

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství

Hlístice rodu *Trichuris* u volně žijících přežvýkavců a nutrií

doktorská disertační práce

Autor: Ing. Stanislava Nechybová

Školitel: prof. Ing. Iva Langrová, CSc.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou doktorskou dizertační práci na téma „Hlístice rodu *Trichuris* u volně žijících přežvýkavců a nutrií“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího dizertační práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury.

Datum 20. 5. 2019

.....

podpis

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala prof. Ing. Ivě Langrové, CSc. za odborné vedení mého doktorského studia, za pomoc s plánováním a získáváním materiálu k experimentům a za osobní vstřícný přístup. Také bych chtěla poděkovat kolegům a kolegyním z Katedry zoologie a rybářství za pomoc během studia. Zvláštní poděkování patří mému manželovi za psychickou podporu a zázemí, které mi poskytl během celého studia. V neposlední řadě bych rovněž chtěla poděkovat za podporu a pomoc svým kamarádkám.

Obsah

1. Úvod	6
2. Současný stav problematiky	8
2.1 Kmen hlístice (Nematoda)	8
2.2 Rod <i>Trichuris</i>	10
2.2.1 Systematické zařazení rodu <i>Trichuris</i>	10
2.2.2 Morfologie hlístic rodu <i>Trichuris</i>	11
2.2.3 Vývojový cyklus hlístic rodu <i>Trichuris</i>	12
2.3 Druhy hlístic rodu <i>Trichuris</i> vyskytující se u volně žijících přežvýkavců a nutrií	12
2.3.1 <i>Trichuris ovis</i> (Abildgaard, 1795)	12
2.3.2 <i>Trichuris discolor</i> (Linstow, 1906)	16
2.3.3 <i>Trichuris skrjabini</i> (Baskakov, 1924)	19
2.2.4 <i>Trichuris globulosa</i> (Linstow, 1901)	22
2.3.5 <i>Trichuris capreoli</i> Artjuch, 1984	25
2.3.6 <i>Trichuris myocastoris</i> Enigk, 1933	27
2.3.7 Porovnání druhových morfologických charakteristik	30
2.4 Výskyt hlístic rodu <i>Trichuris</i> u vybraných hostitelů	31
2.4.1 Výskyt v Evropě kromě České republiky	31
2.4.2 Výskyt v České republice	33
3. Hypotéza a cíle	34
4. Materiál a metodika	35
4.1 Volně žijící přežvýkavci	35
4.2 Nutrie říční	36
4.3 Helmintologická pitva	36
4.4 Koprologické vyšetření	37
4.5 Morfologická analýza	38
4.6 Molekulární analýza	38
4.7 Statistická analýza	38
5. Publikované práce	40
6. Výsledky a souhrnná diskuse	74
6.1 Výsledky a diskuse v rámci dílčích cílů	74
6.2 Souhrn výsledků analýzy hlístic rodu <i>Trichuris</i> cizopasících u volně žijících přežvýkavců v České republice	83
6.2.1 Druhy rodu <i>Trichuris</i> zjištěné u vybraných přežvýkavců v České republice	83

6.2.2 Morfologická analýza.....	83
6.2.3 Molekulární analýza	84
6.2.4 Fylogenetické vztahy	84
6.2.5 Praktické aspekty diagnostických metodik	84
6.3 Souhrn výsledků analýzy hlístic rodu <i>Trichuris</i> cizopasících u farmových a volně žijících nutrií v České republice	85
6.3.1 Druhy rodu <i>Trichuris</i> zjištěné u nutrií v České republice.....	85
6.3.2 Morfologická analýza.....	85
6.3.3 Molekulární analýza	85
6.3.4 Fylogenetické vztahy	86
6.3.5 Praktické aspekty diagnostických metodik	86
7. Závěr.....	87
8. Seznam použité literatury.....	88
9. Seznam obrázků	100
10. Seznam tabulek.....	101

1. Úvod

Volně žijící přežvýkavci jsou nedílnou součástí naší přírody a jejich úspěšný chov a následný lov je významnou složkou mysliveckého hospodaření (Hanzal, 2000). Myslivost má v České republice staré a bohaté tradice. Česká republika je svým klimatem, rozmanitostí krajiny a bohatstvím zvěře ideální pro její dobrý chov. V současnosti jsou převládajícími volně žijícími přežvýkavci ve střední Evropě, včetně České republiky, srnec obecný (*Capreolus capreolus*) a jelen evropský (*Cervus elaphus*), daněk evropský (*Dama dama*), muflon evropský (*Ovis orientalis musimon*) a jelen sika (*Cervus nippon*) (Čermák & Mrkva 2003; Kamler et al. 2010; Galuppi et al. 2011; Macháček et al. 2014).

Zajišťování dobrého zdravotního stavu zvěře, veterinární prevence a léčba patří k základním úkonům péče o zvěř. U volně žijících přežvýkavců způsobují největší přímé i nepřímé ztráty parazitární onemocnění. Gastrointestinální nematodózy patří k nejrozšířenějším a nejzávažnějším infekčním chorobám přežvýkavců po celém světě. V závislosti na intenzitě infekce zhoršují nutriční stav zvířat. Je prokázáno, že kromě zjevně nemocných zvířat jsou to i asymptomatické stavy, které mohou podstatně zhoršovat a urychlovat onemocnění jiné etiologie. Především u mláďat mohou nepříznivě ovlivňovat základní fyziologické procesy a odolnost organismu ve stadiu jeho vývinu a růstu.

Výzkumem parazitů u volně žijících přežvýkavců na území České republiky se zabývala řada autorů, například Erhardová et al. (1953), Kotrlý & Tarczynski (1958), Kotrlý & Krul (1961) a Kotrlá et al. (1984). Volně žijící zvířata mají často přístup na pastviny a parazitární choroby divokých přežvýkavců se mohou přenášet na domácí zvířata a naopak (Erhardová & Kotrlý, 1955). Mohou se však stát zdrojem nebezpečí i pro zdraví lidí (Kotrlý & Kotrlá, 1972). Jedním z parazitů s rizikem přenosu z volně žijících přežvýkavců na domácí přežvýkavce jsou hlístice rodu *Trichuris*, kterými se zabývá tato práce.

Dalším hostitelem těchto hlístic u nás je nutrie říční (*Myocastor coypus*). Je to hlodavec původem z Jižní Ameriky (Woods et al. 1992). V roce 1924 byly nutrie dovezeny z Argentiny do České republiky na farmu v Jablonném nad Orlicí jako první v Evropě. Zhruba od 70. let minulého století se v přírodě začaly objevovat nutrie uniklé z farmového chovu. Poslední mapování výskytu nutrií ve volné přírodě proběhlo v roce 2011 a jejich stálý výskyt

je hlášený na 16,2 % území ČR (Anděra 2011). Parazitární onemocnění jsou jedním z hlavních veterinárních problémů ve farmových chovech těchto hlodavců. Na farmách žijí nutrie v těsné blízkosti různých domácích zvířat, zejména malých přežvýkavců. Dobrovol'skii (1952) uvádí, že *Trichuris ovis* byl nalezen u ondatry pižmové. Nicméně, studie o parazitech nutrií jsou sporadické a zaměřují se hlavně na volně žijící nutrie (Babero & Lee 1961, Gayo et al. 2011; Martino et al. 2012). Zatížení parazity je ovlivněno mnoha faktory, jako jsou specifita hostitele, přítomnost mezipřenositelů nebo výskyt jiných zvířat, od kterých by mohlo dojít k přenosu parazita. Z těchto důvodů může docházet k rozdílnému výskytu jednotlivých endoparazitů u volně žijících nutrií a nutrií chovaných ve farmových chovech (Martino et al. 2012).

2. Současný stav problematiky

2.1 Kmen hlístice (Nematoda)

Hlístice jsou jednou z nejpočetnějších a nejrozšířenějších skupin živočichů a představují evolučně úspěšnou skupinu. Bylo popsáno téměř 23 tisíc druhů nematodů (Blaxter & Koutsovoulos 2015). Parazitují v obratlovcích, bezobratlých nebo rostlinách. Mnoho dalších žije volným způsobem života a vyskytují se ve všech biotopech.

Pro hlístice je charakteristické protáhlé nesegmentované tělo. Povrch je tvořen odolnou vícevrstevnou kutikulou. Primární tělní dutina, zvaná pseudocel, odděluje tělní stěnu a vnitřní orgány. Tělo hlístic se dá rozlišit na tři základní části: přední (hlavovou), střední část a zadní (kaudální) část. Hlavová část je vybavena orgány k příjmu potravy (ústa, pysky a jícen) a orgány smyslovými. Tato část má nejvyšší pohyblivost a zajišťuje hlísticím orientaci v prostředí. Ve střední části se nachází střevo, gonády se samičími vývody, exkreceční a osmoregulační soustava. V zadní části ústí střevo a samčí pohlavní orgány. Hlístice jsou většinou gonochoristé, mají oddělené pohlaví a projevuje se u nich výrazný pohlavní dimorfismus. Existují však i druhy hermafroditní nebo partenogenetické, nebo druhy střídající sexuální strategie. Samci jsou menší, kaudální část jejich těla je často zahnutá a opatřená složitými strukturami podílejícími se na páření (Jíra 1998). Samčí pohlavní soustavu tvoří nepárové varle, velká a malá ejakulární žláza a pohlavní vývod vyúsťující do kloaky. Zadní konec těla samce může být přetvořen v kopulační burzu (*bursa copulatrix*) s početnými žebry a papilami (Horák & Scholz 1998). Kopulační burza spolu se sklerotizovanými spikulami a gubernákulem tvoří pomocné kopulační orgány. Spikuly jsou většinou párové jehlicovité útvary umístěné na dorzální straně kloaky ve spikulové pochvě. Gubernákulum se podílí na správném pohybu spikul při kopulaci. Uspořádání kopulačního aparátu u samců se využívá při charakterizaci a druhové identifikaci hlístic (Jíra 1998). Samice jsou oproti samcům větší, zadní konec jejich těla není zahnutý (Horák & Scholz 1998). Základem samičí soustavy je trubicovitý vaječník, ze kterého ústí děloha. Soustava je zakončená vaginou, často se svalnatou stěnou a z těla vyúsťuje vulvou (Horák & Scholz 1998).

Vývojové cykly hlístic mohou být přímé bez nutnosti mezihostitele, anebo nepřímé, uskutečněné za spoluúčasti mezihostitele. Velká část hlístic má vývoj přímý. Tyto hlístice obvykle působí závažná onemocnění často s vysokou mortalitou a to zvláště v podmínkách velkochovů z důvodu jejich schopnosti velmi rychlé reprodukce a dosažení vysoké početnosti (Horák & Scholz 1998). Vývoj hlístic se uskutečňuje svlékáním kutikuly (ekdyse, podobně jako u ostatních skupin linie Ecdysozoa) u několika larválních stadií, která bývají čtyři ($L_1 - L_4$) až pět (L_5). U jednotlivých larválních stadií dochází k přeměně vnitřních orgánů (Jíra 1998).

Systematika hlístic, jejich fylogenetické vztahy a zařazení v rámci ostatních mnohobuněčných organismů jsou předmětem dlouhodobé diskuse a doposud nejsou uspokojivě vyřešeny (Volf et al. 2007). V minulých dobách byl systém živočichů budován spíše na morfologické podobnosti a skutečná příbuznost byla pouze odhadována. Mnohé taxonomické omyly jsou dnes odhalovány použitím metod moderní molekulární genetiky, ale hlavně kombinací těchto metod s kladistickou (fylogenetickou) analýzou morfologických znaků. U molekulárních znaků nesmírně záleží na metodickém přístupu a interpretaci výsledků. Občas tak dochází k velmi rozporuplným závěrům a s téměř každou novější studií se objevují dodatečné změny. Navíc reálné příbuzenské vztahy bývají mnohdy natolik komplikované, že z didaktických a pragmatických důvodů se nadále uvádějí zjednodušující tradiční klasifikace, byť evidentně neodpovídají skutečnosti (Klimeš 2009). Nezpochybnitelným faktem však je, že kmen Nematoda patří do velké skupiny živočichů charakterizovaných periodickým svlékáním kutikuly v průběhu vývoje, kteří nesou název Ecdysozoa.

Skupina Ecdysozoa představuje asi nejslavnější produkt molekulární fylogenetiky konce 20. století. Zároveň poukazuje na některé paradoxní aspekty tohoto fenoménu. Spojení „svlékajících se zvířat“ (především hlístic a členovců) do jedné skupiny je v jasném rozporu se starobyrou, původně cuvierovskou (francouzský zoolog a průkopník srovnávací anatomie George Cuvier, 1769 – 1832) představou blízké příbuznosti segmentovaných členovců a kroužkovců. Na druhé straně ovšem existence vícevrstevné, obvykle chitinové a pravidelně svlékané kutikuly (a ekdysteroidních hormonů řídících celý svlékací cyklus) byla již známa. Po letech polemik máme dnes potvrzeno, že Ecdysozoa jsou monofyletická skupina, ale její vnitřní fylogenetická struktura není stále úplně jasná (Zrzavý 2015).

Průkopníkem ve výzkumu systematiky kmene Nematoda je prof. Mark Blaxter, který se spolupracovníky konstruovali molekulárně fylogenetický systém kmene Nematoda na základě sekvencí DNA pro malou podjednotku ribozomálního genu (SSU rDNA, small subunit ribosomal DNA) a dalších genů. Kmen Nematoda je tvořený třemi hlavními liniemi Enoplia, Dorylaimia a Chromadoria (De Ley & Blaxter 2002, 2004; Blaxter & Koutsovoulos 2015). Parazitické skupiny hlístic se řadí do různých skupin v rámci Chromadoria a Dorylaimia a nemají společný historický původ. Naopak objevovaly se v průběhu evoluce mnohokrát nezávisle. Fylogenetické analýzy parazitických taxonů a jejich volně žijících příbuzných dokázaly, že skupiny hlístic cizopasících u rostlin vznikly třikrát. Až desetkrát vznikly skupiny parazitů bezobratlých a pětkrát paraziti obratlovců (Blaxter & Koutsovoulos 2015).

Další studie uváděly i alternativní systém. Například Van Megen et al. (2009) rozdělili hlístice do pěti větví, tzv. kládů („clade“). Dva z nich jsou totožné s liniemi Enoplia a Dorylaimia, další tři (Spirurina, Tylenchina a Rhabditina) tvoří linii Chromadoria (Blaxter & Koutsovoulos 2015). Lze konstatovat, že oba systémy se v podstatě shodují.

2.2 Rod *Trichuris*

2.2.1 Systematické zařazení rodu *Trichuris*

Systematické zařazení (podle De Ley & Blaxter 2002)

Říše:	Animalia
Skupina:	Ecdysozoa
Kmen:	Nematoda
Třída:	Enoplea
Podtřída:	Dorylaimia
Řád:	Trichinellida Hall, 1916
Nadčeleď:	Trichinelloidea Ward, 1907
Čeleď:	Trichuridae Railliet, 1915
Rod:	<i>Trichuris</i> Roederer, 1761

2.2.2 Morfologie hlístic rodu *Trichuris*

Rod *Trichuris* je celosvětově rozšířen. Je to výhradně parazitická skupina hlístic, jejichž zástupci cizopasí u řady zvířat i člověka.

Tělo trichurů je rozděleno na dvě části. Část jícnová je velmi dlouhá, tenká, vláskovitá a zaujímá přes dvě třetiny z celkové délky těla hlístice. Celou touto částí probíhá úzký jícen (Erhardová & Kotrlý 1955), který je pro trichury charakteristický. Skládá se z krátké přední svalnaté části a dlouhé zadní žláznaté části. Žláznové buňky (stichocyty) lemují lumen v jedné až třech řadách a utvářejí tak orgán zvaný stichosom. Jícnová část červa je zanořena do slizničního epitelu střeva hostitele. Sekrety stichosomu vyvolávají tvorbu syncytia epiteliálního původu, které poskytuje parazitovi výživu (Volf et al. 2007). Za ukončením jícnu se tělo rozšiřuje v širokou zadní část vyplněnou pohlavními orgány.

Všechny druhy rodu *Trichuris* jsou odděleného pohlaví. Trubicovitou samčí pohlavní soustavu tvoří jedno varle, semenný váček, chámovod a jedna spikula. Pohlavní systém vyúsťuje na konci těla. Samice mají jeden trubicovitý vaječník, vejcovod, trubicovitou dělohu a vagínu. Samičí pohlavní vývod tvoří vulva uložená ventrálně v blízkosti přechodu jícnu a zadní části těla (Volf et al. 2007).

Jednotlivé druhy rodu *Trichuris* se od sebe liší velikostí těla a velikostí a tvarem pohlavních vývodů, avšak morfologické znaky vykazují značnou variabilitu (Kotrlá et al. 1984). V současnosti byly některé druhy podrobněji redeskribovány na základě morfologických a biometrických znaků a na základě druhu hostitele (Cutillas et al. 1995; Robles 2011). Nicméně ani tyto podrobné údaje neumožňují vždy jednoznačně identifikovat jednotlivé druhy (Chandler 1930; Cutillas et al. 2009). Taxonomie rodu *Trichuris* je ve skutečnosti velmi nejasná. Mnoho popsaných druhů může představovat synonymum jiného staršího druhu. Hlavně v případě, kdy není prozkoumána potenciální morfologická variabilita parazita z různých druhů hostitelů (Knight 1984), a není k dispozici ani porovnávací molekulární analýza.

2.2.3 Vývojový cyklus hlístic rodu *Trichuris*

Hlístice rodu *Trichuris* jsou tzv. geohelminți. Ke svému vývoji nepotřebují mezihostitele. Samičky, lokalizované v slepém a tlustém střevě hostitele, kladou silnostěnná vajíčka velikosti 70 - 80 x 30 - 42 μm , citronového tvaru se dvěma pólovými zátkami. Vajíčka (3 až 10 tisíc denně) vycházejí z hostitele s trusem a ve vnějším prostředí se v nich formují larvy do infekčního stadia L_1 (Volf et al. 2007). Larva se vyvíjí ve vnitřní vaječné bláně, kterou neopouští. Zůstává v ní až do té doby, dokud není vajíčko spolknuto dalším hostitelem, například zvěří (Kotrlá et al. 1984). Infekční larvální stádium L_1 se ve vajíčku vyvine během 1 – 2 měsíců, záleží na teplotě okolí. Za optimálních podmínek prostředí mohou tyto larvy ve vajíčkách přežít a zůstat životaschopné po několik let. Po pozření hostitelem jsou tenké zátky na pólech vajíček stráveny a larvy L_1 jsou uvolněny. Poté aktivně penetrují do epitelu slizničních krypt slepého střeva a kyčelníku. Následně zde probíhají čtyři svlékání, kdy dospělé červy vznikají z larvy L_4 . Dospělci zůstávají předním koncem zanořeni do střevní sliznice. Zadní část červa je volně vysunutá do lumenu střeva. Prepatentní perioda je 7 – 10 týdnů (Zajac & Conboy, 2006).

2.3 Druhy hlístic rodu *Trichuris* vyskytující se u volně žijících přežvýkavců a nutrií

U volně žijících přežvýkavců byly v Evropě zjištěny tyto druhy rodu: *Trichuris ovis*, *T. discolor*, *T. skrjabini*, *T. globulosa* a *T. capreoli*. U nutrií se nachází pouze druh *Trichuris myocastoris* (Mehlhorn 2016).

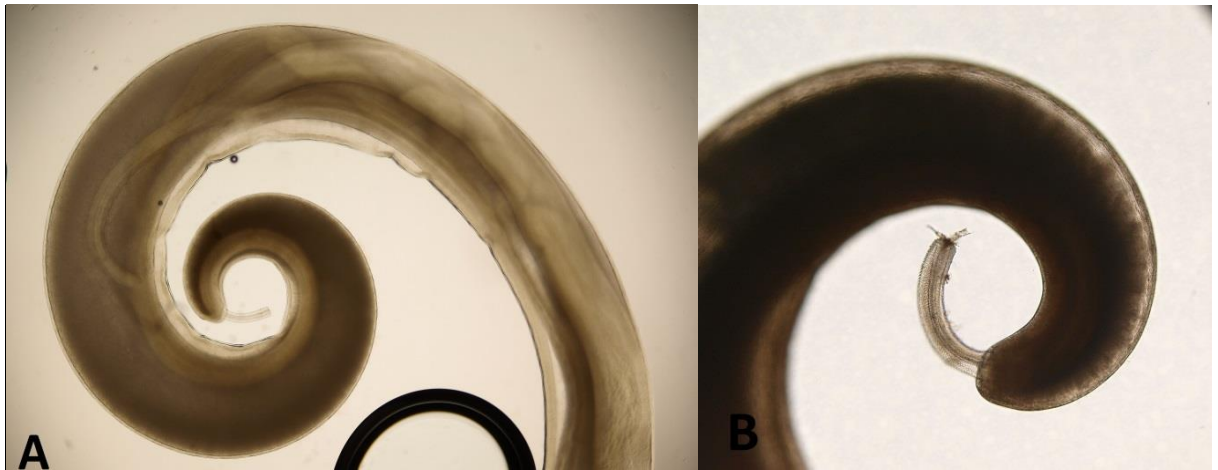
2.3.1 *Trichuris ovis* (Abildgaard, 1795)

Podle literárních údajů má druh *Trichuris ovis* celosvětové rozšíření a jeho hostitelé jsou tur domácí (*Bos taurus*), ovce domácí (*Ovis aries*), koza domácí (*Capra hircus*), velbloud jednohrbý (*Camelus dromedarius*), velbloud dvouhrbý (*Camelus bactrianus*), srnec obecný (*Capreolus capreolus*), daněk skvrnitý (*Dama dama*), jelen evropský (*Cervus elaphus*),

los evropský (*Alces alces*), axis indický (*Axis axis*), daněk skvrnitý (*Dama dama*), muflon evropský (*Ovis orientalis musimon*), ovce středoasijská (*Ovis ammon*), ovce mexická (*Ovis mexicana*), goral východní (*Naemorhedus caudatus*), gazela dorkas (*Gazella dorcas*), žirafa (*Giraffa camelopardalis*), kabar pižmový (*Moschus moschiferus*), kozorožec sibiřský (*Capra sibirica*) a ovce kruhorohá (*Ovis orientalis vignei*) (Skrjabin et al. 1957; Mehlhorn 2016).

Samci

Spikula samců je pokryta pochvou, která se před svým ukončením rozšiřuje v nepravidelný cylindrický válec (Obr. 1). Celá tato pochva i se svou rozšířeninou je pokryta drobnými ostny (Erhardová & Kotrlý 1955). Ostny se zmenšují směrem k distálnímu konci (Zajac & Conboy 2006). Spikula končí ostrou špičkou (Erhardová & Kotrlý 1955; Knight 1971). V místě kde se spikula vysouvá z pochvy je znatelné dvojité postranní srolování kutikuly (Eckert et al. 1992). Přehled údajů o rozměrech morfologických znaků udává Tabulka 1.



