

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zoologie a Rybářství**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Diagnostika, patologie a epizootologie ashworthiózy**

## **Disertační práce**

**autor: Ing. Jan Magdálek**

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

© 2022 ČZU v Praze

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem zde předkládanou disertační práci na téma „Diagnostika, patologie a epizootologie ashworthiózy“ vypracoval samostatně a použil pouze zdrojů uvedených v seznamu použité literatury. Současně dávám svolení k tomu, aby tato disertační práce byla používána ke studijním účelům ve smyslu § 60 Zákona č.121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon).

V Praze dne

.....  
Ing. Jan Magdálek



## **Poděkování**

Rád bych touto cestou poděkoval svému školiteli, doc. Ing. Jaroslavu Vadlejchovi Ph.D. za jeho cenné rady, připomínky a čas, který mi v průběhu vedení této disertační práce věnoval. Rovněž bych chtěl poděkovat všem spoluautorům a spolupracovníkům z ČZU i mimo ni a v neposlední řadě také všem subjektům, které poskytly biologický materiál pro tento výzkum.

## **Práce vznikla za podpory následujícího grantu**

TA ČR TJ01000009 Vyhodnocení rizik invazního parazita *Ashworthius sidemi* pro oborový chov spárkaté zvěře v České republice, tlumení ashworthiózy a prevence jejího šíření

## Seznam zveřejněných výstupů:

### I. Disertační práce vychází z těchto impaktivých publikací:

1. Škorpíková, L., Reslová, N., **Magdálek, J.**, Vadlejch, J., Kašný, M. 2020. The use of high resolution melting analysis of ITS-1 for rapid differentiation of parasitic nematodes *Haemonchus contortus* and *Ashworthius sidemi*. Scientific Reports, 10, 1, 15984. DOI 10.1038/s41598-020-73037-9, **WOS Q1**
2. **Magdálek, J.**, Makovický, P., Vadlejch, J. 2021. Nematode-induced pathological lesions and alterations of mucin pattern identified in abomasa of wild ruminants. International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife, 14, 62 -67. DOI 10.1016/j.ijppaw.2020.12.008, **WOS Q2**
3. Magdálek, J., Bourgoïn, G., Vadlejch, J. 2022. Non-native parasite *Ashworthius sidemi* is currently a dominant component of the abomasal nematode community in cervid hosts in the Czech Republic. Frontiers in Veterinary Science – **v oponentním řízení**

### II. Další publikační výstupy související s tématem této disertační práce:

1. **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. (eds.) 9<sup>th</sup> Workshop on biodiversity, Jevany, Česká zemědělská univerzita v Praze, pp 66 – 71. – **příspěvek na mezinárodní konferenci**
2. Vadlejch, J., **Magdálek, J.**, Makovický, P., Forejtek, P. 2018a. Patomorfologické změny spojené s infekcemi vyvolanými invazním parazitem *Ashworthius sidemi*. Veterinářství, 68 (12), 862 – 868. – **článek v odborném periodiku**

3. Vadlejch, J., **Magdálek, J.**, Rylková, K., Forejtek, P., Čadková, Z. 2018b. Sezónní dynamika invazní hlístice *Ashworthius sidemi* u volně žijících přežvýkavců v ČR. Veterinářství, 68 (12), 869– 875. – **článek v odborném periodiku**
4. **Magdálek, J.**, Čadková, Z., Vadlejch, J. 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 -- **příspěvek na mezinárodní konferenci**

### **III. Další výstupy související s tématem této disertační práce:**

1. Vadlejch, J., Čadková, Z., **Magdálek, J.**, Nápravníková, J. 2019. Pomůcka pro zdokonalení diagnostiky ashworthiózy. CZ 32489 U1 – **užité vzor**
2. Vadlejch, J., **Magdálek, J.**, Čadková Z. 2019. Tlumení a prevence šíření invazního parazita *Ashworthius sidemi*. **Certifikovaná metodika**, ČZU v Praze: 59 s. ISBN 978-80-213-2946-1
3. **Magdálek, J.**, Jankovská, I., Langrová, I., Tlachová, E.. 2016. Endoparasites of coypus (*Myocastor coypus* Molina, 1782) from selected farms in CR. In: Kubík Š. & Barták M. (eds.) 8<sup>th</sup> Workshop on biodiversity, Jevany, Česká zemědělská univerzita v Praze, pp 66 – 70. – **příspěvek na mezinárodní konferenci**

### **IV. Impaktové publikace nesouvisející s tématem této disertační práce:**

1. Jankovská, I., Sloup, V., Száková, J., **Magdálek, J.**, Nechybová, S., Peřínková, P., Langrová, I. 2018. How tapeworm infection and consumption of a Cd and Zn hyperaccumulating plant may affect Cu, Fe, and Mn concentrations in an animal-a plant consumer and tapeworm host. Environmental Science and Pollution Research, 25, 4190 – 4196. DOI 10.1007/s11356-017-0787-3, **WOS Q2**,

2. Sloup, V., Jankovská, I., Száková, J., **Magdálek, J.**, Sloup, S., Langrová, I. 2018. Effects of tapeworm infection on absorption and excretion of zinc and cadmium by experimental rats. *Environmental Science and Pollution Research*, DOI 10.1007/s11356-018-3397-9, **WOS Q2**
3. Sloup, V., Jankovská, I., Štolcová, M., **Magdálek, J.**, Karešová, V., Lanková, S., Langrová, I. 2021. Effects of excessive dietary zinc or zinc/cadmium and tapeworm infection on the biochemical parameters in rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 105, 989 – 995. DOI 10.1111/jpn.13524, **WOS Q2**

# 1 OBSAH

2	Úvod do problematiky.....	10
2.1	Systematické řazení hlístic parazitujících ve slezu.....	12
2.2	Slezové hlístice jelenovitých.....	13
2.2.1	<i>Ashworthius sidemi</i> .....	14
2.2.2	<i>Haemonchus contortus</i> .....	19
2.2.3	Podčeď Ostertagiinae .....	20
2.3	Jelenoví v ČR jako hostitelé slezových hlístic.....	23
2.4	Patologie ashworthiózy .....	26
2.4.1	Abomasum .....	26
2.4.2	Patologie trichostrongylidních infekcí .....	27
2.5	Diagnostika ashworthiózy.....	30
2.5.1	Parazitologická pitva.....	31
2.5.2	Ovoskopie .....	32
2.5.3	Larvoskopie.....	34
2.5.4	Imunologické a sérologické metody .....	35
2.5.5	Molekulární metody .....	35
2.6	Epizootologie infekcí trichostrongylidními hlísticemi .....	38
3	Cíle a hypotézy.....	42
3.1	Diagnosika ashworthiózy .....	42
3.2	Patologie .....	42
3.3	Epizootologie ashworthiózy .....	43
4	Metody zpracování.....	44
4.1	Monitoring <i>A. sidemi</i> .....	44
4.1.1	Biologický materiál.....	44
4.1.2	Parazitologická pitva.....	44
4.1.3	Determinace hlístic .....	45
4.1.4	Charakteristiky infekce .....	45
4.1	Diagnostika.....	46
4.1.1	qPCR-HRM.....	46
4.2	Patologické vyšetření.....	49
4.3	Epizootologie .....	49
4.3.1	Vliv faktorů hostitele a prostředí na abundanci .....	49
4.3.2	Sezónní dynamika ashworthiózy .....	50
5	Výsledky .....	52
5.1	Výsledky monitoringu.....	52
5.2	Dianostické metody, výsledky qPCr-HRM.....	55
5.2.1	Koprologické vyšetření vs. pitvy .....	55
5.2.2	Výsledky qPCR-HRM .....	56

<b>5.3</b>	<b>Výsledky patologického vyšetření.....</b>	<b>58</b>
5.3.1	Parazitární zátěž.....	58
5.3.2	Makroskopické změny na sliznicích.....	58
5.3.3	Histologie.....	59
<b>5.4</b>	<b>Výsledky studie vlivu faktorů a sezónní dynamiky.....</b>	<b>60</b>
5.4.1	Vliv faktorů na abundanci infrapopulace.....	60
5.4.2	Sezónní dynamika.....	61
<b>6</b>	<b>Diskuse .....</b>	<b>63</b>
<b>6.1</b>	<b><i>Ashworthius sidemi</i> v ČR .....</b>	<b>63</b>
<b>6.2</b>	<b>Zdokonalení diagnostiky ashworthiózy.....</b>	<b>67</b>
<b>6.3</b>	<b>Patologie <i>Ashworthius sidemi</i> a změny v sekreci mucinu .....</b>	<b>69</b>
<b>6.4</b>	<b>Sezónní dynamika infekce <i>Ashworthius sidemi</i>.....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Závěry .....</b>	<b>74</b>

## 2 ÚVOD

Onemocnění vyvolaná u přežvýkavců strongylidními hlísticemi jsou celosvětově příčinou významných ekonomických ztrát v chovech domácích přežvýkavců. U volně žijících přežvýkavců má působení těchto parazitů dopad na populační dynamiku a na biologické fitness jedince (Albon et al., 2002; Gunn et al., 2003).

Spektrum druhů parazitujících u volně žijících druhů je přitom proměnlivé v čase a prostoru a může být významně ovlivněno antropogeními introdukcemi nových druhů hostitelů (Hoberg a Zarlenga, 2016). V současnosti se tak v Evropě množí počet záznamů o dynamickém šíření a rostoucí intenzitě infekce nepůvodního druhu *Ashworthius sidemi* mezi jelenovitými (Lehrter et al., 2016; Kuznetsov et al., 2018; Kołodziej-Sobocińska et al., 2018).

Přestože na území České republiky byl výskyt tohoto parazita slezu asijských jelenovitých přežvýkavců zaznamenán již v druhé polovině 20. století (Kotrá a Kotrlý, 1973), informace o jeho rozšíření u místních druhů jelenovitých dosud chybí.

Pro identifikaci tohoto invazního druhu je třeba spolehlivých diagnostických metod. Zatímco v diagostice hlístic u hospodářsky významných přežvýkavců se stále více uplatňují pokročilé molekulární metody (Roeber et al., 2013; Santos et al., 2020). Detekce a kvantifikace gastrointestinálních hlístic volně žijících druhů je založena převážně na tradičních metodách jako jsou pitvy, nebo koprologické vyšetření. Tyto metody však nemusí být dostatečně citlivé pro detekci nepůvodních druhů.

Strongylidní hlístice způsobují patologické změny na sliznici gastrointestinálního traktu (GI) a mohou narušovat rovněž jeho sekreční činnost (Simpson et al., 2016; Scott et al., 2017). Tyto změny byly v předchozích dekádách porobně studovány na experimentálně infikovaných ovcí a skotu (Simpson et al., 2016; Scott et al., 2017). Oproti tomu, většina studií zaměřených na jelenovité se v tomto ohledu omezuje na popisy klinických případů např. (Conti a Howerth, 1987; Boggiato, 2018). Patogennímu působení *A. sidemi* ve slezu volně žijících přežvýkavců se dosud věnovalo jen několik málo studií, zaměřených na netypického hostitele, zebra evropského (Demiszkiwicz et al., 2009; Osińska et al., 2010).

Dynamika infekce GI hlísticemi je u volně žijících přežvýkavců ovlivněna faktory hostitele (věk, pohlaví, tělesná kondice) a prostředí (teplota, vlhkost), které vykazují sezónní proměnlivost. Znalost epizootologie parazitózy a její sezónní dynamiky je nezbytná pro kontrolu a navrhování účinných opatření proti šíření infekce. O sezónní dynamice *A. sidemi*



bylo dosud publikováno jen omezené množství informací, které byly navíc získané v klimaticky odlišném prostředí (Ovcharenko, 1968; Dróždž, et al., 2003).

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Systematické řazení hlístic parazitujících ve slezu

Hlístice podřádu Strongylida (řád: Rhabditida, třída: Chromadorea) jsou mimořádně různorodou skupinou parazitů, parazitující napříč všem skupinami terestrických obratlovců. Předchůdci dnešních strongylidních hlístic byly pravděpodobně volně žijící rhabditidní hlístice, které začaly parazitovat u obojživelníků přibližně před 350 miliony lety (Durette-Desset, 1994). Čeleď Trichostrongylidae (Leiper, 1912) obsahuje kosmopolitně rozšířené GI parazity domácích a volně žijících přežvýkavců. Čeleď je obecně považována za monofyletickou, nicméně na fylogenetické vztahy uvnitř skupiny dosud neexistuje jednotný pohled. Řada autorů, například Gibons a Khalil (1982), nebo Durette-Desset (1983) uznávají na základě morfologických charakteristik šest podčeledí, které se podle autorů Hoberg a Lichtenfels (1994) dělí do dvou hlavních větví. První je tvořena podčeledí Cooperiinae, Trichostrongylinae a Lybiostrongylinae, druhá sestává z podčeledí Graphidiinae, Ostertagiinae a Haemonchiinae. Podčeledi Haemonchiinae a Ostertagiinae, obsahující parazity slezu přežvýkavců, včetně *Ashworthius sidemi*, jsou v tomto pojetí považovány za sesterské. Oproti tomu Durette-Dessett (1999) v pozdější revizi nadčeledi Trichostrongyloidea provedené na základě téměř padesáti morfologických charakteristik povýšila podčeleď Haemonchiinae na samostatnou čeleď zahrnující jednak rody hematofágních hlístic jako je *Haemonchus*, *Ashworthius* nebo *Mecistocirrus*, ale také zástupce dřívější podčeledi Ostertagiinae.

Výsledky následné molekulární analýzy ITS-2 regionu ribozomální DNA (Chilton et al., 2001) se však značně lišily od všech dříve navržených fylogenetických stromů. Podle těchto výsledků mají druhy rodu *Haemonchus* geneticky blíže k zástupcům rodu *Cooperia*, se kterými tvoří sesterský klad a rod *Spiculoptera* má blíže k rodu *Trichostrongylus*, než k ostatním zástupcům dřívější podčeledi Ostertagiinae. Pro lepší přehlednost je v této disertační práci nadále používáno tradiční dělení čeledi Trichostrongylidae na šest podčeledí podle autorů Hoberg a Lichtenfels (1994).

## 3.2 Slezové hlístice jelenovitých

Čeď Trichotrongylidae obsahuje čtyři ekonomicky významné rody hlístic parazitující u hospodářských přežvýkavců. Zatímco rody *Cooperia* a *Trichostrongylus* obsahují především parazity tenkého střeva, druhy rodu *Ostertagia* a *Teladorsagia* parazitují ve slezu. Infekce těmito hlísticemi způsobují každoročně významné ekonomické ztráty v chovech hospodářských zvířat. Dochází k nim jednak poklesem produktivity a v některých případech i smrtí zvířat, ale také vysokými náklady na léčbu anthelmintiky (Charlier et al., 2015; Fanke et al., 2017).

Za nejvýznamnější parazity domácích i sylvatických přežvýkavců jsou považovány zejména druhy parazitující ve slezu (Levine, 1980; Hoberg, 2001). Přestože u volně žijících přežvýkavců dosahují trichostrongylidní hlístice obvykle nižších intenzity infekce než u domácích, mohou hostitelské druhy postihovat jak na úrovni tělesné kondice a biologického fitness jedince (Irvine et al., 2006; Zaffaroni et al., 2007), tak na úrovni populace (Gulland et al., 1997; Albon, 2002; Gunn et al., 2003; Pedersen et al., 2015). U volně žijících druhů přežvýkavců navíc klinické projevy onemocnění vyvolává nižší intenzita infekce, než je tomu u hospodářských zvířat, což je dáno vlivy prostředí (Pursglove et al., 1976).

Jelenovití jsou parazitováni širokým spektrem druhů slezových hlístic, převážně z podčeledi Ostertagiinae (Lopez-Neyra, 1947) a Haemonchiinae, přičemž tyto paraziti ve slezu tvoří společenství několika druhů (Pato et al., 2013; Carrau et al., 2021), které zpravidla představují dominantní složku gastrointestinální nematofauny (Hoberg et al., 2001; Manfredi et al., 2007; Santín-Durán et al., 2008).

Diverzita společenstev parazitů se může v průběhu času výrazně měnit, jak bylo pozorováno například u zubrů evropských (*Bison bonasus*) z Bělověžského pralesa (Karbowski et al., 2014a). Ke vzniku nového vztahu hostitel-parazit je nutný jednak kontakt mezi novým parazitem a hostitelem, ale také jejich biologická kompatibilita (Combes et al., 2002). Co se týče biokompatibility, paraziti mohou být specialisty omezenými na úzkou skupinu hostitelů, nebo dokonce pouze jeden hostitelský druh, nebo generalisty schopnými infikovat širokou škálu mnohdy nepříbuzných hostitelských druhů. Řada druhů hlístic přežvýkavců jsou v tomto ohledu generalisti (Zaffaroni et al., 2000; Winter et al., 2018). Některé druhy z podčeledi Ostertagiinae a Haemonchiinae jsou, více či méně, specifické pro určitého hostitele, avšak ve většině případů jsou známé i přenosy těchto druhů na netypické hostitele.

Například druhy *Ostertagia antipini* nebo *Mazamostrongylus dagestanica*, které jsou považovány za typické parazity losa evropského (*Alces alces*) (Wyrobisz-Papiewska et al., 2018), byly identifikovány i u sympatrických srnců (Drózdź et al., 1992). Bariéry znemožňující setkání hostitele a jeho potenciálního nového parazita mohou být překonány vlivem významných ekologických změn (Hoberg and Zarlenga, 2016), ale také lidskou činností při záměrné či nevědomé introdukci nepůvodních druhů hostitelů na nové lokality (Kołodziej-Sobocińska, 2019). V průběhu minulého století se tak mezi evropskými druhy jelenovitých začala šířit alochtonní hlístice z podčeledi Haemonchiinae, *A. sidemi*.

### 3.2.1 *Ashworthius sidemi*

Rod *Ashworthius* (Le Roux, 1930) byl založen pro hlístice morfoloogicky podobné druhu *Haemonchus contortus* se symetrickým burzálním lalokem a chybějícím gubernákulem. V současnosti je do tohoto rodu řazeno sedm druhů hematofágních hlístic parazitujících převážně u turovitých a jelenovitých přežvýkavců v Eurasii a Subsaharské Africe (Hoberg et al., 2002), s výjimkou druhu *A. tuenguangi* (Yen, 1961) parazitujícího u zajícovitých a *A. ptriciapillitae*, který byl jako jediný zástupce rodu *Ashworthius* nalezen na západní polokouli, kde parazituje u kostarických jelenců běloocasých (Carreno et al., 2001).

Druh *Ashworthius sidemi* (Shulz, 1932) byl původně popsán u jelenů sika Dybowského (*Cervus nippon hortulorum*) na ruském Dálném východě, poblíž Vladivostoku. Jedná se o hlístici parazitující primárně u asijských jelenovitých. Znamé hostitelské spektrum tohoto parazita zahrnuje populace jelenů wapiti sibiřských (*Cervus canadensis sibiricus*) v jižní části centrální Asie, jeleny maral v pohoří Altaj na území Kazachstánu (Kostayev et al., 1969) a Sambary (*Rusa unicolor*) ze severního Vietnamu (Drózdź, 1973). V důsledku antropogenní introdukce byl areál výskytu tohoto parazita rozšířen až po západní Palearktickou oblast (Hoberg et al., 2002).

Do Evropy se *A. sidemi* dostal pravděpodobně již na přelomu devatenáctého a dvacátého století spolu s jeleny sika, kteří byli záměrně introdukováni do řady Evropských zemí za účelem zpestření druhové skladby lovné zvěře. Importovaní jedinci náleželi do poddruhů jelen sika japonský (*C. nippon nippon*) a jelen sika Dybowského (*C. nippon hortulorum*), přičemž zpočátku introdukce tyto poddruhy nebyly rozlišovány a v místech aklimatizace pravděpodobně docházelo k jejich křížení (Bartoš, 2009).

Jelikož archiv hlavního evropského dovozce jelenů sika nebyl dochován (Bartoš, 2003), vysledovat informace o původu evropských jelenů sika je v současnosti velmi obtížné. Společně s jeleny sika se *A. sidemi* dostal na území Ukrajiny, Běloruska, bývalého Československa a Francie (Kotrlá a Kotrlý 1973; Dvojnós a Pogrebniak, 1977; Ferté a Durette-Desset, 1989).

Zpočátku byli jeleni sika obvykle drženi v oborách, nicméně již během první poloviny 20. století docházelo k opakovaným únikům a jejich záměrnému vypouštění do volné přírody. Množství obor bylo rovněž poškozeno během 2. světové války, což vedlo k dalším únikům. Vzhledem k nízké hostitelské specifitě tento parazit na novém území záhy kolonizoval místní druhy přežvýkavců. Ve Francii a na Ukrajině se *A. sidemi* stal významným parazitem srnce obecného (*Capreolus capreolus*) (Ferté et al. 2000; Kuzmina et al. 2010). Spolu s migrujícími jeleny evropskými se *A. sidemi* dále šířil do nových oblastí. V Polsku nebyl tento parazit pozorován až do konce devadesátých let minulého století, přestože zde byla provedena řada studií helmintofauny volně žijících přežvýkavců (Drózd , 1966; Drózd et al. 1992; Drózd et al. 1993). Při vyšetření jelenů sika v šedesátých létech minulého století v Polsku byly identifikovány pouze druhy, které se běžně vyskytují u autochtonních druhů (Drózd , 1963). Následně byla vysoká intenzita infekce tímto parazitem zjištěna u zubrů volně žijících v oblasti Bukovských vrchů (Bieczady) při hranicích s Ukrajinou a Slovenskem (Drózd et al. 1998) a později v také v Bělověžském pralese (Drózd et al. 2003), kde byl *A. sidemi* identifikován u jelenů evropských (*Cervus elaphus*) (považovaných těmito autory za zdroj infekce) a u srnců obecných. V následujících letech byly u zubrů evropských na zmíněných lokalitách pozorovány značně vysoké intenzity infekce (Demiaszkiewicz, et al. 2009), což řada autorů považuje za limitující faktor pro záchranné chovy tohoto ohroženého druhu (Radwan et al. 2010; Karbowski et al. 2014b; Kołodziej-Sobocińska et al. 2016). V současnosti podobnému riziku čelí ohrožené populace tatranského poddruhu kamzíka horského (*Rupicapra rupicapra tatrica*), jelikož byl *A. sidemi* nově zachycen i u jelenů evropských a srnců obecných v oblasti Vysokých a Západních Tater (Nosal et al. 2021). Hlístici *A. sidemi* lze podobně jako příbuzný druh *H. contorus* považovat za generalistu schopného infikovat širokou škálu hostitelských druhů. Do současnosti tak byl zjištěn například u volně žijících losů evropských (Demiaszkiewicz et al. 2013), nebo farně chovaných daňků (Kowal et al., 2012). Kotrlá a Kotrlý (1976) pozorovali během experimentální infekce schopnost larev *A. sidemi* infikovat jehňata ovce domácí a dokončit v tomto hostiteli vývoj.

Později byl popsán rovněž přenos v přirozených podmínkách, kdy byl *A. sidemi* detekován u skotu (*Bos taurus*) sdílejícího pastvu s volně žijícími přežvýkavci (Moskwa et al., 2015). Na rozdíl od příbuzného druhu *H. contortus*, který u jelenovitých obvykle tvoří minoritní část nematofauny slezu (Pato et al., 2013), nabývá *A. sidemi* ve slezu jelenovitých vysokých intenzit infekce. V nedávných studiích byl popsán jednak trend vzrůstající intenzity infekce na lokalitách výskytu *A. sidemi* (Demiaszkiewicz et al. 2017; Kołodziej-Sobocińska et al. 2018), ale také dynamické šíření *A. sidemi* na nová území (Kuznetsov et al. 2018). Navíc vzhledem k nedostatečnosti metod používaných při diagnostice *A. sidemi* existuje riziko dalších antropogenních introdukcí (Vadlejch et al., 2017).

### 3.2.1.1 *Ashworthius sidemi* na území ČR

Na konci devatenáctého století byli jeleni sika poprvé importováni na území Čech. Dovezení jedinci byly vypuštěni na oboře Kluk poblíž Poděbrad (Kokeš, 1970) a na oborách Manětín a Čeminy na Plzeňsku. Během druhé světové války a krátce po ní došlo k poškození těchto obor a uniklí jedinci se stali základem pro současnou populaci jelenů sika v Západních Čechách (Wolf a Vavruněk, 1975; 1976). Moravská populace má původ v chovu jelenů sika na hradě Žádlovice na Šumpersku, který byl zrušen krátce po druhé světové válce (Babička, 1977). Výskyt *A. sidemi* na území dřívějšího Československa byl zaznamenán již v 70. letech minulého století při pitvě několika jelenů sika ulovených v Lánské oboře (Kotrlá a Kotrlý, 1973). Následovala rozsáhlejší studie helmintofauny spárkaté zvěře v Čechách a na Moravě (Kotrlá a Kotrlý, 1977), při které byl *A. sidemi* zjištěn také u jelenů evropských a muflonů (*Ovis gmeini musimon*) vystavených kontaktu s jeleny sika. Na oborách Lány a Opočno byl *A. sidemi* identifikován, jako dominantní parazit jelenů sika, avšak podrobnější údaje o rozšíření, prevalenci a abundanci nebyly publikovány. Během dalšího monitoringu parazitů srnce obecného, která byla provedena na Strakonicku (Vetýška et al., 1980), již byly ve slezu vyšetřených zvířat nalezeny pouze autochtonní druhy hlístic. Další informace o výskytu *A. sidemi* chybí až do roku 2016, kdy byl tento parazit nalezen během pitvy dvou jedinců zebra evropského a dvou jedinců jelena evropského ulovených v oboře Židlov v Libereckém kraji (Vadlejch et al., 2017). Do této obory byli v minulosti importováni zubři z Polska, kteří byli zdrojem infekce pro populace jelenovitých žijících na daném území.

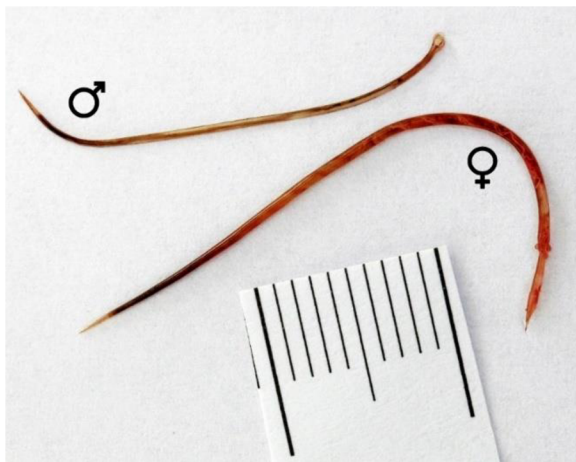
### 3.2.1.2 Morfologie *Ashworthius sidemi*

Společným znakem trichostrongylidních hlístic je redukovaná ústní kapsula, která je u zástupců podčeledi Haemonchiinae na dorsální straně opatřena kutikulárním zubem (neodont) (Durette-Desset et al., 1985). U *A. sidemi* má tento zub tvar háčku a dosahuje délky 10 – 15  $\mu\text{m}$ .



**Obrázek 1:** pářící plahetka (*bursa copulatrix*) a spikuly samčího jedince *A. sidemi*

U samců je patrná pářící plachetka *bursa copulatrix* tvořená třemi laloky. Genitální kónus je široký a kulatý se dvěma ventrálními papilami (Kotrlá a Kotrlý, 1973). Pro rod *Ashworthius* je typickým znakem podlouhlý symetrický dorsální lalok a absence gubernákula (Le Roux,



**Obrázek 2:** dospělá stadia *A. sidemi*.

1930). Významným znakem pro determinaci druhu jsou pářící jehlice, tzv. spikuly, které u *A. sidemi* délkou přesahují 700  $\mu\text{m}$  a jsou zbarveny žlutohnědě. Jejich distální konce směřují mediálně a jsou pokryty průhlednou kutikulární membránou (Pike, 1969). U samic skrz kutikulu prosvítají bílá ovaria, která se spirálovitě obtáčejí kolem červeně zbarveného střeva. Vulva je kryta chlopní, jejíž velikost mezi jedinci značně kolísá. V

posteriorní části se tělo samic zužuje od análního póru k tupému zakončení. Délka dospělých jedinců *A. sidemi* se může značně lišit v závislosti na hostiteli. Samci jsou obecně menší, než samice (Kotrlá a Kotrlý, 1976) pozorovali u jelenů sika samčí jedince dosahující délky 17 – 26 mm, zatímco délka samic přesahovala 30 mm.

Oproti tomu jedinci identifikovaní u zebra evropského v Polsku dosahovali menších rozměrů. Délka samců se pohybovala mezi 18 a 22mm, přičemž samice se délkou výrazně nelišily od samců (20 – 24 mm). Nižších rozměrů oproti těm popsaným u jelenů sika doshovali také jedinci *A. sidemi* získaní experimentální infekcí ovce domácí (Kotlá a Kotrlý, 1976) Na území České republiky byl navíc popsán minoritní morfotyp, tzv. gigantická forma u které samice mohou dosahovat až pěti centimetrů a samci jsou běžně delší než 30 mm (Vadlejch et al., 2017b). Kromě dospělců se v určité fázi infekce v lumenu abomasa nacházejí také juvenilní jedinci. Tito se od dospělců liší do té míry, že byli původně popsáni, jako samostatný druh *Ashworthius gagarini* (Kostayev, 1969). Délka juvenilů se pohybuje okolo jednoho centimetru a při makroskopickém prohlídce je lze poměrně snadno zaměnit s dospělými stadii zástupců podčeledi Ostertagiinae. Spikuly juvenilních samců nejsou plně sklerotizované, což se projevuje jejich světlejším, až průhledným zbarvením. Laterální laloky kopulační burzy svojí délkou nepřesahují lalok dorsální (Drózd, 1998). U samic je nápadný slabý vývin dělohy a absence vajíček. Od samic druhů z podčeledi Ostertagiinae je lze poměrně dobře odlišit na základě přítomnosti neodontu a poněkud tupějšího zakončení posteriorního konce s absencí typického kutikulárního kroužku (Lancaster a Hong, 1990). Dospělí jedinci *A. sidemi* se morfologicky podobají příbuznému druhu *H. contortus*, od kterého je lze rozlišit na základě několika znaků. U samců jsou to především spikuly, které



**Obrázek 3:** spikuly samce druhu *Haemonchus*

jsou u *H. contortus* kratší (maximálně 450 – 500  $\mu\text{m}$ ) a zakončené nestejně dlouhými zpětnými háčky (Lichtenfels et al., 1994). × Na rozdíl od *A. sidemi* je u samců *H. contortus* přítomno gubernákulum a dorsální lalok je asymetrický. Samice obou druhů lze rozlišit na základě tvaru neodontu, který má v případě *A. sidemi* tvar háčku, zatímco u *H. contortus* má tvar hrotu kopí, rovněž

cervikální papily mají u *H. contortus* ostřejší zakončení (Lehrter et al., 2016). Kutikulární hřebeny jsou u *A. sidemi* ve stejném počtu (30) jako u *H. contortus*, ale na rozdíl od *H. contortus*, u kterého dosahují od hltanu zhruba do poloviny těla, u *A. sidemi* sahají pouze do jedné třetiny (Lichtenfels a Pillit, 2000).



