

Česká zemědělská univerzita v Praze  
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů  
katedra zoologie a rybářství

# **TLUMENÍ A PREVENCE ŠÍŘENÍ INVAZNÍHO PARAZITA *ASHWORTHIIUS SIDEMI***

**Certifikovaná metodika**

**doc. Ing. Jaroslav Vadlejch, Ph.D.**

**Ing. Jan Magdálek**

**Ing. Zuzana Čadková, DiS., Ph.D.**

Praha © 2019

## **Oponenti:**

**MVDr. Pavel Forejtek, CSc.**

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

a

Středoevropský institut ekologie zvířet, o.p.s.

**MVDr. Petr Šatrán, Ph.D.**

Státní veterinární správa

Odbor ochrany zdraví a pohody zvířat

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. TJ01000009 s názvem:  
„Vyhodnocení rizik invazního parazita *Ashworthius sidemi* pro oborový chov  
spárkaté zvířet v České republice, tlumení ashworthiomy a prevence jejího šíření“

**ISBN 978-80-213-2946-1**

## Seznam použitých zkratk

**CIC** (International Council for Game and Wildlife Conservation) – Mezinárodní rada pro lov a ochranu zvěře

**DNA** (Deoxyribonucleic Acid) – deoxyribonukleová kyselina

**FECRT** (Faecal Egg Count Reduction Test) – test redukce počtu vajíček

**GI** – gastrointestinální

**L<sub>1</sub>** – larva 1. vývojového stadia

**L<sub>2</sub>** – larva 2. vývojového stadia

**L<sub>3</sub>** – larva 3. vývojového stadia = infekční larva

**L<sub>4</sub>** – larva 4. vývojového stadia

**MK** – medikované krmivo

**PCR** (Polymerase Chain Reaction) – polymerázová řetězová reakce

**RPM** (revolutions per minute) – počet otáček za minutu

**SVS** – Státní veterinární správa

**WAAVP** (The World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) – Světová asociace pro rozvoj veterinární parazitologie

**ž. hm.** – živá hmotnost

## Seznam obrázků

- obr. 1** (str. 12) – Vývojový cyklus hlístice *Ashworthius sidemi*
- obr. 2** (str. 15) – Dospělci hlístice *Ashworthius sidemi*
- obr. 3** (str. 16) – Detail vyústění reprodukčního ústrojí samice *Ashworthius sidemi*
- obr. 4** (str. 17) – Detail konce těla samce *Ashworthius sidemi*
- obr. 5** (str. 18) – Vajíčka několika druhů trichostrongylidních hlístic získaná flotací
- obr. 6** (str. 21) – Slez infikovaný ashworthiózou
- obr. 7** (str. 22) – Histologický řez slezem infikovaným ashworthiózou
- obr. 8** (str. 31) – Správné uložení vzorku před koprologickým vyšetřením
- obr. 9** (str. 34) – Schematické znázornění pomůcky pro zdokonalení diagnostiky ashworthiózy
- obr. 10** (str. 37) – Baermannova aparatura s kultivovanými výkaly
- obr. 11** (str. 38) – Infekční larvy trichostrongylidních hlístic získané koprokulturou
- obr. 12** (str. 45) – Pohled do slezu vyšetřovaného zvířete
- obr. 13** (str. 48) – Pohled na zadní konec těla samce *Haemonchus contortus*

# Obsah

|                                                         |    |
|---------------------------------------------------------|----|
| I. Cíl metodiky .....                                   | 6  |
| II. Vlastní popis metodiky .....                        | 8  |
| 1    SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ .....                        | 9  |
| 1.1 <i>Ashworthius sidemi</i> .....                     | 9  |
| 1.1.1    Původ a rozšíření .....                        | 9  |
| 1.1.2    Biologie a vývoj .....                         | 12 |
| 1.2    Ashworthióza .....                               | 17 |
| 1.2.1    Diagnostika .....                              | 17 |
| 1.2.2    Patologie a negativní dopad .....              | 20 |
| 1.2.3    Tlumení a prevence .....                       | 23 |
| 2    METODICKÁ ČÁST .....                               | 27 |
| 2.1    Intravitální diagnostika .....                   | 28 |
| 2.1.1    Morfologické metody .....                      | 28 |
| 2.1.1.1    Získání a skladování vzorku .....            | 28 |
| 2.1.1.2    Koprologie .....                             | 32 |
| 2.1.1.3    Koprokultura .....                           | 35 |
| 2.1.2    Molekulární metody .....                       | 39 |
| 2.1.2.1    Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....     | 40 |
| 2.2    Postmortální diagnostika .....                   | 43 |
| 2.2.1    Parazitologická pitva .....                    | 43 |
| 2.2.2    Morfologická determinace .....                 | 47 |
| 2.3    Tlumení .....                                    | 49 |
| 2.4    Prevence .....                                   | 53 |
| III. Srovnání „novosti postupů“ .....                   | 56 |
| IV. Popis uplatnění metodiky .....                      | 58 |
| V. Ekonomické aspekty .....                             | 60 |
| VI. Seznam použité související literatury .....         | 66 |
| VII. Seznam publikací, které předcházely metodice ..... | 74 |
| VIII. Dedikace .....                                    | 76 |

## **I. Cíl metodiky**

Cílem předložené metodiky je:

- vytvořit přehled o diagnostických metodách invazní parazitózy (ashworthiózy), které umožní jejího původce (*Ashworthius sidemi*) spolehlivě detekovat
- poskytnout vhodný postup účinného tlumení ashworthiózy
- doporučit účinnou strategii pro zamezení šíření invazního parazita *A. sidemi* na území České republiky
- poukázat na výhody, nevýhody, ale i ekonomické aspekty terapeutických a preventivních zásahů proti invaznímu parazitovi *A. sidemi*

Na základě doporučení uvedených v této metodice by měl být její uživatel z řad odborné i myslivecké veřejnosti schopen vyhodnotit reálný dopad invazního parazita *A. sidemi* a infekcí jím vyvolaných na zvěř v intenzivních chovech i v honitbách a zároveň zhodnotit vhodnost těchto opatření z pohledu ekonomického i ekologického.

## **II. Vlastní popis metodiky**



# 1 SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

## 1.1 *Ashworthius sidemi*

### 1.1.1 Původ a rozšíření

První záznam o druhu *Ashworthius sidemi* pochází z první třetiny 20. století, kdy byla tato hlístice popsána jako krev sající parazit jelena siky dybowského (*Cervus nippon dybowskii*) z oblasti Vladivostoku v Rusku (Schulz, 1933). Primárním areálem výskytu *A. sidemi* je geografická oblast východní, jihovýchodní a Střední Asie, kde tento parazit infikuje autochtonní druhy jelenovitých, jako např. jelena siku (*Cervus nippon*), wapiti sibiřského (*Cervus elaphus sibiricus*) nebo sambara (*Cervus unicolor*). Do rodu *Ashworthius* bylo do dnešní doby zařazeno celkem osm validních druhů hlístic, z nichž naprostá většina je endemických, infikuje přezvýkavce a vykazuje vysokou hostitelskou specifitu. Pouze *A. sidemi* je generalista, který je schopný parazitovat u širokého spektra hostitelů a podle současných poznatků je areál jeho výskytu poměrně rozsáhlý (Hoberg et al., 2002).

Koncem 19. a počátkem 20. století byl z Asie do většiny zemí západní, střední a východní Evropy, z důvodu obohacení spektra lovené přezvýkové spárkaté zvěře,

importován jelen sika (*Cervus nippon*) (Bartoš, 2009). Společně s tímto druhem zvěře byl člověkem neúmyslně introdukován i alochtonní parazit *A. sidemi*. Tento druh hlístice se v Evropě postupně adaptoval na zdejší klimatické podmínky, infikoval autochtonní druhy volně žijících přežvýkavců a začal se mezi nimi samovolně šířit. Z výše uvedených důvodů lze tedy *A. sidemi* považovat za invazní druh organismu (Ehrenfeld, 2010).

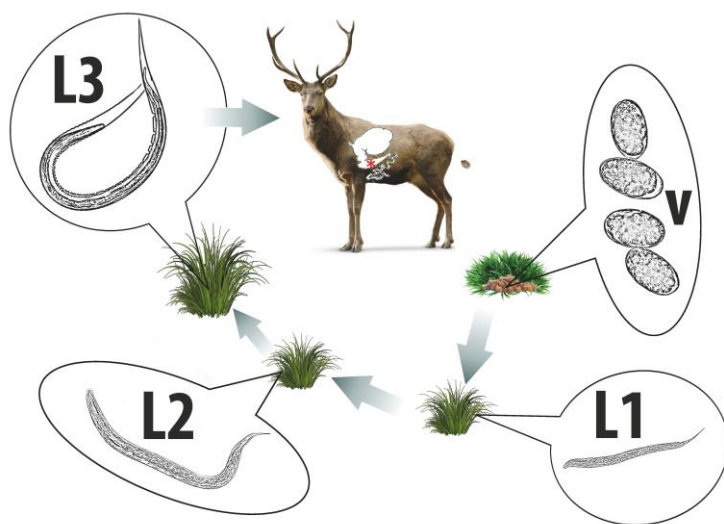
Kromě primárního areálu výskytu byl *A. sidemi* dosud prokázán i na území Ukrajiny, Polska, Francie, Slovenska a České republiky (Drózd, 1998; 2003). Na území ČR byl tento alochtonní parazit poprvé zjištěn v 70. letech minulého století (Kotrlá a Kotrlý, 1973) při pitvách několika jedinců jelena siky ulovených v Lánské oboře ve Středočeském kraji, a také u sik v blízkosti obce Manětín v Plzeňském kraji. Následně byl *A. sidemi* prokázán také u sik v Opočenské oboře v Královéhradeckém kraji (Kotrlá a Kotrlý, 1977). Další informace o výskytu alochtonní hlístice přežvýkavé spárkaté zvěře v ČR pocházejí z přelomu let 2015 a 2016, kdy byl *A. sidemi* identifikován na základě morfologicko-molekulárních analýz pitevně získaných dospělých hlístic z několika jedinců jelena evropského (*Cervus elaphus*) a zubra evropského (*Bison bonasus*) pocházejících z obory Židlov v Libereckém kraji (Vadlejch et al., 2017a). Od té doby byl invazní parazit nalezen i v dalších oblastech ČR a jeho dosud zjištěná prevalence dosahuje téměř 50 % (Vadlejch et al., 2018a).

Na území výše uvedených evropských států byl *A. sidemi*, kromě alochtonního jelena siky (*Cervus nippon*), nalezen již u všech tradičních autochtonních druhů přežvýkavé spárkaté zvěře – jelena evropského (*Cervus elaphus*), srnce obecného (*Capreolus capreolus*), daňka evropského (*Dama dama*), muflona (*Ovis musimon*) nebo losa evropského (*Alces alces*) a zubra evropského (*Bison bonasus*) (Drózdź, 1998; Vadlejš et al., 2018a). Nízkou hostitelskou specificitu tohoto druhu hlístice potvrzuje fakt, že kromě volně žijících druhů přežvýkavců byl prokázán i u ovce domácí (*Ovis aries*) (Kotrlá et al., 1976) a u skotu (*Bos taurus*) (Moskwa et al., 2015).

Rozšíření této invazní hlístice je ovlivněné především antropogenně, ale závisí i na přirozené migrační aktivitě zvěře. K introdukci tohoto parazita na nová území může docházet i v současnosti, společně s importovanými zvířaty. Za rizikové oblasti v tomto smyslu lze považovat některé evropské státy, v nichž je prevalence *A. sidemi* vysoká (Drózdź et al., 2003; Radwan et al., 2010; Kowal et al., 2014). Na šíření tohoto invazního parazita se podílí i sami infikovaní hostitelé. Některé druhy zvěře jsou totiž schopné překonávat značné vzdálenosti (až desítky kilometrů) a mohou přecházet i mezi jednotlivými státy (Demiaszkiewicz et al., 2013; Magdálek et al., 2017). Lze tedy předpokládat, že areál výskytu *A. sidemi* může být mnohem širší, než bylo dosud zjištěno.