Obr. 1 Samec hlístice *Trichuris ovis*

A široká kaudální část

B detail kaudální části se spikulární pochvou

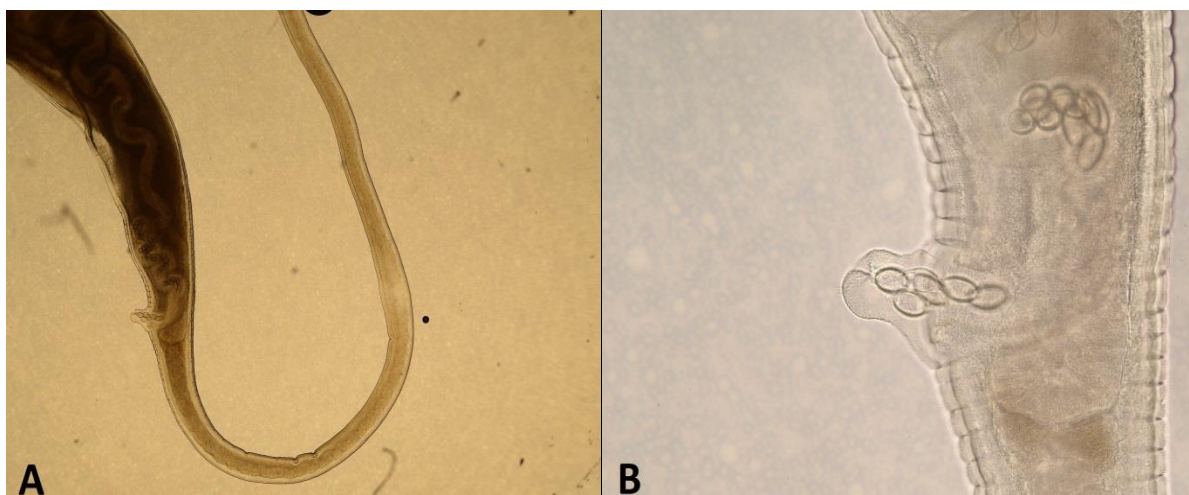
(Zdroj: orig. foto Nechybová, 2016)

Tabulka 1: Biometrické parametry samců *Trichuris ovis* (vlastní zpracování)

Biometrické znaky	[mm]	Zdroj
Celková délka těla	45,0 – 68,0	Erhardová & Kotrlý 1955
	57,9	Noda 1955
	60,0 – 80,0	Skrjabin et al. 1957
	46,0 – 56,0	Andrews 1969
	50,0 – 80,0	Soulsby 1982
	32,0 – 75,0	Cutillas et al. 1995
	46,8 – 88,6	Špakulová 1994
	40,0 – 78,0	Aysha 2008
Délka přední jícnové části těla	53,0 – 75,0	Kuchai et al. 2013
	39,8	Noda 1955
	22,0 – 55,0	Cutillas et al. 1995
Délka zadní části těla	28,1 – 66,6	Špakulová 1994
	19,5	Noda 1955
Délka spikuly	10,0 – 20,0	Cutillas et al. 1995
	5,20 – 5,80	Erhardová & Kotrlý, 1955
	5,72 – 6,48	Noda 1955
	6,30 – 6,70	Skrjabin et al. 1957
	4,00 – 6,00	Andrews 1969
	5,00 – 6,90	Knight 1971
	4,40 – 7,65	Gagarin 1972
	5,00 – 6,00	Soulsby 1982
	5,10 – 8,58	Špakulová 1994
	4,67 – 6,23	Cutillas et al. 1995
	4,00 – 6,00	Aysha 2008
5,72 – 6,48	Kuchai et al. 2013	

Samice

Samice mají vulvu umístěnou v blízkosti konce jícnu (Obr. 2). Vulva je opatřena malým kutikulárním výběžkem, který má tvar malého válce a je obrácen kaudálním směrem. Celý tento výstupek je pokryt malými ostny (Erhardová & Kotrlý 1955). Vulvární přívěsek je vejčitý či tubulární a je širší než delší. Na přechodné části tělní kutikuly a na výběžku vulvy jsou kutikulární výběžky, tupé i ostřejší, které vytvářejí nepravidelné řady (Baruš et al. 1978). Vagina je relativně dlouhá (Skrjabin et al. 1957). Přehled údajů o rozměrech morfologických znaků udává Tabulka 2.



Obr. 2 Samice hlístice *Trichuris ovis*

A část jícnu, vulva a vagína; B detail vulvy s vajíčky a vagína s vajíčky

(Zdroj: orig. foto Nechybová, 2017)

Tabulka 2: Biometrické parametry samic *Trichuris ovis* (vlastní zpracování)

Biometrické znaky	[mm]	Zdroj
Celková délka těla	43,0 – 70,0	Erhardová & Kotrlý, 1955
	52,9	Noda 1955
	55,0 – 70,0	Skrjabin et al. 1957
	47,0 – 75,0	Andrews 1969
	55,0 – 80,0	Gagarin 1972
	35,0 – 70,0	Soulsby 1982
	40,0 – 78,0	Aysha 2008
	32,0	Callejón et al. 2012
	32,0 – 70,2	Kuchai et a. 2013
	32,0 – 34,0	Callejón et al. 2015
Délka přední jícnové části těla	39,0	Noda 1955
	36 – 52,0	Skrjabin et al. 1957
	24,0	Callejón et al. 2012
	20,0	Callejón et al. 2015
Délka zadní části	13,9	Noda 1955
	8,0	Callejón et al. 2012
	12,0 – 14,0	Callejón et al. 2015
Vulvární přívěsek délka	0,07 – 0,09	Skrjabin a kol., 1957
	0,02 – 0,06	Baruš a kol., 1978
Vulvární přívěsek šířka	0,07 – 0,08	Skrjabin et al. 1957
	0,08 – 0,10	Baruš et al. 1978
Vejce	0,073 – 0,076 x 0,032 – 0,035	Noda 1955
	0,073 – 0,078 x 0,035 – 0,037	Skrjabin et al. 1957
	0,080 x 0,030	Andrews 1969
	0,071 – 0,078 x 0,031 – 0,037	Gagarin 1972
	0,070 – 0,080 x 0,030 – 0,042	Soulsby 1982
	0,060 – 0,070 x 0,030 – 0,040	Aysha 2008
	0,080 x 0,030	Callejón et al. 2012
	0,070 – 0,082 x 0,034 – 0,046	Kuchai et al. 2013
0,050 – 0,060 x 0,030	Callejón et al. 2015	

2.3.2 *Trichuris discolor* (Linstow, 1906)

Hostitelem tohoto celosvětově rozšířeného druhu jsou podle literárních zdrojů tur domácí (*Bos taurus*), zebu indický (*Bos indicus*), okapi (*Okapia johnstoni*), ovce mexická (*Ovis canadensis mexicana*), jak divoký (*Bos mutus*), japonský serrow (*Capricornis crispus*) a srnec obecný (*Capreolus capreolus*) Skrzjabin et al. 1957; Lanferdi et al. 1995; Itagaki et al. 2007; Martino et al. 2012; Callejon et al. 2012; Liu et al. 2012; Salaba et al. 2013; Mehlhorn 2016).

Samci

Samci mají proximální konec spikuly trychtýřovitě rozšířen. Distální konec spikuly je zaoblený a vyčnívá ven z pochvy (Obr. 3). Pochva spikuly je hustě pokrytá trny (Lanferdi et al. 1995; Callejon et al. 2012;). Kloaka vyúsťuje subterminálně. Na jedné straně je opatřena velkými kónickými papilami (Knight 1971). Přehled údajů o rozměrech morfologických znaků udává Tabulka 3.



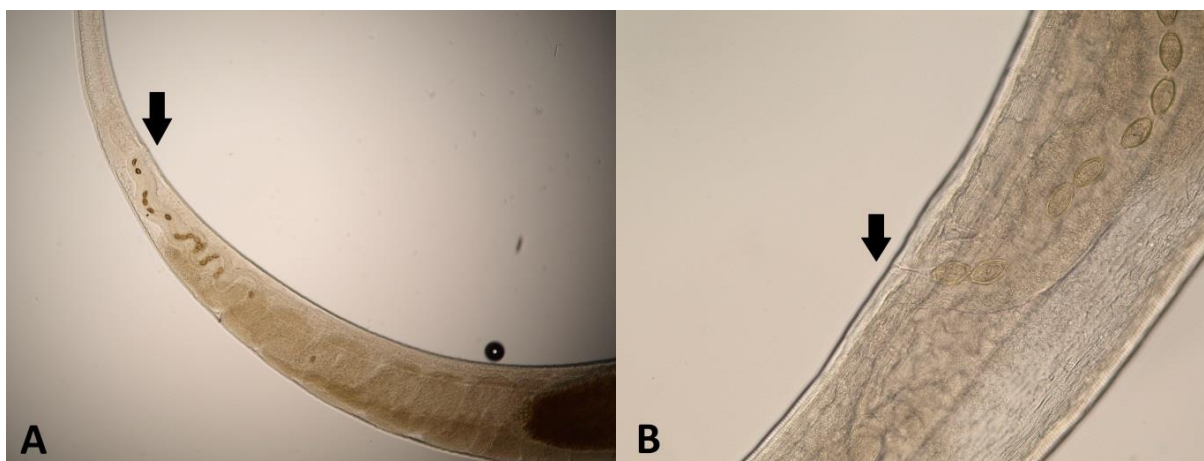
Obr. 3 Samec hlístice *Trichuris discolor*; * označení pericloakální papily
šipka označuje A spikulární pochvu; B: konec varlete
(Zdroj: Callejon et al. 2012)

Tabulka 3: Biometrické parametry samců *Trichuris discolor* (vlastní zpracování)

Biometrické znaky	[mm]	Zdroj
Celková délka těla	45,0 – 47,0	Baer 1950
	56,7 – 63,7	Noda 1955
	54,6 – 69,1	Knight 1971
	51,0 – 53,0	Callejón et al. 2012
Délka přední jícnové části těla	43,0 – 48,0	Noda 1955
	32,0 – 46,0	Knight 1971
	34,0 – 39,0	Callejón et al. 2012
Délka zadní části těla	21,1 – 26,4	Noda 1955
	19,2 – 25,0	Knight 1971
	14,0 – 16,0	Callejón et al. 2012
Délka spikuly	1,7	Baer 1950
	1,76 – 3,0	Allen 1955
	1,7 – 1,8	Noda 1955
	1,5 – 2,02	Sarwar 1959
	1,7 – 2,3	Knight 1971
	1,75 – 1,99	Tenora et al. 1992
	1,98	Callejón et al. 2012

Samice

Vulva samic je umístěna poblíž přechodu jícnu a střeva (Obr. 4) a nevystupuje nad úroveň těla (Knight 1971; Lanferdi et al. 1995). Otvor vulvy je transversálně elipsoidní. Kutikula kolem vulvy je hladká, v proximální části s řídkými a malými trny. Vagina má směrem od vulvy 2 až 3 velmi jemné záhyby. Před vyústěním do dělohy, které je opatřeno svěračem, se mění v část s více zakřiveními. Vulva je od dělohy oddělena svěračem. V zadní části těla přechází děloha do úzkého vejcovodu. Ten obvykle v zadní části těla vytváří smyčku s mnoha kličkami (Knight 1971). Přehled údajů o rozměrech morfologických znaků udává Tabulka 4.



Obr. 4 Samice hlístice *Trichuris discolor*

A část jícnu, vulva (šipka), vagína s vajíčky a část dělohy, B detail vulvy (šipka) a vagína s vajíčky

(Zdroj: orig. foto Nechybová, 2017)

Tabulka 4: Biometrické parametry samic *Trichuris discolor* (vlastní zpracování)

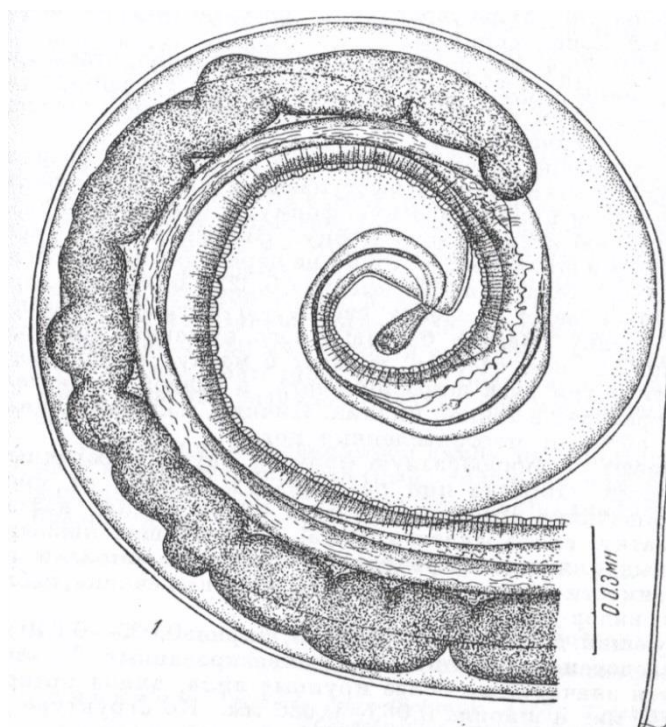
Biometrické znaky	[mm]	Zdroj
Celková délka těla	50,0 – 55,0	Baer 1950
	56,7 – 63,7	Noda 1955
	51,2 – 65,0	Knight 1971
	36,0 – 53,0	Callejón et al. 2012
	41,0 – 60,0	Salaba et al. 2013
Délka přední jícnové části těla	45,0 – 48,0	Noda 1955
	35,0 – 50,0	Knight 1971
	25,0 – 39,0	Callejón et al. 2012
	25,0 – 44,0	Salaba et al. 2013
Délka zadní části těla	11,7 – 15,7	Noda 1955
	9,86 – 17,10	Knight 1971
	10,0 – 17,0	Callejón et al. 2012
	13,0 – 19,0	Salaba et al. 2013
Vejce	0,065 – 0,068 x 0,025	Baer 1950
	0,058 – 0,065 x 0,031 – 0,036	Noda 1955
	0,062 – 0,067 x 0,032 – 0,033	Sarwar 1959
	0,055 – 0,067 x 0,026 – 0,034	Knight 1971
	0,070 – 0,080 x 0,020 – 0,040	Callejón et al. 2012

2.3.3 *Trichuris skrjabini* (Baskakov, 1924)

Tento druh byl nalezen na různých kontinentech u hostitelů tur domácí (*Bos taurus*), ovce domácí (*Ovis aries*), koza domácí (*Capra hircus*), velbloud jednohrbý (*Camelus dromedarius*), velbloud dvouhrbý (*Camelus bactrianus*), goral východní (*Naemorhedus caudatus*), srnec obecný (*Capreolus capreolus*), daněk skvrnitý (*Dama dama*), džežran (*Gazella subgutturosa*), los evropský (*Alces alces*), axis indický (*Axis axis*), kozorožec sibiřský (*Capra sibirica*), sajga tatarská (*Saiga tatarica*) a koza domácí (*Capra hircus*) (Skrjabin et al. 1957; Drózd 1966; Callejón et al. 2009; Mehlhorn 2016).

Samci

Samci mají krátkou spikulu s tupým koncem. Spikula je kryta ostnitou pochvou a bývá často zasunuta dovnitř těla. Ve střední části je nepatrně rozšířena, ke konci se zužuje (Obr. 5). Na konci těla jsou v místě počátku pochvy dvě malé bradavky (Erhardová & Kotrlý 1955). Konec spikuly je zaoblený a nikdy nebyl nalezen vyčnívající ze spikulové pochvy (Cutillas et al. 1996). Spikula je bez bulbusu (Gagarin 1972). Přehled údajů o rozměrech morfologických znaků udává Tabulka 5.



Obr. 5 Samec hlístice *Trichuris skrjabini* – kaudální část

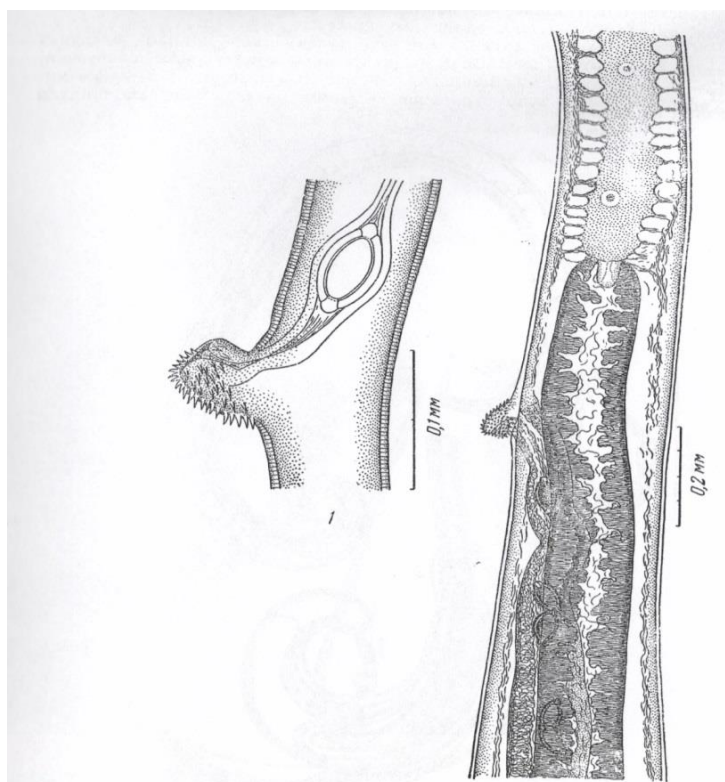
(Zdroj: Skrjabin et al. 1957)

Tabulka 5: Biometrické parametry samců *Trichuris skrjabini*

Biometrické znaky	[mm]	Zdroj
Celková délka těla	36,0	Baskakov 1924
	45,2 – 65,6	Magomedbekov 1957
	41,0 – 46,0	Erhardová & Kotrlý 1955
	45,2 – 65,6	Skrjabin et al. 1957
	33,9 – 50,6	Knight 1971
	45,2 – 65,6	Gagarin 1972
	36,7 – 59,5	Špakulová 1994
	37,0 – 64,0	Cutillas et al. 1996
Délka přední jícnové části těla	24,0	Baskakov 1924
	27,0 – 41,4	Magomedbekov 1957
	25,0 – 36,0	Knight 1971
	25,6 – 42,5	Špakulová 1994
	27,0 – 47,0	Cutillas et al. 1996
Délka zadní části těla	12,0	Baskakov 1924
	18,2 – 24,2	Magomedbekov 1957
	7,9 – 14,6	Knight 1971
	8,0 – 17,0	Cutillas et al. 1996
Délka spikuly	0,98	Baskakov 1924
	0,84 – 1,50	Magomedbekov 1957
	1,20 – 1,40	Erhardová & Kotrlý 1955
	0,84 – 1,50	Skrjabin et al. 1957
	0,94 – 1,30	Knight 1971
	0,80 – 1,50	Gagarin 1972
	0,85 – 1,30	Špakulová 1994
	0,49 – 1,17	Cutillas et al. 1996

Samice

Vulva vystupuje nad povrch těla a je opatřena malým cylindrickým výstupkem s drobnými ostny (Erhardová & Kotrlý 1955). Cylindrický výstupek je obvykle mírně kaudálně stočen (Obr. 6). Je pokryt špičatými trny, které nepřecházejí na tělo hlístice (Skrjabin et al. 1957). Vyvýšenina má cylindrický, zvonovitý či tubulární tvar. Tělo vyvýšeniny je hustě pokryto kutikulárními výběžky. Na tubulární části jsou tyto výběžky prstovité s tupým koncem. Na okraji otvoru mají výrůstky širokou bázi a trojúhelníkovitý půdorys. Výrůstky nejsou zcela sklerotizované (Baruš et al. 1978). Vulva přechází do mírně stočené vagíny se silnou svalovou stěnou (Skrjabin et al. 1957). Přehled údajů o rozměrech morfologických znaků udává Tabulka 6.



Obr. 6 Samice hlístice *Trichuris skrjabini*
 vlevo detail vulvy a vajíčko, vpravo část jícnu, vulva a vagina
 (Zdroj: Skrjabin et al. 1957)

Tabulka 6: Biometrické parametry samic *Trichuris skrjabini* (vlastní zpracování)

Biometrické znaky	[mm]	Zdroj
Celková délka těla	48,0	Baskakov 1924
	40,0 – 75,4	Magomedbekov 1957
	60,0 – 75,4	Skrjabin et al. 1957
	36,0 – 59,0	Knight 1971
	60,0 – 75,0	Gagarin 1972
	35,0 – 76,0	Cutillas et al. 1996
Délka přední jícnové části těla	40,3 – 50,1	Magomedbekov 1957
	25,0 – 59,0	Cutillas et al. 1996
Délka zadní části těla	19,7 – 25,3	Magomedbekov 1957
	9,0 – 17,0	Cutillas et al. 1996
Vulvární přívěsek délka	0,035 – 0,040	Skrjabin et al. 1957
	0,037 – 0,130	Baruš et al. 1978
Vulvární přívěsek šířka	0,022 – 0,032	Skrjabin et al. 1957
	0,028 – 0,038	Knight 1971
	0,033 – 0,044	Baruš et al. 1978
Vejce	0,065 – 0,080 x 0,035 – 0,040	Magomedbekov 1957
	0,065 – 0,080 x 0,035 – 0,040	Gagarin 1972

2.2.4 *Trichuris globulosa* (Linstow, 1901)

Hostitelem tohoto široce rozšířeného druhu jsou tur domácí (*Bos taurus*), ovce domácí (*Ovis aries*), koza domácí (*Capra hircus*), srnec obecný (*Capreolus capreolus*), jelen evropský (*Cervus elaphus*), jelen sika (*Cervus nippon*), muflon evropský (*Ovis orientalis musimon*), daněk evropský (*Dama dama*), kamzík horský (*Rupicapra rupicapra*), velbloud jednohrbý (*Camelus dromedarius*), okapi (*Okapia johnstoni*) a žirafa sp. (*Giraffa* sp.) (Skrjabin et al. 1957; Haupt & Danner, 1980; Rehbein et al. 2001; Rehbein 2010; Mehlhorn 2016).

Samci

Spikula samce vybíhá v ostrou špičku (Skrjabin et al. 1957). Je kryta dlouhou válcovitou pochvou (Obr. 7), která se na svém konci rozšiřuje v kulovitý bulbus měřící 0,100 – 0,110 x 0,057 – 0,060 mm. Celá pochva i s bulbusem je kryta malými jemnými ostny (Erhardová & Kotrlý, 1955). Spikula je částečně uložena v pochvě pokryté trny (Popova 1954). Přehled údajů o rozměrech morfologických znaků udává Tabulka 7.



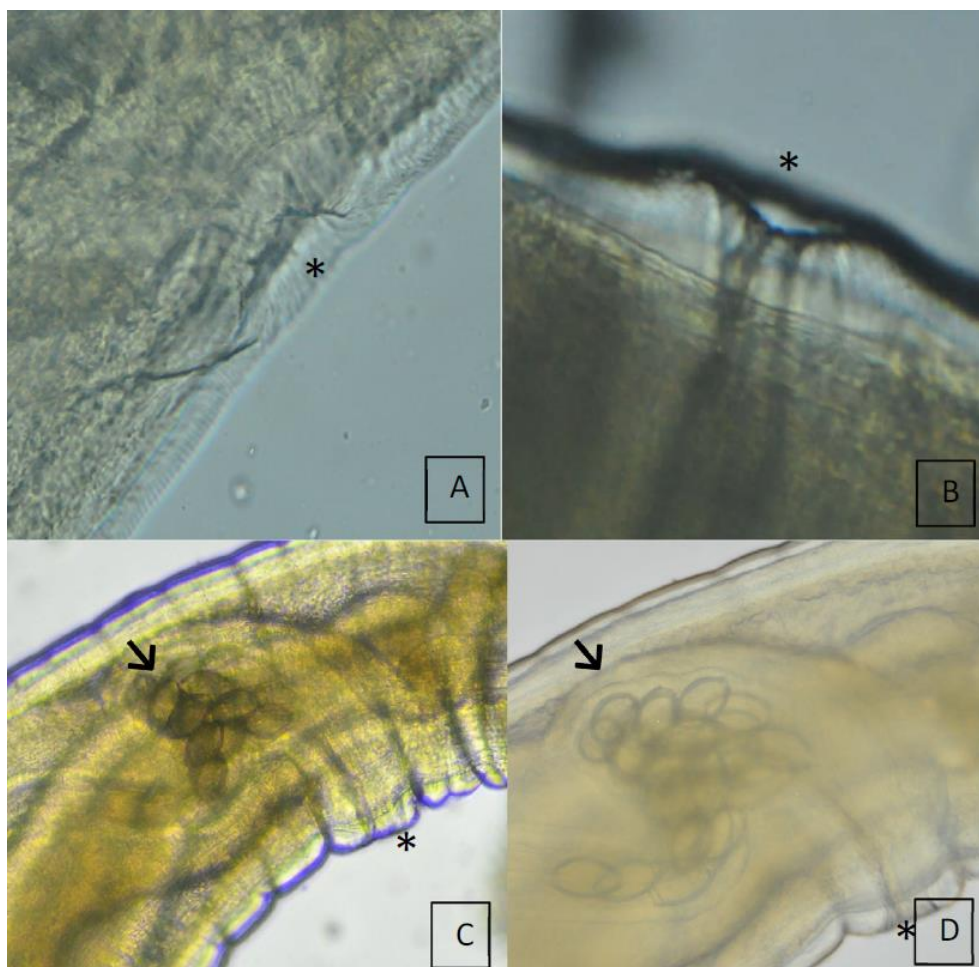
Obr. 7 Samec hlístice *Trichuris globulosa*
G kaudální konec, H kulovitý bulbus s trny (šipka)
(Zdroj: Callejon et al. 2015)

Tabulka 7: Biometrické parametry samců *Trichuris globulosa* (vlastní zpracování)

Biometrické znaky	[mm]	Zdroj
Celková délka těla	40,0 – 50,0	Erhardová & Kotrlý 1955
	54,7	Noda 1955
	40,0 – 70,0	Gagarin 1972
	44,0 – 74,0	Cutillas et al. 1995
Délka přední jícnové části těla	32,2	Noda 1955
	30,0 – 60,0	Cutillas et al. 1995
Délka zadní části těla	22,5	Noda 1955
	12,0 – 23,0	Cutillas et al. 1995
Délka spikuly	5,0	Baer, 1950
	4,1 – 4,9	Erhardová & Kotrlý 1955
	4,3	Noda 1955
	3,8 – 5,7	Skrjabin et al. 1957
	3,8 – 5,7	Gagarin 1972
	4,5 – 4,9	Cutillas et al. 1995
	4,1 – 5,1	Callejon et al. 2015

Samice

Konec těla samice je široce zaoblen, na konci těla leží subterminální anus. Vulva je umístěna blízko za ukončením jícnu. Vulva je jednoduchá bez kutikulárního výstupku (Erhardová & Kotrlý 1955). Vulva je postesofageální, nachází se 0,093 – 0,17 mm od zadního konce jícnu a je okrouhlá. Kutikula kolem ní je hladká nebo jen s malým počtem příčných pruhů. V průměru měří 0,042 – 0,048 mm. Má pouze malý hemisférický vulvární přívěšek, který vyčnívá vulvárním otvorem do špičky – tímto se odlišuje od druhu *Trichuris discolor*. Tento otvor měří 0,015 – 0,017 mm v průměru. Stěna tohoto výběžku je hladká nebo pokryta jen malými kutikulárními výběžky (Baruš et al. 1978). Vagina se nachází hned za ostatou částí vulvy (Obr. 8). Je poměrně krátká a svalnatá, v distální části má 3 až 4 zákruty (Skrjabin et al. 1970). Vulva má kutikulární výběžek (Kaur & Duggal 2007). Přehled údajů o rozměrech morfologických znaků udává Tabulka 8.



