÝCH SOUVISLOSTECH	54
8. ZNAKOVÝ POPIS DOSUD DETEKOVANÝCH JEDNOTLIVÝCH GENOTYPŮ RODU <i>TRICHINELLA</i> PRO ÚZEMÍ ČR.....	57
9. ZÁVĚR	61
10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63
11. ONLINE ZDROJE.....	67
12. PŘÍLOHY	69
13. SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ	74

Seznam zkratk

SVS – Státní veterinární správa

SVÚ – Státní veterinární ústav

KVS – Krajská veterinární správa

NRL – Národní referenční laboratoř

EURLP – Referenční laboratoř Evropské Unie pro parazity

EIA – imunoenzymatické metody

DNA – deoxyribonukleová kyselina

FAO – Organizace pro výživu a zemědělství

WHO – Světová zdravotnická organizace

OIE – Světová organizace pro zdraví zvířat

Ab – protilátka

Ag – antigen

1. ÚVOD

Trichinelóza je celosvětově obávané onemocnění. Původcem této choroby je parazitická hlístice rodu *Trichinella*. V současné době je známých 12 genotypů trichinel rozšířených po celém světě. Ve střední Evropě nás mohou ohrožovat druhy *T. spiralis*, *T. pseudospiralis* a *T. britovi*, napadající savce, ptáky ale i plazy. Historie onemocnění sahá až do dávné minulosti. Byla nalezena egyptská mumie z období 1 200 let př. n. l., u které se prokázalo právě toto onemocnění. Poprvé ovšem byla trichinelóza prokázána až v druhé polovině 19. století.

Onemocnění vzniká po požití nakaženého syrového, či nedostatečně tepelně upraveného masa. Larvy trichinel jsou žaludečnými šťávami uvolněny z pouzdra a putují do tenkého střeva, kde se zavrtávají a samice rodí živé larvy. Larvy jsou dále krví transportovány do svalů, kde se opouzdří.

Léčba této choroby je velmi náročná a jen v bývalém Československu zemřelo na toto onemocnění několik desítek lidí. Onemocnění probíhá ve dvou fázích. V druhé - svalové, se k horečkám z první fáze připojují nesnesitelné bolesti, které vedly nejednoho nakaženého člověka až k sebevraždě. U vnímavých zvířat na toto onemocnění nejsou projevy choroby tak silné jako v případě humánní trichinelózy.

Z tohoto důvodu jsou velké nároky kladeny na uplatňování prevence. Především to je kontrola svaloviny veškerých zvířat, které jsou určeny k lidské spotřebě. Je mnoho metod, které se mohou k detekci onemocnění trichinelózou použít. Vycházejí z přímé detekce larev, nebo hledání ve vzorku specifické protilátky. Ovšem z hlediska našich zákonů je nařízena povinnost každé zvíře, které je určeno k lidské spotřebě, kontrolovat vyšetřením tak zvanou trávicí metodou, při které se laboratorně připraví obdobné prostředí jako v žaludku a po sedimentaci vzorku se sediment na přítomnost larev prověřuje pod mikroskopem.

2. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce je charakteristika a vyhodnocení známých dostupných metod detekce parazitárního onemocnění trichinelózy ve vzájemných souvislostech a znakový popis nejvíce rozšířených jednotlivých genotypů rodu *Trichinella* na území České republiky a v okolních státech.

3. CHARAKTERISTIKA RODU TRICHINELLA

Trichinelóza je celosvětově velmi vážné a obávané parazitární onemocnění přenosné na člověka, vázané na požití syrového či nedostatečně tepelně upraveného masa zvířat (Koudela, 2001).

3.1. Původce

Parazit rodu *Trichinella* (svalovec) je řazen do čeledi Trichinellidae, řádu Trichocephalida, třídy Adenophorea, kmenu Nematoda a říše Animalia. Je popsáno 12 druhů a genotypů trichinel. Devět druhů tvoří cysty kolem larev ve svalových vláknech. Patří mezi ně nejznámější a nejpatogennější *T. spiralis*, dále *T. britovi*, *T. nativa*, *T. murelli*, *T. nelsoni*, genotypy T6, T8, T9 a T12, pouze 3 druhy netvoří kolagenní pouzdro okolo larev a tím jim umožňují volný pohyb uvnitř svalových vláken. Mezi tyto druhy jsou řazeny *T. pseudospiralis*, *T. papuae*, *T. zimbabwensis* (Koudela et al. 2011).

3.1.1. Zástupci rodu *Trichinella*

- ***Trichinella spiralis***

Je kosmopolitní druh, který se hojně vyskytuje v teplejších oblastech (Evropa, Asie, Severní a Jižní Amerika), protože larvy nejsou odolné vůči mrazu. Jedná se o synantropní druh, nejvíce patogenní pro člověka i domácí zvířata, především prase domácí (*Sus scrofa domesticus*), koně (*Equus caballus*), kozu (*Capra hircus*), psa

(*Canis familiaris*) a kočku domácí (*Felis catus*). Rezervoárem je nejčastěji potkan obecný (*Rattus norvegicus*) (Gottstein et al. 2009).

- **Trichinella nativa**

Vyznačuje se velkou odolností vůči mrazu, je to tzv. arktický druh. Larvy dokáží přežít ve zmrzlé svalovině až 5 let. Hostitelem je liška obecná (*Vulpes vulpes*), lední medvěd (*Selenarctos maritimus*), vlk obecný (*Canis lupus*), mýval severní (*Procyon lotor*), rys ostrovid (*Lynx lynx*) a z mořských živočichů např. mrož lední (*Odobenus rosmarus*) a tuleň obecný (*Phoca vitulina*). Výskyt byl zjištěn převážně v chladných, arktických a subarktických oblastech Ameriky, Asie a severu Evropy (Gottstein et al. 2009).

- **Trichinella britovi**

Typický a nejrozšířenější zástupce sylvatického (lesního) výskytu, vázaný na mírné podnebí Evropy a Asie. Částečně se výskyt potvrdil i na západě Afriky. Napadá převážně divoce žijící šelmy. Je to pravděpodobně hlavní zdroj pro infekci prasat divokých (*Sus scrofa*), dále je infekční pro vlka obecného (*Canis lupus*), lišku obecnou (*Vulpes vulpes*), mývala severního (*Procyon lotor*) a jezevce lesního (*Meles meles*) (Gottstein et al. 2009).

- **Trichinella pseudospiralis**

Kosmopolitní druh, jeho hostitelem jsou savci, ale i masožraví ptáci a vačnatci. Geneticky je lze rozdělit na 3 typy: paleoarktický, neoarktický a australský (tasmánský). Lidská úmrtí po nákaze touto trichinelou jsou hlášená z Ruska, Thajska a Francie, pro člověka je tento druh trichinel velmi patogenní. Na rozdíl od opouzdřených druhů trichinel, má *T. pseudospiralis* velmi nízkou odolnost vůči mrazu a teplu (Gottstein et al. 2009).

- **Trichinella murelli**

Je málo infekční druh, napadající volně žijící masožravce v Americe. Například kojota prérijního (*Canis latrans*), lišku obecnou (*Vulpes vulpes*), medvěda ledního (*Selenarctos maritimus*) a mývala severního (*Procyon lotor*). Hlavním zdrojem nákazy pro člověka se stávají medvědi a v několika případech to byli také koně. Tento druh

nebyl popsán zatím u prasat. Je poměrně odolný vůči nízkým teplotám (Gottstein et al. 2009).

- **Trichinella nelsoni**

Vyskytuje se převážně v Africe a typickým hostitelem tohoto druhu je hyena skvrnitá (*Crocuta crocuta*). Občas se mohou nakazit i jiné druhy živočichů, například prase bradavičnaté (*Phacochoerus aethiopicus*). Tento druh je pro člověka jen málo patogenní. Je hlášeno jen pár případů nákazy lidí v Keni a Tanzanii. Je velmi odolný vůči teplu, ovšem vůči mrazu jen málo (Gottstein et al. 2009).

Mezi druhy méně významné nebo málo známé patří

- **Trichinella papue**

Synantropní druh. Napadá především prasata a krokodýly v Papui Nové Guinei. Tímto druhem byl nakažen i člověk (Gottstein et al. 2009).

- **Trichinella zimbabwensis**

Je další druh, který vyhledává jako svého hostitele krokodýly nilské (*Crocodylus niloticus*). Je infekční i pro savce v Mosambiku, Zimbabwe a Etiopii (Gottstein et al. 2009).

- **Trichinella patagoniensis**

Nalezena pouze u pumy americké (*Puma concolor*) v Jižní Americe (Gottstein et al. 2009).

- **Trichinella T-6**

Je rezistentní vůči mrazu. Nalezena byla u koní a prasat v Severní Americe. Geneticky velmi podobný *T. nativa* (Gottstein et al. 2009).

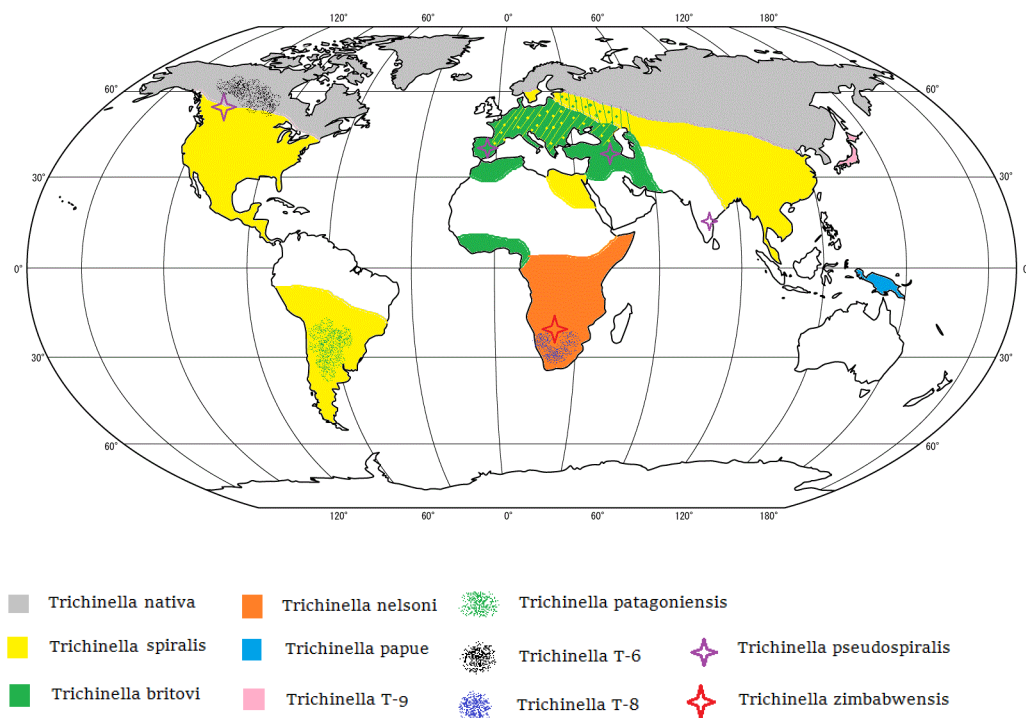
- **Trichinella T-8**

Výskyt u masožravců v Namibii a Jižní Africe. Dosud nebyla hlášena nákaza člověka. Geneticky podobný *T. britovi* (Gottstein et al. 2009).

- **Trichinella T-9**

Nalezena u masožravých šelem v Japonsku. Geneticky podobná *T. murrelli* (Gottstein et al. 2009).

Obr. č. 1: Mapa výskytu trichinel ve světě (podle Chmelíkové, 2013, upraveno).



3.1.2. Epidemiologie rodu *Trichinella*

- **cyklus synantropní**

Hlavním zástupcem tohoto cyklu je *T. spiralis* a *T. papue*. Jedná se o přenos mezi hlodavci a domácími prasaty. Ta jsou zdrojem nákazy pro člověka. Může dojít také k přenosu z koňského masa, které bylo nakaženo infikovaným hlodavcem. Například v případě, kdy kůň pozře nakaženého hlodavce na pastvě (Chroust & Forejtek, 2010). Hlodavci se mohou nakazit po jídání odpadů z jatek nebo infikovaných kádaverů volně žijících živočichů, jako např. prasete divokého (*Sus scrofa*), lišky obecné (*Vulpes vulpes*), vlka obecného (*Canis lupus*), a rysa ostrovida (*Lynx lynx*) (Jurášek & Dubinský, 1993).

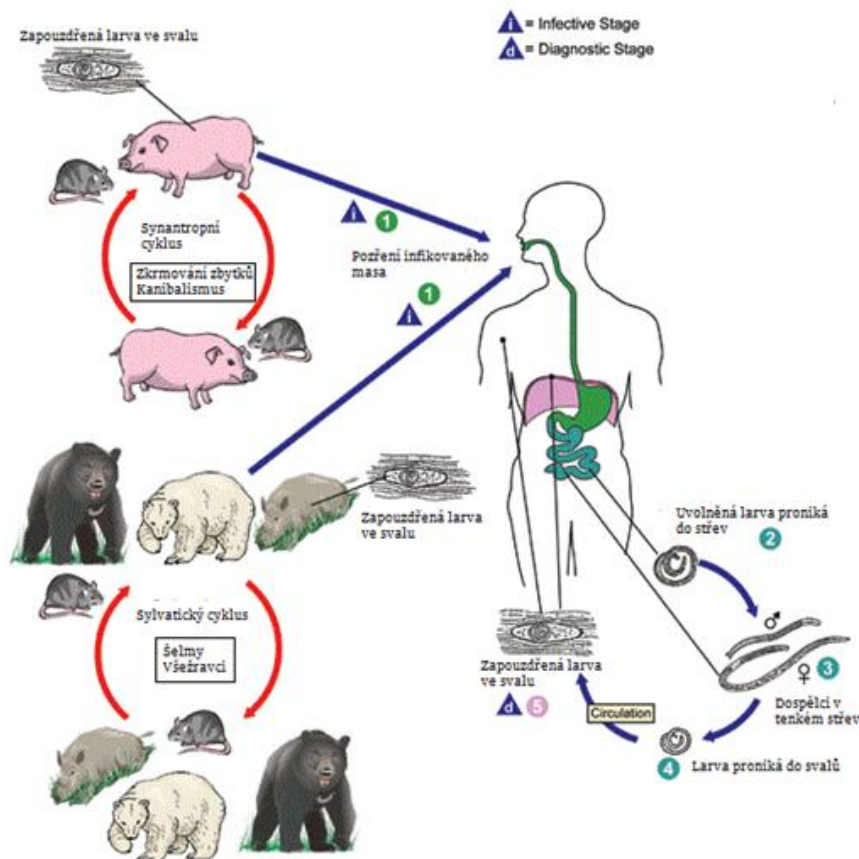
- **cyklus sylvatický**

Hlavním zástupcem tohoto cyklu je *T. britovi*. Trichinelóza koluje v přírodních podmínkách, kdy se z volně žijících masožravců nakazí divoké prase (*Sus scrofa*) nebo hlodavci. Dalším významným druhem je *T. pseudospiralis* (Chroust & Forejtek, 2010). Člověk se nakazí především zejména pozřením infikovaných divokých zvířat získaných lovem. Do sylvatického cyklu vstupuje často nepřímě i člověk, tím, že ponechá zbytky vyvrhnutých živočichů na místě ulovení. Dochází tak k rozšíření možné nákazy mezi volně žijícími živočichy (Palmer et al. 2011).