## 1.1.2 Biologie a vývoj

*Ashworthius sidemi* patří mezi tzv. trichostrongylidní hlístice (Nematoda: Trichostrongyloidea) (Durette-Desset et al., 1999) s nimiž sdílí řadu charakteristik, včetně vývojového cyklu, který je přímý, bez účasti mezipřenositele (viz obr. 1). Samička hlístice po oplodnění samečkem uvolňuje v predilekčním místě parazitace (slez a duodenum) vajíčka, která procházejí gastrointestinálním (GI) traktem hostitele a jsou společně s jeho výkaly uvolňována do vnějšího prostředí. Vajíčka jsou oválná, dosahují velikosti  $97 - 103 \times 48 - 49 \mu\text{m}$  (Drózd et al., 2000) a morfologicky jsou velmi podobná vajíčkům ostatních druhů trichostrongylidních hlístic.



obr. 1. Vývojový cyklus hlístice *Ashworthius sidemi*: v – vajíčka, L1, L2 – preinfekční larvy 1. a 2. stadia, L3 – infekční larva 3. stadia (originál J. Vadlejch)

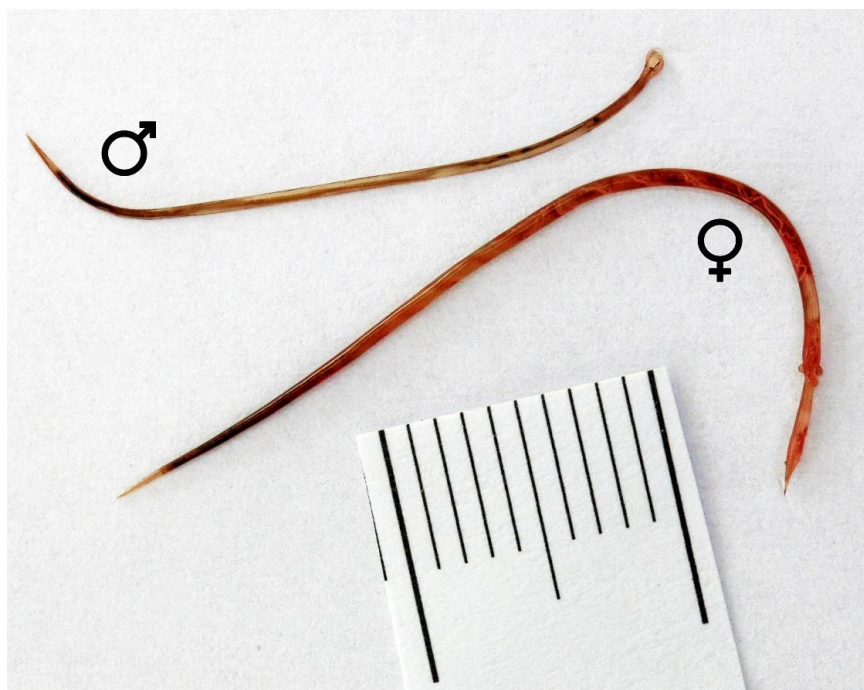
Průběh exogenního vývoje vajíček, respektive líhnutí larev, závisí na řadě faktorů, z nichž nejvýznamnější je přítomnost kyslíku, teplota a vlhkost prostředí. Ve vhodných podmínkách se za 48 hodin z vajíček líhnou larvy 1. stadia ( $L_1$ ), které následně odvrhují povrchovou kutikulu a přeměňují se na larvu 2. stadia ( $L_2$ ). Stadia  $L_1$  a  $L_2$  se živí bakteriemi přítomnými ve výkalech hostitele. Další larvální vývoj je doprovázený řadou morfologických, biochemických a fyziologických změn, které souvisejí s přeměnou preinfekčních stadií na stadium infekční. Na povrchu  $L_2$  stadia se syntetizuje nová vrstva kutikuly, která překrývá tu původní a infekční larvy  $L_3$  o délce 985 – 1 056  $\mu\text{m}$  (Drózd et al., 2000) jsou tak ve výsledku chráněny dvěma vrstvami kutikul, které jim poskytují dostatečnou ochranu před nepříznivými podmínkami vnějšího prostředí. Infekční larvy jsou z výkalů hostitele buď pasivně odstraněny (mechanicky, deštěm apod.) nebo z nich aktivně migrují na přilehlou vegetaci, po níž migrují horizontálním směrem. Ve vnějším prostředí infekční larvy hlístic přežívají až několik měsíců,  $L_3$  stadia některých druhů trichostrongylidních hlístic dokonce na povrchu půdy, či v půdě, přežívají zimní období (Stromberg, 1997; O'Connor et al., 2006). Exogenní vývoj většiny druhů trichostrongylidních hlístic je podrobně prostudován, ale o vývoji *A. sidemi* ve vnějším prostředí dosud existuje jen velmi málo informací.

Infekční larvy hlístic jsou přizpůsobeny k dlouhodobému přežívání nepříznivých podmínek vnějšího prostředí (chlad i vysoká teplota, UV záření,

desikace apod.) a k tomuto účelu se v průběhu evoluce u nich vytvořila řada adaptačních mechanismů. Jedním z nich je i pozastavený endogenní vývoj, díky němuž jsou larvální stadia parazita schopna přežívat nepříznivé období pozdního podzimu a zimy v minimální metabolické aktivitě (hypobióza) v hostiteli. V jarním období se pak v důsledku fyziologickým změn v organismu hostitele hypobiózní larvy zaktivují a pokračují ve vývoji (Gibbs, 1986; Belem et al., 1993). Pochopení tohoto jevu má značný význam nejen pro získání uceleného pohledu na biologii parazita, ale i pro úspěšné tlumení parazitózy. Fenomén hypobiózy byl popsán i u hlístice *A. sidemi*. Ovcharenko (1968) v Rusku a Drózd et al. (2003) v Polsku, v zimních měsících, u volně žijících přežvýkavců pitevně prokázali přítomnost pouze larválních a juvenilních stadií *A. sidemi*, zatímco v létě u stejných druhů hostitelů zjišťovali převážně dospělé tohoto parazita. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že *A. sidemi* přežívá období zimy ve stadiu hypobiózy. Výsledky Vadlecha et al. (2018a) však dokazují, že v současných klimatických podmínkách střední Evropy *A. sidemi* nevyužívá hypobiózu jako prioritní strategii pro přežití nepříznivých podmínek. Naposledy jmenovaní autoři v zimním období u spárkaté zvěře ulovené v ČR nalézali až tisíce dospělých hlístic *A. sidemi*. Tento fakt zároveň poukazuje na schopnost parazita se adaptovat na aktuální klimatické podmínky daného prostředí.

Další vývoj probíhá již v hostiteli, po náhodném pozření infekční larvy hlístice společně s vegetací nebo po

aktivaci hypobiózních stadií přítomných v hostiteli. Larvální stadium  $L_4$  se vyvíjí ve sliznici slezu a začíná sát krev. V závislosti na imunitní odpovědi hostitele se přibližně po dvou týdnech ze sliznice vynořují dospělé hlístice. Obě pohlaví jsou výrazně červeně zbarvená nasátou krví (viz obr. 2).



obr. 2. Dospělci hlístice *Ashworthius sidemi* – v distální části těla (vpravo) samce je vějířovitě rozevřená kopulační burza s tmavě zbarvenými spikulami. Uvnitř těla samice jsou viditelná kontrastně bílá ovaria obtáčející střevo naplněné krví. V zadní části těla samice je pak viditelná vulvární chlopeč. Délka měřítka je 1 cm (foto J. Vadlejš)

Samičky lze rozpoznat podle kontrastně bílých ovaríí, která se obtácejí kolem střeva naplněného krví hostitele. V zadní části jejich těla se nachází výrazná chlopeň, která kryje vulvu (viz obr. 3).



obr. 3. Detail vyústění reprodukčního ústrojí samice *Ashworthius sidemi* – na snímku je zřetelná vulvární chlopeň, která kryje vulvu, zvětšení 200× (foto J. Vadlejch)

Samci jsou menší a konec jejich těla je vějířovitě rozšířen v bursu copulatrix (viz obr. 4) (Drózd et al., 2000).

Výsledná celková délka jedinců obou pohlaví je značně proměnlivá a závisí na řadě faktorů, zejména však na imunitním systému hostitele, u kterého hlístice parazituje. Na základě výsledků Vadlejcha et al. (2017b) lze v subpopulacích *A. sidemi* parazitujících u volně žijících přežvýkavců v ČR rozeznat dva velikostní morfotypy. Majoritní morfotyp dosahuje standardní velikosti (samice  $\pm 19$  mm a samci  $\pm 17$  mm), zatímco jedinci minoritního morfotypu „giganteus“ dosahují až dvojnásobné délky (samice  $\pm 37$  mm a samci  $\pm 26$  mm). Příčina těchto velikostních rozdílů však zatím zůstává nejasná. V období



pohlavní zralosti samci hlístic vyhledávají samice, páří se s nimi, samice produkují vajíčka a celý cyklus se opakuje.



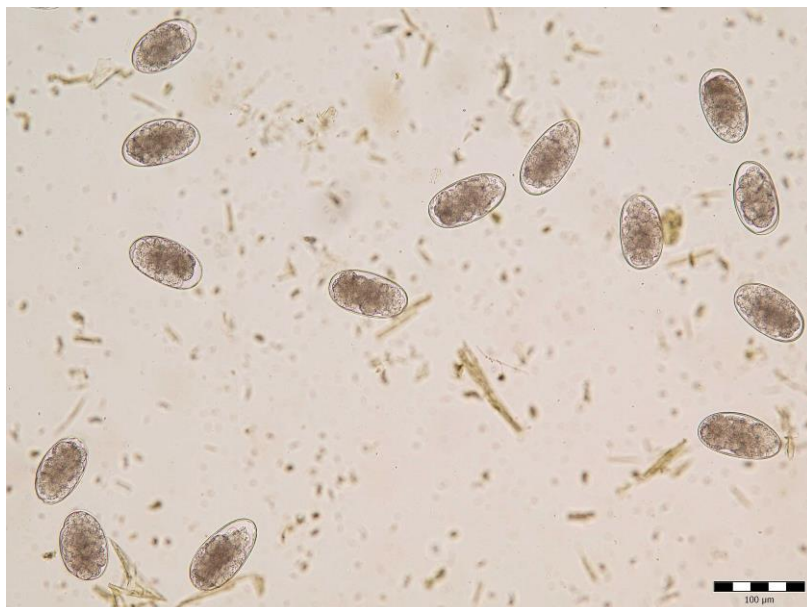
obr. 4. Detail konce těla samce *Ashworthius sidemi* – uprostřed kopulační burzy jsou výrazně dlouhé spikuly, jejichž distální konce (vpravo) jsou uzavřené v kutikulární pochvě, zvětšení 200x (foto J. Vadlejch)

## 1.2 Ashworthióza

### 1.2.1 Diagnostika

Infekce vyvolané hlísticí *A. sidemi* (ashworthióza) lze detekovat a případně i kvantifikovat jak u živých zvířat (intravitálně), tak postmortálně u ulovených či uhynulých zvířat.

Zlatým standardem intravitální diagnostiky GI infekcí vyvolaných naprostou většinou druhů hlístic je koprologické vyšetření výkalů hostitele, kterým je možné prokázat přítomnost vajíček hlístice ve vzorku výkalu vyšetřovaného hostitele. Nejčastěji se k tomuto účelu používají flotační metody, které s využitím nasyceného roztoku solí, či sacharidů umožňují zkoncentrovat vajíčka hlístic ve vrstvě tekutiny, která se pak následně mikroskopicky prohlíží (Zajac a Conboy, 2012; Bowman, 2014). Flotační metody však mají určité limity. Vajíčka většiny druhů trichostrongylidních hlístic jsou morfologicky velmi podobná a nelze je tak spolehlivě od sebe rozpoznat (viz obr. 5). Z tohoto důvodu se po



obr. 5. Vajíčka několika druhů trichostrongylidních hlístic získaná flotací, zvětšení 200x (foto J. Vadlejš)

prokázání vajíček tzv. strongylidního typu ve vzorku provádí kultivace výkalů pozitivního jedince pro získání infekčních larev hlístic (viz kapitola 2.1.1.3). Na základě morfometrických znaků L<sub>3</sub> larev je možná bližší determinace infekčního agens (van Wyk et al., 2004; van Wyk a Mayhew, 2013).