Obr. 8 Samice hlístice *Trichuris globulosa* – A, B, C a D

* označuje vulvu, šipka označuje vaginu s vajíčky

(Zdroj: Callejon et al. 2015)

Tabulka 8: Biometrické parametry samic *Trichuris globulosa* (vlastní zpracování)

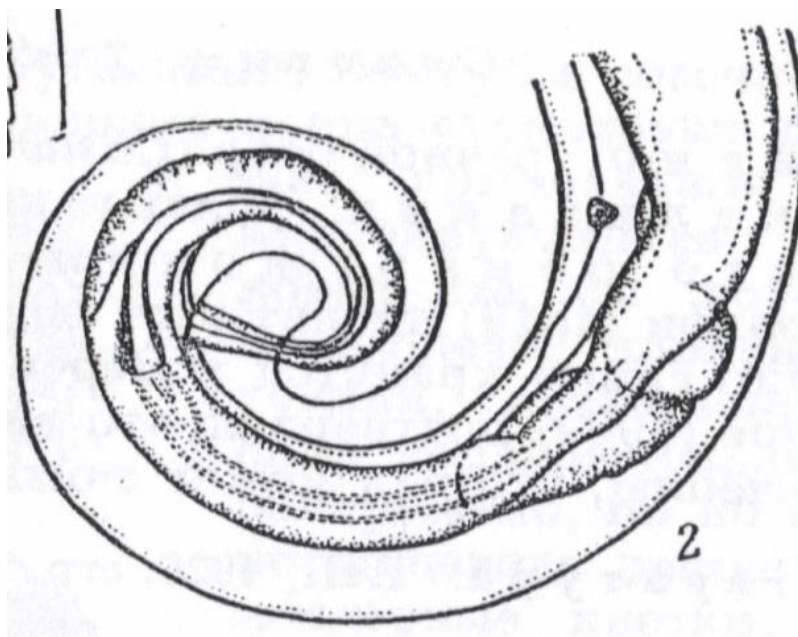
Biometrické znaky	[mm]	Zdroj
Celková délka těla	42,0 – 52,0	Erhardová & Kotrlý 1955
	71,1	Noda 1955
	31,0 – 40,0	Callejon et al. 2015
Délka přední jícnové části těla	56,0	Noda 1955
	23,0 – 32,0	Callejon et al. 2015
Délka zadní části těla	13,0 – 15,0	Erhardová & Kotrlý 1955
	15,1	Noda 1955
	7,0 – 8,0	Callejon et al. 2015
Vejce	0,068 – 0,072 x 0,032 – 0,036	Baer 1950
	0,068 x 0,036	Noda 1955
	0,060 – 0,070 x 0,030 – 0,040	Callejon et al. 2015

2.3.5 *Trichuris capreoli* Artjuch, 1984

Hostitelem tohoto druhu, dosud zjištěného v Evropě a Azii, jsou srnec obecný (*Capreolus capreolus*), jelen evropský (*Cervus elaphus*), džežran (*Gazella subgutturosa*) a tur domácí (*Bos taurus* (Skrjabin et al. 1957; Mehlhorn 2016).

Samci

Samci mají distální konec spikuly zúžený. Spikulární pochva je kulovitě rozšířena a pokryta trny (Skrjabin et al. 1957, Obr. 9). Distální konec spikuly je klínovitě zaostřen (Popova 1954). Spikulu zakrývá pochva, která je cylindrická a na konci se rozšiřuje do cibulovitěho tvaru (Rommel et al. 2000). Přehled údajů o rozměrech morfologických znaků udává Tabulka 9.



Obr. 9 Samec hlístice *Trichuris capreoli* – kaudální část

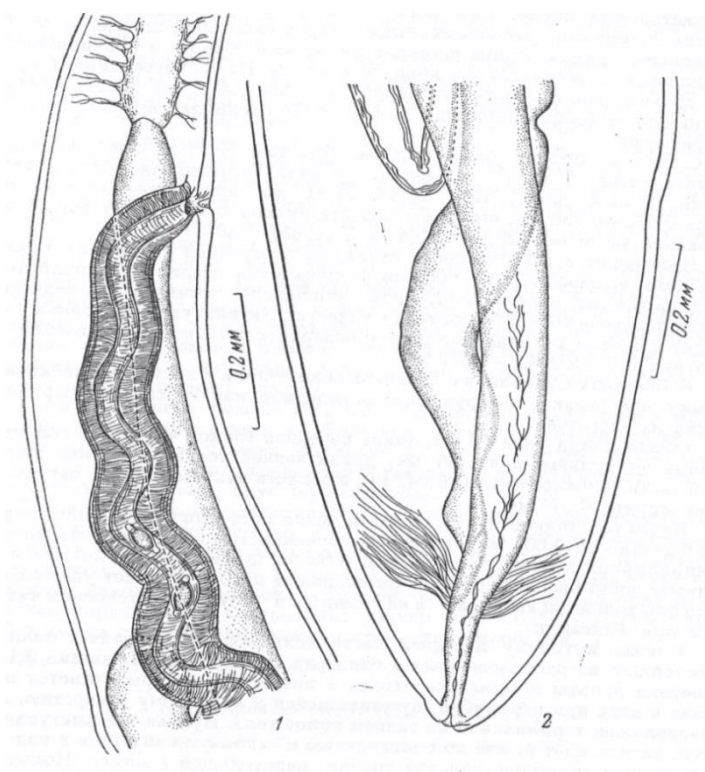
(Zdroj: Skrjabin et al. 1957)

Tabulka 9: Biometrické parametry samců *Trichuris capreoli* (vlastní zpracování)

Biometrické znaky	[mm]	Zdroj
Celková délka těla	53	Gagarin 1972
Délka přední jícnové části těla	33,0	Skrjabin et al. 1957
Délka zadní části těla	20,0	Skrjabin et al. 1957
Délka spikuly	2,3 – 3,5	Popova 1954
	2,3 – 3,2	Skrjabin et al. 1957
	2,3 – 3,5	Gagarin 1972
	2,4 – 2,7	Eckert et al. 1992

Samice

Vulva samic (Obr. 10) je umístěna na počátku rozšiřující se části, nevystupuje nad povrch těla a není opatřena kutikulárním výběžkem (Skrjabin et al. 1957; Rommel et al. 2000). Na hlavě jsou u všech jedinců malá laterální křídélka, pravidelného tvaru, nepatrně proužkovaná a měří kolem 0,03 mm. Erhardová & Kotrlý (1955) našli při pitvách pouze samice. Přehled údajů o rozměrech morfologických znaků udává Tabulka 10.



Obr. 10 Samice hlístice *Trichuris capreoli*

1 konec jícnu a vagina s vulvou, 2 kaudální část s vyústěním rekta

(Zdroj: Skrjabin et al. 1957)

Tabulka 10: Biometrické parametry samic *Trichuris capreoli* (vlastní zpracování)

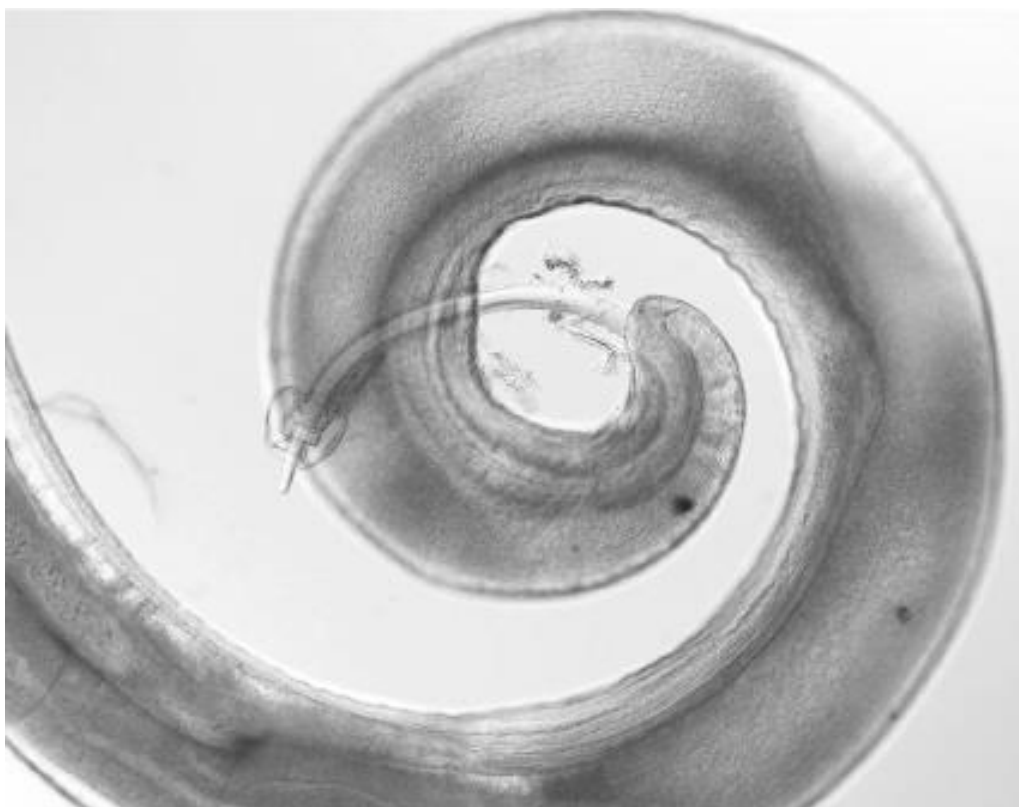
Biometrické znaky	[mm]	Zdroj
Celková délka těla	27,0 – 37,0	Erhardová & Kotrlý 1955
	38,5 – 54,6	Skrjabin et al. 1957
	38,5 – 54,6	Gagarin 1972
Délka přední jícnové části těla	29,9 – 40,5	Skrjabin et al. 1957
Délka zadní části těla	8,6 – 12,2	Skrjabin et al. 1957
Vejce	0,031 – 0,060 x 0,034	Gagarin 1972

2.3.6 *Trichuris myocastoris* Enigk, 1933

Hostitelem tohoto druhu je nutrie říční (*Myocastor coypus*) jak ve svém původním areálu v Jižní Americe (Eberhardt et al. 2019), tak i jinde na světě, kam byla nutrie zejména v průběhu 20. let minulého století introdukována (vyjma kontinentů Austrálie a Antarktidy) (Carter & Leonard 2002; Woods et al. 1992; Guichón et al. 2003; Anděra & Červený, 2007).

Samci

Spikula samců je pokryta pochvou, která se před svým ukončením rozšiřuje ve válec. Celá tato pochva i se svou rozšířeninou je pokryta ostny (Baruš et al. 1975, Obr. 11). Přehled údajů o rozměrech morfologických znaků udává Tabulka 11.



Obr. 11 Samec hlístice *Trichuris myocastoris* – kaudální část

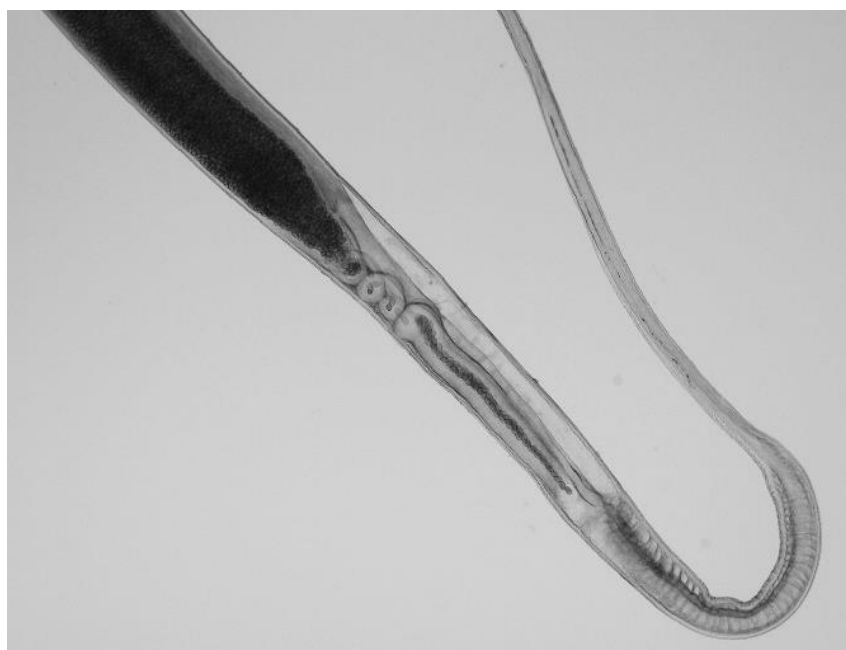
(Zdroj: orig. foto Nechybová, 2016)

Tabulka 11: Biometrické parametry samců *Trichuris myocastoris* (vlastní zpracování)

Biometrické znaky	[mm]	Zdroj
Celková délka těla	27,9 – 39,8	Enigk 1933
	38,0 – 46,0	Petrov 1941
	30,0 – 38,0	Skrjabin et al. 1957
	22,9 – 35,3	Baruš et al. 1975
Délka přední jícnové části těla	19,0 – 26,7	Enigk 1933
	23,7 – 25,9	Petrov 1941
	18,0 – 24,0	Skrjabin et al. 1957
	13,3 – 19,7	Baruš et al. 1975
Délka zadní části těla	9,69 – 15,60	Baruš et al. 1975
Délka spikuly	2,96 – 4,5	Enigk 1933
	3,7 – 3,9	Petrov 1941
	2,7 – 3,2	Skrjabin et al. 1957
	3,5 – 3,7	Baruš et al. 1975

Samice

Vulva samic je umístěna u konce jícnu, má tvar příčné štěrbiny se zašpičatělými okraji. Kutikula kolem ní je hladká. Vagina má silně svalnaté stěny, je směřována dozadu a tvoří 2 – 4 malé vlny (Baruš et al. 1975, Obr. 12). Přehled údajů o rozměrech morfologických znaků udává Tabulka 12.



Obr. 12 Samice hlístice *Trichuris myocastoris* – část jícnu, vagina a děloha
(Zdroj: Rylková et al. 2015)

Tabulka 12: Biometrické parametry samic *Trichuris myocastoris*

Biometrické znaky	[mm]	Zdroj
Celková délka těla	30,3 – 45,2	Enigk 1933
	46,0 – 55,0	Petrov 1941
	43,0 – 50,0	Skrjabin et al. 1957
	38,4 – 43,1	Baruš et al. 1975
Délka přední jícnové části těla	22,3 – 31,8	Enigk 1933
	27,0 – 34,0	Petrov 1941
	26,0 – 32,0	Skrjabin et al. 1957
	24,6 – 28,1	Baruš et al. 1975
Délka zadní části těla	16,0 – 18,0	Skrjabin et al. 1957
	13,1 – 15,0	Baruš et al. 1975
Vejce	0,050 – 0,065 x 0,024 – 0,030	Enigk 1933
	0,060 – 0,063 x 0,030 – 0,033	Petrov 1941
	0,052 – 0,060 x 0,030 – 0,034	Baruš et al. 1975

2.3.7 Porovnání druhových morfologických charakteristik

Přehled základních morfologických znaků samců a samic uvedených druhů rodu *Trichuris*, který zohledňuje minimo-maximální hodnoty uváděné v dosavadní literatuře, je sumarizován v Tabulkách 13 a 14.

Tabulka 13: Morfologické znaky samců *Trichuris* spp.

Morfologické znaky	<i>Trichuris ovis</i>	<i>Trichuris discolor</i>	<i>Trichuris skrjabini</i>	<i>Trichuris globulosa</i>	<i>Trichuris capreoli</i>	<i>Trichuris myocastoris</i>
Celková délka těla	32,0 – 88,6	45,0 – 69,1	33,9 – 65,6	40,0 – 74,0	53,0	22,9 – 46,0
Délka jícnové části těla	22,0 – 66,6	32,0 – 48,0	24,0 – 47,0	30,0 – 60,0	33,0	13,3 – 26,7
Délka zadní části těla	10,0 – 20,0	14,0 – 26,4	7,9 – 24,2	12,0 – 23,0	20,0	9,7 – 15,6
Délka spikuly	4,0 – 8,6	1,5 – 3,0	0,5 – 1,5	3,8 – 5,7	2,3 – 3,5	2,7 – 4,5

Tabulka 14: Morfologické znaky samic *Trichuris* spp.

Morfologické znaky	<i>Trichuris ovis</i>	<i>Trichuris discolor</i>	<i>Trichuris skrjabini</i>	<i>Trichuris globulosa</i>	<i>Trichuris capreoli</i>	<i>Trichuris myocastoris</i>
Celková délka těla	32,0 – 80,0	36,0 – 65,0	35,0 – 76,0	31,0 – 71,0	27,0 – 54,6	30,3 – 55,0
Délka jícnové části těla	20,0 – 52,0	25,0 – 50,0	25,0 – 59,0	23,0 – 56,0	29,9 – 40,5	22,3 – 34,0
Délka zadní části těla	8,0 – 14,0	9,9 – 19,0	9,0 – 25,3	7,0 – 15,1	8,6 – 12,2	13,1 – 15,0
Délka vulvy	0,02 – 0,09	není	0,035 – 0,04	není	není	není
Délka vajíčka	0,05 – 0,08	0,06 – 0,08	0,06 – 0,08	0,06 – 0,07	0,03 – 0,06	0,05 – 0,07
Šířka vajíčka	0,03 – 0,05	0,02 – 0,04	0,03 – 0,04	0,03 – 0,04	0,03	0,02 – 0,03

Z uvedeného přehledu vyplývá, že celková délka těla a délka morfologicky se lišící přední a zadní části těla nejsou použitelné k druhové diferenciaci. Lepšími znaky jsou délka spikuly u samců a morfologie vulvy samic, i když i tyto znaky jsou variabilní a neposkytují možnost jednoznačné identifikace (Špakulová, 1994). Avšak i nejkvalitnější diferenciací znak – délka spikuly samců – se překrývá u druhů *T. ovis* a *T. globulosa* (nejdelší spikuly), u druhů *T. discolor* a *T. capreoli* (středně dlouhé spikuly) a *T. skrjabini* (nejkratší spikula). Délka spikuly *T. myocastoris* však svojí variabilitou zasahuje do kategorií středních a dlouhých spikul. Klasické popisy druhů využívají kombinaci informací o morfologických znacích a zároveň o druhu hostitele (Skrjabin et al. 1957).

2.4 Výskyt hlístic rodu *Trichuris* u vybraných hostitelů

2.4.1 Výskyt v Evropě kromě České republiky

V Evropě byly u volně žijících přežvýkavců zaznamenány jen čtyři druhy rodu *Trichuris*, pátý druh *T. discolor* je zmiňován jen u hovězího dobytka (*Bos taurus*) v publikaci Callejón et al. (2012). U srnce obecného byly zjištěny druhy *T. ovis* (Dróždž 1966; Kutzer & Knaus 1969; Haupt & Stubbe 1973; Bütner 1978; Nickel et al. 1978; Kutzer et al. 1987, 1988; Borgsteede et al. 1990; Jansen 1992; Rehbein et al. 2000; Cisek et al. 2003; Shimalov & Shimalov 2003; Balicka-Ramisz et al. 2003; Pilarczyk et al. 2005; Rehbein 2010; Kuzmina et al. 2010; Bolukbas et al. 2012; Pato et al. 2013), *T. skrjabini* (Dróždž 1966; Barth & Schaich 1971; Haupt & Stubbe 1973), *T. globulosa* (Dróždž 1966; Kutzer & Knaus 1969; Haupt & Stubbe 1973; Nickel et al. 1978; Bütner 1978; Spellmeyer 1996; Rehbein et al. 2000; Rehbein 2010), a *T. capreoli* (Dróždž 1966; Kutzer & Knaus 1969; Barth & Schaich 1971; Dollinger 1973; Nickel et al. 1978; Kutzer et al. 1987, 1988; Bernard et al. 1988; Rommel et al. 2000; Schwarz et al. 2011; Pato et al. 2013). U jelena evropského byly nalezeny druhy *T. ovis* (Dróždž 1966; Rehbein et al. 2002; Cisek et al. 2003; Shimalov & Shimalov 2003; Pilarczyk et al. 2005; Rehbein 2010), *T. globulosa* (Rehbein et al. 2002; Rehbein 2010), a *T. capreoli* (Bernard et al. 1988). U jelena siky byl nalezen pouze druh *T. globulosa* (Rehbein & Visser 2007; Rehbein 2010). Tři druhy byly zaznamenány u muflona evropského, a to *T. ovis* a *T. globulosa* (Haupt & Danner 1980), a *T. capreoli* (Bernard et al. 1988). U daňka evropského se vyskytují dva druhy, *T. ovis* (Cisek et al. 2003) a *T. globulosa* (Rehbein et al. 2001). Přehled údajů o prevalenci různých druhů rodu *Trichuris*, nalezených u srnce obecného, jelena evropského, jelena siky, muflona evropského a daňka evropského uvádí Tabulka 15.

Tabulka 15: Prevalence hlístic rodu *Trichuris* u vybraných hostitelů v Evropě kromě České republiky (vlastní zpracování)

Hostitel	<i>Trichuris</i> sp.	Prevalence [%]	Země	Zdroj	
srnec obecný	<i>Trichuris ovis</i>	8,0 – 9,1	Maďarsko	Kutzer et al. 1988	
		4,7	Německo	Rehbein et al. 2000	
		8,1	Polsko	Balicka-Ramisz et al. 2003	
		8,1	Polsko	Císek et al. 2003	
		7,0	Polsko	Pilarzyk et al. 2005	
		18,5	Ukrajina	Kuzmina et al. 2010	
		5,6	Německo	Rehbein 2010	
		5,9	Rakousko	Rehbein 2010	
		13,3	Turecko	Bolukbas et al. 2012	
		10,4	Španělsko	Pato et al. 2013	
		<i>Trichuris skrjabini</i>	1,0	Polsko	Drózd 1966
		<i>Trichuris globulosa</i>	1,0	Polsko	Drózd 1966
			32,2	Německo	Spellmayer 1996
			67,2	Německo	Rehbein et al. 2000
	59,3	Německo	Rehbein 2010		
	17,6	Rakousko	Rehbein 2010		
<i>Trichuris capreoli</i>	16,0	Polsko	Drózd 1966		
	47,2	Belgie	Pato et al. 2013		
	22,7 – 66,6	Maďarsko	Kutzer et al. 1988		
	31 – 60	Německo	Rommel et al. 2000		
	50,0	Rakousko	Schwarz et al. 2011		
	53,1	Španělsko	Pato et al. 2013		
jelen evropský	<i>Trichuris ovis</i>	10,5	Německo	Rehbein et al. 2002	
		4,4	Polsko	Císek et al. 2003	
		5,1	Polsko	Pilarzyk et al. 2005	
		<i>Trichuris globulosa</i>	3,9	Německo	Rehbein et al. 2002
		50,0	Německo	Rehbein 2010	
		22,2	Rakousko	Rehbein 2010	
		<i>Trichuris capreoli</i>	17,6	Belgie	Bernard et al. 1988
jelen sika	<i>Trichuris globulosa</i>	1,9	Rakousko	Rehbein & Visser (2007)	
		8,0	Německo	Rehbein 2010	
		1,9	Rakousko	Rehbein 2010	
muflon evropský	<i>Trichuris ovis</i>	28,9	Německo	Haupt & Danner 1980	
	<i>Trichuris globulosa</i>	22,0	Německo	Haupt & Danner 1980	
	<i>Trichuris capreoli</i>	19,0	Belgie	Bernard et al. 1988	
daněk evropský	<i>Trichuris ovis</i>	8,0	Polsko	Císek et al. 2003	
	<i>Trichuris globulosa</i>	9,4	Německo	Rehbein et al. 2001	
		14,7	Rakousko	Rehbein et al. 2014	

Specifická hlístice nutrií *T. myocastoris* se vyskytuje jak v oblasti původního výskytu hostitele – v jižní Americe (Martino et al. 2012; Eberhardt et al. 2019), tak i v Evropě.

Po introdukci nutrií na různé kontinenty, se tento parazit vyskytuje jak ve farmových chovech tak i u druhotně volně žijících nutrií (Petrov 1941; Baruš et al. 1975; Babero & Lee 1961). Původní popis druhu *T. myocastoris* pochází z Německa (Enigk 1933). Jeho přítomnost v Evropě, a to v Polsku, byla potvrzena v práci Scheuring (1990). Do České republiky byly nutrie dovezeny v roce 1925, avšak jejich parazity se zabýval až Zajíček (1955).

