



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Laboratorní diagnostika larev hlístic z čeledi Anisakidae

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA

Autor: Michaela Kožená

Vedoucí práce: RNDr. Antonín Prouza (†)
prof. RNDr. Tomáš Scholz, CSc.

České Budějovice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem Laboratorní diagnostika larev hlístic z čeledi Anisakidae jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat svému zesnulému původnímu vedoucímu práce panu RNDr. Antonínu Prouzovi za pomoc při zpracování praktické části, cenné rady a hlavně trpělivost. Svému novému vedoucímu panu prof. RNDr. Tomášovi Scholzovi, CSc. děkuji za nové vedení a pomoc při dokončení této bakalářské práce.

Dále děkuji RNDr. Tereze Vyhlídalové za pomoc s praktickou částí této bakalářské práce v parazitologické laboratoři na Státního veterinárního ústavu Jihlava, pobočce v Českých Budějovicích. A rovněž jsem zavázána dr. Camile Pantoia de Oliveira z Brazílie za genotypizaci nalezených larev.

V neposlední řadě děkuji své rodině za trpělivost a veškerou pomoc.

Laboratorní diagnostika larev hlístic z čeledi Anisakidae

Abstrakt

Cílem práce bylo zjistit, zda je trávicí metoda vhodná pro zachycení larev hlístic čeledi Anisakidae v syrových nebo tepelně zpracovaných (uzených) rybách. Výsledky prokázaly častý výskyt larev čeledi Anisakidae v makrelách a sledích prodávaných v maloobchodní síti. Experiment rovněž prokázal, že larvy je možné detekovat i po použití trávicí metody. Nejvíce larev se nacházelo v syrových rybách, které nebyly zničeny tepelnou úpravou (např. uzením). Výjimečným zjištěním byl nález živých larev v natrávené svalovině chlazené, nekuchané makrely obecné *Scomber scombrus* Linnaeus, 1758. Následná genotypizace prokázala, že se jedná o druh *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) sensu stricto.

Přínosem této bakalářské práce je zlepšení informovanosti veřejnosti o možných rizicích při konzumaci nedodatečně tepelně upravených ryb.

Klíčová slova

Paraziti ryb; zoonózy; makrela obecná; sled' obecný; trávicí metoda

Laboratory diagnostics of larvae of anisakid nematodes

Abstract

The aim of the study was to determine whether the digestion method was suitable for the detection of larvae of anisakid nematodes in raw or cooked (smoked) fish. The results showed the frequent occurrence of Anisakidae larvae in mackerel and herring sold at retail. The experiment also showed that the larvae could be detected even after using the digestion method. Most larvae were found in raw fish that had not been destroyed by heat treatment (e.g., smoking). An exceptional finding was the detection of live larvae in the digested muscle of chilled, uncooked mackerel *Scomber scombrus* Linnaeus, 1758. Subsequent genotyping revealed that the larvae were *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) sensu stricto.

The contribution of this bachelor thesis is to raise public awareness of the potential risks of consuming undercooked fish.

Key words

Fish parasites; zoonoses; Atlantic mackerel; Atlantic herring; digestion method

Obsah

Úvod	7
1 Teoretická část	8
1.1 Taxonomie	8
1.2 Morfologie	8
1.3 Vývojový cyklus	10
1.4 Zeměpisné rozšíření	11
1.5 Anisakidóza	12
1.6 Alergie	13
1.7 Diagnostika a detekce larev	14
1.8 Léčba	14
1.9 Preventivní opatření	15
1.10 Legislativní opatření v EU	15
1.11 Legislativní opatření v ČR	16
2 Praktická část	17
2.1 Cíl práce	17
2.2 Materiál	17
2.3 Metody	18
2.3.1 Parazitologická pitva	18
2.3.2 Trávicí metoda	18
2.3.2.1 Princip	19
2.3.2.2 Pomůcky a přístroje	19
2.3.2.3 Chemikálie	19
2.3.2.4 Pracovní postup	19
2.3.2.5 Vyhodnocení výsledků	21
2.4 Výsledky	21
2.5 Diskuse	30
3 Závěr	34
4 Seznam použité literatury	35
5 Seznam obrázků	41
6 Seznam tabulek	42
7 Seznam příloh	43

Úvod

Živé larvy hlístic rodu *Anisakis* (čeleď Anisakidae) pozřené člověkem mohou způsobit onemocnění anisakidózu, nicméně i uhynulé larvy v tepelně upravených pokrmech ryb jsou schopny zapříčinit u některých lidí vážné alergické reakce. K nákaze člověka dochází konzumací syrového nebo nedostatečně tepelně upraveného masa mořských ryb. Základním cílem práce je proto zjistit, do jaké míry lze larvy hlístic čeledi Anisakidae v rybách po tepelném zpracování nízkou teplotou (uzení) zachytit při použití trávící metody a současně porovnat záchyty larev z ryb mražených a chlazených prodávaných v obchodní síti.

V teoretické části jsem se zaměřila na obecný přehled hlístic čeledi Anisakidae, jejich výskytu a základní charakteristiky, dále na samotné onemocnění člověka vyvolané těmito parazity zvané anisakidóza, její klinické příznaky, léčbu a diagnostiku. V praktické části jsem zjišťovala, zda je možné zachytit všechny larvy po natrávení a zda se je trávící metoda vhodná k diagnostice, tj. k zachycení larev při veterinární inspekci rybích produktů. K vyšetření byly použity na trhu nejčastěji prodávané mořské ryby, tj. sled' obecný *Clupea harengus* Linnaeus, 1758 a makrela obecná *Scomber scombrus* Linnaeus, 1758. Vyšetřována byla jak svalovina, tak vnitřní orgány. Pro experimenty byly použity živé larvy z čerstvých ryb, mrtvé larvy ze zmražených ryb a larvy získané z finálních výrobků tepelně zpracovaných ryb (typicky uzený sled').

1 Teoretická část

1.1 Taxonomie

Říše: Animalia

Kmen: Nematelminthes

Třída: Nematoda

Podtřída: Secernentea

Řád: Ascaridida

Čeleď: Anisakidae Skrjabin et Karokhin, 1945

Rod: *Anisakis* Dujardin, 1845

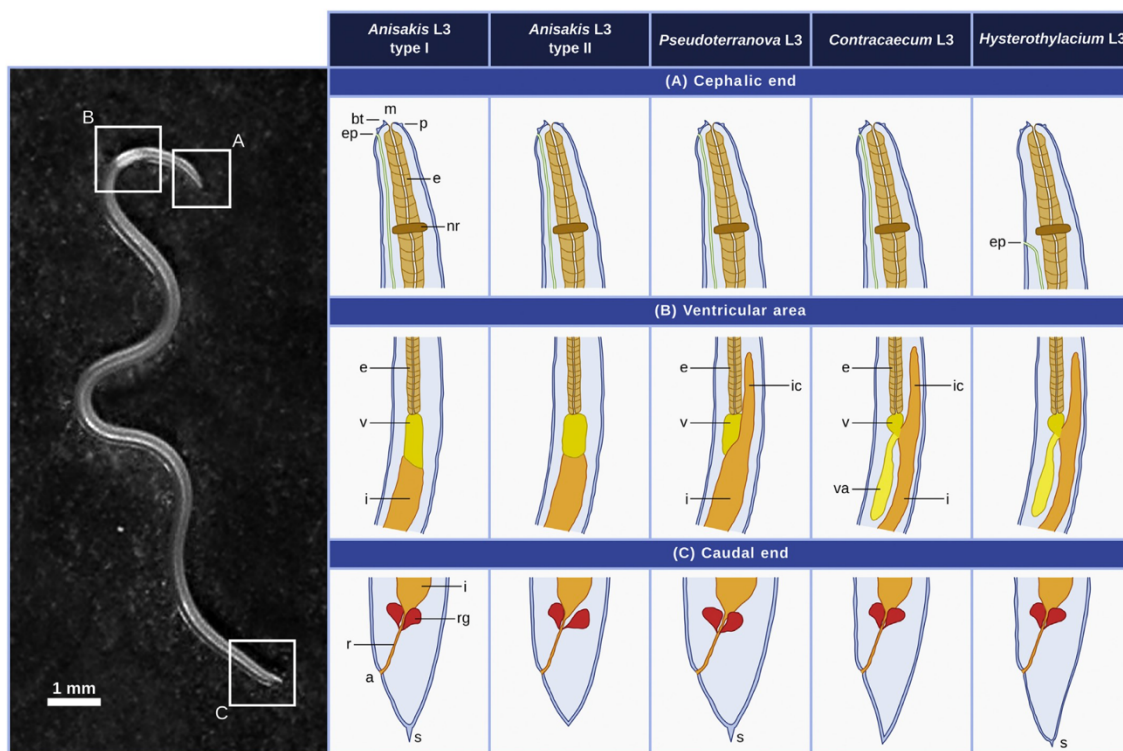
Vybrané druh: *Anisakis pegreffii* Campana-Rouget et Biocca, 1955; *Anisakis physeteris* Baylis, 1923; *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1805)

Rod: *Pseudoterranova* Layman et Borovkova, 1926

Druh: *Pseudoterranova decipiens* (Krabbe, 1878)

1.2 Morfologie

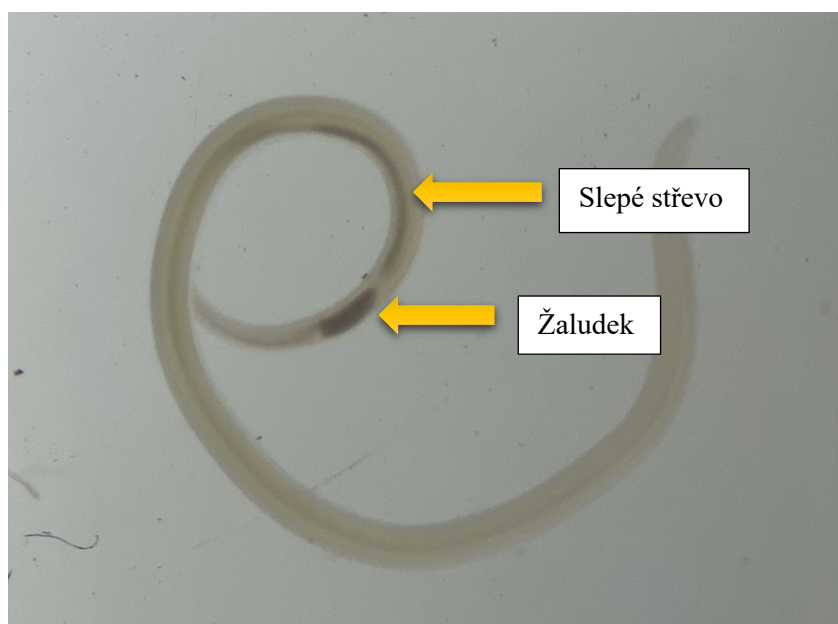
Anisakidní larvy dosahují celkové délky 10 – 30 mm, šířky do 1 mm, jsou bělavé až průhledné (Audicana et al, 1997). Vyskytují se převážně kolem vnitřních orgánů (jater, ledvin, pylorických přívěscích), jsou stočené do spirály, často opouzďené (encystované) a v případě většího počtu larev lze rozpoznat pouhým okem.



Obrázek č. 1 – Porovnání morfologické stavby mezi larvami třetího stádia (L3) hlístic rodů *Anisakis* I. a II. typu, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* a *Hysterothylacium*.

Zkratky: a – anus, bt – vyvrtávací zub, e – jícen, ep – vylučovací pór, i – střevo, ic – slepé střevo (střevní výběžek), m – ústa, nr – nervový prstenec, p – papila, r – konečník, rg – rektální žláza, s – mukron, v – žaludek, va – výběžek žaludku

(podle Adroher Benítez, 2020)



Obrázek č. 2 – Mikroskopická stavba larvy hlístice z rodu *Anisakis* (originál)

Larvy 3. stádia (L3) hlístic rodu *Anisakis* jsou si morfologicky velmi podobné a klasifikují se jako larvy typu I nebo II, přičemž jednotlivé druhy jsou v rámci typového rozdělení morfologicky nerozlišitelné (Mattiucci a Nascetti, 2008). Larvy rodů *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* a *Hysterothylacium* nelze makroskopickým vyšetřením rozlišit a přesné rodové zařazení je možné provést pomocí optického mikroskopu na základě rozdílné stavby trávicího ústrojí, jak lze vidět na obrázku č. 1.