S využitím koprologických metod lze však detekovat pouze patentní infekci, kdy samičky produkují vajíčka. Larvální, pohlavně nezralá stadia a dospělé hlístice, které z určitého důvodu neprodukují vajíčka prokázat nelze. V takových případech poskytuje koprologické vyšetření falešně negativní výsledky, což se týká i invazní parazitózy vyvolané hlísticí *A. sidemi*. Podle aktuálních poznatků v současných klimatických podmínkách ČR (a zřejmě i v ostatních zemích střední Evropy) nelze ashworthiózu v zimním období koprologicky detekovat. Přestože s využitím flotačních metod nebyla v zimě ve výkalech volně žijících přežvýkavců detekována žádná vajíčka, v hostitelích byly při pitvách nalézány vysoké počty živých dospělců *A. sidemi*. V tělech samic hlístic sice byla vajíčka přítomna, ale nebyla jimi neuvolňována a nebylo je tedy možné koprologicky zjistit. Zřejmě se jedná o novou adaptaci parazita umožňující přežití nepříznivých podmínek prostředí (Vadlejch et al., 2017a). Jedince infikované hlísticí *A. sidemi* lze tedy v průběhu zimního období s jistotou prokázat pouze na základě parazitologické pitvy.

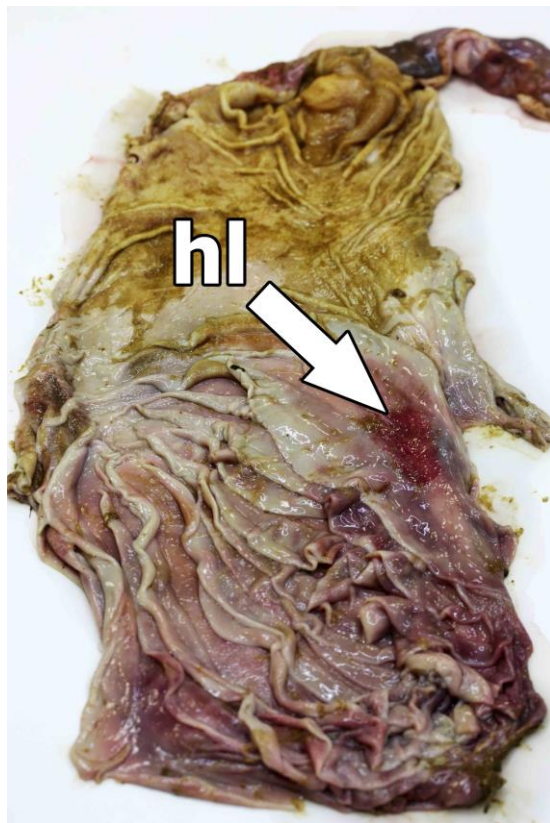
## 1.2.2 Patologie a negativní dopad

Hlístice *A. sidemi* může u infikovaného hostitele v důsledku traumatizace parazitované tkáně, ale i nepřímo (obránná reakce organismu na přítomnost parazita) vyvolat závažné zdravotní komplikace, které mohou hostitele oslabovat, mohou mít negativní dopad na jeho celkový zdravotní stav, či na produkci zvěřiny a trofejí.

Patomorfologické změny vzniklé v důsledku parazitace *A. sidemi* jsou mnohdy viditelné již při makroskopické prohlídce orgánu. Sliznice infikovaných slezů mají v důsledku hematofágní činnosti hlístice tmavě karmínovou barvu a jsou na nich zřetelné hemoragické léze (viz obr. 6). Tyto léze mohou mít petechiální charakter, ale mohou se i shlukovat a vytvářet několikacentimetrové okrsky bez výraznějšího ohraničení (Vadlejch et al., 2018b).

Ashworthióza je doprovázená poměrně výraznou imunitní reakcí hostitele. V infikovaných slezech se vytváří difúzní zánětlivý infiltrát (viz obr. 7), který může prostupovat i hlouběji do tkáně. V parazitovaných tkáních lze dále histologicky sledovat hyperémii, edémem sliznice, dysplazii epiteliálních buněk, ale i autolytické procesy s výslednými nekrotickými ložisky (viz obr. 7) (Osińska et al., 2010; Vadlejch et al., 2018b).

Hlístice *A. sidemi* představuje zdravotní riziko pro predisponované jedince (mláďata, oslabení jedinci, intenzivní chovy zvěře) nebo pro některé druhy volně žijících přežvýkavců

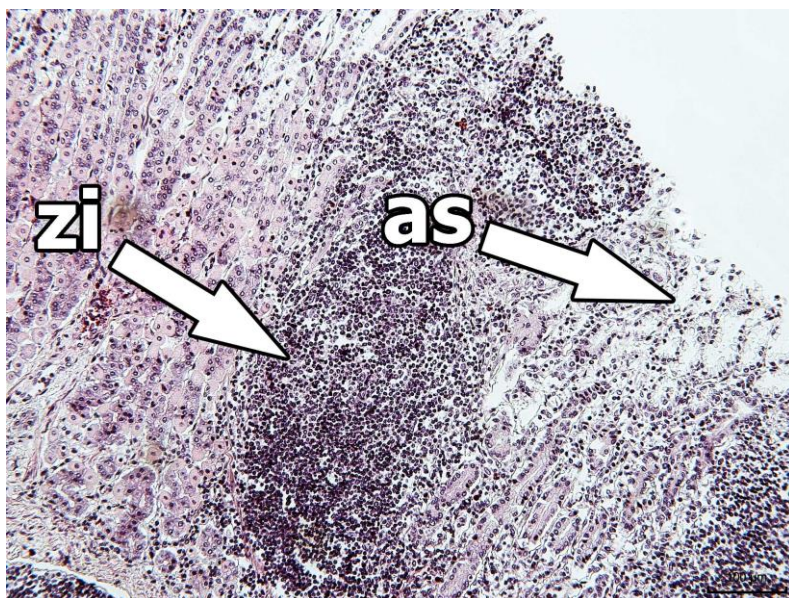


obr. 6. Slez infikovaný ashworthiózou – postížená sliznice (spodní část fotografie) má výrazně odlišnou barvu a obsahuje zřetelnou hemoragickou lézi (hl) o velikosti  $3,5 \times 1,5$  cm (foto J. Vadlejš)

Jedná se zejména o zubra evropského (*Bison bonasus*), který je jako relativně nový hostitel *A. sidemi* (Drózd et al., 1998) k ashworthióze velmi citlivý a u jehož populací v Polsku za poslední desetiletí došlo k enormnímu nárůstu prevalence tohoto invazního parazita. U infikovaných zubrů byly,



kromě histopatologických změn slezu a duodena (Osińska et al., 2010), sledovány i změny v krevních parametrech – pokles počtu erytrocytů, hladiny hemoglobinu a hematokritu (Kołodziej-Sobocińska et al., 2016). *A. sidemi* tak představuje určitou hrozbu pro populace zubra chované v rámci záchranných programů (Radwan et al., 2010). Nezanedbatelné riziko představuje invazní parazit i pro domácí přežvýkavce, kteří se zvěří sdílejí pastviny. Malí přežvýkavci či skot jsou kashworthióze také vnímaví (Kotrlá et al., 1976; Moskwa et al., 2015) a lze předpokládat, že negativní dopad této infekce u hospodářských zvířat bude ještě výraznější, než u zvěře.



obr. 7. Histologický řez slezem infikovaným ashworthiózou – na snímku je zřetelný zánětlivý infiltrát (zi) a rozvolněná autolyzovaná sliznice (as). Barvení hematoxylin-eosinem, zvětšení 200× (foto J. Vadlejš)

### 1.2.3 Tlumení a prevence

Péče o zvěř v intenzivních chovech i v honitbách je v ČR dlouhodobě a úzce spjata s tlumením parazitóz. Systematickému tlumení parazitóz zvěře je věnována zvýšená pozornost od 70. let minulého století, kdy k tomuto účelu byly ve Výzkumném ústavu pro biofarmacie a veterinární léčiva (nyní BIOPHARM, Výzkumný ústav biofarmacie a veterinárních léčiv) vytvořeny první léčivé přípravky. V důsledku edukační činnosti pracovníků tohoto ústavu a jeho spolupracovníků se podání antiparazitik zvěři v českých honitbách i intenzivních chovech značně rozšířilo a postupem času se plošné tlumení parazitů stalo rutinní součástí péče o zvěř. V určitých obdobích byla antiparazitární léčba zvěře dokonce hrazená státem (Kyrál, 2007; Koudela, 2010; 2014). Česká republika společně se Slovenskem, kde je situace s podáváním antiparazitik zvěři obdobná, jsou v tomto ohledu, v rámci států Evropské unie unikátní. V žádném jiném členském státě EU k takto plošnému podávání léčiv zvěři nedochází (Koudela, 2010; Mohelský, 2013).

Antiparazitikum se téměř výhradně podává zvěři bezkontaktně, ve formě medikovaného krmiva. V současnosti jsou k terapii parazitóz zvěře k dispozici dva přípravky – Rafendazol (účinné látky rafoxanid a mebendazol) a Cermix (ivermektin). Kontaktní podání léčiva (enterální či parenterální) je z důvodu problematického odchycení zvěře a manipulace s ní použitelné pouze

v určitých typech intenzivních chovů či v rámci výzkumné činnosti (Lamka et al., 1997). Aplikace antiparazitik je ošetřená legislativně (veterinární zákon č. 166/1999 Sb. a zákon č. 378/2007 Sb. o léčivech). Optimální účinnosti antiparazitik je dosaženo při jejich podání zvíři od listopadu do poloviny února (Forejtek et al., 2010), nicméně je třeba respektovat aktuálního nařízení orgánů veterinárního správy, která termín podání MK upravuje. Dle Metodiky kontroly zdraví zvířat a nařízené vakcinace vydané v aktuálním roce Státní veterinární správou (SVS) lze antiparazitární přípravky v honitbách na území ČR většinou podávat v průběhu února daného roku. V důsledku mimořádných veterinárních opatření pak SVS může uživatelům honiteb podání léčiva povolit pouze na výjimku. Antiparazitika v intenzivních (oborních a farmových) chovech lze, s přihlédnutím k ochranným lhůtám léčivých přípravků, použít v průběhu celého roku (zákon č. 449/2001 Sb. o myslivosti).

Podání antiparazitik zvíři je vždy třeba předem zvážit na základě výsledků parazitologického vyšetření. Pro dosažení maximálního terapeutického efektu antiparazitika je potřeba dodržovat určitá pravidla. Vlastní aplikaci léčivé látky, respektive MK, by měla předcházet návyková fáze, která minimalizuje vznik zdravotních komplikací spojených s přesycením zvíře jadrným krmivem (Kyrál, 2007; Ševčík, 2013). MK je potřeba připravit přesně dle instrukcí výrobce medikovaného premixu a užívat ho pouze v souladu s jeho doporučením, aby nedocházelo ke snížení jeho terapeutické



účinnosti. MK by mělo být v honitbách aplikováno ve spolupráci s veterinárním lékařem a výhradně v povoleném zimním období, kdy má zvěř nedostatek přirozené potravy a je tak předpoklad maximálního příjmu podaného krmiva. Podle aktuálního stavu zvěře by mělo být MK dodáno na dostatečný počet krmných míst tak, aby se k němu dostalo co nejvíce jedinců a předešlo se přesycení nejsilnějších kusů zvěře (Kyrál, 2007; Ševčík, 2013). Po provedené terapii by měla vždy být zjištěna její účinnost.

Zatímco je tlumení parazitóz u zvěře v honitbách tak, jak je praktikováno v současnosti v ČR, diskutabilní (Rajský et al., 2011; Koudela, 2014), podání antiparazitik v intenzivních chovech je ve většině případů opodstatněné. V oborních chovech, které jsou zaměřeny především na produkci trofejní zvěře, chov geneticky cenných jedinců, či na chov vzácných a ohrožených druhů zvěře a ve farmových chovech zaměřených na produkci zvěřiny je dopad parazitóz mnohem výraznější, než u zvěře ve volnosti.

Většina informací týkajících se tlumení parazitóz je zaměřena výhradně na autochtonní druhy parazitů přezvýkavé spárkaté zvěře a účinností antiparazitik proti invazní hlístici *A. sidemi* se dosud žádná domácí ani zahraniční studie nezabývala. Na základě vlastních, dosud nepublikovaných výsledků však můžeme konstatovat, že v intenzivních chovech zvěře lze při správně provedeném podání antiparazitik dosáhnout požadovaného efektu potlačení ashworthiózy. V dančí oboře, v níž provádíme kontinuální několikaletý výzkum zaměřený na invazního

parazita *A. sidemi* bylo po podání medikovaného krmiva pozorováno výrazné snížení intenzity ashworthiózy. Potlačení parazitózy bylo nejen prokazatelné na základě pitev ulovených zvířat, ale i vizuálně zřejmé na úrovni celé populace dančí zvěře, která byla po antiparazitárním zásahu mnohem vyrovnanější a trofeje dosáhli vyšší kvality.