2.4.2 Výskyt v České republice

Pět druhů rodu *Trichuris* bylo zaznamenáno u srnce obecného, konkrétně *T. ovis* (Erhardová & Kotrlý 1955; Tománek 1967; Osakwe 1970; Koždoň 1975; Salaba et al. 2013), *T. discolor* (Salaba et al. 2013), *T. skrjabini* (Erhardová & Kotrlý 1955), *T. globulosa* (Erhardová & Kotrlý 1955; Tománek 1967; Osakwe 1970; Koždoň 1975; Vetýška 1980; Salaba et al. 2013) a *T. capreoli* (Tománek 1967; Dyk & Chroust 1974). Čtyři druhy byly evidovány u daňky evropského: *T. ovis* (Kotrlá & Kotrlý 1977), *T. skrjabini* (Kotrlá & Kotrlý 1977), *T. globulosa* (Erhardová & Kotrlý 1955; Kotrlá & Kotrlý 1977) a *T. capreoli* (Erhardová & Kotrlý 1955; Kotrlá & Kotrlý 1977; Vetýška 1980). U muflona evropského byly zaznamenány jen dva druhy, a to *T. ovis* (Erhardová & Kotrlý 1955; Kotrlá & Kotrlý 1977) a *T. globulosa* (Erhardová & Kotrlý 1955; Kotrlá & Kotrlý 1977; Baruš et al. 1978), a jediný druh *T. globulosa* byl nalezen i u jelena evropského (Erhardová & Kotrlý 1955; Kotrlá & Kotrlý 1977). Údaje o výskytu *T. myocastoris* u nutrie říční v České republice publikoval pouze Zajíček (1955).

Přehled údajů o prevalenci různých druhů rodu *Trichuris*, nalezených u srnce obecného, uvádí Tabulka 16.

Tabulka 16: Prevalence hlístic rodu *Trichuris* u srnce obecného v České republice (vlastní zpracování)

Hostitel	Rod <i>Trichuris</i>	Prevalence [%]	Zdroj
srnec obecný	<i>Trichuris ovis</i>	61,7	Koždoň 1975
		11,7	Tománek 1967
	<i>Trichuris globulosa</i>	1,9	Tománek 1967
		34,0	Koždoň 1975
		21,4	Vetýška 1980
	<i>Trichuris capreoli</i>	8,9	Vetýška 1980

3. Hypotéza a cíle

Tradiční taxonomie hlístic rodu *Trichuris*, založená pouze na morfologických znacích, neposkytuje dostatečné diferenciatní znaky pro odlišení jednotlivých druhů rodu *Trichuris*, parazitujících u volně žijících přežvýkavců a nutrií v České republice. Pro ověření druhového spektra těchto hlístic je tak nezbytné využít kombinaci molekulárních a morfologických analýz.

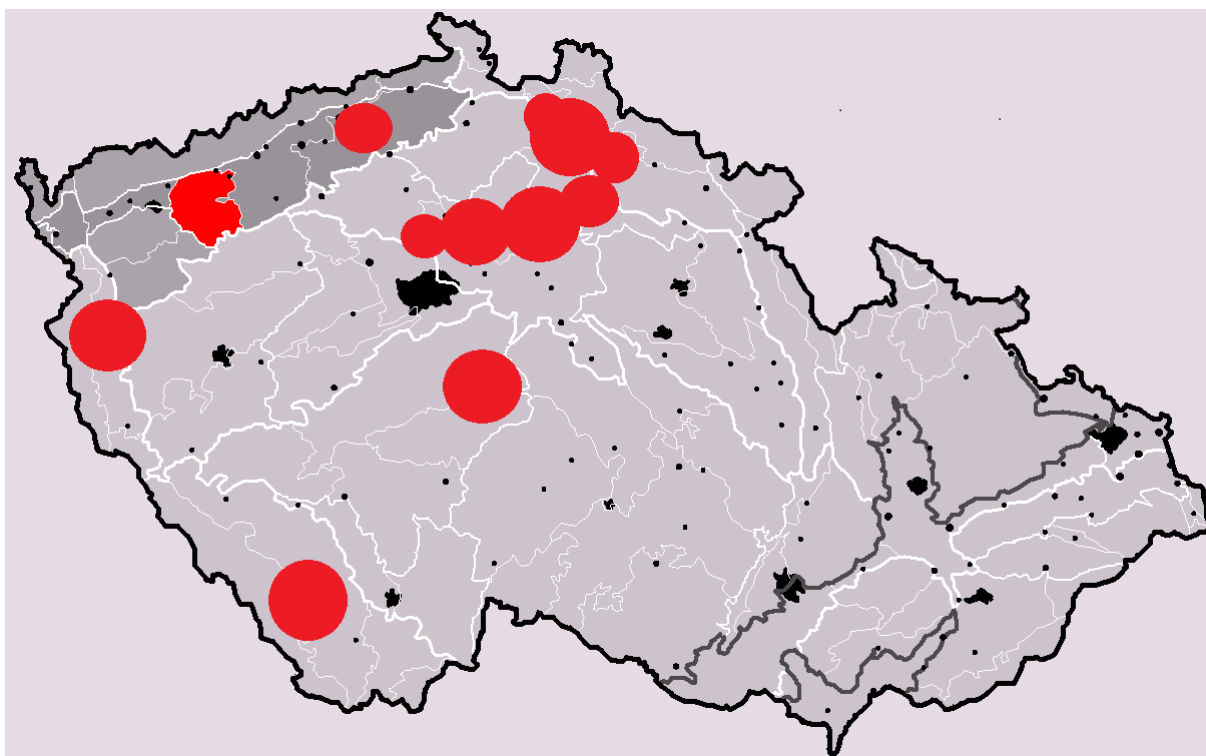
Cíle práce

1. Hlavním cílem práce byl morfologicko-molekulární výzkum hlístic rodu *Trichuris*, parazitujících u volně žijících přežvýkavců a nutrií v České republice, využívající simultánní koprologické a pitevní vyšetření. Výsledky výzkumu by měly umožnit revizi druhového spektra studovaných parazitů, upřesnit poznatky o extenzitě a intenzitě modelových druhů rodu *Trichuris* a o míře jejich hostitelské specifity.
2. Dílčí cíle práce, vázané na přiložené publikace:
 - a. Ověření druhové příslušnosti a determinace hlístic rodu *Trichuris*, cizopasících u vybraných přežvýkavců v České republice, za použití integrovaného vyšetření; posouzení spolehlivosti tradičních morfologických znaků.
 - b. Vyhodnocení druhového spektra hlístic rodu *Trichuris* a jejich prevalence a intenzity infekce u pěti druhů volně žijících přežvýkavců v České republice; porovnání efektivity simultánního pitevního vyšetření střevních traktů a koprologických metod.
 - c. Ověření druhové příslušnosti hlístic *Trichuris myocastoris*, cizopasících u nutrie říční v České republice, za použití morfologicko-molekulárního vyšetření; redeskripce morfologických znaků, stanovení molekulární druhové charakteristiky a vyhodnocení fylogenetických vztahů v rámci rodu *Trichuris*.
 - d. Vyhodnocení prevalence a intenzity infekce *Trichuris myocastoris* u nutrie říční v České republice; porovnání spektra parazitických hlístic z farmových chovů nutrií a u volně žijících nutrií.

4. Materiál a metodika

4.1 Volně žijící přežvýkavci

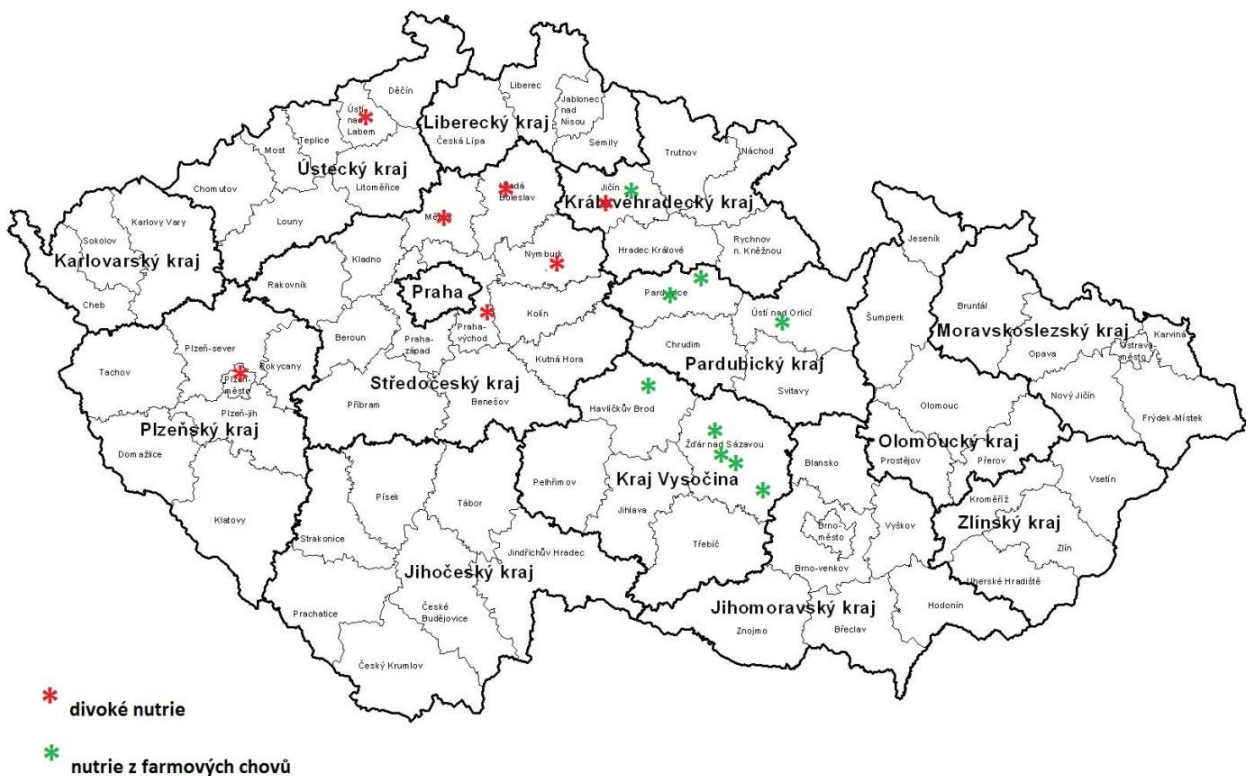
Materiál pro studium parazitických hlístic rodu *Trichuris* u divokých přežvýkavců byl získáván z gastrointestinálních traktů ulovené spárkaté zvěře z vybraných 32 honiteb v České republice v průběhu let 2009 až 2017 (Obr. 13). Honitby se nacházely v oblastech Doupovské hory, Kokořínsko, Český ráj, Podkozákovo, Mělnicko, Liberecko, Tachovsko, Mladoboleslavsko, Benešovsko a Šumava. Celkem bylo vyšetřeno 176 kusů přežvýkové spárkaté zvěře, z toho 62 srnců obecných, 34 jelenů evropských, 62 jelenů sika, 13 daňků evropských a 5 muflonů evropských.



Obr. 13 Mapa vybraných honiteb, označeno červeně

4.2 Nutrie říční

Materiál pro studium parazitů u nutrií z farmových chovů pocházel z 11 farem Pardubického kraje, Královéhradeckého kraje a Kraje Vysočina. Materiál pro studium parazitů u divokých nutrií byl získán ze 14 oblastí Středočeského kraje, Královéhradeckého kraje, Plzeňského a Ústeckého kraje (Obr. 14).



Obr. 14 Mapa sledovaných lokalit nutrií říční

4.3 Helmintologická pitva

Po odstřelu byly z každého zvířete ihned vyvrženy jeho vnitřnosti a co nejdříve dopraveny na Fakultu agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU v Praze. Stejně tak bylo postupováno i s vnitřnostmi z nutrií po jejich usmrcení na farmách. Všechna vyšetření byla prováděna v parazitologické laboratoři Katedry zoologie a rybářství FAPPZ. Gastrointestinální trakty byly pitvány bezprostředně po přepravě do laboratoře nebo byly

celé zmrazeny na -20°C , dokud nebylo možné provádět další analýzy. Za účelem analýz hlístic rodu *Trichuris* bylo z trávicího traktu zvířat odděleno tlusté střevo spolu se slepým střevem. Střeva byla uložena na podnos, podélně rozříznuta a byl odebrán jeho obsah. Sliznice střev byla po propláchnutí důkladně prohlédnuta. Obsah střeva byl slabým proudem vody přecezen přes laboratorní síto o velikosti otvorů 0,50 mm. Veškeré hlístice, zachycené na sítích, byly vybrány a promyty ve fyziologickém roztoku (9 g NaCl v 1 litru vody) pro odstranění nečistot. Následně byly fixovány v lahvičkách v 70 % etanolu.

4.4 Koprologické vyšetření

Koprologické vyšetření trusu bylo prováděno koncentrační McMasterovu metodou dle Roepstorff & Nansen (1998), která je podle porovnávací studie Vadlejch et al. (2011) vysoce citlivá.

Vzorky pro koprologické vyšetření byly odebírány z rekta hostitelských zvířat. U farmově chovaných nutrií byly vzorky odebírány po defekaci zvířat. U volně žijících nutrií je získávání vzorků trusu obtížnější. Volně žijící nutrie odkládají trus většinou do vody. Občas bylo možné trus najít na místě pastvy, nebo v blízkosti nor na náplavech, kde nutrie odpočívají.

Každý vzorek byl označen číslem a uložen do sáčku. Ze vzorku trusu byly odváženy 4 g, které byly vloženy do třecí misky. K těmto výkalům bylo přidáno 56 ml vody a vše bylo rozmělněno tloučkem. Vzniklá suspenze byla přecezena přes sítko do kádinky. Z kádinky bylo odebráno 10 ml suspenze do zkumavky. Zkumavky se suspenzí byly centrifugovány 5 minut při 1200 RPM. Následně byl slitím odstraněn supernatant a do zkumavek byl doplněn flotační roztok na celkový objem 4 ml. Flotačním médiem byl nasycený roztok NaCl s 500 g glukózy na 1 litr NaCl. Poté byl vzorek promíchán Pasteurovou pipetou a aplikován do McMasterových komůrek, kde se nechal 5 minut flotovat.

Vzorky byly vyšetřeny pod světelným mikroskopem Olympus CX21 při zvětšení 40 – 100 x. Součet nalezených vajíček byl vynásoben číslem 20. Intenzitu infekce udává výsledek EPG (eggs per gram – počet vajíček v 1 g trusu).

4.5 Morfologická analýza

Dospělí jedinci rodu *Trichuris* byli podle morfologických znaků identifikováni do druhů. Jako hlavní determinační znaky byly sledovány u samic: tvar a velikost vulvy, vzdálenost od konce jícnu k vulvě, šířka těla v místě konce jícnu, vzdálenost vulvy od svěrače dělohy, šířka dělohy, vzdálenost vaječníků od konce těla a velikost vajec. Pro zařazení jednotlivých hlístic do druhů byla použita dosavadní dostupná literatura s popisy jednotlivých druhů: Skrjabin et al. (1957), Knight (1971), Baruš et al. (1978), Špakulová (1994), Lanfredi et al. (1995) a Oliveros & Cuttilas 2003. Jednotlivé hlístice byly změřeny, popsány, vyfotografovány pod světelným mikroskopem Olympus BX 21 s fotoaparátem za pomoci softwaru pro analýzu obrazu Quick Photo Micro. Následně byly uloženy do mikroskopavek typu Eppendorf v 70 % etanolu.

4.6 Molekulární analýza

Celková DNA byla izolována z jednotlivých hlístic, které byly uchovávány v 70 % etanolu a morfologicky identifikované do druhu. K izolaci celkové DNA byly použity komerční kity (QI Aampu Tissue Kit (Qiagen), NucleoSpin® Tissue Kit) přesně podle protokolu výrobce. Úsek ribosomální DNA (rDNA), zahrnující oblast ITS-1, 5.8S RNA a oblast ITS-2, byl amplifikován polymerázovou řetězovou reakcí PCR za použití univerzálních párů primerů: přímý primer NC5 5'- GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT-3 'a reverzní primer NC2 5'-TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3 ' (Gasser et al. 1996; Zhu et al. 2000). Složení reakčních směsí PCR, jejich průběh a následná práce se získanými produkty se u publikovaných prací lišila. Postupy jsou podrobně popsány v publikovaných pracích č. 1 a č. 3.

4.7 Statistická analýza

V práci byly použity následující statistické testy (Dell Statistica Software, Dell Inc. 2015): Mann-Whitney U test byl aplikován při porovnání morfometrických znaků druhů

a populací *Trichuris ovis* a *T. discolor*; χ^2 testem byly porovnány hodnoty prevalence a intenzity infekce těchto parazitů u různých druhů a věkových kategorií hostitelských zvířat. Regresní analýza (lineární model) byla použita jak při vyhodnocení vztahu mezi hodnotami EPG a počtem samic trichurů v jednotlivých hostitelských zvířatech, tak i při predikci EPG.

5. Publikované práce

1. Vejl P, **Nechybová S**, Peřínková P, Melounová M, Sedláková V, Vašek J, Čílová D, Rylková K, Jankovská I, Vadlejch J, Langrová I. 2017. Reliable molecular differentiation of *Trichuris ovis* and *Trichuris discolor* from sheep (*Ovis orientalis aries*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) and morphological characterisation of their females: morphology does not work sufficiently. *Parasitology Research* **116**:2199-2210.
2. **Nechybová S**, Vejl P, Hart V, Melounová M, Čílová D, Vašek J, Jankovská I, Vadlejch J, Langrová I. 2018. Long-term occurrence of *Trichuris* species in wild ruminants in the Czech Republic. *Parasitology Research* **117**:1699-1708.
3. Rylková K, Tůmová E, Brožová A, Jankovská I, Vadlejch J, Čadková Z, Frýdlová J, Peřínková P, Langrová I, Chodová D, **Nechybová S**, Scháňková Š. 2015. Genetic and morphological characterization of *Trichuris myocastoris* found in *Myocastor coypus* in the Czech Republic. *Parasitology Research* **114**:3969-3975.
4. **Nechybová S**, Langrová I, Tůmová E. 2017. Parasites of *Myocastor coypus* – a comparison in farm animals and their feral counterparts. *Scientia Agriculturae Bohemica* **49**:21-25.

Reliable molecular differentiation of *Trichuris ovis* and *Trichuris discolor* from sheep (*Ovis orientalis aries*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) and morphological characterisation of their females: morphology does not work sufficiently

Pavel Vejl¹ · Stanislava Nechybová² · Pavla Peřinková² · Martina Melounová¹ · Vladimíra Sedláková¹ · Jakub Vašek¹ · Daniela Čílová¹ · Kateřina Rylková¹ · Ivana Jankovská² · Jaroslav Vadlejch² · Iva Langrová²

Received: 24 January 2017 / Accepted: 26 May 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract The main aim of the study was to evaluate associations between morphological variability of *Trichuris* females from sheep and roe deer and their rDNA polymorphism in whipworm populations from the Czech Republic. The results introduced the use of new molecular markers based on the internal transcribed spacer (ITS)1-5.8S RNA-ITS2 region polymorphisms, as useful tools for the unambiguous differentiation of congeners *Trichuris ovis* and *Trichuris discolor*. These markers revealed both parasites in roe deer and in sheep; however, *T. ovis* females predominated in sheep while *T. discolor* females occurred mostly in roe deer. Additional analysis of ITS1-5.8 rRNA-ITS2 discovered the genetic uniformity of the analysed *T. discolor* but high haplotype variation of *T. ovis*. Simultaneously, molecularly designated female individuals of both species were categorised into four morphotypes (MT) on the basis of morphology of genital pore area. MT1 and MT4 (vulvar opening on everted vaginal appendage/on visible cuticular bulge) occurred only in *T. ovis*, MT2 (uneverted vagina—vulvar opening without any elevation) was identified only in *T. discolor* and MT3 (transient type of vulvar opening on a small swelling) was observed in both species. Statistical analysis of biometric data confirmed that morphology of vulva is not a reliable marker

for the species determination. On the basis of the ITS1-5.8S RNA-ITS2 region variability, we carried out a phylogenetic analysis (maximum likelihood method, Hasegawa-Kishino-Yano model) which showed that *T. ovis* haplotypes from the Czech Republic and Ireland and *T. discolor* haplotypes from the Czech Republic, Spain, Iran and Japan are sister OTUs.

Keywords *Trichuris discolor* · *Trichuris ovis* · ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region · Molecular markers · Morphotypes

Introduction

Trichuris nematodes are common endoparasites of both domestic and wild ruminants. Individual species differ from each other based on host preference, body length, length of the anterior oesophageal portion and body width. However, they differ mainly in the shape and size of their reproductive organs. Spicule length is considered the main criterion used to identify *Trichuris* males. Female trichurids are more difficult to identify than are males (Tenora et al. 1993). The determination of females is based primarily on vulvar characteristics (Skrjabin et al. 1957; Knight 1971; Baruš et al. 1978; Rickard and Bishop 1991; Lanfredi et al. 1995; Cutillas et al. 2009), vagina structure and lining and, alternatively, the distance from the vulva to the uterine sphincter (Knight 1971; Callejón et al. 2012, 2015). However, the shape and size of this structure is variable (Zaman 1984; Tenora et al. 1988, 1993).

Trichuris ovis, *Trichuris globulosa* and *Trichuris skrjabini* are common endoparasites of sheep (*Ovis orientalis aries*) (Makovcová et al. 2008; Khan et al. 2010; Khalafalla et al. 2011). The vagina in *T. globulosa* females never appears

✉ Pavel Vejl
vejl@af.czu.cz

¹ Department of Genetics and Breeding, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences in Prague, Prague, Czech Republic

² Department of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences in Prague, Prague, Czech Republic

everted in contrast to that of female *T. ovis* and *T. skrjabini* (Skrjabin et al. 1957; Baruš et al. 1978; Cutillas et al. 1995; Callejón et al. 2015). The morphological and genetic characterisation of *T. ovis* females is well documented (Baylis 1932; Knight 1971; Baruš et al. 1978; Cutillas et al. 1995; Oliveros and Cutillas 2003; Liu et al. 2012; Kuchai et al. 2013; Wang et al. 2013). Nevertheless, descriptions of *T. globulosa* females are inconsistent (Noda 1955; Skrjabin et al. 1957; Gagarin 1972; Baruš et al. 1978; Cutillas et al. 1995; Callejón et al. 2015). Despite the variable results of morphometric measurements, the cited authors claim consistently that the vagina of *T. globulosa* is never everted.

Another species that possesses an uneverted vagina is *Trichuris discolor* (Knight 1971; Oğuz 1977; Tenora et al. 1992; Lanfredi et al. 1995; Callejón et al. 2012). *T. discolor* has been described from cattle (Noda 1955; Oğuz 1977; Tenora et al. 1992; Santos et al. 2010; Callejón et al. 2012). These nematodes have also been obtained from zebu (*Bos indicus*), Japanese serow (*Capricornis crispus*), mountain sheep (*Ovis canadensis mexicana*) and okapi (*Okapia johnstoni*) (Baer 1950; Allen 1955; Skrjabin et al. 1957; Yamaguti and Hayama 1961; Tenora et al. 1992; Lanfredi et al. 1995). Most recently, this nematode has been found in wild yak (*Bos grunniens*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) (Liu et al. 2012; Salaba et al. 2013). Morphological descriptions of *T. discolor* females are provided in several studies: (Noda 1955; Knight 1971; Rickard and Bishop 1991; Tenora et al. 1992; Lanfredi et al. 1995; Callejón et al. 2012).

The phylogeny of the genus *Trichuris* has been studied by various authors using molecular markers. Cutillas et al. (1995) conducted one of the first studies of *T. ovis* and *T. globulosa* genetic variability using isoenzyme markers. These authors hypothesised that *T. ovis* and *T. globulosa* are the same biological species on the basis of isoenzyme markers and biometric data. Oliveros et al. (2000) evaluated the internal transcribed spacer 2 (ITS2) region variability of different *Trichuris* species (*T. ovis*, *T. globulosa*, *Trichuris suis* and *Trichuris leporis*). They found that ITS2 sequences did not differ between *T. ovis* and *T. globulosa*. Cutillas et al. (2004) focused on the evaluation of ITS1-5.8S RNA-ITS2 sequence differences between *T. skrjabini*, *T. ovis*, *T. globulosa*, *T. leporis*, *T. muris* and *T. arvicolae*. The lengths of the ITS1 and ITS2 regions, as well as G + C content, were determined for each of the evaluated species. The only case in which differences in size of the ITS1 and ITS2 regions were not confirmed was that of *T. ovis* and *T. globulosa*.