1.3 Vývojový cyklus

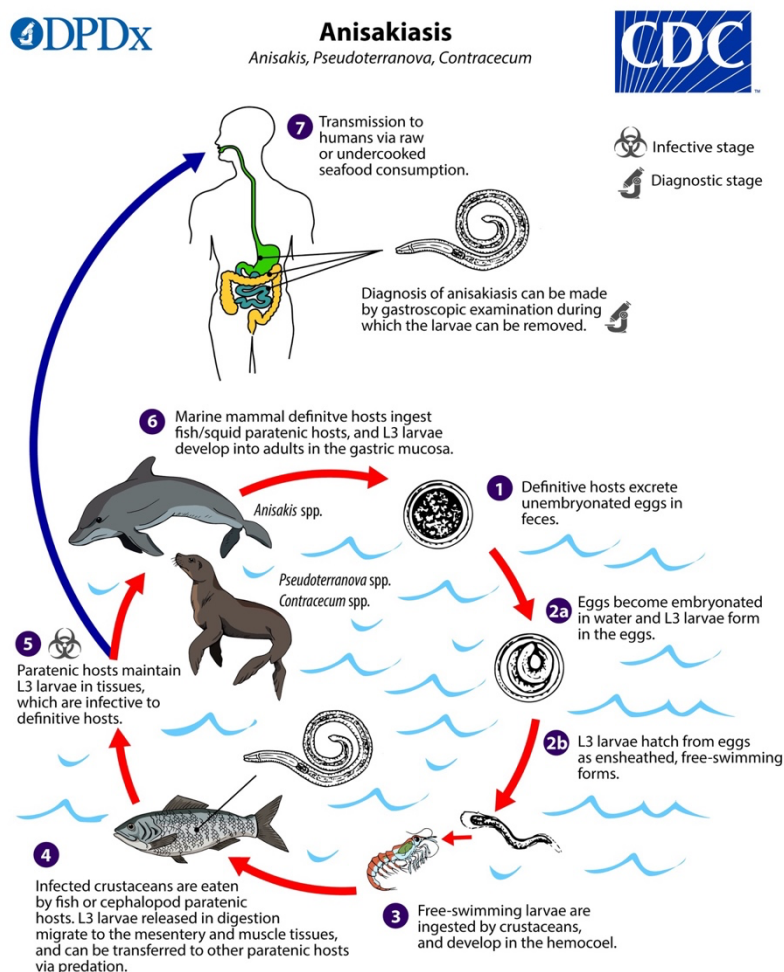
Hlístice čeledi Anisakidae jsou vázány na vodní organismy (ryby a mořské savce) a rybožravé ptáky (Anderson, 2000). Tyto hlístice mají složitý životní cyklus, který zahrnuje různé mořské organismy na jednotlivých úrovních trofické sítě v mořském ekosystému (Rezaei, 2022). Vývoj hlístic zahrnuje 5 základních stádií, která jsou od sebe oddělena svlékáním kutikuly (Anderson, 2000).

Nerozrýhována vajíčka procházejí trusem konečného hostitele a embryo se vyvíjí v mořské vodě, přičemž rychlost líhnutí je řízena teplotou vody (rozmezí 4 – 8 dní při 13 – 18 °C až 57 – 82 dní při teplotě 5 °C). Studie vývoje těchto hlístic ukazují, že ve vajíčku dochází ke dvěma svlékáním, přičemž v obalech je třetím stádiem, nikoli druhým stádiem, jak se dříve předpokládalo (Bratney et al., 1992; Køie et al., 1995; Wash, 2011). Rychlost líhnutí vajíček a míra přežití objevujících se L3 jsou silně ovlivněny teplotou vody. Kutikulární pouzdro, které obklopuje larvu, má přilnavé vlastnosti, které usnadňují přichycení k substrátu mořského dna, kde larva zůstává až do svého požití vhodným mezihostitelem (Audicana et al., 2003). Nově vylíhlé larvy jsou požírány širokou škálou korýšů (euphausiidní oceánské krilly, veslonožky), kteří slouží jako mezihostitelé. Při následném pozření rybami nebo hlavonožci, larvy pronikají do tělní dutiny, zejména do jater, gonád a střev, kde se opouzdrí. Když jiná ryba nebo hlavonožec pozře infikovanou rybu, nový hostitel plní roli paratenického hostitele, ve kterém se parazit dále nevyvíje a zůstává ve stádiu L3, tj. larvy třetího stádia (Bilska-Zajac et al., 2015). U ryb jsou L3 larvy stočené a jejich celková délka těla dosahuje až 2 cm (Aibinua et al., 2019).

Definitivním hostitelem většiny anisakidních hlístic včetně zástupců rodu *Anisakis*, ve kterých parazit pohlavně dospívá, jsou kytovci (např. delfíni a tuleni) (Hochberg et al., 2010; Aibinua et al., 2019). Dospělí jedinci druhů rodu *Contracaecum* žijí v žaludku

rybožravých ptáků a savců. Podobný vývoj mají i další rody, jako například *Pseudoterranova*, *Contracaecum* (Anderson, 2000).

Na obrázku č. 3 je znázorněn vývojový cyklus hlístic čeledi Anisakidae včetně přenosu na definitivního hostitele nebo paratenického hostitele, případně přenosu mezi paratenickými hostiteli navzájem.



Obrázek č. 3 – Vývojový cyklus hlístic čeledi Anisakidae (podle CDC, 2019)

1.4 Zeměpisné rozšíření

Druh *Anisakis simplex* má téměř celosvětové rozšíření, a zvláště hojný je v polárních a mírně chladných mořských vodách (Hochberg et al., 2010). Parazit se vyskytuje především v severním Atlantském a Tichém oceánu (Bilska-Zajac et al., 2015).

Zemí s nejvyšším výskytem lidských případů anisakidózy je Japonsko (Baird et al., 2014). Ročně je zde diagnostikováno přibližně 20 000 případů anisakidózy z důvodu časté konzumace syrových ryb (sushi a sashimi) (Audicana et al., 2022). Španělsko má nejvyšší hlášený výskyt v Evropě a marinované ančovičky jsou považovány za hlavní důvod nákazy (Bao, 2017). V Itálii, kde jsou marinované nebo syrové ryby v některých regionech kulinářskou tradicí, se předpokládá, že skutečný výskyt anisakidózy u lidí je vzhledem k vysoké prevalenci nákazy ryb larvami v oblasti Středozemního moře silně podhodnocen. Větší informovanost o anisakidóze, globalizace čínské i japonské kuchyně a rozvoj lepších diagnostických postupů vedou k častějšímu hlášení anisakidózy v zemích jako je Korea, Austrálie, Čína, Chorvatsko a Spojené státy americké (Arizono et al., 2012; Pravettoni et al., 2012).

V České republice byla anisakidóza zaznamenána, ale je považována za vzácné onemocnění. Podle údajů Ministerstva zdravotnictví ČR bylo v letech 2011–2020 v České republice potvrzeno 32 případů anisakidózy. Nejznámější případ byl v roce 2011, kdy bylo do České republiky dodáno 5 000 kg mražených sledů z Norska. Surovina měla být zpracována na uzené sledě, ale při veterinární kontrole byla zjištěna přítomnost hlístic rodu *Anisakis*. Zhruba 3 600 kg ryb bylo zachyceno mražených ve skladě, 405 kg ve výrobě a 100 kg zpracovaných ryb se podařilo stáhnout před prodejem (Zachytili jsme sledě s parazity, 2011).

1.5 Anisakidóza

První případ nákazy člověka hlísticemi z čeledi Anisakidae byl hlášen před 60 lety. Během posledních 20 let se tyto hlístice staly intenzivně studovaným parazitem, nejen jako původci anisakidózy, ale také z důvodu vzniku alergických reakcí u citlivých lidí (Audicana, 2022). Anisakidóza je onemocnění postihující gastrointestinální trakt člověka po požití infikovaných syrových nebo nedostatečně tepelně upravených ryb nebo chobotnic (Rosset et al., 1982). Je způsobena larvami třetího stádia několika rodů a druhů hlístic rodů *Anisakis*, *Pseudoterranova* a *Phocanema*, pozřených člověkem při požívání syrových, případně marinovaných mořských ryb (sled', makrela) nebo sépií, sloužících jako parateničtí hostitelé (Hübner et al., 1995).

Lidská anisakidóza je unikátní tím, že asi 90–95 % popsaných případů je způsobena jedinou larvou. Nejčastějším místem lokalizace larev u člověka je gastrointestinální trakt (Audicana et al., 2003). Doba přežití larev u lidí larev hlístic čeledi Anisakidae je velmi

krátká, neboť obvykle odumřou během několika dnů nebo málo týdnů. Po požití kontaminované ryby se larva během několika hodin zavrtá do střevní stěny, což vede ke krátkodobé, ale akutní infekci s příznaky jako jsou intenzivní bolest břicha, zvracení, nevolnost nebo průjem (Audicana a Kennedy, 2008). Tyto příznaky se většinou objeví do 5 dnů (Takabayshi et al., 2014). Typickým klinickým příznakem je akutní epigastrická bolest, která se projeví během několika hodin po konzumaci infikované ryby, s rozvinutím symptomů od jedné hodiny do dvou týdnů (Lee et al., 2009; Takabayshi et al., 2014).

Hlístice *Anisakis simplex* způsobuje přímé poškození tkáně po přichycení ve střevě ve formě rozvoje eosinofilního granulomu, v extrémních případech může způsobit perforaci střeva nebo silnou alergickou reakci (Audicana et al., 2002). Životaschopné larvy nejprve vyvolávají reakci v duodenu v místě přichycení. Pokud je parazit poškozen nebo uhynie, mohou produkty jeho odumřelých tkání způsobit alergickou reakci u senzitivních pacientů, v extrémních případech dokonce anafylaktický šok (Audicana a Kennedy, 2008). Onemocnění může být v tomto případě chybně diagnostikováno jako Crohnova choroba (Montalto et al., 2005).

Každý, kdo sní tepelně netepelně neupravenou rybu, je ohrožen (Anisakiasis FAQs, 2010).

1.6 Alergie

Ve světě přibývá potravinových alergií rychleji než jiných alergických onemocnění. Ve srovnání s jinými dobře prostudovanými parazitárními chorobami se parazitickým zoonózám přenášeným rybami nevěnuje dostatek pozornosti (Ivanović et al., 2017).

Alergeny hlístice *Anisakis simplex* jsou však nyní považovány za nejběžnější mezi potravinovými alergeny. Přítomnost těchto i dalších hlístic rodu *Anisakis* může způsobit nebezpečné alergické reakce, včetně anafylaktického šoku (Bilska-Zajac et al., 2015). Osoby, které mají podezření na alergii na parazita *Anisakis*, by měly vyhledat lékařskou pomoc a v budoucnu se vyhnout konzumaci syrových nebo nedostatečně tepelně upravených ryb. Opakovaná nákaza vede u některých jedinců k systémovým alergickým reakcím jako je kopřivka nebo anafylaktický šok, což z těchto hlístic činí důležitý zdroj skrytých alergenů v mořských plodech (Nieuwenhuizen, 2016). Některé studie ukázaly senzibilizaci pacientů nakažených hlísticí *Anisakis simplex* po konzumaci kuřecího masa

a došlo dokonce k alergické reakci. Vysvětlením tohoto překvapivého zjištění bylo složení krmiva pro slepice, které obsahovalo rybí moučku. Všem testovaným pacientům vyšel pozitivní prick test (jedná se o typ kožního testu, který slouží k diagnostice alergií pomocí vpichů na povrch kůže), bronchiální provokační testy byly pozitivní u pacientů, kteří trpěli astmatem a potravinový provokační test byl pozitivní rovněž u pacienta s angioedémem, tj. náhle vzniklým nezánettivým otokem kůže nebo sliznic vyvolaným vazoaktivními mediátory, které jsou příčinou dilatace a zvýšené permeability cév v hlubších vrstvách podkoží nebo v submukóze (Armentia et al., 2006).