- **cyklus smíšený**

Charakteristické pro tento cyklus je, že lidé krmí doma chovaná prasata zbytky ulovených živočichů. Tedy se můžou k synantropnímu druhu *T. spiralis* připojit sylvatické druhy trichinel – *T. britovi* a *T. pseudospiralis* (Palmer et al. 2011).

Obr. č. 2: Cyklus synantropní a sylvatický

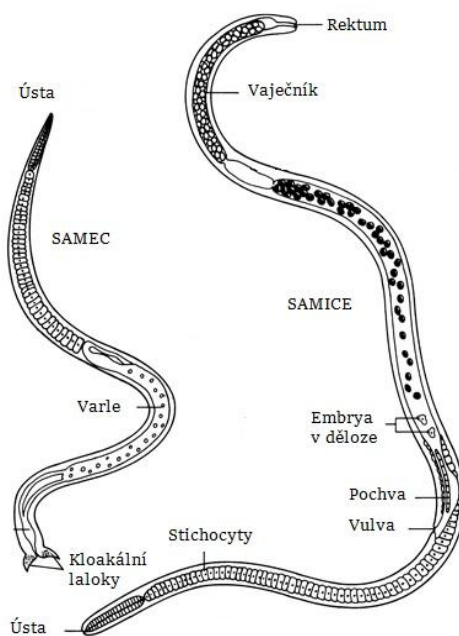


Zdroj: <http://www.cdc.gov/parasites/trichinellosis/biology.html> (upraveno).

3.1.3. Stavba těla parazita

Stavba těla všech známých druhů trichinel je velmi podobná. Většina druhů tvoří pouzdro (*T. spiralis*, *T. nativa*, *T. nelsoni*, *T. britovi*) a dosahují velikosti viditelné okem. Samice dosahují délky 1,5 – 4 mm, samci sotva poloviční. Trichinela má vláskovité tělo, které se dopředu zužuje, na opačném konci leží řitní otvor (Jírovec, 1948). Z dělohy samice se rodí živé larvy. Uprostřed jícnové oblasti samice se nachází genitální otvor. Samci mají tělo tvořeno z jedné třetiny jícnem a na konci se nacházejí dva kloakální laloky (Jurášek & Dubinský, 1993). Laloky samcům slouží k uchycení samice při páření, protože na rozdíl od ostatních nematod samci nemají spikuly (trny) (Gunn & Pitt, 2012). Jícen je také velmi důležitý pro některé biologické procesy parazita. Je tvořen svalnatou přední a dlouhou žlaznatou zadní částí lemovanou žlaznatými buňkami (stichocyty), které utvářejí speciální strukturu stichosom, který, produkující aktivní molekuly, např. se účastní migrace larev tkáněmi hostitele a regulace procesů v napadených buňkách hostitele (Dupouy-Camet & Murrel, 2007).

Obr. č. 3: Morfologie trichinel



Zdroj: <http://rowdysites.msudenver.edu/~churchcy/BIO3270/Images/Nematodes/Trichinella.htm>
(upraveno).

3.1.4. Životní cyklus

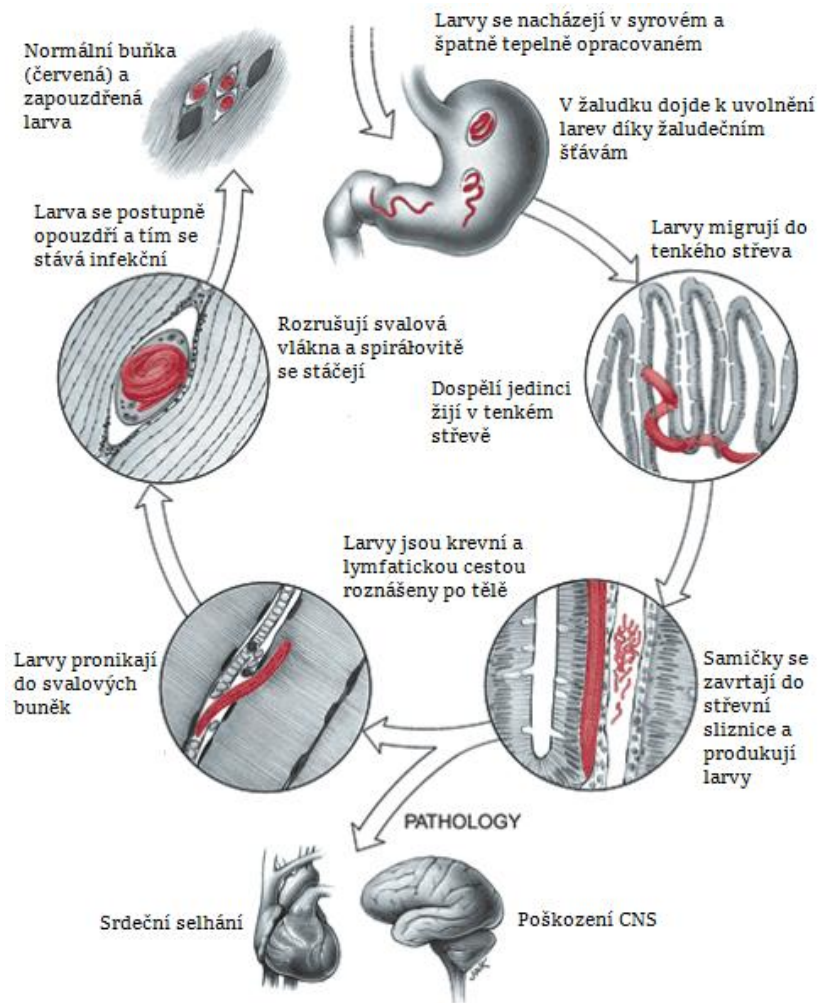
Člověk je pro tohoto vetřelce jen neefektivním a slepým článkem cyklu (Forstl, 2003). Pro životní cyklus trichinel je zapotřebí, aby se predátor stal následně kořistí. Trichinela je, co se týká vývojového cyklu, zajímavá v tom, že v hostiteli jsou zároveň dospělí jedinci i larvální stádia. Dospělci jsou ve střevě, larvy ve svalovině hostitele (Bowman, 2009). Trichinely jsou tzv. biohelminti, tzn., že odpadá nutnost „shánět“ mezihostitele a žádná z vývojových fází neprobíhá ve vnějším prostředí (Bednář et al. 1994).

Vývoj začíná pozřením infikovaného syrového nebo málo tepelně zpracovaného masa hostitelem. V žaludku dojde k postupnému uvolnění larev prostřednictvím trávicích šťáv (obsahujících pepsin a kyselinu chlorovodíkovou). Larvy migrují do tenkého střeva, kde pohlavně dospívají během 2 dnů. Dospělý samec po kopulaci uhynie, přesto zvládne oplodnit několik samic. Samičky se po kopulaci zavrtávají do střevní sliznice, kde vyprodukují až 1 500 larev za dobu 1,5 měsíce. Larvy prostupují do lymfatické a krevní soustavy a odtud jsou roznášeny po celém těle. Ve svalovině narušují svalová vlákna a spirálovitě se stáčí. Postupně se opouzdří a přeměňují morfolonii i metabolismus svalové buňky za vzniku tzv. mateřské buňky, která larvu vyživuje. Asi za 3 týdny je larva již obalena ochrannou vrstvou – kolagenní kapsulou (cysta) a je připravena stát se infekční pro dalšího hostitele (Gottstein et al. 2009; Koudela et al. 2011; Gunn & Pitt, 2012; Koudela, 2001; Jurášek & Dubinský, 1983).

Larvy trichinel mohou napadat jakoukoli svalovinu, ovšem nejčastěji si vybírají brániční svaly, žvýkáčí svaly, jazyk, oko-hybné svaly a hrtan, při čemž na těchto místech vyvolávají záněty. U člověka, prasete a hlodavců se jedná častěji o dýchací svaly, především je to bránice, zatímco u masožravců to je i jazyk, žvýkáčí svaly a svalovina končetin. Je to způsobeno intenzitou svalové činnosti a tím souvisejícím stupněm prokrvení. Jedinou svalovinou, kde se larvy prakticky neusazují, je svalovina srdeční a hladká. Druhy larev netvořící pouzdro vyvolávají mnohem silnější zánětlivou reakci v těle.

Zapouzdřené larvy jsou životaschopné u člověka 30 let a u prasete 10 let (Jurášek & Dubinský, 1983; Koudela, 2001; Lamb, 2012; Chroust & Forejtek, 2010; Matyáš, 1975).

Obr. č. 4: Životní cyklus trichinel



"Parasitic Diseases" 4th Ed. © Apple Trees Productions, LLC, Pub. P.O. Box 280, New York, NY 10032

Zdroj: http://www.trichinella.org/bio_lifecycle.htm (upraveno)

3.2. Historie a současnost onemocnění

3.2.1. Historie ve světě

Trichinelóza se vyskytovala již v dávné historii, kdy lidé jedli především maso málo tepelně opracované nebo dokonce zcela syrové. Také je pravděpodobné, že je i hlavní příčinou zákazu požívání vepřového masa v islámských státech (Koudela, 2001).

Ovšem zcela poprvé byla trichinelóza diagnostikována v Anglii v roce 1835 při pitvě člověka, kdy zapouzdřené larvy objevil mladý student medicíny James Paget. Jeho profesor Robert Owen nález publikoval a pojmenoval parazita jako *Trichina spiralis*. Rodový název *Trichinella* navrhl v roce 1895 francouzský parazitolog Alcid Raillet (Koudela, 2001).

Rok 1846 se stal důležitým v objevu trichinely ve svalovině prasete. Americký lékař Joseph Leidy si všiml v šunce drobných útvarů, které byly podobné trichinelám ve svazech jeho pacienta (Koudela, 2001). Ve druhé polovině 19. století se stala tak zvaná „americká trichinelóza“ velkou obavou pro většinu evropských zemí. Itálie v roce 1879 zakázala dovoz prasat a do roku 1891 již tento zákaz vydala i většina ostatních zemí Evropy. Amerika zareagovala a nařídila vyšetřit všechna exportovaná prasata, ovšem na tuzemských farmách toto nařízení neplatilo. Na přelomu 19. a 20. století bylo lékařským vyšetřením dokázáno, že je trichinelózou nakaženo 16,2 % občanů Ameriky (Formánková, 2012).

V Německu v letech 1853 – 1860 byly učiněny pokusy parazitologem Rudolfem Virchowem, na jejichž základě byl popsán vývojový cyklus a možnosti šíření parazita trichinelózy. Roku 1860 drážďanský lékař Friedrich Albert Zenker dopodrobna popsal případ nákazy trichinely končící smrtí. Tím se změnil pohled na dosud přehlížené onemocnění. Následně během 20 let bylo popsáno 8 491 případů nakažení a téměř 500 jich bylo smrtelných. Na pokyn Rudolfa Virchowa byla v roce 1864 přijata různá opatření k zabránění šíření onemocnění. Do konce století je převzaly další země západní a střední Evropy (Koudela, 2001).

3.2.2. Historie a současnost v ČR a SR

- **Česká republika**

V Čechách se první prokázání trichinely datuje na rok 1865 ve Frýdlantu. Onemocnělo zde 35 lidí. Během posledních 100 let bylo zaznamenáno 19 nálezů, kdy nakaženo bylo přes 1 000 lidí a zemřelo 50. Roku 1954 ve Smrdově u Pacova proběhla první velká nákaza vyvolaná konzumací masa prasete divokého (*Sus scrofa*), při které onemocnělo 11 osob a zemřely 3. Největší nákaza u nás byla v roce 1934 v Aši, nakaženo bylo 180 osob, zemřely 2 (Chroust & Forejtek, 2010).

Po mnoha letech „klidu“ byla objevena trichinelóza u prasete divokého (*Sus scrofa*) uloveného v Beskydech v roce 2001. Také u obce Tvořihráz na Znojemsku byl odstřelen pozitivní kus stejné zvěře (Pozio, 2007). „Nejčerstvější“ nález trichinelózy je z února roku 2016, kdy nakaženým bylo opět prase divoké (*Sus scrofa*), ulovené v oblasti Mařeničky v okrese Česká Lípa.

Tabulka č. 1: Přehled záchytů pozitivních kusů živočichů při povinném vyšetření na trichinelózu.

Katastr	Doba záchytu	Živočich
Krásná, Frýdek- Místek	5/2001	prase divoké
Tvoříhráz, Znojmo	7/2001	prase divoké
Starý Rokytník, Trutnov	4/2002	prase divoké
Ostravice, Frýdek-Místek	8/2002	prase divoké
Javory, Děčín	1/2003	prase divoké
Staré Křečany, Děčín	1/2003	prase divoké
Běleč nad Orlicí, Hradec Králové	12/2003	prase divoké
Vysoká nad Labem, Hradec Králové	12/2003	prase divoké
Velký Uhřínov, Rychnov nad Kněžnou	9/2006	prase divoké
Mosty u Jablunkova, Frýdek-Místek	11/2010	jezevec lesní
Dolní Dobrouš, Ústí nad Orlicí	12/2010	prase divoké
Dolní Dobrouš, Ústí nad Orlicí	1/2011	prase divoké
Dolní Dobrouš, Ústí nad Orlicí	1/2011	prase divoké
Paseky nad Jizerou, Liberec	1/2013	prase divoké
Bělá nad Radbuzou, Domažlice	11/2013	prase divoké
Dolní Bousov, Mladá Boleslav	1/2014	liška obecná
Okres Frýdek-Místek	1/2015	prase divoké
Cvikov, Česká Lípa	2/2016	prase divoké

Zdroj: (Janáček, 2014, upraveno)

V současné době za velké riziko jsou pro ČR považovány lišky. Na území našeho státu se systematické zjišťování výskytu trichinelózy u lišek neprovádí. V lednu roku 2014 byly MVDr. Miroslavem Tomčíkem odebrány vzorky svaloviny u celkem 229 lišek, ulovených v 8 krajích ČR a 39 okresech. Vzorky byly standardně vyšetřovány trávicí metodou. Pozitivní nález byl např. u jedné lišky obecné (*Vulpes vulpes*), ulovené v okrese Mladá Boleslav, ve kterém bylo vyšetřeno celkem 5 lišek. Liška obecná (*Vulpes vulpes*) a jiní volně žijící masožravci se nakazí často na místech, kde se vyskytne onemocnění u prasete divokého (*Sus scrofa*), z důvodu přímého požití infikované svaloviny (Pavlásek et al. 2014; Koudela & Pavlíčková, 2005).

Ve 40. a 50. letech probíhalo rozsáhlé vyšetřování masožravců pocházejících z různých částí tehdejšího Československa. Bylo vyšetřeno 170 kusů zvířat a trichinely byly nalezeny u 1 kočky divoké (*Felis silvestris*), 1 lišky obecné (*Vulpes vulpes*), 2 vlků obecných (*Canis lupus*) a 2 rysů ostrovidů (*Lynx lynx*).

▪ Slovensko

Na Slovensku v roce 1998 bylo vyšetřením zjištěno celkem 336 osob pozitivních na trichinelózu, které se nakazily pozřením klobás z infikovaného pravděpodobně psiho masa. Jednalo se o nákazu vyvolanou *T. britovi*. Poslední nákaza byla v roce 2001 v okrese Komárno, onemocnělo při ní 13 lidí (Formánková, 2012).