### 3.2.2 *Haemonchus contortus*

Rod *Haemonchus*, Cobb, 1898 obsahuje 12 druhů, z nichž většina parazituje u subsaharských sudokopytníků. Druhy, které během své evoluční historie kolonizovaly zástupce podčeledí Caprinae a Bovinae (*H. contortus*, *H. placei* a *H. similis*) jsou v současnosti kosmopolitně rozšířené a způsobují významné ekonomické ztráty v chovech hospodářských zvířat (Lichtenfels et al., 1994; Hoberg et al., 2004).

Výskyt druhu *Haemonchus contortus* (Rudolphi 1803) byl dosud zaznamenán u čtyřiceti rodů přežvýkavců náležejících do pěti čeledí (Hoberg et al., 2004). Ačkoliv je původ tohoto druhu spojován s africkými antilopami (Zarlenga a Hoberg 2016), v současnosti se jedná o dominantního parazita ovcí a koz (Caprinae) (O'Connor et al. 2006), jehož kosmopolitní rozšíření především důsledkem lidské činnosti. V minulosti například antropogenní introdukce ovce domácí (*Ovis aries*) během kolonizace Severní Ameriky umožnila přenos *H. contortus* na nearktické jelenovité, přičemž v současnosti tato hlístice představuje významnou složku parazitofauny severoamerických jelenců běloocasých (Hoberg et al. 2001; Barone et al. 2020). V místech kontaktu mezi jelenovitými, volně žijícími a domestikovanými zástupci Caprinae dochází k mezidruhovému přenosu *H. contortus*, jak dokládají studie druhové specifity a analýzy mtDNA hlístic parazitujících u alpských volně žijících přežvýkavců (Zaffaroni et al. 2000; Cerruti et al. 2010).

Infekce *H. contortus* je v oblasti západního palearktu relativně častá u srnců obecných. Byla například zaznamenána u srnců na severovýchodě Iberského poloostrova (Pato et al., 2013), ve Francii (Ferté et al., 2000), v Polsku (Drózd et al., 1992), v České republice (Vetýška et al., 1980), na Ukrajině a v Turecku (Bolukbas et al., 2012). Prevalence a intenzita infekce *H. contortus* je obvykle nižší v porovnání s druhy typickými pro jelenovité, ale například u srnců na několika lokalitách západní a centrální Ukrajiny je tento parazit dominantním druhem (Kuzmina et al., 2011). Autoři Verheyden et al. (2020) zaznamenali pozitivní korelaci mezi denzitou pasených domácích přežvýkavců v krajině a mírou parazitární zátěže u sympatrických srnců. Celosvětově narůstajícím problémem je rezistence *H. contortus* vůči anthelmintikům (Kaplan et al., 2012; Rose et al., 2015). Volně žijící přežvýkavci v tomto ohledu mohou působit jako vektor rezistentních linií (Megyesi et al., 2019). Například u srnců ve Velké Británii a v Maďarsku byli identifikováni jedinci *H.*

*contortus* nesoucí ve své DNA alely způsobující rezistenci vůči benzimidazolovým léčivům (Chintoan-Uta et al. 2014; Nagy et al. 2017).

### 3.2.3 Podčeleď Ostertagiinae

V rámci holarktického regionu jsou za nejrozšířenější a nejpatogennější skupinu trichostrongylidních hlístic parazitujících u jelenovitých tradičně považováni zástupci podčeledi Ostertagiinae parazitující ve slezu. Podčeleď Ostertagiinae je považována za monofyletickou sesterskou větev Haemonchiinae v rámci čeledi Trichostrongylidae (resp. Haemonchiidae) (Hoberg a Lichtenfels, 1994; Durette-Desset et al., 1999).

Pro druhy této podčeledi je typická konfigurace paprsků pářící plachetky typu 2-1-2 pro rody: *Marschallagia* (Orloff, 1933), *Camelostrongylus* (Orloff, 1933), *Longistrongylus* Le Roux, 1931 a *Ostertagia* Ransom, 1907 a 2-2-1 typická pro rod *Spiculoptergia* (Orloff, 1933), *Mazamastrongylus* Cameron, 1935 a *Teladorsagia* Andreeva a Satubaldin, 1954 (Durette-Desset et al., 1989). Dalšími charakteristickými znaky jsou přítomnost dvou párů papil na ventrálních a laterálních částech genitálního kuželu (Chabaud et al., 1970) a konfigurace kutikulárních hřebenů (synlophe) (Lichtenfels a Hoberg, 1993).

U srnců obecných a jelenů evropských jsou v řadě studií jako dominantní uváděny druhy *Spiculoptergia spiculoptera* a *Ostertagia leptospicularis* (Hoberg et al., 2001; Togni et al. 2004; Wyrobisz-Papiewska, 2018). *O. leptospicularis* je hlístice rozšířená napříč západním palearktem. Jde o parazita typického především pro srnce obecného, u kterého obvykle převažuje nad ostatními druhy gastrointestinálních parazitů (Bolukbas et al., 2012; Pato et al., 2013).

Druh *Spiculoptergia spiculoptera* syn *S. boehmi* dosahuje nejvyšší prevalence a abundance u jelena evropského (Drózdž et al., 1993; 1994; Manfredi et al. 2007), ale byla zaznamenána rovněž u turovitých, jako jsou zubři evropští, kamzíci horští nebo kozorožci horští (*Capra Ibex*) (Suarez a Cabaret et al. 1991; Demiazskiewicz 2014; Zaffaroni et al., 2000).

Výskyt druhů *S. asymmetrica* a *Ostertagia Drózdži* je spojován s daňky evropskými (Santín-Durán et al., 2004; Rehbein et al. 2014), nicméně v oblastech mediteránního klimatu může namísto *O. leptospicularis* představovat dominantního parazita jelena evropského (Santín-Durán et al., 2008).

Během pitev jelenovitých přežvýkavců jsou rovněž často nacházeny druhy typické pro ovce a kozy, jako je *Teladorsagia circumcincta*, nebo pro skot, jako je *O. ostertagi* (Vetýška et al., 1980; Togni et al., 2004; Pato et al., 2009).

*Marshallagia marshalli*, je typickým parazitem kamzíků horských a kozorožců horských (Wyrobisz-Papiewska et al., 2018), přičemž v místech kontaktu s jelenovitými dochází k přenosu tohoto parazita na jeleny evropské následně na srnce obecné (Zaffaroni et al., 2000; Manfredi et al., 2007). Tento druh se vyskytuje rovněž v polárních oblastech severní Evropy a Ameriky, kde společně druhem *Ostertagia gruenheri* tvoří součást parazitofauny soba polárního *Rangifer tarandus* (Dallas et al., 2000; Mäntylä et al., 2014). U tohoto hostitele byl pomocí molekulární analýzy mitochondriální DNA popsán výskyt kryptického druhu *Teladorsagia boreaeticus* (Hoberg et al., 1999).

S jeleny sika byl do Evropy, pravděpodobně z Japonska, introdukován druh *Spiculopteria houdemeri*. V kontinentální Evropě byl tento parazit zatím zaznamenán u jelenů sika v Severním Porýní-Westfálsku (Rehbein et al. 2003) a v Dolním Rakousku (Rehbein a Visser, 2007). Poměrně nedávno byla *S. houdemeri* pomocí multiplex PCR identifikována také na území Velké Británie u ovcí bez anthelmintické kontroly (Sinclair et al., 2016). V Japonsku byla tato hlístice popsána jako *S. yamashitai*, přičemž zde parazituje u jelenů sika a sobů polárních (Obayashi, 1966).

Pro hlístice z podčeledi Ostertagiinae parazitujících u jelenovitých je typická vysoká prevalence, často dosahující 100 % a zároveň relativně nízké intenzity infekce (Drózd, 1995). Negativní dopady infekce těmito hlísticemi u volně žijících přežvýkavců jsou podobné jako u hospodářských zvířat, včetně změn v pastevním chování, fyziologii hostitele a snížení celkové hmotnosti (Arneberg a Folstad, 1999; Boggiato et al., 2020).

Přestože jsou jednotlivé druhy hlístic z podčeledi Ostertagiinae obvykle typické pro určitého hostitele, v lokalitách společného výskytu více druhů přežvýkavců může být pozorováno sdílení těchto parazitů mezi jelenovitými, ale dochází rovněž k přenosům na turovité (Winter et al. 2018, Wyrobisz-Papiewska et al. 2018). Například hlístice *O. leptospicularis* se stala dominantním druhem v populaci zubrů evropských v Polsku na území Bělověžského pralesa. Třicet let po vypuštění těchto zubrů z obory do volné přírody zjištěná abundance *O. leptospicularis* převyšovala abundanci *O. ostertagi*, druhu typického pro tury (Bovinae) včetně zobra (Drózd et al. 1989). Po kolonizaci místních zubrů invazním druhem *A. sidemi* abundance *O. leptospicularis* prudce poklesla, zatímco abundance typického druhu zůstala nezměněna (Demiaszkiewicz, 2014). Zubři zde rovněž získali

hlístice *O. antipini* a *M. dagestanica*, které parazitují primárně u losa evropského (Grandi et al. 2018).

Vzhledem k nízké specifitě většiny druhů gastrointestinálních hlístic může docházet rovněž k přenosu zástupců podčeledi Ostertgiinae z jelenovitých na domácí přežvýkavce. Přestože jsou záznamy o takových infekcích spíše ojedinělé (Borgsteede, 1982; Mulrooney et al., 1991; Mäniinen et al., 2014; Sinclair et al. 2016), lze předpokládat, že k nim ve skutečnosti dochází mnohem častěji, jelikož pomocí metod intravitální diagnostiky běžně používaných u hospodářských zvířat není možné spolehlivě identifikovat jednotlivé druhy.

### 3.2.3.1 Polymorfismus zástupců podčeledi Ostertagiinae

Značné rozdíly v morfologii kopulačních orgánů samců podčeledi Ostertagiinae vedly k vytvoření až 17 samostatných rodů (Gibbons a Khalil, 1982). Současně však byl pozorován fenomén pravidelného společného výskytu dvou druhů. Jeden z druhů v infrapopulaci vždy převažuje, přičemž procentuální zastoupení minoritního druhu vždy korelovalo s abundancí majoritního druhu. Z toto vztahu Drózd (1995) vyvodil, že se ve skutečnosti jedná o dva morfologické projevy jednoho druhu, tzv. morfotypy. Morfologické rozdíly majoritního a minoritního morfotypu mají obdobný charakter napříč druhy: spikuly majoritního morfotypu jsou vždy štíhlé a přídavná membrána na kopulační burze není výrazně sklerotizovaná (Lichtenfels a Hoberg, 1993). Naopak spikuly minoritního morfotypu jsou robustnější a přídavná membrána tvoří sklerotizovaný útvar označovaný, jako Sjöbergův orgán (Asakawa et al., 2010). Morfologické rozdíly pářících orgánů mezi oběma morfotypy jsou natolik výrazné, že pro minoritní morfotypy byly v minulosti založeny samostatné rody. Hypotézu existence polymorfismu v následujících letech podpořily výsledky molekulárních analýz. Bylo tak například zjištěno, že ITS-1 a ITS-2 sekvence ribozomální DNA *S. asymerica* a *S. quarispiculata* jsou identické (Santín-Durán et al., 2002). Příslušnost ke stejnému druhu byla potvrzena rovněž u dvojic *Marshallagia marshalli* a *Marshallagia occidentalis* (Dallas et al., 2000), *Spiculoteragia spiculoptera* a *Spiculopteragia mathevossiani* (Liénard et al. 2007) a *S. houdemeri* a *S. andreevae* (Sultan et al. 2012). Rody *Skrjabinagia* (=Ostertagia), *Rindia* (=Siculopteraia) a *Apteragia* (=Spiculopteragia) tak v současnosti nejsou považovány za platné taxony. Druhy *Skrjabinagia kolchida*, *Rinadia mathevossiani*, *Rinadia andreevae* a *Apteragia quadrispiculata* jsou proto v této disertační práci uváděny jako minoritní morfotypy druhů: *O. leptosicularis*, *S. spiculoptera*, *S. houdemeri* a *S. asymmetrica*.

V minulosti byl pozorován určitý vliv sezóny (Drózd et al., 1992) a věku hostitelů (Drózd et al., 1987; Santín-Durán et al., 2004) na poměr zastoupení jednotlivých morfotypů, nicméně hlavním faktorem je zřejmě intenzita infekce majoritním morfotypem. Při mírné infekci minoritní morfotypy často nejsou přítomny (Yokohata et al., 2013). Druhy rodu *Camelosongylus*, *Longistrongylus* a *Mazamastrongylus* jsou považovány za monomorfní. Příčiny vzniku polymorfismu dosud nejsou známy. Morfologické určení samic je poměrně obtížné, založené na přítomnosti a rozměrech vulvální chlopně a délce kaudální části (vzdálenost od análního otvoru po špičku casu). Tyto znaky jsou ale poměrně variabilní v rámci druhu a dochází k výrazným překryvům mezi druhy (Lancaster a Hong, 1990).

Spolehlivějším znakem pro určení samic je konfigurace kutikulárních hřebenů a morfometrie přepážky oddělující oesophagus od střeva (Lichtenfels a Hoberg 1993). S pomocí těchto znaků je možné samice rozlišit do jednotlivých druhů. Samičí morfotypy nebyly identifikovány. Během experimentálního křížení samic z laboratorních monomorfních linií majoritního morfotypu se samci minoritního morfotypu byly získány samci odpovídající oběma morfotypům bez znaků křížení (Suarez a Cabaret, 1992).

### 3.3 Jelenovití v ČR jako hostitelé slezových hlístic

Čeleď Cervidae zahrnuje přibližně 55 druhů v 18 rodech (Hassanin et al., 2012) a vedle turových (Bovidae) tak tvoří druhou nejpočetnější čeleď v rámci přežvýkavců (Ruminantia). Oblasti přirozeného výskytu zahrnují Eurasii a oba americké kontinenty, přičemž až na výjimky je jejich rozšíření omezeno na severní polokouli. Zástupci jelenovitých jsou adaptovaní na různé typy prostředí. Unikátními morfologickými znaky jsou absence žlučníku a přítomnost paroží. V současnosti se většina autorů na základě molekulárních analýz přiklání k rozdělení čeledi na hlavní skupiny: podčeleď Cervinae, obsahující tribus Cervini (jeleni), a Muntiacini (muntžakové) a podčeleď Capreolinae složenou z tribů Capreolini (srnci), Alceini (losi), Odocoileini (jelenci), a rangiferini (sobi) (Hassanin et al., 2012; Gutiérrez et al., 2017; Heckenberg, 2020). Tato dichotomie zároveň odpovídá staršímu dělení založeném na morfologii končetin, konkrétně přítomnosti laterálních megapodií, které jsou zachované u eurasijských jelenů a asijských muntžáků (Plesiometacarpalia) a redukovány u zástupců skupiny Telemetacarpalia odpovídající podčeledi Capreolinae.

Původními druhy jelenovitých pro Českou republiku jsou srnec obecný a jelen evropský, ačkoliv u jelena evropského došlo v minulosti k hybridizaci s několika dalšími poddruhy (Bartoš et al., 2010) a v současnosti hybridizuje s jelenem sika (Bartoš et al., 1981; Putnová et al., 2021). Oba druhy se značně liší svými nároky na prostředí. Jelen evropský se na území ČR vyskytuje v rozsáhlých lesních komplexech, přičemž těžiště výskytu leží v příhraničních horských oblastech a přilehlém podhůří (Anděra a Červený 2009; Romportl et al., 2017). Jelikož je tento druh nejvíce ceněný z hlediska loveckých trofejí, je rozšířen rovněž jeho oborní chov. Oproti srnci obecnému jelen evropský preferuje souvislé lesní porosty, které poskytují dostatečný úkryt (Heurich et al., 2015) přičemž důležitá je rovněž vegetační skladba. Jeleni preferují oblasti s výskytem pastvin a mýtin s bohatým bylinným patrem (Mysterud et al., 2002; Anděra a Červený, 2009).

Během zimního období kdy sněhový pokryv ve vysokých nadmořských výškách znesnadňuje pohyb a přístup k potravě sestupují jeleni do níže položených oblastí, kde přezimují (Mysterud, 1999). V nížinách je vzhledem k fragmentaci lesního typu krajiny výskyt jelenů spíše vzácný, s výjimkou lužních lesů (Anděra a Červený, 2009). Oproti tomu srnec obecný je rozšířen napříč biotopy na celé ploše ČR. Početní stavy tohoto druhu za poslední dekády výrazně vzrostly a v současnosti se jedná o nejpočetnější druh z čeledi jelenovitých na evropském kontinentě. Přestože byl považován za „lesní“ druh, největších počtů dosahuje v zemědělsky využívané krajině s mírným klimatem (Hagen et al., 2014; Benjamin et al., 2022). U srnců a jelenů na území dřívějšího Československa byli v minulosti zjištěny typičtí paraziti slezu *O. leptospiularis* a *S. spiculoptera* a v místech kontaktu s daňky evropskými také *S. asymmetrica* (Kotrlá a Kotrlý, 1977; Vetýška, 1980).

Los evropský byl na území dnešní ČR vyhuben již v době vrcholného středověku a jeho současný výskyt je důsledkem rekolonizace jedinci migrujícími z Polska zaznamenané od 50. let minulého století (Anděra a Červený, 2009). Losi preferují vlhké lesy doplněné mokřady a rybníky s bujnou pobřežní vegetací. Kromě migrujících jedinců, kterých od předešlých dekád značně ubylo, byl trvalý výskyt mezi lety 2006 a 2009 zjištěn pouze v okolí Vodní nádrže Lipno a v jižní části Šumavy (Romportl et al., 2017). Jelikož má los v České republice status ohroženého druhu, který nelze legálně lovit, informace o parazitofauně místní populace prakticky neexistují. Nález typického parazita losa *M. dagestanica* (Řezáč, 1987) u srnce obecného na Pardubicku naznačoval přítomnost migrujících jedinců tohoto druhu.

Daněk evropský (skvrnitý) je jedním ze tří nepůvodních druhů v ČR. K introdukci tohoto druhu došlo již v období pozdního středověku, přičemž do 2. světové války se jednalo

o čistě oborní zvěř. V současnosti je daněk rozšířen na větší části území, přičemž oblasti výskytu tvoří souvislé plochy (Anděra a Červený, 2009). Preferuje níže položené oblasti s nadmořskou výškou do 500 m. n. m. (Bartoš et al., 2010). Daněk je u nás zároveň nejčastěji ze všech druhů jelenovitých předmětem oborního a intenzivního faremního chovu (Svrčula et al., 2019). Autoři Kotrlá a Kotrlý (1977) uvádějí jako dominantního parazita daňků v oborách i ve volnosti druh *S. asymmetrica* přičemž u těchto hostitelů pozorovali rovněž druhy typické pro jeleny a srnce.

Dalším nepůvodním druhem jelenovitých je jelen sika (*Sika nippon*), který se v současnosti dynamicky šíří na území ČR. Tento druh byl introdukovaný do několika obor v Čechách a na Moravě, přičemž od poloviny 20. století dochází k jeho expanzi z ohnisek výskytu v severozápadních Čechách a severovýchodní Moravě.

Oproti jelenu evropskému vykazuje větší schopnost mobility a nižší nároky na zalesnění krajiny (Anděra a Červený, 2009). Do roku 2010 byl jelen sika zaznamenán téměř ve všech krajích ČR, s výjimkou Jihočeského a Zlínského kraje (Dvořák a Palyzová 2016). Kromě invazního druhu *A. sidemi* byla jako druhý nejčastější parazit slezu tohoto hostitele zjištěna *S. asymmetrica* získaná pravděpodobně na oborách sdílených s daňky (Kotrlá a Kotrlý, 1977).

Jelenec běloocasý (*Odocoileus virginianus*) je původně nearktický druh, introdukovaný do ČR z Kanady v druhé polovině 19. století. Hlavní oblast výskytu leží v Brdské vrchovině, menší izolovaná populace se nachází rovněž v oblasti Chlumského hřebene. Na Moravu byli v 80. letech minulého století introdukováni jedinci poddruhu (*Odocoileus virginianus borealis*) do několika obor v Jihomoravském a Zlínském kraji (Anděra a Červený, 2009). Početní stavy tohoto druhu spíše klesají v důsledku nevyhovujících podmínek (dostupnost vhodné potravy) a konkurence ostatních druhů jelenovitých (Bartoš et al., 1999). Jelenci běloocasí na novém území ztratili své specifické druhy slezových parazitů, jako je například *Ostertgia mossi*, nebo *Spiculoptera odocoilei* (Hoberg et al., 2001). Na druhou stranu byli tito hostitelé kolonizováni celým spektrem palearktických druhů z podčeledi Ostertgiinae: *O. letospicularis*, *S. spiculoptera* a *S. asymmetrica* (Kotrlá a Kotrlý, 1977).

## 3.4 Patologie ashworthiózy

### 3.4.1 Abomasum

Slez (abomasum), neboli pravý žaludek je čtvrtým a posledním segmentem tvořícím složený žaludek přežvýkavců, jeho funkce a anatomie je obdobná, jako u žláznatého žaludku monogastrů. Na rozdíl od předžaludků zde dochází především k trávení proteinů. U okusovačů, jako je například srnec obecný nebo los evropský, je relativní hmotnost a kapacita slezu nižší než u spásačů (muflon), a u druhů s přechodným typem potravní strategie (jelen evropský, daněk obecný) (Hofman, 1989). Vnitřní část slezu lze rozdělit na oblast dna (fundus), kde jsou secernovány trávící enzymy a na pylorickou část, ve které je produkován pouze hlen. Sliznice fundu tvoří četné záhyby, čímž je zvyšována celková vnitřní plocha slezu pro co největší kontakt s pasážovanou potravou. Při naplnění slezu dochází ke zvýšení pH na 6,0 – 7,0 což stimuluje parietální buňky k produkci iontů kyseliny chlorovodíkové, k obnovení kyselého pH 2,5, které je optimální pro přeměnu pepsinogenu na pepsin. U okusovačů je sliznice slezu silnější než u spásačů a obsahuje vyšší množství parietálních buněk, což umožňuje neutralizovat vysokou alkalitu slin, které naopak pomáhají udržovat optimální pH během fermentace v bachoru (Hofman, 1989).

Za fyziologických podmínek je sliznice fundu slezu tvořena velkým množstvím jamek (foveolae), které jsou zakončeny mírně rozvětvenými tubulárními žlázami. Svrchní část těchto jamek je vystlána buňkami produkujícími mucinózní hlen. Tyto buňky jsou dvojího typu: při povrchu se vyskytují tzv. SMC (surface mucous cells) buňky produkující převážně neutrální mucin MUC5AC, zatímco hlubší část, označovaná jako krček je osazena tzv. MNC (mucose neck cells) buňkami, což jsou v podstatě nezralé hlavní buňky, které kromě pepsinogenu vylučují mucin typu MUC6 (Ota a Katsuyama, 1992). Sliznice je tak chráněna několika vrstvami hlenu, které spolu s hydrogenuhličitanovými ionty a hydrofobními fosfolipidy vytvářejí gradient pH mezi kyselým obsahem slezu a povrchem epitelu (Lichtenberger, 1999; Simpson, 2000). Kromě ochrany před mechanickým a chemickým poškozením vlastní tkáně mohou muciny významně ovlivňovat vnímavost nebo případnou rezistenci vůči gastrointestinálním parazitům (Magalhaes et al., 2009; Hasnain et al., 2013). Klíčová je v tomto ohledu skladba oligosacharidů, které jsou navázány na polypeptidové jádro O-glykosilací. Vazba se tvoří mezi hydroxylovou skupinou threoninu, nebo serinu a GalNac (N-acetylgalaktosamin) sacharidového řetězce, případně mezi GalNac



a asparginem (Kobata, 1992). Například u mláďat rezistentních vůči gastrointestinálním hlísticím byla zjištěna vyšší míra sulfatace mucinů (Hoang et al., 2010).

Při bázi žláz se nacházejí buňky, které se svojí činností podílejí na trávení. Jsou to jednak zralé hlavní buňky, které produkují pepsinogen a parietální buňky, které do lumenu uvolňují ionty  $H^+$  a  $Cl^-$ , čímž zajišťují kyselé prostředí, ve kterém může dojít k přeměně pepsinogenu na aktivní pepsin. Dále je zde řada endokrinních buněk, které prostřednictvím svých produktů, jako např. gastrin, nebo histamin, regulují a koordinují činnost trávicí soustavy a zajišťují fyziologickou architekturu sliznice. Všechny tyto buňky jsou obnovovány dozráváním kmenových buněk, které se neustále tvoří v progenitorové zóně krčku (Rinaldi et al., 2011).

## **3.4.2 Patologie trichostrongylidních infekcí**

### **3.4.2.1 Přímé působení hlístic a makroskopicky viditelné patologie**

Infekce slezu hlísticemi čeledi Trichostrongylidae lze obecně považovat za vysoce patogenní. Dochází při nich k mechanickému poškození sliznice slezu a duodena, což vede k zánětlivým reakcím a anemickým stavům, ale také k narušení exkreční funkce buněk epitelu slezu.

Zástupci podčeledi Ostertagiinae způsobují nejzávažnější poškození hromadnou migrací larev tkání hostitele během svého vývoje. Ostertagióza prvního typu, je způsobena penetrací sliznice larvami třetího stadia krátce po pozření infekčních larev hostitelem a objevuje se nejčastěji u mláďat v pozdním létě a na podzim. K ostertagióze druhého typu dochází po dosažení dospělosti a následném synchronním vynořením velkého množství larev čtvrtého stadia, případně časných stadií dospělců. Ostertagióza druhého typu se objevuje hlavně u na jaře, u starších jedinců, po období pozastaveného vývoje larev (Bellem et al., 1993; Connan, 1991). Makroskopicky pozorovatelným patologickým projevem ostertagiózy je otok, zesílení sliznice a zejména přítomnost typických nodulárních lézí, které se tvoří v okolí infikované tkáně (Conti a Howeth, 1987). Ostertagióza je dobře známa v chovech hospodářských přežvýkavců, ale bývá též pozorována u jelenovitých, u kterých je označována, jako Fading elk syndrome (Woodburry a Parry, 2009; Boggiatto et al., 2018).

Onemocnění se projevuje výraznou ztrátou hmotnosti, úbytkem svalové hmoty a sníženou kvalitou srsti (Orr et al., 1990).

Hematofágní druhy z podčeledi Haemonchiinae, mezi které patří i *A. sidemi*, způsobují poškození sliznice především v dospělosti během sání krve. Typickým nálezem u přežvýkavců infikovaných *H. contortus* jsou hemoragické léze, ulcerace, nekrózy a eroze sliznice (Pérez et al., 2001; Dutta et al., 2017; Jaheed et al., 2021). O patogenním vlivu *A. sidemi* na sliznici slezu existuje dosud jen málo podrobných informací. Autoři Demiaszkiewicz et al. (2009) pozorovali hyperémii a nápadný otok sliznice slezu u mláďat jelena evropského infikovaných větším množstvím jedinců *A. sidemi*. Podrobnější vyšetření bylo provedeno pouze u zubrů evropských. U infikovaných jedinců byly na sliznici slezu zjištěny příznaky abomasitis, které se makroskopicky projevovaly hyperémií a celkovým otokem. Histologické vyšetření zubrů infikovaných *A. sidemi* odhalilo přítomnost zánětlivého infiltrátu tvořeného převážně lymfoidními buňkami a eozinofily přičemž intenzita infiltrace těchto buněk pozitivně korelovala s intenzitou infekce (Osińska et al., 2010). V souvislosti s *A. sidemi* byla u zubrů zjištěna také zhoršení některých krevních parametrů. Počet červených krvinek, množství hemoglobinu a úroveň hematokritu negativně korelovala s intenzitou infekce (Kołodziej-Sobocińska et al., 2016b).

### 3.4.2.2 Změny v sekreci slezu a histopatologie

Kromě přímého poškození tkáně způsobeného migrujícími larvami a sáním krve dospělci mohou hlístice z čeledi Trichostrongylidae narušovat fyziologickou funkci slezu nepřímo změnami sekreční aktivity. Při infekci slezovými hlísticemi je běžně pozorováno zvýšení pH v lumenu slezu (Hertzberg et al., 2000; Moradpour et al., 2013). K tomuto jevu dochází bezprostředně po vynoření larev čtvrtého stadia a jejich následného dosažení dospělosti (Lawton et al., 1996; Simpson et al., 1996). Autoři Scott et al. (2017) pozorovali nástup projevů zvýšeného pH ve slezu již několik hodin po transplantaci dospělých jedinců *T. circumcincta* do lumen slezu ovcí. Vzestup pH má za následek narušení trávení bílkovin, jelikož dochází k omezení přeměny pepsinogenu na aktivní pepsin. Zatímco larvální stadia hlístic způsobují poškození parietálních buněk pouze v bezprostředním okolí infikované tkáně, za přítomnosti dospělců dochází ke snížení počtu parietálních buněk a k degenerativním změnám jejich morfologie (Scott et al., 2000). Klíčovou roli v procesu inhibice parietálních buněk pravděpodobně hraje produkce exkrečně sekrečních produktů

(ESP) dospělými parazity. Autoři Simpson et al. (1999) transplantovali do slezu ovčí dospělce *T. circumcincta* uzavřené v porézním obalu tak, aby nebyl možný kontakt se sliznicí a zároveň mohlo docházet k úniku ESP, načež pozorovali zvýšení pH v lumen slezu. Rovněž laboratorně kultivované parietální buňky vystavené ESP *T. circumcincta* vykazovaly sníženou sekreci kyseliny (Mihi et al. 2013). Inhibici parietálních byla v minulosti zjištěna i při infekci ovčí druhem *O. leptospicularis*, typickým pro jelenovité (Hertzberg et al., 2000). Při koinfekci *O. leptospicularis* a *O. ostertagi* byly pozorovány vyšší hodnoty pepsinogenu v krvi hovězího skotu (Al Saqur et al., 1980).