1.7 Diagnostika a detekce larev

K detekci larev anisakidních hlístic v rybím mase je používána řada metod. Základními metodami jsou vizuální kontrola, světelná mikroskopie, prosvěcování, natrávení svaloviny pepsinem, detekce larev v rybím mase pomocí UV osvětlením, rentgenového záření a ultrazvuku, nebo fluorescenční rezonanční přenos energie (FRET) v reálném čase po zobrazovací spektrofotometrii (Llarena-Reino et al., 2013). Mezi nejjednodušší detekci patří vizuální kontrola, která se provádí po rozříznutí ryby od řitního otvoru po žábry kontrolou přítomnosti larev v tělní dutině (Cammilleri, 2016). Dále jsou používány imunochemické a molekulárních techniky např. ELISA, real-time PCR, polymorfismus délky restrikčních fragmentů po PCR (RFLP-PCR) (Buchmann a Mehrdana, 2016). Ultrasonografie je užitečná k diagnostice žaludeční anisakidózy (Ishikawa et al., 2019).

Larvy parazitů v rybách se vyskytují nejvíce v tělní dutině nebo na povrchu jater, kdy se před průmyslovým zpracováním většina larev odstraní. Toho lze jednoduše dosáhnout odstraněním tělních orgánů a jater s přidruženými larvami červů (Audicana et al., 1997).

1.8 Léčba

Nejúčinnější léčbou anisakidózy v žaludku, duodenu nebo tlustém střevě je extrakce larev pomocí endoskopie, kdy příznaky obvykle do několika hodin vymizí (Audicana et al., 2003). K eliminaci anisakidních hlístic je rovněž vhodná léčba anthelmintiky, například albendazolem (Buchmann a Mehrdana, 2016). Dále je možná léčba pomocí prednisolu (5 mg/den, po dobu 10 dní) a olopatidinu hydrochloridu (10 mg/den, po dobu 6 týdnů) dle ultrasonografického nálezu. Po šesti měsících léčby prokázala ultrasonografie břicha normální nález (Toyoda a Tanaka, 2016). Kolonoskopií lze diagnostikovat anisakidózu

tlustého střeva, což je důležité pro zabránění závažných komplikací (obstrukce střeva a jeho perforace, rozvoj rakoviny) (Tsukui et al., 2016).

1.9 Preventivní opatření

Nejdůležitějším preventivním opatřením je zabránění konzumace syrového nebo nedostatečně tepelně zpracovaného rybího masa. Nejvhodnějším způsobem ochrany proti nákaze je tepelná úprava rybího masa, a to ohřátím na nejméně na 63 °C (teplota uvnitř masa). Další možností je zmrazení rybího masa na teplotu při -20 °C nebo nižší po dobu 7 dnů nebo jeho skladování při teplotě nejméně -35 °C po dobu 24 hodin. Vyšší koncentrace soli může být použita k usmrcení nebo inaktivaci hlístic (Anisakiasis FAQs, 2010).

1.10 Legislativní opatření v EU

V rámci Evropské unie byla vydána řada nařízení a vyhlášek s cílem zajistit ochranu spotřebitelů před nákazou parazity, kteří se mohou vyskytovat v potravě, včetně mořských ryb. Níže jsou uvedena tato nařízení EU a vyhlášky vydané v České republice za účelem ochrany zdraví spotřebitelů.

- *Rady (ES) č. 1224/2009 ze dne 20. listopadu 2009 o zavedení kontrolního režimu Společenství k zajištění dodržování pravidel společné rybářské politiky, o změně nařízení (ES) č. 847/96, (ES) č. 2371/2002, (ES) č. 811/2004, (ES) č. 768/2005, (ES) č. 2115/2005, (ES) č. 2166/2005, (ES) č. 388/2006, (ES) č. 509/2007, (ES) č. 676/2007, (ES) č. 1098/2007, (ES) č. 1300/2008 a (ES) č. 1342/2008 a o zrušení nařízení (EHS) č. 2847/93, (ES) č. 1627/94 a (ES) č. 1966/2006. Toto nařízení bylo částečně změněno nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1380/2013 ze dne 11. prosince 2013 o společné rybářské politice a nařízením Evropského parlamentu a Rady (EU) 2015/812 ze dne 20. května 2015, pokud jde o povinnost vykládky.*
- *Nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1380/2013 ze dne 11. prosince 2013 o společné rybářské politice, o změně nařízení Rady (ES) č. 1954/2003 a (ES) č. 1224/2009 a o zrušení nařízení Rady (ES) č. 2371/2002 a (ES) č. 639/2004 a rozhodnutí Rady 2004/585/ES.*

- *Nařízení Rady (EU) 2023/194 ze dne 30. ledna 2023, kterým se pro rok 2023 stanoví rybolovná práva ve vodách Unie a rybolovná práva, jimiž disponují rybářská plavidla Unie v některých vodách mimo Unii, pro některé rybí populace, a kterým se pro roky 2023 a 2024 stanoví tato rybolovná práva pro některé populace hlubinných druhů ryb.*
- *Nařízení komise (EU) č. 1276/2011 ze dne 8. prosince 2011, kterým se mění příloha III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, pokud jde o ošetření produktů rybolovu určených k lidské spotřebě za účelem usmrcení životaschopných parazitů.*

1.11 Legislativní opatření v ČR

- *Vyhláška č. 197/2004 Sb. k provedení zákona č. 99/2004 Sb., o rybníkářství, výkonu rybářského práva, rybářské strážní, ochraně mořských rybolovných zdrojů a o změně některých zákonů.*
- *Vyhláška č. 69/2016 Sb. obsahuje požadavky na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich.*
- *Zákon č. 166/1999 Sb. obsahuje zákon o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon).*
- *Zákon České národní rady č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání.*

2 Praktická část

2.1 Cíl práce

Základním cílem bylo zjistit, do jaké míry lze larvy hlístic čeledi Anisakidae v rybách po tepelném zpracování (uzení) zachytit při použití trávící metody a současně porovnat záchyty larev z ryb mražených a chlazených prodávaných v obchodní síti. Dalším cílem bylo získání informace u kterých druhů ryb se vyskytují larvy čeledi Anisakidae v obchodní síti v Jihočeském kraji, konkrétně v Českých Budějovicích.

2.2 Materiál

Všechny parazitologicky vyšetřované ryby byly zakoupeny v maloobchodní tržní síti. Vzorky byly vyšetřeny v období od května roku 2022 do března roku 2023. Celkem bylo vyšetřeno 17 mořských ryb, z toho 7 sledů obecných *Clupea harengus* Linnaeus, 1758, 8 makrel *Scomber scombrus* Linnaeus, 1758 a 2 tresky tmavé *Pollachius virens* (Linnaeus, 1758). Za účelem zjištění vlivu technologického zpracování ryb na životaschopnosti larev hlístic z čeledi Anisakidae byly použity ryby uzené (kuchané/nekuchané), chlazené (nekuchané), mražené (nekuchané) a filety. V tabulce níže je uveden konkrétní počet vyšetřovaných ryb dle technologického zpracování a datum vyšetření.

Tabulka č. 1 – Přehled vyšetřovaných ryb

Proto- kol č.	Název ryby	Technologické zpracování	Datum zakoupení/vyšetření
1.	Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	4. 5. 2022
2	Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	21. 8. /22. 8. 2022
3.	Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	21. 8. /22. 8. 2022
4.	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	chlazená, nekuchaná	25. 8. 2022
5	Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	5. 9. 2022
6.	Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	5. 9. 2022

7.	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	mražená, nekuchaná	15. 9. 2022
8.	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	mražená, nekuchaná	15. 9. 2022
9.	Sleď obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	4. 12. 2022
10.	Sleď obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	4. 12. 2022
11.	Treska tmavá (<i>Pollachius virens</i>)	filet	10. 3. /11. 3. 2023
12.	Treska tmavá (<i>Pollachius virens</i>)	filet	10. 3. /11. 3. 2023
13.	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	uzená, kuchaná	10. 3. /11. 3. 2023
14.	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	uzená, kuchaná	10. 3. /11. 3. 2023
15.	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	chlazená, nekuchaná	10. 3. /11. 3. 2023
16.	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	chlazená, nekuchaná	10. 3. /11. 3. 2023
17.	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	chlazená, nekuchaná	10. 3. /11. 3. 2023

2.3 Metody

2.3.1 Parazitologická pitva

Před provedením trávicí metody byly všechny vzorky podrobeny parazitologické pitvě. Nejprve byly ryby zváženy a změřeny a poté následovala parazitologická pitva. Pomocí skalpelu byla naříznuta břišní dutina od řitního otvoru po žábry. Po odstranění tělní stěny a následně vnitřních orgánů byly spočítány makroskopicky viditelné larvy a podle pohybu bylo posouzeno, zda se jedná o živé nebo již uhynulé larvy. Celkový počet živých i uhynulých larev byl zaznamenán do protokolu, které jsou součástí přílohy.

2.3.2 Trávicí metoda

Trávicí metoda je vhodná ke zjišťování larev ve svalovině vyšetřených vzorků, zejména ke zjištění počtu nalezených larev. Metoda využívá natrávení svaloviny hostitele, které provedeno pomocí pepsinu a kyseliny chlorovodíkové (Cammilleri, 2016). K vyšetření byla použita svalovina ryb (bez kostí), která byla pro lepší natrávení předem rozmělněna v mixéru.

2.3.2.1 Princip

Pomocí trávicí metody zjišťujeme, zda po použití trávicích enzymů (pepsin) dochází k natrávení larev anisakidních hlístic. Použita byla metodika rutinně používaná v diagnostických laboratořích Státního veterinárního ústavu (SVÚ) Jihlava, pobočka České Budějovice, pro diagnostiku larev svalovců (*Trichinella* spp.).

Parazitickou hlístici druhu *Trichinella spiralis* (i další zástupce rodu *Trichinella*) lze detekovat již za 17 dní po nákaze hostitele nálezem larev. Citlivost trávicí metody je přibližně 3 larvy /1 g tkáně. Metoda je nejcitlivější u čerstvých vzorků a její citlivost se snižuje u mraženého masa a svaloviny v rozkladu. Senzitivita testu rovněž stoupá přímo úměrně s množstvím testované tkáně. Pokud tedy testujeme 5 g, zvyšuje se citlivost až na 1 larvu /1 g tkáně (Veterinární univerzita, 2022).

2.3.2.2 Pomůcky a přístroje

- Pomůcky: magnetická míchačka, míchadlo, pipetovací nástavec, nálevka, sítko (170–180 µm), dělicí nálevka 2 l, teploměr, stativ s kruhy, pipety 25 ml, kádinky 3 l, válec 50 ml, malé Petriho misky, malá kádinka, pinzeta, nůžky, alobal, Pasteurova pipeta, skalpel
- Přístroje: váhy, mixér, dávkovač, stereomikroskop (eventuálně trichinoskop)

2.3.2.3 Chemikálie

- Kyselina chlorovodíková 25%
- Pepsin 1 : 10 000 HF
- Voda o teplotě 45 °C

2.3.2.4 Pracovní postup

Pracovní postup se upravuje podle množství vyšetřovaného masa (viz tabulka č. 2). V mém případě se jednalo nejčastěji o 50 g rybího masa. Trávicí směs obsahovala 1000 ml vodovodní vody, 5 g pepsinu a 8 ml kyseliny chlorovodíkové. Proces trávení se považuje za uspokojivý, pokud na sítku nezůstane více tkáně než 5 % počáteční hmotnosti vzorku.