Liu et al. (2012) were the first to describe the complete mitochondrial genome of *T. ovis* and *T. discolor* while Callejón et al. (2012) used the partial sequence of the 16S mitochondrial DNA gene and ITS1 and ITS2 regions of ribosomal DNA (rDNA) as differential markers of *T. discolor* and *T. ovis*. In this study, individuals of the *Trichuris* genus originating from cattle (*Bos taurus*) from Iran and Spain were analysed. Phylogenetic

studies showed that *T. discolor* individuals from Iran were clustered together and separated from those originating from Spain. Callejón et al. (2015) focused on the taxonomy and phylogeny of *Trichuris* species from *Camelus dromedarius* and *T. globulosa* from sheep originating from Iran and South Africa, respectively. The authors found that polymorphisms in the ITS2 region are not sufficient to distinguish *T. globulosa* from *T. discolor*. For this reason, cytochrome c oxidase and cytochrome b partial gene sequencing were carried out. Callejón et al. (2015) recognised different genetic lineages of *T. globulosa* and *T. discolor*.

The aims of this study were as follows: (a) to define four morphotypes of *Trichuris* females originating from sheep and roe deer on basis of the morphology of vulvar area; (b) to analyse polymorphism of the ITS1-5.8S RNA-ITS2 region of ribosomal DNA and to design species-specific markers; (c) to evaluate the occurrence of *T. ovis* and *T. discolor* in sheep and roe deer in the Czech Republic; and (d) using all relevant data on *T. ovis* and *T. discolor*, to implement a molecular phylogenetic analysis and to reconsider a degree of the genetic variability.

Material and methods

Sample collecting and host origin

Female (235) and male (5) individuals of the *Trichuris* species were collected from sheep and roe deer originating from 20 localities across the Czech Republic. All of the worms were separated from the caecum and an adjacent part of the colon, and subsequently rinsed in a physiological saline solution in order to remove contaminants. Species determination of *Trichuris* males was carried out according to Skrjabin et al. (1957) and Oliveros and Cutillas (2003).

All of the experimental procedures were conducted in accordance with Czech legislation (section 29 of Act No. 246/1992 Coll. on the protection of animals against cruelty, as amended by Act No. 77/2004 Coll.). We hereby declare that animal handling conducted in our study complies with the relevant European and international guidelines on animal welfare, namely Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes and the guidelines and recommendations of the Federation of Laboratory Animal Science Associations. All experimental protocols were approved by the Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources of the Czech Republic and Institutional and National Committees.

Identification of vulva morphotypes in *Trichuris* females

Trichuris females were categorised into four vulvar morphotypes: MT1 with a visibly everted vagina; MT2 with

a vulvar opening without an everted vagina; MT3 with a vulvar opening on a small swelling; and MT4 with a vulvar opening on a clearly visible bulge.

Molecular study and haplotype analysis

Trichuris individuals used for molecular analysis were preserved in 96% ethanol. Before DNA extraction, they were dried in a freeze-dryer (Alpha 1–4 Christ) for 60 min. Genomic DNA was extracted from 235 females and 5 males using a NucleoSpin® Tissue Kit. An animal tissue support protocol was utilised. The rDNA region, consisting of ITS-1, 5.8SRNA gene and ITS-2, was amplified from 70 randomly selected female and male individuals from sheep and roe deer using PCR. All four female morphotypes were analysed. A primer pair (nc5 5'-GTAGGTGAACCTGCGGAAGG ATCATT-3' and NC2 5'-TTAGTTCTTTTCCTCCGCT-3') designed by Gasser et al. (1996) was used for amplification. The PCR mix (12.5 µl) consisted of the following: 10 ng of genomic DNA, 5 ng BSA, 0.4 µM of each primer, 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of dNTP, 2 mM of TMA oxalate (Top Bio) and 0.7 U of *Taq* polymerase (Roche). The amplification was performed in a C1000™ Thermal Cycler (BioRad) under the following conditions: 1 × (94 °C—180 s), 35 × (94 °C—60 s, 55 °C—60 s, 72 °C—60 s) and 1 × (72 °C—600 s). Amplicons were electrophoresed through 1% agarose gels and visualised using ethidium bromide, and later extracted from the gel using a MiniElute PCR Purification Kit (Qiagen). A BigDye® Terminator v 3.1 Kit (Life Technologies) and an ABI 3730xl DNA Analyser (Life Technologies) were used for rDNA region sequencing. Three replicates of each PCR amplicon were sequenced.

Sequences of the rDNA region (70 recently analysed sequences and 18 previously published sequences) were used to distinguish *T. discolor* from *T. ovis*. All obtained ITS1-5.8S RNA-ITS2 sequences from *T. discolor* and *T. ovis* were deposited in GenBank. Furthermore, haplotypes of both species were identified. The MAFFT version 7 software (Kato and Toh 2008) was used for multiple sequence alignment (Q-INS-i iterative refinement method). The secondary structures of RNA were considered. The software jModelTest 2.1.10 v20160303 (Darriba et al. 2012) was used for an optimal substitution model selection. Subtree Pruning and Regrafting method (SPR) was used as a tree topology search operation. The best substitution model was chosen according to Akaike Information Criterion (AIC) (Akaike 1973), Bayesian Information Criterion (BIC) (Schwarz 1978) and Decision Theory Performance-Based Selection (DT) (Minin et al. 2003). Phylogenetic analysis was conducted with PhyML 3.0 (Guindon and Gascuel 2003). The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method based on the Hasegawa-Kishino-Yano model (HKY + G) (Hasegawa et al. 1985). A discrete Gamma distribution was

used to model evolutionary rate differences among sites. The bootstrap consensus tree, inferred from 1000 replicates, was used to represent *T. discolor* and *T. ovis* evolutionary history. Branches corresponding to partitions reproduced in less than 70% bootstrap replicates were collapsed. Five *Trichuris myocastoris* haplotypes (M1, M2, M3, M4 and M5) were used as outgroup sequences. All five haplotypes originated from coypus (*Myocastor coypus*) from the Czech Republic (present results, GenBank accession numbers MF077367, MF077368, MF077369, MF077370 and MF077371). Two *T. skrjabini* haplotypes were also used as representatives of the genetically related taxon. The S1 haplotype originated from sheep from the Czech Republic (present result, GenBank accession number KT630825); and the S2 haplotype (GenBank accession number AJ489248) came from goats (*Capra aegagrus hircus*) from Spain.

New PCR marker design and their application in distinguishing *T. discolor* from *T. ovis*

Regions with insertions and deletions in *T. discolor* ITS 1 and *T. ovis* ITS 1 were used to design two species-specific markers (INDEL 1 and INDEL 2). A Primer3 Input 0.4.0 Program (Rozen and Skaletsky 2000) was utilised to design primer pairs (INDEL 1-F 5'-CWTTGCGGCGRAACYTCC-3' and INDEL 1-R 6FAM™-5'-GCTCACGGTAGAAAGCAAGC-3', INDEL 2-F 5'-CCATGCTGCTTACTTCCAGATC-3' and INDEL 2-R 6FAM™-5'-GTGAAGCCCAAACGGAACAG-3'). Designed primer positions in the ITS 1 region of rDNA and the size of the insertions and deletions are shown in Fig. 1. The length polymorphism of markers INDEL 1 and INDEL 2 of each haplotype is also presented in Fig. 1. The PCR mix (12.5 µl) in both markers consisted of the following: 10 ng of genomic DNA, 0.4 µM of each primer, 2.2 mM of MgSO₄, 0.2 mM of dNTP and 0.25 U of Bestaq™ DNA Polymerase (Applied Biological Materials Inc.). The amplification of both markers was performed in a T Gradient Thermal Cycler (Biometra) under the following conditions: 1 × (94 °C—180 s), 28 × (94 °C—10 s, 61 °C—20 s, 72 °C—20 s) and 1 × (72 °C—600 s). PCR products were diluted 600 times in ddH₂O, and 1 µl of diluted PCR product was denatured for 5 min in 12 µl of Hi-Di formamide at 95 °C. An ABI 310 DNA Analyser (Life Technologies) was used for fragment analysis, and the GeneScan™—600 LIZ Size Standard (Life Technologies) was used for PCR amplicon size determination. A GeneMapper 4.1 Program (Life Technologies) was applied for chromatogram evaluation. Both molecular markers were used for determination of 235 female and 5 male individuals of *Trichuris* species.

For evaluating differences between numbers of *T. discolor* in roe deer and sheep, the Mann-Whitney *U* test with a correction of data continuity was employed. The same analysis was also used in *T. ovis*. The relative frequency ratios of the

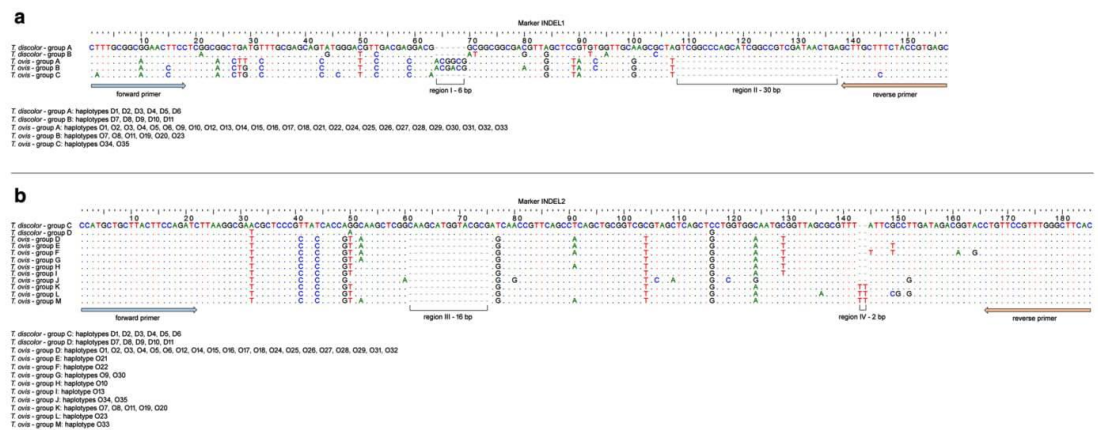


Fig. 1 Sequences of markers INDEL1 (**a**) and INDEL2 (**b**) in various *Trichuris discolor* and *Trichuris ovis* haplotypes

occurrence of both parasites in roe deer and sheep were compared with a χ^2 test. Software Dell Statistica (Dell Inc. 2015) was used for both statistical tests.

Biometric and morphologic studies of *T. discolor* and *T. ovis* females

A detailed morphometric study was carried out on 250 females, which were taxonomically classified using the PCR markers. Morphological data were assessed according to Skrjabin et al. (1957), Knight (1971), Lanfredi et al. (1995), Callejón et al. (2012) and Callejón et al. (2015). All specimens were studied using an Olympus BX51 microscope at a total magnification of $\times 200$ – $\times 400$, and morphological characters were measured with QuickPHOTO MICRO 3.0 software.

The Mann-Whitney *U* test by software Dell Statistica (Dell Inc. 2015) was used to compare morphometric measurements in *T. discolor* and *T. ovis* individuals regardless of their morphotypes and hosts. This statistical analysis was not carried out for vulvar appendage width and vulvar appendage length because these parameters are measurable only in MT1, MT3 and MT4 morphotypes.

Results

Occurrence of *Trichuris* female morphotypes in studied hosts

In roe deer, only morphotypes MT2, MT3 and MT4 were identified. As shown in Table 1, the most dominant was MT2 with a vulvar opening without an everted vagina (96.43%). Contrarily, all morphotypes were discovered in sheep and MT1 with a visibly everted vagina was the most frequent (71.58%) (Table 1). The vulvar characteristics of

Trichuris, which are classified as MT1, MT2, MT3 and MT4, are presented in Fig. 2.

Molecular analysis and phylogenetic study

Tables 2 and 3 show specimens of *T. discolor* and *T. ovis* that were used for haplotype analysis.

All of the compared ITS1-5.8S RNA-ITS2 sequences of *T. discolor* were homozygous. The combination of two haplotypes in one *T. ovis* individual was identified in three evaluated sequences (O15/O16, O17/O18, O19/O20). The remaining *T. ovis* ITS1-5.8S RNA-ITS2 sequences (GenBank accession numbers shown in Table 3) may be regarded as homozygous.

The differentiation between *T. discolor* and *T. ovis* and the comparison of the variability of the ITS1-5.8S RNA-ITS2 regions were the main basis of the phylogenetic analysis. Evolutionary analysis presented in Fig. 3 involved 53 nucleotide sequences, and there was a total of 1716 positions in the final dataset. The software jModelTest 2.1.10 v20160303 (Darriba et al. 2012) found 288 models in the 100% confidence interval. All three criteria (AIC, BIC and DT) identified the HKY + G model (Hasegawa et al. 1985) as the most suitable. Gama shape parameter was 0.8530 and transition/transversion ratio was 1.7578. The percentages of replicate trees, in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates), are shown next to the nodes (red numbers).

Species-specific PCR marker design and their application in distinguishing *T. discolor* from *T. ovis*

Insertion-deletion polymorphisms typical of *T. discolor* and *T. ovis* were identified based on multiple alignment of the ITS1-5.8S RNA-ITS2 regions listed in Tables 2 and 3. Species-specific insertions or deletions were discovered only

Table 1 Origin of *Trichuris* infrapopulations and overview of described morphotypes and species (species identification was carried out by molecular markers)

Host	Locality	Number of parasites/morphotype			
		<i>Trichuris discolor</i>		<i>Trichuris ovis</i>	
		♀	♂	♀	♂
<i>C. capreolus</i> /1	50° 25' 06.8" N 14° 31' 24.3" E	10/MT2	0	0	0
<i>C. capreolus</i> /4	50° 37' 08.8" N 15° 11' 16.3" E	2/MT2	0	0	0
<i>C. capreolus</i> /5	50° 24' 51.6" N 14° 32' 11.0" E	1/MT2	0	0	0
<i>C. capreolus</i> /10	50° 20' 14.0" N 14° 32' 54.9" E	5/MT2	0	0	0
<i>C. capreolus</i> /14	50° 35' 38.8" N 15° 15' 38.5" E	32/MT2	0	1/MT1	2
<i>C. capreolus</i> /31	50° 22' 04.7" N 14° 32' 32.4" E	9/MT2	0	0	0
<i>C. capreolus</i> /47	50° 22' 37.4" N 14° 35' 36.5" E	4/MT2	0	0	0
<i>C. capreolus</i> /51	50° 35' 55.2" N 15° 12' 42.6" E	19/MT2	0	0	0
<i>C. capreolus</i> /65	50° 42' 37.4" N 15° 14' 04.6" E	2/MT2	0	0	0
<i>C. capreolus</i> /86	49° 54' 32.2" N 12° 52' 30.4" E	1/MT2	0	0	0
<i>C. capreolus</i> /88	50° 23' 56.4" N 14° 54' 29.6" E	1/MT2	0	0	0
<i>C. capreolus</i> /89	50° 23' 38.5" N 14° 53' 47.5" E	1/MT2	0	0	0
<i>C. capreolus</i> /98	50° 35' 55.2" N 15° 12' 42.6" E	11/MT2, 2/MT3	0	0	0
<i>C. capreolus</i> /99	50° 35' 42.8" N 15° 13' 16.5" E	8/MT2	0	1/MT1	0
<i>C. capreolus</i> /T1	50° 02' 27.5" N 14° 21' 59.2" E	14/MT2	0	1/MT1	0
<i>C. capreolus</i> /T2	50° 36' 25.9" N 15° 12' 12.2" E	8/MT2	0	0	0
<i>C. capreolus</i> /T6	50° 34' 51.5" N 15° 11' 13.6" E	7/MT2	0	0	0
Total number of parasites		137		5	
Frequencies of parasites [%]		96.48		3.52	
Number of parasites per host					
\bar{x} , CI _{95%}		8.06, (4.16 to 11.96)		0.29, (-0.08 to 0.66)	
\bar{x} , CI _{95%}		7.00, (2.00 to 13.00)		0.00, (0.00 to 0.00)	
<i>O. orientalis aries</i> /6	49° 53' 48.9" N 13° 18' 32.8" E	0	0	13/MT1	0
<i>O. orientalis aries</i> /8	50° 50' 53.0" N 15° 04' 55.4" E	1/MT2	0	0	2
<i>O. orientalis aries</i> /54	50° 50' 53.0" N 15° 04' 55.4" E	1/MT2	0	0	0
<i>O. orientalis aries</i> /56	49° 02' 56.5" N 13° 47' 19.0" E	2/MT2	0	1/MT1	0
<i>O. orientalis aries</i> /57	49° 02' 56.5" N 13° 47' 19.0" E	1/MT2	0	0	0
<i>O. orientalis aries</i> /58	49° 02' 56.5" N 13° 47' 19.0" E	1/MT2	0	0	0
<i>O. orientalis aries</i> /59	49° 02' 56.5" N 13° 47' 19.0" E	2/MT2	0	0	0
<i>O. orientalis aries</i> /60	49° 02' 56.5" N 13° 47' 19.0" E	1/MT2	0	0	0
<i>O. orientalis aries</i> /62	49° 02' 56.5" N 13° 47' 19.0" E	1/MT2	0	0	0
<i>O. orientalis aries</i> /92	50° 35' 38.8" N 15° 15' 38.5" E	3/MT2	0	19/MT1, 5/MT3, 4/MT4	1
<i>O. orientalis aries</i> /104	50° 41' 48.6" N 15° 43' 58.4" E	4/MT2	0	6/MT1	0
<i>O. orientalis aries</i> /T3	49° 53' 48.9" N 13° 18' 32.8" E	0	0	6/MT1	0
<i>O. orientalis aries</i> /T4	49° 53' 48.9" N 13° 18' 32.8" E	0	0	13/MT1	0
<i>O. orientalis aries</i> /T5	49° 53' 48.9" N 13° 18' 32.8" E	0	0	7/MT1	0
<i>O. orientalis aries</i> /T7	49° 53' 48.9" N 13° 18' 32.8" E	1/MT2	0	3/MT1	0
Total number of parasites		18		80	
Frequencies of parasites [%]		18.37		81.63	
Number of parasites per host					
\bar{x} , CI _{95%}		1.20, (0.62 to 1.78)		5.33, (1.33 to 9.33)	
\bar{x} , CI _{95%}		1.00, (1.00 to 2.00)		2.00, (0.00 to 13.00)	

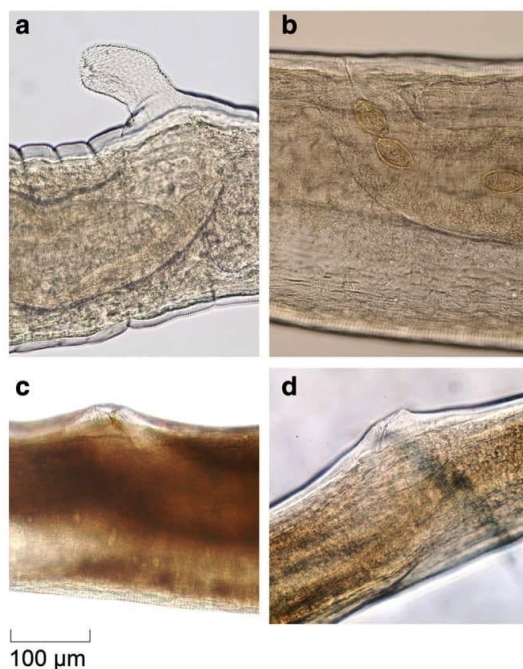


Fig. 2 Morphotypes MT1 (a), MT2 (b), MT3 (c) and MT4 (d) of *Trichuris* females isolated from sheep and roe deer originated from the Czech Republic

in the ITS1 region. Two primer pairs used to amplify INDEL1 and INDEL2 markers were designed in the ITS1 region to ensure specific amplification only in *T. discolor* and *T. ovis*. Marker sequences, primer positions and regions with deletions or insertions are shown in Fig. 1. The INDEL1 amplicon size is 151 bp in *T. discolor* and 127 bp in *T. ovis*, whereas the INDEL2 amplicon size is 183 bp in *T. discolor* and 168 or 170 bp in *T. ovis*. In *T. ovis* populations of the Czech Republic, the INDEL2 marker possesses a codominant character.

Moreover, we discovered that region I of marker INDEL1 corresponds to a microsatellite sequence (CGG)_n. This trinucleotide microsatellite motive shows interspecific and intraspecific variability (Fig. 1). The microsatellite sequence (CGG)₃ was found in all *T. discolor* haplotypes, with the exception of D7, D8, D9, D10 and D11 (group B from Iran). The sequence (CGG)₁ was discovered only in Iranian haplotype group B of *T. discolor*. The sequence (CGG)₄ was typical of all *T. ovis* haplotypes, with the exception O34 and O35 from Spain, which had the sequence (CGG)₂. Moreover, we revealed another microsatellite sequence (CTG)₃ in the ITS1 region and one microsatellite sequence (GCT)₃ in the ITS2 region. Interspecific variability was not observed in these microsatellites.

Statistically significant differences ($p < 0.05$) between the numbers of *T. discolor* individuals determined by design markers (regardless of their morphotypes) in roe deer and those

in sheep were confirmed on the basis of a Mann-Whitney U test. The same result was also confirmed in *T. ovis*. This conclusion was also supported by χ^2 test. The relative frequencies of *T. discolor* (96.48%) and *T. ovis* (3.52%) in roe deer and *T. discolor* (18.37%) and *T. ovis* (81.63%) in sheep are also shown in Table 1. Using the χ^2 test, we compared the ratios between frequencies of *T. discolor* and *T. ovis* in roe deer and in sheep, respectively. The identity likelihood of compared ratios was only 1.76×10^{-90} .

Biometric analysis of *T. discolor* and *T. ovis* female individuals

We carried out a detailed biometrical analysis of *Trichuris* females, whose identification was validated using INDEL1 and INDEL2 markers. Biometric measurements that were used for *T. discolor* and *T. ovis* female descriptions are presented in Table 4. We found no statistically significant differences ($p < 0.05$) in any of biometric measurements of *T. discolor* and *T. ovis* individuals regardless of their morphotypes and hosts.

The vulvar description of *T. discolor* female individuals obtained from roe deer and sheep is as follows: the vulva lies 0.08–0.36 mm from the end of the oesophagus and has a specific structure. The first part of the vagina is slightly wavy, but at times, it is almost straight. The subsequent region is convoluted, and tight folds often form in the distal area. The internal surface of the vagina is beset with small spines. The uneverted vagina (MT2) was detected in 98.71% of *T. discolor* female individuals; however, the vulva was located on a small swelling (MT3) in 1.29% of *T. discolor* female individuals.

The vulvar description of *T. ovis* females obtained from roe deer and sheep is as follows: the vulva lies 0.16–0.35 mm from the end of the oesophagus and protrudes externally as a slightly posteriorly bent snub appendage, which is 0.08–0.16 mm long and 0.05–0.16 mm wide (88.75% of *T. ovis* female individuals). This appendage is covered with spine-like papillae (Fig. 2). However, 11.25% of *T. ovis* female individuals have a vulvar opening on a small bump (MT3) or a clearly visible bulge (MT4). The vagina passes posteriad with two to four curves and then may or may not become straight, and finally, some more curves appear before transforming into the uterus. The straight-line distance from the vulva to the junction of the vagina and uterus ranges from 1.58 to 5.89 mm.

Discussion

The species determination of *Trichuris* females is based primarily on vulvar descriptions (Skrjabin et al. 1957; Knight 1971; Baruš et al. 1978; Rickard and Bishop 1991; Lanfredi

Table 2 Overview of specimens used to identify *Trichuris discolor* haplotypes (species identification was carried out by molecular markers)

Haplotype	Host	Number of sequenced specimens/ morphotype			Origin	Authors—GenBank
		♀	♂	Unspecified		
D1	<i>C. capreolus</i> /14	9/MT2, 1/MT3	–	–	CZE	Present results— KT630807
D1	<i>C. capreolus</i> /T1	12/MT2, 1/MT3	–	–	CZE	Present results— KT630807
D1	<i>C. capreolus</i> /T2	8/MT2	–	–	CZE	Present results— KT630807
D1	<i>C. crispus</i>	–	–	1	JPN	Itagaki et al. (2007)— AB367794
D1	<i>O. orientalis aries</i> /8	1/MT2	–	–	CZE	Present results— KT630808
D1	<i>O. orientalis aries</i> /T6	1/MT2	–	–	CZE	Present results— KT630808
D2	<i>B. taurus</i>	1	–	–	ESP	Callejón et al. (2012)— HE608849
D2	<i>C. crispus</i>	–	–	1	JPN	Itagaki et al. (2007)— AB367795
D3	<i>B. taurus</i>	1	–	–	ESP	Callejón et al. (2012)— FR870272
D4	<i>B. taurus</i>	1	–	–	ESP	Callejón et al. (2012)— HE608846
D4	<i>B. taurus</i>	1	–	–	ESP	Callejón et al. (2012)— HE608847
D5	<i>B. taurus</i>	1	–	–	ESP	Callejón et al. (2012)— HE608848
D6	<i>B. taurus</i>	1	–	–	ESP	Callejón et al. (2012)— HE608850
D7	<i>B. taurus</i>	–	–	1	IRN	Callejón et al. (2012)— FR870273
D7	<i>B. taurus</i>	–	–	1	IRN	Callejón et al. (2012)— HE608851
D8	<i>B. taurus</i>	–	–	1	IRN	Callejón et al. (2012)— HE608852
D9	<i>B. taurus</i>	–	–	1	IRN	Callejón et al. (2012)— HE608853
D10	<i>B. taurus</i>	–	–	1	IRN	Callejón et al. (2012)— HE608854
D11	<i>B. taurus</i>	–	–	1	IRN	Callejón et al. (2012)— HE608855

et al. 1995; Cutillas et al. 2009). However, a determining factor often used in this description is the presence of an everted or non-everted vagina, especially when describing trichurids from wild ruminants (Erhardová and Kotrlý 1955; Kutzer and Hinaidy 1969; Gagarin 1972; Spellmeyer 1996; Rehbein et al. 2000, 2001). For this reason, we focused on the combination of morphometric characteristics of *Trichuris* females and molecular taxonomic methods. Genetic analyses helped us to unambiguously distinguish *T. discolor* from *T. ovis*. Therefore, we studied vagina morphotype occurrence in individuals that were taxonomically classified by molecular markers.