V období let 2000 – 2007 bylo podle údajů Hurníkové a Dubinského (2009) na Slovensku vyšetřeno na trichinelózu 70 568 vzorků svaloviny prasat divokých, přičemž pozitivních bylo 0,06 % (43 jedinců). „Nejsilnější“ rok na výskyt trichinelózy byl rok 2005, kdy bylo zjištěno 0,11 % nakažených prasat divokých. Z toho 99 % prasat divokých bylo nakaženo genotypem *T. britovi*, pouze jedno procento genotypem *T. pseudospiralis*. Na Slovensku je ovšem hlavním rezervoárem liška obecná (*Vulpes vulpes*). V roce 2007 bylo onemocnění zjištěno u 20 % těchto vyšetřovaných jedinců.

V roce 2012 byla vydána Zpráva o zoonózách ve Slovenské republice, za rok 2011, zpracovaná MVDr. Beladičovou. Bylo vyšetřeno 15 405 prasat divokých, z nichž 4 byla pozitivní na trichinelózu. V roce 2012 bylo vyšetřeno celkem 5 221 volně žijících zvířat, z nichž 10 bylo pozitivních na trichinelózu (Pavlásek & Máca, 2014; Ondriáš, 2008).

3.2.3. Současnost ve světě

V evropských zemích jsou nejvážnějšími tyto nákazy v minulých letech. V roce 1997 nákaza v Rumunsku, kde bylo nakaženo 1653, trichinela byla potvrzena u 6 000 ks prasat. Rok 1999 v Anglii onemocnělo 8 srbských emigrantů. Zdrojem se stal salám dovezený ze Srbska. Zajímavostí na tomto případě je, že nákaza se dokáže importovat i ve formě trvanlivého masného výrobku. Ve stejném roce v Německu se nakazilo 52 lidí. Jednalo se o dvě nezávislé epidemie. Prvním zdrojem se staly párky, vyráběné z nakaženého masa ze Španělska, druhý zdroj nebyl dohledán, protože uzenina pocházela z masa, které bylo dovezeno celkově z 9 jatek od 40 chovatelů. Na přelomu roku 2001/2002 propukla nákaza v Srbsku. Nakažených bylo až 347 lidí a zdrojem nákazy byl opět salám, vyrobený na místních jatkách (Formánková, 2012).

V současnosti je otázka trichinelózy stále velmi aktuální. Mezi státy se zvýšeným množstvím pozitivních zvířat v Evropě patří Polsko (odhaleno je až 100

infikovaných obyvatel za rok), Španělsko (také odhaleno až 100 infikovaných obyvatel ročně), Bulharsko (zjištěno bylo více jak 100 nálezů ročně) a nejvýznamnější Rumunsko (v průměru 5,5 případů na 100 obyvatel ročně) (Pozio, 2007). Ostatní okolní země jako například Slovensko, Rakousko a Německo přijaly vysokou úroveň hygieny a kontroly vepřového masa na trichinelu. Zamezil se také styk domácích prasat s prasaty divokými (Koudela, 2001).

▪ **Polsko**

V Polsku s nákazou trichinelózy stále zápasí, především kvůli přemnoženým liškám obecným a mývalům severním. Dále prevalence u prasat divokých (25 %) i domácích je poměrně vysoká. S tím souvisí i vysoký počet humánní trichinelózy (až 100 případů za rok). Mezi léty 1993 až 2000 přesáhl počet případů 1 100. V roce 2012 bylo vyšetřeno 173 678 ks prasat divokých. Trichinela byla objevena u 481 ks zvířat (0,27 %). Z toho nejvíce *T. spiralis* v 65,5 % a *T. britovi* u 21 % (Pozio, 2007; Pavlásek & Máca, 2014).

▪ **Německo**

Humánní trichinelóza v Německu je pouze sporadická a ve většině případů je způsobena genotypem *T. britovia* *T. pseudospiralis*. V roce 2012 shrnul Nöckler výsledky vyšetření v období 2002 až 2011. V těchto letech bylo vyšetřeno 3 290 979 ks prasat divokých na trichinelózu s pozitivním výsledkem jen u 100 ks prasat (0,003 %). Nejvíce pozitivních prasat divokých bylo zjištěno v roce 2008 (16 kusů z 354 118 vyšetřených jedinců) a naopak nejméně v roce 2009 (3 kusy z 275 290 ks vyšetřených jedinců). Roku 2012 byla zjištěna trichinela u prasete divokého (*Sus scrofa*) i s intenzitou 60 larev v jednom gramu (Pozio, 2007; Pavlásek & Máca, 2014).

▪ **Rakousko**

Stejně jako v Německu, tak i Rakousko, má prosté chovy domácích prasat. Poslední propuknutí onemocnění u člověka bylo monitorováno roku 1970, a to po konzumaci vepřového masa z rodinné farmy, protože prasetem byly zkrmovány zbytky infikované lišky obecné (*Vulpes vulpes*). V roce 1982 byl poslední výskyt trichinel zjištěn u prasat bílých. V některých případech se objevila nákaza u prasete divokého (*Sus scrofa*) a lišky obecné (*V. vulpes*). V roce 2012 bylo vyšetřením kontrolováno

33 426 ks jedinců této zvěře a nebyl nalezen žádný pozitivní případ (Pozio, 2007; Pavlásek & Máca, 2014).

3.2.4. Méně obvyklý zdroj nákazy v Evropských zemích

Zdrojem nákazy nemusí být pouze maso vepřové nebo z prasete divokého (*Sus scrofa*). V roce 1998 bylo dovezeno z Polska 27 koní do Itálie na jatka. Italové z koňského masa připravují specialitu podobnou našemu tatarskému bifteku. V té době již probíhalo povinné vyšetření na trichinelu, ale kuriozitou na tomto případě je, že místní veterinář zjistil jeden pozitivní případ. Bohužel na jatkách byla zaměněna hlava a trup poraženého a infikovaného koňského těla. Řezník, který maso odkoupil, připravil místní specialitu a díky této záměně onemocnělo 92 lidí (Formánková, 2012).

V Rusku v letech 1988 – 2002 propuklo 47 nálezů, při kterých onemocnělo 864 osob. 5 nálezů způsobilo nedostatečně opracované maso z jezevce lesního (*Meles meles*). Při vyšetření jezevců na trichinelu bylo pozitivních celkem 27 %. Vyšší výskyt trichinel u jezevců hlásilo také Bulharsko, Slovinsko, Itálie, Rumunsko, Polsko, Finsko a Estonsko (Koudela, 2010).

Také v České republice se nákaza u jezevce lesního (*Meles meles*) potvrdila. Bylo to roku 2010 u jedince odloveného v okolí Mostů u Jablunkova. Již dříve (v roce 2004) byla nalezena na trichinelózu pozitivní liška obecná (*Vulpes vulpes*). Ovšem nikdy nebyl potvrzen případ lidské trichinelózy po pozření masa z jezevce lesního (*M. meles*) (Koudela, 2010).

Zdrojem nákazy se, jak už bylo výše uvedeno, může stát i maso psí. Ovšem jako zdroj nákazy se považuje pozření jakéhokoliv infikovaného kadáveru, ať už nekrofágií či predací. Proto jsou sem řazeni savci, ptáci i plazi, včetně exotických druhů jako je například krokodýl nilský (*Crocodylus niloticus*) (Pozio, 1998). Více o zdroji nákazy v kapitole 4.1. – vnímavé druhy zvířat.

Psík mývalovitý (*Nyctereutes procyonoides*) je v posledních letech velkým nebezpečím jako rezervoár trichinelózy pro volně žijící živočichy. V jeho domovině (východní Asie) je podle různých autorů uváděno, že procento nakažených psíků je 25 –

60 %. Vzhledem k jeho masivnímu šíření do celé Evropy, je potřeba v rámci možností vyšetřovat také tuto psovitou šelmu (Pavlásek & Máca, 2014).

Neposledním významným hostitelem trichinelózy je rys ostrovid (*Lynx lynx*), který patří k nejvíce ohroženým masožravcům. V roce 1960 se našel pozitivní kus rysa ostrovida (*L. lynx*) v oblasti Velkých Karlovic v Beskydech. Mohlo jít o zvíře, které migrovalo ze Slovenska nebo Polska, kde se vyskytuje trichinelóza u vlků, rysů a medvědů i v dnešní době (Chroust & Forejtek, 2010).

3.3. Současná legislativa

Veterinární předpisy naší země stanovují povinnost prohlídky masa jatečných a divokých prasat, nutrií, medvědů a koní, které jsou určeny pro lidskou spotřebu. Metodický pokyn Státní veterinární správy ČR číslo 14/2000 a Nařízení Komise (ES) č. 2075/2005. Existují dvě základní vyšetřovací metody určené k diagnostice trichinelózy. Jedná se o tzv. „trávicí metodu“, kdy se uměle simuluje situace v žaludku hostitele v laboratorních podmínkách. A metoda tzv. „kompresní“, která se může uskutečňovat v domácích podmínkách pouze při osobní spotřebě masa (Chroust & Forejtek, 2010).

Další z metod jsou serologické testy, které ovšem nejsou vhodné pro zjišťování přítomnosti trichinel u jednotlivých zvířat určených pro lidskou spotřebu. Jedna z možností prevence před trichinelózou je také zmrazení masa, které za určitých podmínek usmrtí přítomné parazity, ale pouze u druhů, které nejsou odolné vůči mrazu (Nařízení ES číslo 2075/2005).

Vyhláška 289/2007 Sb., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty říká, že lovec může zvěř vnímavou na trichinelózu dodávat či prodávat konečnému spotřebiteli až po negativním vyšetření na přítomnost svalovce, provedeném v akreditované laboratoři, nebo v laboratoři, které vydá Krajská veterinární správa povolení pro tento druh vyšetření.

Nařízení Komise (ES) číslo 2075/2005 také udává možnosti devitalizace trichinel, kompletní pohotovostní plán, dohledávání pozitivních kusů, nakládání s pozitivními kusy, atd.

3.4. Živočišné druhy vnímavé k infekci

▪ **jateční prasata**

Z chovu musí být prasata na jatka dovezena společně s informací o jejich potravním řetězci. Tyto informace poskytuje chovatel zvířat. Po převozu zkontroluje veterinární dozor průvodní dokumenty a zdravotní stav zvířat. Po porážce jsou v rámci preventivní kontroly odebrány z každého jatečního kusu vzorky z bráničního pilíře, popřípadě jiných částí těla a vloženy do předem očíslovaných vzorkovnic. Vzorkovnice s pečeti se společně s vyplněnou žádankou na trichineloskopické vyšetření se odešle pomocí svozové linky každý den do akreditované laboratoře (SVÚ). V laboratoři dojde k vyšetření a poté zaslání písemného protokolu s výsledkem vyšetření zpět veterinárnímu dozoru. Do té doby musí být jateční tělo pozastaveno z oběhu a nesmí opustit prostor jatek (žádná jeho část). Pro urychlení se v současnosti používá možnost SMS zpráv, e-mailu nebo faxu, kdy ihned po ukončení vyšetření dojde zpráva veterinárnímu lékaři a provozovateli jatek a jatečně opracované tělo může být uvolněno k dalšímu zpracování (Formánková, 2012).

▪ **zvěř**

V současnosti je jako nejpravděpodobnější zdroj nákazy člověka vedeno prase divoké (*Sus scrofa*), proto dle pokynů Státní veterinární správy lovec, resp. uživatel honitby, je povinen předložit každý ulovený kus černé zvěře ještě před zpracováním k vyšetření na trichinely (Chroust & Forejtek, 2010). Odebraný vzorek musí být o objemu minimálně 10 g čisté svaloviny (jazyk, žvýkáci sval, svalovina přední končetiny, svalovina mezižeberní, svalovina z obou bráničních pilířů). Odběr provádí obvykle lovec nebo myslivecký hospodář. Vzorek nesmí být zamražený, pouze zachlazený, v nepropustném obalu, řádně označený (číslo plomby) a identifikovaný s přiloženou vyplněnou žádankou a lístkem o původu zvěře. Od 1.1.2016 je také povinnost přiložit k vzorku tzv. píрко (ocásek prasete). Vyšetření se provádí v SVÚ (trávicí metodou) nebo pro potřebu lovce v laboratoři schválené KVS (trávicí i kompresní metoda). Laboratoř vydá po vyšetření uživateli honitby Protokol o laboratorním vyšetření zvířete. Je povinnost uživatele honitby tento protokol uchovat 2 roky a na požádání jej předložit veterinárnímu dozoru (Veterinární zákon; Zbořil, 2012).

k určení druhu trichinel s využitím molekulárních analýz pomocí metody multiplex PCR. Protokol o provedené typizaci je zpět odeslán do země původu (Pavlásek & Máca, 2014).

▪ **Mimořádná veterinární opatření**

Při výskytu trichinelózy nařizuje Státní veterinární správa a vyhláší místně příslušná Krajská veterinární správa mimořádná veterinární opatření, která zamezí šíření nebezpečné nákazy přenosné ze zvířat na člověka. Účinnost opatření nabývá dnem vyvěšení na úřední desce příslušného Krajského úřadu a obecních úřadů, jejichž území se nákaza týká.

▪ **Ochranná a zdlávací opatření**

- a) Zjištění původce (opatření jsou vyhlášena na základě hlášení nálezů pozitivního výsledku povinného vyšetření vzorku svaloviny akreditovanou laboratoří – trávící metodou)
- b) Vymezení ohniska nákazy (katastrální území)
- c) Opatření v ohnisku nákazy (týká se osob oprávněných k lovu zvěře dle zákona o myslivosti)
 - odlovit veškerou zvěř vnímavou na trichinelózu v ohnisku nákazy
 - zajistit vyšetření všech odlovených kusů na přítomnost trichinel dle veterinárního zákona, a to odebráním vzorku svaloviny bez tuku a vaziva a zajistit vyšetření těchto vzorků trávící metodou
 - oznámit toto bezodkladně po ulovení nebo dohledání zvěře vnímavé na trichinelózu v ohnisku, jejíž maso má sloužit pro konzumaci člověkem, mysliveckému hospodáři uživatele honitby
 - nejpozději do 7 kalendářních dnů od ulovení nebo dohledání vnímavé zvěře v ohnisku, která má být určena pro lidský konzum, doručit mysliveckému hospodáři vyplněné Hlášení o lovu zvěře, oddělené od

Lístku o původu zvěře na formuláři daném Zákonem o myslivosti a současně dodat protokol či jeho kopii o vyšetření zvěřiny na trichinelózu

- do obdržení výsledků vyšetření je zakázáno jakkoli s ulovenou zvěřinou dále manipulovat (stahovat z kůže, bourat, konzumovat, distribuovat)
- uživatelé honiteb a jejich myslivečtí hospodáři musí poučit všechny lovce o povinnostech stanovených veterinárním zákonem, způsobu odběru vzorku na vyšetření, manipulaci a uchovávání zvěřiny do obdržení výsledků – toto musí lovci stvrdit podpisem, dále musí uživatelé honiteb shromažďovat a uchovávat hlášení a protokoly o vyšetření zvěře na trichinelózu a na požádání kdykoli Krajské veterinární správě předložit
- zakazuje se používat těl zvířat vnímavých na trichinelózu či jejich částí k újedi

d) Stanovení pozorovací doby – 3 měsíce

e) Zdolání nákazy (nákaza je prohlášena za zdolanou a mimořádná veterinární opatření budou ukončena, jestliže v průběhu pozorovací doby budou všechna vyšetření ulovených či dohledaných zvířat vnímavých na trichinelózu a sloužících ke konzumu zaregistrována a negativní)

f) Za porušení mimořádných veterinárních opatření jsou stanoveny sankce

4. MOŽNOSTI PŘENOSU A ŠÍŘENÍ

4.1. Vnímané druhy zvířat

Jak už bylo výše popsáno (kapitola 3.1.1.), trichinelózou se můžou nakazit savci včetně člověka, dále pak plazi (vnímaví na *T. zimbabwensis* a *T. papue*), kuriozitou je nakažení po pozření masa vodních želv (vnímavé na *T. pseudospiralis*) a ptáci (vnímaví na *T. pseudospiralis*). V literaturách jsou zmínky o experimentální infekci obojživelníků a ryb, ovšem s neúspěšným výsledkem (Pozio & Murrell, 2006). Zato pokusy s bezobratlými a obojživelníky jako rezervoárů trichinel měly větší přínosy. Zjistilo se, že teplotou vnějšího prostředí je ovlivněno přežívání trichinel v těchto hostitelích, čím nižší teplota, tím delší dob přežívání (Palmer et al. 2011).