Tabulka č. 2 – Základní údaje složení trávicí tekutiny závislosti na množství vyšetřované svaloviny (podle údajů z SVÚ Jihlava, pobočka České Budějovice)

Množství svaloviny (g)	Pepsin (g)	25 % HCl (ml)	Vodovodní voda (ml)
50	5,0	8,0	1000
55	5,5	8,8	1100
60	6,0	9,6	1200
65	6,5	10,4	1300
70	7,0	11,2	1400
75	7,5	12,0	1500
80	8,0	12,8	1600
85	8,5	13,6	1700
90	9,0	14,4	1800
95	9,5	15,2	1900
100	10,0	16,0	2000

1. Nejprve bylo zváženo množství vyšetřovaného masa, byly zapsány zjištěné hodnoty a podle tabulky bylo vyhodnoceno, jaké množství pepsinu a kyseliny chlorovodíkové je potřeba přidat.
2. Do třilitrové kádinky bylo nalito 1 l vodovodní vody zahřáté na teplotu 45 °C, poté byla do kádinky vložena magnetická míchací tyčinka a kádinka byla umístěna na předeřátou ploténku a zahájilo se míchání. Je důležité, aby míchačka udržovala konstantní teplotu v rozmezí 44–46 °C a aby se během míchání trávicí tekutina otáčela v dostatečně vysokých otáčkách a vytvořila hluboký vír.
3. Následně bylo přidáno 5 g pepsinu a 8 ml kyseliny chlorovodíkové.
4. Vyšetřované maso bylo rozmělněno v mixéru, opakovaným zapínáním po dobu 2–3 vteřin.
5. Rozmělněné rybí maso bylo vloženo do kádinky s vodou, pepsinem a kyselinou chlorovodíkovou.
6. Kádinka byla zakryta aluminiovou folií a poté se nechala působit trávicí směs po dobu 20–30 minut, aby byly rozpuštěny všechny částčky masa.

7. Poté byla míchačka vypnuta, trávicí tekutina byla přelita přes sítko do sedimentační nálevky a její obsah byl prohlédnut pod stereomikroskopem (zvětšení 10×).

2.3.2.5 Vyhodnocení výsledků

Po natrávení vzorku trávicí tekutinou a následném přelití přes sítko jsem určila přítomnost nenatrávených larev anisakidů. Larvy v případě pozitivního nálezu byly viditelné pouhým okem na sítku. Následně bylo zkontrolováno sítko ještě pod stereomikroskopem s cílem nalézt případné zbytky nenatrávených larev. Počty nalezených larev jsou uvedeny v pracovních protokolech, které jsou součástí přílohy.



Obrázek č. 4 – Mikroskopický nález larev hlístic z čeledi Anisakidae po natrávení; některé larvy jsou uvolněny z kutikulárního obalu (originál)

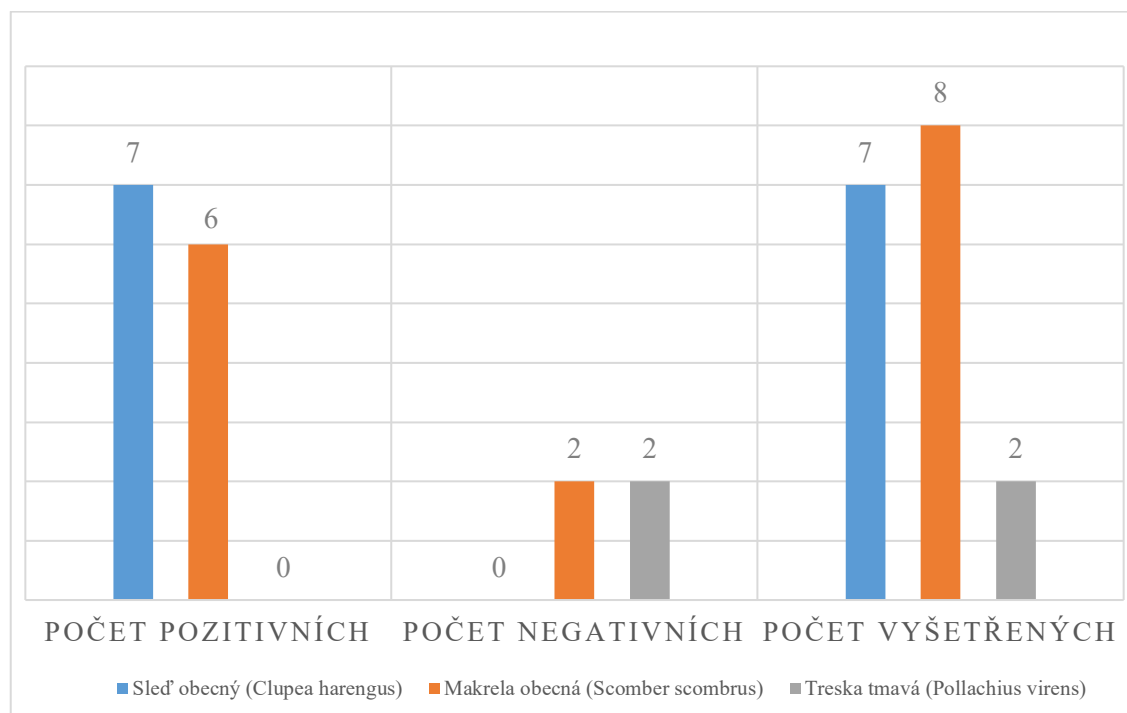
2.4 Výsledky

Z celkového počtu parazitologicky vyšetřených ryb (17 kusů) byl zjištěn pozitivní nález larev hlístic čeledi Anisakidae u 13 kusů (tj. prevalence 76 %), zatímco 4 ryby neobsahovaly larvy anisakidních hlístic. Ze 7 kusů vyšetřovaných sledů obecných

(*Clupea harengus*) byly larvy anisakidních hlístic nalezeny u všech vyšetřených ryb (tj. prevalence 100 %). Z 8 vyšetřovaných makrel obecných (*Scomber scombrus*) byl pozitivní nález larev anisakidů u 6 kusů a 2 kusy byly negativní (tj. prevalence 75 %). V žádné ze dvou tresek tmavých (*Pollachius virens*) nebyly larvy anisakidních hlístic zjištěny. Výsledky parazitologického vyhodnocení ryb jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 – Parazitologické vyhodnocení

Druh ryby	Počet vyšetřených	Počet pozitivních	Počet negativních
Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	7	7	0
Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	8	6	2
Treska tmavá (<i>Pollachius virens</i>)	2	0	2
CELKEM	17	13	4



Obrázek č. 5 – Grafické znázornění počtu vyšetřovaných ryb

Pomocí vizuální kontroly byly u všech uzených sledů obecných nalezeny larvy hlístic z čeledi Anisakidae.

V případě chlazených ryb s vnitřnostmi byl pozitivní nález u poloviny vyšetřovaných kusů, kdy v jednom případě i po natrávení byla část larev živých. Toto zjištění znamená, že při požití těchto ryb mohou živé larvy u člověka vyvolat onemocnění zvané anisakidóza.

U mražených ryb s vnitřnostmi byly larvy hlístic velmi časté, ale všechny byly již mrtvé. U dvou uzených makrel obecných byl nález pomocí vizuální kontroly negativní, ale pomocí trávicí metody byly zjištěny mrtvé larvy, což dokazuje vyšší citlivost trávicí metody ve srovnání s vizuální kontrolou.

Všechny filety z tresky tmavé byly parazitologicky negativní. Veškeré údaje o výsledcích parazitologického vyšetření studovaných ryb jsou uvedeny v tabulce č. 4.

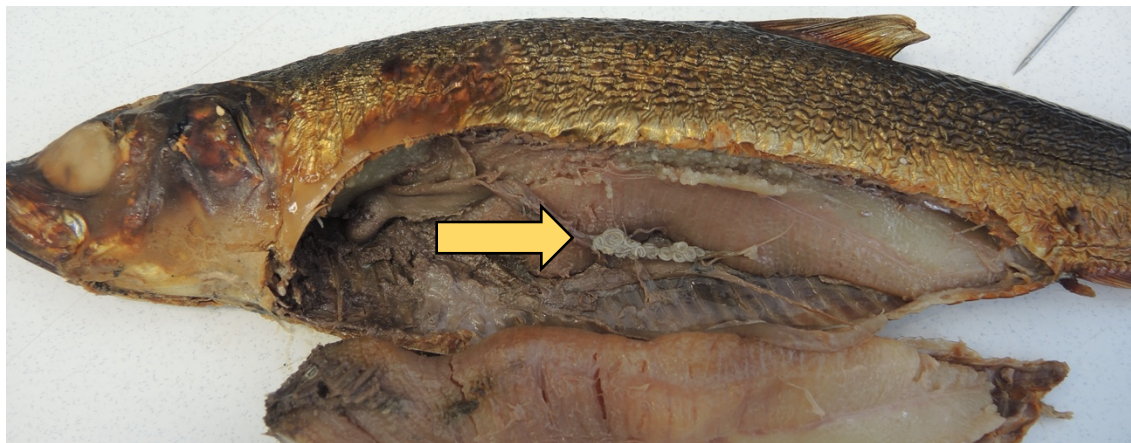
Tabulka č. 4 – Parazitologické vyšetření ryb na přítomnost larev anisakidních hlístic

Druh ryby	Technologické zpracování	Počet larev před natrávením (mrtvé/živé)	Počet larev po natrávení (mrtvé/živé)	Vyhodnocení	Protokol č.
Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	14/0	0/0	pozitivní	1.
Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	2/0	0/0	pozitivní	2.
Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	12/0	0/0	pozitivní	3.
Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	26/0	0/0	pozitivní	5.
Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	1/0	1/0	pozitivní	6.
Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	14/0	0/0	pozitivní	9.
Sled' obecný	uzený, nekuchaný	7/0	0/0	pozitivní	10.

<i>(Clupea harengus)</i>					
Makrela obecná <i>(Scomber scombrus)</i>	chlazená, nekuchaná	0/0	0/0	negativní	4.
Makrela obecná <i>(Scomber scombrus)</i>	mražená, nekuchaná	138/0	13/0	pozitivní	7.
Makrela obecná <i>(Scomber scombrus)</i>	mražená, nekuchaná	27/0	0/0	pozitivní	8.
Makrela obecná <i>(Scomber scombrus)</i>	uzená, kuchaná	0/0	1/0	pozitivní	13.
Makrela obecná <i>(Scomber scombrus)</i>	uzená, kuchaná	0/1	2/0	pozitivní	14.
Makrela obecná <i>(Scomber scombrus)</i>	chlazená, nekuchaná	10/2	8/4	pozitivní	15.
Makrela obecná <i>(Scomber scombrus)</i>	chlazená, nekuchaná	0/0	0/0	negativní	16.
Makrela obecná <i>(Scomber scombrus)</i>	chlazená, nekuchaná	5/1	5/0	pozitivní	17.
Treska tmavá <i>(Pollachius virens)</i>	filet	0/0	0/0	negativní	11.
Treska tmavá <i>(Pollachius virens)</i>	filet	0/0	0/0	negativní	12.

U sledů obecných se larvy nejvíce nacházely na vnitřní straně gonád (jiker u samic) a v blízkosti střeva. Ve všech vyšetřených rybách byly nalezeny pouze mrtvé larvy.

Na obrázku č. 6 je fotograficky zachycen makroskopický nález mrtvých larev hlístic z čeledi Anisakidae. Larvy byly přítomny v uzeném sledi obecném s vnitřnostmi; v okolí střeva a vaječníku lze vidět velký shluk larev.



Obrázek č. 6 – Parazitologický nález larev hlístic z čeledi Anisakidae u sledě obecného (*Clupea harengus*); larvy označené šipkou (originál)

Larvy anisakidů u makrely obecné byly převážně lokalizovány na povrchu jater, okolí střeva a ledvin a na pylorických přívěscích. V obou případech uzených makrel bez vnitřností byl pozitivní nález až po natrávení svaloviny, což je důkazem lepší citlivosti trávicí metody.

Na obrázku č. 7 je zachycen makroskopický nález mrtvých larev hlístic z čeledi Anisakidae. Larvy byly přítomny v mražené makrele obecné s vnitřnostmi. Jedná se o masivní nález v okolí střeva, žaludku a pohlavních orgánů.