Při zvýšení pH ve slezu dochází k vzestupu gastrinu v krvi infikovaných zvířat (Fox et al., 1988). Tento jev nastává v důsledku ztráty negativní zpětné vazby. Hlavním aktivátorem G buněk k produkci gastrinu je zvýšené pH během pasáže tráveniny. Po vyprázdnění slezu obnovené nízké pH stimuluje D buňky k produkci somatostatinu, který funguje jako inhibitor G buněk. Trvale zvýšené pH během infekcí trichostrongylidními hlísticemi tak způsobuje hypergastrinemii (Lawton et al., 1996). To má za následek změny v architektuře sliznice fundu, jelikož gastrin se mimo jiné podílí na udržování rovnováhy mezi tvorbou a dozráváním buněk tvořených v progenitorové části krčku (Simpson, 2000). Jedním z histologických projevů zvýšené sekrece gastrinu tak může být proliferace buněk v oblasti krčku slezových jamek a následná hyperplazie, která je během trichostrongylidních infekcí často pozorována (Rinaldi et al., 2011; Simpson et al., 2016; Scott et al., 2017).

Alterací v sekreci slezu trichostrongylidní infekce ovlivňují také množství a kvalitu produkovaných mucinů. Ve slezu ovčí infikovaných hlísticí *H. contortus* bylo pozorováno snížení neutrálního secernovaného mucinu Muc5AC a naopak zvýšení množství kyselého mucinu Muc6 v hlubších částech sliznice (Newlands et al., 1990). Při hemonchóze byla později zjištěna snížená exprese genu pro tvorbu neutrálního mucinu MUC5AC. Rinaldi et al. (2011) zaznamenali zvýšenou expresi genu MUC6 pro tvorbu kyselého secernovaného mucinu a membránových mucinů MUC1 a MUC20 během infekce skotu hlísticí *O. ostertagi*, přičemž poměr a lokalizace neutrálních a kyselých mucinů byly podobné jako v předchozí zmiňované studii (Newlands et al., 1990). Zároveň byla pozorována zvýšená exprese genů zapojených do specifického typu syntézy mucinů (fukosylace). K redukci neutrálního mucinu Muc5AC v oblasti SMC a zvýšení kyselého mucinu v oblasti MNC bylo pozorováno jak při infekci vyvolané druhem *H. contortus* (Haemonchiinae), tak při infekci *T. circumcincta* (Ostertagiinae). Navíc tito autoři pozorovali snížené množství sulfatovaných mucinů, které mohou být významným faktorem rezistence proti gastrointestinálním parazitům (Hoang et al., 2010). Autoři Scott et al. (2017) u ovčí uměle infikovaných *T.*

*circumcincta* sledovali výše zmiňované změny (zvýšení pH a gastrinu a zeslabenou reakci PAS), které indikují pokles neutrálních mucinů v povrchové části slezových jamek a naopak zvýšenou reakci ALC detekující kyselé muciny v hlubších částech sliznice. Ke všem těmto změnám došlo v řádu hodin od transplantace dospělých hlístic. V případě infekce larvami se změny začaly výrazně projevovat až deset dní po infekci, což odpovídalo době jejich dosažení dospělosti. Na základě uvedených poznatků je zřejmé, že k nejvýznamnějším změnám postihujícím sekreční činnost slezu přežvýkavců dochází za přítomnosti dospělých stadií trichostrongylidních hlístic a to napříč druhy. Zejména neutrální mucin Muc5AC tvoří významnou bariéru chránící sliznici slezu před autolytickým poškozením a před vstupem dalších patogenů. Dopad *A. sidemi*, ani jiných druhů hlístic parazitujících u jelenovitých na tvorbu tohoto mucinu dosud nebyl studován.

### 3.5 Diagnostika ashworthiózy

Metody diagnostiky GI hlístic lze rozdělit na postmortální a intravitální. Postmortální diagnostika zahrnuje parazitologickou pitvu GI traktu, při které je možné stanovit absolutní intenzitu infekce, nebo její odhad na základě přímé determinace parazitů. Oproti tomu intravitální metody umožňují detekci parazita a odhad intenzity infekce na základě přítomnosti propagulí parazita ve výkalech hostitele. Podle vývojového stupně diagnostikovaných propagačních stadií se intravitální metody dále dělí na ovoskopické při kterých je infekce diagnostikována na základě přítomnosti a počtu vajíček ve výkalech a larvoskopické při kterých jsou detekovány infekční larvy vykultivované z vajíček, nebo získané z prostředí. Nástrojem pro diagnostiku mohou být také nepřímé metody, odhalující infekci prazity na základě specifických změn v těle hostitele vyvolaných imunitní odpovědí, nebo narušením fyziologických funkcí hostitele.

Přesná diagnostika je nutná jednak pro antiparazitární kontrolu a prevenci infekce, ale také pro studie epizootologie parazitóz (Gasser et al., 2008). Pomocí diagnostických metod lze ověřit parazitární infekci u jedinců s klinickým projevem, ale také odhalit subklinickou infekci, která má negativní dopad na zdraví jak ve stádech domácích, tak v populacích volně žijících přežvýkavců (Eysker a Ploeger, 2000 Gunn a Irvinne, 2003). Zatímco intravitální diagnostika GI hlístic parazitujících u ekonomicky významných přežvýkavců zaznamenala v předešlých letech značný rozvoj zejména díky zavedení

molekulárních metod, studie těchto parazitů u volně žijících zvířat jsou ve většině případů stále založeny na výsledcích parazitologických pitev (Budischak et al., 2015).

### 3.5.1 Parazitologická pitva

Stěžejní metodou pro postmortální diagnostiku helmintóz volně žijících přežvýkavců je parazitologická pitva (Taylor et al., 2016). Na rozdíl od intravitálních metod parazitologická pitva umožňuje zjistit absolutní hodnou intenzitu infekce jednotlivých parazitů, nicméně vzhledem k časové náročnosti determinace GI histi je ale obvykle určena pouze část infrapopulace a celková intenzita je následně stanovena odhadem (Gaba et al., 2006). Podle účelu vyšetření je prováděna celková pitva GI traktu, nebo orgánová, při které je vyšetřen pouze predilekční segment pro určitou skupinu parazitů.

Úplná parazitologická pitva zahrnuje vyšetření obsahu orgánu včetně výplachu sliznic a jejich rozvolnění pro získání larválních stadií (Eyskyer a Kooyman, 1993) Pro *A. sidemi*, je vhodné provést úplnou orgánovou pitvu, při které jsou, kromě makroskopicky viditelných dospělců v lumenu slezu, zachycena i larvální stadia zanořená ve sliznici. Díky tomu je možné sledovat sezónní výskyt histotropních larev v poměru k dospělým stadiím. Pro tyto účely se používají trávící metody, při kterých dojde k rozvolnění sliznice a uvolnění larev do trávícího roztoku, ze kterého jsou posléze získávány pasáží přes laboratorní síta o průměru oka 38  $\mu\text{m}$  a dekantací zachyceného materiálu (Hansen a Perry, 1994; McKenna, 2008).

Nevýhodou postmortální diagnostiky je značná logistická náročnost získávání biologického materiálu a časová náročnost při samotném vyšetřování. Získání reprezentativního vzorku populace volně žijících živočichů může být limitováno legislativními a etickými normami. Sběry vzorků pro studie helmintóz jelenovitých jsou tak často omezeny na období loveckých sezón nebo přirozenou mortalitu, přičemž není možné postihnout sezónní změny v prevalenci a intenzitě infekce (Irvine et al., 2006; Albery, 2018). U lovené zvěře může být následná interpretace výsledků pitev ovlivněna způsobem získávání vyšetřovaného materiálu. Například při průběrném odstřelu jsou selektováni jedinci s viditelně zhoršeným zdravotním stavem. U těchto zvířat lze při tom předpokládat vyšší parazitární zátěž (Burgoin et al., 2021). Legislativa navíc umožňuje po určitou dobu v

roce lovit pouze některé věkové skupiny, nebo pohlaví, což může být překážkou pro studii epizootologie parazitóz (Pato et al., 2013).

### 3.5.2 Ovoskopie

I přes rozvoj sérologických a molekulárních metod zůstává po více než sto letech od svého zavedení nejběžnější metodou pro intravitální diagnostiku helmintóz koprologické vyšetření (Ward et al., 1997; Nielsen et al., 2021). Paraziti GI traktu uvolňují propagační stadia v podobě vajíček, která odchází do vnějšího prostředí s výkaly. Do trávicího traktu se spolknutím vykašlaného sputa dostávají rovněž vajíčka či larvy plicních parazitů a spolu se žlučí sem odcházejí vajíčka jaterních parazitů. Mikroskopické vyšetření výkalů tak představuje poměrně levnou metodu, pomocí které lze detekovat propagační stadia řady endoparazitů a odhadnout intenzitu infekce (Taylor et al., 2016).

Pro účinnou diagnostiku pomocí ovoskopie je třeba dodržovat správný postup sběru a uchovávání vzorků. Jednotlivé vzorky by měly být vždy čerstvé, odebírané, pokud možno individuálně přímo z rekta vyšetřovaného jedince. Koprologické vyšetření vzorků by mělo následovat v co nejkratší době od jejich získání. Vzorky výkalů je možné krátkodobě uchovávat v uzavřených sáčcích při teplotě 4 °C (Rinaldi et al., 2011), nicméně zhruba po týdnu dochází k rozvoji plísní, jejichž hyfy vzorek znehodnocují. Při vyšších teplotách (okolo 20 °C) a přísunu kyslíku dochází k líhnutí larev a vzorek následně není možné použít pro ovoskopické vyšetření (Foreyt, 2001). Při mražení dochází k popraskání vajíček, proto lze pro dlouhodobé uchování použít pouze chemickou konzervaci 5 – 10% roztokem formaldehydu, případně Lugolovým roztokem. Konzervace formaldehydem vylučuje další použití vzorku pro koprokulturu a molekulární metody, jelikož při ní dochází k nevratnému poškození DNA (Harmon et al., 2007).

V laboratorních podmínkách se pro diagnostiku GI hlístic nejčastěji používají flotační metody, které umožňují koncentrovat reprezentativní vzorek vajíček parazitů z vyšetřovaného materiálu. Principem těchto metod je suspenze vzorků v nasyceném flotačním roztoku o vysoké hustotě, ve kterém mají vajíčka hlístic vzhledem k své nižší hustotě tendenci stoupat k povrchu, kde mohou být snadno odebírána pro mikroskopické vyšetření. Počet vajíček v daném objemu suspenze vztahený k celkovému objemu vzorku

výkalů poskytuje informaci o počtu vajíček v jednom gramu vyšetřovaného vzorku (eggs per gram, EPG) (Nicholls a Obendorf, 1994).

Univerzálním nástrojem pro detekci a kvantifikaci infekce hlísticemi je McMasterova metoda, umožňující odečítat počet vyflotovaných vajíček pomocí speciálně navrženého podložního sklíčka opatřeného komůrkami (Gordon a Whitlock, 1939). Důležitými parametry této metody je volba flotačního roztoku, respektive jeho relativní hustoty, poměr ředění vzorku, doba flotace a objem suspenze odebrané pro vyšetření (Cringoli et al., 2004). Flotační roztoky s vyšší relativní hustotou zachytí širší škálu vajíček, ale zároveň i větší množství nečistot. S rostoucí relativní hustotou flotačního roztoku navíc roste riziko poškození vajíček (Zajac a Conboy, 2012). Pro diagnostiku GI hlístic jsou podle autorů Cringoli et al. (2004) optimální flotační roztoky na bázi sacharózy o hustotě mezi 1,2 a 1,35 g·cm<sup>-3</sup>

V průběhu let tato metoda prošla řadou modifikací jako např. FLOTAC a Mini-FLOTAC zvyšujících citlivost a přesnost původní metody (Cringoli et al., 2010; 2017).

Tyto metody jsou v současnosti používané zejména pro posouzení parazitární zátěže infikovaného hostitele, ověřování účinnosti anthelmintické léčby (FECRT) a pro detekci rezistentních linií hlístic parazitujících u hospodářských přežvýkavců (George et al., 2017). U volně žijících přežvýkavců je s použitím ovoskopických metod možné kontinuálně sledovat sezónní dynamiku zátěže GI hlísticemi (Albery et al., 2018).

Vzhledem k morfologické uniformitě vajíček trichostrongylidních hlístic nejsou flotační metody vhodné pro identifikaci jednotlivých druhů. U většiny těchto parazitů, včetně *A. sidemi*, jsou vajíčka tenkostěnná oválného tvaru o velikosti 60 – 80 μm. Determinace jednotlivých druhů na základě ovoskopie je díky tomu takřka nemožná. Odlišit lze pouze zástupce rodů *Nematodirus* a *Marshallagia*, jejichž vajíčka dosahují až dvojnásobné velikosti oproti vajíčkům ostatních hlístic z podčeledi Haemonchiinae a Ostertagiinae (Lichtenfels a Hoberg, 1994). Vajíčka druhu *H. contortus* je možné identifikovat pomocí značeného lektinu (aglutinin) (Umair et al., 2016).

Flotační metody mohou parazita spolehlivě detekovat pouze v patentní fázi infekce, tedy v době, kdy samice produkují vajíčka (McKenna, 1981). Zjištěné počty vajíček tak často nekorelují s mírou skutečné parazitární zátěže (Budischak et al., 2015). Při vyhodnocování výsledků koprologického vyšetření je vždy potřeba zvážit biotický potenciál konkrétního druhu hlístice, který se mezi jednotlivými druhy parazitů značně liší.

U druhů GI hlístic produkujících velké množství vajíček, jako je například *H. contortus* detekované EPG odrážejí intenzitu infekce lépe, než u druhů s nízkým biotickým potenciálem, jako je například *O. ostertagi* (Eysker, 2000; Gasser et al. 2008). V endogenní fázi vývojového cyklu trichostrongylidních hlístic nastávají období, kdy jsou v hostiteli přítomna pouze larvální stadia (prepatenní perioda, hypobióza). V takových případech koprologická vyšetření poskytují falešně negativní výsledek. Ani přítomnost dospělců v GI traktu však nezaručuje spolehlivost výsledku, jelikož vajíčka jsou často vylučována v nepravidelných intervalech. Například během pitev slezu zubrů bylo nalezeno značné množství dospělých hlístic *A. sidemi*, zatímco koprologické flotační metody detekovaly u stejných jedinců pouze zanedbatelné množství vajíček (Vadlejch et al., 2017).

### 3.5.3 Larvoskopie

Jelikož vajíčka jednotlivých druhů trichostrongylidních hlístic nelze od sebe spolehlivě odlišit, prakticky jedinou spolehlivou tradiční metodou determinace je identifikace na základě infekčních larev (L<sub>3</sub>) (van Wyk et al. 2004). Tyto larvy je možné získat inkubací výkalů vyšetřovaných zvířat. Klíčovými faktory při inkubaci larev jsou vlhkost, teplota přístup vzduchu a optimální pH (Hubert a Kerboeuf, 1984). Hansen a Perry (1994) uvádějí jako optimální pro kultivaci larev GI hlístic přežvýkavců inkubaci v termostatu při teplotě 27 °C po dobu sedmi až deseti dnů, přičemž je nutná pravidelná kontrola vlhkosti koprokultury. Při dostatečné teplotě a vlhkosti se z vajíček obsažených ve výkalech vylíhnou larvy, které se přibližně po týdnu vyvinou v infekční larvy L<sub>3</sub>. Ty je možné z koprokultury získat Baermanovou metodou využívající pozitivní hydrotaxi larev. Získané larvy lze možné určit na základě morfologických a morfometrických charakteristik (van Wyk a Mayhew, 2013). Při sběru výkalů z prostředí je vysoce pravděpodobná jejich kontaminace volně žijícími druhy hlístic, což znesnadňuje další diagnostiku. Faktorem zkreslujícím odhad intenzity infekce je v případě použití koprokultury rozdílná mortalita mezi larvami různých druhů hlístic (Dobson et al., 1992; Parraud et al., 2006; O'Connor et al., 2006). Z tohoto důvodu je před použitím kultivací larev z výkalů volně žijících přežvýkavců nutné nejprve optimalizovat teplotu a dobu inkubace pro příslušné druhy parazitů. Namísto výkalů lze použít agarové médium, do kterého jsou přenesena separovaná a pročištěná vajíčka (Hubert a Kerboeuf, 1984). Při této metodě se snáze udržuje potřebná



vlhkost, prokysličení a umožňuje rovnoměrné rozložení živin pro raná larvální stadia, nevýhodou je však pracnost a časová náročnost.

### **3.5.4 Imunologické a sérologické metody**

Z dalších možností diagnostiky gastrointestinálních hlístic lze zmínit imunologické metody využívající detekce specifických protilátek v krvi a sérologické metody, při kterých jsou sledovány změny hladin protilátek. Testy na přítomnost specifických protilátek, jako je např. ELISA nebo Western blot mohou sloužit například k detekci *H. contortus* u ovcí (Zarlenga et al. 2016). U volně žijících přežvýkavců jsou imunologické metody používány pro diagnostiku bakteriálních a virových onemocnění (Bréard et al., 2020). Pro diagnostiku gastrointestinálních hlístic se tyto metody však nejeví jako vhodné z důvodu nízké citlivosti, jelikož při výskytu příbuzných druhů hlístic často dochází ke zkřížené reakci (Johnson et al., 1996; Eysker et al., 2000), nicméně mohou být významným nástrojem při studiích imunologie parazitárních nákaz (Zarlenga et al. 2016). Hlístice slezu lze diagnostikovat na základě zvýšené hladiny pepsinogenu, jelikož za přítomnosti těchto parazitů vlivem narušení funkce parietálních buněk dochází ke vzrůstu pH, což vede k pozastavení přeměny pepsinogenu na pepsin a následnému uvolňování pepsinogenu do krve. Podobným indikátorem infekce slezu hlísticemi může být vzestup hladiny gastrinu. Použití sérologických metod jako nástroje rutinní diagnostiky znemožňuje značná obtížnost získávání vzorků krve u volně žijících přežvýkavců.

### **3.5.5 Molekulární metody**

Metody popisované v předešlých kapitolách mají řadu a nedostatků. Ovoskopické metody poskytují pouze informaci o celkové infekci trichostrongylidními hlísticemi, přičemž není možná determinace jednotlivých druhů parazitů. Oproti tomu larvoskopické metody umožňují determinaci druhů, nicméně kultivace larev a jejich následné určování je časově náročné a vyžaduje značnou zkušenost. Navíc tyto metody nejsou plošně standardizovány a každá laboratoř zpravidla používá vlastní modifikované metody s různou

spolehlivostí a citlivostí (Kassai, 1999; Cringoli et al., 2004), což znesnadňuje porovnávání výsledků mezi laboratořemi (Roeber et al., 2013).

Přesná determinace na úrovni druhu je nezbytná jak pro diagnózu, tak pro studium epizootologie *A. sidemi*. Pro tyto účely je možné použít molekulární metody, které se v současnosti používají k diagnostice hlístic u domácích přežvýkavců (Gasser et al., 2008; Roeber et al., 2013). Tyto metody jsou založené na polymerázové řetězové reakci (PCR – polymerase chain reaction), při které je amplifikován druhově specifický fragment DNA parazita. Pro diagnostiku GI hlístic jsou jako genetický marker nejčastěji používány první a druhý vnitřní transkribovaný mezerník (ITS-1, ITS-2), lokalizovaný na jaderném ribozomálním DNA (rDNA). Nízká variabilita mezi jedinci a zároveň mezi jednotlivými populacemi činí z těchto mezerníků ideální markery pro identifikaci na úrovni druhu.

Při multiplex-PCR je možné amplifikovat více fragmentů současně, což umožňuje detekovat přítomnost celého spektra parazitů z jednoho vzorku. Pro zachování přesnosti a účinnosti této metody je nutná optimalizace počtu cyklů, poměru reaktantů a teploty jednotlivých fází cyklu (Henegariu et al., 1997). Multiplex-PCR je využívána při diagnostice GI hlístic parazitujících u domácích druhů přežvýkavců (Zarlenga a Higgins, 2001; Roeber et al., 2017), ale stále častěji je používána i pro parazity jelenovitých, namísto klasické morfologické determinace, například při detekci plicnivek rodu *Dyctiocaulus* (Höglund et al., 1999; Pyziel et al., 2015), hlístic rodu *Elaphostrongylus* parazitujících v nervové soustavě (Swislocka et al., 2021). V minulosti byly popsány rovněž genetické markery pro diagnostiku některých druhů hlístic parazitujících ve slezu jelenovitých, například *O. leptospicularis* (von Samson-Himmelstjerna et al., 2002; Bisset et al., 2014) nebo *Spiculoptera houldemeri* (Sinclair et al., 2016). Protokoly používané těmito autory byly navrženy pro diagnostiku druhového spektra GI hlístic ovcí na místech, kde dochází ke sdílení pastvy s volně žijícími přežvýkavci, avšak metoda multiplex-PCR umožňující identifikovat celé spektrum hlístic slezu jelenovitých dosud nebyla optimalizována.

### 3.5.5.1 Real-time PCR a HRMA

Metoda real-time PCR (qPCR) (Higuchi et al., 1992) umožňuje v reálném čase sledovat, zda dochází k amplifikaci fragmentu DNA a zároveň kvantifikovat množství vzniklého produktu. K tomu slouží barviva jako např. SYBR green, nebo EvaGreen s afinitou k dvouvláknové DNA (dsDNA) (Becker et al., 1996; Wang et al., 2006). Po vzniku

produktu se tato barviva naváží na amplikony, přičemž vyzařují intenzivní zelené světlo. V případě multiplex-PCR mohou být pro identifikaci vzniku amplikonů použity specifické sondy, jako např. TaqMan. Intenzita fluorescenčního záření emitovaná při vzniku amplikonů je monitorována optickým zařízením, což umožňuje v reálném čase sledovat množství vznikajícího produktu (citace).

Pro relativní, nebo absolutní kvantifikaci amplikonů je klíčová identifikace kvantifikačního cyklu ( $C_q$ ) ve kterém amplifikační křivka přechází do exponenciální fáze a začíná amplifikace cílového fragmentu. Pro kvantifikaci jsou porovnávány  $C_q$  standardů o různé koncentraci templátové DNA s  $C_q$  testovaných vzorků.

Pokročilejší metodou je MT-PCR (multiplexed tandem PCR), která se skládá ze dvou kroků: v prvním jsou cílové sekvence amplifikovány pomocí multiplex PCR v několika málo cyklech. V druhém kroku jsou získané produkty použity jako templát pro několik nezávislých PCR pro každou detekovanou sekvenci (Stanley a Szewczuk, 2005). Použití této metody umožňuje sledování většího množství cílových sekvencí, jelikož termocyklery pro multiplexní PCR obvykle disponují pouze kanály pro čtyři až šest fluorescenčních signálů. Zároveň odpadá nutnost použití různých sond pro každou cílovou sekvenci, což významně snižuje náklady. V praxi jsou metody qPCR a MT-PCR používány pro identifikaci a částečnou kvantifikaci GI hlístic u hospodářských zvířat (Bott et al., 2009; Roeber et al., 2017; Rashid et al., 2018)

Vysokorozlišovací analýza křivek tání, neboli High Resolution Melting Analysis (HRMA) je metoda založená na PCR a umožňuje přesnou diagnostiku. Pomocí této metody lze detekovat alterace sekvencí, jako jsou delece, inserce nebo jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) na fragmentech DNA amplifikovaných pomocí qPCR. Amplikony jsou denaturovány postupně zvyšovanou teplotou, přičemž teplota tání DNA ( $T_m$ ) je ovlivněna délkou amplikonu a poměrem množství párů bází GC a AT. Vazba třemi vodíkovými můstky mezi G a C je stabilnější, než vazba dvěma můstky mezi A a T. Amplikony s vyšším obsahem párů bází GC tedy mají vyšší  $T_m$ . Během denaturace amplikonu dochází k odlučování barviva ze zanikající dsDNA, což má za následek postupné slábnutí fluorescenčního signálu. Výhodou této metody je její rychlost (odpadá nutnost elektroforézy) a relativní jednoduchost. V praxi může být použita pro genotypizaci, zjišťování mutací a rovněž pro determinaci hlístic (Demeler et al., 2013; Arbabi et al., 2020).

### 3.5.5.2 Molekulární metody po diagnostiku *A. sidemi*

Autoři Ljunggren et al.(2007) osekvenovali fragment rRNA obsahující regiony ITS-1 a ITS-2 získaný z larev a dospělců *A. sidemi* (Genbank EF467325). Na základě této sekvence připravili Moskwa et al. (2014) specifické primery pro *A. sidemi* 5'-ACA ACA TTA ACACCT GTT GCA TGT-3'(reverse) a 5'-ACTGTA TCC GAA TAT ATA TCG GAG-3'(forward), pomocí kterých lze *A. sidemi* s využitím jednoduché PCR spolehlivě prokázat již při velmi nízké koncentraci DNA (0,1 pg/μl) ve vyšetřovaném vzorku (Moskwa et al., 2014). DNA je po možné získat rovněž z vyflotovaných vajíček po pročištění a při použití metody extrakce DNA, při které jsou eliminovány inhibitory amplifikace (Roeber et al. 2011).

Autoři Lehrter et al. (2016) sekvenovali geny kódující podjednotku NADH dehydrogenázy, lokalizované na mitochondriální DNA *A. sidemi* a *H. contortus*, na základě čehož navrhli metodu pro přesné odlišení obou druhů, včetně jejich larválních stadií pomocí multiplex PCR. Značnou nevýhodou tohoto protokolu je relativně vysoké množství DNA (40 ng/μl) potřebné pro účinnou diagnostiku. Vzhledem k zanedbatelné produkci vajíček *A. sidemi* i při vysokých intenzitách infekce (Vadlejch et al., 2017) nemusí být vždy možné získat biologický materiál pro testování v požadovaném množství. Spolehlivá metoda intravitální diagnostiky pro *A. sidemi* a *H. contortus* je při tom nezbytná, neboť flotačními ani larvoskopickými metodami nelze oba parazity od sebe odlišit. Taxonomická identifikace je možná zejména na základě samčích jedinců, obtížnější je u samic a u larválních stadií je téměř nemožná. *A. sidemi* je při tom hostitelky nespecifický druh schopný infikovat ovce a skot (Kotrlá a Korlý, 1976; Moskwa et al., 2015). U volně žijících druhů přežvýkavců navíc byly pozorovány současné infekce oběma druhy (Ferté et al., 2000). Pokud jeden z druhů v infrapopulaci výrazně převažuje, vzhledem k morfologické podobnosti může během postmortálního vyšetření snadno dojít k přehlédnutí koinfekce.

## 3.6 Epizootologie infekcí trichostrongylidními hlísticemi

Vývojový cyklus *A. sidemi* je, stejně jako u ostatních trichostrongylidních hlístic, přímý. Dospělé samice ve slezu produkují vajíčka, která spolu s výkaly opouští tělo hostitele. Další vývoj probíhá ve vnějším prostředí, bez zapojení mezihostitele. Při dostatečné vlhkosti

a vhodné teplotě dochází přibližně po dvou dnech k líhnutí larev. Larvy prvních dvou stadií se živí bakteriemi, zatímco třetí, infekční stadium, již nepřijímá potravu. Přejít na vyšší stadium je vždy doprovázen svlečením kutikuly, přičemž larva 3. stadia si ponechává kutikulu předchozího stadia, která tvoří jakýsi ochranný plášť, který jí umožňuje přežití v nepříznivých podmínkách vnějšího prostředí. Larvy 1. a 2. stadia jsou poměrně zranitelné. Stejně jako pro líhnutí jsou pro jejich další vývoj nejdůležitějšími faktory teplota a vlhkost.

Při příliš vysokých teplotách dochází u larev k hyperaktivitě, což má za následek příliš rychlé vyčerpání energetických zásob. Za takových podmínek dosáhne infekčního stadia jen malé množství larev. Naopak při nižší teplotě dochází ke zpomalení vývoje a při teplotě nižší než 10 °C dojde většinou k jeho zastavení (Taylor et al., 2016). Nároky preinfekčních stadií na teplotu se mezi druhy výrazně liší. Zatímco optimum pro exogenní vývoj *Haemonchus contortus* je 25 – 36 °C (O'Connor et al., 2006), larvy druhu *Teladorsagia circumcincta* jsou schopny v subarktickém podnebném pásu dokončit vývojový cyklus na pastvině i během zimy (Waller et al., 2004; Mäntöniemi et al., 2014). Vlhkost prostředí jednak zabraňuje vyschnutí larev a zároveň umožňuje jejich migraci na vegetaci. Infekční larvy třetího stadia již dokáží mnohem lépe odolávat oběma teplotním extrémům a rovněž desikaci. K infekci hostitele dochází pozřením L<sub>3</sub> společně s vegetací. Pro zvýšení pravděpodobnosti ingesce hostitelem dochází na pastvě k horizontální disperzi infekčních larev. Po pozření hostitelem larvy odhazují zadržovanou kutikulu L<sub>2</sub> stadia a pronikají do sliznice v predilekční části GI traktu, kde následně prodělávají dva svleky. Tato fáze trvá několik dní a liší se mezi druhy. Například u *O. leptopicularis* se dospělci objevují v lumen slezu přibližně pět dní po experimentální infekci (Hertzberg et al., 2000). Oproti tomu u larev *M. marschalli* tento proces vyžaduje osmnáct a v případě *O. ostertagi* dokonce 21 dní (Fox et al., 1987; Taylor et al., 2016). Histotropní fáze vývoje může být značně prodloužena, neboť u řady druhů trichostrongylidních hlístic dochází v těle hostitele k pozastavení vývoje ve čtvrtém, případně třetím larválním stadiu (Sargison et al., 2007). Tento jev se označuje jako hypobióza a zpravidla se objevuje pouze u části infrapopulace daného parazita, které umožňuje přežít nepříznivé období (chladné zimy, období sucha) při minimální metabolické aktivitě (Gibbs, 1986; Belem et al., 1993). K pokračování vývoje do dospělosti a produkci vajíček poté dochází v období příznivém pro exogenní vývoj nové generace larev (následující jaro). Parazit tak zároveň může synchronizovat vlastní vývojový cyklus s reprodukčním cyklem hostitele tak, aby největší produkce vajíček připadla na období, kdy je na pastvině dostupné množství neimunizovaných hostitelů (Gibbs, 1986). V další fázi vývoje je jedním z rozhodujících faktorů schopnost parazita kontaminovat

prostředí svými propagačními stadii. Biotický potenciál trichostrongylidních hlístic se značně liší mezi jednotlivými druhy. Zatímco například samice *H. contortus* produkují řádově tisíce vajíček, u zástupců podčeledi Ostertagiinae jsou to spíše stovky (Waler et al., 2005; Sargison et al., 2007). Populační dynamika parazita a jeho schopnost šíření mezi sylvatickými hostiteli je ovlivněna jednak faktory prostředí, ale také biologickými faktory (Kołodziej-Sobocińska, 2019).