Co se týká klinického obrazu, u karnivorů se nákaza projevuje jen s drobnými příznaky. Pouze v případě silné infekce, může ve svalové fázi docházet k horečkám, edémům a poruchám pohybu. Na rozdíl od člověka, kde svalová fáze je doprovázená (mimo jiných příznaků) silnou bolestí kosterního svalstva, která v minulosti dovedla několik lidí k sebevraždě (Chroust & Forejtek, 2010).

4.2. Riziko onemocnění

Humánní trichinelóza byla prokázána v 55 zemích světa (27,8 %) (Chmelíková, 2013). Nejedná se pouze o státy, kde jsou speciální stravovací zvyky, např. konzumace syrových masných výrobků, nijak výjimečné nebo země s nízkou úrovní hygieny a kontroly poražených jatečných zvířat na trichinelu, ale také státy Severní Ameriky i celé Evropy (Gottstein et al. 2009).

Člověk se může nakazit všemi druhy trichinel, ale každý druh je pro člověka různě patogenní. Ovšem vždy je infekce podmíněna pozřením syrového či málo tepelně opracovaného masa obsahujícího larvy trichinel (Bednář et al. 1994).

4.3. Inkubační doba

Inkubační doba je různá – podle síly infekce, druhu trichinely a neméně důležitá je odolnost infikovaného člověka. U akutních případů se příznaky projeví už za týden, v mírnějších formách asi za 14 dní a u velmi mírných infekcí za 3 – 4 týdny s minimálními klinickými projevy. Detekce u subklinické formy je často náhodná (Dupoy – Camet & Murrell, 2007).

4.4. Protilátky a imunita

U lidí i zvířat vzniká po prodělané infekci dlouhodobá imunita a není možná následná superinfekce, dochází k vyloučení novorozených larev stolicí (Jírovec, 1977).

Specifická imunitní reakce organismu člověka při infekci trichinelou vytváří protilátky IgM (imunoglobulin M), následované IgG protilátkami a také IgA jako reakce na samičky trichinel nacházející se ve střevech. Dochází k metabolickému poškození larev a jsou vyloučeny z těla aktivovanými lymfocyty (Stites & Terr, 1994).

4.5. Odolnost trichinel

Jak už bylo rozepsáno v kapitole 3.1.1. je 12 známých druhů genotypů trichinel a každá přežívá v jiných podmínkách, proto je potřeba dobrých znalostí jejich odolností vůči teplu či chladu, aby šíření nákazy bylo eliminováno.

Základní způsob prevence je tepelné ošetření. Teplota 100°C spolehlivě ničí všechny druhy trichinel (Zítek, 2001). Ovšem na likvidaci parazita stačí již teplota 70°C. Moderní způsob ohřívání a tepelné úpravy masa mikrovlnnou troubou pro účely prevence proti trichinelóze nestačí (Celta, 2006).

Nařízení ES číslo 2075/2005 udává jako další z možností likvidace trichinel zmrazením. Zmrazování probíhá ve zmrazovacích místnostech a jsou zde pevně stanoveny kombinace teplot a času, v návaznosti na objem zmrazovaného masa. Teplota se hlídá kalibrovanými termoelektrickými přístroji, kterými je průběžně zaznamenávána. Nikdy nesmí překročit úroveň zvolené deaktivující teploty.

Ošetření masa mrazem ovšem nemusí vždy znamenat kompletní likvidaci parazita. Druhy, jako je *T. nativa*, *T. britovi* a genotyp T-6, jsou značně odolné vůči chladu, proto se na tuto metodu není dobré plně spoléhat.

▪ **Příklady kombinace času a teploty při mražení**

a) maso o průměru nebo tloušťce do 15 cm musí být mraženo jednou z těchto kombinací

- 20 dnů při – 15°C
- 10 dnů při – 23°C
- 6 dnů při – 29°C

b) maso o průměru nebo tloušťce mezi 15 až 50 cm musí být mraženo jednou z těchto kombinací

- 30 dnů při – 15°C
- 20 dnů při – 25°C
- 12 dnů při – 29°C

Tab. č. 2: Tepelné ošetření vepřového masa a doba potřebná k likvidaci trichinely

Minimální teplota v jádře masa (°C)	Minimální čas
49	21 hod
50	9,5 hod
53	2,0 hod
55	30 min
56	15 min
57	6 min
58	3 min
59	2 min
60	1 min
63	okamžitě

Zdroj: http://www.svps.sk/potraviny/info_Trichinely.asp

Většina mikroorganismů se úspěšně likviduje při různých kulinářských úpravách. Ovšem, co se týká trichinel, běžné úpravy jako např. nakládání do láků a

uzení, na likvidaci nemají žádný vliv, takto zpracované maso obsahovalo ještě po 8 dnech živé larvy trichinel. Zato jiného výsledku se dosáhlo při nasolení masa. Bylo sice potřeba použít 20 % nasolení, ale bylo úspěšné (Gottstein et al. 2009). Stejného úspěchu se dosáhlo při ionizačním ozáření.

V roce 2002 tým českých vědců zkoumal možnosti přežívání trichinel *T. spiralis* a *T. britovi* ve fermentovaných masných výrobcích. Používalo se maso experimentálně infikováno larvami, do kterého bylo přidáno standardní množství startovacích bakteriálních kultur. Maso bylo zpracováno jako při běžné výrobě. V průběhu zrání bylo zkrmováno potkany a sledovalo se přežívání larev a schopnost larev způsobit infekci. Vědci došli k příznivému závěru, protože prokázali, že larvy obou druhů testovaných trichinel ztratily životaschopnost mezi 1 – 4 dnem zrání masných výrobků. Proto dodržení technologických postupů při výrobě trvanlivých fermentovaných masných výrobků je z hlediska infekčnosti larvami trichinel bezpečné (Bezpečnost potravin, 2005).

5. LÉČBA A PREVENTIVNÍ OPATŘENÍ

5.1. Klinické příznaky

Klinické příznaky se odvíjejí od průběhu nákazy. Při slabé nákaze (10 – 50 pozřených larev) probíhá infekce takřka bez příznaků a její detekce je pouze náhodná. Ostatní formy nákazy probíhají s typickými příznaky, mnohdy vyžadující hospitalizaci nemocného. Při silné nákaze je přímo ohrožen život pacienta (Bednář et al. 1994).

5.1.1. Umělá invaze trichinel praseti domácímu

U zvěře a prasat domácích klinické příznaky obvykle probíhají velmi klidně, mnohdy bez typických příznaků (Jírovec, 1977).

Experimentálně byly zjišťovány klinické příznaky u prasete při umělé invazi velkým počtem larev. V tomto případě se již projeví příznaky a to nejprve průjmy a zvracení. Později docházelo k svalovým poruchám, které byly pozorovatelné zejména na toporné chůzi, poruchy žvýkání, polykání a tvorbě edému z důvodů osidlování trichinel do svalů. Jako další příznak je uváděna vysoká eozinofilie – trichinely toxicky poškozují organismus produkty lákové výměny a tím dochází k zvyšování eosinofilů (druh bílých krvinek) v krvi hostitele.

Příznaky po 4 – 6 týdnech vymizely, jen prase zakrnělo v růstu.

Pouze v ojedinělých případech velmi těžké infekce docházelo k úhynu z důvodu kachexie a anémie (Jírovec, 1948).

5.1.2. Klinické příznaky u člověka

Prvními příznaky nákazy trichinelózou bývají bolesti hlavy, horečka, zimnice, pocení, dále se přidávají otoky v obličeji, zejména kolem očí, bolesti svalů, nevolnost i závratě (Dupoy – Camet & Murrell, 2007). Při nákaze 10 – 50 larvami dochází ke skryté reakci, 50 – 500 larev způsobí střední až vážné zdravotní komplikace a infekce

1 000 a více larvami může mít za následek těžké stavy až smrt napadeného (Koudela, 2009).

- **Fáze střevní**

Je způsobena larvami, které se zavrtávají do střevní sliznice postiženého. Objevuje se již 1 den po infekci a trvá přibližně 8 dní (Jírovec, 1948). Příznaky nejsou příliš specifické. Jedná se o vodnaté průjmy, bolesti břicha, často hlen s krví. Stejně jako u prasete i u člověka jsou v krvi zvýšené hodnoty eosinofilů. Při velmi silné invazi se mohou přidat komplikace, které ohrožují pacienta na životě (Jírovec, 1948).

- **Fáze svalová**

Druhou fází, která nastupuje zpravidla po 8 – 14 dnech, provází opět horečka, dále pak tachykardie, deliria, myositis se silnými bolestmi svalů, zejména na dotek. K těmto příznakům dochází kvůli toxickým produktům látkové výměny trichinel. Při silnějším napadení dochází ke ztížení až neschopnosti hýbat s postiženými svaly. Postižený nemůže například hýbat jazykem, okem, hůře se mu mluví a těžce dýchá. Objevují se edémy v obličeji. U 25 % případů jsou u pacientů viditelné drobné krváceniny na končetinách, petechiální krváceniny pod nehty i na spojivce (Jírovec, 1977).

Z orgánů je postižena slezina, která je zvětšená, stejně tak mizní uzliny a velmi snížené je močení. Laboratorně je zjištěna zvýšená aktivita transaminas GOT (glutamát – oxaloctová transamináza) a GPT (glutamát-pyrohroznová transamináza), zejména aldolas. Dále je vyšší aktivita kreatinkinázy (CK), sérového myoglobinu a laktátdehydrogenázy (LD). Často se přidružuje hypoproteinémie, leukocytóza a zvýšená sedimentace. Okolo 20 dne od infekce je nejsilnější eosinofilie. (Formánková, 2012). Tvoří se hydrostatické edémy z důvodu snížení koloidně – osmotického tlaku v plazmě a oběhových poruch.

Při silné invazi mohou nastat komplikace jako např. selhávání srdce v důsledku myokarditidy (až v 50 %), pneumonie, tromboembolie, encephalitida nebo poruchy vidění z důvodu poškození oční mikrocirkulace (Bednář et al. 1994). Až v 60 % se přidávají revmatoidní bolesti ve svalech. Od 6. týdne po infekci bývá pacient kachektický, dehydratovaný, přidružují se poruchy centrálního a periferního nervstva a

plicní komplikace. Postižený cítí chronický únavový syndrom. I tato fáze může končit smrtí (Klimeš, 1985). Těhotné ženy mohou v důsledku infekce předčasně porodit nebo potratit (Dupoy-Camet & Murrell, 2007). Mortalita trichinelózy je až 40 % (ŠVPS SR, 2010).

V pokynech pro sledování, prevenci a kontrolu trichinelózy, které vydaly v roce 2007 společně FAO, WHO a OUE jsou shrnuta pozorování počtu larev vyvolávající onemocnění u lidí. V roce 1954 německý parazitolog Piekarsky uvedl, že k rozvinutí klinických příznaků stačí 70 larev, naproti tomu v roce 1983 americký parazitolog ve své práci popsál, že ke klinickému onemocnění je potřeba 150 larev. V současnosti se počet ustálil na počtu 100 až 200 larev, ale je vždy důležité podotknout, kterého genotypu trichinel se to týká. Nejinfekčnější je pro člověka *T. spiralis*. Smrtelné je pozření 1 500 larev (Koudela, 2015).

5.2. Diagnostika

V první fázi diagnostiky je potřeba zjistit anamnézu pacienta (zdroj infekce, množství požitého infikovaného masa, počet larev přítomných v infikovaném masu a počet případů v epidemii) a prošetření klinických příznaků (uznání známek a akutních příznaků trichinelózy a definice formy onemocnění, která ovlivňuje volbu léčby). Diagnostika samotná probíhá vyšetřením krve nebo pro zrychlení a upřesnění výsledků, biopsií svalů (Bednář et al. 1994).

5.2.1. Diagnostika z krve

V první fázi onemocnění je diagnostika velmi náročná, jak už bylo uvedeno výše, klinické příznaky jsou velmi nespecifické a také není možná detekce specifických protilátek, které se provádí sérologickými testy, jako např. ELISA nebo imunofluorescence (Bednář et al. 1944). Tato diagnostika se provádí nejdříve za 3 týdny po nákaze a až v 80 – 90 % vykazuje u nakažených osob pozitivitu (Garcia et al. 2013). Před 3. týdnem po infekci je průkazná pouze vysoká eosinofilie a podezření, že podobnými příznaky trpí více osob se stejným druhem nákazy (Jírovec, 1948).

5.2.2. Diagnostika z biopsie

Pro zjištění trichinel ve svalu biopsií se používají dvě metody. První, tzv. „kompresní metoda“, se používá pouze v případě silnějšího nakažení, poněvadž na 1g svaloviny musí být přítomny nejméně 3 – 4 larvy trichinel. Biopsie se provádí na svalovině stehenní, ramenní nebo lýtky. Vzorek se roztlačí mezi podložní sklíčka a mikroskopuje se zvětšením 20-50x.

Druhým způsobem je metoda tzv. „trávicí“, která se používá při slabší invazi a je tedy možné, že kompresní metodou by se larvy trichinel nenašly. Při této metodě se laboratorně navodí situace v trávicím traktu a díky kyselému prostředí a žaludečnímu enzymu pepsinu se larvy začínají uvolňovat (Jírovec, 1948).

5.3. Terapie

Pokud je trichinelóza zjištěna u pacienta v první fázi, tj. fázi střešní, je léčba poměrně jednoduchá a má velkou šanci na úspěch léčby. Jako první pomoc se uvádí výplach žaludku a podání projímadla. Poté se nasazují anthelmintika, která se podávají několik dní až týdnů. Účinná látka je mebendazol (v ČR znám v přípravku Vermox, podle držitele registrace léčiv farmaceutické společnosti Janssen – Cilag s.r.o., Praha, z roku 2007) po dobu 14 dní, nebo albendazol (dříve Zentel, podle držitele registrace léčiv farmaceutické společnosti Laboratoire GlaxoSmithKline, Marly – le-Roi Cedex, Francie, z roku 2010) (Bednář et al. 1994; Janáček, 2014).

Léčba ve fázi svalové je poměrně náročnější. Léčba je více symptomatická, ale anthelmintika se podávají stále, aby se později zabránilo případné opožděné expanzi dospělých larev ve střevě (Garcia et al. 2013). Také např. účinná látka thiabendazol (Mintezol, podle držitele registrace léčiv farmaceutické společnosti MSD, Německo, z roku 2010) (Bednář et al. 1994; Janáček, 2014) dokáže zahubit až 50 % svalových trichinel. Pacient je od začátku léčby pod neustálým dohledem lékařů v nemocnici a není výjimkou, že je nutno ho převézt na jednotku intenzivní péče z důvodu vážných komplikací (Stejskal, 2005).