Obrázek č. 7 – Masivní parazitologický nález larev hlístic z čeledi Anisakidae u makrely obecné (*Scomber scombrus*) (originál)

Tabulka č. 5 – Lokalizace larev u pozitivních vzorků

Druh ryby	Technologické zpracování	Počet larev před natrávením (mrtvé/ živé)	Počet larev po natrávení (mrtvé / živé)	Lokalizace larev	Vyhodnocení	Protokol č.
Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	14/0	0/0	povrch gonád, okolí střeva	pozitivní	1.
Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	2/0	0/0	vnitřní strana jiker, blízko střeva	pozitivní	2.
Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	12/0	0/0	vnitřní strana gonád	pozitivní	3.
Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	26/0	0/0	okolí střeva a ovarii	pozitivní	5.
Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	1/0	1/0	vnější strana ovaria	pozitivní	6.

Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	14/0	0/0	okolí střeva a jater, kraniální část gonád	pozitivní	9.
Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)	uzený, nekuchaný	7/0	0/0	vnější strana gonád	pozitivní	10.
Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	mražená, nekuchaná	138/0	13/0	povrch jater, okolí střeva a ledvin	pozitivní	7.
Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	mražená, nekuchaná	27/0	0/0	povrch jater, okolí střeva a ledvin	pozitivní	8.
Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	uzená, kuchaná	0/0	0/1	svalovina	pozitivní	13.
Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	uzená, kuchaná	0/1	0/2	svalovina	pozitivní	14.
Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	chlazená, nekuchaná	10/2	8/4	na pylorických přívěscích, okolo střeva, jater, žaludku, a jícnu	pozitivní	15.
Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)	chlazená, nekuchaná	5/1	5/0	na pylorických přívěscích, okolo střeva, ve svalovině	pozitivní	17.

Část nalezených larev byla fixována v 96 %-ním v etanolu a následně byla osekvenována dr. Camilou Pantoja de Oliveirou z Brazílie v rámci jejího pracovního pobytu v Parazitologickém ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích. Na základě porovnání sekvencí podjednotky 2 mitochondriálního genu pro cytochrom oxidázu (*cox2*; délka 506 nukleotidů) bylo zjištěno, že všechny larvy patří do druhu-genotypu *Anisakis simplex* sensu stricto (C. Pantoja de Oliveira – nepublikované údaje).

Vzorky vybrané pro molekulární analýzy byly rozděleny na tři části. Přední a zadní část byly ponechány jako morfologické vouchery (hologenofory) a prostřední část byla připravena pro extrakci celkové genomové DNA podle protokolu popsaneho Georgievou et al. (2013). Amplifikace DNA částečného fragmentu mitochondriálního genu *cox2* byla provedena pomocí primerů 211 F a 210 R (Nadler a Hudspeth, 2000). PCR reakce byla připravena v celkovém objemu 25 µl s 8 µl H₂O, 1,5 µl (10 µM) každého primeru, 12,5 µl SYBR® Green Master Mix a 1,5 µl genomové DNA. Parametry amplifikace pomocí PCR byly použity podle práce Nadler a Hudspeth (2000). Získané amplikony byly přečištěny pomocí Exo-SAP-IT Kit™ Express Reagent (Thermo Fisher Scientific) a zaslány komerční firmě SEQme, Dobříš, Česká republika (<https://www.seqme.eu>) k sekvenování. Pět nově získaných a 20 dříve publikovaných sekvencí zástupců rodu *Anisakis* bylo upraveno (alignment) pomocí programu ClustalW implementovaného v programu Geneious ver. 11.

Srovnávací analýza sekvencí potvrdila přítomnost druhu *Anisakis simplex* sensu stricto u zkoumaných ryb. Fylogenetický strom získaný z BI analýzy (Bayesian inference) je uveden na obrázku č. 8. Genetické vzdálenosti sekvencí jednotlivých porovnaných vzorků druhů rodu *Anisakis* jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Nově získané sekvence byly umístěny do stejné genetické linie s izoláty *Anisakis simplex* sensu stricto. Dvě nově získané sekvence (CP209 a CP211) byly identické se sekvencemi *Anisakis simplex* sensu stricto OM142476 a KY595216, které byly získány ze sviňuchy obecné *Phocoena phocoena* (Linnaeus, 1758) na pobřeží Skotska a ze sledě obecného *Clupea harengus* v Baltském moři. Sekvenční rozdíly mezi našimi pěti exempláři byla 0 – 1 %. Vnitrodruhová genetická variabilita mezi sekvencemi našich vzorků a sekvencemi *Anisakis simplex* sensu stricto uloženými v genové bance byla rovněž 0 – 1 %, přičemž sekvence CP208, CP210 a OM142472 (*Anisakis simplex* sensu stricto) vykazovaly nejvyšší vnitrodruhovou divergenci (1 %).

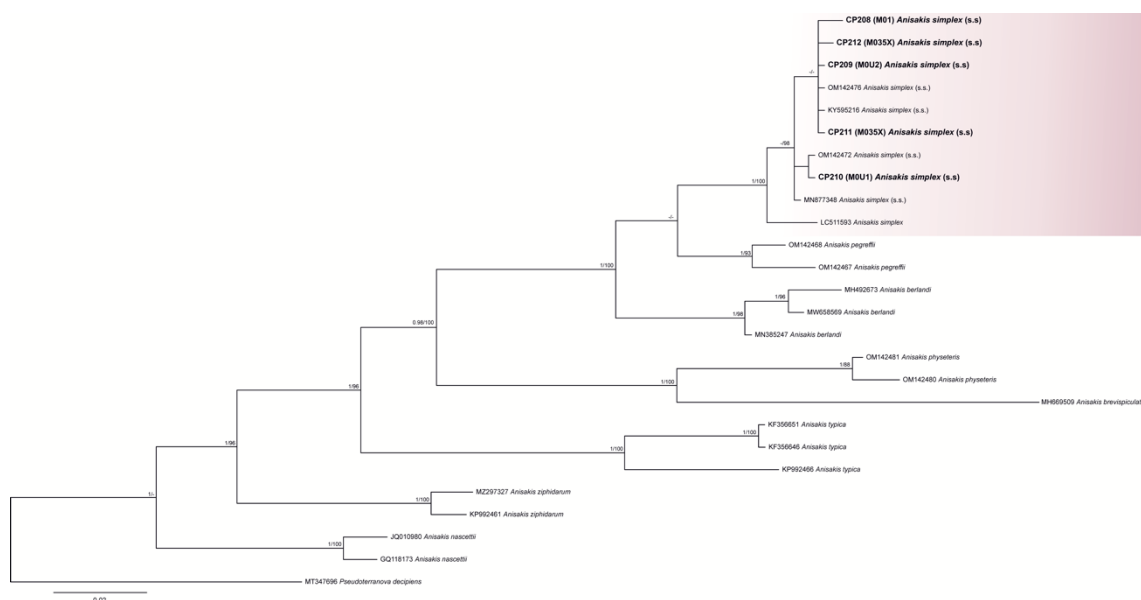
Tabulka č. 6 – Porovnání nukleotidů (%) částečných sekvencí mtDNA *Anisakis* spp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
1. MH669509 <i>Anisakis brevicaudata</i>																									
2. OM142481 <i>Anisakis physeteris</i>	10.3																								
3. OM142480 <i>Anisakis physeteris</i>	11.3	1.0																							
4. KP992466 <i>Anisakis typica</i>	17.4	14.4	14.6																						
5. KF356651 <i>Anisakis typica</i>	17.4	13.4	14.0	5.7																					
6. KF356646 <i>Anisakis typica</i>	17.4	13.4	14.0	5.7	0.0																				
7. MH492673 <i>Anisakis berlandi</i>	15.2	12.6	12.5	13.2	12.3	12.3																			
8. MW658569 <i>Anisakis berlandi</i>	14.8	12.8	12.6	13.4	12.5	12.5	1.2																		
9. MN385247 <i>Anisakis berlandi</i>	15.0	12.6	12.5	12.8	12.3	12.3	1.8	1.0																	
10. LC511593 <i>Anisakis simplex</i>	15.4	13.0	12.5	13.2	13.8	13.8	6.3	5.9	4.9																
11. MN877348 <i>Anisakis simplex</i> (s.s.)	14.8	12.8	12.3	12.8	13.0	13.0	6.3	5.9	4.9	1.2															
12. OM142472 <i>Anisakis simplex</i> (s.s.)	14.6	12.6	12.1	12.8	12.8	12.8	6.3	5.9	4.9	1.4	0.2														
13. CP210 <i>Anisakis simplex</i> (s.s.)	14.6	12.6	12.1	12.8	12.8	12.8	6.3	5.9	4.9	1.4	0.2	0.0													
14. CP208 <i>Anisakis simplex</i> (s.s.)	14.8	12.6	12.5	13.2	12.8	12.8	6.3	5.9	4.9	2.0	0.8	1.0	1.0												
15. CP212 <i>Anisakis simplex</i> (s.s.)	14.4	12.3	12.1	13.2	12.8	12.8	5.7	5.3	4.3	1.8	0.6	0.8	0.8	0.6											
16. CP209 <i>Anisakis simplex</i> (s.s.)	14.6	12.5	12.3	13.0	12.6	12.6	5.9	5.5	4.5	1.6	0.4	0.6	0.6	0.4	0.2										
17. OM142476 <i>Anisakis simplex</i> (s.s.)	14.6	12.5	12.3	13.0	12.6	12.6	5.9	5.5	4.5	1.6	0.4	0.6	0.6	0.4	0.2	0.0									
18. KY595216 <i>Anisakis simplex</i> (s.s.)	14.6	12.5	12.3	13.0	12.6	12.6	5.9	5.5	4.5	1.6	0.4	0.6	0.6	0.4	0.2	0.0	0.0								
19. CP211 <i>Anisakis simplex</i>	14.6	12.5	12.3	13.0	12.6	12.6	5.9	5.5	4.5	1.6	0.4	0.6	0.6	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0							
20. OM142468 <i>Anisakis pegreffii</i>	14.4	12.8	12.6	13.0	12.3	12.3	6.3	5.9	5.3	4.3	4.0	3.8	3.8	4.2	4.2	4.0	4.0	4.0	4.0						
21. OM142467 <i>Anisakis pegreffii</i>	15.2	12.6	12.5	13.0	11.5	11.5	5.9	5.9	5.7	5.1	4.7	4.5	4.5	4.9	4.9	4.7	4.7	4.7	4.7	1.8					
22. MZ297327 <i>Anisakis ziphidarum</i>	13.0	12.8	12.3	13.2	14.2	14.2	12.6	11.9	11.3	11.3	11.1	11.1	11.1	11.5	11.1	11.3	11.3	11.3	11.9	12.6					
23. KP992461 <i>Anisakis ziphidarum</i>	13.6	13.2	12.6	13.2	13.8	13.8	12.5	12.1	11.1	11.3	11.3	11.1	11.1	11.5	11.1	11.3	11.3	11.3	11.3	11.9	12.6	1.4			
24. JQ010980 <i>Anisakis nascetti</i>	16.4	15.2	15.4	12.8	13.8	13.8	13.6	13.0	12.5	13.0	13.2	13.2	13.2	13.2	12.8	13.0	13.0	13.0	13.0	12.8	13.4	9.7	9.9		
25. GQ118173 <i>Anisakis nascetti</i>	15.8	15.0	15.2	12.3	13.2	13.2	13.4	12.8	12.3	12.8	13.0	13.0	13.0	13.0	12.6	12.8	12.8	12.8	12.8	12.6	13.2	9.5	9.7	1.4	

Tabulka č. 7 – Seznam sekvenovaných vzorků *Anisakis simplex*

Host: *Scomber scombrus*

LAB	Extraction code	TS-Code	Species	Host	Locality	
CZ	CP207	M01	<i>Anisakis simplex</i>	<i>Scomber scombrus</i>	Czech (fish market)	cox2
CZ	CP208	M01	<i>Anisakis simplex</i>	<i>Scomber scombrus</i>	Czech (fish market)	cox2
CZ	CP209	M0U2	<i>Anisakis simplex</i>	<i>Scomber scombrus</i>	Czech (fish market)	cox2
CZ	CP210	M0U1	<i>Anisakis simplex</i>	<i>Scomber scombrus</i>	Czech (fish market)	cox2
CZ	CP211	M035X	<i>Anisakis simplex</i>	<i>Scomber scombrus</i>	Czech (fish market)	cox2
CZ	CP212	M035X	<i>Anisakis simplex</i>	<i>Scomber scombrus</i>	Czech (fish market)	cox2