Jak bylo popsáno výše, trichostrongylidní hlístice, včetně *A. sidemi*, prodělávají přímý vývoj zahrnující volně žijící stadia. To činí dynamiku infekce těmito parazity silně závislou na sezónních změnách teploty a vlhkosti. V mírném podnebném pásu, kde dochází ke střídání ročních období, vykazují populace GI hlístic u jelenovitých žijících hostitelů obvykle nižší intenzity infekce během zimního období (Drózdž et al., 1992; 1993). Sezónní dynamika hlístic slezu může být v některých případech ovlivněna krajinným managementem. Například autoři Santín-Durán et al. (2008) pozorovali u jelenů na lokalitě v centrálním Španělsku dva vrcholy intenzity infekce hlísticemi slezu. Kromě typického vrcholu během období vyšších srážek byl pozorován druhý vrchol během období sucha způsobený pravděpodobně umělým zavlažováním. Znalost sezónní dynamiky je nezbytná pro správné načasování aplikace léčiv a zavedení preventivních opatření tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší účinnosti a zároveň bylo sníženo riziko vzniku rezistence. Zatímco sezónní dynamice hlístic parazitujících u domestikovaných přežvýkavců se věnuje řada studií (Waller et al., 1981; Sweeny et al., 2022), pro parazity volně žijících přežvýkavců existuje v tomto ohledu jen málo informací.

Sezónní dynamika se u jelenovitých může lišit mezi různými věkovými skupinami a rovněž mezi pohlavími v závislosti na behaviorálních rozdílech a různé účinnosti imunitního systému (Santín-Durán et al., 2008; Body et al., 2011). Dalším důležitým faktorem pro šíření parazita mohou být parametry hostitelské populace jako je denzita a genetické předpoklady pro vnímavost k infekci (Radwan et al., 2010). V neposlední řadě je třeba vzít v úvahu behaviorální faktory konkrétního druhu hostitele, které mohou mít negativní vliv na intenzitu infekce v populaci, jako je například tvorba zimních stád a agregace kolem krmných stanovišť (Kołodziej-Sobocińska et al., 2016a), nebo migrační chování některých druhů jelenovitých, které může pomáhat šíření parazita na značné vzdálenosti (Drózdž et al., 2003; Demiaszkiewicz et al., 2013).

Dosavadní omezené informace o sezónní dynamice *A. sidemi* byly získány v klimaticky odlišném prostředí Bukovských vrchů a ruského Dálného východu, navíc u hostitelů, kteří nejsou typičtí pro ČR (Ovcharenko, 1968; Drózdž, 2003). K infekci *A. sidemi*

dochází podle Drózdž et al. (2000) od června do září, kdy infrapopulaci parazita tvoří převážně dospělci. Naopak v zimních měsících zjistili Ovcharenko (1968) u jelena siky a Drózdž et al. (2003) u zebra evropského pouze larvální a juvenilní stadia. Tyto výsledky naznačovaly, že *A. sidemi* přečkává zimní období ve formě hypobiózních larev. Oproti tomu, během helmintologické pitvy dvou jedinců zebra evropského a dvou jedinců jelena evropského z obory Židlov během zimy 2016, bylo nalezeno značné množství dospělých hlístic *A. sidemi* a pouze několik larválních stadií (Vadlejch et al., 2017).

## 4 CÍLE A HYPOTÉZY

Obecným cílem bylo definovat současné rozšíření invazního parazita *Ashworthius sidemi* u jelenovitých na území ČR, zlepšit diagnostické metody ashworthiózy, získat nové poznatky o patogenním působení invazního parazita a definovat sezónní charakteristiky ashworthiózy v aktuálních klimatických podmínkách ČR.

### 4.1 Diagnosika ashworthiózy

Předpokladem bylo, že tradiční koprologické metody nejsou dostatečně citlivé pro detekci a kvantifikaci infekce vyvolané hlísticí *Ashworthius sidemi*. Jedním z cílů této disertační práce proto bylo vyvinout citlivou a spolehlivou metodu umožňující detekci *A. sidemi* a odlišení tohoto parazita od morfologicky podobného druhu *H. contortus*.

**Hypotéza 1a:** Tradiční koprologické metody mohou při diagnostice ashworthiózy poskytovat falešně negativní výsledek.

**Hypotéza 1b:** Pomocí vysokorozlišovací analýzy křivek tání (HRMA) lze spolehlivě identifikovat hlístici *A. sidemi*.

### 4.2 Patologie

Cílem v této části disertační práci bylo vyhodnocení patologických změn ve slezu jelenovitých způsobených trichostrongylidními hlísticemi se zvláštním zaměřením na invazní druh *A. sidemi*. Dílčími cíli bylo: definovat makroskopicky viditelné léze na sliznici slezu jelenovitých infikovaných *A. sidemi* a charakterizovat histologické a histochemické změny na parazitované tkáni.

**Hypotéza 2a:** Infekce invazní hlísticí *A. sidemi* je pro jelenovité hostitele silně patogenní.

**Hypotéza 2b:** Ashworthióza ve slezu jelenovitých způsobuje sníženou sekreci mucinu.



## 4.3 Epizootologie ashworthiózy

Cílem této části disertační práce bylo vyhodnotit faktory, které ovlivňují abundanci invazní hlístice *A. sidemi* u jelenovitých a zjistit průběh sezónní dynamiky ashworthiózy v aktuálním klimatických podmínkách ČR.

**Hypotéza 3a:** Sezónní dynamika ashworthiózy u jelenovitých je v aktuálních klimatických podmínkách ČR odlišná od průběhu infekce pozorované v minulosti v Polsku a na Ruském Dálném východě.

**Hypotéza 3b:** Hypobióza není v aktuálních klimatických podmínkách ČR významnou strategií *A. sidemi* pro přežití zimního období.

# 5 METODY ZPRACOVÁNÍ

## 5.1 Monitoring *A. sidemi*

### 5.1.1 Biologický materiál

Získávání biologického materiálu probíhalo mezi lety 2016 – 2019 v honitbách a oborách na území České republiky. Celkem byly získány GI trakty ze 104 jedinců náležících k pěti různým druhům jelenovitých. Jednalo se o původní druhy, jako je srnec obecný (n=40), daněk obecný (n=31), jelen evropský (n=20), ale byl získán materiál i z nepůvodních druhů jako je jelen sika (n=10) nebo jelenec běloocasý (n=2). Všichni studovaní jedinci byli uloveni v souladu se zákonem o myslivosti 449/2001 Sb. a v době lovu pro příslušný druh stanoveného aktuální vyhláškou. Dodatečně byl získán slez z jedince losa evropského, který byl usmrcen během srážky s automobilem. Každý takto získaný trakt byl opatřen informacemi o věku, a pohlaví zvířete. Stáří zvířete bylo odhadnuto na základě opotřebení zubů a u samců na základě stupně vývoje paroží (Mysterud a Østbye, 2006, Veiberg et al., 2020). Na základě dat získaných z Českého hydrometeorologického ústavu byla na lokalitě v době odstřelu vždy stanovena průměrná teplota vzduchu. Získané GI trakty byly v co nejkratší době po odstřelu dopravovány do laboratoře na ČZU pro další zpracování.

### 5.1.2 Parazitologická pitva

Slezy byly podrobeny orgánové parazitologické pitvě podle standardní metody (Wood et al., 1995). Nejprve byly slezy odděleny od zbytku GI traktu pomocí peánů tak, aby nedošlo k vytečení obsahu a následně odstřiženy. Všechny slezy byly rozstřiženy podél velkého zakřivení a jejich obsah byl proudem vody vypláchnut do připravených věder. Získaný obsah byl přecezen přes laboratorní síto o velikosti otvorů 200  $\mu\text{m}$  a protékající tekutina následně přes jemnější síto (150  $\mu\text{m}$ ), aby byla zachycena všechna vývojová stadia, včetně juvenilních jedinců a larev. Takto získaný materiál byl jemným proudem vody vypláchnut na kontrastně zbarvené tácy. Jednotlivá stadia hlístic byla převáděna do fyziologického roztoku a po očištění fixována v 70% ethanolu.

Pro získání uceleného přehledu o velikosti infrapopulace hlístic v jednotlivých hostitelích a míře uplatnění hypobiózy bylo nutné získat rovněž larvy v histotropní fázi vývoje, které jsou zanořené ve sliznici slezu. Za tímto účelem byla použita metoda podle Hansen a Perry (1994). Sliznice slezu byla po vypláchnutí obsahu orgánu rozprostřena do lázně teplého fyziologického roztoku tak, aby sliznice směřovala vnitřní stranou dolů a celá její plocha byla ponořena v roztoku. Slez byl přes noc ponechán v inkubátoru při teplotě 22 °C. Následující den byla sliznice důkladně propláchnuta a zachycená tekutina společně s tekutinou z tácu byla přecezena přes síto o velikosti otvorů 32 μm. Zachycený materiál byl dekantován v konických nádobách a získaný sediment byl fixován v 70% ethanolu pro pozdější mikroskopické vyšetření.

### **5.1.3 Determinace hlístic**

Před samotnou determinací byly pitevně získané hlístice prosvětlovány pomocí roztoku fenolu a etanolu (80 dílů fenolů na 20 dílů 96% etanolu), aby bylo možné sledovat charakteristické morfologické znaky. K determinaci byl použit mikroskop Olympus BX51 opatřený kamerou Promicam 3-3CP Sony Pregius a zobrazovací software QuickPHOTO MICRO 3.0.

Hlístice z čeledi Haemonchiinae byly určeny do druhu s využitím determinačních klíčů a publikací (Lichtenfels, 1994; Lehrter et al., 2016). V případě, že bylo zachyceno méně, než sto hlístic byli determinováni všichni samci. Pokud počet přesahoval 100, bylo v každém případě určeno minimálně 10 % hlístic z podčeledi Haemonchiinae. Všichni nalezení samci z podčeledi Ostertagiinae byli determinováni na úrovni morfotypu podle Drózdž (1995). Samice hlístic z podčeledi Ostertagiinae byly vzhledem k mimořádné náročnosti jejich determinace a nízké spolehlivosti určení na základě morfologických znaků sloučeny do jedné skupiny. Ze stejného důvodu byly všechny larvy získané z rozvolněných sliznic označeny, jako L4 bez bližší morfologické determinace.

### **5.1.4 Charakteristiky infekce**

Pro popis infekce byly použity parametry podle (Bush, 1997). Prevalence jako podíl infikovaných jedinců určitého druhu konkrétním druhem parazita z celkového počtu

vyšetřených jedinců vyjádřený v procentech. Abundance jako počet parazita určitého druhu hostiteli, a biodiverzita vyjádřená jako počet jednotlivých druhů parazitů v určitém druhu hostitele. Pro všechny kvantitativní deskriptory byl zjištěn 95% konfidenční interval.

## 5.1 Diagnostika

Pro posouzení účinnosti běžně užívaných flotačních metod byly během pitvy přímo z rekta vyšetřovaných zvířat odebírány vzorky výkalů, které byly následně vyšetřeny koprologicky. Výsledky těchto vyšetření byly poté porovnávány se skutečným počtem dospělých hlístic nalezených ve slezu. Pro ověření zda existuje vztah mezi zjištěnými počty vajíček v 1g výkalů (EPG) a skutečným počtem dospělých jedinců *A. sidemi* ve slezu vyšetřovaných zvířat byl použit Spearmanův korelační test, provedený v programu R 4.0. Tímto způsobem byla testována modifikovaná Cornell-Wisconsinova metoda (Egwand a Slocombe, 1982) využívaná pro vysokou analytickou citlivost (1 EPG) a Koncentrovaná McMasterova metoda (Roepstorff a Nansen, 1998), umožňující kvantifikaci infekce. Pro obě metody byl použit flotační roztok připravený ze směsi glukózy a chloridu sodného o finální relativní hustotě 1,28 g . cm<sup>-3</sup>.

### 5.1.1 qPCR-HRM

Molekulární analýze bylo podrobena 45 dospělých jedinců *A. sidemi* a *H. contortus* identifikovaných na základě morfologických znaků a morfometrických charakteristik. Jednalo se o dvacet samců a 15 samic od každého druhu. Aby bylo dosaženo co nejvyšší pravděpodobnosti odhalení potenciální vnitrodruhové variability, byli tito jedinci získáváni z širokého spektra hostitelů, zahrnujícího původní (jelen evropský, srnec obecný) a introdukované druhy jelenovitých (daněk obecný, jelen sika) a vzácné druhy, jako jsou los evropský nebo zubr evropský. Jedinci druhu *H. contortus* byli získáni ze slezu muflonů, koz bezoárových, jelence běloocasého, ovce a kozy domácí. Hostitelé pocházeli z různých lokalit napříč ČR (příloha 1).

Pro otestování účinnosti metody pro larvální stadia byly kultivovány infekční larvy (L3) *H. contortus*. Pro tyto účely byly použity výkaly ovcí uměle infikované *H. contortus*, které byly inkubovány při teplotě 27 °C po dobu sedmi dnů. Vykultivované larvy byly z koprokultury separovány Baermanovou metodou a do zpracování uchovány v kohoutkové vodě při teplotě 4 °C.

### 5.1.1.1 Izolace DNA

Genomová DNA byla izolována podle upraveného protokolu (Reslová et al., 2017). Hlístice byly homogenizovány v 50 µl extrakčního pufru (100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 1,5 mM dithiothreitol) obsahujícího 0,06 mg proteinázy K. Lýza proběhla v termomixeru zapnutém přes noc při teplotě 55 °C a při 300 otáčkách za minutu. K lyzátu byly přidány 3 M acetátu sodného (1/3 objemu lyzátu), a následně 5 µl (20 mg/ml) glykogenu spolu s isopropanolem (2/3 objemu lyzátu). Vzorky byly krátce vortexovány a inkubovány při -80 °C po dobu třiceti minut pro urychlení srážení DNA. Po dvouminutové centrifugaci při 14 000 g byla opatrně odstraněna vodní frakce. Peleta obsahující gDNA byla vymyta 200 µl 70% etanolu za účelem odstranění zbytků solí bez jejího porušení. Poté proběhla další centrifugace po dobu dvou minut při 14 000 g a poté byl odstraněn supernatant. Nakonec byla peleta DNA vysušena a disociována v 25 µl vody. Všechny vzorky byly uloženy při -20 °C do dalšího zpracování.

gDNA larev (n=10) byla extrahována podle stejného protokolu, jako u dospělců, přičemž celkový objem extrakce byl redukován na 30 µl. Vzhledem k odolné kutikule larev třetího stadia byl do procesu lýzy tkání přidán krok opakovaného mrazení při teplotě -80 °C a rozmrazování (99 °C), přičemž výtěžnost DNA zůstala nezměněna. Koncentrace, celkový výtěžek a čistota extrahované gDNA byly měřeny Spektrofotometrem NanoDrop 8000

### 5.1.1.2 Navržení primeru pro qPCR-HRM a validace

Pro diferenciaci *H. contortus* a *A. sidemi* parazitující u přežvýkavců na území ČR byla použita dvojice univerzálních primerů 5'-GCA ATT CGT GGT AAA TAA CGCAG-3' a 5'-GGG TGT ATT GCT AWA ATA CTG CCT C-3' cílicí na sekvence ITS-1. Tyto primery byly navrženy podle dostupných sekvencí (GenBank) pro *H. contortus* (AB908961.1) a *A. sidemi* (EF467325.1).

Pro diferenciaci *H. contortus* a *A. sidemi* parazitující u přežvýkavců na území ČR byla použita dvojice univerzálních primerů 5'-GCA ATT CGT GGT AAA TAA CGCAG-3' a 5'-GGG TGT ATT GCT AWA ATA CTG CCT C-3' cílicí na sekvence ITS-1. Tyto primery byly navrženy podle dostupných sekvencí (GenBank) pro *H. contortus* (AB908961.1) a *A. sidemi* (EF467325.1).

Pro získání primerů vymezení sekvence s dostatečnou mezidruhovou variabilitou a naopak co největší vnitrodruhovou uniformitou byl použit software BLAST. Specifita primeru byla ověřena experimentálně použitím analýzy qPCR-HRM na spektru příbuzných druhů hlístic parazitujících v GI traktu přežvýkavců zahrnujícím druhy *T. circumcincta*, *T. colubriformis*, *Nematodirus battus*, *Cooperia curticei*, *Chabertia ovina* a *Oesophagostomum venulosum*.

### 5.1.1.3 qPCR a HRM

Jako templát pro qPCR byla použita izolovaná gDNA. Následně byla aplikována HRM analýza pomocí termocykleru C1000 opatřeným optickým modulem CFX96. Postup a podmínky reakce byly nastaveny podle protokolu Reslové et al. (2017). qPCR proběhla v reakční směsi Kapa HRM Fast Master Mix (Kapa Biosystems). Tato směs obsahovala 2,5 mM Barviva Eva Green, MgCl<sub>2</sub>, primery (každý 250nM) a 50ng DNA. Celá směs byla ředěna vodou na celkový objem 20  $\mu$ l. qPCR probíhala v následujících krocích: iniciální denaturace při 95 °C po dobu tří minut následovaná čtyřiceti pěti cykly denurací při 95 °C po dobu pěti vteřin. Annealing a extenze probíhala za teploty 57 °C po dobu čtyřiceti sekund a na závěr proběhlo ochlazení na 40 °C po dobu třiceti sekund.

Po qPCR byl amplicon disociován ve stejném termocykleru. Teplotní rozsah byl nastaven na 70 – 87 °C s nárůstem o 0.2 °C každých deset vteřin. Všechny vzorky byly testovány v duplikátu. Teploty tání vzorků byly vyhodnocovány pomocí softwaru CFX Manager 3.0 (Bio-Rad Laboratories). Hrubá data reprezentovaná křivkami byla pomocí matematické konverze (Palais a Wittwer, 2009) normalizována pro dosažení relativních hodnot v rozsahu 100 až 0 %. Fluorescenční signály před a po teplotě tání byly nastaveny na 71 – 73°C a 83 – 58°C. Následně byly vytvořeny grafy pro vyjádření křivek tání. Jako referenční hodnota byl stanoven na základě normalizovaných dat získaných ze samčích jedinců *A. sidemi* stanoven medián. S touto hodnotou byly porovnávány hodnoty vzorků získaných na dospělých samicích a larvách. Pro ověření správného určení druhů hlístic na základě morfologicko-morfometrických charakteristik byly sekvence použité pro qPCR-HRM osekvenovány a porovnány s příslušnými sekvencemi v databázi GenBank.

## 5.2 Patologické vyšetření

Patologickému vyšetření bylo podrobeno 21 slezů získaných během let 2017 a 2018 z dospělých jedinců jelenovitých infikovaných hlístic *A. sidemi*. Celkem šlo o pět jelenů evropských, pět jelenů sika, pět srnců obecných, pět daňků evropských a jednoho losa evropského. Po prokázání přítomnosti *A. sidemi* byly sliznice prohlédnuty makroskopicky. Viditelné léze byly měřeny a fotograficky zdokumentovány. Následně byly ze záhybů fundu odebírány vzorky tkáně o velikosti 1×1cm. První vzorek byl vždy odebrán z oblasti s patrnými projevy působení hematofágních hlístic (hemoragické léze) a druhý (kontrolní) z oblasti bez makroskopicky viditelného poškození. Všechny získané vzorky byly fixovány 10% pufovaným formalínem a odeslány na specializované histopatologické pracoviště. Zde byly vzorky zpracovány tkáňovým procesorem Leica ASP6025 a v automatické lince Leica EG 1150H zalaty do parafinových bločků. Bločky byly krájeny na mikrotomu Leica RM2255 na plátky o tloušťce 2 – 5 μm a poté barveny třemi histochemickými barvivy: hematoxylin eosinem (HE) pro základní přehled o histopatologických změnách, roztokem PAS (periodic acid-Schif), pro detekci celkových mucinů a Alcianovou modří (ALC) pro detekci kyselých mucinů. Pro odhalení případné fibrotizace tkáně byl použit Massonův trichrom (TRI), který ve tkáni rozlišuje kolagenní vlákna. Z takto barvených řezů byly připraveny trvalé preparáty. Pro ucelený přehled o infropopulaci parazitů byly zbylé sliznice inkubovány ve fyziologickém roztoku pro získání larválních stadií (viz kapitola 4.1.2).

## 5.3 Epizologie

### 5.3.1 Vliv faktorů hostitele a prostředí na abundanci

Po posouzení vlivu vnitřních a vnějších faktorů na abundanci *A. sidemi* byly použity výsledky pitev vyšetřovaných zvířat (kapitola 3.1.1). Na základě odhadnutého věku byla jednotlivá zvířata rozdělena do tří skupin: 1) mláďata do jednoho roku (n=26), 2) roční a mladí jedinci (n=26) a 3) dospělci starší než tři roky (n=47). Podle průměrné měsíční teploty v době odstřelu zvířat byly vytvořeny tři kategorie: mrazivé měsíce (<0 °C, n=31), teplejší měsíce (0–5 °C, n=60) a teplé měsíce (5–16 °C, n=8). Abundance *A. sidemi* a druhů z podčeledi *Ostertagiinae* byly mezi jednotlivými skupinami (druh, teplota, věková kategorie, pohlaví) porovnávány neparametrickým Kruskal-Wallisovým testem.

Dále byl pomocí mnohonásobné lineární regrese odhadnut efekt jednotlivých faktorů prostředí (teplota, jako spojitá proměnná) a hostitele (druh, věk, pohlaví) na abundanci *A. sidemi* a hlístic z podčeledi Ostertagiinae. Pro dosažení normality rozdělení získaných dat byly hodnoty abundance *A. sidemi* a druhů z podčeledi Ostertagiinae sloučených do jedné skupiny logaritmovány. Model popisující závislost abundance na environmentálních a hostitelských faktorech byl vybrán na základě Akaikeho informačního kritéria s korekcí pro malé výběry (AICc). V případě že dva a více modelů splňovaly základní předpoklad  $\Delta AICc < 2$ , byl vybrán nejjednodušší model podle (Burnham & Anderson, 2002). Normalita rozdělení reziduí byla testována pomocí Lillieforsova testu. Veškeré analýzy byly provedeny s využitím statistického programu R4.0. Pro vizualizaci dat byla použita rozšiřující funkce ggplot2.

### 5.3.2 Sezónní dynamika ashworthiózy

Jelikož legislativa ČR neumožňuje celoroční odstřel spárkaté zvěře ve volnosti a rovněž v oborách probíhá odstřel nejčastěji v době lovu daného druhu, nebylo možné získávat informace o sezónním výskytu *A. sidemi* pouze z pitevních nálezů. Pro zajištění dlouhodobého sledování sezónní dynamiky tohoto parazita byla proto na základě výsledků pitev vybrána obora s vysokou prevalencí (82,4 %) ashworthiózy, ze které byly od února 2018 do února 2020 kontinuálně získávány směsné vzorky výkalů pro koprokulturu. Ve vykultivované směsi larev byla pomocí qPCR metody prokazována přítomnost a intenzita *A. sidemi*.

Sběry byly opakovány v měsíčních intervalech, přičemž při každém byl získán přibližně 1 kg výkalů. Získaný materiál byl třením v ruce homogenizován a smíchán s dostatečným množstvím (3 – 4 polévkové lžice) vermikulitu. Po dosažení hrudkovité konzistence byla směs výkalů a vermikulitu v otevřených mikrotenových sáčcích umístěna do inkubátoru, kde byly kultivovány larvy při teplotě 27 °C po dobu 7 dní. Po skončení inkubace byla koprokultura převedena do Baermanova aparátu, kde došlo k uvolnění infekčních larev z fekálního materiálu a jejich zachycení. Po 24 hodinách byla tekutina obsahující larvy vypuštěna do konických nádob a dekantována při 4 °C. Sediment tvořený larvami byl následně pročištěn opakovanou Baermanizací a fixován 70% ethanolem. Vzorky získané od února do října 2018 byly zároveň vyšetřeny McMasterovou metodou.



Ze získaných larev byla izolována DNA (podkapitola 3.1.1.1), která byla následně použita, jako templát pro qPCR probíhající podle protokolu uvedeného v podkapitole 3.1.1.3. Získaná data byla zpracována softwarem CFX Manager 3.0.

Pro kvantifikaci amplifikovaného produktu byly použity relativní hodnoty kvantifikačních cyklů  $C_q$  vzorků získaných v jednotlivých měsících. Jako výchozí hodnota pro stanovení relativní  $C_q$  byla použita minimální hodnota  $C_{q_{min}}=100\%$  naopak maximální hodnota (40 cyklů= 0%) indikovala, že nedošlo k vytvoření produktu amplifikace.

## 6 VÝSLEDKY

### 6.1 Výsledky monitoringu

Parazitické hlístice byly identifikovány u 92 % vyšetřených jelenovitých. Prevalence detekovaných druhů parazitů je uvedena v tabulce č. 1. Medián celkové abundance byl 95 jedinců (95% KI = 56 – 143,). Celkem bylo zachyceno téměř 27 000 hlístic náležících do 8 druhů.

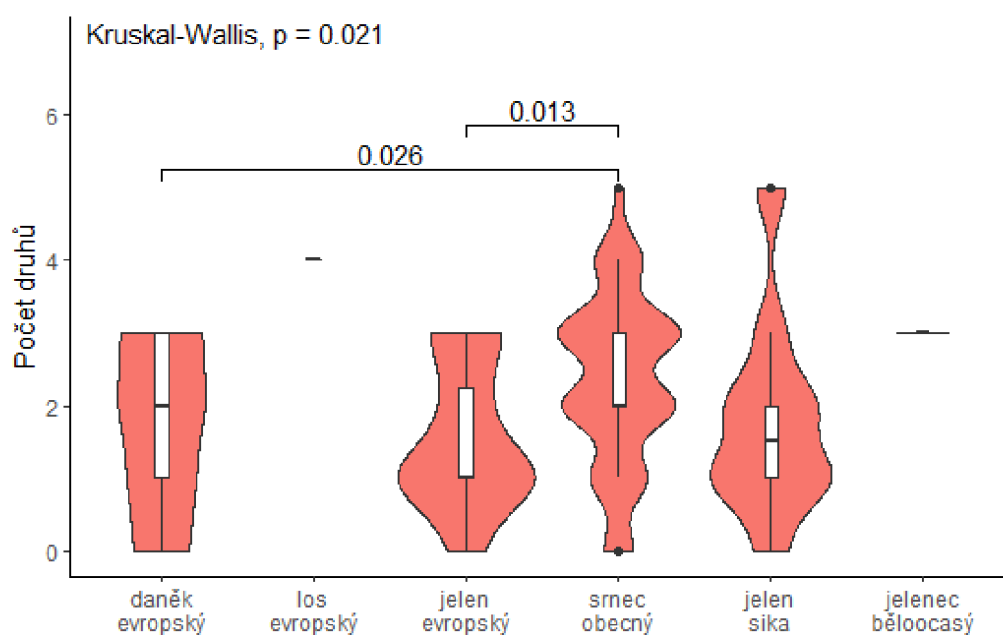
*Tabulka 1 Prevalence hlístic zachycených ve slezu hlavních vyšetřovaných druhů jelenovitých během let 2016 a 2019*

Druhy hlístic	Hostitelé			
	Smec obecný (n=40)	Jelen evropský (n=20)	Daněk evropský (n=31)	Jelen sika (n=10)
	Prevalence % (KI) *	Prevalence % (KI)*	Prevalence % (KI) *	Prevalence % (KI) *
Celková prevalence hlístic	98 (85–99)	95 (73–99)	83 (66–94)	99 (54–99)
<i>Ashworthius sidemi</i>	75 (60–80)	65 (43–82)	74 (57–87)	80 (48–95)
<i>Haemonchus contortus</i>	12 (5–26)	–	–	–
<i>Ostertagia leptospicularis/kolchida</i>	73 (57–84)	40 (22–61)	48 (32–65)	10 (0.2–45)
<i>Spiculoptera</i>	45 (35–60)	40 (22–61)	3 (0.8–17)	30 (10–60)
<i>spiculoptera/mathevossiani</i>				
<i>Spiculoptera. asymmetrica</i>	10 (3–20)	5 (0.1–25)	39 (24–56)	20 (5–52)
<i>Spiculoptera. houdemeri</i>	20 (10–35)	5 (0.1–25)	3 (0.8–17)	40 (17–69)

\*KI= horní a dolní mez 95% konfidenčního intervalu.

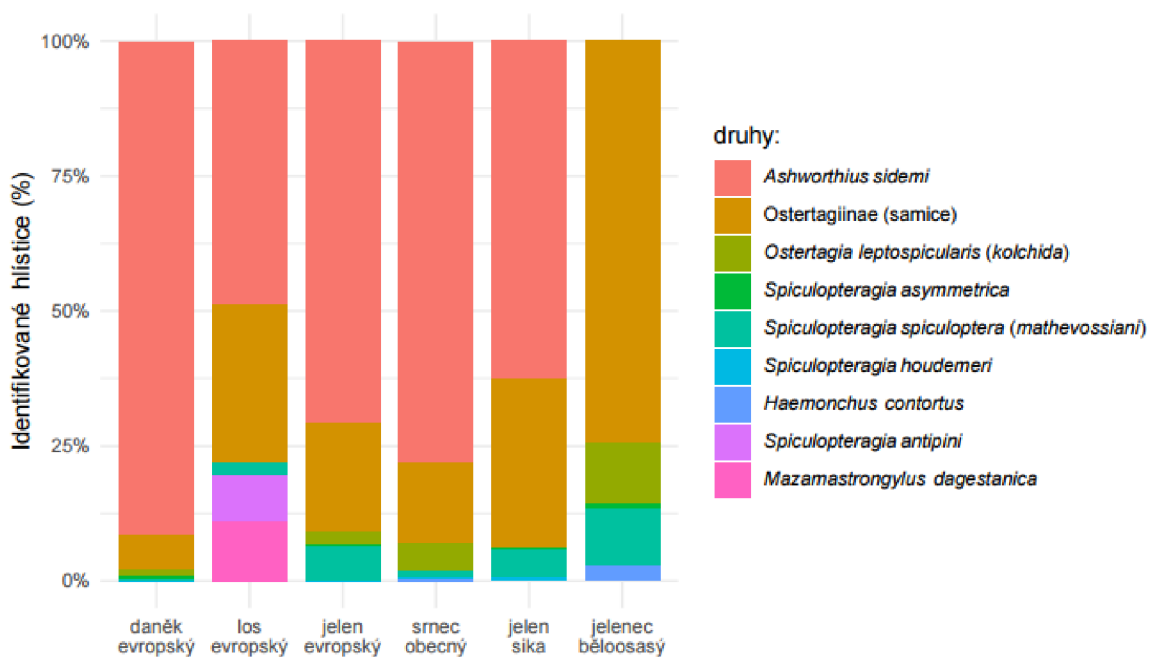
Larvy čtvrtého stadia byly zachyceny pouze v sedmi procentech případů ( 95% KI = 3 – 13), přičemž dosahovaly počtů od jednoho do 26 jedinců. Většina vyšetřených slezů byla parazitována jedním (27 jedinců ), dvěma (27 jedinců) nebo třemi (30 jedinců) druhy parazitických hlístic. Druhové bohatství v průběhu roku významně kolísalo ( $p=0,04$ ). Zvířata ulovená během teplejších měsíců 5 – 16 °C byla infikována větším množstvím druhů, než jedinci ulovení v zimě. Nejvyšší počet druhů hlístic byl zjištěn u srnce obecného, který se v tomto faktoru významně lišil od ostatních hostitelů (graf 1).