Podávání vysokých dávek anthelmintik má i vedlejší účinky, které se projevují na každém pacientu individuálně. Nejčastějšími vedlejšími účinky je postižení jater a

kostní dřeně. Proto je nezbytně nutné, aby pacient byl v průběhu léčby monitorován krevními testy (Garcia et al. 2013). Také pro těhotné ženy a malé děti do 2 let je léčba anthelmintiky velmi riziková a jejich použití je silně omezeno jen na nezbytně nutnou dobu (Dupoy – Camet & Murrell, 2007).

Současně s anthelmintiky se padávají vysoké dávky kortikosteroidů (Prednison, podle držitele registrace léčiv farmaceutické společnosti Zentiva, středisko Praha, ČR, z roku 2009), potlačující zánětlivou (eozinofilní) reakci organismu na larvy (Bednář et al. 1994; Janáček, 2014). Podle symptomů se dále mohou nasadit analgetika, antipyretika, infúze a imunosupresiva proti šoku (Garcia et al. 2013).

5.4. Prevence

Jak již bylo popsáno v několika kapitolách výše, nejdůležitější prevencí před humánní trichinelózou je kontrola masa určeného k lidské spotřebě. Také je potřeba regulovat šíření mezi divokými zvířaty, např. nenechávat vnitřnosti a zbytky zvěře (možné nakažené trichinelózou) na místě jeho skolení.

První vyšetřovací metodou byla komprese neboli roztlačení kousků svaloviny mezi skla a pozorování mikroskopem při středním zvětšení (navržená parazitologem Virchowem roku 1864). Později se začalo používat tzv. kompresorium, skládá se ze dvou skel rozdělených na 28 polí. V současné době se od této metody upouští z důvodu pracnosti a potřeby silné infekce.

V 70. letech minulého století byla vyvinuta trávicí metoda, která se různě modifikuje a modernizuje a její použití je stále aktuální (Formánková, 2002).

6. VYUŽITÍ JEDNOTLIVÝCH ZNÁMÝCH A DOSTUPNÝCH METOD DETEKCE VE VZÁJEMNÝCH SOUVISLOSTECH

Jak již bylo mnohokrát uvedeno, trichinelóza je velmi závažné onemocnění, které může končit i smrtí nakaženého jedince, proto je nezbytná diagnostika jak v humánní, tak ve veterinární praxi.

Vyšetření masa má mnoholetou tradici. Povinné vyšetření masa určeného k lidské spotřebě bylo nařízeno na konci 19. století v Německu po objevení vývojového cyklu trichinel.

V kapitole 3.3. jsou uvedeny možnosti vyšetření masa, které jsou povinné ze zákona. Vzhledem k ceně je ovšem potřeba stále vyvíjet nové alternativní metody diagnostiky, které budou méně metodicky náročné a také lépe finančně dostupné. V současné době by se zde mohly řadit některé diagnostické metody, např. ELISA test nebo imunoblot). Není je ovšem možno využít v oblastech s vysokým rizikem trichinelózy.

Detekce trichinel se dělí na přímé a nepřímé metody.

6.1. Detekce a identifikace parazita – přímé metody

Přímé detekce larev trichinel ve svalové tkáni se provádějí nejčastěji postmortálně. Jedná se o trichinoskopii a trávicí metodu. Jsou také běžnou součástí kontroly na jatkách. Identifikace trichinel se také může použít intravitálně, při diagnostice humánní trichinelózy (Nockler et al. 2000).

6.1.1. Trichinoskopie (kompresní metoda)

Jedná se o základní vyšetřovací metodu, která je sice finančně velmi nenáročná, ale zastaralá, pracná a časově náročná. Také citlivost na přítomnost trichinel je nižší než u metody trávicí. (Gamble et al. 2000). Infekci lze zachytit až při počtu tří larev na gram svaloviny. Najednou je možno vyšetřit jen malý počet vzorků, proto se tato metoda

používá převážně pro vyšetření svaloviny volně žijících zvířat, jejichž těla jsou určena k lidské spotřebě (www.cit.vfu.cz).

▪ **Princip kompresní metody**

Kompresorium je složeno ze dvou skleněných desek rozdělených na 28 polí, které lze sešroubovat k sobě. Právě sešroubováním (stlačením) skel dojde ke kompresi vzorků a pod mikroskopem se hledají opouzdřené larvy trichinel. Druhy *T. pseudospiralis*, *T. papuae* a *T. zimbabwensis* se těžko diagnostikují kompresní metodou, právě pro chybějící pouzdra (Gamble et al. 2000).

▪ **Vzorky svaloviny**

U prasat divokých se odebírají vzorky z šesti míst ve velikosti cca 1 g.

Základní odběrová místa jsou:

- oba brániční pilíře
- svalovina čelisti
- svalovina dolní kýty
- mezižeberní svalovina
- jazyk

Pokud nejsou k dispozici základní odběrové svaly, odeberou se čtyři vzorky z dostupných míst (www.cit.vfu.cz).

Obr. č.6 : Kompresorium

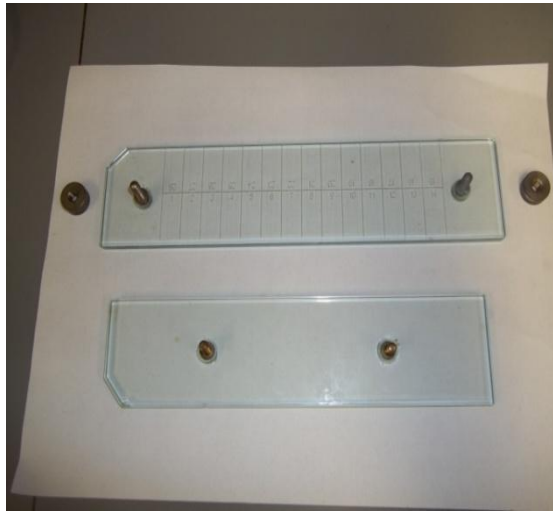


Foto pořízeno na SVÚ v Brně (Janáček, 2016, upraveno).

6.1.2. Referenční metoda (trávicí metoda)

Metoda, která je používána jako diagnostická metoda v souladu s právními předpisy Evropské unie (Nařízení komise ES č. 2075/2005). Ve srovnání s trichinoskopií je trávicí metoda citlivější, přibližně 3 larvy na 1 g tkáně. Také je rychlejší, méně pracná a spolehlivější. Je ovšem mnohem dražší (Koudela et al. 2011).

▪ **Princip metody**

V laboratorních podmínkách se navodí vnitřní prostředí žaludku a pomocí trávicích šťáv obsahujících pepsin a kyselinu chlorovodíkovou dochází k uvolnění larev. Po následné sedimentaci lze živé, pohybující se trichinely, pozorovat při 15 – 20 násobném zvětšení (www.cit.vfu.cz).

▪ **Vzorky svaloviny**

Vzorky se odebírají u jatečně upraveného těla po prohlídce post mortem. Vyšetřovaná skupina vzorků má 100 g, přičemž se vzorky odebírají jednotlivě z každého vyšetřovaného kusu.

Vzorky se liší podle druhu a stáří zvířat (dle online cit.vfu.cz):

- domácí prasata výkrmová (žírná) – 1 g odebraný z bráničního pilíře u přechodu do šlachovité části
- chovná prasata a kanci – 2 g z bráničního pilíře u přechodu do šlachovité části

Může se stát, že brániční pilíře chybí. V tom případě se odebírá vzorek z žeberní části bránice u hrudní kosti, žvýkacího svalu, svalu jazyka nebo břišních svalů v dvojnásobném množství (2 g u výkrmových prasat a 4 g u chovných prasnic či kanců). U zmrazeného vepřového masa a porcovaného masa se odebírá z příčně pruhované svaloviny minimálně 5 g.

- kůň – nejméně 10 g ze svalu jazyka nebo žvýkacího svalu

Pokud tato svalovina chybí, odebere se celý brániční pilíř u přechodu do šlachovité části

- prasata divoká – nejméně 10 g z obou bráničních pilířů, případně nohy a jazyka

Těla jatečných zvířat (prase, kůň) se po odebrání vzorků mohou označit značkou zdravotní nezávadnosti a umístit do chladiřen. Ovšem až po potvrzení negativity mohou opustit potravinářský podnik. Těla je možno bourat až na 6 částí, ale přitom je také potřeba splnit podmínku, že žádná část nesmí opustit jatka. Podobně ostatní části těla jatečného zvířete, které obsahují příčně pruhovanou svalovinu a jsou určeny k lidské nebo zvířecí spotřebě. Naopak, živočišný odpad a další již vyšetřené živočišné produkty, neurčené k lidské spotřebě a neobsahující příčně pruhovanou svalovinu, je možno z prostor odvézt ještě dřív, než jsou k dispozici výsledky vyšetření (www.cit.vfu.cz).

▪ **Stanovení**

Před samotným vyšetřením se vzorky vyšetřované svaloviny musí zbavit veškeré pojivové a tukové tkáně, protože takové vzorky nelze trávit. Všechny vzorky se ještě musí rozemlít na 2 – 4 mm části.

Podle www.cit.vfu.cz probíhá trávicí metoda takto:

- **trávicí tekutina**

Množství trávicí tekutiny je závislé na množství testované tkáně. Při vyšetření 100 g jsou potřeba 2 litry tekutiny. Trávicí tekutina se skládá z 2 litrů vody o teplotě 46 – 48 °C, 16 ml 25 % HCL a 10 g pepsinu.

- **trávení vzorku**

Nasekané, pomleté vzorky se postupně smíchají s trávicí tekutinou, ale pepsin se přidá až po homogenizaci vody s HCL a svaloviny. Do kádinky se přidá magnetická míchačka a při teplotě okolo 47 °C a neustálého míchání se tráví 30 minut. Je potřeba aby tekutina tvořila hlubový vír. Toho se dosáhne rychlostí otáček a překrytím kádinky aluminiovou fólií. Doba trávení se může prodloužit maximálně na 60 minut a ukončí se ve chvíli, kdy je vzorek plně natráven.

- **sedimentace vzorku**

Natrávený vzorek se přelije přes síto s oky o velikosti 180 µm do sedimentační baňky. Nechá se 30 minut odstát a tím se uvolněné larvy sedimentují na dno sedimentační baňky. Poté se rychle odpustí 40 ml do malého odměrného válce a nechá se znovu stát 10 minut.

- **vyšetření sedimentu**

Odlije nebo odpipetuje se horních 30 ml a zbylých 10 ml se přelije na Petriho misku nebo jinou vhodnou nádobu a vyšetřuje se pod mikroskopem při zvětšení 15 – 20x, stereomikroskopem nebo trichinoskopem.

Pozn. Obrázková příloha viz v kapitole 11. Příloha.

- **Pozitivní nález**

Sediment se v případě podezření vyšetřuje při 40x zvětšení. Pozitivita znamená nález živých i mrtvých larev. Živé se spirálovitě pohybují, mrtvé jsou ve tvaru písmene C. Larvy pro pozdější identifikaci druhu lze uchovat v 70 – 75 % etanolu, pro dlouhodobou v 95 % etanolu.

Maso pozitivní na trichinelózu je vyloučeno z lidské spotřeby. Aby se zjistilo, které zvíře bylo nakažené, musí se ze zbytků vzorků opakovat vyšetření, ovšem váha vzorku se zvýší na 20 g od kusu. Vyšetřují se postupně všechny vzorky, dokud se neodhalí pozitivní kus/kusy. V případě koní a prasat je vzorek 50 g.

6.1.3. Alternativa trávící metody

Výše popisovaná trávící metoda je prováděna za použití magnetické míchačky. Její alternativy jsou popsány v Nařízení ES číslo 2075/2005.

- **trávící metoda pomocí mechanického zařízení a sedimentační techniky**

Odběr vzorků a rozemletí je stejné jako u předchozí metody. Používají se ovšem laboratorní míchačky zn. Stomacher 3 500 s dvojitým plastovým vakem při teplotě 40 – 41 °C. 1,5 litru vody o této teplotě se nalije do vnitřního vaku a přidá se 25 ml 17,5 % HCL. Vloží se svalovina a po homogenizaci se přidá 6 g pepsinu. Po 25 minutách se z míchačky vyjme vak a trávící tekutina se přelije přes sítko. Vak je potřeba vypláchnout asi 100 ml vody, která se přidá k filtrátu. K tekutině se přidá led do objemu 2 l a postupně, při neustálém míchání se rozpustí. Poté 30 minut sedimentuje v nálevce s vibrátorem. Po sedimentaci se odpustí 60 ml vzorku do odměrného válce a opět se nechá sedimentovat. Odsaje se vrchních 45 ml a zbývajících 15 ml se vyšetřuje v Petriho miskách pod trichinoskopem nebo stereomikroskopem. Opět je potřeba vypláchnout odměrný válec 5 –10 ml vody a přidat k sedimentu na vyšetření.

- **trávící metoda pomocí magnetické míchačky (izolace na filtru) a zjišťování larev latexovým aglutinačním testem**

Odběr vzorků a až třiceti minutové trávení v sedimentační míchačce je stejné jako u trávící metody s použitím magnetické míchačky. Dále se sestaví vývěva – nylonový filtr se umístí do podstavce na filtry, ocelová filtrační nálevka se k podstavci připevní držákem a ocelové sítko se umístí na nálevku. Vývěva se spojí s filtračním podstavcem a s kovovou nebo plastovou nádrží pro zachycení trávící tekutiny. Ta se přefiltruje do filtrační nálevky a pomocí 250 ml teplé vody se vypláchne kádinka a výplach se přidá k filtrátu. Filtrační membrána se přehne minimálně čtyřikrát a vloží se

do kuželovité kyvety, která musí odpovídat paličce. Roztok k ředění vzorků se přidá do kuželovité nálevky a filtrační membrána se paličkou zhomogenizuje. Každý vzorek se pomocí pipety nanese do různých políček aglutinačního testu. Do každého políčka se také přidají latexové kuličky. Karta se položí na 3D třepačku, a po 10 minutách na rovný povrch kde se odečítají výsledky. Pozitivní je shluk kuliček.

6.1.4. Metoda polymerázové řetězové reakce PCR

PCR – Polymerase Chain Reaction, je biochemická reakce, která využívá enzym DNA – polymerázu, ke kopírování DNA. Tato metoda je využívána pro druhovou identifikaci a určení genotypu v referenčních laboratořích, protože detekuje přítomnost specifické DNA. Ačkoli je citlivost vysoká, nehodí se pro rutinní používání u potravinových zvířat (www.cit.vfu.vz).

- **PCR testy**

PCR je metoda molekulární biologie používaná k množení (amplifikace) specifického úseku DNA in vitro. Kopie úseku DNA jsou syntetizovány podle templátu (jednořetězová DNA) pomocí enzymu DNA-polymerázy na principu komplementarity bází. Dvouřetězová DNA denaturuje pomocí vysoké teploty a získaná jednořetězová vlákna jsou využita jako templát. Druhou fází je napojení tzn. primerů (chemicky syntetizované krátké oligonukleotidy) na komplementární úseky řetězců DNA. Pomocí primerů se vymezí úsek DNA, který bude amplifikován.

- **Používané PCR testy**

- **RAPD – PCR**

Při této metodě dochází k náhodné amplifikaci polymorfních úseků DNA – RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Mezi pozitiva této PCR metody patří rychlost, jednoduchost a citlivost, ovšem kvůli nestálé kvalitě analyzovaného vzorku DNA je špatná reprodukovatelnost (Oivanen, 2005).