Nedílnou součástí tlumení parazitóz je prevence spočívající v dodržování hygienických podmínek při aplikaci léčiv, hygieny krmných zařízení i okolí krmišť (mechanické odstraňování výkalů a chemická dezinfekce prostředí krmelců) (Kýral, 2007; Ševčík, 2013) a v neposlední řadě včasný selektivní odlov nejslabších jedinců, kteří jsou zdrojem parazitů pro ostatní zvěř (Rajský et al., 2011). Neopomenutelným preventivním opatřením je zabránění zavlečení parazitů (zvláště invazních druhů) společně s importovanou zvěří z oblastí, kde je prevalence parazitóz vysoká (Vadlejch et al., 2017a).

## 2 METODICKÁ ČÁST

Podání antiparazitika by vždy mělo předcházet parazitologické vyšetření reprezentativního počtu jedinců daného druhu zvěře (alespoň 10 jedinců), které poskytuje přehled o druhovém spektru parazitů v hostitelích a současně odhad intenzity infekce těmito parazity vyvolané. K těmto účelům slouží řada intravitálních i postmortálních technik. Každá z metod má své výhody, ale i omezení a informace o skutečném parazitárním zatížení zvěře je většinou možné získat pouze kombinací více metod.

Na základě výsledku vyšetření by se měl daný myslivecký subjekt, majitel obory či farmy rozhodnout, jestli je nutné zvěři antiparazitika podat, případně jakou účinnou látku zvolit. Při rozhodování by měl vždy zvážit nejen benefity, ale i negativní důsledky podání antiparazitik zvěři (přítomnost reziduí léčiv ve zvěřině, ovlivnění flóry a fauny metabolity léčivých látek uvolňovaných do prostředí, vznik lékové rezistence při příliš častém podávání antiparazitika apod.).

V honitbách by se k podání antiparazitika mělo přistupovat výhradně terapeuticky, v indikovaných případech (vysoká intenzita parazitózy, výskyt patogenních nebo invazních druhů parazitů apod.). V intenzivních chovech zvěře je situace poněkud odlišná (obecně vyšší parazitární zatížení zvěře) a při rozhodování je třeba vzít v úvahu především dopad parazitóz na zaměření daného

chovu. Zcela zásadní roli v tomto procesu hraje diagnostika parazitóz a přesná determinace jejich původců.

## **2.1 Intravitální diagnostika**

### **2.1.1 Morfologické metody**

Pro zjišťování výskytu parazitů u živých zvířat se standardně používají koprologické metody, které detekují přítomnost propagačních stadií parazitů (oocysty, či cysty prvků a vajíčka helmintů) ve výkalech hostitele. Tyto útvary se pak identifikují a determinují na základě morfologických a morfometrických znaků. Podle fyzikálního principu, který daná diagnostická metoda využívá, lze rozlišit flotační a sedimentační metody. Pro diagnostiku GI hlístic se používají flotační metody, při nichž se vajíčka hlístic v důsledku přidání flotačního roztoku o vyšší hustotě než jsou propagační stadia, koncentrují v povrchové vrstvě tekutiny. Zde jsou vajíčka odebrána a mikroskopicky vyhodnocena.

#### **2.1.1.1 Získání a skladování vzorku**

Velmi důležitým krokem před vlastním koprologickým vyšetřením je správné získání a uchování

vzorku (Zajac a Conboy, 2012). Vzorky výkalů by měly být získány individuálně, přímým odběrem z rekta vyšetřovaného jedince. Protože je odchyt a manipulace se zvířím v naprosté většině případů nereálná, získává se vzorek výkalu z ulovené zvířete. Je potřeba zvážit vhodnost daného jedince pro parazitologické vyšetření. Koprologické vyšetření vzorků pocházející pouze od jedinců ze selektivního odstřelu totiž nepodává reálný přehled o parazitárním zatížení stáda. Preventivní odlov jedinců je praktikován právě z důvodu eliminace jedinců s viditelnými příznaky onemocnění a podává tak falešně pozitivní výsledky. Proto je vhodné získat vzorky i z jiných ulovených zvířat (alespoň 10 jedinců), ideálně obou pohlaví. Z důvodu nerovnoměrného rozložení parazitů ve stádě zvířat (80 % hlístic se nachází ve 20 – 30 % zvířat ve stádě) (Sréter et al., 1994) neposkytují směsné vzorky od neznámého počtu jedinců reálný pohled na parazitární zatížení stáda. Směsný vzorek totiž může pocházet právě od jedinců s vysokou intenzitou parazitózy, což podává falešně pozitivní výsledek a naopak.

Pokud není možné získat výkaly rektálně (např. z důvodu vyprázdnění jedince), lze pro koprologické vyšetření využít výkaly z prostředí, vždy však co nejdříve po jejich vyloučení zvířetem. Takovéto výkaly lze rozeznat podle jejich relativně vyšší teploty ve srovnání s okolní teplotou a zároveň podle jejich lesklého povrchu, který je způsoben fyziologickou přítomností zbytkového čirého hleny z GI traktu zvířete. Výkaly, které byly několik dní

vystaveny působení prostředí, již nejsou pro koprologické vyšetření vhodné. Poměrně rychle do nich začínají migrovat půdní roztoči a saprofytické druhy hlístic, které diagnostiku ztěžují.

Vzorky výkalů by měly být ihned po jejich získání uloženy do vhodné odběrové nádoby, opatřeny identifikačními údaji (ideálně datum a místo odběru, druh a pohlaví jedince a odhad jeho věku) co nejrychleji vyšetřeny. Je možné výkaly krátkodobě skladovat, ale měly by být uchovávány v odpovídajících podmínkách, které neovlivní výsledek vyšetření. Výkaly se ideálně skladují v anaerobním prostředí při teplotě  $\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (chladničková teplota). Koprologická diagnostika hlístic je založena na detekci a determinaci jejich vajíček (tzv. ovoskopické metody). Pokud jsou výkaly uchovávány v podmínkách vhodných pro vývoj hlístic (přístup kyslíku, teplota  $\geq 20\text{ }^{\circ}\text{C}$  a dostatek vlhkosti), dochází poměrně rychle k larválnímu vývoji a ovoskopická diagnostika je tím znemožněna. Z tohoto hlediska se jako nejvhodnější jeví skladování výkalů v uzavíratelném igelitovém sáčku, z něhož se před uzavřením vytlačí vzduch a celý sáček se vloží do dalšího uzavíratelného sáčku, který se opět zbaví vzduchu (viz obr. 8). Zmrznutí výkalů nebo jejich plísňová kontaminace mohou přítomná vajíčka hlístic poničit a negativně tak ovlivnit výsledek vyšetření.



obr. 8. Správné uložení vzorku před koprologickým vyšetřením (foto J. Vadlejš)

Pro dosažení relevantních výsledků je potřeba vzorek vyšetřit co nejrychleji. Pokud není možné vzorky vyšetřit během krátké doby (přibližně do týdne) od jejich získání, lze je konzervovat. K tomuto účelu lze využít chemikálie jako Lugolův roztok či formalín. Před konzervací vzorku je ale třeba zvážit jeho další využití, protože formaldehyd degraduje DNA a znemožňuje tak molekulární diagnostiku.

### **2.1.1.2 Koprologie**

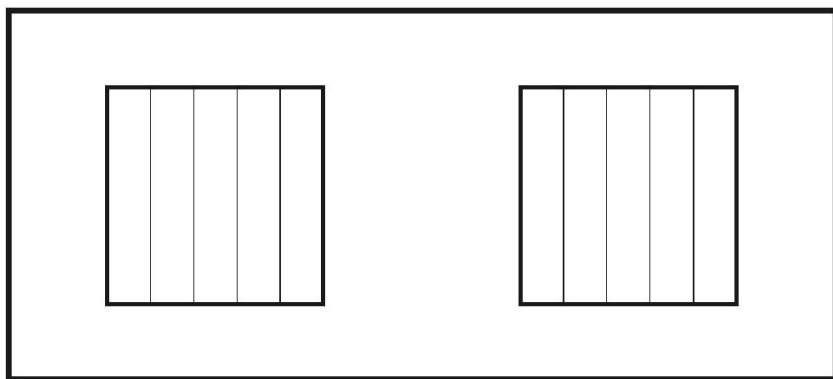
Pro detekci GI hlístic a kvantifikaci jimi způsobených infekcí byla dosud vytvořena řada koprologických (flotačních) metod. V diagnostických laboratořích se běžně používá McMasterova metoda, která byla pro diagnostiku většiny druhů GI hlístic mnoha studiemi vyhodnocena jako nejvhodnější. Pro intravitální detekci ashworthiózy však není McMasterova metoda vyhovující. Mnohem citlivější v tomto ohledu je Cornell-Wisconsinova metoda, která s využitím speciálně navržené pomůcky (Vadlejch et al., 2019) poskytuje spolehlivější výsledky.

Pracovní postup modifikované Cornell-Wisconsinovy metody:

- do třecí misky se vloží 10 g výkalu a zalije se 30 ml odstáté kohoutkové vody
- fekální směs se tloučkem roztírá do pastovité konzistence
- vzniklá fekální suspenze se převede přes kuchyňské sítko do nádoby
- z nádoby se přelije 15 ml suspenze do centrifugační zkumavky
- po 5 minutové centrifugaci při 1 200 otáčkách (RPM) se opatrně slijí supernatant
- ke vzniklému sedimentu ve zkumavce se přilije flotační roztok (směs nasyceného NaCl a glukózy o



- finální hustotě 1 280 g.cm<sup>-3</sup>) zhruba do poloviny výšky zkumavky a pomocí Pasteurovy pipety se obsah zkumavky opatrně, ale řádně zhomogenizuje
- přilije se flotační roztok tak, aby zkumavka byla plná a na hladině se vytvořil se tzv. pozitivní meniskus
  - na hladinu tekutiny se opatrně přiloží mikroskopické krycí sklo a zkumavka se nechá alespoň 30 minut v klidu stát nebo se centrifuguje 3 minuty při 1 100 RPM
  - krycí sklo se opatrně sejme a spodní stranou, kde je z fekální suspenze vytvořena kapka, se vloží na mikroskopické podložní sklo, respektive na pomůcku pro diagnostiku ashworthiózy (viz obr. 9)
  - prohlížením celé plochy krycího skla se zaznamenávají všechna přítomná vajíčka hlístic
  - pro zpřesnění diagnostiky je potřeba výše uvedeným způsobem vyšetřit celý připravený vzorek (30 ml), tedy dvě zkumavky, respektive dvě krycí skla
  - součet všech nalezených vajíček na obou krycích sklech představuje intenzitu parazitózy



obr. 9. Schematické znázornění pomůcky pro zdokonalení diagnostiky ashworthiózy (originál J. Vadlejš)

Při interpretaci výsledků koprologického vyšetření je vždy potřeba zohlednit řadu faktorů hostitele (fyziologický stav, pohlaví, věk), parazita (adaptační mechanismy na přežívání nepříznivých podmínek) i prostředí (sezóna), které mohou odhad parazitárního zatížení daného jedince ovlivnit. Nevýhodou koprologické (ovoskopické) diagnostiky je skutečnost, že je schopná prokázat pouze patentní fázi infekce a dále to, že vajíčka většiny trichostrongylidních hlístic jsou morfologicky velmi podobná (viz obr. 5) a jejich přesná determinace je mnohdy nemožná. Z tohoto důvodu je potřeba ze vzorků pozitivních na přítomnost trichostrongylidních hlístic vykultivovat infekční larvy (tzv. koprokultura), u kterých je determinace spolehlivější.

### 2.1.1.3 Koprokultura

Správná determinace původce parazitózy je zcela zásadní při mapování výskytu, zvolení vhodné antiparazitární terapie, či při vyhodnocení účinnosti terapeutického zásahu. Vajíčka většiny zástupců trichostrongylidních hlístic nelze morfologicky spolehlivě determinovat ani na úroveň rodů. Na pozitivní koprologické vyšetření by tak měla navazovat koprokultura. Jedná se o inkubaci výkalů ve specifických podmínkách (stálá teplota a vlhkost), při kterých se z přítomných vajíček vyvinou infekční larvy. Tato stadia pak už lze na základě morfologických a morfometrických znaků mnohem spolehlivěji determinovat do rodu nebo dokonce až na úroveň druhu. Existuje několik přístupů, které se liší v metodice provedení, použité teplotě a délce inkubace, druhem materiálu přidaného do koprokultury pro udržení vlhkosti, či v technice získání vykultivovaných larev (Rossanigo a Gruner, 1996; van Wyk a Mayhew, 2013).