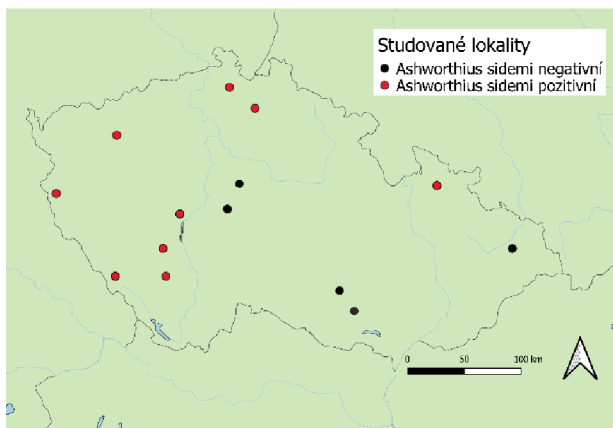
**Graf 1:** diverzita druhů hlístic parazitujících ve slezu vyšetřovaných hostitelů.



*Ashworthius sidemi* byl zjištěn ve slezu 72 % (95% KI = 63 – 80), přičemž tvořil 80 % ze všech zjištěných druhů hlístic. Celkem bylo zachyceno 21 646 jedinců této hlístice. U běžně se vyskytujících druhů jelenovitých, jako je srnec obecný, jelen evropský, daněk evropský, nebo jelen sika tento parazit tvořil dominantní složku helmintofauny slezu (graf 2).

**Graf 2:** Procentuální zastoupení druhů hlístic identifikovaných u jelenovitých v ČR. (názvy v závorkách označují minoritní morfotypy).





Obrázek 4 mapa lokalit zjištěného výskytu *A. sidemi*

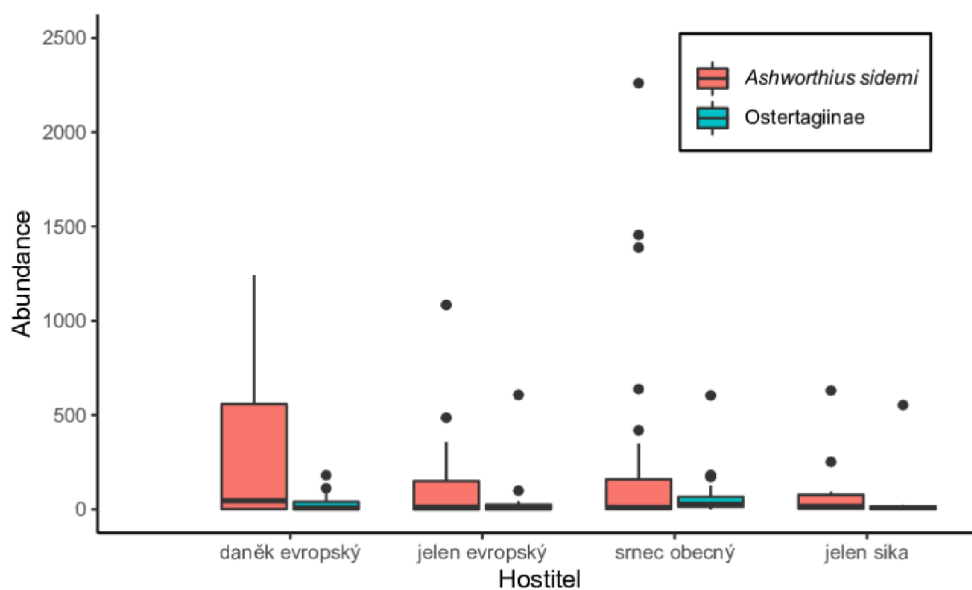
Přítomnost *A. sidemi* byla potvrzena na devíti ze 14 sledovaných lokalit. Medián abundance tohoto parazita byl 19 jedinců (95% KI = 6 – 60), přičemž maximální intenzita (2 260 jedinců) byla pozorována u tříleté samice srnce obecného. Infrapopulace *A. sidemi* sestávala převážně z dospělých jedinců.

Juvenilní jedinci se vyskytovali u 16 % (95% KI = 10 – 25) vyšetřených zvířat a jejich počty byly v rozsahu od jednoho do 81 jedinců. Abundance *A. sidemi* u jednotlivých vyšetřovaných druhů znázorňuje graf 3.

U 6 % (95% KI = 2 – 13) vyšetřených zvířat byl zjištěn *H. contortus*, avšak smíšená infekce *A. sidemi* a *H. contortus* během této studie nebyla pozorována. Nejčastěji zachycenými parazity byli zástupci podčeledi Ostertagiinae (77% prevalence, 95% KI = 67 – 84). Abundance těchto parazitů se pohybovaly v rozpětí od jednoho do 607 dospělců. Medián abundance byl 19 jedinců (95% KI = 11 – 25) *Ostertagia leptospicularis* spolu s minoritním morfotypem *O. kolchida* byl nejčastěji identifikovaný druh z podčeledi Ostertagiinae. V této studii byl zjištěn u 52 % vyšetřených jelenovitých (95% KI = 43 – 63) následován druhem *Spiculopteragia spiculoptera*/*S. mathevossiani*, jehož prevalence dosahovala 32 % (95% KI = 23 – 42).

Tyto druhy byly časté především u srnců a jelenů, zatímco *Spiculopteragia asymmetrica*, jejíž celová prevalence byla 19 % (95% KI = 12 – 28), byla častější u jelenů sika a daňků (Tabulka 1). *Spiculopteragia houdemeri* parazitovala ve slezu jelenů evropských, srnců, daňků a jelenů sika s celkovou prevalencí 13 % (95% KI = 8 – 21). Minoritní morfotypy druhů *S. asymmetrica* a *S. houdemeri*: *Spiculopteragia quadrispiculata* a *Spiculopteragia andreevae* nebyly během tohoto vyšetření detekovány.

**Graf 3:** Abundance *A. sidemi* a zástupců podčeledi *Ostertagiinae* zjištěné u jednotlivých druhů jelenovitých.



## 6.2 Dianostické metody, výsledky qPCr-HRM

### 6.2.1 Koprologické vyšetření vs. pitvy

V průběhu zimního období 2017/2018 byly u vyšetřované zvěře pitevně prokázány relativně vysoké intenzity infekce dospělými stadii *A. sidemi*, přičemž vždy více než polovinu dospělé infrapopulace tvořily samice s plně vyvinutou pohlavní soustavou. Navzdory tomu obě testované flotační metody detekovaly jen velmi nízkou nebo dokonce nulovou intenzitu infekce (Tabulka 2). Přestože byla v ovariích pozorovaných samic mikroskopicky prokázána přítomnost vajíček, nedocházelo pravděpodobně k jejich uvolňování v takové míře, aby je použitými metodami bylo možné zachytit. Mezi hodnotami EPG poskytovanými McMasterovou a Cornell-Wisconsin metodou a intenzitou infekce nebyla zjištěna korelace ( $p > 0,1$ ).

**Tabulka 2:** Porovnání výsledků koprologického vyšetření a výsledků pitev jelenovitých, infikovaných *A. sidemi* během podzimu a zimy 2017/2018

Měsíc	Hostitel	McMaster (EPG)	Cornell-Wisconsin (EPG)	Intenzita infekce <i>A. sidemi</i>
X.	Daněk	0	0	4
X.	Daněk	0	27	26
XII.	Srnec	20	1	26
XII.	Jelen sika	0	0	242
XII.	Jelen sika	0	0	3
XII.	Jelen sika	0	0	26
XII.	Jelen sika	0	0	17
XII.	Daněk	0	0	926
XII.	Daněk	120	30	970
XII.	Daněk	20	7	743
XII.	Daněk	0	0	3
XII.	Daněk	60	0	6
XII.	Daněk	40	0	29
I.	Jelen sika	0	0	92
II.	Jelen sika	40	0	582
II.	Jelen sika	0	0	16

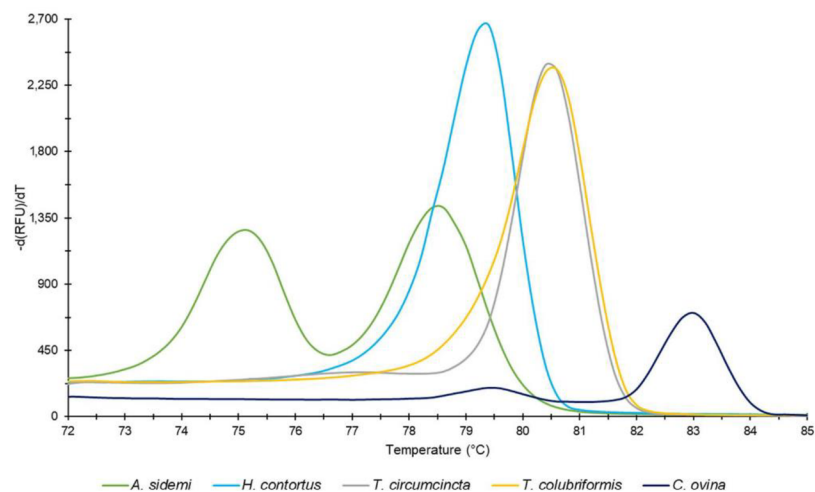
## 6.2.2 Výsledky qPCR-HRM

Pro sekvence *A. sidemi* byly na výstupních grafech zobrazujících křivky tání patrné dva specifické vrcholy denaturace při teplotě 75,1 °C a při 78,6 °C. Pro *H. contortus* vykazovala křivka T<sub>m</sub> jeden specifický vrchol při 79,3 °C. Specifita použitých primerů byla následně ověřena qPCR-HRM analýzou genomové DNA izolované z různých druhů příbuzných gastrointestinálních hlístic přežvýkavců.

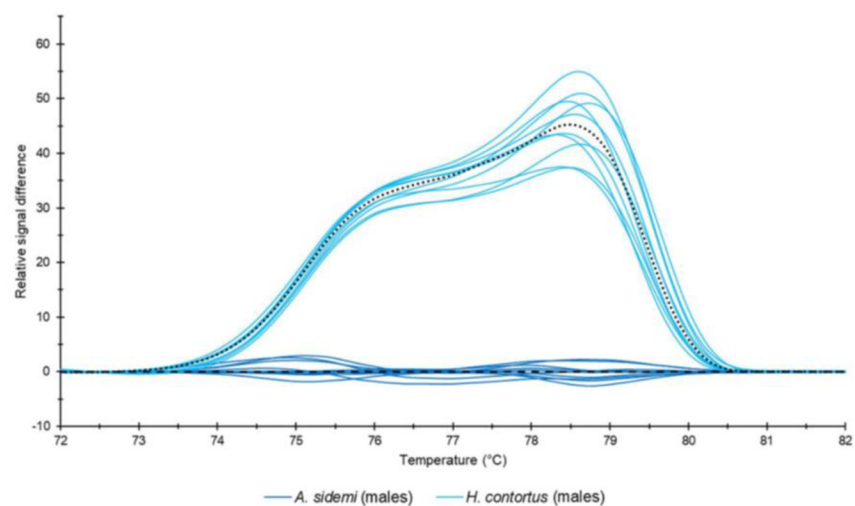
V případě druhů *Nematodirus batus*, *Cooperia curticei* a *Oesophagostomum venulosum* nedošlo k tvorbě produktu. U druhů *T. circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis* a

*Chabertia ovina* došlo k navázání primerů, teplota tání výsledných produktů však byla odlišná, než u *A. sidemi* a *H. contortus*. (graf 4). Na základě průběhu křivek značících slábnutí fluorescenčního signálu při rostoucí teplotě byly oba sledované druhy, *A. sidemi* a *H. contortus* jednoznačně rozlišeny. Pro názornější zobrazení byla data získaná od *A. sidemi* a *H. contortus* prezentována jako relativní změna signálu (graf 5).

**Graf 4:** vrcholy teploty tání ( $T_m$ ) produktů qPCR: *A. sidemi* ( $T_m$ : 75.1 °C; 78.6 °C), *H. contortus* ( $T_m$ : 79.3 °C), *T. circumcincta* ( $T_m$ : 80.5 °C), *T. colubriformis* ( $T_m$ : 80.6 °C), a *C. ovina* ( $T_m$ : 83.0 °C).



**Graf 5:** Porovnání relativní změny signálu při denaturaci amplikonů *A. sidemi* a *H. contortus* (přerušované křivky značí medián).



Výsledný produkt amplifikace fragmentů ITS-1 obsahoval 290 párů bází pro *A. sidemi* a 281 párů bází pro *H. contortus*. Sekvenování produktů získaných od všech jedinců *A. sidemi* poskytlo identické sekvence.

Ve všech těchto vzorcích byl zachován heterozygotní genotyp A/G na pozici 142, což odpovídalo příslušné sekvenci v databázi GenBank (EF467325). Rovněž vzorky *H. contortus* poskytly identické sekvence odpovídající sekvenci AB908961.1. Výsledky sekvenování potvrdily genetickou konformitu uvnitř obou druhů a relevantní rozdíl mezi nimi, což silně podporovalo předpoklad druhové specifity křivek získaných z HRMA. Tato metoda byla aplikována rovněž na samice a larvy *H. contortus*, přičemž křivky všech analyzovaných vzorků odpovídaly referenčním křivkám samčích vzorků.

## 6.3 Výsledky patologického vyšetření

### 6.3.1 Parazitární zátěž

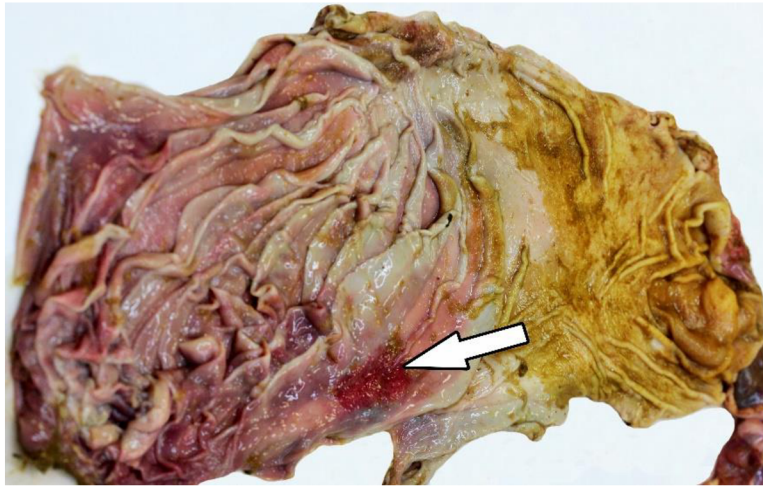
*Ashworthius sidemi* tvořil 96 % hlístic nalezených ve slezech u kterých byly sledovány patologické změny, přičemž intenzita infekce dosahovala hodnot mezi dvěma a 2 300 jedinci. V převážné většině se jednalo o plně vyvinuté dospělé. V osmi slezech byli zjištěni juvenilní jedinci s maximální intenzitou 73 jedinců. Ve většině vyšetřovaných slezů (87 %) byly rovněž zjištěni zástupci podčeledi Ostertagiinae v maximální intenzitě infekce 100 jedinců. V převážné většině se jednalo o druhy z rodů *Ostertagia* a *Spiculopteragia*, pouze u losa evropského byl nalezen druh *Mazamastronylus dagestanica*. Larvy čtvrtého stadia byly získány pouze ze dvou vyšetřených sliznic, přičemž jejich počty byly zanedbatelné. Deset larev odpovídajících podle popisu autorů Drózd et al. (2000) druhu *A. siemi*, bylo zjištěno u jednoho daňka. Čtyřicet larev odpovídajících morfologicky druhům z podčeledi Ostertagiinae bylo detekováno ve tkáni jednoho jelena siky.

### 6.3.2 Makroskopické změny na sliznicích

Na všech vyšetřovaných sliznicích byly patrné léze a příznaky zánětu, jako například otok, nebo rozsáhlé okrsky hyperémie. Zánět postihoval především oblast fundu. Pozorované léze nabývaly různé intenzity a rozsahu od izolovaných políček petechií velikosti 3 mm v průměru až po souvislé hemoragické okrsky o průměru několika centimetrů



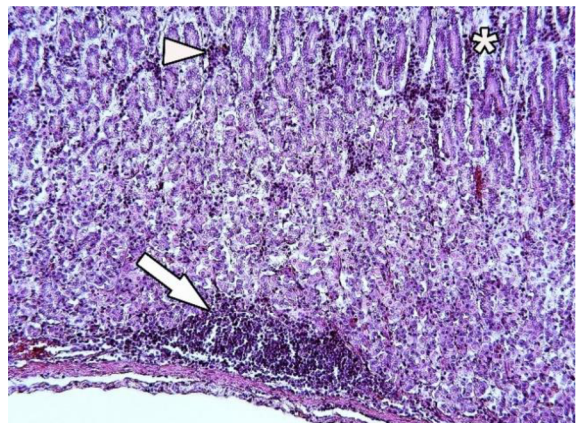
(obrázek 5). V antrální části byly v několika případech pozorovány souvislé plochy nodulárních lézí.



*Obrázek 5: sliznice slezu s makroskopicky viditelnými lézemi (šipka označuje hemoragický okrsek).*

### 6.3.3 Histologie

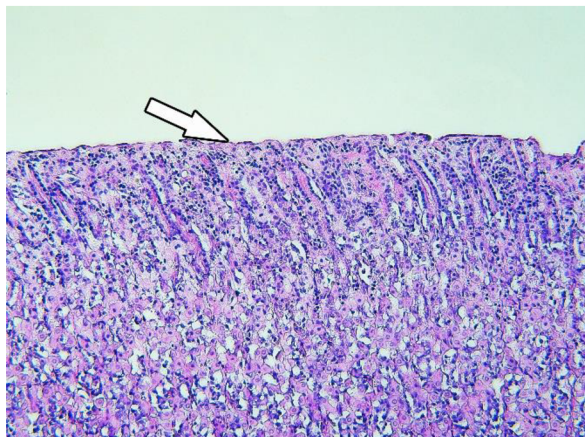
Ve všech vzorcích tkání byl zjištěn zánět manifestovaný infiltrátem a patologickými změnami, jako jsou např. nekrózy nebo rozvolnění žláz. Tyto nálezy indikující abomasitis byly překvapivě pozorovány ve všech histologických řezech bez ohledu na to, zda vzorek pocházel z oblastí slezu s viditelnými lézemi, nebo z oblastí bez makroskopicky viditelného poškození. Přítomnost hlístic ve sliznici slezu nebyla pozorována v žádném vzorku. Zánětlivý infiltrát difusního charakteru byl tvořen převážně lymfocyty a plasmatickými buňkami, přičemž prostupoval celou tkání sliznice. Agregace kulatobuněčného infiltrátu byly lokalizovány při bazální lamině (*lamina propria*) a ve slizničním vazivu (obrázek 6). U více než poloviny vyšetřených vzorků infiltrát prostupoval celou stěnou slezu včetně vláken podslizniční svaloviny *muscularis mucosa* a *tunica muscularis*.



*Obrázek 6: část sliznice slezu prostoupená difusním kulatobuněčným zánětem (trojúhelník) s agregací při bázi žláz (šipka) a viditelným rozvolněním tkáně v oblasti jamek (asterisk).*

V jednom vzorku srnce obecného byl pozorován masivní nekrotický okrsek ohraničený kolagenními vlákny. Vzorky tří vyšetřených jedinců vykazovaly erozi epitelu slezových jamek. U vzorků odebraných z oblasti nodulárních lézí bylo pozorováno výrazné zesílení oblasti mucin produkujících buněk krčku (MNC). Na vzorcích odebraných z míst viditelných lézí byly pozorovány četné hemoragie v oblasti *lamina propria*.

Barvení Massonovým trichromem odhalilo přítomnost kolagenních vláken v oblasti slizniční tkáně u osmi vyšetřených jedinců. Tkáně barvené PAS vykazovaly snížený obsah



**Obrázek 7:** povrch sliznice bez přítomnosti pozitivní reakce na PAS barvení (šipka).

povrchoých polysacharidů, až jejich úplnou ztrátu. Zejména v oblasti SMC byly pozorovány četné okrsky bez pozitivní reakce na PAS s pouze s občasnými rezidui. V oblasti krčku byla reakce na PAS slabá s tendencí zesilovat v hlubších částech jamek (obrázek 7). V této oblasti byla zároveň pozorována silnější reakce Alcianovou modří (ALC). Ve všech vzorcích docházelo k překryvu oblastí PAS a ALC pozitivity.

Rozsah ani intenzita pozorovaných změn nekorelovaly s aktuálně zjištěnou intenzitou infekce hlísticemi. Rovněž mezi vzorky odebranými z různých hostitelských druhů nebyl pozorován prokazatelný rozdíl v intenzitě nebo rozsahu patologických změn.

## 6.4 Výsledky studie vlivu faktorů a sezónní dynamiky

### 6.4.1 Vliv faktorů na abundanci infrapopulace

Na základě zvoleného modelu (tabulka 2) bylo zjištěno, že abundance *A. sidemi* není prokazatelně závislá na žádném ze sledovaných faktorů hostitele ani na prostředí.

Naopak u hlístic z podčeledi Ostertagiinae byla pozorována závislost na kombinovaném efektu hostitelského druhu a průměrné měsíční teploty na lokalitě ( $w=0,445$ ). Abundance těchto parazitů byl prokazatelně vyšší u srnců oproti ostatním hostitelským druhům, přičemž během teplejších měsíců ( $>5^{\circ}\text{C}$ ) byla prokazatelně vyšší, než během měsíců s průměrnou teplotou pod bodem mrazu. U žádného z vyšetřovaných druhů

hostitelů nebyl prokázán vliv věku, nebo pohlaví zvířat na abundanci trichostrongylidními hlísticemi.

*Tabulka 2: Výběr modelu pro ověření vlivu faktorů hostitele a prostředí na zjištěné abundance *A. sidemi*.*

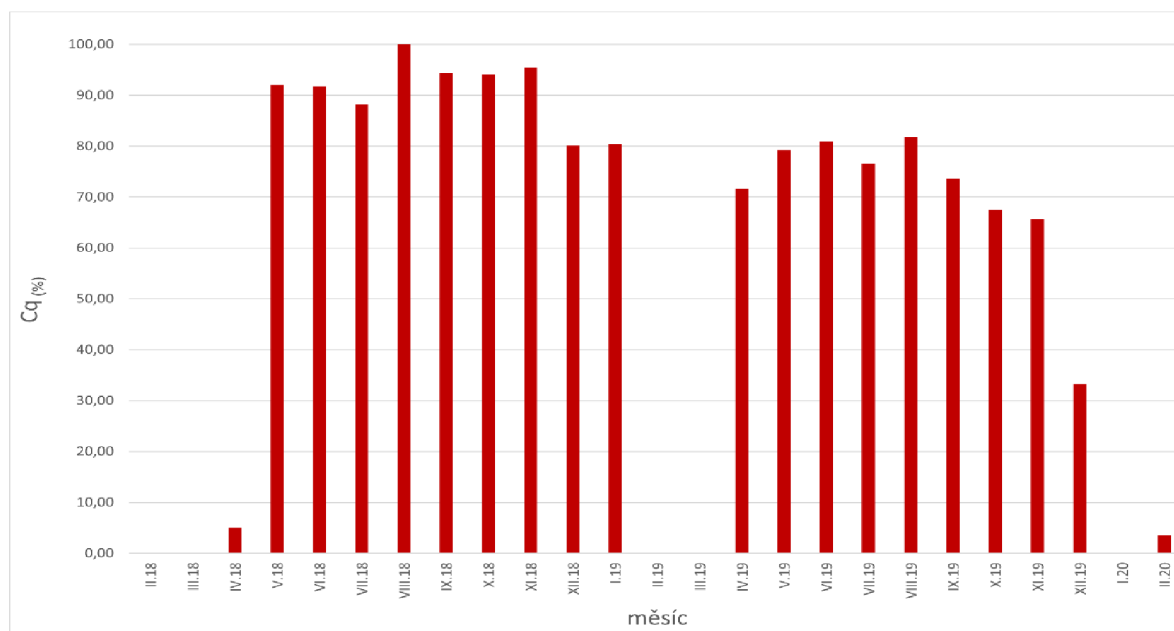
Model	Df	AICc	$\Delta$ AICc	w
<b>bez efektu testovaných faktorů</b>	<b>2</b>	<b>447.8</b>	<b>0.00</b>	<b>0.405</b>
věk hostitele	3	479.2	1.33	0.208
průměrná teplota	3	479.7	1.87	0.159
věk hostitele + průměrná teplota	4	481.0	3.19	0.082
druh hostitele	5	482.4	4.54	0.042
pohlaví hostitele	6	482.7	4.91	0.035
druh hostitele + průměrná teplota	6	483.4	5.63	0.024
věk hostitele + průměrná teplota	6	484.1	6.29	0.017
věk hostitele + pohlaví hostitele	7	484.1	6.29	0.017
Pohlaví hostitele + průměrná teplota	7	485.0	7.17	0.011

Df= stupně volnosti, AIC= hodnota Akaikeho informačního kritéria, w= váha testu.

## 6.4.2 Sezónní dynamika

Nejnižší hodnota kvantifikačního cyklu  $C_q$  (13,1; 100 %) byla zjištěna ve vzorcích larev získaných na pastvině v srpnu 2018 a 2019, což indikovalo největší množství vajíček *A. sidemi* na sledované oboře v těchto měsících. Naopak ve vzorcích z února a března 2018 a 2019 a během ledna 2020 nedošlo k amplifikaci ( $C_q=40$ ) a přítomnost *A. sidemi* tak nebyla potvrzena. Ze vzorků získaných v roce 2018 bylo během qPCR získáno vyšší množství produktu oproti těm z roku 2019. Obě sezóny však vykazovaly podobný trend. Po únorové a březnové absenci propagačních stadií *A. sidemi* jejich množství během května 2018 a dubna 2019 prudce vzrostlo, přičemž po dosažení vrcholu během srpna byl pozorován mírný pokles, který byl výrazný až v prosinci (Graf 6).

**Graf 6:** relativní kvantifikace jedinečných sekvencí pro *A. sidemi* získaných amplifikací (qPCR). Templátem byla gDNA, izolovaná ze směsných vzorků larev které byly získávány na vytipované oboře v letech 2018-2020.



Při koprologickém vyšetření směsných vzorků sbíraných na sledované lokalitě od února do října 2018 zjištěné hodnoty trichostrongylidních vajíček dosahovaly 60 - 320 EPG, přičemž vzorky z února, března a dubna byly negativní (tabulka 3).

**Tabulka 3** Výsledky koprologického vyšetření a PCR vykultivovaných larev ze směsných vzorků výkalů odebíraných na vytipované oboře od února do října 2018.

číslo	měsíc	McMaster	PCR
		Trichostrongylidní hlístice (EPG)	<i>Ashworthius sidemi</i>
1	II	100	-
2	III	0	-
3	IV	0	-
4	V	160	+
5	VI	80	+
6	VII	60	+
7	VIII	120	+
8	IX	140	+
9	X	320	+

## 7 DISKUSE

### 7.1 *Ashworthius sidemi* v ČR

V rámci této disertační práce byla provedena úplná orgánová pitva 104 slezů získaných z obor a honiteb napříč ČR za účelem získání přehledu o současném rozšíření *A. sidemi* a získání biologického materiálu pro další výzkum tohoto invazního parazita. Převážná většina slezů (92 %) během tohoto monitoringu byla infikovaná trichostrongylidními hlísticemi. Tento výsledek byl v souladu s dřívějšími studii, během kterých byly hlístice slezu identifikovány jako nejvíce abundantní paraziti gastrointestinálního traktu (Hoberg et al., 2001). Slez je častěji než ostatní segmenty trávicího traktu infikován více druhy parazitů současně (Pato et al., 2013; Wyrobisz-Papiewska et al., 2018; Carrau et al., 2021). Většina slezů vyšetřených během tohoto monitoringu byla infikována jedním až třemi druhy hlístic náležící do podčeledí Haemonchiinae a Ostertagiinae.

Autoři Kotrlá a Kotrlý (1977) uvádějí *A. sidemi* jako dominantního parazita jelenů sika na oborách Lány a Opočno, přičemž pozorovali přenos na sympatrické muflony a jeleny evropské. Další výskyt tohoto parazita nebyl zaznamenán až do roku 2016, kdy byl identifikován u několika jedinců jelena evropského a zebra evropského v Oboře Židlov, kam byli v minulosti importováni zubři z Polska (Vadlejch et al., 2017). Na základě výsledků monitoringu provedeného v rámci této disertační práce lze konstatovat, že *A. sidemi* je v současnosti na území České republiky značně rozšířen a to mezi širokou škálou autochtonních hostitelů zahrnující jelena evropského, srnce obecného, daňka evropského a losa evropského. Tato expanze je pravděpodobně důsledkem značného vzrůstu počtu jelena sika a jeho šíření z ohnisek výskytu v západních Čechách (Wolf a Vavrušek, 1975; 1976; Dvořák a Palyzová, 2016).

*Ashworthius sidemi* byl nalezen v 72 % vyšetřených slezů, přičemž tvořil 80 % z celkového počtu zachycených hlístic. Ve většině případů se vyskytoval jako součást smíšené infekce spolu s dvěma až třemi druhy hlístic z podčeledi Ostertagiinae, které byly zjištěny v 77 % vyšetřených slezů.



Během tohoto monitoringu byl na území České republiky poprvé zaznamenán výskyt druhu *Spiculoteragia houdemeri*. Tento parazit byl nalezen u všech sledovaných druhů s výjimkou losa evropského a jelence běloocasého. K introdukci tohoto nepůvodního parazita došlo pravděpodobně přirozenou migrací jelenů sika ze sousedního Rakouska po pádu želené opony, kdy byly odstraněny vysoké ploty bránící migraci zvěře (Rehbein et al., 2007). Většina druhů hlístic detekovaných během monitoringu infikovala celé spektrum vyšetřovaných hostitelů s výjimkou *S. antipini* a *M. dagestanica*, což jsou typičtí paraziti losa (Wyrobisz-Papiewska et al., 2018) a *H. contortus*, který byl nalezen pouze ve slezu srnců a jelenů běloocasých. Nevyšší abundance zástupců podčeledi Ostertagiinae a nejvyšší druhové bohatství hlístic bylo v porovnání s ostatními druhy hlístic zjištěno ve slezu srnce obecného. To mohlo být způsobeno odlišnou potravní strategií tohoto druhu. Srnec, jakožto okusovač, přijímá potravu s nižším obsahem vlákniny a celulózy oproti jelenům, nebo daňkům, kteří mají blíže ke spásáčům, v jejichž potravě jsou více zastoupeny traviny (Hofmann, 1989). U okusovačů a spásáčů se rovněž vyvinuly odlišné strategie obrany proti infekci parazity. Zatímco u spásáčů hlavní obranou efektivní imunitní odpověď, okusovači uplatňují spíše behaviorální mechanismy, které jim umožňují vyhnout se infekci (Hoste et al. 2010). Mezi tyto mechanismy patří tendence vyhýbat se fekálně znečištěným plochám, které představují potenciální zdroj infekce, nebo tzv. self cure fenomén – vyhledávání rostlin s anthelmintickým účinkem, např. luskovin bohatých na třísloviny (Gunn et al. 2003; Verheyden et al. 2020). V honitbách s vysokou denzitou více konkurence schopných druhů jelenovitých a ve fragmentované agrikulturní krajině mohou být možnosti tohoto způsobu obrany před parazity značně omezené.