Metoda byla použita r. 1999 (autor práce C.M.O. Kapel) u 24 lišek polárních (*Alopex lagopus*) infikovaných larvou *T. nativa*. Všechny lišky byly potvrzeny jako pozitivní (Chmelíková, 2013).

- **Multiplexní real – time PCR**

Při této metodě se používají fluorescenční barviva nebo fluorescenční sondy již v průběhu polymerázové řetězové reakce (u klasické PCR se detekuje až finální produkt). Při Real – time je potřeba tzv. Cykler – přístroj, umožňující teplotní cyklování i detekci fluorescence odpovídajícímu množství syntetizovaného amplikonu v každém cyklu PCR. Výhoda je krátký čas vyhodnocení, nízké finanční náklady, kvantifikace a vysoká citlivost (až 0,1 larev na 1 g.). Tato metoda má vysokou pravděpodobnost, že bude patřit mezi rutinní detekci larev trichinel u jatečných druhů zvířat (Klein, 2002).

Metoda byla použita např. roku 2009 (autor práce H. Atterby et al.). Vzorky byly ze svalové tkáně lišek, přičemž testy ukázaly, že potencionální limit detekce je 0,01 larev na 1 g (Chmelíková, 2013).

- **Jednovláknový konformační polymorfismus (SSCP)**

Tato metoda je úspěšně používána k odlišení všech genotypů u trichinel. Funguje na principu různé velikosti jednovláknových nukleotidových sekvencí DNA, které se liší svou konformací (sekundární strukturou) v nenedaturujícím polyakrylamidovém gelu při nízké teplotě (Chmelíková, 2013).

- **RFLP – PCR metoda**

Podstatou této metody je enzymatické štěpení molekul DNA ve specifickém štěpném (restrikčním) místě enzymem, který se nazývá restriční endonukleáza (Bartáková, 2011).

Zarlenga a Murrell (1989) touto metodou studovali ribozomální DNA a snažili se díky ní rozlišit jednotlivé genotypy (Chmelíková, 2013).

6.2. Detekce specifických protilátek – nepřímé metody

Těmito metodami se neprokazuje přímý průkaz parazita (či jeho DNA), ale přítomnost specifických protilátek. Jsou to metody serologické, mezi které patří např. imunofluorescence, western blot, imunoelktrotransfer blot, imunohistochemické reakce a metoda ELISA (Koudela et al. 2001).

6.2.1. Imunofluorescence

Princip imunofluorescence je navázání fluorochromů na monoklonální nebo polyklonální protilátky nebo antigen, které se následně vážou ke stanovené substanci. Fluorochromy jsou nízkomolekulární chemické substance, schopné absorbovat světlo o vlnové délce v UV oblasti světelného spektra. Pokud dojde k reakci mezi antigenem a specifickou protilátkou, je možno sledovat fluorescenčním mikroskopem nebo fluorometrem emisní záření. Nejčastěji se používá fluorochrom FITC (Fluorescein IsoThioCyanát) (Litzman et al. 2007).

V roce 1968 použil metodu imunofluorescence W. R. Gore. Testoval lidi s prokázanou nákazou trichinelózy a 26 z 28 vzorků bylo pozitivních. Také se dělaly pokusy na myších, potkanech a králících experimentálně infikovaných larvami trichinel a dokázalo se, že protilátky mohou být detekovány již za 2 týdny po očkování (Chmelíková, 2013).

Podle Litzmana (2007), existují dva typy imunofluorescence.

Přímá – kde reaguje specifická protilátka značená fluorochromem přímo s antigenem. K diagnostice trichinelózy se nepoužívá.

Nepřímá – ve vyšetřovaném vzorku se zjišťuje přítomnost protilátek. Vzorek se přidá k vhodným antigenním substrátům a v případě pozitivní reakce dochází ke vzniku imunokomplexu (antigen – protilátka). Projeví se fluorescencí antigenních struktur.

6.2.2. Western blot

Metoda, při které se využívá kvantitativní zhodnocení reakce specifických protilátek se spektrem elektroforeticky frakcionovaných antigenů proteinové povahy. WB je zcela specifický a také velmi přesný. Bylo by možné ho používat jako primární diagnostický test, ovšem jeho velkou nevýhodou je časová náročnost a z hlediska financí je mnohem dražší než např. ELISA test (Dupouy – Camet & Murrell, 2007).

Tuto metodu zkoumalo mnoho odborníků, např. Parazitolog H. Yera roku 2003 odebíral séra pacientům infikovaných *T. spiralis*.

- **Postup WB**

- **elektroforéza**

Před vlastním blotem je potřeba proteiny rozdělit elektroforeticky na základě molekulové hmotnosti v polyakrylamidovém gelu.

- **blotování**

Práce se samotným gelem je náročná, proto se proteiny přenáší na membránu, nejčastěji vyrobenou z nitrocelulózy nebo z PVDF (polyvinylidenfluoridu). Blotátor je přístroj realizovaný jako soustava anoda (spodní díl) a katoda (horní díl). Na anodu se položí papír namočený do pufru, na papír membrána, gel a poté zase papír.

- **reakce proteinů s protilátkou**

Musí se zamezit nespecifickému navázání protilátky na membránu. To se dosáhne přidáním např. bílkovinami z kravského mléka nebo hovězím sérovým albuminem. Poté se přidá primární protilátka – protilátka proti proteinu. Po promytí se přidá sekundární protilátka – protilátka proti primární protilátce. Tato protilátka je specificky značena (nejčastěji křenovou peroxidásou).

- **vizualizace**

V místě reakce membrány a roztoku, který obsahuje substrát pro peroxidázu dochází ke změně barvy – v místě reakce je tmavší zbarvení (Litzman et al. 2007).

6.2.3. ELISA test

Patří to řady imunochemických metod, která je v dnešní době nejvíce využívaná a komerčně vyráběná. Vzorkem pro vyšetření je krevní sérum nebo meat juice (masová šťáva).

Test ELISA je heterogenní variantou EIA, což znamená, že k reakci vyžaduje oddělení značeného reaktantu vázaného v imunokomplexu od volného (na rozdíl od homogenní EIA), kde toto oddělení není provedeno (Paulík, 2005).

Podle Crowthera, (2000) se dělí nepřímé testy ELISA na kompetitivní a nekompetitivní.

- **nekompetitivní ELISA** (známá pod názvem sendvičová)

Na dno jamky mikrotitrační destičky jsou zachycovány antigeny, které zároveň reagují s testovanou primární protilátkou. Vzorek je inkubován tak, aby se co nejvíc antigenu navázalo na protilátku, a poté je promývacím pufrem odstraněn přebytečný antigen. Přidá se specifická sekundární protilátka značená enzymem (alkalická fosfatasa). Opět probíhá inkubace a promytí a následuje přidání vhodného substrátu, díky kterému dochází k přeměně bezbarvého substrátu na barevný produkt.

- **kompetitivní ELISA**

Specifické protilátky jsou vázány na pevný podklad. Po krátké inkubaci je oddělen volný komplex od komplexu vázaného. Je přidán standard, který se skládá z antigenu s vázaným enzymem a antigenem ze vzorku, které se kompletují o vazbu na specifické protilátky. Po promytí a přidání substrátu dochází k barevné změně. Výsledek je opačný než u sendvičového testu.

- **Použití**

ELISA test je jako jediná imunologická metoda standardizovaná. Je to výborný nástroj na epizootologické sledování skupin zvířat vnímavých na trichinelózu pomocí testování přítomnosti specifických protilátek. Není vhodná na individuální vyšetřování zvířat určených k lidské spotřebě. Její největší nevýhodou je skutečnost, že u potravinových zvířat se dají detekovat protilátky až za 3 – 5 týdnů od nakažení. To znamená, že i pozitivní jedinci jsou metodou označeni jako negativní (www.cit.vfu.cz).

Roku 1987 tuto metodu studovali H. J. Smith a K. E. Snowdon na ponících infikovaných *T. spiralis*. Tento experiment dokázal, že test nelze použít pro vyšetření zvířat určených k lidské spotřebě, protože u poníků, kteří byli infikováni 1 000 larvami trichinel, byl výsledek negativní. Pozitivní byl pouze v případech poníků nakaženými 5 000 a 25 000 larvami trichinel (Chmelíková, 2013).

6.2.4. Radioimunoanalýza (RIA)

U této metody probíhá detekce cestou reakce „antigen – protilátka“, pomocí radioaktivního izotopu. RIA testy mohou být ve fázi kapalné i fázi pevné, která probíhá nejčastěji na stěně zkumavky. Fáze pevná je postupem podobná testu ELISA, ovšem barevná změna je způsobena použitím radioizotopu (Litzman et al. 2007).

Roku 1983 bylo testováno 18 pacientů s akutní formou trichinelózy a 35 s ostatními parazitárními infekcemi. Metodou RIA bylo detekováno 94 % pacientů (Chmelíková, 2013).

6.2.5. Další imunologické metody

- **imunohistochemické reakce**

Metody, při kterých se detekují specifické antigenní determinanty (molekuly či jejich částice) s využitím imunologické vazby – vazba antigenu a protilátky.

- **imunoelektroforéza**

Metoda je založena na rozdílné pohyblivosti proteinů v elektrickém poli a následně specifické imunochemické reakci mezi antigenem a protilátkou (Chmelíková, 2013).

- **precipitační reakce**

Jedná se o sérologickou metodu, při které reaguje solubilní antigen (látka, kterou imunitní systém rozpozná a reaguje na ni) a specifické protilátky a tím dochází k zákalu, který je možné vyhodnotit nefelometrem a při silnější reakci ke zrakem viditelné sraženině (Toman, 2000).

Dle Nechvátalové (2002), jsou precipitační reakce dvojího druhu:

- a) **Precipitace v roztoku** – k měření intenzity zákalu se používá turbidimetrie (měří množství procházejícího světla) a nefelometrie (měří množství rozptýleného světla). Precipitát vzniká ve zkumavkách, kde se udržuje konstantní množství protilátek za současného přidávání antigenu. Lze stanovit také kvantitu odpočtem proteinů ve vzorku z kalibrační křivky.

b) **Precipitace v gelu** – je založena na pasivní difuzi látek v prostředí koncentračního gradientu. Jsou používány agarové či agarázové půdy nejčastěji v Petriho miskách. V místě styku protilátky a antigenu vzniká precipitát.

- a. Jednoduchá radiální imunodifúze – protilátka se rozpustí v gelu přidáním antigenu. Výsledkem jsou ostře ohraničené kroužky precipitátu.
- b. Dvojitá radiální imunodifúze (dle Ouchterlonyho) - při testování více vzorků. Dochází k protisměrné difúzi antigenu i protilátky v gelu při tvorbě precipitačních linií.

Precipitaci v roce 1928 zkoušel použít pro detekci trichinel L. F. Bachman. Tato metoda je sice velmi jednoduchá, ale není spolehlivá. Mnoho léků snižuje její reakci (Chmelíková, 2013).

- **aglutinace**

Metoda, při které opět dochází k reakci mezi protilátkou a antigenem, který je v tomto případě tvořen z celých těl mikroorganismů nebo jejich částí. Výsledkem je okem viditelná sraženina. (Nechvátalová, 2002).

- a) Aglutinace přímá – antigeny jsou přirozenou součástí struktur reagujících částic
- b) Aglutinace nepřímá – antigen se na povrch částic navazuje uměle.

- **např. Latex – fixační test**

Jedná se o pasivní hemaglutinaci, která se provádí na mikrotitračních destičkách. Jako nosič rozpustného antigenu se využívá latexových částic. Dochází k reakci specifických protilátek za vzniku shlukování latexových částic s navázaným antigenem (Toman, 2000).

Tento test byl v roce 1989 prováděn vědci pod vedením S. T. Haralabidise, kteří testovali poražená prasata infikovaná *T. spiralis* 95 dnů po infekci. Výsledky byly skoro okamžitě (do 3 minut) a pozitivní reakce byla i u prasat s infekční dávkou 10 larev (Chmelíková, 2013).

6.2.6. Sekvenování DNA

Sekvenace DNA je souhrnný název pro biochemické metody, použitelné k analýze biologických materiálů. Sekvenování se používá k určení pořadí jednotlivých nukleotidů v řetězci DNA. Analýzou nalezené sekvence je možné získat genetické informace např. o infekčních chorobách. Existují dvě základní sekvenční metody, a to Sangerova a Maxam – Gilberova, od kterých už se postupně opouští a vyvíjejí se nové, rychlejší a jednodušší metody. V současné době se používá tzv. další (druhá) generace sekvenování (Next Generation Sequencing) (Kývalová, 2011).

Tuto metodu např. v roce 2006 využil Zarlenga a kolektiv při zkoumání fylogenetických vztahů všech druhů trichinel, kromě *T. patagoniensis*, poněvadž je to jeden z nejnověji objevených genotypů. Na rozdíl od jiných prací, které se zabývaly touto metodou, byly sekvenovány části jader, mitochondriální DNA a DNA pro cytozom. Výsledky posloužily k modelaci evolučních znaků a migrace genotypů trichinel v rámci stěhování druhů zvířat mezi Euroasií a Afrikou (Pozio, 2013).

7. VYHODNOCENÍ ÚSPĚŠNOSTI JEDNOTLIVÝCH DETEKČNÍCH METOD V NÁVAZNOSTI NA EKONOMICKÉ ASPEKTY A SOUČASNOU LEGISLATIVU VE VZÁJEMNÝCH SOUVISLOSTECH

V kapitole 6 (Využití jednotlivých známých a dostupných metod detekce ve vzájemných souvislostech) byly jednotlivě popsány použitelné metody detekce trichinel a u většiny přidány příklady využití a úspěšnosti.

Tab. č. 3: Shrnutí jednotlivých metod detekce

Met.	Název	Využití
Přímé	Trichineloskopie (kompresní metoda)	Pro účely myslivosti (v domácích podmínkách)
	Trávicí metoda (a její alternativy dle nařízení č.2075/2005)	Diagnostika trichinel dle nařízení č. 2075/2005
	PCR testy	Určení genotypu v referenčních laboratořích
Nepřímé	Imunofluorescence	Detekce protilátek – experimentálně
	Western blot	Kvantitativní metoda detekce protilátek
	ELISA test	Epizootologické sledování zvířat vnímavých na trichinelózu
	Radioimunoanalýza a další imunologické metody	Detekce protilátek – experimentálně
	Preciptace	Detekce protilátek – experimentálně
	Aglutinace	Detekce protilátek – experimentálně
	Sekvenování DNA	Získání genetické informace – experimentálně

Mezi metody běžně využitelné v oblasti detekce trichinel patří trichineloskopie, trávicí metoda a ELISA testy. Ostatní jsou pro svou náročnost, vysokou cenu či nepřesnost používány pouze experimentálně. Pro odlišení genotypu se v EURLP v Římě používá metoda multiplex PCR. Do reakční směsi se přidá násobné množství primerů a tím se docílí analyzování více parametru v průběhu jednoho reakčního procesu.