Vlastní pracovní postup koprokultury:

- využívá se směsný vzorek (cca 200 g) stáda získaný z více jedinců rektálně nebo z prostředí, co nejdříve po vyloučení zvířetem (viz kapitola 2.1.1.1); na základě vlastní zkušenosti je potřeba výkaly z prostředí zbavit přichycených částeczek půdy a

vegetace, které často obsahují saprofytické půdní hlístice ztěžující determinaci

- výkaly se vloží do jednoho či více igelitových sáčků a dle množství výkalů se k nim přidají 3 – 4 polévkové lžíce vermikulitu o střední hrubosti (zrnitost 1,4 – 6 mm)
- sáček s výkaly se tlakem mezi prsty zhomogenizuje a dle vytvořené konzistence se případně pomocí rozprašovače zvlhčí odstátou kohoutkovou vodou
- v případě průjmovité konzistence výkalů se naopak přidá další vermikulit tak, aby výsledná konzistence fekálního materiálu měla hrudkovitou konzistenci
- pootevřený sáček se nechá inkubovat 7 dní při teplotě  $\pm 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ ; je možné také nechat sáček inkubovat 14 dní při laboratorní teplotě ( $22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ )
- v průběhu inkubace se koprokultura ideálně denně kontroluje a homogenizuje se mezi prsty; pokud je obsah sáčku příliš suchý, zvlhčuje se kohoutkovou vodou
- po uplynutí inkubační doby se obsah sáčku vloží do připravené Baermannovy aparatury (viz obr. 10)
  - svorkou se uzavře hadička
  - do trychtýře se napustí vlažná kohoutková voda o takovém objemu, aby mělo kuchyňské síto umístěné v trychtýři dno ponořené ve vodě
  - do síta se vloží buničitá vata a na ní se navrství kultivovaný fekální materiál



obr. 10. Baermannova aparatura s kultivovanými výkaly (foto J. Vadlejš)

- za 24 hodin se z Baermannovy aparatury odpustí několik ml tekutiny, ve které jsou nahromaděné vykultivované larvy (viz obr. 11)
- na základě vlastních zkušeností je vhodné získanou fekální tekutinu, která je příliš tmavá na prohlížení, nechat několikrát dekantovat v ledničce při  $\pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$

- sediment se mikroskopicky prohlédne, vyjádří se celkový počet infekčních larev hlístic a determinuje se alespoň 10 % larev



obr. 11. Infekční larvy trichostrongylidních hlístic získané koprokulturou, zvětšení 200× (foto J. Vadlejš)

Výsledný počet vykultivovaných larev a jejich druhové zastoupení mohou být ovlivněny odlišnými nároky jednotlivých druhů hlístic na vývoj (Rossanigo a Gruner, 1996). Ekologické nároky alochtonního parazita *A. sidemi* sice dosud nebyly definovány, ale na základě vlastní zkušenosti můžeme pro vývoj tohoto druhu do infekčního stadia L<sub>3</sub> doporučit inkubační dobu minimálně 5 dní při teplotě 27 °C. Morfologické a morfometrické charakteristiky infekčních larev jednotlivých druhů trichostrongylidních hlístic vykazují určité rozpětí, které může být ovlivněno jak

podmínkami prostředí (teplota a délka inkubace), tak samotným hostitelem (imunitní systém). U některých druhů hlístic se dokonce rozpětí určitých morfometrických charakteristik překrývá (van Wyk et al., 2003; van Wyk a Mayhew, 2013). Přes tyto nevýhody, ke kterým lze přičíst i časovou náročnost metody (procedura i vyhodnocení) a dostatečné determinační zkušenosti, je morfometrická analýza (zejména s využitím softwaru pro analýzu obrazu) infekčních larev hlístic mnohem přesnější než samotná ovoskopická determinace.

## 2.1.2 Molekulární metody

Určité nevýhody diagnostických metod založených na morfologii (viz kapitoly 2.1.1.2 a 2.1.1.3) lze překonat s využitím molekulárních metod. Tyto metody založené na detekci specifických úseků DNA hledaného parazita jsou velmi citlivé a lze pomocí nich prokázat parazita i v malém množství biologického materiálu.

Pro účely molekulární detekce *A. sidemi* se nám osvědčilo využít larvy získané koprokulturou (Vadlejch et al., 2018a). Lze použít i vajíčka, ale ta jsou relativně malá a ve srovnání s L<sub>3</sub> larvami *A. sidemi* (viz kapitola 1.1.2) poskytují mnohem méně genetického materiálu. Navíc lze infekční larvy získat v čistém stavu, bez nadbytečného biologického materiálu, který by mohl průběh použité

molekulární metody negativně ovlivnit. Podle vlastní zkušenosti lze L<sub>3</sub> larvy po fixaci Lugolovým roztokem skladovat i několik měsíců aniž by došlo k poškození jejich DNA.

### **2.1.2.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

K molekulární diagnostice ashworthiózy je vhodná polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction – PCR), která detekuje specifický úsek DNA parazita. V případě hlístice *A. sidemi* se diagnosticky osvědčil úsek ribozomální DNA o velikosti 406 pb (Moskwa et al., 2014). Před vlastním provedením PCR je vždy vhodné mikroskopicky zkontrolovat aktuální stav použitého biologického materiálu (případné poškození L<sub>3</sub> larev a jejich počet), zejména pokud je delší doba skladovaný. PCR je relativně velmi citlivá metoda a je proto potřeba, aby při každé analýze byly dodrženy stejné podmínky (počet larev, metoda izolace DNA, chemikálie i přístrojové vybavení) aby nedocházelo k ovlivnění výsledku. Izolace DNA z vyšetřovaného materiálu je zřejmě nejkritičtější krok celé metody. Infekční larvy mají značně odolné povrchové struktury (dvě vrstvy kutikuly) a je proto potřeba tyto vrstvy nejdříve dezintegrovat, aby bylo možné získat DNA somatických buněk jednotlivých larev. Pro tento účel se nám osvědčila chlazená ultrazvuková dezintegrace. Pro vlastní



izolaci DNA je pak dostačující komerční izolační kit (např. DNeasy Blood & Tissue).

### Postup polymerázové řetězové reakce (PCR):

- úprava infekčních larev před izolací DNA
  - směs larev v mikrozkušavkách se sonikuje na ledu – 30 sekundové pulzy (3×) s minutovými přestávkami
  - mikroskopicky se zkontroluje úspěšná dezintegrace larev
  - mikrozkušavky po sonikaci se centrifugují (10 min při 15 000 RPM), supernatant se opatrně odpipetuje a v mikrozkušavce se ponechá pouze sediment larev s minimálním množstvím tekutiny
  - k sedimentu se přidá proteináza K a nechá se působit minimálně 3 hodiny (ideálně do druhého dne) při teplotě 56 °C
- vlastní izolace DNA probíhá s využitím chemikálií a dle instrukcí výrobce izolačního kitu
- amplifikace 406 pb rDNA *A. sidemi*
  - do mikrozkušavek se napipetuje reakční směs – vyizolovaná DNA, PCR pufr, DNA polymeráza,  $Mg^{2+}$ , nukleotidy (dNTP) a primery *A. sidemi* R-specific (5'-ACA ACA TTA ACA CCT GTT GCA TGT-3') a *A. sidemi* F-specific (5'-ACT GTA TCC GAA TAT ATA TCG GAG-3')

- vlastní PCR reakce probíhá v následujících krocích – iniciální denaturace (95 °C, 5 min), 35 denaturačních cyklů (95 °C, 45 s), hybridizace (52 °C, 45 s), elongace (72 °C, 1 min) a finální elongace (72 °C, 10 min)
- amplifikované fragmenty DNA se elektroforeticky separují na 2% agarózovém gelu po přidavku fluorescenčního barviva
- finální vizualizace gelu probíhá pod UV lampou

Přes všechny výhody molekulárních metod je třeba zmínit i jejich nedostatky. Metody založené na detekci DNA jsou velmi citlivé a analyzovaný biologický materiál musí být řádně skladovaný a připravený, aby nedocházelo k jeho kontaminaci či degradaci, respektive ke zkreslení výsledků analýz. Molekulární metody vyžadují dostatečnou laboratorní zručnost, přesnost, a zkušenost práce s molekulárními diagnostickými přístroji. V neposlední řadě dosud nebyla vyřešena otázka kvantifikace detekované DNA, především na úrovni diagnostikovaného jedince. PCR detekce je tak vítaný nástroj pro monitoring ashworthiózy v populacích zvěře, ale pro stanovení intenzity parazitózy u jednotlivců ještě není tato metoda standardizovaná.

## 2.2 Postmortální diagnostika

Zatímco intravitální diagnostika poskytuje přehled o dospělých parazitech, kteří se v hostiteli aktuálně nacházejí a zároveň více, či méně přesný odhad intenzity infekce, kterou tito paraziti vyvolávají, postmortální diagnostika odhaluje reálné parazitární zatížení vyšetřovaného jedince, včetně patologických změn vyvolaných parazitací.

### 2.2.1 Parazitologická pitva

Základem postmortální diagnostiky je parazitologická pitva, kterou lze podle rozsahu vyšetření rozlišit na celkovou pitvu se zaměřením na všechny orgány a tkáně hostitele a pitvu orgánovou zaměřenou na konkrétní orgán hostitele. Podle potřeby lze parazitologickou pitvu provést jako úplnou (zachycení všech vývojových stadií přítomných parazitů) či pitvu neúplnou (zaměření pouze na makroskopicky viditelné parazity) (Letková, 1993). Pro účely zjištění parazitárního zatížení hostitele hlísticí *A. sidemi* je vhodná úplná orgánová pitva. Metodické doporučení pro provedení parazitologické pitvy vydala Světová asociace pro rozvoj veterinární parazitologie (World

Association for the Advancement of Veterinary Parasitology – WAAVP) (Wood et al., 1995).

Postup parazitologické pitvy se zaměřením na detekci *A. sidemi*:

- otevření tělní dutiny zvířete a vyjmutí trávicího traktu; přitom je třeba dbát zvýšené opatrnosti, aby nedošlo k proříznutí, či jinému poškození vyšetřovaného orgánu (slezu)
- oba konce slezu se podváží, aby po oddělení od zbytku traktu obsah orgánu nevytekl
- oddělený slez se přenesse do nádoby, podélně se rozstříhne a jeho obsah se do nádoby vyprázdní
  - již v této fázi lze pozorovat (jak na sliznici slezu, tak v jeho obsahu) přítomnost hlístic (viz obr. 12)
- sliznice slezu se obrátí vnitřní stranou vzhůru a do nádoby se propláchne slabým proudem vody
- nádoba s obsahem se rozředí fyziologickým roztokem a důkladně se promíchá
- získaný materiál se pak po částech převede na laboratorní síta s velikostí ok 500 – 600  $\mu\text{m}$  a propláchne se slabým proudem vody
- protékající tekutina se zachytává do tácu a nakonec se přecedí přes síto s velikostí ok 50 – 100  $\mu\text{m}$
- přebytečný fekální materiál projde přes síta a dospělci a juvenilní stadia (oka 500 – 600  $\mu\text{m}$ ) nebo larvy (oka 50 – 100  $\mu\text{m}$ ) hlístic se na sítích zachytí

- síta se zachycenými parazity se následně promyjí vodou a společně s ní se vylíjí do táčů (ideálně tmavě zbarvených)
- v obsahu táčů se pak makroskopicky nebo s využitím lupy hledají jednotlivá stadia hlístic, která se přenášejí do nádoby s fyziologickým roztokem
- získané hlístice zbavené nečistot se pak převedou do 70% ethanolu, v němž se skladují pro pozdější morfologickou či molekulární determinaci



obr. 12. Pohled do slezu vyšetřovaného zvířete; v obsahu je zřetelně vidět několik dospělých samic *Ashworthius sidemi* (foto J. Vadlejš)

Pro komplexní zhodnocení parazitárního zatížení vyšetřovaného jedince a pro vyhodnocení účinnosti antiparazitárního zásahu je potřeba zjistit nejen počet dospělců a juvenilních stadií jednotlivých hlístic, ale i počet jejich larev. Larvální stadia, pokud se nacházejí v histotropní nebo hypobiózní fázi jsou zanořena ve sliznici a je potřeba je získat jiným způsobem než standardní pitvou. Pro tyto účely se sliznice vyšetřovaného orgánu upravuje (chemicky či mechanicky) a uvolněné larvy se pak mikroskopicky prohlíží. Řádně propláchnutá sliznice vyšetřovaného orgánu se vnitřní stranou položí do tácu naplněného teplým fyziologickým roztokem a nechá se při laboratorní teplotě ( $22 \pm 2$  °C) přes noc inkubovat. Larvální stadia ze sliznice migrují do tekutiny, která se po uplynutí inkubační doby slije do kónické nádoby. Obsah nádoby se nechá několikrát dekantovat a sediment se mikroskopicky prohlíží na přítomnost larev (Hansen a Perry, 1994).