Knight (1971) carried out a comprehensive redescription of *T. discolor* female individuals. This author hypothesised that only uneverted vaginae occur in *T. discolor* populations. This vagina type corresponds to MT2, which was observed in *T. discolor* populations from the Czech Republic. It is necessary to emphasise that in previous studies, *Trichuris* female individuals from roe deer were often identified as *T. globulosa*. However, the majority of *Trichuris* female individuals were identified only on the basis of an uneverted vagina (Erhardová and Kotrlý 1955; Kutzer and Hinaidy 1969; Gagarin 1972; Spellmeyer 1996; Rehbein et al. 2000, 2001). Salaba et al. (2013) were the first to study *Trichuris* nematodes

Table 3 Overview of specimens used to identify *Trichuris ovis* haplotypes (species identification was carried out by molecular markers)

Haplotype	Host	Number of sequenced specimens/morphotype			Origin	Authors—GenBank
		♀	♂	Unspecified		
O1	<i>O. orientalis aries</i> /6	–	1	–	CZE	Present results— KT630811
O2	<i>O. orientalis aries</i> /8	–	1	–	CZE	Present results— KT630812
O2	<i>O. orientalis aries</i> /6	1/MT3	2	–	CZE	Present results— KT630812
O3	<i>C. capreolus</i> /14	1/MT1	–	–	CZE	Present results— KT630814
O3	<i>O. orientalis aries</i> /6	1/MT3	–	–	CZE	Present results— KT630813
O4	<i>O. orientalis aries</i> /6	1/MT1	–	–	CZE	Present results— KT630815
O5	<i>O. orientalis aries</i> /6	1/MT1	–	–	CZE	Present results— KT630816
O6	<i>O. orientalis aries</i> /6	1/MT1	–	–	CZE	Present results— KT630817
O7	<i>O. orientalis aries</i> /6	1/MT3	–	–	CZE	Present results— KT630818
O8	<i>O. orientalis aries</i> /6	1/MT4	–	–	CZE	Present results— KT630819
O9	<i>O. orientalis aries</i> /6	1/MT1	–	–	CZE	Present results— KT630820
O10	<i>O. orientalis aries</i> /6	1/MT4	–	–	CZE	Present results— KT630821
O11	<i>O. orientalis aries</i> /6	1/MT1	–	–	CZE	Present results— KT630822
O11	<i>O. orientalis aries</i> /8	–	1	–	CZE	Present results— KT630822
O12	<i>O. orientalis aries</i> /T5	–	1	–	CZE	Present results— JX218206
O13	<i>C. capreolus</i> /14	–	1	–	CZE	Present results— KT630824
O14	<i>C. capreolus</i> /14	–	1	–	CZE	Present results— KT696534
O14	<i>O. orientalis aries</i> /T4	1/MT1	–	–	CZE	Present results— JX218216
O15/O16	<i>O. orientalis aries</i> /T3	1/MT1	–	–	CZE	Present results— JX218200
O17	<i>O. orientalis aries</i> /T3	1/MT1	2	–	CZE	Present results— JX218204
O17/O18	<i>O. orientalis aries</i> /T3	–	1	–	CZE	Present results— JX218202
O19/O20	<i>O. orientalis aries</i> /T3	–	1	–	CZE	Present results— JX218203
O21	<i>O. orientalis aries</i> /T5	–	1	–	CZE	Present results— JX218205
O22	<i>O. orientalis aries</i> /T5	1/MT1	–	–	CZE	Present results— JX218207
O23	<i>O. orientalis aries</i> /T5	1/MT1	–	–	CZE	Present results— JX218208
O24	<i>O. orientalis aries</i> /T6	–	1	–	CZE	Present results— JX218209
O24	<i>O. orientalis aries</i> /T5	1/MT1	1	–	CZE	Present results— JX218209
O25	<i>O. orientalis aries</i> /T6	1/MT1	–	–	CZE	Present results— JX218210
O26	<i>O. orientalis aries</i> /T6	–	1	–	CZE	Present results— JX218211
O27	<i>O. orientalis aries</i> /T4	1/MT1	–	–	CZE	Present results— JX218212
O28	<i>O. orientalis aries</i> /T4	1/MT4	–	–	CZE	Present results— JX218213
O29	<i>O. orientalis aries</i> /T4	1/MT1	–	–	CZE	Present results— JX218214
O30	<i>O. orientalis aries</i> /T4	1/MT1	–	–	CZE	Present results— JX218215
O31	<i>O. orientalis aries</i> /T4	1/MT1	–	–	CZE	Present results— JX218217
O32	<i>C. capreolus</i> /T1	–	1	–	CZE	Salaba et al. (2013)— JX218218
O33	<i>O. orientalis aries</i>	–	–	1	IRL	Conneely et al. (2011)— JF680987
O34	<i>B. taurus</i>	1	–	–	ESP	Callejón et al. (2012)— FR870274
O35	<i>B. taurus</i>	1	–	–	ESP	Callejón et al. (2012)— FR870274

in roe deer using molecular methods. They found an occurrence of female individuals with an unevverted vagina in *T. discolor* populations from the Czech Republic.

In the case of *T. ovis* females, an externally protruded vulva covered with spine-like papillae (corresponding to MT1) was most frequently reported (Baylis 1932; Skrjabin et al. 1957;

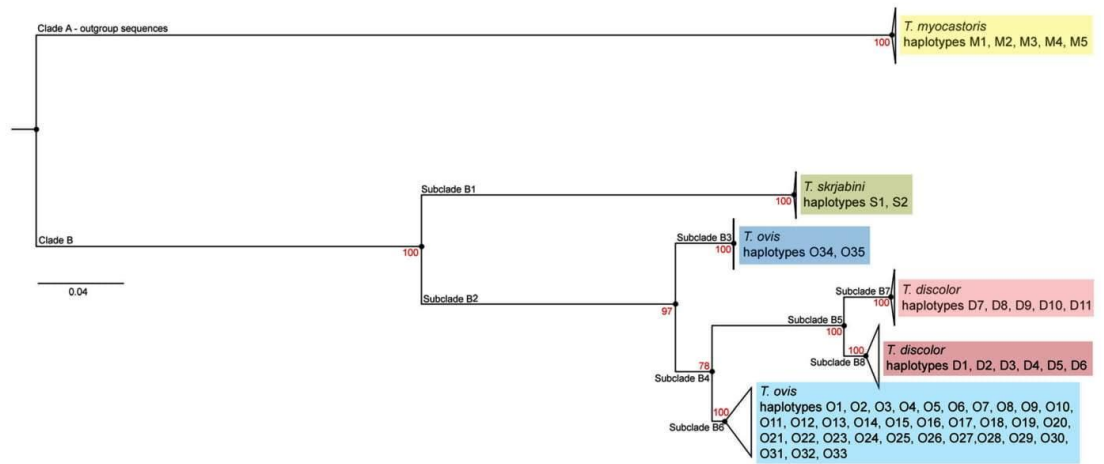


Fig. 3 Molecular phylogenetic analysis of *Trichuris discolor* and *Trichuris ovis* haplotypes by the maximum likelihood method

Knight 1971; Cutillas et al. 1995). This form of the vagina is relatively long, uniformly convoluted, and lacks a straight mid-section. The lumen of the distal part is lined with small spines. The distal part of the vagina, which is also lined with spines, is normally protruding. However, the current study has demonstrated that *T. ovis* females occur both in sheep and in roe deer and the variability of their vulvas is much broader,

involving three morphotypes (with the exception of MT1—the most common morphotype). Some females were characterised as MT3 and MT4 with a vulvar opening on a small or more pronounced swelling. Similarly, Oliveros and Cutillas (2003) describe one juvenile female in which the vagina neither appears everted nor creates prominence over the surface of the body.

Table 4 Measured morphometric parameters of *T. discolor* and *T. ovis* females

Species	<i>T. discolor</i>				<i>T. ovis</i>			
	Range	SD	\bar{x}	\bar{x}	Range	SD	\bar{x}	\bar{x}
Number of females	155				80			
Total length [mm]	23.36–55.10	12.24	39.89	41.82	33.24–61.77	10.13	44.69	42.11
Length of anterior part [mm]	16.31–39.10	9.71	27.74	30.32	25.55–46.56	8.48	34.25	30.97
Length of posterior part [mm]	7.05–16.00	4.99	12.35	11.96	5.88–15.21	5.82	10.69	11.72
Diameter of anterior part [mm]	0.10–0.18	0.04	0.14	0.13	0.11–0.18	0.09	0.13	0.13
Diameter of posterior part [mm]	0.27–0.90	0.19	0.64	0.61	0.23–0.83	0.23	0.50	0.58
Oesophagus to vulva [mm] ^a	0.08–0.36	0.14	0.25	0.24	0.16–0.35	0.11	0.23	0.24
Body width [mm] ^b	0.18–0.34	0.11	0.29	0.26	0.17–0.31	0.09	0.23	0.25
Vulva width [mm]	0.04–0.09	0.03	0.07	0.09	0.08–0.12	0.04	0.10	0.10
Vulva to uterus [mm] ^c	1.14–4.53	1.73	2.76	2.95	1.58–5.89	1.32	3.13	3.08
Uterus width [mm]	0.08–0.51	0.19	0.38	0.37	0.20–0.63	0.13	0.32	0.35
Ovary to end of body ^d	0.19–1.43	0.46	0.56	0.71	0.43–1.05	0.38	0.73	0.79
Rectum length [mm]	0.27–1.55	0.62	0.57	0.43	0.20–0.42	0.12	0.32	0.44
Egg length [mm]	0.06–0.07	0.006	0.06	0.06	0.05–0.08	0.009	0.07	0.06
Egg width [mm]	0.03–0.04	0.002	0.03	0.03	0.03–0.05	0.002	0.03	0.03

^a Distance from oesophagus end to vulva

^b Body width in the location of the oesophagus end

^c Distance from vulva to sphincter of uterus

^d Distance from ovary to posterior end of body

Summarily, MT2 predominates in *T. discolor*, whereas MT1 prevails in *T. ovis* populations from the Czech Republic. Due to the occurrence of MT3 in both studied species, however, vagina morphology cannot serve as a reliable marker for species determination of these *Trichuris* spp.

The primer pair nc5 and nc2, designed by Gasser et al. (1996), is most often used to amplify the segment of rDNA that contains the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region. For example Cutillas et al. (2004); Wimmer et al. (2004); Bott et al. (2009); Cutillas et al. (2009); Callejón et al. (2012); Ravasi et al. (2012); Rose et al. (2014); and Cavallero et al. (2015) used this primer pair in phylogenetic studies of the genus *Trichuris*.

We carried out a phylogenetic analysis that included 45 *T. discolor* and 43 *T. ovis* sequences (Table 1). Studying the phylogenetic relationships between *T. discolor* and *T. ovis* and assessing the intraspecific variability level were the aims of molecular analyses reported also by Oliveros et al. (2000) and Callejón et al. (2015). Obtained phylogenetic tree revealed genetic relationships between both *Trichuris* species (Fig. 3), and the similar separation of *T. discolor* and *T. ovis* has been revealed also by Callejón et al. (2012) on the basis of ITS1 and ITS2 sequences. Similarly, these authors reported very similar results regarding *T. discolor* from Iran. A complex comparison of available sequences of *T. discolor* individuals revealed that haplotypes derived from parasites of Iranian cattle studied by Callejón et al. (2012) (D7, D8, D9, D10 and D11) constitute a specific separate group—subclade B7 (Fig. 3). Moreover, our results clearly show that Iranian haplotypes are not found in the Czech Republic. In fact, Iranian haplotypes, which form the subclade B7, are homogenous both in terms of origin (Iran) and host (cattle). The majority of individuals that were assigned to subclade B8 exhibited high host (cattle, roe deer, Japanese serow and sheep) and origin (the Czech Republic, Spain and Japan) variability. Similarly, Callejón et al. (2012) and Cavallero et al. (2015) indicate that some *Trichuris* species are multi-host parasites and that their presence of a parasite in a host is not a key factor in taxonomic identification. It is almost certain that that haplotypes D1, D2, D3, D4, D5 and D6 are typical of the European *T. discolor* population. Interestingly, clear haplotype homogeneity (haplotype D1) was found in the *T. discolor* population of the Czech Republic as well as in Spain and Japan, and a low-sequence variability was evident in all haplotypes included in subclade B8. For example the difference between haplotype D1 and D2 consists of only one substitution in the ITS1 region. An additional finding was reported by Callejón et al. (2012) as they identified a separate group of Iranian *T. discolor* genotypes based on the evaluation of 16S partial gene mtDNA sequences, and similarly, Callejón et al. (2015) assess this material as a separate Iranian *T. discolor* subclade in a phylogenetic study. The current analysis confirmed the existence of specific substitutions in ITS2 that are typical of *T. discolor* from Iran, and we take into account the hypothesis

by Callejón et al. (2012) that *T. discolor* from Iran and Spain may be two cryptic species. The recent analysis indicates that populations from the Czech Republic and Japan clustered together with Spanish samples and thus may represent the same species.

Haplotypes of *T. ovis* are clustered into two groups in the phylogenetic tree. Subclade B6 merges all 32 Czech and 1 Irish haplotypes (Conneely et al. 2011). It is clear from the position of the subclades B5 and B6 (Fig. 3) that the *T. discolor* haplotypes D1-D11 and *T. ovis* haplotypes O1-O33 are sister operational taxonomic units (OTUs). This fact may explain the reason why morphotypes and biometric measurements does not allow unambiguously distinguish *T. discolor* and *T. ovis* females. Subclade B3 contains only two haplotypes of *T. ovis* from Spanish cattle, published by (Callejón et al. 2012). Figure 3 shows that O34 and O35 *T. ovis* haplotypes (subclade B3) are non-sister OTUs by comparison with *T. ovis* haplotypes from the Czech Republic and Ireland (subclade B6). We can assume that B3 and B6 subclades might represent two cryptic species. Haplotypes of *T. ovis* were detected in both studied hosts (Table 1). Therefore, *T. ovis* can be considered a multi-host parasite, which was previously revealed by Salaba et al. (2013).

The successful design of reliable and easy to use markers for *T. discolor* and *T. ovis* differentiation represents a practical outcome of our work. Callejón et al. (2012) also found species-specific insertions and deletions in ITS1 sequences; however, that study did not focus on designing diagnostic PCR markers but rather on the description of microsatellite motives in the ITS1 and ITS2 regions. Our study used 140 trichurid females and 2 males from roe deer and 95 females and 3 males from sheep, and all the individuals were identified into the species *T. discolor* or *T. ovis* using the makers INDEL1 and INDEL2 (Table 1). The consensus between species discrimination based on the two proposed markers (INDEL1 and INDEL2) and proper species identification based on morphological data (considering typical *T. ovis* MT1 and typical *T. discolor* MT2 morphotypes) indicate marker suitability for *T. ovis* and *T. discolor* differentiation. Wimmer et al. (2004) and Bott et al. (2009) also recommended a combined microscopic molecular approach when diagnosing key nematode infections in sheep.

We found that the multiple-host species *T. discolor* is the predominant representative of the *Trichuris* genus in roe deer. Contrarily, *T. ovis* is the predominant parasite in sheep. Rose et al. (2014) also confirmed that *T. ovis* can parasitise various hosts (sheep, goat and cattle). The fact that roe deer can be commonly found on sheep pastures is the reason for the occurrence of *T. discolor* and *T. ovis* in both studied hosts. We detected the simultaneous occurrence of *T. discolor* and *T. ovis* in roe deer (17.65%) and sheep (33.33%). The occurrence of sheep (40.00%) infected by *T. discolor* is shown in Table 1. It is necessary to note that there was an occurrence of one or two

T. discolor individuals per host. Nevertheless, this result was clearly confirmed on the basis of the Mann-Whitney *U* test. Salaba et al. (2013) reached similar conclusions when studying *T. discolor* and *T. ovis* isolates from roe deer and sheep. However, they evaluated fewer hosts and parasites, and therefore did not conduct a statistical relevant survey. Callejón et al. (2012, 2015) and Salaba et al. (2013) reached similar conclusions when studying *T. discolor* and *T. ovis* from roe deer and sheep; however, our study revealed for the first time a possibility of simultaneous infection of both trichurid species in a single individual of those hosts.

Conclusions

The results of this work introduce the use of new molecular markers based on rDNA polymorphism of the ITS1-5.8S RNA-ITS2 region for the unambiguous identification of parasite species *T. discolor* and *T. ovis*. Simultaneously, *Trichuris* female individuals were categorised into four morphotypes on the basis of vagina morphology. Nonetheless, statistical analysis of biometric data indicates that vagina morphology is not a reliable marker for species determination. Sequences of *T. discolor*, *T. ovis*, *T. skrjabini* and *T. myocastoris* haplotypes containing the ITS1-5.8S RNA-ITS2 region were used for phylogenetic analysis (maximum likelihood method, HKY + G model), which revealed that *T. ovis* haplotypes create two non-sister clades corresponding to parasite origin. Contrarily, we might consider *T. ovis* haplotypes originated from the Czech Republic and Ireland and *T. discolor* haplotypes from the Czech Republic, Spain, Iran and Japan as sister OTUs.

Acknowledgements This study has been funded by the Grant of National Agency for Agricultural Research of the Czech Republic, No. QJ1510038 and Grant of Internal Grant Competition of Czech University of Life Sciences in Prague, No. 20152021. The authors gratefully acknowledge certain sheep farmers and gamekeepers from various areas of the Czech Republic for providing biological materials. The authors are also grateful to Mr. Brian Kavalir (Ontario, Canada) and to the company Proof-Reading-Service.com (Ref. No. 201604-1992958) for the proofreading.

References

- Akaike H (1973) Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: Petrov B, Csáki F (eds) 2nd International Symposium on Information Theory, Tsahkadsor, Armenia, USSR, September 1971. Budapest, Akadémiai Kiadó, pp 267–281
- Allen RW (1955) Parasites of mountain sheep in New Mexico, with new host records. *J Parasitol* 41:583–587
- Baer JG (1950) Etude critique des helminthes parasites de l'Okapi. *Acta Trop* 7:164–186
- Baruš V, Kotrlá B, Tenora F (1978) Scanning electron microscopic study of the vulva of some trichurids (Nematoda). *Folia Parasitol* 25:31–34
- Baylis HA (1932) LIV.—three notes on parasitic nematodes. *Ann Mag Nat Hist* 10:497–502
- Bott NJ, Campbell BE, Beveridge I et al (2009) A combined microscopic-molecular method for the diagnosis of strongylid infections in sheep. *Int J Parasitol* 39:1277–1287
- Callejón R, Halajian A, de Rojas M, Marrugal A, Guevara D, Cutillas C (2012) 16S partial gene mitochondrial DNA and internal transcribed spacers ribosomal DNA as differential markers of *Trichuris discolor* populations. *Vet Parasitol* 186:350–363
- Callejón R, Gutiérrez-Avilés L, Halajian A, Zurita A, de Rojas M, Cutillas C (2015) Taxonomy and phylogeny of *Trichuris globulosa* Von Linstow, 1901 from camels. A review of *Trichuris* species parasitizing herbivorous. *Infect Genet Evol* 34:61–74
- Cavallero S, De Liberato C, Friedrich KG et al (2015) Genetic heterogeneity and phylogeny of *Trichuris* spp. from captive non-human primates based on ribosomal DNA sequence data. *Infect Genet Evol* 34:450–456
- Connely BM, McCarthy E, Good B, Hanrahan JP, de Waal T (2011) Comparison of internal transcribed spacer regions from parasitic nematodes of sheep. National Center for Biotechnology Information, Bethesda <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/JF680987.1>. Accessed 23 November 2016
- Cutillas C, German P, Arias P, Guevara D (1995) *Trichuris ovis* and *Trichuris globulosa*: morphological, biometrical, and genetic studies. *Exp Parasitol* 81:621–625
- Cutillas C, Oliveros R, de Rojas M, Guevara DC (2004) Determination of *Trichuris skrjabini* by sequencing of the ITS1–5.8S–ITS2 segment of the ribosomal DNA: comparative molecular study of different species of *Trichurids*. *J Parasitol* 90:648–652
- Cutillas C, Callejón R, de Rojas M, Tewes B, Ubeda JM, Ariza C, Guevara DC (2009) *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. *Acta Trop* 111:299–307
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods* 9(8):772. doi:10.1038/nmeth.2109
- Dell Inc. (2015) Dell Statistica (data analysis software system), version 13. software.dell.com
- Erhardová B, Kotrlý A (1955) Cizopasní červi zaživacího ústrojí našich volně žijících přežvýkavců. *Československá Parazitologie* 2:41–68
- Gagarin VG (1972) Analiz vidogo sostava trihicefalov zvačnyh zaregistrovanyh v Sovetskom Sojuze. *Trudy Vsesojuznogo Ordena Trudovogo Krasnogo Znameni Instituta Gel'mintologii Imeni K I Skrjabina* 19:39–57
- Gasser RB, Stewart LE, Spaere R (1996) Genetic markers in ribosomal DNA for hookworm identification. *Acta Trop* 62:15–21
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52(5):696–704
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22(2):160–174
- Itagaki T, Ohtori M, Aki M, Ichinomiya M (2007) Molecular phylogenetic analysis of gastrointestinal helminth from Japanese serow (*Capricornis crispus*) in North region. National Center for Biotechnology Information, Bethesda <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB367795>. Accessed 23 November 2016
- Katoh K, Toh H (2008) Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based framework. *BMC Bioinf* 9:212. doi:10.1186/1471-2105-9-212
- Khalafalla RE, Elseify MA, Elbahy NM (2011) Seasonal prevalence of gastrointestinal nematode parasites of sheep in northern region of Nile Delta, Egypt. *Parasitol res* 108:337–340