Obrázek č. 8 – Fylogenetický strom druhů rodu *Anisakis* (poskytnuto dr. Camilou Pantoja de Oliveira)

2.5 Diskuse

Výsledky této práce i předchozích existujících údajů, potvrzují výskyt larev hlístic čeledi Anisakidae v rybích produktech zpracovávaných a prodávaných v maloobchodní síti v České republice. Výskyt larev čeledi Anisakidae v mořských rybách v tržní síti České republiky může být ovlivněn technologickým zpracováním ryb. Z toho lze usoudit, že správné zpracování ryb je klíčové pro minimalizaci rizika konzumace potravin kontaminovaných hlísticemi z rodu *Anisakis* nebo dalších rodů anisakidních hlístic. Tepelným opracováním bývá parazit vždy usmrcen, takže z hlediska ohrožení zdraví lidí anisakidózou není přítomnost parazitů v surovině nebezpečná. Nicméně mrtví červi mohou být silným alergenem, takže i při absenci živého parazita může být přítomnost těchto hlístic v rybách produktu závažné zdravotní důsledky. V souladu s nařízením EU o produktech rybolovu nesmí být viditelní parazité přítomni v produktech a tyto produkty se stahují z trhu a likvidují. Nicméně v praxi není možné toto nařízení i vzhledem k mimořádně častému a početnému výskytu larev anisakidních hlístic zcela důsledně dodržovat. Svědčí o tom i výsledky této práce, stejně jako údaje z jiných zemí (Audicana et al., 2002).

Hlístice jsou nejčastěji zjišťovány u importovaných nekuchaných mořských ryb v dutině tělní na povrchu gonád, jater a střeva. Jedná se především o larvy rodu *Anisakis*, v mém konkrétním případě druhu *Anisakis simplex* sensu stricto. Tito paraziti jsou prokazováni hlavně u sledů ze zimních výlovů z oblastí východního pobřeží USA a Kanady. U makrel a tresek je jejich výskyt méně častý (Konečný a Pavlíček, 1997).

V roce 2011 bylo dodáno do České republiky z Norska 5 tisíc kg mražených celých ryb, konkrétně sledů z Norska. Tyto ryby měly být využeny, avšak při běžné veterinární kontrole byla ve svalovině těchto ryb zjištěna přítomnost parazitů rodu *Anisakis*. Toto zjištění vedlo k pozastavení výroby a vydání zákazu uvolnění těchto ryb do obchodní sítě. Část zpracovaných výrobků byla již stáhnuta z trhu a odběratelé byli informováni (Zachytili jsme sledě s parazity, 2011).

V roce 2016 bylo na základě podnětu spotřebitele na zdravotní potíže po konzumaci originálně balené potraviny „Losos divoký uzený – kousky 100 g“, dáváno do příčinné souvislosti s přítomností cizorodých larev. Po laboratorním vyšetření byla potvrzena přítomnost *Anisakis simplex* (Losos divoký uzený – kousky 100 g, 2016).

V roce 2022 po zakoupení tresky tmavé se česká zákaznice obchodního řetězce Lidl zděsila, neboť v rybě našla parazita. Nepříjemný nález sdílela žena na sociálních sítích (Dočkalová, 2022). V této bakalářské práci však byly oba vzorky stejného druhu ryb negativní.

Dle studie Takabe et al., 1998, bylo zjištěno, že 98 % makrel (rod *Scomber*) a 94 % tresek (rod *Gadus*) z velkoobchodu s rybami v Japonsku bylo napadeno parazity rodu *Anisakis*.

Celosvětovou prevalenci anisakidózy je obtížné určit kvůli nedostatečnému hlášení a chybné diagnóze případů. Je však známo, že jde o rozšířený problém v mnoha částech světa, zejména v oblastech, kde se běžně konzumují syrové nebo nedostatečně tepelně upravené mořské plody. Výsledky mé bakalářské práce poskytují další důkaz o častém a četném výskytu larev těchto hlístic, které mají zoonotický potenciál, a kromě vzniku lidské anisakidózy se mohou mrtvé larvy podílet na vzniku alergické reakce u přecitlivělých pacientů. Problematice výskytu larev těchto hlístic mořských savců by tedy měla být i u nás věnována větší pozornost.

Z důvodu nedostatečné informovanosti o anisakidóze se doporučuje shromáždit více epidemiologických údajů, aby bylo možné získat lepší přehled o dopadu těchto hlístic na lidské zdraví. Údaje ze Španělska a Norska odhadují počet případů anisakidózy na 10 – 20 tisíc případů ročně (Rahmati et al., 2020, Gabriël et al., 2022).

V studii Cammilleri et al., 2016 byla vyvinuta nová metoda k detekci larev z čeledi Anisakidae pomocí mechanického trávicího systému Trichineasy®. K ověření metody bylo vyšetřeno celkem 142 vzorků ryb, které patřily 14 různým druhům. Reakční směs, která obsahovala 100 g vzorku, 10 g pepsinu a 50 ml 10 % HCl a byla trávena při 36 ± 1 °C po dobu 20 minut byla vyhodnocena jako nejlepší podmínka pro trávení vzorků ryb. Tyto parametry rovněž umožnily detekci životaschopných larev po trávení. Výsledky potvrzují, že tato metoda umožňuje detekci larev z čeledi Anisakidae v rybích produktech.

Trávení svaloviny pepsinem je běžnou metodou používanou pro detekci anisakidů v rybím mase. Tato metoda však může být časově náročná a může vyžadovat optimalizaci, aby se zvýšila její účinnost. V této studii se zaměřili na optimalizaci trávicí metody pro detekci anisakidů v produktech rybolovu. Testovali různé proměnné včetně koncentrace pepsinu, pH rozkladu, teploty a doby trávení a poměru vzorku k roztoku.

Výsledky ukázaly, že zvýšení koncentrace pepsinu na 2 % a snížení pH rozkladu na 1,5 zlepšilo účinnost metody. Jako optimální se ukázala teplota trávení 37 °C po dobu 1 hodiny a zvýšení poměru vzorku k trávicímu roztoku z 1:10 na 1:5 dále zlepšilo účinnost metody. Závěrem lze říct, že optimalizace pepsinové rozkladné metody úpravou koncentrace pepsinu může zlepšit účinnost detekce anisakidů v rybích produktech. Tato zjištění lze použít v rybářském průmyslu k zajištění bezpečnosti a kvality produktů rybolovu pro spotřebitele (Llarena-Reino et al., 2013).

Tejeda et al., 2016 testoval přežívání larev po zmrazení rybiho masa na – 10 °C, - 15 °C, - 20 °C, - 30 °C a následném trávení. Výsledky ukázaly, že žádná z larev, která přežila cyklus zmrazení/rozmrazení, nebyla po trávení pepsinem živá. Nicméně, jako v případě každého experimentu, je důležité vzít v úvahu další faktory, které mohou ovlivnit výsledky a provést další studie, aby se potvrdily tyto výsledky a získaly další informace o tématu.

Podobný pokus provedli Sánchez-Alfonso et al., 2021, ve kterém zjistili, že metoda umělého trávení (s použitím pepsinu) může podcenit životaschopnost *Anisakis simplex* L3 přítomného ve zpracovaných rybích produktech, zejména v těch, které prošly zmrazením a rozmrazením. Studie zjistila, že po cyklu zmrazení a rozmrazení může být celková výtěžnost larev až 60 % a procento larev, které odolaly trávení pepsinem a mohly být nalezeny živé, bylo mnohem nižší než u neošetřených larev (25-63 %). Tato zjištění naznačují, že metoda umělého trávení nemusí přesně odrážet skutečný počet životaschopných larev *Anisakis* v daném zmrazeném produktu. Je důležité poznamenat, že tato studie se zaměřila konkrétně na larvy *Anisakis* a není jasné, zda by se tato zjištění vztahovala i na jiné typy parazitů.. Výsledky však naznačují, že při používání metody umělého trávení k hodnocení parazitárních infekcí ve zpracovaných rybích produktech je třeba postupovat opatrně a že k získání přesnějšího hodnocení životaschopnosti parazitů bude možná nutné vyvinout alternativní metody nebo je použít ve spojení s metodou umělého trávení.

V našem výzkumu bylo u jedné vyšetřované ryby, konkrétně u chlazené, nekuchané makrely obecné zjištěno po natrávení několik živých mrtvých larev, což svědčí o schopnosti některých larev přežít během působení trávicího roztoku.

Dalším významným výsledkem této práce jsou pozitivní nálezy larev ve svalovině pomocí trávicí metody u kuchaných, uzených makrel obecných, u kterých vizuální vyšetření filetů neprokázalo přítomnost larev.

Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že technologické zpracování ryb mořských ryb má vliv na výskyt larev z čeledi Anisakidae. U nekuchaných ryb byl výskyt larev zpravidla větší než u ryb nekuchaných. Správné technologické zpracování mořských ryb může proto minimalizovat riziko konzumace anisakidů. Je také důležité, aby spotřebitelé byli informováni o rizicích spojených s konzumací nekuchaných ryb. Pokud tržní síť nenabízí bezpečné varianty uzených ryb, měli by spotřebitelé být obezřetní a při výběru ryb dbát na správné zpracování.

Cílem této bakalářské práce bylo rovněž zjistit, zda je trávicí metoda vhodná pro laboratorní diagnostiku larev hlístic z čeledi Anisakidae. Zjištěné výsledky jednoznačně prokazují vhodnost této diagnostické metody.

3 Závěr

Trávicí metodou bylo vyšetřeno celkem 17 kusů ryb, z toho 7 uzených nekuchaných sledů obecných, 2 mražené, nekuchané makrely obecné, 2 uzené, kuchané makrely obecné, 4 chlazené, nekuchané makrely obecné a 2 filety z tresky tmavé. Při parazitologické pitvě a následné vizuální kontrole byl negativní nález u obou filetů z tresky tmavé a ve dvou chlazených, nekuchaných makrelách. U dvou uzených, kuchaných makrel vizuální kontrola nezjistila přítomnost larev, ale po natrávení svaloviny byly u těchto ryb nenatrávené larvy nalezeny. Významným výsledkem byl nález 4 živých larev u chlazené, nekuchané makrely obecné *Scomber scombrus*.

V rámci této bakalářské práce byly u celkem 11 vyšetřených ryb nalezeny larvy hlístic z čeledi Anisakidae, konkrétně druhu *Anisakis simplex* sensu stricto. Lze proto konstatovat, že mořské ryby dovážené do České republiky mohou obsahovat larvy těchto parazitických hlístic.

Nákaze člověka lze zabránit tím, že se vyhneme konzumaci mořských nedostatečně tepelně upravených ryb nebo hlubokým zmražením při teplotě - 20 °C po dobu alespoň 24 hodin.

Na základě našich výsledku lze říct, že trávicí metoda je vhodná k detekci larev hlístic z čeledi Anisakidae.