Interpretaci výsledků parazitologické pitvy je potřeba provádět s ohledem na druh zvíře, pohlaví a věk vyšetřovaného jedince, celkový zdravotní stav, či zjištěné patologie. Obecně se za mezní hladinu infekce považuje 1 500 dospělců hematofágních slezových hlístic na jednoho jedince. Takováto abundance hlístic již může mít znatelný dopad na zdravotní stav populace zvíře (Eve a Kellog, 1977).

Nevýhodou postmortální diagnostiky je její pracnost, značná časová náročnost a samozřejmě nutnost ulovení, či úhynu vyšetřovaného jedince.

## 2.2.2 Morfologická determinace

Pitevně získané hlístice se determinují podle morfologických a morfometrických znaků nebo na základě molekulárních analýz.

Pro rutinní diagnostické účely je morfologická determinace využívána mnohem častěji a je dostačující. Podle morfologie a morfometrie specifických znaků (např. spikuly samců a ústní kapsula u obou pohlaví) lze většinu druhů hlístic spolehlivě rozpoznat. Tyto znaky jsou poměrně stabilní a nedochází k jejich ovlivnění faktory prostředí, či hostitele. Morfologická determinace však vyžaduje určité zkušenosti a striktní využívání pouze vhodných (doporučených) rozlišovacích znaků. Pouhou makroskopickou prohlídkou hlístic nelze některé druhy hlístic od sebe rozeznat. Jedná se například o slezové hematofágní hlístice *Haemonchus contortus* a *Ashworthius sidemi*. Pro správnou determinaci je potřeba využít morfologie a morfometrie spikul samců a morfologii ústní kapsuly. Spikuly samců *H. contortus* nejsou obě stejně dlouhé (383 – 475  $\mu\text{m}$ ), mezi nimi se nachází gubernákulum a na konci jsou spikuly opatřeny špičkami (viz obr. 13) (Lichtenfels et al., 1994). Oproti tomu obě spikuly *A. sidemi* dosahují shodné a až dvojnásobné délky (709 – 817  $\mu\text{m}$ ) spikul *H. contortus* a nevyskytuje se u nich gubernákulum. Jejich unikátním rysem je kutikulární pochva, která kryje distální zakončení (Schulz, 1933; Pike, 1969) (viz obr. 4).



obr. 13. Pohled na zadní konec těla samce *Haemonchus contortus* – bursa copulatrix s typickými spikulami, mezi nimiž se nachází gubernákulum, zvětšení 200x (foto J. Vadlejš)

Některé jedince, zejména pak samice, však na základě jejich morfologických znaků nelze spolehlivě determinovat. V těchto případech je vhodné několik jedinců podrobit sekvenci vybraného úseku DNA a výsledky pak porovnat se záznamy uveřejněnými v genetické databázi.



## 2.3 Tlumení

V případě, že je invazní hlístice *A. sidemi* u zvěře prokázána (ideálně kombinací intravitální a postmortální diagnostiky) a je zjištěna vysoká intenzita infekce, je vhodné zasáhnout terapeuticky. Předem je však potřeba zvážit vhodnost tohoto zásahu, ale i negativní dopady (viz kapitola V.). Před antiparazitárním zásahem by nejdříve měl být zjištěn aktuální počet zvěře (a odhad její hmotnosti), které se bude dané léčivo podávat a podle výsledků parazitologického vyšetření (druhové spektrum parazitů a intenzita infekce) nakoupit MK s vhodnou účinnou látkou. Pro dosažení maximální účinnosti MK je potřeba zajistit takové podmínky (viz kapitola 1.2.3), aby každý léčený jedinec obdržel dostatečnou terapeutickou dávku léčiva. Dodržení této zásady je však u volně žijících zvířat (zejména u zvěře v honitbách) velmi problematické a z těchto důvodů je léčba zvěře diskutabilní. V určitých případech (viz kapitola 1.2.3) je však antiparazitární terapie opodstatněná.

V současnosti lze MK pro zvěř zakoupit v řadě společností, které se výrobou krmných směsí zabývají. Je ale potřeba zmínit, že výroba MK je vázána na veterinární předpis, na jehož základě výrobní krmných směsí MK s požadovanou účinnou látkou vyrobí. Komerčně jsou dostupné dva druhy antiparazitárních přípravků, respektive dvě účinné látky – ivermektin (Cermix) a kombinace rafoxanidu a mebendazolu (Rafendazol). Na základě

vlastních výsledků výzkumu účinnosti antiparazitárních přípravků proti ashworthióze můžeme doporučit ivermektin. Důležitým krokem je správná příprava MK. Na základě poznatků z praxe musíme konstatovat, že při individuální přípravě MK často dochází k chybám, které vedou k nedostatečné homogenizaci (např. promíchání lopatou) antiparazitárního přípravku s krmivem a tudíž k nerovnoměrnému dávkování léčivé látky. Výsledkem je pak snížená účinnost MK, což může vést ke vzniku anthelmintické rezistence. Z tohoto důvodu doporučujeme zakoupit ve výrobně krmných směsí s povolením medikace již namíchané MK, které lze zvěři již přímo předložit. Je ale potřeba si uvědomit, že toto MK nemusí obsahovat vyvážený poměr živin, respektive vlákniny, kterou je vhodné dodat ve formě objemných krmiv (seno, senáž, siláž) případně dřevin k ohryzu. Alespoň dva týdny před aplikací MK je nezbytné podávat (postupně se zvyšující dávky) zvěři jadrné krmivo, které v předchozím období neměla k dispozici a do které bude léčivý přípravek zamíchán. Trávicí trakt zvěře se tak postupně připraví na příjem jadrných krmiv a předejde se tak přesytení zvěře, respektive zdravotním komplikacím.

V tomto přípravném (navykacím) období, kdy se zvěř koncentruje u krmišť, se osvědčilo zhodnotit její aktuální zdravotní stav a kondici, odhadnout počet kusů, poměr pohlaví a hmotnost jednotlivých kusů. MK je vhodné podávat dle výše zjištěných informací na více krmných míst současně, aby se léčivá látka dostala ke všem jedincům.

Pokud jsou krmná místa příliš blízko sebe, není dosaženo požadovaného účinku, protože samice a mláďata (případně slabší jedinci) se nemusejí k MK dostat.

Po každé aplikaci antiparazitik zvěři by měla být vyhodnocena účinnost tohoto opatření. V případě, že byl antiparazitární zásah neúčinný, je třeba hledat příčiny, aby nedocházelo k případnému prohlubování lékové rezistence. Pro vyhodnocení účinnosti antiparazitární terapie u hospodářských zvířat byla vytvořena řada metod, pro které asociace WAAVP vydává aktualizovaná doporučení k jejich provádění (Coles et al., 1992; Wood et al., 1995; Coles et al., 2006). Pro volně žijící zvířata takového metody dosud nebyly standardizovány, lze ale vycházet z doporučení pro hospodářská zvířata. Podle způsobu provedení lze metody zjišťování účinnosti léčby rozdělit na *in vivo* a *in vitro* testy. Nejčastěji se účinnost léčby ověřuje pomocí *in vivo* metod – intravitálně testem redukce počtu vajíček nebo postmortálně parazitologickou pitvou. Principem těchto metod je zjištění redukce intenzity parazitózy po aplikaci antiparazitika.

Test redukce počtu vajíček (Faecal egg count reduction test – FECRT) však pro vyhodnocení účinnosti léčby ashworthiózy zvěře není vhodný. FECRT je založený na vyhodnocení poklesu intenzity parazitózy po aplikaci léčiva u konkrétních jedinců. Protože u zvěře nelze s jistotou získat vzorky na individuální úrovni, jsou výsledky tohoto testu značně zkreslené. Další nevýhodou je skutečnost, že zvěř je běžně parazitována řadou druhů GI hlístic, jejichž vajíčka od sebe nelze morfologicky odlišit. Jednotlivé druhy

hlístic se přitom liší svojí plodností, která může výsledek metody dále ovlivnit. Navíc z informací o sezónní dynamice ashworthiózy vyplývá, že samice *A. sidemi* v určité období roku vajíčka, v reakci na nepříznivé podmínky prostředí, neuvolňují, což využitelnost FECRT dále limituje. V neposlední řadě FECRT spíše sleduje vliv podaného léčiva na produkci vajíček u samic parazita, než aby poskytoval informace o odstranění parazita z hostitele.

Jako mnohem vhodnější se pro tyto účely jeví parazitologická pitva, která odhaluje skutečné parazitární zatížení zvěře a poskytuje tak mnohem přesnější informace, alespoň na úrovni stáda. Před aplikací léčiva by mělo být s využitím standardní parazitologické pitvy (viz kapitola 2.2.1) vyšetřeno několik GI traktů ulovené zvěře pro získání přehledu o intenzitě parazitózy. Kontrolní postmortální vyšetření k vyhodnocení účinnosti terapeutického zásahu by mělo být provedeno 4 – 7 dní po aplikaci medikovaného krmiva obsahujícího léčivou látku s rychlým nástupem účinku a minimální perzistencí (benzimidazoly) a 10 – 14 dní po aplikaci léčivé látky s pomalejším nástupem účinku a perzistentními účinky (ivermektiny). Kromě vlivu antiparazitika na patentní infekci (dospělce parazita) je potřeba vyhodnotit i vliv léčivé látky na ostatní vývojová stadia parazita, která se v době ulovení v jedinci mohou nacházet.

Pro vyhodnocení účinnosti léčebného zásahu je možné využít i některé *in vitro* metody (test líhnutí vajíček, test vývoje larev, test inhibice krmení larev), které sledují

vývoj vyizolovaných parazitárních stadií (vajíčka, larvy) v prostředí léčiva, v přesně definovaných podmínkách. Tyto testy jsou však z důvodu pracnosti, časové a finanční náročnosti a především nároků na značné zkušenosti s interpretací výsledků, vhodné spíše pro experimentální účely.

Vyhodnocování účinnosti terapie u volně žijících zvířat je značně komplikované a ovlivněné řadou faktorů, které mohou výsledek vyšetření ovlivnit. Je potřeba mít na paměti, že vyhodnocování účinnosti terapie na individuální úrovni, z důvodu nemožnosti odchyty a manipulace se zvířeti, je nereálné. Vyhodnocuje se tak účinek antiparazitárního zásahu na úrovni celého stáda a je potřeba počítat s tím, že výsledek testu je pouze orientační a může poskytovat i falešně negativní výsledky (např. vyhodnocení účinnosti u zvířat, která již před léčbou měla nízkou intenzitu parazitózy). Pro získání co nejreálnějšího přehledu o účinnosti terapeutického zásahu je proto potřeba po aplikaci léčiva vyšetřit alespoň 10 zvířat.

## **2.4 Prevence**

Léčba parazitóz zvěře (především v honitbách) je komplikovaná řadou skutečností a mnohem vhodnější strategií je vhodnou péčí o zvěř negativním dopadům

parazitóz předcházet. Při dodržení určitých opatření (optimální početní stavy zvěře a dodržování pohlavní a věkové struktury populací, celoroční zabezpečení kvalitativně i kvantitativně vhodné a hygienicky nezávadné potravy a vodních zdrojů, omezení biotických i abiotických faktorů, které na zvěř působí negativně) je zvěř parazitována pouze v nízké intenzitě, což je přirozený jev, který není třeba řešit terapeutickým zásahem.