- Khan MN, Sajid SS, Khan MK, Iqbal Z, Hussain A (2010) Gastrointestinal helminthiasis: prevalence and associated determinants in domestic ruminants of district Toba Tek Singh Punjab, Pakistan. *Parasitol Res* 107:787–794
- Knight RA (1971) Redescriptions of *Trichuris discolor* (Von Linstow, 1906) and *T. skrjabini* (Baskakov, 1924) from domestic ruminants in the United States and comparisons with *T. ovis* (Abildgaard, 1795). *J Parasitol* 57:302–310
- Kuchai JA, Ahmad F, Chishti MZ, Dar JA, Tak H (2013) On morphology and morphometry of *Trichuris ovis* Abildgaard, 1795 recovered from ruminants of Ladakh, India. *J Buffalo Sci* 2:49–52
- Kutzer E, Hinaidy HK (1969) Die Parasiten der wildlebenden Wiederkauer Osterreichs. *Z Parasitenk* 32:354–368
- Lanfredi RM, Souza WD, Gomes DC, Lanfredi RM, Souza WD, Gomes DC (1995) Comparative study of four species of *Trichuris* roederer, 1761 (Nematoda, Trichurinae) by scanning electron microscopy. *Mem I Oswaldo Cruz* 90:489–496
- Liu GH, Wang Y, Xu MJ, Zhou DH, Ye YG, Li JY, Song HQ, Lin RQ, Zhu XQ (2012) Characterization of the complete mitochondrial genomes of two whipworms *Trichuris ovis* and *Trichuris discolor* (Nematoda: Trichuridae). *Infect Genet Evol* 12:1635–1641
- Makovcová K, Langrová I, Vadlejch J, Jankovská I, Lytvynets A, Borkovcová M (2008) Linear distribution of nematode in the gastrointestinal tract of tracer lambs. *Parasitol Res* 104:123–126
- Minin V, Abdo Z, Joyce P, Sullivan J (2003) Performance-based selection of likelihood models for phylogeny estimation. *Syst Biol* 52(5):674–683
- Noda R (1955) *Trichuris* species from giraffe and cattle. *Bull Univ Osaka Pref* 5:119–127
- Oğuz T (1977) Yurdumuz Koyun ve Sigirlarında Tespit Ettigimiz *Trichuris (Trichocephalus)* Türleri. *AÜ Vet Fak Derg* 23:412–421
- Oliveros R, Cutillas C (2003) Redescrípción de *Trichuris ovis* (Nematoda) (Abildgaard, 1795) parásito de *Ovis aries* (Linné, 1758) y *Capra hircus* (Linné, 1758). *Rev Iber Parasitol* 63:77–83
- Oliveros R, Cutillas C, Rojas MD, Arias P (2000) Characterization of four species of *Trichuris* (Nematoda: Enoplida) by their second internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence. *Parasitol Res* 86:1008–1013
- Ravasi DF, O’Riain MJ, Davids F, Illing N (2012) Phylogenetic evidence that two distinct *Trichuris* genotypes infect both humans and non-human primates. *PLoS One* 7(8):e44187. doi:10.1371/journal.pone.0044187
- Rehbein S, Lutz W, Visser M, Winter R (2000) Beiträge zur Kenntnis der Parasitenfauna des Wildes in Nordrhein-Westfalen. 1. Der Endoparasitenbefall des Rehwildes. *Z Jagdwiss* 46:248–269
- Rehbein S, Lutz W, Visser M, Winter R (2001) Beiträge zur Kenntnis der Parasitenfauna des Wildes in Nordrhein-Westfalen. 2. Der Endoparasitenbefall des Damwildes. *Z Jagdwiss* 47:1–16
- Rickard LG, Bishop JK (1991) Redescription of *Trichuris tenius*, Chandler, 1930, from llamas (*Lama glama*) in Oregon with a key to the species of *Trichuris* present in North American ruminants. *J Parasitol* 77:70–75
- Rose H, Hoar B, Kutz SJ, Organ ER (2014) Exploiting parallels between livestock and wildlife: predicting the impact of climate change on gastrointestinal nematodes in ruminants. *Int J Parasitol Parasites and Wildlife* 3:209–219
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365–386
- Salaba O, Rylková K, Vadlejch J, Petrářl M, Schánková Š, Brožová A, Jankovská I, Jebavý L, Langrová I (2013) The first determination of *Trichuris* sp. from roe deer by amplification and sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 segment of ribosomal DNA. *Parasitol Res* 112:955–960
- Santos TR, Lopes WDC, Buzulini C, Borges FA, Sakamoto CAM, Lima RCA, Oliveira GP, Costa AJ (2010) Helminth fauna of bovines from the central-western region, Minas Gerais State, Brazil. *Cienc Rural* 40:934–938
- Schwarz GE (1978) Estimating the dimension of a model. *Ann Stat* 6(2):461–464. doi:10.1214/aos/1176344136, MR 468014
- Skrjabin KI, Shikhobalova NP, Orlov IV (1957) Trichosefalidy i kapillariidy zhivotnykh i cheloveka i vyzvaemye imi zabollevaniya. Izdatel’stvo Akademii Nauk SSSR, Moskva
- Spellmeyer O (1996) Untersuchungen zur Helminthenfauna von Reh- und Schwarzwild aus Norddeutschland. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover
- Tenora F, Hovorka J, Hejlková D (1988) A supplement to the scanning electron microscopy of some *Trichocephalus* spp. (Nematoda). *Helminthologia* 25:227–234
- Tenora F, Ooi HK, Stanek M, Kamiya M (1992) Some novel features of male posterior end of *Trichuris discolor* as revealed by scanning electron microscopy. *Kiseichugaku Zasshi* 41:487–491
- Tenora F, Kamiya M, Špakulová M, Asakava M, Stanek M, Ooi HK (1993) Scanning electron microscopy of *Trichuris suis* and *Trichuris vulpis* from Slovakia and Japan. *Helminthologia* 30:93–98
- Wang Y, Liu GH, Li JY, Xu MJ, Ye YG, Zhou DH, Song HQ, Lin RQ, Zhu XQ (2013) Genetic variability among *Trichuris ovis* isolates from different hosts in Guangdong Province, China revealed by sequences of three mitochondrial genes. *Mitochondrial DNA* 24:50–54
- Wimmer B, Craig BH, Pilkington JG, Pemberton JM (2004) Non-invasive assessment of parasitic nematode species diversity in wild Soay sheep using molecular markers. *Int J Parasitol* 34:625–631
- Yamaguti S, Hayama S (1961) A redescription of *Edesonfilaria malayensis* Yeh, 1960, with remarks on ITS systematic position. *P Helm Soc Wash* 28:83–86
- Zaman V (1984) Scanning electron microscopy of *Trichuris trichiura* (Nematoda). *Acta Trop* 41:287–292



Long-term occurrence of *Trichuris* species in wild ruminants in the Czech Republic

Stanislava Nechybová¹ · Pavel Vejl² · Vlastimil Hart³ · Martina Melounová² · Daniela Čílová² · Jakub Vašek² · Ivana Jankovská¹ · Jaroslav Vadlejch¹ · Iva Langrová¹

Received: 31 December 2017 / Accepted: 13 March 2018 / Published online: 2 May 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

The aim of this study was to identify *Trichuris* species in wild ruminants from 32 localities in the Czech Republic using morphological and molecular methods (ITS1-5.8S RNA-ITS2 region polymorphisms). Trichurids were obtained from 176 wild ruminants (roe deer, sika deer, red deer, fallow deer and mouflons) that were culled between 2009 and 2017. *Trichuris discolor* is the predominant trichurid of all of the above-mentioned wild ruminants, whereas *Trichuris ovis* was identified less frequently in roe deer, fallow deer, sika deer and mouflons. Red deer were parasitised exclusively by *T. discolor*. Young hosts under 1 year of age were more intensively infected by trichurids than were adults ($\chi^2 = 32.02$, $p = 0.00$). Trichurid prevalence results obtained through coprological methods and those based on parasitological dissections differed significantly ($\chi^2 = 16.26$, $p = 0.00$). The regression analysis indicated that the eggs per gram (EPG) threshold (20 EPG) was exceeded only if the host was parasitised by more than 7 trichurid females. Full concordance between the positive results obtained by the coprological methods and those obtained via direct dissections was achieved when the number of trichurid females per host exceeded 51.

Keywords *Trichuris discolor* · *Trichuris ovis* · Game ruminants · ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region · Prevalence · Effectiveness of coprology

Introduction

Game management has a great tradition in Europe. Natural conditions in the Czech Republic afford life to many game species. Changes in diversity and in the number of species are, in reaction to environmental changes, relatively dynamic processes. Therefore, individual game species frequently occur in different proportions in our territory over several decades.

Since the beginning of intensive large-scale farming in the last century in Europe, there have been significant changes in habitats as well as a decline in numbers of small game species; contrarily, numbers of wild boars and wild ruminants have sharply increased, and their numbers continue to rise (Gortázar et al. 2006; Martínez-Jauregui and Herruzo 2014; Schulze et al. 2014).

One of the important objectives of hunting is to maintain good animal health, and the same goal has parasite control; research in this area is becoming increasingly important with the overpopulation of game animals. Moreover, wild animals often approach livestock pastures, and such contact can lead to the spreading of parasites from wild animals to livestock. At present, native wild ruminants, i.e. roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) as well as introduced species fallow deer (*Dama dama*), mouflon (*Ovis orientalis musimon*) and sika deer (*Cervus nippon*) are overpopulated in Central Europe, including the Czech Republic (Čermák and Mrkva 2003; Kamler et al. 2010; Galuppi et al. 2011; Macháček et al. 2014).

Trichuris nematodes are commonly found in the gut of many mammals. Reports of trichurids in wild ruminants from

✉ Pavel Vejl
vejl@af.czu.cz

¹ Department of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

² Department of Genetics and Breeding, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

³ Department of Game Management and Wildlife Biology, Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Prague, Czech Republic

Table 2 Occurrence of trichurid nematodes of wild ruminants in countries surrounding the Czech Republic

Host	Trichuris species	Method of determination	References
Roe deer	<i>Trichuris globulosa</i>	Morphological traits	Drózdź (1966); Kutzer and Knaus (1969); Haupt and Stubbe (1973); Nickel et al. (1978); Bütner (1978); Spellmeyer (1996); Rehbein et al. (2000); Rehbein (2010)
	<i>Trichuris ovis</i>	Morphological traits	Drózdź (1966); Kutzer and Knaus (1969); Haupt and Stubbe (1973); Bütner (1978); Nickel et al. (1978); Kutzer et al. (1987); Kutzer et al. (1988); Borgsteede et al. (1990); Jansen (1992); Rehbein et al. (2000); Cisek et al. (2003); Shimalov and Shimalov (2003); Balicka-Ramisz et al. (2003); Pilarczyk et al. (2005); Rehbein (2010); Kuzmina et al. (2010); Pato et al. (2013)
	<i>Trichuris capreoli</i>	Morphological traits	Drózdź (1966); Kutzer and Knaus (1969); Barth and Schaich (1971); Dollinger (1973); Nickel et al. (1978); Kutzer et al. (1987); Kutzer et al. (1988); Bernard et al. (1988); Schwarz et al. (2011); Pato et al. (2013)
	<i>Trichuris skrjabini</i>	Morphological traits	Drózdź (1966); Barth and Schaich (1971); Haupt and Stubbe (1973)
Red deer	<i>Trichuris globulosa</i>	Morphological traits	Rehbein et al. (2002); Rehbein (2010)
	<i>Trichuris ovis</i>	Morphological traits	Drózdź (1966); Rehbein et al. (2002); Cisek et al. (2003); Shimalov and Shimalov (2003); Pilarczyk et al. (2005); Rehbein (2010)
	<i>Trichuris capreoli</i>	Morphological traits	Bernard et al. (1988)
Sika deer	<i>Trichuris globulosa</i>	Morphological traits	Rehbein and Visser (2007); Rehbein (2010)
Fallow deer	<i>Trichuris globulosa</i>	Morphological traits	Rehbein et al. (2001)
	<i>Trichuris ovis</i>	Morphological traits	Cisek et al. (2003)
Mouflon	<i>Trichuris capreoli</i>	Morphological traits	Bernard et al. (1988)

Skrjabin et al. (1957), Knight (1971), Baruš et al. (1978), Špakulová (1994), Lanfredi et al. (1995) and Oliveros and Cutillas Barrios (2003).

Molecular study

Molecular markers (INDEL 1 and INDEL 2) based on the internal transcribed spacer (ITS)1-5.8S RNA-ITS2 region polymorphisms, described by Vejl et al. (2017), were used for the unambiguous identification of *Trichuris ovis* and *Trichuris discolor*.

Coprolological study

Faecal samples were collected directly from the rectum of each examined animal. An eggs per gram count (EPG) was carried out using the McMaster egg-counting technique (Roepstorff and Nansen 1998 and Vadlejš et al. 2011).

Statistical analysis

The ratios of infected to uninfected hosts listed in Table 3 were compared using the χ^2 test. Regression analysis (linear model) was used to evaluate the dependence of EPG values on the trichurid female count per host. This linear model was also used for EPG prediction. Dell Statistica Software (Dell Inc. 2015) was used for all statistical analyses.

Results

Two trichurid species, *T. discolor* and *T. ovis*, were found in roe deer, fallow deer, sika deer and mouflons. Regarding red deer, only 2 young individuals out of 36 animals were parasitised and the parasites belonged exclusively to *T. discolor*. All of the hosts that were parasitised by *T. ovis* had also *T. discolor* while four fallow deer and two sika deer were infected exclusively by *T. discolor* (Table 3). Regarding the host species, 790 females and 51 males were obtained overall; the species of *T. discolor* was represented exclusively by females (700 individuals) and *T. ovis* occurred as females (90) and males (51).

The prevalence of both trichurids was statistically evaluated irrespective of host species. A statistically significant difference ($\chi^2 = 22.27, p = 0.00$) was detected between the prevalence of *T. discolor* (infected/uninfected hosts: 46/130) and that of *T. ovis* (9/167)). In fact, the prevalence of *T. discolor* was higher in all host species (Table 3) and therefore, it is the predominant *Trichuris* species in wild ruminants in the Czech Republic. Further comparisons were made only for this more abundant species.

The prevalence of *T. discolor* in roe deer (infected/uninfected hosts: 33/28) differed significantly from red deer (2/34, $\chi^2 = 23.13, p = 0.00$) as well as from sika deer (3/58, $\chi^2 = 35.47, p = 0.00$) (see Table 3).

Irrespective of host species, the prevalence of *T. discolor* in young hosts under 1 year of age (30/26) was significantly

Table 3 Prevalence and intensity of *T. discolor* and *T. ovis* in studied host species of wild ruminants

Host	Age	Number of hosts	Positive hosts/negative hosts		Prevalence [%]		EPG [eggs g ⁻¹]		Intensity		EPG [eggs g ⁻¹]								
			<i>T. discolor</i>		<i>T. discolor</i>		<i>T. ovis</i>		<i>T. discolor</i>		<i>T. ovis</i>								
			Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max	Min	Max							
Roe deer	≤ 1 year	25	21/4	3/22	84.00	12.00	24.00	0	32	10	5	0	0	60	7	0			
	> 1 year	36	12/24	2/34	33.33	5.56	8.33	0	32	2	0	0	4	0	0	80	3	0	
	Total	61	33/28	5/56	54.10	3.28	14.75	0	32	6	1	0	4	0	0	80	5	0	
Fallow deer	≤ 1 year	3	3/0	1/2	100.00	33.33	100.00	22	77	48	45	0	27	9	0	120	580	353	360
	> 1 year	10	2/8	0/10	20.00	0.00	10.00	0	23	3	0	0	0	0	0	0	120	12	0
	Total	13	5/8	1/12	38.46	7.69	30.77	0	77	13	0	0	27	3	0	0	580	91	0
Red deer	≤ 1 year	9	2/7	0/9	22.22	0.00	0.00	0	95	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	> 1 year	27	0/27	0/27	0.00	0.00	0.00	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	36	2/34	0/36	5.56	0.00	0.00	0	95	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sika deer	≤ 1 year	17	2/15	1/16	11.76	6.25	11.76	0	43	5	0	0	6	0	0	0	0	0	0
	> 1 year	44	1/43	0/44	2.33	0.00	0.00	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Total	61	3/58	1/60	5.17	1.67	3.28	0	43	1	0	0	6	0	0	0	0	0	0
Mouflon	≤ 1 year	2	2/0	1/1	100.00	50.00	100.00	1	2	2	2	0	40	20	0	120	60	60	60
	> 1 year	3	1/2	1/2	33.33	33.33	33.33	0	11	4	0	0	57	19	0	280	93	0	0
	Total	5	3/2	1/3	60.00	25.00	40.00	0	11	3	1	0	57	19	0	280	80	0	0
All hosts	≤ 1 year	56	30/26	6/50	53.57	12.00	21.43	0	95	10	1	0	40	1	0	580	24	0	0
	> 1 year	120	16/104	3/117	15.38	2.50	4.17	0	32	1	0	0	57	1	0	280	4	0	0
	Total	176	46/130	9/167	35.38	5.39	9.66	0	95	4	0	0	57	1	0	580	11	0	0

different ($\chi^2 = 32.02$, $p = 0.00$) than prevalence in adult animals (16/104, Table 3).

Using coprological methods, the prevalence of trichurids detected in all host species (infected/uninfected hosts: 17/159) were found to be significantly different ($\chi^2 = 16.26$, $p = 0.00$) than the actual prevalence of *T. discolor* (46/130) detected by the dissection of the intestine and verified using molecular markers (Table 3). This comparison did not take into account the congeneric species *T. ovis* because no hosts were parasitised exclusively by this trichurid species (Table 3).

A total of 175 data sets (number of female individuals of both trichurid species per host and EPG values) were used for regression analysis since one outlier was excluded. A statistically significant dependence ($p = 0.00$) of EPG values on trichurid count per host was found. A linear model (Fig. 1) showed that EPG values and trichurid female count per host were highly correlated ($r = 0.79$).

Table 4 shows predicted values of EPG based on the proposed linear model including their 95% least squares (LS). The threshold EPG value of the used coprological method was 20 eggs per gram. This value corresponds to one detected egg in two McMaster counting cells. The predicted values and 95% least squares (Table 4) indicate that this EPG threshold value becomes reliably exceeded when the number of trichurid females per host is greater than 7.

All animals regardless of species were categorised into four groups (Fig. 2) based on count of trichurid females per host. The frequency of EPG positive and negative hosts was calculated for each of the above-mentioned groups. All animals which were uninfected by *T. discolor* and/or

T. ovis (based on parasitological dissection) were also EPG negative. It is clear from the graph (Fig. 2) that all hosts became EPG positive only if the count of trichurid females per host exceeded 51.

Discussion

Out of five investigated wild game species, the roe deer showed significantly higher trichurid burdens than did other animals. Juveniles under 1 year of the age were especially more infected than their adults. *Trichuris discolor* clearly dominated comparing with all of the other studied ruminants. Contrarily, *T. ovis* can be considered a minor nematode in the game animals, occurring sometimes in roe deer but being accidental or lacked in other four wild ruminants.

Significantly higher trichurid prevalence in roe deer in comparison with red deer and sika deer was reported also by Rehbein (2010) and Bernard et al. (1988) in the Germany-Austria region and Belgium, respectively. Low trichurid infection in red deer was also found by Drózdź et al. (1994) and Cisek et al. (2003) in Poland.

Why *Trichuris* nematodes occur much less in red and sika deer than in roe deer living in the same areas is certainly an interesting and somewhat complicated question. Suggested answers may include a stronger immune system as well as differences in gastrointestinal physiology, habits and food intake and processing.

Wild ruminants from the family Cervidae encompass a wide range of evolutionary specialisation in feeding and digestive strategies. The family Cervidae include almost all

Fig. 1 Count of trichurid females per host

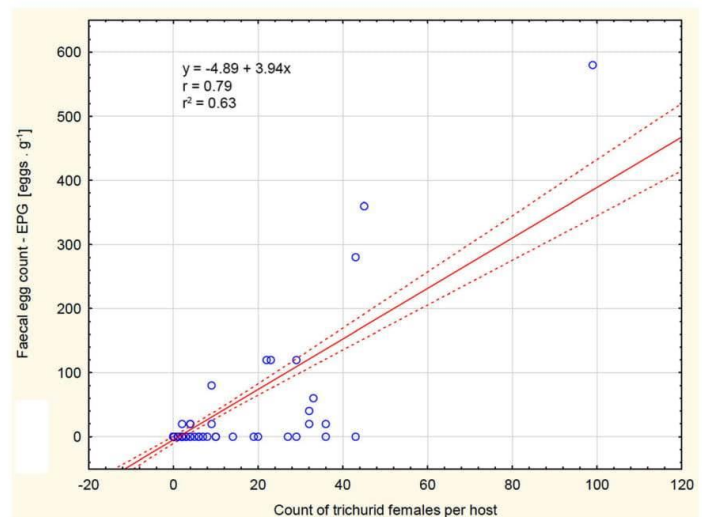


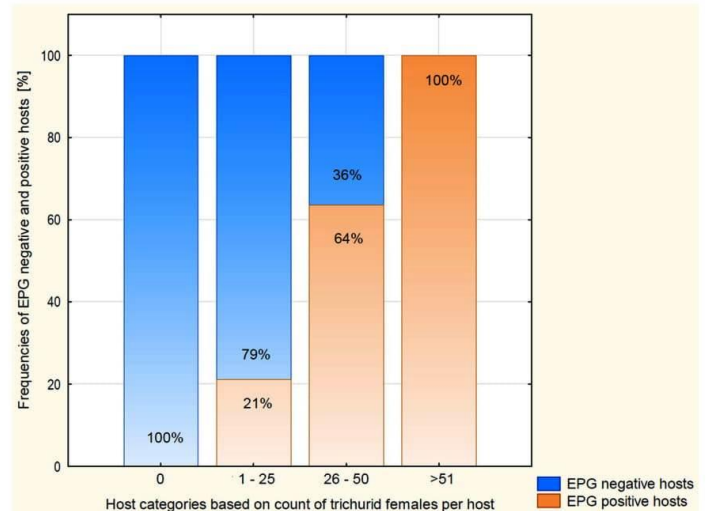
Table 4 EPG predictions based on the proposed linear model and their 95% least squares (LS)

Trichurid count per host	Faecal egg count—EPG [eggs g ⁻¹]			Trichurid count per host	Faecal egg count—EPG [eggs g ⁻¹]		
	Prediction	-95%	+95%		Prediction	-95%	+95%
		LS	LS			LS	LS
3	6.92	1.63	12.21	30	113.23	100.28	126.18
4	10.86	5.58	16.13	35	132.92	117.87	147.97
5	14.79	9.50	20.09	40	152.60	135.41	169.80
6	18.73	13.38	24.08	45	172.29	152.92	191.66
7	22.67	17.22	28.12	50	191.98	170.41	213.55
8	26.61	21.02	32.19	60	231.35	205.36	257.35
9	30.54	24.80	36.29	70	270.73	240.27	301.19
10	34.48	28.54	40.42	80	310.10	275.16	345.05
15	54.17	46.89	61.44	90	349.48	310.04	388.92
20	73.85	64.86	82.85	100	388.85	344.91	432.80
25	93.54	82.63	104.45	200	782.60	693.38	871.82

groups of ruminant feeding types, with the exception of non-selective grazers (Hofmann 1985). Concentrate selectors or browsers (roe deer) prefer to consume less fibrous plant species than do red deer, which are intermediate roughage feeders (Van Wieren 1995).

The high incidence of trichurids in roe deer is most likely the result of two diverging strategies developed against parasite infections in ruminants. Hoste et al. (2010) hypothesised that, owing to divergent evolutionary processes, sheep and goats have developed two different strategies to regulate gastrointestinal nematode infections (GIN); these strategies are based on immune responses and feeding behaviour. Like roe deer and red deer, sheep and goats have developed different feeding behaviours. Sheep are usually described as grazers,

preferring to feed on grass and forbs. In contrast, goats are classified as browsers or intermediate browsers, ingesting substantial amounts of browse (woody plants, vines and brush) even when other nutritional forage is available. Because feeding is also a source of nematode infection, it has been hypothesised that such various feeding habits can result in distinct strategies against nematode infections, with major consequences to host-parasite relationships. These two divergent strategies rely on a balance between the development of an immune response (sheep) and behavioural responses that limit contact with nematode infective stages in the environment (goats). In grazing situations, goats are significantly more heavily infected than sheep (Le Jambre and Royal 1976; Jallow et al. 1994; Huntley et al. 1995; Pomroy et al.

Fig. 2 Host categories based on count of trichurid females per host

1986), and several studies have illustrated that both the acquisition and expression of immune responses against nematode species are less efficient in goats than they are in sheep (Huntley et al. 1995; Pomroy et al. 1986; Hoste et al. 2010; Vlassoff et al. 1999).

We believe that the same phenomenon can be found in red (sika) deer and roe deer. Roe deer are smaller, territorial concentrate selectors that are adapted to dense cover, which is usually identical to their main food sources (forbs and bush layer). These species exhibit extreme selectivity for cell contents and easily digestible nutritious plant parts; high amyolytic fermentation rates and a rapid rate of food passage necessitate frequent feedings (Van Wieren 1995; Hofmann 1985). The roe deer, when given the opportunity, avoids the nematode infective stages, which are associated with grass. We hypothesise that, owing to evolutionary processes, roe deer feeding habits, which are similar to those of goats, can lead to differences in the control of parasite populations, e.g. a subdued immune response to parasites, a rapid metabolism of xenobiotics and an ability to self-medicate. Some botanical taxa are known to produce metabolites with anthelmintic effects (Klimpel et al. 2011). We can assume that red and sika deer prefer feeding on these plant species, which can lead to low trichurid prevalence.

Trichurids affect all age groups but they are more severe in young, developing animals. Rehbein (2010) and Body et al. (2011) also reported higher trichurid prevalence in young animals than in adults. Similarly, the highest trichurid burden in our study was observed in roe deer kids. Moreover, among red deer and sika deer, trichurids were harboured mainly in fawns. No trichurids were found in adult red deer, and only one adult sika deer was infected with *T. discolor*.

In earlier studies, trichurids were determined primarily according to morphological characteristics. At the molecular level, *T. discolor* from cattle or yak has been characterised only 5 years ago (Callejón et al. 2012; Liu et al. 2012). Afterwards, Salaba et al. (2013) identified ITS1 and ITS2 DNA regions of female trichurids from roe deer, at first morphologically determined as *Trichuris globulosa*, and found that they matched (completely or almost completely) the sequences of *T. discolor* from Japanese serow *Capricornis crispus* (Itagaki et al. 2007; published only in dataset) and *T. discolor* from *Bos taurus* (Callejón et al. 2012). This work was followed by study of Vejl et al. (2017), which analysed the Czech populations of female trichurids from sheep and roe deer. The authors confirmed that *T. discolor* infected mostly roe deer while *T. ovis* sheep, however, both parasites occurred in both hosts. Interestingly, the study also revealed high genetic uniformity and a lack of males of *T. discolor* in 20 localities of the Czech Republic; the current more extensive survey confirms this fact, and shows that the rDNA markers designed by Vejl et al. (2017) are applicable for the identification of trichurid species from other wild ruminants.