Mezidruhová kompetice o potravní zdroje navíc u srnčat způsobuje ztrátu tělesné hmotnosti a vyvolává stres (Richard et al. 2010; Ferreti a Fattorini., 2020; Horcajada-Sánchez et al. 2019), což může zvyšovat vnímavost vůči gastrointestinálním hlísticím. Srnci vyšetřovaní v rámci monitoringu byli podobně jako jeleni evropští, parazitováni pro ně typickými druhy *O. leptospicularis* a *S. spiculoptera*. Oproti jelenům byly ale u srnců častěji detekovány druhy *S. asymmetrica* a *S. houdemeri* získané pravděpodobně od sympatrických daňků a jelenů sika. Vysoké intenzity infekce a přítomnost atypických druhů parazitů u srnců byly dříve pozorovány v Boreckém pralese, který srnci osidlují společně s dalšími druhy spárkaté zvěře (Drózd et al. 1992).

Na lokalitách, kde je umožněn kontakt s hospodářskými zvířaty k druhovému bohatství abomasálních hlístic srdce obecného přispěl *H. contortus*.

Na lokalitách, kde je umožněn kontakt s hospodářskými zvířaty k druhovému bohatství abomasálních hlístic srdce obecného přispěl i *H. contortus*. Přítomnost tohoto parazita u srnců byla v minulosti opakovaně pozorována, přičemž ve většině případů tvořil pouze zanedbatelnou složku infrapopulace (Vetýška; Pato et al., 2013; Manfredi et al., 2004). Naopak na některých lokalitách ve Francii a na Ukrajině *H. contortus* u srnců dosahuje vysoké prevalence a intenzity infekce např. (Ferté et al., 2000; Kuzmina et al., 2010). Otázkou zůstává, zda jsou ve všech případech zdrojem infekce hospodářská zvířata, či zda dochází k trvalému šíření v populacích srnců. Přestože případy smíšené infekce *A. sidemi* a *H. contortus* byly již v minulosti popsány (Kuzmina et al. 2010; Lehrter et al., 2016), v průběhu této studie nebyl společný výskyt obou parazitů pozorován v žádném vyšetřovaném slezu.

Jedním z možných vysvětlení je, že *H. contortus*, jakožto typický parazit hostitelů z podčeledi Caprinae není schopen dlouhodobé konkurence s *A. sidemi*, pokud není na lokalitě možnost kontaktu se zdrojem infekce v podobě muflonů nebo domácích malých přežvýkavců. Podobný výsledek mezidruhové kompetice byl nedávno pozorován u ovčí domácích infikovaných typickým parazitem skotu, *H. placei* a typickým ovčím parazitem *H. contortus* (dos Santos et al., 2020).

Vysoká prevalence a abundance *A. sidemi* byla překvapivě pozorována u srnců na lokalitě Vojenského Újezdu Hradiště, kde byl na konci v sedmdesátých let minulého století zaznamenán četný výskyt a vysoká abundance druhu *H. contortus* (Vetýška et al., 1981). Současná absence tohoto druhu byla pravděpodobně způsobena postupnou změnou krajinného rázu, ke které došlo po přechodu oblasti pod vojenskou správu a vzniku vojenského újezdu. Během více než padesáti let probíhající sukcese byla někdejší agrikulturní krajina postupně nahrazena lesem (Kopecký a Vojta, 2009). S vymizením zdroje infekce *H. contortus* a současným šířením jelenů sika (Dvořák a Palyzová, 2016) místní srnce kolonizoval *A. sidemi*.

Řada parazitologických studií zaměřených na nepůvodní hlístici *A. sidemi* se v minulosti soustředila pouze na tento druh a opomíjela autochtonní druhy parazitující ve slezu jelenovitých. O *A. sidemi* jakožto součásti společenství druhů parazitujících ve slezu neexistuje mnoho informací, nicméně ty, které jsou k dispozici, většinou uvádějí tohoto parazita jako dominantní druh dosahující u jelenovitých vyšší abundance a intenzity infekce, než druhy původní (Kuzmina et al., 2010; Kowal et al., 2012; Demiaszkiewicz et al., 2017).

Tento jev byl pozorován i během monitoringu prováděného v rámci této disertační práce, kde *A. sidemi* tvořil převážnou většinu identifikovaných hlístic. Rovněž maximální hodnoty abundance a celková biomasa byly u toho parazita výrazně vyšší než u zástupců podčeledi Ostertagiinae. U daňků vyšetřených během tohoto monitoringu byla pozorována tendence k vyšší intenzitě infekce oproti ostatním hostitelským druhům. To může částečně vysvětlovat fakt, že převážná většina daňků v této studii pocházela z oborů, kde byla zaznamenána extrémně vysoká denzita odpovídající spíše faremnímu chovu. Korelace mezi zvýšenou denzitou zvířat a abundancí gastrointestinálních parazitů byla v minulosti zaznamenána například u srnců (Body et al., 2011). Bylo pozorováno, že agregace zvířat během podávání krmiva zvyšuje sociální stres, jehož následkem může být oslabená imunita. (Santín Durán et al., 2004; Forristal et al., 2012; Vadlejch et al., 2015). Zvýšená vnímavost zvířat vůči parazitům v důsledku stresu spolu s vysokou pravděpodobností infekce na omezeném prostoru může vést k nárůstu abundance a intenzity infekce. V populacích volně žijících zvířat s denzitou hostitelů narůstá virulence parazita, což vede k postupné redukci hostitelské populace a ustanovení rovnováhy (Anderson, 1979). Tento vliv parazita na populační dynamiku hostitele může být silně ovlivněn podáváním antiparazitických léčiv (Pedersen et al., 2015).

Na sledované dančí oboře probíhala každoroční dehelmintizace v lednu. Výrazná dominance *A. sidemi* a nízká diverzita parazitů slezu u vyšetřovaných daňků (graf 2) tak mohla být výsledkem různé vnímavosti jednotlivých druhů hlístic vůči anthelmintické léčbě. Například Sinclair et al. (2016) pozorovali vyšší diverzitu gastrointestinálních parazitů (včetně přítomnosti druhů typických pro jelenovitě) na ovčí farmě v níž nebyla dlouhodobě podávána anthelmintika.

Nejvyšší abundance byla zjištěna u srnců na oboře Židlov, na které jsou, kromě jelena evropského a srnce obecného, chováni i zubři evropští. U zubrů byla v minulosti zjištěna vysoká vnímavost vůči *A. sidemi* (Karbowski et al., 2014) a na dané lokalitě i značně vysoké intenzity infekce v řádu tisíců jedinců této hematofágní hlístice (Vadlejch et al., 2017). Zubři a srnci tak mohou představovat významný lokální rezervoár infekce. Srnec obecný, jakožto nejpočetnější a nejrozšířenější zástupce jelenovitých na území České republiky (Bartoš et al., 2010) může výrazně přispívat k lokálnímu šíření parazita ve volné přírodě a navíc je potenciálním zdrojem infekce pro domácí přežvýkavce na místech kde je umožněn kontakt a sdílení pastvy. Vnímavost vůči *A. sidemi* byla v minulosti potvrzena u ovcí (Kotrlá et al., 1976) a skotu (Moskwa et al., 2015).



Oproti tomu migratorní jedinci jelena evropského z důvodu rozsáhlého domovského okrsku a migracím na dlouhé vzdálenosti hrají klíčovou roli v introdukci parazita na nové lokality vzhledem (Romportl et al., 2017). *A. sidemi* byl v rámci tohoto monitoringu pozorován na území Národního parku Šumava v populaci jelenů, kteří podle správy parku částečně migrují ze sousedního Německa, a také u losa evropského, jehož migrace mezi Polskem, Českou republikou a Německem byly již dříve zaznamenány (Schönfeld, 2009). Lze tedy předpokládat, že dochází k šíření *A. sidemi* i za hranice České republiky podobně, jako bylo nedávno pozorováno v případě invazního druhu motolice velké *Fascioloides magna* zjištěné na zemi Bavorska (Rehbein et al., 2021).

## 7.2 Zdokonalení diagnostiky ashworthiózy

Stupeň patogenity a sezónní dynamika se může lišit mezi jednotlivými druhy gastrointestinálních hlístic. Rovněž pro terapii infekcí vyvolaných různými druhy hlístic je třeba zvolit odlišné přístupy (Irvine et al., 2006; Kemper et al., 2010). Z těchto důvodů je nutná jejich přesná diagnostika. Determinace minimálně na úrovni druhu je důležitá pro mapování rozšíření parazitů, epizootologické studie a pro ověřování účinnosti anthelmintických opatření. Intravitální diagnostika hlístic je při tom stále založená primárně na mikroskopickém vyšetření, respektive na koprologii.

Vzhledem k morfologické uniformitě vajíček trichostrongylidních hlístic není možné morfologicky spolehlivě odlišit druhy z podčeledi Haemonchiinae od zástupců podčeledi Ostertagiinae a už vůbec ne jednotlivé druhy mezi sebou. Navíc na základě porovnání výsledků pitev a dvou tradičně používaných flotačních metod lze konstatovat, že tyto metody nejsou dostatečně citlivé pro detekci *A. sidemi* a mohou poskytovat falešně negativní výsledky. V praxi může jako příklad následků selhání tradičních metod intravitální diagnostiky sloužit nedávná introdukce *A. sidemi* do obory Židlov se zubry evropskými (Vadlejch et al., 2017). Určení druhu na základě morfologických znaků je možné pouze u základě larválních stadií (vanWyk a Myhew, 2013) a dospělých samců, kteří mohou být rozlišeni na základě rozdílů v morfologii a rozměrech spikul a přítomnosti nebo absence gubernákula (Lichtenfels et al., 1994; Lehrter et al., 2016).

Rovněž samice je možné identifikovat na základě specifických morfologických znaků, nicméně celý proces určování na základě morfologie je velmi časově náročný a pracný. Z toho důvodu jsou v současnosti stále více preferovány molekulární metody diagnostiky.

Pro detekci *A. sidemi* je využívána jednoduchá metoda PCR zacílená na oblast ribozomální DNA vyžadující následnou vizualizaci elektroforetické separace a multiplex PCR zacílená na mitochondriální podjednotku (ND4) vyžadující sekvenování (Moskwa et al., 2014; Lehrter et al., 2016). Dříve navržený protokol (Lehrter et al. 2016) vyžadoval vysoké množství DNA (optimálně 100 ng), přičemž tato metoda nebyla dostatečně robustní a citlivá pro jednotlivé larvy. Proti tomu při použití qPCR-HRM bylo možné odlišit *H. contortus* a *A. sidemi* s použitím jedné zkumavky a jednoho páru primerů. Identifikace druhů byla založena na regionu ITS-1, který běžně slouží jako marker pro odhalení fylogenetických vztahů mezi druhy v rámci jednoho rodu a mezi blízkce příbuznými rody u řady hlístic (Santín Durán et al., 2002; Liénard et al., 2007). Pro qPCR byl zvolen fragment ITS-1, jelikož je dostatečně mezidruhově variabilní (pořadí nukleotidů v sekvenci, délka a obsah GC) a zároveň vnitrodruhově konzervativní. Pro optimalizaci byly použity pouze larvální stadia *H. contortus*, jelikož larvy *A. sidemi* nebyly v době experimentu dostupné. Protože jednotlivé larvy poskytují pouze malé množství genomové DNA, byl vybrán vhodný protokol navržený autory Reslová et al. (2017). qPCR-HRM představuje užitečný nástroj ke zlepšení intravitální diagnostiky *A. sidemi*.

Na základě studie autorů Moskwa et al. (2015) lze předpokládat, že v místech společné pastvy volně žijících a domácích přežvýkavců může docházet k přirozenému přenosu *A. sidemi*.

Ačkoliv se jedná o jediný záznam takového přenosu, je pravděpodobné, že se ve skutečnosti jedná o mnohem častější jev, který ale nelze běžně používanými metodami diagnostiky odhalit vzhledem k uniformitě vajíček a morfologické podobnosti dospělců. U volně žijících přežvýkavců jsou rovněž známy případy smíšené infekce *A. sidemi* a *H. contortus* (Ferté et al., 2000), které je ale obtížné identifikovat při vysokých intenzitách infekce. Metoda qPCR-HRM vzhledem ke své citlivosti a relativně snadnému použití může pomoci získat informace o skutečné četnosti těchto jevů.

## 7.3 Patologie *Ashworthius sidemi* a změny v sekreci mucinu

V rámci této disertační práce bylo 21 slezů infikovaných invazním druhem *A. sidemi* podrobena patologickému vyšetření. Ve většině případů byla pozorována koinfekce *A. sidemi* a několika autochtonních druhů hlístic z podčeledi Ostertagiinae, přičemž *A. sidemi* vždy tvořil dominantní část infrapopulace. Ve čtrnácti procentech slezů byla nalezena monoinfekce *A. sidemi*. Tento nález byl v souladu s dřívějšími studiemi přinášejícími informace o dynamickém šíření a nárůstu intenzity tohoto parazita u jelenovitých (Demiaszkiewicz et al. 2017; Kuznetsov et al. 2018).

Všechny vyšetřené vzorky infikované tkáně slezu vykazovaly znaky zánětu slezu, přičemž intenzita zánětlivého infiltrátu kolísala od mírné až po masivní. Zjištěné patologie, například hemoragie, nebo nekrózy, odpovídaly dřívějším nálezům učiněným u jelenů a zubrů evropských v Polsku (Demiaszkiewicz et al. 2009; Ósinka et al. 2010). Zánětlivý infiltrát ve vyšetřovaných vzorcích byl tvořen převážně lymfocyty a plasmatickými buňkami se zanedbatelným množstvím až úplnou absencí eosinofilů. Tento typ infiltrátu je spojován spíše se sekundární infekcí. Například u telat infikovaných hlísticí *O. ostertagi* byl počet lymfoidních buněk zjištěných ve slezu vyšší při reinfekci, než při primární infekci (Gasbarre, 1994). Jelikož byly v rámci této disertační práce vyšetřovány vzorky dospělých jedinců, je pravděpodobné, že zachycený stav byl výsledkem opakované infekce spíše než primární infekce. Absence eosinofilů pravděpodobně souvisela zanedbatelným množstvím larev ve tkáni hostitelů, jelikož se eosinofily uplatňují především v rané fázi infekce při obraně proti larválním histotropním stádiím, spíše než při boji s dospělými parazity (Meeusen and Balic, 2000). Rovněž při experimentální infekci ovcí domácích hlísticí *T. circumcincta* hladina eosinofilů ve sliznici slezu postupně klesala od desátého dne po infekci, což odpovídá době, kdy dochází k vývoji v dospělce (Scott et al., 2017). Složení infiltrátu a vývojový stupeň zachycených parazitů naznačuje spíše chronickou fázi infekce.

V části vzorků (40 %) byla patrná iniciální fibróza. Nahrazování tkáně kolagenem může mít různé příčiny, ale obvykle se objevuje při chronických zánětech, jako jeden z projevů imunitní odpovědi typu Th2, jejíž cytokiny IL-4, IL-5 a zejména IL-13 se uplatňují při procesu fibrogenese (Wynn, 2004; Van Dyken and Locksley, 2013).

Imunitní odpověď typu dva se uplatňuje během infekcí helminty, včetně hlístic parazitujících ve slezu, jako je například *T. circumcincta* (Díaz and Allen, 2007; Knight et al., 2007). Přítomnost kolagenních vláken může být důsledkem opravných mechanismů hostitele, avšak za podmínek chronického zánětu může fibrotizace tkáně vést k patologickým změnám (Gieseck et al., 2018).

Epitel slezu je u savců pokryt vrstvou secernovaného mucinu který sestává z proteinového jádra, ke kterému jsou glykosilací připojeny oligosacharidy. Buňky ve svrchní části slezových jamek a na povrchu lumen slezu produkují převážně neutrální mucin Muc5AC, zatímco buňky v hlubší části jamek (v krčku) produkují kyselý mucin Muc6 (Ota and Katsuyama, 1992; Hoorens et al., 2011). U všech vzorků vyšetřených během studie patologií spojených s *A. sidemi* byla patrná ztráta polysacharidů, projevující se slabou, nebo nulovou reakcí na barvení PAS. Povrch lumen slezu tak na většině plochy zůstal takřka bez ochranné vrstvy hlenu. Podobný pokles neutrálního mucinu byl dříve zaznamenán u hospodářských zvířat experimentálně infikovaných trichostrongylidními hlísticemi, jako jsou *H. contortus*, *O. ostertagi*, nebo *T. circumcincta* (Rinaldi et al., 2011; Simpson et al., 2016; Scott et al., 2017). Tyto nálezy jsou v souladu se pozorovaným snížením exprese genu Muc5AC pro tvorbu neutrálního mucinu v epitelu slezu u ovcí infikovaných hlísticí *H. contortus*. Buňky v hlubších oblastech slezových jamek (MNC) vykazovaly různý stupeň pozitivitu na PAS a ALC barvení. Pozitivní reakce na ALC v této oblasti indikovala přítomnost kyselého mucinu. Nárůst mucinu Muc6 v oblasti jamek a krčku zaznamenali rovněž autoři Simpson et al. (2016) u ovcí infikovaných *H. contortus* a *T. circumcincta* a Rinaldi et al. (2011) u telat infikovaných *O. ostertagi*.

Pro redukci povrchového mucinu existují dvě protichůdná vysvětlení. Na jednu stranu může být pokles mucinu důsledkem snahy parazita o optimalizaci prostředí pro udržení infekce, jelikož Muc5AC není pouze bariérou proti mechanickému a chemickému poškození slezu, ale slouží rovněž jako obrana proti řadě patogenů včetně helmintů (Lichtenberger, 1999). Například u myši hraje mucin klíčovou roli ve vypuzení gastrointestinálních parazitů (Sharpe, 2018). Rovněž u přežvýkavců je odpověď organismu na helminty posílena účinkem Muc5AC. U ovcí rezistentních k infekci trichostrongylidními hlísticemi byla zjištěna silnější exprese Muc5AC, než u ovcí k těmto infekcím vnímavých (Ingham et al., 2008).

Rezidua neutrálního mucinu pozorovaná během tohoto vyšetření tak mohla indikovat snahu o obnovení normální tvorby mucinu po vypuzení většiny hlístic v pozdní fázi infekce, což naznačovaly i nízké intenzity *A. sidemi* v některých vyšetřených slezech. Redukce povrchových mucinů byla patrná i ve vzorcích ze zvířat infikovaných minimálním množstvím hlístic. Na druhou stranu Muc5AC umožňuje některým patogenům jako je např. *Helicobacter pylori* kolonizaci gastrointestinálního traktu (Van den Brink et al., 2000; Van de Bovenkamp et al., 2003). V minulosti bylo pozorováno že vystavení trichostrongylidních hlístic jako např. *T. circumcincta*, nebo *H. contortus* kyselému prostředí, jaké je za normálních podmínek udržováno ve slezu, vede k jejich usmrcení (Rowe et al., 2009; Hoorens et al., 2011). Vrstva hlenu tvořená neutrálním Muc5AC tak může představovat ochranný film poskytující hlísticím ochranu před působením kyselého prostředí slezu (Scott et al., 2017). V takovém případě by redukce povrchových mucinů mohla být obranným mechanismem organismu, který se tímto způsobem zbaví patogenních parazitů, ale za cenu rizika autolytického poškození a otevření vstupní brány pro další patogeny.

Změny v sekreci mucinu jsou pravděpodobně způsobeny inhibicí činnosti parietálních buněk ke které dochází bezprostředně po objevení dospělých stadií hlístic ve slezu. Na této inhibici se podílejí jednak exkrečně-sekreční produkty, ale také mediátory vyvolaného zánětu. (Simpson et al., 1999; Lawton et al., 1996). Vymizení negativní zpětné vazby v podobě sníženého pH pro buňky produkující gastrin způsobí masivní nárůst produkce tohoto hormonu, který má za následek proliferaci a následnou hyperplazii v oblasti krčku slezových jamek. Zároveň je však pozastaveno dozrávání těchto buněk v hlavní parietální buňky. Během této studie bylo zjištěno pouze mírné zesílení v oblasti MNC navzdory výraznému snížení produkce mucinu. Výjimku tvořily vzorky z oblasti nodulárních lézí, kde byla patrná výrazná hyperplazie oblasti MNC.

Pozorované patologické změny byly s největší pravděpodobností důsledkem synergního působení *A. sidemi* a výrazně méně početných hlístic z podčeledi Ostertagiinae. Ačkoliv rozsah a intenzita patologií překvapivě nekorelovaly s intenzitou infekce, mohlo jednat o stav vyvolaný mnohem silnějšími počátečními infekcemi, které byly v průběhu času oslabeny stárnutím infropopulací parazitů, působením imunitního systému, nebo anthelmintickým zásahem.

## 7.4 Sezónní dynamika infekce *Ashworthius sidemi*

Abundance hlístic *A. sidemi* zjištěné během pitev slezu v letech 2016 – 2019 nebyly prokazatelně ovlivněny teplotou. Nejvyšší intenzita infekce zaznamenaná u srnců ulovených v listopadu 2016 byla pravděpodobně způsobena akumulací larev hlístic na pastvině během léta a časného podzimu. S využitím molekulární analýzy (qPCR) směsi larev získaných z dančí obory bylo největší množství infekčních larev *A. sidemi* zjištěno v srpnu s pozvolným poklesem počtu během podzimu. Tyto výsledky jsou v souladu s dříve pozorovanou sezónní dynamikou *A. sidemi* u zubrů v Polsku (Drózd et al., 2003) a jelenů sika a jelenů maral na Ruském Dálném východě (Ovcharenko, 1968). Rovněž nízká prevalence a abundance juvenilních jedinců *A. sidemi* zjištěná během pitev od pozdního podzimu do jara naznačuje, že k nejvýznamnější infekci dochází během letního období.

Na rozdíl od výsledků výše zmiňovaných autorů značné množství dospělců nalezené během pitev prováděných v zimním období v rámci této disertační práce nepotvrzuje významnou roli pozastaveného vývoje larev *A. sidemi* pro přečkání zimního období. Počet histotropních larev L4 zachycených během pitev byl zanedbatelný, podobně jako u zubrů a jelenů evropských (Vadlejch et al., 2017). Přítomnost dospělých hematofágních hlístic během zimy přitom může pro hostitele představovat značnou zátěž bez ohledu na množství vyprodukovaných. Například u zubrů parazitovaných *A. sidemi* byl pozorován pokles množství červených krvinek, hemoglobinu a úrovně hematokritu (Kołodziej-Sobocińska et al., 2016b).

Pozastavený vývoj je u hlístic, které parazitují u jelenovitých méně častým jevem, než je tomu v případě hlístic parazitujících u hospodářských zvířat (Irvine et al., 2000; Gunn a Irvine, 2003).

Halvorsen (1986) vyslovil hypotézu pozastaveného vývoje larev během zimy jako adaptace parazitů hospodářských zvířat na zimní ustájení zvířat, během kterého není umožněn vývoj larev v prostředí a nedochází tak k přenosu infekce. Oproti tomu u hlístic volně žijících přežvýkavců zimní přenos pravděpodobně hraje významnější roli vzhledem k tvorbě zimních stád a shlukování během zimního příkrmování (Kołodziej-Sobocińska et al., 2016). Například u sobů polárních docházelo k infekci trichostrongylidními hlísticemi i během arktické zimy (Halvorsen et al., 1999). Oproti tomu v oboře, kde byla v rámci této disertační práce kontinuálně sledována přítomnost infekčních larev *A. sidemi*, byla během února a března opakovaně zaznamenána jejich absence. Výsledek tohoto vyšetření byl

pravděpodobně silně ovlivněn pravidelným podáváním anthelmintických léčiv na konci ledna, ačkoliv postmortální vyšetření daňků provedené na této lokalitě v březnu 2018 odhalilo u šesti z osmi jedinců přítomnost *A. sidemi* v intenzitě infekce 415 – 1203 dospělých stadií. Náhlá absence infekčních larev tak mohla být způsobena kombinací anthelmintické intervence a přirozeně nízkého biotického potenciálu *A. sidemi*. Nízké až zanedbatelné produkci vajíček *A. sidemi* nasvědčovaly rovněž hodnoty EPG získané koprologickým vyšetřením směsných vzorků výkalů ze sledované obory (tabulka 3). Autoři Halvorsen et al. (1999) odhadli, že pro dosažení intenzity infekce v řádu tisíců jedinců strongylidních hlístic u sobů polárních je třeba požití asi dvaceti šesti larev denně, což tito autoři připisovali relativně dlouhé životnosti hlístic parazitujících u volně žijících přežvýkavců, která umožňuje postupnou kumulaci parazitů v gastrointestinálním traktu hostitelů.

Relativně nevýrazný vrchol přítomnosti vajíček, respektive larev na pastvině a jejich nízká produkce v průběhu roku je v kontrastu s vysokou abundancí dospělců zjištěnou během pitev. Nezávislost abundance *A. sidemi* na teplotních poměrech a absence hypobiózy naznačují, že k infekci tímto invazním parazitem dochází v průběhu celého roku a to i při relativně nízkém příjmu infekčních larev.

Naopak abundance hlístic z podčeledi Ostertagiinae ve slezu během tohoto monitoringu kolísala s průměrnou teplotou na lokalitách výskytu hostitelů. Během měsíců s průměrnou teplotou nad bodem mrazu byla abundance těchto hlístic prokazatelně vyšší, než v průběhu chladnějších měsíců (prosinec 2016, únor 2018 a leden 2019). Nižší intenzity infekce hlísticemi z podčeledi Ostertagiinae během zimy byly dříve pozorovány u jelenovitých v Polsku (Drózd et al., 1992; 1993) pravděpodobně jako důsledek kombinace postupného stárnutí infrapopulace získaných během pastevní sezóny a sníženého přenosu během zimy (Stromberg et al., 1997). Výsledky pitev prováděných v rámci této disertační práce nepotvrdili efekt získané imunity na abundanci hlístic slezu, jelikož tato abundance nevykazovala prokazatelný rozdíl mezi jednotlivými věkovými skupinami. Dopad efektu věku volně žijících přežvýkavců na úroveň infekce hlístic z podčeledi Ostertagiinae nebyl pozorován ani v dřívějších výzkumech založených na pitvách slezu (Halvorsen et al., 1999; Santín Durán et al., 2008) a molekulární analýze larev (Halvarsson et al., 2021).

## 8 ZÁVĚRY

Výsledky pitev jelenovitých přežvýkavců z různých částí ČR prokázaly přítomnost širokého spektra slezových hlístic s převahou invazního druhu *A. sidemi*.

Koprologické vyšetření vzorků odebraných během pitev jedinců infikovaných *A. Sidemi* koprologickými metodami poskytlo v několika případech falešně negativní výsledky. Zjištěné hodnoty EPG navíc nereflektovaly skutečnou intenzitu infekce.

Oproti tradičním metodám diagnostiky metoda qPCR-HRM představuje spolehlivý nástroj pro detekci invazní hlístice *A. sidemi* a jejího odlišení od příbuzných druhů, jako je *H. contortus*, bez nutnosti elektroforézy produktu a sekvenování. Navržená metoda může sloužit jednak pro detekci smíšených infekcí *A. sidemi* a *H. contortus* u volně žijících přežvýkavců, ale také pro posouzení, zda a v jakém rozsahu dochází k přirozenému přenosu *A. sidemi* do chovů hospodářských zvířat. Následujícím krokem pro zlepšení diagnostiky parazitóz u volně žijících přežvýkavců by měla být optimalizace metody multiplexní qPCR pro širší spektrum hlístic parazitujících ve slezu.

Během patologického vyšetření vzorků tkáně slezu bylo pozorováno, že *A. sidemi* s přispěním hlístic z podčeledi Ostertagiinae způsobuje u jelenovitých chronickou abomasitis při které zároveň dochází ke snížení až úplnému zastavení sekrece neutrálního mucinu. Jelikož tyto alterace byly pozorovány ve slezech širokého spektra jelenovitých, lze předpokládat, že infekce hlísticemi, a především invazním druhem *A. sidemi*, může negativně ovlivňovat welfare volně žijících jelenovitých, ale také snižovat produkci zvěřiny a trofejí ve faremních chovech.

Oproti dřívějším studiím sezónní dynamiky *A. sidemi* v této disertační práci nebyla zjištěna významná role pozastaveného vývoje larev v zimním období. Abundance infrapopulací *A. sidemi* nebyla prokazatelně ovlivněna faktorem průměrné měsíční teploty a relativně vysoké intenzity infekce byly pozorovány rovněž během zimy. Abundance *A. sidemi* se rovněž významně nelišila mezi hostitelskými druhy, pohlavími, nebo věkovými skupinami vyšetřovaných zvířat. To naznačuje vysokou schopnost *A. sidemi* šíření mezi autochtonními druhy jelenovitých. Výsledky kontinuálního sběru fekálních vzorků daňka obecného na studované lokalitě naznačují, že k produkci propagačních stadií dochází v průběhu celého roku, v relativně malém množství s vrcholem v pozdním létě s mírným poklesem začátkem zimy.



Vzhledem k nízkým hodnotám EPG a nevýraznému vrcholu produkce vajíček jsou vysoké intenzity infekce ve slezu pravděpodobně důsledkem kontinuální kumulace parazita ve slezu hostitelů během roku. Zatímco migrující jedinci jelena evropského a losa evropského mohou způsobovat introdukce *A. sidemi* na nová území, srnec obecný, jakožto nejpočetnější a nejrozšířenější druh jelenovitých v ČR může hrát významnou roli v lokálním šíření a na místech sdílené pastvy představovat potenciální zdroj infekce pro domácí přežvýkavce.