Poněkud odlišná je ale strategie zabraňující výskytu alochtonních, či invazních druhů parazitů (včetně *A. sidemi*). Základním preventivním opatřením je v tomto případě zamezení zavlečení parazitů společně se zvěří. Na základě vlastních zkušeností doporučujeme v tomto ohledu dodržovat zvláštní opatření zvláště při importu zvířat ze zemí s vysokou prevalencí konkrétní parazitózy. V dané zemi by ještě před transportem měla být zvířata, s přihlédnutím k aktuálním poznatkům o konkrétním parazitovi a k nálezové situaci, s využitím kombinace vhodných diagnostických metod řádně vyšetřena. V případě, že intravitální diagnostika není možná nebo její výsledky nejsou v konkrétním období roku dostatečně relevantní (sezónnost *A. sidemi*) a pravděpodobnost zavlečení parazita je vysoká, je opodstatněné při manipulaci s konkrétním jedincem kontaktní podání léčivé látky. V tomto ohledu se nám osvědčilo injekční podání ivermektinu. Po transportu do cílové země je vhodné zvířata na přechodnou dobu umístit do karantény, během které se kromě aklimatizace mohou opakovaně vyšetřit na

přítomnost parazitů. Zvláštní pozornost je třeba věnovat zvířatům, která jsou po transportu vypouštěna do volnosti.

### **III. Srovnání „novosti postupů“**



V předložené metodice jsou uvedeny postupy, výsledky vlastního sledování i praktické připomínky a doporučení, které současně vycházejí ze studia literatury (české i zahraniční) a z výzkumné činnosti autorů zaměřené na invazního parazita *A. sidemi*. Metodika obsahuje modifikace metod i vlastní, dosud nepublikované pracovní postupy, které dosud nebyly zveřejněny. Tyto informace umožní standardizovat diagnostiku ashworthiózy i ověřování účinnosti terapeutického zásahu a sjednotit tak výsledky mezi různými laboratořemi. S využitím zde publikovaných poznatků bude možné lépe vyhodnotit skutečný význam invazního parazita, respektive předejít ekonomickým ztrátám způsobených parazitózou, či nevhodným antiparazitárním zásahem, ale i reziduím léčivých přípravků ve zvěřině.

## **IV. Popis uplatnění metodiky**

Publikace je určena všem pracovníkům v oblasti péče o zvěř. Cílovými skupinami jsou zejména myslivecké spolky, obory, farmové chovy zvěře, dále pak orgány veterinární správy, pracovníci veterinárních ústavů, ale i veterinární lékaři, laboratorní pracovníci a studenti zemědělsky, veterinárně a přírodovědně zaměřených středních škol a univerzit.

## **V. Ekonomické aspekty**

Paraziti u volně žijících přežvýkavců vyvolávají více či méně závažné infekce, které za určitých podmínek mohou mít dopad na zdravotní stav, či produkci. Antiparazitární zásah a následná preventivní opatření se pak mohou výrazně promítnout do celkové ekonomiky chovu. Při hodnocení vlivu parazitózy na hostitele je vždy potřeba zohlednit řadu faktorů jako např. druh zvěře, její věk, pohlaví a aktuální fyziologický stav, patogenitu původce infekce, intenzitu infekce, typ, zaměření a management chovu, biotické a abiotické činitele působící na zvěř apod. Je potřeba zmínit, že zvěř je běžně parazitována několika druhy (až desítkami druhů) parazitů současně a vliv konkrétního druhu parazita na zdraví, či produkci zvěře v reálných podmínkách chovů tak nelze zcela relevantně vyjádřit. Mnohem přesnější informace je možné získat v kontrolovaných podmínkách, při experimentálních infekcích konkrétního druhu hostitele vybraným druhem parazita. Takováto studie zaměřená na dopad ashworthiózy na konkrétní druh zvěře však dosud nebyla uskutečněna. Z výše uvedených důvodů má předložená ekonomická rozvaha charakter teoretické modelové situace, která vychází z dostupných informací o invazním parazitovi *A. sidemi* a infekcích, které vyvolává. Jako modelový hostitel byl zvolen daněk evropský (*Dama dama*), který je jako autochtonní druh zvěře k této invazní parazitóze citlivý. Modelová situace u hostitele předpokládá majoritní výskyt hlístice *A. sidemi*.

Ashworthióza negativně ovlivňuje činnost GI traktu infikovaného jedince, což se v konečném důsledku může projevit úbytkem hmotnosti parazitované zvěře. Dle intenzity parazitózy se může jednat u jednoho jedince o snížení hmotnosti o 250 až 500 g živé hmotnosti (ž. hm.). Reálná výkupní cena dančího masa (zvěřiny) po odečtení srážek za nástřely je 60 Kč za 1 kg ž. hm. Za průměrného dospělého daňka v technologickém dílu (tj. zvěř v kůži, zcela vyvržená, bez distálních částí končetin a hlavy) lze tak získat 3 000 Kč. V důsledku úbytku hmotnosti způsobené ashworthiózou však dochází k finanční ztrátě 12 – 30 Kč na jednom uloveném jedinci, což je zanedbatelná částka. Pokud se ale myslivecký subjekt rozhodne parazitární zatížení řešit terapeuticky, musí nakoupit MK.

Antiparazitární krmná směs s Cermixem (balení 100 kg) aktuálně stojí 4 422 Kč s DPH. Výrobcem doporučené dávkování (0,2 mg ivermektinu na 1 kg ž. hm. a den) pro dančí zvěř o průměrné hmotnosti 65 kg tedy představuje 860 g MK na 1 jedince a den s tím, že MK se podává dva po sobě jdoucí dny. Podání MK jednomu jedinci tak stojí 76 Kč. Při 100% účinnosti MK tak u léčeného jedince může dojít k zvýšení hmotnosti až o 0,5 kg, což představuje zisk desítek Kč, ale ve finále, při započítání ceny MK není celý zásah ekonomicky rentabilní (ztráta – 46 Kč/jedince). Podání MK se ekonomicky vyplatí např. u srnčí zvěře, která je vykupována za vyšší cenu, než zvěř dančí a zároveň doporučené dávkování MK je mnohem nižší. Z výše uvedených důvodů se podání MK dančí zvěři v honitbách,

kde intenzita parazitóz běžně bývá nízká a zároveň je účinek antiparazitárního zásahu diskutabilní, jeví jako ekonomicky (i ekologicky) nevýhodné.

Poněkud odlišná je situace v oborách a především ve faremním chovu dančí zvěře. V těchto intenzivních chovech jsou z důvodu jejich zaměření vytvářeny optimální podmínky (vysoká koncentrace zvířat na omezeném prostoru) pro šíření parazitóz. V jejich důsledku pak u zvěře může docházet k problémům s reprodukci (zhoršení zabřezávání, zvýšená mortalita mláďat), produkcí zvěřiny (dosažení porážkové hmotnosti se prodlužuje), či s kvalitou trofejí. Takto významným problémům je již třeba předcházet podáním MK s předpokladem ekonomického přínosu.

Jako příklad lze uvést modelovou situaci s poklesem hmotnosti u říjících samců či kvalitou trofejí. U říjících daňků z důvodu značného omezení příjmu potravy běžně dochází ke snížení jejich hmotnosti až o 20 kg. Po ukončení říje tito samci potřebují určitou dobu na dosažení původní hmotnosti. V důsledku hormonálních změn během říje (zvýšení hladiny estrogenu) u samců dochází k poklesu jejich imunity, což se může projevit zvýšením intenzity parazitózy. V důsledku oslabení organismu ashworthiózou, může dosažení původní hmotnosti trvat mnohem delší dobu, nebo původní váhy nemusí dosáhnout. Pokud je parazitovanému daňkovi po říji podáno MK, ochotně ho přijímá a lze očekávat pozitivní vliv tohoto zásahu jak na snížení intenzity parazitózy, tak následně na hmotnost jedince (zvýšení až o 20%). Pokud uvažujeme, že reálná cena

dančí zvěřiny ve faremním chovu je oproti chovu z volnosti až dvakrát vyšší, tak antiparazitární zásah představuje (po odečtení ceny MK) čistý zisk 300 – 400 Kč na jednom kusu dančí zvěře. Pro dančí farmu s 50 samci tak finanční zisk může představovat až 20 000 Kč.

Mnohem zřetelněji se ekonomický přínos podání MK projeví při zhodnocení kvality trofejí. U zvěře, která je parazitovaná hematofágními druhy parazitů, se vyskytují v mnohem větší míře deformity paroží nebo paroží nedorůstá požadované trofejové kvality. Pokud jsou daňci chováni pro poplatkový lov, tak v důsledku ashworthiózy může dojít ke ztrátě trofejního ohodnocení paroží až o desítky CIC bodů, což může představovat finanční ztrátu až několik tisíc Kč na jednom jedinci. Po úspěšném antiparazitárním zásahu může dančí paroží dosáhnout až kategorie význačných trofejí. Například rozdíl mezi stříbrnou a zlatou trofejí představuje finanční zisk až 15 000 Kč. Pro oborní chov zaměřený na poplatkový lov to tak může znamenat finanční přínos 30 – 40 000 tisíc Kč.

Je potřeba ale také zmínit možné negativní dopady antiparazitárního zásahu. V případě, že zvěř není navyklá na jadrná krmiva, může dojít k jejímu přesycení medikovaným jadrným krmivem, které vede k vážným zdravotním komplikacím, v důsledku nichž může daný jedinec i uhynout. V případě úhynu kvalitního trofejního kusu se jedná o ekonomickou ztrátu až několik desítek tisíc Kč.



Kromě ekonomických aspektů terapeutického řešení již vzniklé ashworthiózy je vhodné zvážit i ekonomiku preventivních opatření. U intenzivních chovů je vhodné průběžně kontrolovat kvalitu oplocení (ohrazení), aby nedocházelo k případnému pronikání menších druhů spárkaté zvěře do oborů, či farmy. Zvěř z volnosti totiž může být zdrojem parazitů (včetně invazní hlístice *A. sidemi*), kterými kontaminuje prostředí intenzivního chovu. Antiparazitární zásah tak zvýší náklady za zdravotní péči o zvěř. Pokud předpokládáme, že u oplocené plochy jednou za tři roky, z důvodu povětrnostních podmínek, únavy materiálu či z jiných příčin, dojde (dle velikosti pozemku) k poškození 10 m oplocení, může oprava v případě použití dřevěného materiálu (1 kus plotovky 30 Kč, kůl 80 Kč) a kvalitního spojovacího materiálu (1 hřebík 80 Kč) stát přibližně 3 000 Kč, respektive 1 000 Kč za rok. Takovýto preventivní zásah může zabránit vypuknutí ashworthiózy, která bude vyžadovat antiparazitární zásah. Pro oboru s jarním kmenovým stavem 300 kusů dančí zvěře (poměr pohlaví 1 : 1, koeficient přírůstku 1) bude potřeba zakoupit jedno 100kg balení MK (antiparazitární krmná směs s Cermixem), což představuje částku 4 422 Kč. Preventivní opravou oplocení tak lze ušetřit více než 3 442 Kč.

Vedle ekonomického zisku lze vhodnou prevencí docílit i neekonomických pozitiv – snížení reziduí léčivých látek ve zvěřině a jejich negativního dopadu na flóru a faunu apod.

## **VI. Seznam použité související literatury**

### Seznam použité související literatury

- Bartoš, L. 2009. Sika Deer in Continental Europe. In: McCullough, D.R., Takatsuki, S., Kaji, K. (Eds.) Sika Deer Biology and Management of Native and Introduced Populations, 1<sup>st</sup> ed. Springer, pp. 573–594.
- Belem, A.M., Couvillion, C.E., Siefker, C., Griffin, R.N. 1993. Evidence for arrested development of abomasal nematodes in white-tailed deer. *Journal of Wildlife Diseases*, 29:261–265.
- Bowman, D.D. 2014. *Georgis Parasitology for Veterinarians*. Saunders Elsevier, 10<sup>th</sup> Ed., pp. 326–332.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44:35–44.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruysse, J. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136:167–185.
- Demiaszkiewicz, A.W., Kuligowska, I., Lachowicz, J., Pyziel, A.M., Moskwa, B. 2013. The first detection of nematodes *Ashworthius sidemi* in elk *Alces alces* (L.) in Poland and remarks of ashworthiosis foci limitations. *Acta Parasitologica*, 58:515–518.
- Drózd, J., Demiaszkiewicz, A.W., Lachowicz, J. 1998. *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) a new parasite of the European bison *Bison bonasus* (L.) and the question of independence of *A. gagarini*. *Acta Parasitologica*, 43:75–80.