4 Seznam použité literatury

1. ADROHER - BENÍTEZ, I., ADROHER - AUROUX, F. J., BENÍTEZ - RODRÍGUEZ, R., 2020. Anisakiasis and *Anisakis*: An underdiagnosed emerging disease and its main etiological agents. *Research in Veterinary Science*. 132, 535 – 545. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.08.003>
2. AIBINUA, I. E., SMOOKERA, P. M., LOPATA, A.L., 2019. *Anisakis* nematodes in fish and shellfish – from infection to allergies. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 384 – 393. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2019.04.007>
3. ANDERSON, R. C., 2000. *Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission*. Wallingford: CAB International. ISBN 0851997864.
4. Animalia, 2004. *Biolib.cz* [online]. Německo: Fauna Europaea. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id14923/>
5. *Anisakiasis FAQs* [online], 2010. CDC. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/parasites/anisakiasis/faqs.html>
6. Anisakiasis, 2019. In: *CDC* [online]. Dostupné z: <https://www.cdc.gov/parasites/anisakiasis/biology.html#>
7. ARMENTIA, A., MARTÍN - GIL, F. J., MARTÍNEZ, C., MARTÍN - ESTEBAN, M., CALLEJO, A., 2006. *Anisakis simplex* allergy after eating chicken meat. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*. 16, 258 – 263. Dostupné z: <https://www.jiaci.org/issues/vol16issue04/7.pdf>
8. AUDICANA, L., AUDICANA, M. T., CORREZ, L. F., KENNEDY, M. W., 1998. Cooking and freezing may not protect against allergenic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in humans. *Veterinary Records*. 140, 235. Dostupné z: [doi:10.1136/vr.140.9.235](https://doi.org/10.1136/vr.140.9.235)
9. AUDICANA, M. T., 2022. *Anisakis*, something is moving inside the fish. *Pathogens*. 11, 326. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pathogens11030326>
10. AUDICANA, M. T., ANSOTEGUI, I. J., CORRES, L. F., KENNEDY, M. W., 2002. *Anisakis simplex*: dangerous – dead and alive? *Trends in Parasitology*. 18, 2025. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)02152-3](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)02152-3)
11. AUDICANA, M. T., KENNEDY, M. W., 2008. *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews* 21, 360–379. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/CMR.00012-07>

12. AUDICANA, M. T., POZO, M. D., IGLESIAS, R., UBEIRA, F. M., 2003. *International Handbook of Foodborne Pathogens: Anisakis simplex and Pseudoterranova decipiens*. 1. Boca Raton: CRC Press. ISBN 9780429222955.
13. BAO, M., PIERCE, G. J., PASCUAL, S., GONZÁLEZ - MUNOZ, M., MATTIUCCI S., MLADINEO, I., CIPRIANI, P., BUŠELIC, I., STRACHAN, N. J. C.. Assessing the risk of an emerging zoonosis of worldwide concern: anisakiasis. *Scientific Reports*, 7, 43699. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/srep43699>
14. BILSKA-ZAJĄC, E., RÓŻYCKI, M., CHMURZYŃSKA, E., KARAMON, J., SROKA, J., KOCHANOWSKI, M., KUSYK, P., CENCEK, T., 2015. Parasites of Anisakidae family – geographical distribution and threat to human health. *Journal of Agricultural Science and Technology A*. 5, 146 – 152. doi: 10.17265/2161-6256/2015.02A.010
15. BRATTEY, J., CLARK, J. K., 1992. Effect of temperature on egg hatching and survival of larvae of *Anisakis simplex* B (Nematoda: Ascaridoidea). *Canadian Journal of Zoology*. 70, 274 – 279. Dostupné z: <https://doi.org/10.1139/z92-041>
16. CAMILLERI, G., CHETTA, M., COSTA, A., GRACI, S., COLLURA, R., BUSCEMI, M. D., CUSIMANO, M., ALONGI, A., PRINCIPATO, D., GIANGROSSO, G., VELLA, A., FERRANTELLI, V., 2016. Validation of the TrichinEasy® digestion system for the detection of Anisakidae larvae in fish products. *Acta Parasitologica*. 61, 369 – 375. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/ap-2016-0048>
17. CONG, W., ELSHEIKHA, M., 2021. Biology, Epidemiology, Clinical Features, Diagnosis, and treatment of Selected Fish-borne Parasitic Zoonoses. *Yale Journal of Biology and Medicine*. 94, 297 – 309. PubMed PMID: 34211350
18. *Contracaecum*, 2001. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Contracaecum>
19. DOČKALOVÁ, V., 2022. Zákazníci Lidlu Veroniku zdesil červ v tresce: V rybě našla škrkavku. *Extra.cz* [online]. Dostupné z: <https://www.extra.cz/zpravy-zakaznici-lidlu-veroniku-zdesil-nebezpecny-cerv-v-tresce-v-rybe-nasla-skrkavku-a4e3c>

20. GABRIËL, S., DORNY, P., SAELENS, G., DERMAUW, V., 2022. Foodborne Parasites and Their Complex Life Cycles Challenging Food Safety in Different Food Chains. *Foods* [online]. 12(1), 142. doi:10.3390/foods12010142
21. GAJDOŠOVÁ, M., 2020. *Anisakis*: malý problém pro suši, velký pro kytovce. *Vesmír* 99, 318–319. doi: 10.1111/gcb.15048
22. GEORGIEVA, S., SELBACH, C., FALTÝNKOVÁ, A., SOLDÁNOVÁ, M., SURES, B., SKÍRNISSON, K., KOSTADINOVA, A., 2013. New cryptic species of the 'revolutum' group of *Echinostoma* (Digenea: Echinostomatidae) revealed by molecular and morphological data. *Parasites & Vectors*. 6,64. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-64>
23. GUINDON, S., DUFAYARD, J. F., LEFORT, V., ANISIMOVA, M., HORDIJK, W., GASCUEL, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*. 59, 307 – 321. doi: 10.1093/sysbio/syq010
24. HOCHBERG, N. S., HAMER, D. H., HUGHES, J. M., WILSON, M. E., 2010. Anisakidosis: Perils of the Deep. *Clinical Infectious Diseases*. 51(7), 806 – 812. Dostupné z: <https://academic.oup.com/cid/article/51/7/806/354398?login=false>
25. HÜBNER, J., UHLÍKOVÁ, M., ZÁSTĚROVÁ, I., LEISSOVÁ, M., 1995. *Parazitární nákazy a onemocnění člověka a jejich laboratorní diagnostika*. Praha: Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví.
26. CHALMERS, R. M., ROBERTSON, L. J., DORNY, P., JORDAN, S., KÄRSSIN, A., KATZER, F., CARBONA S. L., LALLE, M., LASSEN, B., MLADINEO, I., ROZYCKI, M., BILSKA-ZAJAC E., SCHARES G., MAYER-SCHOLL, A., TREVISAN, CH., TYSNES, K., VASILEV, S., KLOTZ, CH., 2020. Parasite detection in food: Current status and future needs for validation. *Trends in Food Science & Technology*. 99, 337 – 350. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.03.011>
27. ISHIKAWA, T., KOJIMA, Y., AZUMI, M., IMAI, M., NOZAWA, Y., et al., 2019. Diagnosis of gastric anisakiasis by abdominal ultrasonography. *Global Imaging Insights*. 4(1). Dostupné z: <https://www.oatext.com/pdf/GII-4-186.pdf>
28. IVANOVIĆ, J., BALTIĆA, M. Ž., BOŠKOVIĆ, M., KILIBARDAB, N., DOKMANOVIĆA, M., MARKOVIĆA, R., JANJIĆA, J., BALTIĆA, B., 2017. *Anisakis* allergy in human. *Trends in Food Science & Technology*. 59, 25 – 29. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.11.006>

29. KARLÍK, T., 2021. *Parazitického červa z rybiho masa přibylo za 40 let dvěstěkrát. Může napadat i člověka* [online]. ČT24. Dostupné z: <https://ct24.ceskatelevize.cz/veda/3271980-parazitickeho-cerva-z-rybiho-masa-pribylo-za-40-let-dvestekrat-muze-napadat-i-cloveka>
30. KØIE, M., BERLAND, B., BURT, M. D. B., 1995. Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 52, 134 – 139. doi: 10.1139/f95-519
31. KONEČNÝ, MVDr. S., PAVLÍČEK MVDr. J., 1997. Nálezy cizopasníků rodu *Anisakis* u importovaných mořských ryb. *Veterinářství – pro praxi*. 474 – 475.
32. LLARENA-REINO, M., PIÑEIROA, C., ANTONIOA, J., OUTERIÑO, L., VELLOB, C., GONZÁLEZA, Á.F., PASCUALA, S., 2013. Optimization of the pepsin digestion method for anisakids inspection in the fishing industry. *Veterinary Parasitology*. 191, 276 – 283. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.09.015
33. Losos divoký uzený – kousky 100 g, 2016. *Mzcr* [online]. Ministerstvo zdravotnictví České republiky. Dostupné z: https://www.mzcr.cz/wp-content/uploads/wepub/12476/27482/Varován%C3%AD%20HH_losos%20uzený.pdf
34. MAZZUCCO, W., RAIA, D. D., MAROTTA, C., COSTA, A., FERRANTELLI, V., VITALE, F., CASUCCIO, A., 2018. *Anisakis* sensitization in different population groups and public health impact: A systematic review. *Plos one*. 13(9). Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203671>
35. MEASURES, L. N., 1993. Annotated List of Metazoan Parasites Reported from the Blue Whale, *Balaenoptera musculus*. *Journal of the Helminthological Society of Washington* 60(1), 62 – 66. Dostupné z: <http://bionames.org/bionames-archive/issn/1049-233x/60/62.pdf>
36. MILIOTIS, M.D., BIER (Eds.), J.W., 2003. *International Handbook of Foodborne Pathogens* (1st ed.). CRC Press. ISBN 9780429222955
37. MONTALTO, M., MIELE. MARCHEGGIANO, A., SANTORO, L., CURIGLIANO, V., VASTOLA, M., GASBARRINI, G., 2005. *Anisakis* infestation: a case of acute abdomen mimicking Crohn's disease and eosinophilic gastroenteritis. *Digestive and liver disease*. 37(1), 62 – 64. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.dld.2004.05.014>

38. NADLER, S.A., HUDSPETH, D. S. S., 2000. Phylogeny of the Ascaridoidea (Nematoda: Ascaridida) based on three genes and morphology: hypotheses of structural and sequence evolution. *Journal of Parasitology* 86, 380 – 393. Dostupné z: [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0380:POTANA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0380:POTANA]2.0.CO;2)
39. NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 1276/2011 ze dne 8. prosince 2011, kterým se mění příloha III nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004, pokud jde o ošetření produktů rybolovu určených k lidské spotřebě za účelem usmrcení životaschopných parazitů. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1276&from=ES>
40. NIEUWENHUIZEN, N. E., 2016. *Anisakis* – immunology of a foodborne parasitosis. *Parasite Immunology*. 38(9), 548 – 557. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/pim.12349>
41. NIEUWENHUIZEN, N. E., LOPATA, A. L., 2014. Allergic Reactions to *Anisakis* Found in Fish. *Current Allergy and Asthma Reports* volume. 14(8), 455. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11882-014-0455-3#citeas>
42. PACIOS, E., ARIAS-DIAZ, J., ZULOAGA, J., GONZALEZ-ARMENGOL, J., BALIBREA, J. L., VILLARROEL, P., 2005. Albendazole for the Treatment of Anisakiasis Ileus. *Clinical Infectious Diseases*. 41(12), 1825 – 1826. Dostupné z: <https://doi.org/10.1086/498309>
43. Rahmati, A. R., KIANI, B., AFSHARI, A., MOGHADDAS, E., WILLIAMS, M., SHAMSI, S., 2020. World-wide prevalence of *Anisakis* larvae in fish and its relationship to human allergic anisakiasis: a systematic review. *Parasitology research*. 119(11), 3585 – 3594. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06892-0>
44. REZAEI, N., ed., 2022. *Anisakis. Encyclopedia of Infection and Immunity*. Copyright © 2022 Elsevier. ISBN 9780323903035.
45. RONQUIST, F., TESLENKO, M., MARK, P., AYRES, D. L., DARLING, A., HÖHNA, S., LARGET, B., LIU, L., SUCHARD, M. A., HUELSENBECH, J.P., 2012. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. *Systematic Biology*. 61, 539 – 542. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
46. SÁNCHEZ - ALONSO, I., RODRÍGUEZ, S., TEJADA, M., NAVAS, A., GONZÁLEZ - MUÑOZ, M., CARECHE, M., 2021. The artificial digestion