## 9 SEZNAM LITERATURY

- Albery, G.F., Kenyon, F., Morris, A., Morris, S., Nussey, D.H., Pemberton, J.M., 2018. Seasonality of helminth infection in wild red deer varies between individuals and between parasite taxa. *Parasitology* 145, 1410–1420. <https://doi.org/10.1017/S0031182018000185>
- Albon, S.D., Stien, A., Irvine, R.J., Langvatn, R., Ropstad, E., Halvorsen, O., 2002. The role of parasites in the dynamics of a reindeer population. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 269, 1625–1632. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2064>
- Al Saqur I, Armour J, Bairden K, Dunn AM, Jennings FW., 1980. *Ostertagia leptospicularis* Asadov 1953 as a pathogen in British cattle. *Veterinary Records*. 107, 511. doi: 10.1136/vr.107.22.511.
- Anděra, M., Červený, J., 2009. Large mammals in the Czech Republic - distribution, history and protection. 1., Even-toed ungulates (Artiodactyla). Národní muzeum, Praha
- Anderson, R., 1979. Parasite pathogenicity and the depression of host population equilibria. *Nature* 279, 150–152. <https://doi.org/10.1038/279150a0>
- Arbabi, M., Hooshyar, H., Lotfinia, M., Bakhshi, M.A., 2020. Molecular detection of *Trichostrongylus* species through PCR followed by high resolution melt analysis of ITS-2 rDNA sequences. *Molecular and Biochemical Parasitology* 236. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2020.111260>
- Asakawa, M., 2009. Morphological Observations on Male Nematodes of the Subfamily Ostertagiinae in Captive Chinese Water Deer (*Hydropotes inermis*: Artiodactyla: Mammalia) at Whipsnade Wild Animal Park, UK. *Journal of Rakuno Gakuen University*. 34, 223 - 237.
- Arneberg, P., Folstad, I., 1999. Predicting Effects of Naturally Acquired Abomasal Nematode Infections on Growth Rate and Food Intake in Reindeer Using Serum Pepsinogen Levels, Source: *The Journal of Parasitology*. 85, 367-369
- Babička, C., Drábek, M., Štika, J., Ženožička, J., 1977. Poznatky z chovu jelena siky. *Myslivost*, 11, 270 – 271.
- Barone, C.D., Wit, J., Hoberg, E.P., Gilleard, J.S., Zarlenga, D.S., 2020. Wild ruminants as reservoirs of domestic livestock gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* 279. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109041>

- Bartoš, L., Žirovnický, J., 1981. Hybridization between red and sika deer, II. Phenotype analysis. *Zoologischer Anzeiger*. 207, 271–287.
- Bartoš, L., Vaňková, D., Šustr P., Miller, K. V., Heroldová, M., Homolka, M., Smith, M. H., 1999. Příčiny neúspěšné reprodukce jelence viržinského (*Odocoileus virginianus*) v oblasti Dobříše In: *Introdukovaná spárkatá zvěř '99*. Sborník referátů. Česká lesnická společnost, Dobříš.
- Bartoš, L., 2009. Sika deer in continental Europe In: McCullough DR, Takatsuki S, eds. *Sika deer: Biology and Management of Native and Introduced Populations*. Springer Tokyo Berlin Heidelberg New York. p. 573-594.
- Bartoš, L., Kotrba, R., Pintíř, J., 2010. Ungulates and their management in the Czech Republic. *European Ungulates and their Management in the 21st century* 243–261.
- Beaumelle, C., Redman, E.M., de Rijke, J., Wit, J., Benabed, S., Debias, F., Duhayer, J., Pardouret, S., Poirel, M.T., Capron, G., Chabot, S., Rey, B., Yannic, G., Gilleard, J.S., Bourgoin, G., 2021. Metabarcoding in two isolated populations of wild roe deer (*Capreolus capreolus*) reveals variation in gastrointestinal nematode community composition between regions and among age classes. *Parasites and Vectors* 14. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-05087-5>
- Becker, A., Reith, A., Napiwotzki, J., Kadenbach, B., 1996. A Quantitative Method of Determining Initial Amounts of DNA by Polymerase Chain Reaction Cycle Titration Using Digital Imaging and a Novel DNA Stain. *Analytical biochemistry* 237, 234-207.
- 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. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-29.2.261>
- Benjamin, C.S., Uphus, L., Lüpke, M., Rojas-Botero, S., Dhillon, M.S., Englmeier, J., Fricke, U., Ganuza, C., Haensel, M., Redlich, S., Riebl, R., Tobisch, C., Uhler, J., Zhang, J., Menzel, A., Peters, W., 2022. Modelling the Relative Abundance of Roe Deer (*Capreolus capreolus* L.) along a Climate and Land-Use Gradient. *Animals* 12. <https://doi.org/10.3390/ani12030222>
- Bisset, S.A., Knight, J.S., Bouchet, C.L.G., 2014. A multiplex PCR-based method to identify strongylid parasite larvae recovered from ovine faecal cultures and/or pasture samples. *Veterinary Parasitology* 200, 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.12.002>
- Body, G., Ferté, H., Gaillard, J.M., Delorme, D., Klein, F., Gilot-Fromont, E., 2011. Population density and phenotypic attributes influence the level of nematode parasitism in roe deer. *Oecologia* 167, 635–646. <https://doi.org/10.1007/s00442-011-2018-9>

- Boggiatto, P.M., Crawford, L.S., Kanipe, C., Palmer, M. v., Olsen, S.C., 2020. Case Report: Fading Elk Syndrome in a Herd of Captive Elk (*Cervus elaphus*) in the North American Midwest. *Frontiers in Veterinary Science* 7. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00497>
- Bolukbas, C.S., Gurler, A.T., Beyhan, Y.E., Acici, M., Umur, S., 2012. Helminths of roe deer (*Capreolus capreolus*) in the Middle Black Sea Region of Turkey. *Parasitology International* 61, 729–730. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.06.008>
- Bott, N.J., Campbell, B.E., Beveridge, I., Chilton, N.B., Rees, D., Hunt, P.W., Gasser, R.B., 2009. A combined microscopic-molecular method for the diagnosis of strongylid infections in sheep. *International Journal for Parasitology* 39, 1277–1287. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.03.002>
- Bourgoin, G., Portanier, E., Poirel, M.T., Itty, C., Duhayer, J., Benabed, S., Cockenpot, A., Callait-Cardinal, M.P., Garel, M., 2021. Reproductive females and young mouflon (*Ovis gmelini musimon* × *Ovis* sp.) in poor body condition are the main spreaders of gastrointestinal parasites. *Parasitology* 148, 809–818. <https://doi.org/10.1017/S0031182021000329>
- Bovenkamp, J.H.B., Mahdavi, J., Korteland-Van Male, A.M., Buller, H., Einerhand, A., Bor'en, T., Dekker, J., 2003. The MUC5AC glycoprotein is the primary receptor for *Helicobacter pylori* in the human stomach. *Helicobacter* 8, 521–532.
- Budischak, S.A., Hoberg, E.P., Abrams, A., Jolles, A.E., Ezenwa, V.O., 2015. A combined parasitological molecular approach for noninvasive characterization of parasitic nematode communities in wild hosts. *Molecular Ecology Resources* 15, 1112–1119. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12382>
- Burnham, K.P., Anderson, D.R., 2002. *Model Selection and Multimodel Inference: A practical information-Theoretic Approach* (second edition). Springer, New York, NY.
- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.L., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*. 83, 575–583.
- Carrau, T., Martínez-carrasco, C., Garijo, M.M., Alonso, F., Vizcaino, L.L., Herrera-russert, J., Tizzani, P., 2021. Epidemiological approach to nematode polyparasitism occurring in a sympatric wild ruminant multi-host scenario. <https://doi.org/10.1017/S0022149X21000183>
- Carreno, R.A., Durden, L.A., Brooks, D.R., Abrams, A.A., Hoberg, E., 2001. *Parelaphostrongylus tenuis* (Nematoda: Protostrongylidae) and other parasites of

- white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Costa Rica. *Comparative Parasitology* 68,177–184.
- Cerutti, M.C., Citterio, C. v., Bazzocchi, C., Epis, S., D'Amelio, S., Ferrari, N., Lanfranchi, P., 2010. Genetic variability of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongyloidea) in alpine ruminant host species. *Journal of Helminthology* 84, 276–283. <https://doi.org/10.1017/S0022149X09990587>
- Chabaud, A, Puylaert, G.F, Bain, O., Petter, A.J., Durette-Desset, M.C., 1970. Remarques sur l'homologie entre les papillescloacales des Rhabditides et les co^tes dorsales des Strongylida. *Comptes Rendus Hebdomaires des Se'ances de l'Academie des Sciences, Paris* 271, 1771–1774.
- Charlier, J., Velde, F. vande, van der Voort, M., van Meensel, J., Lauwers, L., Cauberghe, V., Vercruyse, J., Claerebout, E., 2015. ECONOHEALTH: Placing helminth infections of livestock in an economic and social context. *Veterinary Parasitology* 212, 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.06.018>
- Chilton, N.B., Newton, L.A., Beveridge, I., Gasser, R.B., 2001. Evolutionary relationships of trichostrongyloid nematodes (Strongylida) inferred from ribosomal DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 19, 367–386. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.0938>
- Chintoan-Uta, C., Morgan, E.R., Skuce, P.J., Coles, G.C., 2014. Wild deer as potential vectors of anthelmintic-resistant abomasal nematodes between cattle and sheep farms. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2985>
- Combes, C., de Buron, I., Connors, V., 2002. *Parasitism: The Ecology and Evolution of Intimate Interactions*. Bibliovault OAI Repository, the University of Chicago Press.
- Connan, R.M., 1991. Type II ostertagiosis in farmed red deer. *Veterinary Records*. 128, 233–235.
- Conti, J.A., Howerth, E.W., 1987. Ostertagiosis in a white-tailed deer due to *Ostertagia ostertagi*. *Journal of wildlife diseases* 23, 159–162. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-23.1.159>
- Cringoli, G., Maurelli, M.P., Levecke, B., Bosco, A., Vercruyse, J., Utzinger, J., Rinaldi, L., 2017. The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nature Protocols* 12, 1723–1732. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.067>

- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Utzinger, J., 2010. FLOTAC: New multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols* 5, 503–515. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.235>
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., Scala, A., 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Parasitology* 123, 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.05.021>
- Dallas, J.F., Irvine, R.J., Halvorsen, O., 2000a. DNA evidence that *Ostertagia gruehneri* and *Ostertagia arctica* (Nematoda: Ostertagiinae) in reindeer from Norway and Svalbard are conspecific, *International Journal for Parasitology*.
- Dallas, J.F., Irvine, R.J., Halvorsen, O., Albon, S.D., 2000b. Identification by polymerase chain reaction (PCR) of *Marshallagia marshalli* and *Ostertagia gruehneri* from Svalbard reindeer, *International Journal for Parasitology* 30, 655 – 658.
- Demeler, J., Ramünke, S., Wolken, S., Ianiello, D., Rinaldi, L., Gahutu, J.B., Cringoli, G., von Samson-Himmelstjerna, G., Krücken, J., 2013. Discrimination of Gastrointestinal Nematode Eggs from Crude Fecal Egg Preparations by Inhibitor-Resistant Conventional and Real-Time PCR. *PLoS ONE* 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061285>
- Demiaszkiewicz, A.W., 2014. Migrations and the introduction of wild ruminants as a source of parasite exchange and emergence of new parasitoses. *Annals of parasitology* 60, 25–30.
- 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. <https://doi.org/10.2478/s11686-013-0164-4>
- Demiaszkiewicz, A.W., Merta, D., Kobielski, J., Filip, K.J., Pyziel, A.M., 2017. Expansion of *Ashworthius sidemi* in red deer and roe deer from the Lower Silesian Wilderness and its impact on infection with other gastrointestinal nematodes. *Acta Parasitologica* 62, 853–857. <https://doi.org/10.1515/ap-2017-0103>
- Demiaszkiewicz, A., Lachowicz, J., Osińska, B., 2009. *Ashworthius sidemi* (Nematoda Trichostrongylidae) in wild ruminants in Białowieża Forest. *Polish Journal of Veterinary Science* 12, 385–388.

- Díaz, A., Allen, J.E., 2007. Mapping immune response profiles: the emerging scenario from helminth immunology. *European Journal of Immunology* 37, 3319–3326.
- Dobson, R.J., Barnes, E.H., Birclijin, S.D., Gill, J.H., 1992. researchnote the survival of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in faecal culture as a source of bias in apportioning egg counts to worm species, In apportioning egg counts to worm species *Journal for Parasitology* 22, 1005-1008.
- dos Santos, M.C., Amarante, M.R.V., Amarante, A.F.T., 2020. Is there competition between *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in a pasture grazed by only sheep? *Veterinary Parasitology* 279, 109054. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2020.109054>
- Drózdź, J. 1963. Helminthofauna zaaklimatyzowanego w Polsce jelenia sika (*Cervus nippon*). *Wiadomości Parazytologiczne* 9, 133–138
- Drózdź, J., 1973. Materials contributing to the knowledge of the helminth fauna of *Cervus (Rusa) unicolor* Kerr and *Muntjac muntjak* Zimm. of Vietnam, including two new nematode species: *Oesophagostomum labiatum* sp. n., and *Trichocephalus muntjaci* sp. n. *Acta Parasitologica Pollonia* 33, 465–474.
- Drózdź, J., Lachowicz J., Demiaszkiewicz, A.W., Sulgostowska, T., 1987., Abomasum nematodes in field and forest roe deer *Capreolus capreolus* (L.) over a yearly cycle. *Acta Parasitologica Pollonia* 32, 339–348.
- Drózdź, J., Demiaszkiewicz, A.W., Lachowicz, J., 1992. The helminthfauna of roe deer *Capreolus capreolus*(L.) in a hunting area inhabited by red deer, elk and European bison (Borecka Forest, Poland) over a yearly cycle. *Acta Parasitologica Polonia* 37, 83–8896
- Drózdź, J., Demiaszkiewicz, A.W., Lachowicz J., 1993. Seasonal changes in the helminth fauna of *Cervus elaphus*(L.) from Slowinski National Park (Poland). *Acta Parasitologica* 38, 85–87.
- Drózdź, J., Demiaszkiewicz, A.W., Lachowicz, J. 1994. The effect of culling red deer, *Cervus elaphus*(L.), on their helminth fauna in the Slowinski National Park (Poland). *Acta Parasitologica* 39:92–94
- Drózdź, J., 1995. Polymorphism in the Ostertagiinae Lopez-Neyra, 1947 and comments on the systematics of these nematodes. *Systematic Parasitology* 32, 91–99. <https://doi.org/10.1007/BF00009507>

- 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
- Drózd, J., Demiaszkiewicz, A.W., Lachowicz, J. 2000. Ashwortioza – nowa parazytoza dzikich przeżuwaczy. *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. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0675-7>
- Drozd, J., Lachowicz, J., 1992. The helminth fauna of the roe deer *Capreolus capreolus* [L.] in a hunting area inhabited by red deer, elk and European bison [Borecka Forest, Poland] over the yearly cycle. *Acta Parasitologica* 37.
- Durette-Desset, M.C. 1985. Trichostrongyloid nematodes and their vertebrate hosts: Reconstruction of the phylogeny of a parasitic group. *Advances in Parasitology* 24, 239-306.
- Durette-Desset, M.C., 1989. Nomenclature proposed for the species described in the subfamily of Ostertagiinae Lopez-Neyra, 1947. *Annales de parasitologie humaine et comparée* 64, 356–373. <https://doi.org/10.1051/parasite/1989645356>
- 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, 1065-1085.
- Durette-Desset, M.C.L., Ben-Slimane, B., Cassone, J., Barton, D.P., Chabaud, A.G., 1994. *Johnpearsonia* nov.gen. et *Johnpearsoniinae* nov. subf. (Molineoidea, Nematoda) parasite de *Bufo marinus*; remarques sur les Trichostrongles primitifs parasites d'Amphibiens et de Reptiles. *Parasite* 1, 153–160. <https://doi.org/10.1051/parasite/1994012153>
- Dutta, B., Konch, P., Rahman, T., Upadhyaya, T.N., Pathak, D.C., Tamuli, S.M., Phangchoo, C. v, Begum, S.A., 2017. Occurrence and pathology of *Haemonchus contortus* infection in Goats. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 5, 1284–1287.
- Dvojnós, G.M., Pogrebniak, L.P. , 1977 About infection of wild ungulates with helminths in hunting grounds of some districts of Ukrainian SSR. *Proceedings of the Republican scientific-technique conference, Kyiev* 2, 30–31.
- Dvořák, J., Palyzová, L., 2016. Analysis of the development and spatial distribution of sika deer (*Cervus nippon*) populations on the territory of the Czech Republic. *Acta*



- Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis 64, 1507–1515.  
<https://doi.org/10.11118/actaun201664051507>
- Egwand, T.G., Slocombe, J.O., 1982. Evaluation of the Cornell– Wisconsin centrifugal flotation technique for recovering trichostrongylid eggs from bovine feces. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. 46, 133–137.
- Eysker, M., Kooyman, F.N.J., 1993. Notes on necropsy and herbage processing techniques for gastrointestinal nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology* 46, 205–213.  
[https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90059-V](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90059-V)
- Eysker, M., Ploeger, H.W., 2000. Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitology* 120, 109–119.
- Fanke, J., Charlier, J., Steppin, T., von Samson-Himmelstjerna, G., Vercruysse, J., Demeler, J., 2017. Economic assessment of *Ostertagia ostertagi* and *Fasciola hepatica* infections in dairy cattle herds in Germany using Paracalc®. *Veterinary Parasitology* 240, 39–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.03.018>
- Ferretti, F., Fattorini, N., 2020. Competitor densities, habitat, and weather: effects on interspecific interactions between wild deer species. *Integrative Zoology* 1–15.  
<https://doi.org/10.1111/1749-4877.12470>
- Ferté, H., Durette-Desset, M.-C., 1989. Redescription of *Ashworthius sidemi* Schulz, 1933, etd *A. gagarini* Kostyaev, 1996, (Nematoda, Trichostrongyloidea) parasites de Cervidae. *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle*. 11, 69–77.
- Ferté, H., Cléva, D., Depaquit, J., Gobert, S., Léger, N., 2000. Status and origin of *Haemonchinae* (Nematoda: Trichostrongylidae) in deer: A survey conducted in France from 1985 to 1998. *Parasitology Research* 86, 582–587.  
<https://doi.org/10.1007/PL00008534>
- Foreyt, W. J., 2001. *Veterinary parasitology: reference manual*, 5th edition. Wiley-Blackwell, Iowa.
- Forristal, V.E., Creel, S., Taper, M.L., Scurlock, B.M., Cross, P.C., 2012. Effects of supplemental feeding and aggregation on fecal glucocorticoid metabolite concentrations in elk. *Journal of Wildlife Management* 76, 694–702. <https://doi.org/10.1002/jwmg.312>
- Fox, M.T., Gerrelli, D., Pitt, S.R., Jacobs, D.E., Hartl, C., Simmonds, A.D. 1987. Endocrine effects of a single infection with *Ostertagia ostertagi* in the calf. *International Journal for Parasitology* 17, 1181–5.
- Gaba, S., Chadoeuf, J., Monestiez, P., Sauve, C., Cortet, J., Cabaret, J., 2006. Estimation of abomasum strongyle nematode infections in sheep at necropsy: Tentative proposals for

- a simplified technique. *Veterinary Parasitology* 140, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.03.021>
- Gasbarre, L.C., 1994. *Ostertagia ostertagi*: changes in lymphoid populations in the local lymphoid tissues after primary or secondary infection, *Veterinary Parasitology* 55, 105–114
- Gasser, R.B., Bott, N.J., Chilton, N.B., Hunt, P., Beveridge, I., 2008. Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock - Bionomic and biotechnological implications. *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.03.003>
- George, M.M., Paras, K.L., Howell, S.B., Kaplan, R.M., 2017. Utilization of composite fecal samples for detection of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of cattle. *Veterinary Parasitology* 240, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.04.024>
- Gibbons, L.M., Khalil, L.F., 1982. A key for the identification of genera of the nematode family Trichostrongylidae Leiper, 1912. *Journal of Helminthology* 56, 185–233. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00034581>
- Gibbs, H. C., 1986. Hypobiosis in parasitic nematodes – an update. *Advances in Parasitology*, 25, 129–174.
- Gieseck, R.L., Wilson, M.S., Wynn, T.A., 2018. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.90>
- Gordon, H.M., Whitlock, H.V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Council of Scientific and Industrial Research*. 12, 50–52.
- Grandi, G., Uhlhorn, H., Ågren, E., Mörner, T., Righi, F., Osterman-Lind, E., Neimanis, A., 2018. Gastrointestinal parasitic infections in dead or debilitated moose (*alces alces*) in SWEDEN. *Journal of Wildlife Diseases* 54, 165–169. <https://doi.org/10.7589/2017-03-057>
- Gunn, A., Irvine, R.J., Gunn, A., Irvine, R.J., 2003. Linked references are available on JSTOR for this article : Subclinical parasitism and ruminant foraging strategies-a review 31, 117–126.
- Gutiérrez, E.E., Helgen, K.M., McDonough, M.M., Bauer, F., Hawkins, M.T.R., Escobedo-Morales, L.A., Patterson, B.D., Maldonado, J.E., 2017. A gene-tree test of the traditional taxonomy of american deer: The importance of voucher specimens, geographic data, and dense sampling. *ZooKeys* 697, 87–131. <https://doi.org/10.3897/zookeys.697.15124>

- Hagen, R., Heurich, M., Kröschel, M., Herdtfelder, M., 2014. Synchrony in hunting bags: Reaction on climatic and human induced changes? *Science of the Total Environment* 468–469, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.022>
- Halvorsen, O., 1986 Epidemiology of reindeer parasites. *Parasitology Today* 2, 334-339.
- Halvorsen, O., Stien, A., Irvine, J., Langvatn, R., Albon, S., 1999. Evidence for continued transmission of parasitic nematodes in reindeer during the Arctic winter. *International Journal for Parasitology* 29, 567–579. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(99\)00005-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(99)00005-3)
- Hansen, J., Perry, B.D., 1994. The epidemiology, diagnosis, and control of helminth parasites of ruminants : a handbook. International Laboratory for Research on Animal Diseases.
- Harmon, A.F., Williams, Z.B., Zarlenga, D.S., Hildreth, M.B., 2007. Real-time PCR for quantifying *Haemonchus contortus* eggs and potential limiting factors. *Parasitological Research*. 101, 71–76.
- Hasnain, S.Z., Gallagher, A.L., Grencis, R.K., Thornton, D.J., 2013. A new role for mucins in immunity; insights from gastrointestinal nematode infection. *International Journal for Biochemistry and Cellular Biology* 45, 364–374.
- Hassanin, A., Delsuc, F., Ropiquet, A., Hammer, C., Jansen Van Vuuren, B., Matthee, C., Ruiz-Garcia, M., Catzeflis, F., Areskoug, V., Nguyen, T.T., Couloux, A., 2012. Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *Comptes Rendus Biologies* 335, 32–50
- Heckeberg, N.S., 2020. The systematics of the Cervidae: A total evidence approach. *PeerJ*. <https://doi.org/10.7717/peerj.8114>
- O. Henegariu, N.A. Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., Vogt, P.H., 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol *BioTechniques* 23, 504-5.
- Heurich, M., Brand, T.T.G., Kaandorp, M.Y., Šustr, P., Müller, J., Reineking, B., 2015. Country, cover or protection: What shapes the distribution of red deer and roe deer in the Bohemian Forest Ecosystem? *PLoS ONE* 10, 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120960>
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., Griffith, R., 1992. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA Sequences. *BioTechnology* 10, 413–417. <https://doi.org/10.1038/nbt0492-413>

- Hoang, V.C., Williams, M.A.K., Simpson, H. v., 2010. Effects of weaning and infection with *Teladorsagia circumcincta* on mucin carbohydrate profiles of early weaned lambs. *Veterinary Parasitology* 171, 354–360. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.007>
- Hoberg, E.P., Abrams, A., Carreno, R.A., Lichtenfels, J.R., 2002. *Ashworthius patriciapilittae* n. sp. (Trichostrongyloidea: Haemonchinae), an abomasal nematode in *odocoileus virginianus* from costa rica, and a new record for species of the genus in the western hemisphere, *Journal for Parasitology* 88, 1189-199.
- Hoberg, E.P., Kocan, A.A., Lora, G.R., 2001. Gastrointestinal strongyles in wild ruminants. In: Samuel, W.M., Pybus, M.J., Kocan, A.A. (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Mammals*. Iowa State University Press, Ames, United States, pp. 193–227.
- Hoberg, E.P., Lichtenfels, J.R., 1994. Phylogenetic Systematic Analysis of the Trichostrongylidae (Nematoda), with an Initial Assessment of Coevolution and Biogeography, Source: *The Journal of Parasitology*.
- Hoberg, E.P., Lichtenfels, J.R., Gibbons, L., 2004. Phylogeny for species of *Haemonchus* (Nematoda: Trichostrongyloidea): Considerations of their evolutionary history and global biogeography among Camelidae and Pecora (Artiodactyla). *Journal of Parasitology* 90, 1085–1102. <https://doi.org/10.1645/GE-3309>
- Hoberg, E.P., Monsen, K.J., Kutz, S., Blouin, M.S., 1999. Structure, Biodiversity, and Historical Biogeography of Nematode Faunas in Holarctic Ruminants: Morphological and Molecular Diagnoses for *Teladorsagia boreoarcticus* n. sp. (Nematoda: Ostertagiinae), a Dimorphic Cryptic Species in Muskoxen (*Ovibos moschatus*), Source: *The Journal of Parasitology* 85, 910-934.
- Hoberg, E.P., Zarlenga, D.S., 2016. Evolution and Biogeography of *Haemonchus contortus*. Linking Faunal Dynamics in Space and Time., *Advances in Parasitology* 93, 1-30. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.021>
- Höeglund, J., Wilhelmsson, E., Christensson, D., Moè Rner, T., Waller, P., Mattsson, J.G., 1999. ITS2 sequences of *Dictyocaulus* species from cattle, roe deer and moose in Sweden: molecular evidence for a new species, *International Journal for Parasitology* 29, 607-611
- Hofmann, R.R., 1989. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive systém. *Oecologia* 78, 443-457.
- Hoorens, P.R., Rinaldi, M., Li, R.W., Goddeeris, B., Claerebout, E., Vercruyse, J., Geldhof, P., 2011. Genome wide analysis of the bovine mucin genes and their gastrointestinal transcription profile. *BMC Genomics* 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-140>

- Horcajada-Sánchez, F., Escribano-Ávila, G., Lara-Romero, C., Virgós, E., Barja, I., 2019. The effect of livestock on the physiological condition of roe deer (*Capreolus capreolus*) is modulated by habitat quality. *Scientific Reports* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52290-7>
- Hoste, H., Sotiraki, S., Landau, S.Y., Jackson, F., Beveridge, I., 2010. Goat-Nematode interactions: Think differently. *Trends in Parasitology* 26, 376–381. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.04.007>
- Hubert, J., Kerboeuf, D., 1984. A new method for culture of larvae used in diagnosis of ruminant gastrointestinal strongylosis: comparison with fecal cultures. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 48, 63–71.
- Ingham, A., Reverter, A., Windon, R., Hunt, P., Menzies, M., 2008. Gastrointestinal nematode challenge induces some conserved gene expression changes in the gut mucosa of genetically resistant sheep. *International Journal for Parasitology* 38, 431–442. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.07.012>
- Irvine, R.J., Corbishley, H., Pilkington, J.G., Albon, S.D., 2006. Low-level parasitic worm burdens may reduce body condition in free-ranging red deer (*Cervus elaphus*). *Parasitology* 133, 465–475. <https://doi.org/10.1017/S0031182006000606>
- Irvine, R.J., Stien, A., Halvorsen, O., Langvatn, R., Albon, S.D., 2000. Life-history strategies and population dynamics of abomasal nematodes in Svalbard reindeer (*Rangifer tarandus platyrhynchus*). *Parasitology* 120, 297–311. <https://doi.org/10.1017/S0031182099005430>
- Jaheed, E., 2021. Study of Blood Serum Biochemical Profile and Pathological Changes in <i>Haemonchosis</i> Experimentally Induced in Goats. *American Journal of BioScience* 9, 95. <https://doi.org/10.11648/j.ajbio.20210903.14>
- Kaplan, R.M., Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* 186, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.048>
- Karbowiak, G., Demiaszkiewicz, A.W., Pyziel, A.M., Wita, I., Moskwa, B., Werszko, J., Bień, J., Goździk, K., Lachowicz, J., Cabaj, W., 2014. The parasitic fauna of the European bison (*Bison bonasus*) (Linnaeus, 1758) and their impact on the conservation. Part 2 The structure and changes over time. *Acta Parasitologica* 59, 372–379. <https://doi.org/10.2478/s11686-014-0253-z>
- Kassai, T., 1999. *Veterinary Helminthology*. Butterworth Heinemann, Oxford, UK.