Tab. č. 4: Srovnání nejznámějších metod detekce trichinel v závislosti na finanční a časové zatížení a citlivost jednotlivých metod

Metoda detekce	Finanční nákladnost	Časová nákladnost	Citlivost metody
Trichinoskopie (kompresní metoda)	nenáročná	pracná	málo citlivá
Trávicí metoda (a její alternativy dle nařízení č.2075/2005)	vyšší než kompresní metoda	méně pracná	citlivější (3 larvy na 1 g svaloviny)
RAPD-PCR	nenáročná	rychlá metoda	citlivá, ale nespolehlivá
Multiplexní real – time PCR	nenáročná	rychlá metoda	vysoká citlivost (0,1 larev na 1 g svaloviny)
Jednovláknový konformační polymorfismus	nenáročná	rychlá metoda	vysoká citlivost
RFLP – PCR	nenáročná	rychlá metoda	citlivá
Imunofluorescence	náročnější	protilátky mohou být detekovány již za 2 týdny od nakažení	citlivá na detekci protilátek
Western blot	velmi drahá	náročná	velmi citlivý a přesný
ELISA test	nenáročná	náročná (protilátky jsou detekovány až za 3 – 5 týdnů od infekce)	citlivá na detekci protilátek
Radioimunoanalýza a další imunologické metody	náročnější	náročná	citlivá na detekci protilátek
Precipitace	nenáročná	jednoduché provedení	citlivá, ale reakci ovlivňuje řada léků
Aglutinace	nenáročná	jednoduché provedení a výsledky do hodiny	citlivá na detekci protilátek
Sekvenování DNA	náročnější	nenáročné	sekvenace DNA

Mezi prvními detekčními metodami byla zavedena kompresní metoda. Nyní se od ní již upouští z důvodu náročnosti provedení a možné nepřesnosti.

Trávicí metoda je referenční metodou zapsanou v Nařízení ES číslo 2075/2005. Její metodika je stále dobře využitelná. Je zde ovšem snaha vyvinout nové, jednodušší, levnější a efektivnější metody.

Jednou z nich je metoda PCR – multiplexní real – time. Podle tabulky č. 3 lze vidět, že ve srovnání s ostatními metodami je nejúspěšnější, a proto je jen otázkou času, kdy se začne používat jako diagnostická metoda detekce trichinel při vyšetření jatečných těl zvířat, určených k lidské spotřebě.

Výbornou metodou detekce trichinel, která se pyšní vysokou citlivostí a přesností je Western blot. Cenově je ale mnohem náročnější než jakékoli jiné metody a její metodika také nepatří mezi nejjednodušší.

Další metodou, kterou je v současné době možné běžně využít, jsou komerčně vyráběné ELISA testy. Metoda má řadu variant, z nichž všechny jsou finančně dostupné a metodicky nenáročné. Jediná nevýhoda je, že se jedná o sérologickou metodu, která detekuje protilátky ve vzorku a ty jsou zjistitelné až min. po 3 týdnech od infekce.

8. ZNAKOVÝ POPIS DOSUD DETEKOVANÝCH JEDNOTLIVÝCH GENOTYPŮ RODU *TRICHINELLA* PRO ÚZEMÍ ČR

Následná tabulka uvádí u jakého druhu zvířete a ve kterém roce se poprvé izoloval jednotlivý genotyp a z které země infikovaný živočich pocházel. V jednom případě se jednalo o humánní trichinelózu.

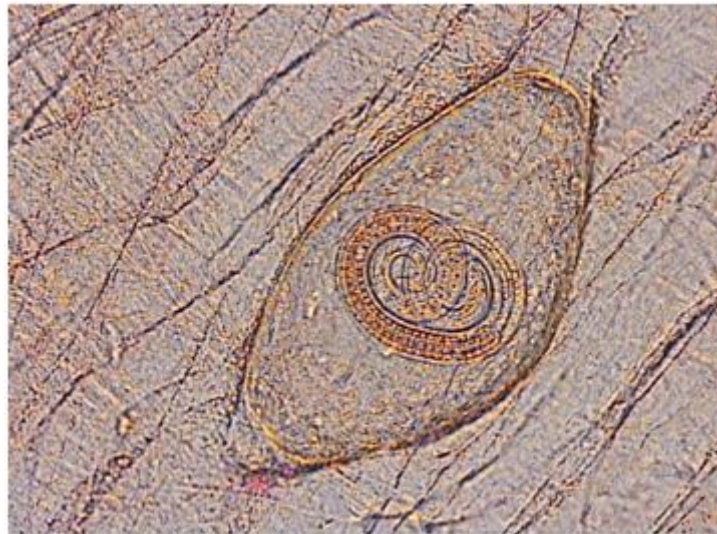
Dále je pozornost věnována převážně genotypům významnějším pro podnebí České republiky a to zejména genotypům *T. spiralis*, *T. britovi* a *T. pseudospiralis*.

Tab. č. 5: Souhrn izolovaných genotypů trichinel (Mohandas et al., 2014, upraveno)

Genotyp <i>Trichinella</i>	Poprvé identifikovaný genotyp		
	U zvířete popř. člověka	V roce:	Ve státě:
<i>T. spiralis</i> T-1	prase divoké	1960	Polsko
<i>T. nativa</i> T-2	medvěd lední	1984	Norsko
<i>T. britovi</i> T-3	liška obecná	1988	Itálie
<i>T. pseudospiralis</i> T-4	mýval severní	1972	Rusko
<i>T. murelli</i> T-5	kojot préríjní	1989	USA
<i>Trichinella sp.</i> T-6	medvěd grizzly	1983	USA
<i>T. nelsoni</i> T-7	prase bradavičnaté	1982	Tanzánie
<i>Trichinella sp.</i> T-8	lev	1992	Namíbie
<i>Trichinella sp.</i> T-9	psík mývalovitý	1984	Japonsko
<i>T. papuae</i> T-10	člověk	2007	Thajsko
<i>T. zimbabwensis</i> T-11	krokodýl nilský	1995	Zimbabwe
<i>T. patagoniensis</i> T-12	puma americká	2008	Argentina

Genotypy *T. spiralis*, *T. britovi* a *T. pseudospiralis* jsou jen těžko rozlišitelné. Mezi morfologické rozdíly se řadí tvorba cyst. *T. spiralis* a *T. britovi* tvoří kolem své larvy v příčně pruhované svalovině ochranný obal – kolagenní kapsulu (cystu). Cysta je tvaru oválného až citrónovitého. *T. pseudospiralis* je druh, který tuto cystu netvoří. Z důvodu absence pouzdra má nižší odolnost vůči teplu a mrazu. Také díky tomu mohou být tyto trichinely až o čtvrtinu menší.

Obr. č. 7: *T. spiralis* a *T. pseudospiralis* v příčně pruhované svalovině



Trichinella spiralis



Trichinella pseudospiralis

Dostupné z www.bfr.bund.de

Na obrázku je viditelná larva *T. spiralis* v pouzdře (horní obrázek), a larva *T. pseudospiralis* bez pouzdra (spodní obrázek).

Podle Koudely, (2015) nám také počet larev zjištěných v infikovaném jedinci může napovědět, o jaký druh se jedná. Jsou známé reprodukční schopnosti jednotlivých druhů a ty můžeme vyjádřit pomocí tzv. RCI (reproductive capacity index). Vyjadřuje poměr mezi počtem larev přijatých a počtem nové generace. *T. spiralis* má hodnotu 88, *T. britovi* 40 a *T. pseudospiralis* 35.

Podle Murrella, (2000) jsou na rozdíl od *T. nativa* a *T. pseudospiralis* spermie *T. spiralis* obklopené tubulární pochvou s evaginacemi, které formují tubuly v cytoplazmě. Dále je odlišná i plasmalema a počet mitochondrií. Ovšem jak sám Murrell uvádí, u těchto tvrzení není ověřená pravdivost.

Tab. č. 6: Základní rozdíly vybraných druhů genotypů trichinel podle Murrella, (2000) (upraveno)

	<i>T. spiralis</i>	<i>T. britovi</i>	<i>T. pseudospiralis</i>
velikost dospělého samce	1,0-1,8 mm	0,99-1,91 mm	0,6-0,9 mm
velikost dospělé samice	1,37-3,7 mm	2,23,4 mm	1,26-2,1 mm
velikost larvy	0,61-1,0 mm	0,86-1,0 mm	0,62-0,76 mm
schopnost tvořit pouzdro	ANO	ANO	NE
produkce novorozených larev za 72 hodin	110	47,4	48,5
index reprodukční kapacity u potkanů Wistar	185-237	0,2-1,0	47-62
infekčnost larev (dny po nakažení)	16-34	24-42	NA
nakažlivost u prasat (počet larev/g svalu)	171,5	30,6	23,9

V Evropě se identifikace genotypů trichinel provádí pouze v EURLP v Římě, pod vedením Dr. Edoarda Pozia, především metodou multiplexní PCR.

V roce 2014 parazitolog Mohandas a kol. studovali 15 mitochondriálních genomů reprezentujících 12 dosud popsáných genotypů trichinel použitím metody sekvenování DNA. Dále v práci porovnávali pořadí genů v jednotlivých mitochondriálních genomech, zhodnotili rozdíly v genetice mezi jednotlivými genotypy a přehodnotili vztahy mezi taxami za použití mitochondriálních nukleových kyselin nebo jednotlivých sad sekvencí aminokyselin.

Zaznamenali sice určité rozdíly mezi nukleotidy, ale byly velmi drobné a často srovnatelné s ostatními. Ovšem podařilo se definovat bohatý zdroj mitochondriálních

genetických markerů, které mohou být v budoucnu použity k systematickým, epidemiologickým a populačně genetickým studiím zástupců rodu *Trichinella*.

Mezi rozdíly dobře prezentované se dá uvést velikost mitochondriálního genomu (pomocí sekvenace) a délka fragmentu rDNA při metodě multiplex PCR. Pro lepší orientaci je zde zastoupení většiny genotypů.

Tab. č. 7: Rozlišení vybraných druhů trichinel na úrovni DNA (dle Mohandas, (2014) & Murrella, (2000) (upraveno)

	délka fragmentu rDNA	velikost mitochondriální hogenomu
<i>T. spiralis</i>	173 bp	16,584 bp
<i>T. nelsoni</i>	155 bp a 404 bp	15,278 bp
<i>T. nativa</i>	127 bp	14,077 bp
<i>T. britovi</i>	127 bp a 252 bp	16,421 bp
<i>T. murrelli</i>	127 bp a 316 bp	16,592 bp
<i>T. papuae</i>	240 bp	17,326 bp
<i>T. pseudospiralis</i>	300 bp a 360 bp	17,667 bp (T-4.1)
		16,450 bp (T-4.2)
		16,379 bp (T-4.3)
		16,371 bp (T-4.4)

Tyto rozdíly jsou podloženy léty výzkumů, takže podle nich lze identifikovat určitý genotyp trichinely izolovaný z infikované svaloviny.

9. ZÁVĚR

Lze tedy stále konstatovat, že parazitární onemocnění trichinelóza je závažné onemocnění, vyskytující se po celém světě. Je způsobeno parazitární hlísticí rodu *Trichinella*. Mezi významné zástupce v České republice zejména patří *T. spiralis*, *T. britovi* a *T. pseudospiralis*.

Onemocnění lze v první fázi jen těžko rozpoznat, proto i v domácnosti je potřeba udržovat zásady hygieny. Např. důkladně omývat náčiní, na kterém bylo připravováno maso. Terapie spočívá v symptomatické léčbě a podávání anthelmintik. Je to velmi bolestivé a dlouhotrvající onemocnění a v minulosti nebylo výjimkou i sebevražedné jednání nakaženého pacienta.

Na našem území se již přes 50 let nevyskytla humánní trichinelóza z důvodu vysoké úrovně nastavených preventivních opatření. Vyšetřovat prasata domácí, divoká prasata, obecně ulovenou na trichinelózu vnímavou zvěř, která je určena k lidské spotřebě, je povinné ze zákona. Jedinou schválenou metodou je metoda trávicí, při které se laboratorně uměle navodí situace v žaludku a uvolněné larvy se zjišťují pod mikroskopem. Je snaha detekční metody stále vylepšovat a modernizovat, hlavně zvýšit citlivost a snížit finanční investice a pracnost. Mezi další použitelné metody může patřit např. ELISA test a PCR metody. Komplexní PCR metody, umožňující určení genotypu trichinelózy, využívá v plné míře v současnosti jen EURLP (Referenční laboratoř Evropské unie pro parazity) v Římě. K této problematice, po vyhodnocení popsanych detekčních metod na trichinelózu, je tedy třeba dodat, že v současné době je zmíněné nařízení EU zcela oprávněné, věcné a dostačující. Přihlíží k současné zjištěné situaci výskytu onemocnění trichinelózy na území České republiky, zejména k možnostem vynakládání finančních prostředků k zamezení šíření onemocnění. Nařízené vyšetření tak zvanou trávicí metodou je jeví jako zcela efektivní, tedy finančně i jinak nejdostupnější. Bezsporně jsou některé další detekční metody, jako např. metoda RAPD – PCR, RFLP – PCR či Multiplexní real – time PCR, rychlejší a méně pracné, ale většinou vykazují menší spolehlivost a potřebu drahého technického zabezpečení a odbornosti k provedení. Obecně řečeno, o využití těchto metod by bylo možno uvažovat v případech jejich možného zdokonalení, v návaznosti se snížením nákladovosti. Nutně je

třeba chápat skutečnost, že v našich podmínkách je třeba v první fázi důležité vůbec zjistit přítomnost parazita a až poté se zabývat rozlišením jednotlivých genotypů trichinelózy.

Cílem mé práce bylo také stanovit rozdíly mezi jednotlivými genotypy, zejména v České republice se vyskytujících trichinel. Morfologické rozdíly jsou pouze ve schopnosti larev tvořit či netvořit pouzdro a s tím související pohyblivostí larev a velikost jedinců. Rozlišit jednotlivé genotypy je možno pomocí tzv. RCI indexu, kde se vyjadřuje poměr mezi počtem přijatých larev organismem a počtem larev nové generace.

Další rozdíly jsou pouze molekulární, mezi které patří např. velikost mitochondriálního genomu, délka fragmentu rDNA nebo počet mitochondrií. Zkoumání těchto znaků je však velice finančně nákladné, dá se říci pro praktické použití laické veřejnosti nepotřebné. V roce 2014 Dr. Pozio s kolegy studovali mitochondriální genomy sekvenováním DNA, přičemž hledali nové možné rozdíly použitelné při identifikaci genotypu. Rozdíly byly velmi minimální. Podařilo se jim ovšem definovat mitochondriální genetické markery, které budou v budoucnu velmi nápomocny při dalším vědeckém zkoumání. V návaznosti na tyto zjištěné skutečnosti by bylo např. zpracování klíče použitelného k určení jednotlivých genotypů trichinel, na základě morfologických znaků zcela neefektivní.

Vzhledem ke stále se nacházejícím pozitivním kusům zvěře (za rok 2015 dva jedinci prasete divokého a tento rok – 2016 jedno prase divoké), není dobré tuto parazitární nákazu brát na lehkou váhu a je důležité stále dbát na prevenci a zamezení možnosti šíření tohoto parazitárního onemocnění.

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BARTŮŇKOVÁ J. & PAULÍK M. 2005: *Vyšetřovací metody v imunologii*. Vyd. 2. Praha: Grada publishing, 168 pp.

BEDNÁŘ M., SOUČEK A. & VÁVRA J. 1994: *Lékařská speciální mikrobiologie a parazitologie*. Praha: Triton, 226 pp.

BOWMAN D. D. 2009: *Georgis' parasitology for veterinarians*. 9th edition. St. Louis: Elsevier Health Services, 451 pp.

CROWTHER J. R. 2001: *The ELISA Guidebook: Methods in Molecular Biology*. New Jersey: Humana Press Inc., 166 pp.

DUPOUY-CAMET J. & MURRELL D. K. 2007: *FAO/WHO/OIE guidelines for the surveillance, management, prevention and control of Trichinellosis*. Food & Agriculture. Paris: 108 pp.