### Seznam použité související literatury

- Drózd, J., Demiaszkiewicz, A.W., Lachowicz, J. 2000. Ashworthiosis - new parasitosis of wild ruminants. *Medycyna weterynaryjna*, 56:32–35.
- Drózd, J., Demiaszkiewicz, A.W., Lachowicz, J. 2003. Expansion of the Asiatic parasite *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae) in wild ruminants in Polish territory. *Parasitology Research*, 89:94–97.
- Durette-Desset, M.C., Hugot, J.P., Darlu, P., Chabaud, A.G. 1999. A cladistic analysis of the Trichostrongyloidea (Nematoda). *International Journal for Parasitology*, 29:1065–1086.
- Ehrenfeld, J.G. 2010. Ecosystem Consequences of Biological Invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 41:59–80.
- Eve, J.H., Kellogg, F.E. 1977. Management Implications of Abomasal Parasites in Southeastern White-Tailed Deer. *Journal of Wildlife Management*, 41:169–177.
- Forejtek, P., Hera, A., Malena, M., Vernerová, E. 2010. Odčervování volně žijící spárkaté zvěře. *Myslivost*, 12:18–21.
- Gibbs, H.C. 1986. Hypobioses in parasitic nematodes – an update. *Advances in Parasitology*, 25:129–174.
- Hansen, J., Perry, B. 1994. The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants. *FAO Animal Health Manual*, pp. 67–82.
- Hoberg, E.P., Abrams, A., Carreno, R.A., Lichtenfels, J.R. 2002. *Ashworthius patriciapillitae* n. sp. (Trichostrongyloidea: Haemonchinae), an Abosomal Nematode in *Odocoileus virginianus* from Costa Rica, and a New record for the Species of the Genus in the Western Hemisphere. *Journal of Parasitology*, 88:1187–1199.
- Kołodziej-Sobocińska, M., Demiaszkiewicz, A.W., Pyziel, A.M., Marczuk, B., Kowalczyk, R. 2016. Does the blood-sucking

### Seznam použité související literatury

- nematode *Ashworthius sidemi* (Trichostrongylidae) cause deterioration of blood parameters in European bison (*Bison bonasus*)? European Journal of Wildlife Research, 62:781–785.
- Kotrlá, B., Kotrlý, A. 1973. The first finding of the nematode *Ashworthius sidemi* Schulz, 1933 in Sika nippon from Czechoslovakia. Folia Parasitologica (Praha), 20:377–378.
- Kotrlá, B., Kotrlý, A. 1977. Helminths of wild ruminants introduced in Czechoslovakia. Folia Parasitologica (Praha), 24:35–40.
- Kotrlá, B., Kotrlý, A., Koždoň, O. 1976. Studies on the specificity of the nematode *Ashworthius sidemi* Schulz, 1933. Acta Veterinaria Brno, 45:123–126.
- Koudela, B. 2010. Nemyslivecký pohled na léčbu parazitóz spárkaté zvěře. Myslivost, 10:22–23.
- Koudela, B. 2014. Jak dál s léčbou volně žijící zvěře proti parazitům? Myslivost, 4:20–21.
- Kowal, J., Kornaś, S., Nosal, P., Wajdzik, M., Basiaga, M., Lesiak, M. 2014. Parasite infections in red deer *Cervus elaphus* from Krakow area, southern Poland. Annals of Parasitology, 61:49–52.
- Kyral, J., Rosol, J. 2007. Stojí prevence a léčba parazitóz u spárkaté zvěře opravdu za to? Myslivost, 12:39–41.
- Lamka, J. Ducháček, L., Nevole, Z., Hejralová, R., Šesták, J., 1997. Parenterally administered ivermectin: Efficacy against nematodes in mouflon (*Ovis musimon*). Veterinární medicína, 42:369–372.
- Letková, V. 1993. Parazitologická diagnostika. In: Jurášek, V., Dubinský, P., Bírová, V., Borošková, Z., Breza, M., Csizmarová, G., Čorba, J., Goldová, M., Hanzelková, V., Juriš, P., Krupier, I., Laciak, V., Letková, V., Nevole, M., Peťko, B.

### Seznam použité související literatury

- 1993: Veterinárna parazitológia. Príroda a.s., Bratislava, pp. 363.
- Lichtenfels, J.R., Pilitt, P.A., Hoberg, E.P. 1994. New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. *Journal of Parasitology*, 80:107–119.
- Magdálek, J., Kyriánová, I.A., Vadlejch, J. 2017. *Ashworthius sidemi* in hunting areas (Cervidae) in the territory of the Czech Republic. In: Kubík Š. & Barták M. (Ed.) 9<sup>th</sup> Workshop on biodiversity, Jevany, Česká zemědělská univerzita v Praze, 66–71.
- Mohelský, M. 2013. Léčit či neléčit? *Myslivost*, 10:31–33.
- Moskwa, B., Bień, J., Goździk, K., Cabaj, W. 2014. The usefulness of DNA derived from third stage larvae in the detection of *Ashworthius sidemi* infection in European bison, by a simple polymerase chain reaction. *Parasites & Vectors*, 7:215.
- Moskwa, B., Bień, J., Cybulska, A., Kornacka, A., Krzysiak, M., Cencek, T., Cabaj, W. 2015. The first identification of a blood-sucking abomasal nematode *Ashworthius sidemi* in cattle (*Bos taurus*) using simple polymerase chain reaction (PCR). *Veterinary Parasitology*, 211:106–109.
- O'Connor, L.J., Walkden-Brown, S.W., Kahn, L.P. 2006. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*, 142:1–15.
- Osińska, B., Demiaszkiewicz, A.W., Lachowicz, J. 2010. Pathological lesions in European bison (*Bison bonasus*) with infestation by *Ashworthius sidemi* (Nematoda, Trichostrongylidae). *Polish Journal of Veterinary Science*, 13:63–67.

### Seznam použité související literatury

- Ovcharenko, D.A. 1968. Seasonal dynamics and development of *Ashworthius sidemi* (Trichostrongylidae), *Oesophagostomum radiatum* and *O. venulosum* (Strongylidae) of *Cervus nippon hortulorum*. Parazitologija, 2:470–474.
- Pike, A.W. 1969. A Revision of the Genus *Ashworthius* Le Roux, 1930 (Nematoda: Trichostrongylidae). Journal of Helminthology, 43:135–144.
- Radwan, J., Demiaszkiewicz, A.W., Kowalczyk, R., Lachowicz, J., Kawalko, A., Wojcik, J.M., Pyziel, A.M., Babik, W. 2010. An evaluation of two potential risk factors, MHC diversity and host density, for infection by an invasive nematode *Ashworthius sidemi* in endangered European bison (*Bison bonasus*). Biological Conservation, 143:2049–2053.
- Rajský, M., Vodňanský, M., Rajský, D. 2011. Problematika praktickej realizácie antiparazitárnej liečby prežúvavej zveri. Myslivost, 2:64–66.
- Rossanigo, C.E., Gruner, L., 1996. The length of strongylid nematode infective larvae as a reflection of developmental conditions in faeces and consequences on their viability. Parasitology Research, 82:304–318.
- Schulz, R.E. 1933. *Ashworthius sidemi* n. sp. (Nematoda, Trichostrongylidae) aus einem Hirsch (*Pseudaxis hortulorum*) des fernen Ostens. Zeitschrift für Parasitenkunde, 5:735–739.
- Ševčík, B. 2013. Tlumení parazitóz spárkaté zvěře z hlediska myslivecké praxe. Myslivost, 10:16–17.
- Sréter, T., Molnár, V., Kassai, T. 1994. The distribution of nematode egg counts and larval counts in grazing sheep and their implications for parasite control. International Journal for Parasitology, 24:103–108.
- Stromberg, B.E. 1997. Environmental factors influencing transmission. Veterinary Parasitology, 72:247–264.

### Seznam použité související literatury

- Vadlejch, J., Kyriánová, I.A., Rylková, K., Zikmund, M., Langrová, I. 2017a. Health risks associated with wild animal translocation: a case of the European bison and an alien parasite. *Biological Invasions*, 19:1121–1125.
- Vadlejch, J., Kyriánová, I.A., Rylková, K., Čadková, Z. 2017b. Size matters – the bigger ones sucks more blood. The 26<sup>th</sup> International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 4. – 8. 9. 2017, Kuala Lumpur, Malaysia
- Vadlejch, J., Magdálek, J., Rylková, K., Forejtek, P., Čadková, Z. 2018a. Sezónní dynamika invazní hlístice *Ashworthius sidemi* u volně žijících přežvýkavců v ČR. *Veterinářství*, 12:869–875.
- Vadlejch, J., Magdálek, J., Makovický, P., Forejtek, P., 2018b. Patomorfologické změny spojené s infekcemi vyvolanými invazním parazitem *Ashworthius sidemi*. *Veterinářství*, 12:862–868.
- Vadlejch, J., Čadková, Z., Magdálek, J., Nápravníková, J. 2019. Pomůcka pro zdokonalení diagnostiky ashworthiózy. CZ 32489 U1
- van Wyk, J.A., Cabaret, J., Michael, L.M. 2004. Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Veterinary Parasitology*, 119:277–306.
- van Wyk, J.A., Mayhew, E. 2013. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 80:539–553.
- Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone, J.B. Jr., Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylor, S.M. 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in



### Seznam použité související literatury

ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, 58:181–213.

Zajac, A.M., Conboy, G.A. (2012) *Veterinary Clinical Parasitology*, 8<sup>th</sup> ed., Wiley-Blackwell, pp. 3–16.

Ostatní:

zákon č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon), ve znění pozdějších předpisů, a některé související zákony

zákon č. 378/2007 Sb., o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech), ve znění pozdějších předpisů

zákon č. 449/2001 Sb., o myslivosti

## **VII. Seznam publikací, které předcházely metodice**

- Magdálek, J., Kyriánová, I.A., Vadlejch, J. 2017. *Ashworthius sidemi* in hunting areas (Cervidae) in the territory of the Czech Republic. In: Kubík Š. & Barták M. (Ed.) 9<sup>th</sup> Workshop on biodiversity, Jevany, Česká zemědělská univerzita v Praze, 66–71.
- Magdálek, J., Čadková, Z., Vadlejch, J. 2018. Quo vadis *Ashworthius sidemi*? Current Status of a Non-Native Parasite in the Czech Republic. XIII<sup>th</sup> Slovak and Czech Parasitological Days. Parasites in the Heart of Europe 2, 21. – 25. 5. 2018, Košice, Slovensko
- Vadlejch, J., Kyriánová, I.A., Rylková, K., Zikmund, M., Langrová, I. 2017a. Health risks associated with wild animal translocation: a case of the European bison and an alien parasite. Biological Invasions, 19:1121–1125.
- Vadlejch, J., Kyriánová, I.A., Rylková, K., Čadková, Z. 2017b. Size matters – the bigger ones sucks more blood. The 26<sup>th</sup> International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 4. – 8. 9. 2017, Kuala Lumpur, Malaysia
- Vadlejch, J., Magdálek, J., Rylková, K., Forejtek, P., Čadková, Z. 2018a. Sezónní dynamika invazní hlístice *Ashworthius sidemi* u volně žijících přežvýkavců v ČR. Veterinářství, 12:869–875.
- Vadlejch, J., Magdálek, J., Makovický, P., Forejtek, P., 2018b. Patomorfologické změny spojené s infekcemi vyvolanými invazním parazitem *Ashworthius sidemi*. Veterinářství, 12:862–868.
- Vadlejch, J., Čadková, Z., Magdálek, J., Nápravníková, J. 2019. Pomůcka pro zdokonalení diagnostiky ashworthiózy. CZ 32489 U1

## **VIII. Dedikace**

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu TA ČR č. TJ01000009 s názvem: „Vyhodnocení rizik invazního parazita *Ashworthius sidemi* pro oborový chov spárkaté zvěře v České republice, tlumení ashworthiózy a prevence jejího šíření“.

vydavatel: powerprint, Praha

vydání: první 2019

tisk: powerprint s.r.o.

Brandejsovo nám. 1219/1

165 00 Praha – Suchdol

[www.publikace24.cz](http://www.publikace24.cz)

Název: Tlumení a prevence šíření invazního parazita *Ashworthius sidemi*

Autoři publikace s vyjádřením podílu práce:

doc. Ing. Jaroslav Vadlejch, Ph.D. (40 %)

Ing. Jan Magdálek (40 %)

Ing. Zuzana Čadková, DiS., Ph.D. (20 %)

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

katedra zoologie a rybářství

Kamýcká 129

165 00 Praha – Suchdol

© 2019

ISBN 978-80-213-2946-1