- method underestimates the viability of *Anisakis simplex* (sl) L3 present in processed fish products. *Food and waterborne parasitology* [online]. 23, e00121. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.fawpar.2021.e00121>
47. TAKABE, K., OHKI, S., KUNIHIRO, O., SAKASHITA, T., ENDO, I., ICHIKAWA, Y., SEKIDO, H., AMANO, T., NAKATANI, Y., SUZUKI, K., SHIMADA, H., 1998. Anisakidosis: a cause of intestinal obstruction from eating sushi. *The American journal of gastroenterology*. 93(7), 1172 – 1173. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1998.00356.x>
 48. TEJADA, M., SÁNCHEZ - ALONSO, I., GONZÁLEZ - MUÑOZ, M., NAVAS, A., CARECHE, M., 2016. The pepsin digestion method may underestimate the content of *Anisakis* in fish products and this is dependent on the status of the larvae. Dostupné z: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/257325/1/pepsilarva.pdf>
 49. TOYODA, H., TANAKA, K., 2016. Intestinal Anisakiasis Treated Successfully with Prednisolone and Olopatadine Hydrochloride. *Case Reports Gastroenterology*. 10(1), 30 – 35. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4929386/>
 50. TSUKUI, M., MORIMOTO, N., KURATA, H., SUNADA, F., 2016. Asymptomatic anisakiasis of the colon incidentally diagnosed and treated during colonoscopy by retroflexion in the ascending colon. *Journal of Rural Medicine*. 11(2), 73 – 75. doi: 10.2185/jrm.2914
 51. Veterinární univerzita [online], 2022. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/ivbp/prohlidka-jatecnich-zvirat-a-masal/vysetreni-masa-na-trichinella>
 52. VOLF, P., HORÁK, P., 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-008-9
 53. Zachytili jsme sledě s parazity [online], 2011. Dostupné z: https://www.svscr.cz/zachytili_jsme_sledě_s_parazity

5 Seznam obrázků

Obrázek č. 1 – Porovnání morfologické stavby mezi larvami třetího stádia (L3) hlístic rodů *Anisakis* I. a II. typu, *Pseudoterranova*, *Contracaecum* a *Hysterothylacium*. Zkratky: a – anus, bt – vyvrtávací zub, e – jícen, ep – vylučovací pór, i – střevo, ic – slepé střevo (střevní výběžek), m – ústa, nr – nervový prstenec, p – papila, r – konečník, rg – rektální žláza, s – mukron, v – žaludek, va – výběžek žaludku (podle Adroher Benítez, 2020)

Obrázek č. 2 – Mikroskopická stavba larvy hlístice z rodu *Anisakis* (originál)

Obrázek č. 3 – Vývojový cyklus hlístic čeledi Anisakidae (podle CDC, 2019)

Obrázek č. 4 – Mikroskopický nález larev hlístic z čeledi Anisakidae po natrávení; některé larvy jsou uvolněny z kutikulárního obalu (originál)

Obrázek č. 5 – Grafické znázornění počtu vyšetřovaných ryb

Obrázek č. 6 – Parazitologický nález larev hlístic z čeledi Anisakidae u sledě obecného (*Clupea harengus*); larvy označené šipkou (originál)

Obrázek č. 7 – Masivní parazitologický nález larev hlístic z čeledi Anisakidae u makrely obecné (*Scomber scombrus*) (originál)

Obrázek č. 8 – Fylogenetický strom druhů rodu *Anisakis* (poskytnuto dr. Camilou Pantoja de Oliveira)

6 Seznam tabulek

Tabulka č. 1 – Přehled vyšetřovaných ryb

Tabulka č. 2 – Základní údaje složení trávicí tekutiny závislosti na množství vyšetřované svaloviny (podle údajů z SVÚ Jihlava, pobočka České Budějovice)

Tabulka č. 3 – Parazitologické vyhodnocení

Tabulka č. 4 – Parazitologické vyšetření ryb na přítomnost larev anisakidních hlístic

Tabulka č. 5 – Lokalizace larev u pozitivních vzorků

Tabulka č. 6 – Porovnání nukleotidů (%) částečných sekvencí mtDNA *Anisakis* spp.

Tabulka č. 7 – Seznam sekvenovaných vzorků *Anisakis simplex*

7 Seznam příloh

Protokol č. 1 - Sled' obecný (*Clupea harengus*)

Název ryby	Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)
Celková délka (cm)	34
Hmotnost (g)	252
Datum zakoupení / vyšetření	4. 5. 2022
Technologické opracování	Uzená, nekuchaná
Oblast lovu / Zakoupeno	Blatenská ryba, spol. s.r.o./Terno ČB
Lokalizace larev	Povrch gonád, okolí střeva
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	0/14
Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/0
Doba trávení (min.)	30

Protokol č. 2 - Sled' obecný (*Clupea harengus*)

Název ryby	Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)
Celková délka (cm)	31
Hmotnost (g)	203
Datum zakoupení / vyšetření	21. 8./22. 8. 2022
Technologické opracování	Uzená, nekuchaná
Oblast lovu / Zakoupeno	Blatenská ryba, spol. s.r.o./Terno ČB
Lokalizace larev	Vnitřní strana jiker, blízko střeva
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	0/2

Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/0
Doba trávení (min.)	30

Protokol č. 3 - Sled' obecný (*Clupea harengus*)

Název ryby	Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)
Celková délka (cm)	33
Hmotnost (g)	217
Datum zakoupení / vyšetření	21. 8./22. 8. 2022
Technologické opracování	Uzená, nekuchaná
Oblast lovu / Zakoupeno	Blatenská ryba, spol. s.r.o./Terno ČB
Lokalizace larev	Vnitřní strana gonád
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	0/12
Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/0
Doba trávení (min.)	30

Protokol č. 4 - Makrela obecná (*Scomber scombrus*)

Název ryby	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)
Celková délka (cm)	31,5
Hmotnost (g)	244
Datum zakoupení / vyšetření	25. 8. 2022
Technologické opracování	Chlazená, nekuchaná

Oblast lovu / Zakoupeno	Atlantický oceán – Biskajský záliv/Makro ČB
Lokalizace larev	-
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	0/0
Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/0
Doba trávení	30

Protokol č. 5 - Sled' obecný (*Clupea harengus*)

Název ryby	Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)
Celková délka (cm)	36,5
Hmotnost (g)	280
Datum zakoupení / vyšetření	5. 9. 2022
Technologické opracování	Uzená, nekuchaná
Oblast lovu / Zakoupeno	Blatenská ryba, spol. s.r.o./Terno ČB
Lokalizace larev	Okolí střeva a ovarií
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	0/36
Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/0
Doba trávení (min.)	20

Protokol č. 6 - Sled' obecný (*Clupea harengus*)

Název ryby	Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)
Celková délka (cm)	36

Hmotnost (g)	252
Datum zakoupení / vyšetření	5. 9. 2022
Technologické opracování	Uzená, nekuchaná
Oblast lovu / Zakoupeno	Blatenská ryba, spol. s.r.o./Terno ČB
Lokalizace larev	Vnější strana ovaria
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	0/1
Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/1
Doba trávení (min.)	20

Protokol č. 7 - Makrela obecná (*Scomber scombrus*)

Název ryby	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)
Celková délka (cm)	38,5
Hmotnost (g)	360
Datum zakoupení / vyšetření	-/15. 9. 2022
Technologické opracování	Mražená, nekuchaná
Oblast lovu / Zakoupeno	Španělsko
Lokalizace larev	Na povrchu jater, okolí střeva a ledvin
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	0/138
Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/13
Doba trávení	20

Protokol č. 8 - Makrela obecná (*Scomber scombrus*)

Název ryby	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)
Celková délka (cm)	38,5
Hmotnost (g)	340
Datum zakoupení / vyšetření	-/15. 9. 2022
Technologické opracování	Mražená, nekuchaná
Oblast lovu / Zakoupeno	Španělsko
Lokalizace larev	Na povrchu jater, okolí střeva a ledvin
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	0/27
Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/0
Doba trávení	20

Protokol č. 9 - Sled' obecný (*Clupea harengus*)

Název ryby	Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)
Celková délka (cm)	33
Hmotnost (g)	276
Datum zakoupení / vyšetření	4. 12. 2022
Technologické opracování	Uzená, nekuchaná
Oblast lovu / Zakoupeno	Blatenská ryba, spol. s.r.o./Terno ČB
Lokalizace larev	Okolí střeva a jater, kraniální část gonád
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	0/14
Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/0
Doba trávení (min.)	20

Protokol č. 10 - Sled' obecný (*Clupea harengus*)

Název ryby	Sled' obecný (<i>Clupea harengus</i>)
Celková délka (cm)	32
Hmotnost (g)	210
Datum zakoupení / vyšetření	4. 12. 2022
Technologické opracování	Uzená, nekuchaná
Oblast lovu / Zakoupeno	Blatenská ryba, spol. s.r.o./Terno ČB
Lokalizace larev	Vnější a vnější strana gonád
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	0/7
Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/7
Doba trávení (min.)	20

Protokol č. 11 - Treska tmavá (*Pollachius virens*)

Název ryby	Treska tmavá (<i>Pollachius virens</i>)
Celková délka (cm)	-
Hmotnost (g)	179
Datum zakoupení / vyšetření	10. 3./11. 3. 2023
Technologické opracování	filet
Oblast lovu / Zakoupeno	Dánsko – Severní moře/Makro ČB
Lokalizace larev	-
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	0/0
Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/0

Doba trávení (min.)	20
----------------------------	----

Protokol č. 12 - Treska tmavá (*Pollachius virens*)

Název ryby	Treska tmavá (<i>Pollachius virens</i>)
Celková délka (cm)	-
Hmotnost (g)	136
Datum zakoupení / vyšetření	10. 3./11. 3. 2023
Technologické opracování	filet
Oblast lovu / Zakoupeno	Dánsko – Severní moře/Makro ČB
Lokalizace larev	-
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	0/0
Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/0

Protokol č. 13 - Makrela obecná (*Scomber scombrus*)

Název ryby	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)
Celková délka (cm)	36,5
Hmotnost (g)	281
Datum zakoupení / vyšetření	10. 3./11. 3. 2023
Technologické opracování	Uzená, kuchaň
Oblast lovu / Zakoupeno	- /Makro ČB
Lokalizace larev	-
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	0/0

Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/1 (suspektní larva)
Doba trávení	20

Protokol č. 14 - Makrela obecná (*Scomber scombrus*)

Název ryby	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)
Celková délka (cm)	36
Hmotnost (g)	279
Datum zakoupení / vyšetření	10. 3./11. 3. 2023
Technologické opracování	Uzená, kuchařská
Oblast lovu / Zakoupeno	- /Makro ČB
Lokalizace larev	-
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	0/0
Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/2
Doba trávení	20

Protokol č. 15 - Makrela obecná (*Scomber scombrus*)

Název ryby	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)
Celková délka (cm)	29
Hmotnost (g)	143
Datum zakoupení / vyšetření	10. 3./11. 3. 2023
Technologické opracování	chlazená, nekuchařská
Oblast lovu / Zakoupeno	Barentsovo moře /Makro ČB

Lokalizace larev	V pylorických přívěškách, okolo střeva, jater, žaludku, a jícnu
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	2/10
Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	4/8
Doba trávení	10

Protokol č. 16 - Makrela obecná (*Scomber scombrus*)

Název ryby	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)
Celková délka (cm)	28,5
Hmotnost (g)	139
Datum zakoupení / vyšetření	10. 3./11. 3. 2023
Technologické opracování	chlazená, nekuchaná
Oblast lovu / Zakoupeno	Barentsovo moře /Makro ČB
Lokalizace larev	svalovina
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	0/0
Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/0
Doba trávení	30

Protokol č. 17 - Makrela obecná (*Scomber scombrus*)

Název ryby	Makrela obecná (<i>Scomber scombrus</i>)
Celková délka (cm)	29
Hmotnost (g)	145

Datum zakoupení / vyšetření	10. 3./11. 3. 2023
Technologické opracování	chlazená, nekuchaná
Oblast lovu / Zakoupeno	Barentsovo moře /Makro ČB
Lokalizace larev	V pylorických přívěškách, okolo střeva, ve svalovině
Makroskopický nález larev; živé/mrtvé	1/5
Počet larev po natrávení; živé/mrtvé	0/5
Doba trávení	20