DYK V., CHROUST K. & ZAVADIL R. 1972: *Parazitologie a invazní choroby* (Vybrané kapitoly z veterinární helmintologie). Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 163 pp.

GAMBLE H. 2000: *International Commission on Trichinellosis: Recommendations on methods for the control of Trichinella in domestic and wild animals intended for human consumption*. *Veterinary Parasitology*, 93, 393 – 408 pp.

GARCIA H., TANOWITZ H. & DEL BRUTTO O. 2013: *Neuroparasitology and Tropical Neurology: Handbook of Clinical Neurology Series*. 1 edition. Amsterdam: Elsevier Health Sciences, 480 pp.

GUNN A. & PITT S. J. 2012: *Parasitology: an integrated approach*. 1st edition. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd., 442 pp.

CHMELÍKOVÁ M. 2013: *Diagnostika parazitických hlístic rodu Trichinella*. Brno, 2013. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, 66 pp.

- CHROUST K. 1960: *Svalovec stočený (Trichinella spiralis) u divoce žijících masožravců*. Brno: [Veterinární fakulta Vysoké školy zemědělské], 116 pp.
- CHROUST K. & FOREJTEK P. 2010: Trichinelóza. *Myslivost*, 88(10), 38 – 40.
- FORMÁNKOVÁ M. 2012: *Vyšetření na Trichinella spiralis*. Hradec Králové. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, 73 pp.
- JANÁČEK M. 2014: *Možnosti přenosu a šíření parazitárního onemocnění trichinelózy*. Praha. Bakalářská práce. ČZU, 64 pp.
- JÍROVEC O. 1977: *Parazitologie pro lékaře*. 3. vydání. Praha: Avicentrum/Zdravotnické nakladatelství, 800 pp.
- JÍROVEC O. 1948: *Parazitologie pro zvěrolékaře*. Praha: Česká akademie věd a umění ve sbírce Nová encyklopedie věd přírodních, 436 pp.
- JURÁŠEK V. & DUBINSKÝ P. 1993: *Veterinární parazitologie*. Prvé vydanie. Bratislava: Príroda a.s., 382 pp.
- KLEIN D. 2002: *Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations*. Trends in molecular medicine, 257 – 260 pp.
- KLIMEŠ J. 1985: *Kapitoly z lékařské mikrobiologie - Stručná lékařská parazitologie III-Diagnostika parazitárních infekcí*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 49 pp.
- KOUDELA B. 2010: Trichinelóza jezevců. *Myslivost* 56(12), 48.
- KOUDELA B., HARNA J. & PIJÁČEK M. 2001: *Monitoring of animal trichinellosis in the Czech Republic-the past and present*. Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, Praha: Triton, 55 pp.
- KRČ J. 2014: *Identifikace některých patogenů přenášených klišťaty pomocí vybraných molekulárních a imunologických metod*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, 58 pp.

- KÝVALOVÁ M. 2011: *Sekvenační metody nové generace: jejich principy a potencionální využití v genetice člověka, etické aspekty*. Brno. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, 62 pp.
- LAMB T. 2012: *Immunity to parasitic infection*. 1st edition. Chichester: John Wiley & Sons, 520 pp.
- LITZMAN J. et al. 2007: *Základy vyšetření v klinické imunologii*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 59 pp.
- MATYÁŠ Z. 1975: *Hygienu potravin a surovin živočišného původu*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 325 pp.
- MOHANDAS N. et al. 2014: *Mitochondrial genomen of Trichinella species and genotypes – a basis for diagnosis, and systematic and epidemiological explorations*. *International Journal for Parasitology*, 44, 1073 – 1080 pp.
- MURRELL K. D. et al. 2000: *The Systematics of the Genus Trichinella with a Key to Species*. *Veterinary Parasitology*, 93, 293 – 307 pp.
- NOCKLER K. et al. 2000: *Detekce Trichinella infekce v potravinách*. *Veterinary Parasitology*, 93, 335 – 350 pp.
- ONDRIÁŠ M., JACKOVÁ S. & BÜCHLEROVÁ Z. 2008: *Sledování trichinel v mase - aktuální stav na Slovensku*. In: Lenfeldovy a Höklovy dny: konference o hygieně a technologii potravin: sborník. Brno. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita.
- OIVANEN L. 2005: *Endemic trichinellosis-experimental and epidemiological studies*. Faculty of Veterinary Medicine, University of Helsinki.
- PALMER S.R., SOULSBY L. & TORGESON P. 2010: *Oxford Textbook of Zoonoses: Biology, Clinical Practice and Public Health Control*. 2nd edition. New York: Oxford University Press, 884 pp.
- POZIO E. 1998: *Trichinellosis in the European union: epidemiology, ecology and economic impact*. *Parasitology Today*, 35 – 38 pp.

- POZIO E. 2007: *World distribution of Trichinella spp. infections in animals and humans*. *Veterinary Parasitology*, 147, 3 – 21 pp.
- POZIO E. & MURRELL D. 2006: *Systematics and Epidemiology of Trichinella*. *Advances in Parasitology*, 63, 367 – 439 pp.
- POZIO E. & ZARLENGA D. S. 2013: *New pieces of the Trichinella puzzle*. *International Journal for Parasitology*, 43, 983 – 997 pp.
- STEJSKAL F. 2005: Současná léčba helmintóz. *Klinická farmakologie*, 83 (19), 35 – 36 pp.
- STITES P. D. & TERR I. A. 1994: *Základní a klinická imunologie*. Praha 1: Victoria Publishing, a.s., 774 pp.
- TOMAN M. 2000: *Veterinární imunologie*. Praha: GRADA publishing.
- Nařízení komise (ES) č.2075/2005, kterým se stanoví zvláštní předpisy pro úřední kontroly trichinel v mase.
- Vyhláška č. 289/2007 Sb., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství.
- Zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů (dále jen "Veterinární zákon").
- Zákon č. 449/2001 Sb., o myslivosti, ve znění pozdějších předpisů (dále jen "Zákon o myslivosti").
- Zákon č. 22/1997 Sb., o technických požadavcích na výrobky a o změně a doplnění některých zákonů.

11. ONLINE ZDROJE

BARTÁKOVÁ E. *PCR (polymerázová řetězová reakce)*. Molekulární biologie. 2011 [cit. 2016-02-21]. Zdroj: <http://mmp.vfu.cz>.

BARTÁKOVÁ E. *RFLP – restrikční reakce*. Molekulární biologie. 2011 [cit. 2016-02-26]. Zdroj: <http://mmp.vfu.cz>.

CELTA Z. *Trichinelóza*. MS KIS. Publikováno 25.9.2006 [cit. 2016-02-09] Zdroj: <http://www.mskis.cz/?path=m1|mt6|mo2308>.

GOTTSTEIN B., POZIO R. & NOCKLER K. *Epidemiology, Diagnosis, Treatment and Control of Trichinellosis*. Clinical Microbiology Reviews January 2009 vol. 22 no. 1 [cit. 2016-02-06]. Zdroj: <http://cmr.asm.org/content/22/1/127.long#abstract-1>

KOUDELA B. *Aktuální výskyt trichinelózy u černé zvěře*. Myslivost. 2001, (7) [cit. 2016-02-06]. Zdroj: www.myslivost.cz.

KOUDELA B. *Trichinelóza v Evropě*. Vesmír. 2001, (3) [cit. 2016-02-06]. Zdroj: www.casopis.vesmir.cz.

KOUDELA B. & PAVLÍČKOVÁ Z. *Trichinelóza volně žijících masožravců v ČR*. Myslivost. 2005, (1) [cit. 2016-03-01]. Zdroj: www.myslivost.cz.

KOUDELA B. & HARNA J. *Další nálezy trichinel u divokých prasat na Frýdecko – Místecku*. Myslivost. 2015, (3), 60 s. [cit. 2016-03-09]. Zdroj: www.myslivost.cz.

NECHVÁTALOVÁ J. *Precipitace, radioimunodifúze (RID), nefelometrie, turbidimetrie*. Ústav klinické imunologie a alergologie FN u sv. Anny. 2002 [cit. 2016-02-09]. Zdroj: <http://is.muni.cz>.

PAVLÁSEK I. & MÁCA O. *Trichinela divokých prasat a jezevců*. Myslivost. 2014, (5), 41 s. [cit. 2016-03-08]. Zdroj: www.myslivost.cz.

PAVLÁSEK I. & MÁCA O. *Trichinela divokých prasat a jezevců*. Myslivost. 2014, (4), 54 – 55 s. [cit. 2016-03-08]. Zdroj: www.myslivost.cz.

PAVLÁSEK I., MÁCA O. & MIKOVÁ K. *Trichinella u lišky*. Myslivost. 2014, (3), 57 s. [cit. 2016-03-08]. Zdroj: www.myslivost.cz.

Přežívání larev *Trichinella spiralis* a *T. britovi* v trvanlivých fermentovaných masných výrobcích. Bezpečnostpotravin. 2005 [cit. 2016-02-09]. Zdroj: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/prezivani-larev-trichinella-spiralis-a-t-britovi-v-trvanlivych-fermentovanych-masnych-vyrobcich.aspx>.

Trichinely a trichinelóza. ŠVPS SR. 2010 [cit. 2016-02-09]. Zdroj: http://www.svps.sk/potraviny/info_Trichinely.asp.

Vyšetření masa na přítomnost *Trichinella* spp. Inovace výuky v bezpečnosti potravin. 2011 [cit. 2016-02-21]. Zdroj: <http://cit.vfu.cz>.

12. PŘÍLOHY

Obrázky u nichž není uveden původ, byly pořízeny v průběhu let 2015 – 2016 autorem práce.

- **Trávicí metoda – metodika ve fotografiích**

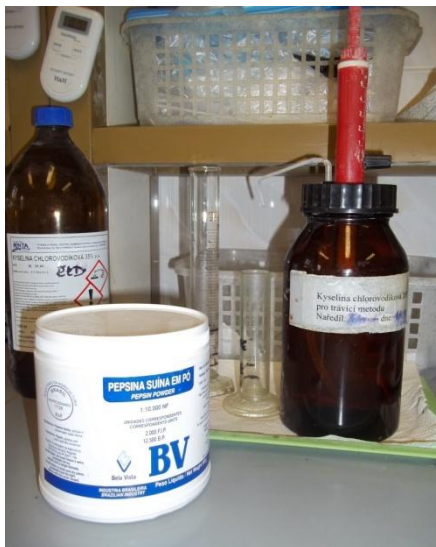
Fotografie pořízené na SVÚ v Brně. Zdroj: (autor práce).

Obr. č. 8: Vzorky k vyšetření trichinelózy z prasete divokého (*Sus scrofa*)



Od 1. 1. 2016 je povinnost k vzoru svaloviny přidat i tzv. pířka – ocásky z ulovených kusů prasat divokých. U každého vzorku nesmí chybět plomba – označení uloveného kusu zvěře.

Obr. č. 9: Chemikálie použité pro přípravu trávicí tekutiny při provádění trávicí metodě



Pepsin a kyselina chlorovodíková. Zdroj: (autor práce).

Obr. č. 10: Vzorky masa se tráví pomocí magnetické míchačky



Zdroj: (autor práce).

Poznámka: Nasekaná svalovina se tráví 30 minut za stálého míchání při teplotě 47 – 49 °C. Otáčky jsou okolo 250 ot./1 min. Kádinka musí být přikryta aluminiovou fólií, uvnitř je magnetické míchadlo.

Obr. č. 11: Filtrace do sedimentační baňky



Zdroj: (autor práce).

Poznámka: Natrávená tekutina se přefiltruje přes síto do sedimentační baňky, kde se nechá opět 30 minut odstát.

Obr. č. 12: Natrávená tekutina odpuštěná ze sedimentační baňky



Zdroj: (autor práce).

Poznámka: Ze sedimentační baňky se rychle odpustí 40 ml do odměrného válce a nechá se 10 minut odstát. Poté se odpipetuje horních 30 ml.

Obr. č. 13: Mikroskopování v trichineloskopu



Zdroj: (autor práce).

Poznámka: Zbylých 10 ml se rozdělí do Petriho misek a prohlíží pod trichineloskopem.

Obr. č. 14: Trichinelóza, přehled ohnisek, nálezů a podezření v ČR



TRI Přehled ohnisek, nálezů a podezření			
Stav	Pol.č.	Datum potvrzení	Popis místa
●	1	01.05.2001	CZ - Krásná pod Lysou Horou
●	2	01.07.2001	CZ - Tvoříhráz
●	3	01.04.2002	CZ - Starý Rokytník
●	4	01.08.2002	CZ - Ostravice
●	5	01.01.2003	CZ - Javory
●	6	01.01.2003	CZ - Staré Křečany
●	7	01.12.2003	CZ - Běleč nad Orlicí
●	8	01.12.2003	CZ - Vysoká nad Labem
●	9	01.09.2006	CZ - Velký Úhřetov
●	10	01.11.2010	CZ - Mosty u Jablunkova
●	11	01.12.2010	CZ - Dolní Dobrouč
●	12	01.01.2011	CZ - Dolní Dobrouč
●	13	01.01.2011	CZ - Dolní Dobrouč
●	14	07.01.2013	CZ - Paseky nad Jizerou, 51247, Paseky nad Jizerou

Zdroj: http://eagri.cz/public/web/svs/tiskovy-servis/tiskove-zpravy/x2013_po-case-opet-trichinelozni-divocak.html.

13. SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ

Tab. č. 1:	Přehled záchytů pozitivních kusů živočichů při povinném vyšetřování na trichinelózu	str. 22
Tab. č. 2:	Tepelné ošetření vepřového masa a doba potřebná k likvidaci trichinel	str. 33
Tab. č. 3:	Shrnutí jednotlivých metod detekce	str. 54
Tab. č. 4:	Srovnání metod detekce trichinely v závislosti na finanční a časové zatížení a citlivost jednotlivých metod	str. 55
Tab. č. 5:	Souhrn izolovaných genotypů trichinel (dle Mohandase et al. 2014, upraveno)	str. 57
Tab. č. 6:	Základní rozdíly vybraných druhů genotypů (dle Murrella, 2000, upraveno)	str. 59
Tab. č. 7:	Rozlišení vybraných druhů trichinel na úrovni DNA (dle Mohandase, 2014 & Murrella, 2000, upraveno)	str. 60
Obr. č. 1:	Mapa výskytu trichinel ve světě (dle Chmelíkové, 2013, upraveno)	str. 15
Obr. č. 2:	Cyklus synantropní a sylvatický	str. 16
Obr. č. 3:	Morfologie trichinel	str. 17
Obr. č. 4:	Životní cyklus trichinel	str. 19
Obr. č. 5:	Lístek o původu zvěře (vzor)	str. 28
Obr. č. 6 :	Kompresorium	str. 42
Obr. č. 7:	<i>T. spiralis</i> a <i>T. pseudospiralis</i> v příčně p. svalovině	str. 58
Obr. č. 8:	Vzorky odebrané z prasete divokého	str. 69
Obr. č. 9:	Chemikálie použité do trávící tekutiny	str. 70
Obr. č. 10:	Vzorky masa se tráví pomocí magnetické míchačky	str. 70
Obr. č. 11:	Filtrace do sedimentační baňky	str. 71
Obr. č. 12:	Natrávená tekutina odpuštěná ze sedimentační baňky	str. 72
Obr. č. 13:	Mikroskopování v trichineloskopu	str. 72
Obr. č. 14:	Přehled ohnisek, nálezů a podezření v ČR	str. 73