- Kemper, K.E., Palmer, D.G., Liu, S.M., Greeff, J.C., Bishop, S.C., Karlsson, L.J.E., 2010. Reduction of faecal worm egg count, worm numbers and worm fecundity in sheep selected for worm resistance following artificial infection with *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Veterinary Parasitology* 171, 238–246. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.005>
- Knight, P.A., Pate, J., Smith, W.D., Miller, H.R.P., 2007. An ovine chitinase-like molecule, chitinase-3 like-1 (YKL-40), is upregulated in the abomasum in response to challenge with the gastrointestinal nematode, *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 20, 55–60.
- Kobata, A., 1992. Structures and functions of the sugar chains of glycoproteins. *European Journal for Biochemistry* 209, 483–501.
- Kokeš, O., 1970. Asijští jeleni na území Československa. *Ochrana Fauny* 4, 158-161.
- Kołodziej-Sobocińska, M., 2019. Factors affecting the spread of parasites in populations of wild European terrestrial mammals. *Mammal Research* 64, 301–318. <https://doi.org/10.1007/s13364-019-00423-8>
- Kołodziej-Sobocińska, M., Demiaszkiewicz, A.W., Lachowicz, J., Borowik, T., Kowalczyk, R., 2016a. Influence of management and biological factors on the parasitic invasions in the wild-spread of blood-sucking nematode *Ashworthius sidemi* in European bison (*Bison bonasus*). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 5, 286–294. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2016.09.005>
- Kołodziej-Sobocińska, M., Demiaszkiewicz, A.W., Pyziel, A.M., Kowalczyk, R., 2018. Increased Parasitic Load in Captive-Released European Bison (*Bison bonasus*) has Important Implications for Reintroduction Programs. *EcoHealth* 15, 467–471. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1327-4>
- Kołodziej-Sobocińska, M., Demiaszkiewicz, A.W., Pyziel, A.M., Marczuk, B., Kowalczyk, R., 2016b. Does the blood-sucking nematode *Ashworthius sidemi* (Trichostrongylidae) cause deterioration of blood parameters in European bison (*Bison bonasus*)? *European Journal of Wildlife Research* 62, 781–785. <https://doi.org/10.1007/s10344-016-1037-6>
- Kołodziej-Sobocińska, M., Pyziel, A.M., Demiaszkiewicz, A.W., Borowik, T., Kowalczyk, R., 2016c. Pattern of parasite egg shedding by European bison (*Bison bonasus*) in the Białowieża Primeval Forest, Poland. *Mammal Research* 61, 179–186. <https://doi.org/10.1007/s13364-016-0270-4>

- Kopecký, M., Vojta, J., 2009. Land use legacies in post-agricultural forests in the Doupovské Mountains, Czech Republic. *Applied Vegetation Science* 12, 251–260. <https://doi.org/10.1111/j.1654-109X.2009.01023.x>
- Kostyaev PE (1969) A new nematode of the genus *Ashworthius* (Trichostrongylidae) from maral deer (in Russian). *Sbornik nauchni-issledovatelski Rab Altai Lab* 2, 162–168.
- Kotrla B. Kotrly A. Kozdon O., 1976. Studies on the specificity of the nematode *Ashworthius sidemi* Schulz, 1933. *Acta Veterinaria Brno* 45, 123–126.
- Kowal, J., Nosal, P., Bonczar, Z., Wajdzik, M., 2012. Parasites of captive fallow deer (*Dama dama* L.) from southern Poland with special emphasis on *Ashworthius sidemi*. *Annals of parasitology* 58, 23–26.
- Kuzmina, T., Kharchenko, V., Malega, A., 2010. Helminth fauna of roe deer (*Capreolus capreolus*) in Ukraine: Biodiversity and parasite community. *Vestnik Zoologii* 44, 12–19. <https://doi.org/10.2478/v10058-010-0002-1>
- Laca Megyesi, Š., Königová, A., Babják, M., Molnár, L., Rajský, M., Szeštáková, E., Major, P., Soroka, J., Urda Dolinská, M., Komáromyová, M., Várady, M., 2020. Wild ruminants as a potential risk factor for transmission of drug resistance in the abomasal nematode *Haemonchus contortus*. *European Journal of Wildlife Research* 66. <https://doi.org/10.1007/s10344-019-1351-x>
- Lancaster, M.B., Hong, C., 1990. The Identification of Females within the Subfamily Ostertagiinae Lopez-Neyra 1947, *Veterinary Parasitology* 120, 503
- Lawton, D.E.B., Reynolds, G.W., Hodgkinson, S.M., Pomroyt, W.E., Simpson, H. v, 1996. Infection of Sheep with Adult and Larval *Ostertagia circumcincta* Effects on Abomasal pH and Serum Gastrin and Pepsinogen, *Journal for Parasitology* 26, 1063-1074.
- Lehrter, V., Jouet, D., Liénard, E., Decors, A., Patrelle, C., 2016. *Ashworthius sidemi* Schulz, 1933 and *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803) in cervids in France: integrative approach for species identification. *Infection, Genetics and Evolution* 46, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.10.027>
- Lichtenberger, L.M., 1999. Gastroduodenal mucosal defense. *Current Opinion in Gastroenterology* 15, 463–472.
- Lichtenfels, J.R., Hoberg, E.P., 1993. The systematics of nematodes that cause ostertagiasis in domestic and wild ruminants in North America: an update and a key to species, *Veterinary Parasitology* 46, 33–53.
- 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. <https://doi.org/10.2307/3283353>
- 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, Source: The *Journal of Parasitology* 80, 976-996.
- Liénard, E., Depaquit, J., Ferté, H., 2006. *Spiculopteraugia mathevossiani* Ruchliadev, 1948 is the minor morph of *Spiculopteraugia spiculoptera* (Gushanskaya, 1931): Molecular evidence. *Veterinary Research* 37, 683–694. <https://doi.org/10.1051/vetres:2006030>
- Ljunggren, E.L., Gozdzik, K., Stefański, W., 2007. Sequencing of the *Ashworthius sidemi* genomic rRNA genes and internal transcribed spacers *Wiadomości Parazytologiczne* 54.
- Magalhães, A., Gomes, J., Ismail, M. N., Haslam, S.M., Mendes, N., Osório, H., Leonor, D., LePendou, J., Hassa, R., Dell, A., Borén, T., Reis, C.A., 2009., Fut2 null mice display an altered glycosylation profile and impaired BabA-mediated *Helicobacter pylori* adhesion to gastric mucosa. *Glycobiology* 19, 1525–1536
- Manfredi, M.T., di Cerbo, A.R., Tranquillo, V., Nassuato, C., Pedrotti, L., Piccolo, G., 2007. Abomasal nematodes of the red deer *Cervus elaphus* in north-eastern Italy. *Journal of Helminthology* 81, 247–253. <https://doi.org/10.1017/S0022149X07739032>
- Manninen, S.M., Thamsborg, S.M., Laaksonen, S., Oksanen, A., 2014. The reindeer abomasal nematode (*Ostertagia gruehneri*) is naturally transmitted to sheep when sharing pastures. *Parasitology Research* 113, 4033–4038. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-4071-x>
- McKenna, P.B., 2008. Comparison of two worm counting procedures for the enumeration of abomasal and small intestinal nematode parasites of sheep. *Veterinary Parasitology* 157, 254–259. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.08.003>
- Meeusen, E.N., Balic, A., 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitology today* 16, 95–101.
- Moradpour, N., Borji, H., Razmi, G., Maleki, M., Kazemi, H., 2013. Pathophysiology of *Marshallagia marshalli* in experimentally infected lambs. *Parasitology* 140, 1762–1767. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001042>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.013>
- 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 and Vectors* 7, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-215>
- Mulrooney, D.M., Bishop, J.K., Zimmerman, G.L., 1991. Research Note - First Report of *Ostertagia leptospicularis* (Nematoda: Trichostrongyloidea) in Calves (*Bos taurus*) from North America, *Journal of Helminthological Society of Washington* 58. 260-262
- Mysterud, A., n.d. Seasonal migration pattern and home range of roe deer (*Capreolus capreolus*) in an altitudinal gradient in southern Norway. *Journal of Zoology* 247, 497-486.
- Mysterud, A., Østbye, E., 2006. Comparing simple methods for ageing roe deer *Capreolus capreolus*: Are any of them useful for management? *Wildlife Biology* 12, 101–107. [https://doi.org/10.2981/0909-6396\(2006\)12\[101:CSMFAR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2981/0909-6396(2006)12[101:CSMFAR]2.0.CO;2)
- Nagy, G., Csivincsik, Á., Sugár, L., Zsolnai, A., 2017. Benzimidazole resistance within red deer, roe deer and sheep populations within a joint habitat in Hungary. *Small Ruminant Research* 149, 172–175. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.02.012>
- Newlands, G.F.J., Miller, H.R.P., Jackson, F., 1990. Immune Exclusion of *Haemonchus contortus* Larvae in the Sheep: Effects on Gastric Mucin of Immunization, Larval Challenge and Treatment with Dexamethasone, *Journal of Comparative Pathology* 102.
- Nicholls, J., Obendorf, D.L., 1994. Application of a composite faecal egg count procedure in diagnostic parasitology. *Veterinary Parasitology* 52, 337–342. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(94\)90125-2](https://doi.org/10.1016/0304-4017(94)90125-2)
- Nielsen, M.K., 2021. What makes a good fecal egg count technique? *Veterinary Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109509>
- Nosal, P., Kowal, J., Wyrobisz-Papiewska, A., Chovancová, G., 2021. *Ashworthius sidemi* Schulz, 1933 (Trichostrongylidae: Haemonchinae) in mountain ecosystems – a potential risk for the Tatra chamois *Rupicapra rupicapra tatica* (Blahout, 1971/1972). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 14, 117–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2021.01.010>
- O'Connor, L.J., Walkden-Brown, S.W., Kahn, L.P., 2006a. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology* 142, 1-15 <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.035>

- Orr M., Mackintosh, C., Walker, G., 1990. Chronic ill thrift in elk. *Surveillance* (Wellington) 17, 11–2
- 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.
- Ota, H., Katsuyama, T., 1992. Alternating laminated array of two types of mucin in the human gastric surface mucous layer. *Journal of Histochemistry*. 24, 86–92.
- Palais, R., Wittwer, C.T., 2009. Chapter 13 Mathematical Algorithms for High-Resolution DNA Melting Analysis. *Methods in Enzymology* 454. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(08\)03813-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(08)03813-5)
- Paraud, C., Pors, I., Chicard, C., Chartier, C., 2006. Comparative efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in goat faeces: Influence of the duration and of the temperature of coproculture. *Parasitology Research* 98, 207–213. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-0028-4>
- Pato, F.J., Vázquez, L., Díez-Baños, N., López, C., Sánchez-Andrade, R., Fernández, G., Díez-Baños, P., Panadero, R., Díaz, P., Morrondo, P., 2013. Gastrointestinal nematode infections in roe deer (*Capreolus capreolus*) from the NW of the Iberian Peninsula: Assessment of some risk factors. *Veterinary Parasitology* 196, 136–142. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.027>
- Pedersen, A.B., Fenton, A., 2015. The role of antiparasite treatment experiments in assessing the impact of parasites on wildlife. *Trends in Parasitology* 31, 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.02.004>
- Pérez, J., García, P., Hernandez, S., Martínez-Moreno, A., De Las Mulas, J.M., Camara, S., 2001. Pathological and immunohistochemical study of the abomasum and abomasal lymph nodes in goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Research* 32, 463–473.
- Pike, A.W., 1969. A revision of the genus *Ashworthius* Le Roux, 1930 (Nematoda: Trichostrongylidae). *Journal of Helminthology* 43,135–144.
- Pursglove, S.R., A.K., Prestwood, V.F., Nettles, F.A. Hayes., 1976. Intestinal nematodes of white-tailed deer in southeastern United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 169, 896-900.

- Putnová, L.Š., Štohl, R., Ernst, M., Svobodová, K., 2021. A microsatellite genotyping-based genetic study of interspecific hybridization between the red and sika deer in the western czech republic. *Animals* 11. <https://doi.org/10.3390/ani11061701>
- Pyziel, A.M., Laskowski, Z., Höglund, J., 2015. Development of a multiplex PCR for identification of *Dictyocaulus* lungworms in domestic and wild ruminants. *Parasitology Research* 114, 3923–3926. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4657-y>
- Radwan, J., Demiaszkiewicz, A.W., Kowalczyk, R., Lachowicz, J., Kawałko, A., Wójcik, 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. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.05.012>
- Rashid, M.H., Gebrekidan, H., Jabbar, A., 2018. Multiplexed-tandem PCR (MT-PCR) assay to detect and differentiate gastrointestinal nematodes of alpacas. *Parasites and Vectors* 11. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2963-9>
- Rehbein, S., Visser, M., 2007. Die endoparasiten des Sikawildes (*Cervus nippon*) in Österreich. *Wiener Klinische Wochenschrift* 119, 96–101. <https://doi.org/10.1007/s00508-007-0865-5>
- Rehbein, S., Visser, M., Hamel, D., Reindl, H., 2021. Occurrence of the giant liver fluke, *Fascioloides magna*, in sympatric wild ungulates in one area in the Upper Palatinate Forest (northeastern Bavaria, Germany). *Parasitology Research* 120, 553–561. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-06996-7>
- Rehbein, V.S., Visser, M., LLrr, W., 2003. *Spiculopteraigia houdemeri* (Schwartz, 1926) (Nematoda, Trichostrongylidae, Ostertagiinae) aus Asiens bei Sikahirschen (*Cervus nippon*) in Deutschland. *Zeitschrift fuer Jagdwissenschaft* 49. <https://doi.org/10.1007/s>
- Reslová, N., Škorpíková, L., Slaný, M., Pozio, E., Kašný, M., 2017. Fast and Reliable Differentiation of Eight *Trichinella* Species Using a High Resolution Melting Assay. *Scientific Reports* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16329-x>
- Richard, E., Gaillard, J.M., Saïd, S., Hamann, J.L., Klein, F., 2010. High red deer density depresses body mass of roe deer fawns. *Oecologia* 163, 91–97. <https://doi.org/10.1007/s00442-009-1538-z>
- Rinaldi, L., Coles, G.C., Maurelli, M.P., Musella, V., Cringoli, G., 2011. Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Veterinary Parasitology* 177, 345–352. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.12.010>

- Rinaldi, M., Dreesen, L., Hoorens, P.R., Li, R.W., Claerebout, E., Goddeeris, B., Vercruyse, J., van den Broek, W., Geldhof, P., 2011. Infection with the gastrointestinal nematode *Ostertagia ostertagi* in cattle affects mucus biosynthesis in the abomasum. *Veterinary Research* 42. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-61>
- Roeber, F., Jex, A.R., Campbell, A.J.D., Campbell, B.E., Anderson, G.A., Gasser, R.B., 2011. Evaluation and application of a molecular method to assess the composition of strongylid nematode populations in sheep with naturally acquired infections. *Infection, Genetics and Evolution* 11, 849–854. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.01.013>
- Roeber, F., Morrison, A., Casaert, S., Smith, L., Claerebout, E., Skuce, P., 2017. Multiplexed-tandem PCR for the specific diagnosis of gastrointestinal nematode infections in sheep: an European validation study. *Parasites and Vectors* 10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2165-x>
- Roepstorff, Allan., Nansen, P., Food and Agriculture Organization of the United Nations., 1998. Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Romportl, D., Bláhová, A., Andreas, M., Chumanová, E., Anděra, M., Červený, J., 2017. Current distribution and habitat preferences of red deer and eurasian elk in the Czech Republic. *European Journal of Environmental Sciences* 7, 50–62. <https://doi.org/10.14712/23361964.2017.5>
- Rose, H., Hoar, B., Kutz, S.J., Morgan, E.R., 2014. Exploiting parallels between livestock and wildlife: Predicting the impact of climate change on gastrointestinal nematodes in ruminants. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 3, 209–219. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.01.001>
- Rowe, A., Gondro, C., Emery, D., Sangster, N., 2009. Sequential microarray to identify timing of molecular responses to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Veterinary Parasitology* 161, 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.12.023>
- Řezáč, P. 1987. First finding of the nematode *Spiculopteroides dagestanica* (Altaev, 1953) Jansen, 1958 in Czechoslovakia. *Folia Parasitologica* 34, 37-38.
- Santín-Durán, M., Alunda, J.M., Hoberg, E.P., de La Fuente, C., 2008. Age distribution and seasonal dynamics of abomasal helminths in wild red deer from central Spain. *Journal of Parasitology* 94, 1031–1037. <https://doi.org/10.1645/GE-1109.1>
- Santín-Durán, M., Alunda, J.M., Hoberg, E.P., de La Fuente, C., 2004. Abomasal parasites in wild sympatric cervids, red deer, *Cervus elaphus* and fallow deer, *Dama dama*, from

- three localities across Central and Western Spain: Relationship to host density and park management. *Journal of Parasitology* 90, 1378–1386. <https://doi.org/10.1645/GE-3376>
- Santín-Durán, M., de la Fuente, C., Alunda, J.M., Rosenthal, B.M., Hoberg, E.P., 2002. Suárez and Cabaret, 1992), allozyme electrophoresis (Andrews and Beveridge, 1990; Gasnier et al., 1993), and comparisons of DNA sequences, *Journal of Parasitology* 88, 417-418.
- Sargison, N.D., Wilson, D.J., Bartley, D.J., Penny, C.D., Jackson, F., 2007. Haemonchosis and teladorsagiosis in a Scottish sheep flock putatively associated with the overwintering of hypobiotic fourth stage larvae. *Veterinary Parasitology* 147, 326–331. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.04.011>
- Schönfeld, F., 2009. Presence of moose (*Alces alces*) in Southeastern Germany. *European Journal of Wildlife Research* 55, 449–453. <https://doi.org/10.1007/s10344-009-0272-5>
- Scott, I., Khalaf, S., Simcock, D.C., Knight, C.G., Reynolds, G.W., Pomroy, W.E., Simpson, H. v., 2000. A sequential study of the pathology associated with the infection of sheep with adult and larval *Ostertagia circumcincta*, *Veterinary Parasitology* 89, 79-94.
- Scott, I., Umair, S., Savoian, M.S., Simpson, H. v., 2017. Abomasal dysfunction and cellular and mucin changes during infection of sheep with larval or adult *Teladorsagia circumcincta*. *PLoS ONE* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186752>
- Sharpe, C., Thornton, D.J., Grecis, R.K., 2018. A sticky end for gastrointestinal helminths; the role of the mucus barrier. *Parasite Immunology* 40. <https://doi.org/10.1111/pim.12517>
- Simpson, H. v., 2000. Pathophysiology of Abomasal Parasitism: Is the Host or Parasite Responsible? *Veterinary Journal* 160, 177-191. <https://doi.org/10.1053/tvj.2000.0491>
- Simpson, H. v., Simpson, B.H., Simcock, D.C., Reynolds, G.W., Pomroy, W.E., 1999a. Abomasal secretion in sheep receiving adult *ostertagia circumcincta* that are prevented from contact with the mucosa. *New Zealand Veterinary Journal* 47, 20–24. <https://doi.org/10.1080/00480169.1999.36102>
- Simpson, H. v., Simpson, B.H., Simcock, D.C., Reynolds, G.W., Pomroy, W.E., 1999b. Abomasal secretion in sheep receiving adult *ostertagia circumcincta* that are prevented from contact with the mucosa. *New Zealand Veterinary Journal* 47, 20–24. <https://doi.org/10.1080/00480169.1999.36102>
- Simpson, H. v., Umair, S., Hoang, V.C., Savoian, M.S., 2016a. Histochemical study of the effects on abomasal mucins of *Haemonchus contortus* or *Teladorsagia circumcincta*

- infection in lambs. *Veterinary Parasitology* 226, 210–221.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.06.026>
- Stanley, K.K., Szewczuk, E., 2005. Multiplexed tandem PCR: Gene profiling from small amounts of RNA using SYBR Green detection. *Nucleic Acids Research* 33.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gni182>
- Stromberg, B.E., 1997. Environmental factors influencing transmission. *Veterinary Parasitology* 72, 247–264. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00100-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00100-3)
- Suarez, V.H., Cabaret, J., Gruner, L., 1995. Morphological polymorphism in the nematode *Teladorsagia circumcincta* in relation to age of larvae, infection mode and lamb characteristics in experimental conditions. *International Journal for Parasitology* 25, 1173–1177. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(95\)00049-8](https://doi.org/10.1016/0020-7519(95)00049-8)
- Sultan, K., Omar, M., Makouloutou, P., Kaneshiro, Y., Saita, E., Yokoyama, M., Suzuki, K., Hosoi, E., Sato, H., 2014. Molecular genetic conspecificity of *Spiculopteragia houdemeri* (Schwartz, 1926) and *S. andreevae* (Drózd, 1965) (Nematoda: Ostertagiinae) from wild ruminants in Japan. *Journal of Helminthology* 88, 1–12.  
<https://doi.org/10.1017/S0022149X12000521>
- Švrčula, V., Košinová, K., Okrouhlá, M., Chodová, D., Hart, V., 2019. The effect of sex on meat quality of fallow deer (*Dama dama*) from the farm located in the Middle Bohemia. *Italian Journal of Animal Science* 18, 498–504.  
<https://doi.org/10.1080/1828051X.2018.1542979>
- Sweeny, A.R., Corripio-Miyar, Y., Bal, X., Hayward, A., Pilkington, J.G., McNeilly, T.N., Nussey, D.H., Kenyon, F., 2022. Longitudinal dynamics of co-infecting gastrointestinal parasites in a wild sheep population. *Parasitology* 1–39.  
<https://doi.org/10.1017/S0031182021001980>
- Świsłocka, M., Ratkiewicz, M., Borkowska, A., 2021. Simultaneous infection of *Elaphostrongylus* nematode species and parasite sharing between sympatrically occurring cervids: Moose, roe deer, and red deer in Poland. *Pathogens* 10.  
<https://doi.org/10.3390/pathogens10101344>
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L., 2016. *Veterinary parasitology*. 4th Edition. Wiley-Blackwell. ISBN: 978-0-470-67162-7
- Togni, T., Manfredi, M.T., DiCerbo, A.R., Zanzani, S., Gioppo, S., Piccolo, G., Bregoli, M., Trevisiol, K., 2004. Abomasal nematodes community in Cervidae (*Cervus elaphus* and *Capreolus capreolus*) from the Trentino Alto Adige (North Italy). *Parassitologia* 46, p71.

- Umair, S., Mc Murtry, L.W., Knight, J. S., Simpson, H. V., 2016. Use of fluorescent lectin binding to distinguish eggs of gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Veterinary parasitology*. 217, 76–80.
- Vadlejch, J., Kotrba, R., Čadková, Z., Ružičková, A., Langrová, I., 2015. Effects of age, sex, lactation and social dominance on faecal egg count patterns of gastrointestinal nematodes in farmed eland (*Taurotragus oryx*). *Preventive Veterinary Medicine* 121, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.07.006>
- Vadlejch, J., Kyriánová, I.A., Rylková, K., Zikmund, M., Langrová, I., 2017. Health risks associated with wild animal translocation: a case of the European bison and an alien parasite. *Biological Invasions* 19, 1121–1125. <https://doi.org/10.1007/s10530-016-1306-z>
- van den Brink, G.R., Tytgat, K.M.A.J., Van der Hulst, R.W.M., Van der Loos, C.M., Einerhand, A., Büler, H., Dekker, J., 2000. *H. pylori* colocalises with MUC5AC in the human stomach. *Gut* 46, 601–607.
- van Dyken, S.J., Locksley, R.M., 2013. Interleukin-4-and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: Roles in homeostasis and disease. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095906>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.012>
- 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. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v80i1.539>
- Veiberg, V., Nilsen, E.B., Rolandsen, C.M., Heim, M., Andersen, R., Holmstrøm, F., Meisingset, E.L., Solberg, E.J., 2020. The accuracy and precision of age determination by dental cementum annuli in four northern cervids. *European Journal of Wildlife Research* 66. <https://doi.org/10.1007/s10344-020-01431-9>
- Verheyden, H., Richomme, C., Sevila, J., Merlet, J., Lourtet, B., Chaval, Y., Hoste, H., 2020. Relationship between the excretion of eggs of parasitic helminths in roe deer and local livestock density. *Journal of Helminthology* 94, 1–6. <https://doi.org/10.1017/S0022149X20000449>
- Vetýška, V., 1980. Endoparasites of Roe Deer in the Strakonice Region. *Acta Veterinaria Brno* 49, 91–103. <https://doi.org/10.2754/avb198049010091>

- von-Samson-Himmelstjerna, G.V., Harder, A., Schnieder, T., 2002 Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. *International Journal for Parasitology* 32, 1529–35.
- Waller, P.J., 2005. *Haemonchus contortus*: Parasite problem No. 1 from Tropics-Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology, *Tropical Biomedicine* 22, 131-137.
- Waller, P.J., Donald, A.D., Dobson, R.J., 1981. Arrested development of intestinal *Trichostrongylus* spp in grazing sheep and seasonal changes in the relative abundance of *T. colubriformis* and *T. vitrinus*. *Research in Veterinary Science* 30, 213–216. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)32583-9](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32583-9)
- Wang, Y., Zhu, W., Levy, D.E., 2006. Nuclear and cytoplasmic mRNA quantification by SYBR green based real-time RT-PCR. *Methods* 39, 356–362. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.06.010>
- Ward, M.P., Lyndal-Murphy, M., Baldock, F.C., 1997. Evaluation of a composite method for counting helminth eggs in cattle faeces, *veterinary parasitology* ELSEVIER *Veterinary Parasitology*.
- Winter, J., Rehbein, S., Joachim, A., 2018. Transmission of helminths between species of ruminants in Austria appears more likely to occur than generally assumed. *Frontiers in Veterinary Science* 5, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00030>
- Wood A'l, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone, J.B., Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylor, S.M., Vercruyse, J., 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 ruminants (bovine, ovine, caprine), *Veterinary Parasitology* 58, 181-213.
- Woodbury, M.R., Parry, N.M.A., 2009. Abomasal parasite syndrome in North American elk (*Cervus elaphus canadensis*). *New Zealand Veterinary Journal* 57, 235–240. <https://doi.org/10.1080/00480169.2009.36908>
- Wolf, R., Vavruněk, J. 1975–1976. Sika východní *Cervus nippon Temm.* V západních Čechách. *Sborník Vědeckého lesnického Ústavu VŠZ v Praze* 18–19, 185 – 199.
- Wynn, T.A., 2004. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nature Reviews Immunology* 4, 583-594. <https://doi.org/10.1038/nri1412>
- Wyrobisz-Papiewska, A., Kowal, J., Nosal, P., Chovancová, G., Rehbein, S., 2018. Host specificity and species diversity of the Ostertagiinae Lopez-Neyra, 1947 in ruminants:



- A European perspective. *Parasites and Vectors* 11, 1–10.  
<https://doi.org/10.1186/s13071-018-2958-6>
- Zaffaroni, E., Citterio, C., Sala, M., Lauzi, S., 1997. Impact of abomasal nematodes on roe deer and chamois body condition in an alpine environment. *Parassitologia* 39, 313–317.
- Zaffaroni, E., Manfredi, M.T., Citterio, C., Sala, M., Piccolo, G., Lanfranchi, P., 2000. Host specificity of abomasal nematodes in free ranging alpine ruminants, *Veterinary Parasitology* 90, 221-230.
- Zajac, A.M., Conboy, G.A., 2012. *Veterinary Clinical Parasitology*, 8th edition. Wiley-Blackwell. Iowa State University Press. p. 3–16. ISBN: 0813820537.
- Zarlenga, D.S., Higgins, J., 2001. PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology, *Veterinary Parasitology* 101, 215-230.
- Zarlenga, D.S., Hoberg, E.P., Tuo, W., 2016. The Identification of *Haemonchus* Species and Diagnosis of Haemonchosis. *Advances in Parasitology* 93, 145–180.  
<https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.02.023>



# PŘÍLOHY

*Příloha 1: původ jedinců A. sidemi a H. contortus podrobených analýze qPCR-HRM*

ID	Parazit		Hostitel	Kraj
	Druh	Pohlaví		
1M	<i>A. sidemi</i>	samec	zubr evropský ( <i>Bison bonasus</i> )	Liberecký
2M	<i>A. sidemi</i>	samec	srnec obecný ( <i>Capreolus capreolus</i> )	Plzeňský
3M	<i>A. sidemi</i>	samec	daněk evropský ( <i>Dama dama</i> )	Liberecký
4M	<i>A. sidemi</i>	samec	jelen evropský ( <i>Cervus elaphus</i> )	Středočeský
5M	<i>A. sidemi</i>	samec	jelen evropský ( <i>Cervus elaphus</i> )	Plzeňský
6M	<i>A. sidemi</i>	samec	jelen evropský ( <i>Cervus elaphus</i> )	Liberecký
7M	<i>A. sidemi</i>	samec	jelen evropský ( <i>Cervus elaphus</i> )	Plzeňský
8M	<i>A. sidemi</i>	samec	jelen evropský ( <i>Cervus elaphus</i> )	Liberecký
9M	<i>A. sidemi</i>	samec	srnec obecný ( <i>Capreolus capreolus</i> )	Plzeňský
10M	<i>A. sidemi</i>	samec	daněk evropský ( <i>Dama dama</i> )	Liberecký
11M	<i>H. contortus</i>	samec	muflon ( <i>Ovis gmelini musimon</i> )	Liberecký
12M	<i>H. contortus</i>	samec	jelenec běloocasý ( <i>Odocoileus virginianus</i> )	Moravsko-Slezský
13M	<i>H. contortus</i>	samec	srnec obecný ( <i>Capreolus capreolus</i> )	Středočeský
14M	<i>H. contortus</i>	samec	muflon ( <i>Ovis gmelini musimon</i> )	Liberecký
15M	<i>H. contortus</i>	samec	koza bezoárová ( <i>Capra aegagrus</i> )	Liberecký
16M	<i>H. contortus</i>	samec	srnec obecný ( <i>Capreolus capreolus</i> )	Sředočeský
17M	<i>H. contortus</i>	samec	ovce domácí ( <i>Ovis aries</i> )	Jihočeský
18M	<i>H. contortus</i>	samec	ovce ( <i>Ovis aries</i> )	Jihočeský
19M	<i>H. contortus</i>	samec	koza bezoárová ( <i>Capra aegagrus</i> )	Liberecký
20M	<i>H. contortus</i>	samec	srnec obecný ( <i>Capreolus capreolus</i> )	Středočeský
1F	<i>A. sidemi</i>	samice	jelen evropský ( <i>Cervus elaphus</i> )	Plzeňský
2F	<i>A. sidemi</i>	samice	jelen evropský ( <i>Cervus elaphus</i> )	Plzeňský
3F	<i>A. sidemi</i>	samice	jelen evropský ( <i>Cervus elaphus</i> )	Liberecký
4F	<i>A. sidemi</i>	samice	jelen evropský ( <i>Cervus elaphus</i> )	Liberecký
5F	<i>A. sidemi</i>	samice	zubr evropský ( <i>Bison bonasus</i> )	Liberecký
6F	<i>A. sidemi</i>	samice	zubr evropský ( <i>Bison bonasus</i> )	Liberecký
7F	<i>A. sidemi</i>	samice	los evropský ( <i>Alces alces</i> )	Plzeňský
8F	<i>A. sidemi</i>	samice	los evropský ( <i>Alces alces</i> )	Plzeňský
9F	<i>A. sidemi</i>	samice	srnec obecný ( <i>Capreolus capreolus</i> )	Karlovarský
10F	<i>A. sidemi</i>	samice	srnec obecný ( <i>Capreolus capreolus</i> )	Karlovarský

11F	<i>A.sidemi</i>	samice	jelen evropský ( <i>Cervus elaphus</i> )	Liberecký
12F	<i>A.sidemi</i>	samice	jelen evropský ( <i>Cervus elaphus</i> )	Liberecký
13F	<i>A.sidemi</i>	samice	daněk evropský ( <i>Dama dama</i> )	Liberecký
14F	<i>A.sidemi</i>	samice	daněk evropský ( <i>Dama dama</i> )	Liberecký
15F	<i>A.sidemi</i>	samice	daněk evropský ( <i>Dama dama</i> )	Liberecký
16F	<i>H. contortus</i>	samice	muflon ( <i>Ovis gmelini musimon</i> )	Liberecký
17F	<i>H. contortus</i>	samice	jelenec běloosasý ( <i>Odocoileus virginianus</i> )	Moravsko-Slezský
18F	<i>H. contortus</i>	samice	srnec obecný ( <i>Capreolus capreolus</i> )	Středočeský
19F	<i>H. contortus</i>	samice	muflon ( <i>Ovis gmelini musimon</i> )	Liberecký
20F	<i>H. contortus</i>	samice	koza bezoárová ( <i>Capra aegagrus</i> )	Liberecký
21F	<i>H. contortus</i>	samice	srnec obecný ( <i>Capreolus capreolus</i> )	Středočeský
22F	<i>H. contortus</i>	samice	koza domácí ( <i>Capra hircus</i> )	Středočeský
23F	<i>H. contortus</i>	samice	ovce domácí ( <i>Ovis aries</i> )	Jihočeský
24F	<i>H. contortus</i>	samice	srnec obecný ( <i>Capreolus capreolus</i> )	Středočeský
25F	<i>H. contortus</i>	samice	srnec obecný ( <i>Capreolus capreolus</i> )	Plzeňský