Despite the availability of many new diagnostic methods, coprology remains vital to studying parasites as one of non-invasive methods. However, the reliability of this procedure varies for different types of parasites (e.g. hermaphroditic versus dioecious helminths) and hosts (Becker et al. 2016). Rieu et al. (2007) reported on the concurrence between coprological and necropsy diagnoses of paramphistomosis (rumen fluke disease) of cattle. Coprological diagnoses of several tapeworms like *Anoplocephala perfoliata* (Meana et al. 1998) or *Taenia saginata* (Hall et al. 1981) were positive only in 54 or 68% of infected hosts, respectively. However, coprological examinations aimed at intestinal nematodes characterised by separate gender were much less efficient. In wild boars, Gassó et al. (2015) reported false infestation rates of 24% for *Trichuris suis*, 28% for *Metastrongylus* spp. and 33% for *Ascaris suum*; stomach nematodes of boars were undetected at all. Vadlejch et al. (2011) found that statistically significant differences exist among sensitivity of McMaster egg counting modifications (Wetzel 1951; Zajíček 1978; Roepstorff and Nansen 1998). Although we used the concentration McMaster technique (Roepstorff and Nansen 1998) that is most sensitive according to Vadlejch et al. (2011), false negative results were found in many cases of our study (Fig. 2). We determined that the false-negative results of EPG technique were dependent on trichurid female count per hosts. When the intensity of trichurid female infection ranged from 1 to 25 females per host, the frequency of false negative results reached 79%. There was full concordance between the positive results obtained by the coprological method and those obtained through the dissection when the trichurid female count per host exceeded 51 provided that all detected females are capable of producing eggs.

Conclusion

This study showed that roe deer had significantly higher trichurid burdens than did red deer, dams, sika deer and mouflons. The molecular analysis of the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region was applied to distinguishing of trichurids that parasitised wild ruminants observed in our study. Two trichurid species, *Trichuris discolor* and *Trichuris ovis*, were found in roe deer, fallow deer, sika deer and mouflons. However, *T. discolor* was the predominant parasite of these wild ruminants. Red deer were infected only by *T. discolor*. Juvenile hosts were more severely infected than adults. The majority of trichurids were observed in young roe deer. The dependence of EPG values on count of trichurid females per host was statistically significant.

Acknowledgments This study has been funded by the Grant of National Agency for Agricultural Research of the Czech Republic, No. QJ1510038. The authors gratefully acknowledge certain sheep farmers and gamekeepers from various areas of the Czech Republic for providing

biological materials. The authors gratefully acknowledge certain sheep farmers and gamekeepers from various areas of the Czech Republic for providing biological materials. The authors are also grateful to Mr. Brian Kavalir (Ontario, Canada) for the proofreading.

References

- Balicka-Ramisz A, Cisek A, Ramisz A, Pilarczyk B (2003) Investigation of the lung, stomach and intestine helminth infections of roe deer in North-West Poland. *Tiearzl Umsch* 58:489–491
- Barth D, Schaich K (1971) Zur Wirksamkeit von thibenzole beim Magen-Darmwurmbefall des Rehwildes. *Z Jagdwiss* 17:240–243. <https://doi.org/10.1007/BF01901783>
- Baruš V, Kotrlá B, Tenora F (1978) Scanning electron microscopic study of the vulva of some trichurids (Nematoda). *Folia Parasitol* 25:31–34
- Baylis HA (1932) LIV.—three notes on parasitic nematodes. *Ann Mag Nat Hist* 10:497–502
- Becker AC, Kraemer A, Epe C, Strube C (2016) Sensitivity and efficiency of selected coproscopical methods—sedimentation, combined zinc sulphate sedimentation-flotation, and McMaster method. *Parasitol Res* 115:2581–2587. <https://doi.org/10.1007/s00436-016-5003-8>
- Bernard J, Biesemans W, Mathy P (1988) Nematodes parasites gastrointestinaux des Ongules gibier dans les Ardennes belges. *Schweiz Arch Tierheilkd* 130:77–103
- Body G, Ferte H, Gaillard JM, 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>
- Borgsteede FHM, Jansen J, Van Nispen Tot Pannerden HPM, Van Der Burg WPJ, Noorman N, Poutsma J, Kotter JF (1990) An investigation of the endoparasitic helminth fauna of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) in the Netherlands. *Z Jagdwiss* 36:104–109
- Bütner K (1978) Untersuchungen zur Parasitierung des Rehwildes bei steigendem Jagddruck. *Z Jagdwiss* 24:139–155
- Callejón R, Halajian A, de Rojas M, Marrugal A, Guevara D, Cutillas C (2012) 16S partial gene mitochondrial DNA and internal transcribed spacers ribosomal DNA as differential markers of *Trichuris discolor* populations. *Vet Parasitol* 186:350–363. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.11.033>
- Čermák P, Mrkva R (2003) Browsing damage to broadleaves in some national nature reserves (Czech Republic) in 2000–2001. *Ekológia Bratislava* 22:394–403
- Cisek A, Balicka-Ramisz A, Ramisz A, Pilarczyk B (2003) Occurrence of gastro-intestinal nematodes in cervids (Cervidae) of North-Western Poland. *Electron J Pol Agric Univ* 6(2), available online <http://www.ejpau.media.pl/volume6/issue2/animal/art-09.html>. Accessed 19 December 2017
- Dell Inc. (2015) Dell Statistica (data analysis software system), version 13. <http://www.dell.com>. Accessed 19 Dec 2017
- Dollinger P (1973) Beitrag zur Kenntnis der Magen-Darm-Parasitenfauna des Rehwildes der Nordostschweiz. *Z Jagdwiss* 19:14–25
- Drózd J (1966) Studies on helminths and helminthiasis in Cervidae. II. The helminth fauna in Cervidae in Poland. *Acta Parasitol Pol* 14:1–13
- Drózd J, Demiasiewicz AW, Lachowicz J (1994) The effect of culling red deer, *Cervus elaphus* (L.), on their helminth fauna in the Stowiński National Park (Poland). *Acta Parasitol* 39:92–94
- Dyk V, Chroust T (1974) Helminths and Coccidia of roe deer in two neighbouring ecologically different regions. *Acta Vet Brno* 43: 65–77
- Erhartová B, Kotrlý A (1955) Cizopasní červi zaživacích ústrojí našich volně žijících přezvýkavců. *Česk Parazitologie* 2:41–68
- Gagarin VG (1972) Analiz vidogo sostava trichicefalov značnyh zaregistrovanyh v Sovetskom Sojuze. *Trudy Vsesojuznogo Ordena Trudovogo Krasnogo Znameni Instituta Gel'mintologii Imeni K I Skryabina* 19:39–57
- Galuppi R, Aureli S, Bonoli S, Caffara M, Tampieri MP (2011) Detection and molecular characterization of *Theileria* sp. in fallow deer (*Dama dama*) and ticks from an Italian natural preserve. *Res Vet Sci* 91: 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.07.029>
- Gassó D, Feliu C, Ferrer D, Mentaberre G, Casas-Díaz E, Velarde R, Fernández-Aguilar X, Colom-Cadena A, Navarro-Gonzalez N, López-Olvera JR, Lavin S, Fernández-Llario P, Segalés J, Serrano E (2015) Uses and limitations of faecal egg count for assessing worm burden in wild boars. *Vet Parasitol* 209:133–137. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.006>
- Gortázar C, Acevedo P, Ruiz-Fons F, Vicente J (2006) Disease risks and overabundance of game species. *Eur J Wildl Res* 52:81–87. <https://doi.org/10.1007/s10344-005-0022-2>
- Hall A, Latham MC, Crompton DWT, Stephenson LS (1981) *Taenia saginata* (Cestoda) in western Kenya: the reliability of faecal examinations in diagnosis. *Parasitology* 83:91–101. <https://doi.org/10.1017/S003118200005006X>
- Haupt W, Stubbe I (1973) Untersuchungen zur Parasitierung der Rehwildpopulation im Wildforschungsbereich Hakel unter besonderer Berücksichtigung von Alter, Geschlecht und Gewicht. *Beiträge zur Jagd- und Wildforschung* 8:171–185
- Hofmann RR (1985) Digestive physiology of the deer—their morphophysiological specialisation and adaptation. In: Fennessy PF, Drew KR (ed) *Biology of deer production*. Proceedings of an International Conference held at Dunedin. Bulletin 22 of the Royal Society of New Zealand, New Zealand, pp 393–407
- Hoste H, Sotiraki S, Landau SY, Jackson F, Beveridge I (2010) Goat-nematode interactions: think differently. *Trends Parasitol* 26:376–381. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.04.007>
- Huntley JF, Patterson M, Mackellar A, Jackson F, Stevenson LM, Coop RL (1995) A comparison of the mast cell and eosinophil responses of sheep and goats to gastrointestinal nematode infections. *Res Vet Sci* 58:5–10. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(95\)90080-2](https://doi.org/10.1016/0034-5288(95)90080-2)
- Itagaki T, Ohtori M, Aki M, Ichinomiya M (2007) Molecular phylogenetic analysis of gastrointestinal helminth from Japanese serow (*Capricornis crispus*) in North region. National Center for Biotechnology Information, published only in dataset. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB367795>. Accessed 19 Dec 2017
- Jallow OA, McGregor BA, Anderson N, Holmes JH (1994) Intake of trichostrongylid larvae by goats and sheep grazing together. *Aust Vet J* 71:361–364. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1994.tb00927.x>
- Jansen J (1992) On the nematode parasite fauna of Friesian roe deer (*Capreolus capreolus*). In: Hernandez, S. (Ed.), “In memoriam” al Profesor Dr. Francisco de Paula Martinez Gomez. Servicio de Comunicaciones de la Universidad de Cordoba, Cordoba. 301–307
- Kamler J, Homolka M, Barančeková M, Krojerová-Prokešová (2010) Reduction of herbivore density as a tool for reduction of herbivore browsing on palatable tree species. *Eur J Forest Res* 129:155–162. <https://doi.org/10.1007/s10342-009-0309-z>
- Klimpel S, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid KA, Aksu G, Fischer K, Strassen B, Mehlhorn H (2011) The effects of different plant extracts on nematodes. *Parasitol Res* 108:1047–1054. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2168-4>
- Knight RA (1971) Redescriptions of *Trichuris discolor* (von Linstow, 1906) and *T. skrjabini* (Baskakov, 1924) from domestic ruminants in the United States and comparisons with *T. ovis* (Abildgaard, 1795). *J Parasitol* 57:302–310
- Knight RA (1984) Morphological differences in *Trichuris ovis* associated with different host species. *J Parasitol* 70:842–843

- Kotrlá B, Kotrlý A (1977) Helminths of wild ruminants introduced into Czechoslovakia. *Folia Parasitol* 24:35–40
- Kutzer E, Knaus E (1969) Untersuchungen über die Endoparasitenfauna eines Rehbestandes in der freien Wildbahn. *Z Jagdwiss* 15:62–72
- Kutzer E, Sugár L, Buchacher-Tonitz S (1987) Beiträge zur Parasitenfauna der wildlebenden Wiederkäuer Ungarns. I. Zur Parasitenfauna von Rehkitzten und Jungrehen (*Capreolus c. capreolus*). *Parasitologia Hungarica* 20:81–90
- Kutzer E, Sugar L, Buchacher-Tonitz S (1988) Beiträge zur Parasitenfauna der wildlebenden Wiederkäuer Ungarns. II. Aufbauentwicklung des Parasitenbefalles bei Rehen (*Capreolus c. capreolus*). *Parasitologia Hungarica* 21:85–97
- Kuzmina TA, Kharchenko VA, Malega AM (2010) Helminth fauna of roe deer (*Capreolus capreolus*) in Ukraine: biodiversity and parasite community. *Vestnik zoologii* 44:15–22
- Lanfredi RM, Souza WD, Gomes DC (1995) Comparative study of four species of *Trichuris* roederer, 1761 (Nematoda, Trichurinae) by scanning electron microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90:489–496. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761995000400011>
- Le Jambre L, Royal WM (1976) A comparison of worm burdens in grazing merino sheep and angora goats. *Aust Vet J* 52:181–183. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1976.tb09467.x>
- Liu GH, Wang Y, Xu MJ, Zhou DH, Ye YG, Li JY, Song HQ, Lin RQ, Zhu XQ (2012) Characterization of the complete mitochondrial genomes of two whipworms *Trichuris ovis* and *Trichuris discolor* (Nematoda: Trichuridae). *Infect Genet Evol* 12:1635–1641. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.08.005>
- Macháček Z, Dvořák S, Ježek M, Zahradník D (2014) Impact of interspecific relations between native red deer (*Cervus elaphus*) and introduced sika deer (*Cervus nippon*) on their rutting season in the Doupovské hory Mts. *J For Sci* 60:272–280
- Martínez-Jauregui M, Herruzo AC (2014) A note on the effectiveness of incorporating management objectives with ecological variables when modeling red deer abundance. *Eur J Wildl Res* 60:511–517. <https://doi.org/10.1007/s10344-014-0813-4>
- Meana A, Luzon M, Corchero J, Gómez-Bautista M (1998) Reliability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perforiata* infection. *Vet Parasitol* 74:79–83. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00145-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00145-3)
- Nickel S, Hiepe T, Ness H, Pingel H (1978) Beiträge zur Parasitenfauna der DDR. 2. Untersuchungen zum Helminthenvorkommen beim Reh (*Capreolus capreolus*). *Angew Parasitol* 19:194–202
- Oliveros R, Cutillas Barrios C (2003) Redescipión de *Trichuris ovis* (Nematoda) (Abildgaard, 1795) parásito de *Ovis aries* (Linné, 1758) y *Capra hircus* (Linné, 1758). *Rev Iber Parasitol* 63:77–83
- Osakwe IR (1970) Morphometry of geohelminthic roe-deer intestine nematodes in two southern Moravian enclosures. *Acta scientiarum naturalium Academiae Scientiarum Bohemicae*, Brno 4:1–45
- Pato FJ, Vázquez L, Díez-Baños N, López C, Sánchez-Andrade, Fernández G, Díez-Banos P, Panadero R, Díaz P, Morrodo P (2013) Gastrointestinal nematode infections in roe deer (*Capreolus capreolus*) from the NW of the Iberian peninsula: assessment of some risk factors. *Vet Parasitol* 196:136–142. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.027>
- Pilarczyk B, Balicka-Ramisz A, Ramisz A, Lachowska S (2005) Występowanie pasożytów przewodu pokarmowego u saren i jeleni na terenie województwa zachodniopomorskiego. *Wiad Parazytol* 4: 307–310
- Pomroy WE, Lambert MG, Betteridge K (1986) Comparison of faecal strongylate egg counts of goats and sheep on the same pasture. *NZVJ* 34:36–37. <https://doi.org/10.1080/00480169.1986.35272>
- Rehbein S (2010) Die Endoparasiten des Sikawildes in Deutschland und Österreich. Dissertation, Universität Salzburg, 415pp
- Rehbein S, Visser M (2007) Die Endoparasiten des Sikawildes (*Cervus nippon*) in Österreich. *Wien Klin Wochenschr* 119:96–101. <https://doi.org/10.1007/s00508-007-0865-5>
- Rehbein S, Lutz W, Visser M, Winter R (2000) Beiträge zur Kenntnis der Parasitenfauna des Wildes in Nordrhein-Westfalen. 1. Der Endoparasitenbefall des Rehwildes. *Z Jagdwiss* 46:248–269. <https://doi.org/10.1007/BF02241594>
- Rehbein S, Lutz W, Visser M, Winter R (2001) Beiträge zur Kenntnis der Parasitenfauna des Wildes in Nordrhein-Westfalen. 2. Der Endoparasitenbefall des Damwildes. *Z Jagdwiss* 47:1–16. <https://doi.org/10.1007/BF02242409>
- Rehbein S, Lutz W, Visser M, Winter R (2002) Beiträge zur Kenntnis der Parasitenfauna des Wildes in Nordrhein-Westfalen. 3. Der Endoparasitenbefall des Rotwildes. *Z Jagdwiss* 48:69–93. <https://doi.org/10.1007/BF02193546>
- Rieu E, Recca A, Bénet JJ, Saana M, Dorchie P, Guillot J (2007) Reliability of coprological diagnosis of *Paramphistomum* sp. infection in cows. *Vet Parasitol* 146:249–253. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.033>
- Roepstorff A, Nansen P (1998) Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine. *FAO Animal Health Manual*, Rome
- Salaba O, Rylková K, Vadlejch J, Petrýl M, Scháňková Š, Brožová A, Jankovská I, Jebavý L, Langrová I (2013) The first determination of *Trichuris* sp. from roe deer by amplification and sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 segment of ribosomal DNA. *Parasitol Res* 112: 955–960. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-3215-0>
- Sarwar MM (1945) Two new records of the species of the genus *Trichuris* from Indian ruminants. *Curr Sci* 14:156
- Sarwar MM (1959) Reconstruction of the genus *Trichuris* and a short review of its taxonomy and morphology. *Biologia (Lahore)* 5:19–35
- Schulze ED, Bouriaud O, Wäldchen J, Eisenhauer N, Walentowski H, Seele C, Heinze E, Pruschitzki U, Danila G, Marin G, Hessenmöller D, Bouriaud L, Teodosiu M (2014) Ungulate browsing causes species loss in deciduous forests independent of community dynamics and silvicultural management in central and southeastern Europe. *Ann For Res* 57:267–288. <https://doi.org/10.15287/af.2014.273>
- Schwarz L, Frena M, Skalicky M, Prosl H (2011) Endoparasitenbefall von Rehen in einem Revier in Niederösterreich. *Wien Tierarztl Monatsschr* 98:285–291
- Shimalov VV, Shimalov VT (2003) Helminth fauna of cervids in Belorussian Polesie. *Parasitol Res* 89:75–76. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0700-x>
- Skrjabin KI, Shikhobalova NP, Orlov IV (1957) Trichosefalidy i kapillariidy zhivotnykh i cheloveka i vyzvaemye imi zabolovaniya. *Izdavatel'stvo Akademii Nauk SSSR*, Moskva
- Špakulová M (1994) Discriminant analysis as a method for the numerical evaluation of taxonomic characters in male trichurid nematodes. *Syst Parasitol* 29:113–119. <https://doi.org/10.1007/BF00009807>
- Spellmeyer O (1996) Untersuchungen zur Helminthenfauna von Reh- und Schwarzwild aus Norddeutschland. Dissertation, Freie Universität Berlin
- Tománek J (1967) Příspěvek k poznání helmintofauny srnčí zvěře severomoravského kraje. *Vet Med (Praha)* 12:739–744
- Vadlejch J, Petrýl M, Zaichenko I, Čadková Z, Jankovská I, Langrová I, Moravec M (2011) Which McMaster egg counting technique is the most reliable? *Parasitol Res* 109:1387–1394. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2385-5>
- Van Wieren SE (1995) The potential role of large herbivores in nature conservation and extensive land use in Europe. *Biol J Linn Soc Lond* 56:11–23. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1995.tb01114.x>
- Vejl P, Nechybová S, Peřinková P, Melounová M, Sedlářková V, Vašek J, Čilová D, Rylková K, Jankovská I, Vadlejch J, Langrová I (2017) Reliable molecular differentiation of *Trichuris ovis* and *Trichuris discolor* from sheep (*Ovis orientalis*

- aries*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) and morphological characterisation of their females: morphology does not work sufficiently. Parasitol Res 116:2199–2210. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5524-9>
- Vetýška V (1980) Endoparasites of roe deer in the Strakonice region. Acta Vet Brno 49:91–103
- Vlassoff A, Bisset SA, McMurty LW (1999) Faecal egg counts in Angora goats following natural or experimental challenge with nematode parasites: within flock variability and repeatabilities. Vet Parasitol 84:113–123. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(99\)00072-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(99)00072-2)
- Wetzel E (1951) Verbesserte McMaster-Kammer zum Auszählen von Wurmeiern. Tierärztl Umsch 6:209–210
- Zajíček D (1978) Comparison of the efficiency of two quantitative ovoskopic methods (article in Czech). Vet Med 23:275–280



Genetic and morphological characterization of *Trichuris myocastoris* found in *Myocastor coypus* in the Czech Republic

K. Rylková¹ · E. Tůmová² · A. Brožová¹ · I. Jankovská¹ · J. Vadlejš¹ · Z. Čadková¹ · J. Frýdlová¹ · P. Peřínková¹ · I. Langrová¹ · D. Chodová² · S. Nechybová¹ · Š. Scháňková¹

Received: 29 June 2015 / Accepted: 3 July 2015 / Published online: 15 July 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract *Trichuris* sp. individuals were collected from *Myocastor coypus* from fancy breeder farms in the Czech Republic. Using morphological and biometrical methods, 30 female and 30 male nematodes were identified as *Trichuris myocastoris*. This paper presents the first molecular description of this species. The ribosomal DNA (rDNA) region, consisting of internal transcribed spacer (ITS)-1, 5.8 gene and ITS-2, was sequenced. Based on an analysis of 651 bp, *T. myocastoris* was found to be different from any other *Trichuris* species for which published sequencing of the ITS region is available. The phylogenetic relationships were estimated using the maximum parsimony methods and Bayesian analyses. *T. myocastoris* was found to be significantly closely related to *Trichuris* of rodents than those of ruminants.

Keywords *Myocastor coypus* · *Trichuris myocastoris* · Parasites · ITS1-5.8S-ITS2 · rDNA

Introduction

Myocastor coypus (coypu or nutria) is a South American semi-aquatic rodent with a wide geographical distribution,

✉ I. Langrová
langrova@af.czu.cz

¹ Department of Zoology and Fisheries, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences in Prague, Kamycka 129, 165 21 Prague, 6-Suchdol, Czech Republic

² Department of Animal Husbandry, Faculty of Agrobiological, Food and Natural Resources, Czech University of Life Sciences in Prague, Kamycka 129, 165 21 Prague, 6-Suchdol, Czech Republic

from central Bolivia and southern Brazil to Tierra del Fuego (Argentina), and as a result of escapes and release from fur farms, feral populations now occur in Europe, Asia and North America (Woods et al. 1992).

In the Czech Republic, nutrias were first bred in 1925, when several animals were imported from Argentina. Within a short time, nutria breeding greatly expanded. Currently, nutrias are increasingly used not only for their fur but also for their high-quality meat.

Nutrias, like other animals, suffer from many diseases as well as many parasitic infections. However, studies on nutria parasites are sporadic and focus mainly on wild nutria from the Americas (Babero and Lee 1961; Rossin et al. 2009; Gayo et al. 2011; Martino et al. 2012). The most common endoparasites of wild nutria are *Eimeria* spp., *Longistriata maldonadoi*, *Strongyloides myopotami* and *Trichuris myocastoris* (Babero and Lee 1961; Pastuszko 1991; Rossin et al. 2009; Martino et al. 2012); for European nutria, they are mainly coccidia, *S. myopotami* and *T. myocastoris* (Zajiček 1955; Hohner 1961; Pastuszko 1991). Pellérdy (1963, 1974) reported the following coccidia in nutria: *Eimeria myopotami*, *Eimeria pellucida*, *Eimeria coypi*, *Eimeria seideli* and *Eimeria nutriae*.

T. myocastoris was first described in 1933 by Enigk; Baruš et al. (1975) redescribed this species. On the basis of a detailed study of the morphology and metrical characters of their specimens, which were compared to the original description of *T. myocastoris* and *Trichuris nutria*, Baruš et al. (1975) demonstrated that *T. myocastoris* and *T. nutria* (Petrov, 1941) are synonyms.

In the Czech Republic, nutrias are widespread and they are often bred on farms for their meat and fur. On these farms, they live in close proximity to various domestic animals (especially small ruminants). It is thus questionable whether *Trichuris* sp., which are very common in nutria in the

Czech Republic, are the same species described by Enigk in 1933 (England) and redescribed by Baruš in 1975 (Azerbaijan). It is also possible that *Trichuris* sp. originated from another host; Dobrovolskii (1952) reported that *Trichuris ovis* had been found in the muskrat. A genetic analysis of *Trichuris* sp. has yet to be made from a nutria.

The aim of this study was to identify *T. myocastoris* from different fancy breeder farms in the Czech Republic using morphometrical as well as genetic molecular methods.

Materials and methods

Morphological study

Trichuris sp. individuals were collected from *M. coypus* (young and adult animals) that originated from three nutria farms in the Czech Republic. A total of 60 worms (30 males and 30 females) were separated and rinsed in a physiological saline solution (0.9 w/v NaCl) in order to remove contaminants. These specimens were used for morphometrical determination.

In order to identify *Trichuris* species found in the caecum and colon of the hosts, morphological and biometric studies were performed with an Olympus microscope (BX51).

A total of 60 *Trichuris* individual specimens were identified at the species level according to Enigk (1933) and Baruš et al. (1975).

The following morphometrical features were measured in each specimen: total body length, length of oesophagus, posterior body length, body width at oesophagus end, maximum posterior body width and spicule length.

Molecular study

We analyzed a total of six *Trichuris* sp. individuals. Genomic DNA from individual worm was extracted using a QIAamp Tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Genomic DNA was detected using 0.8 % agarose gel electrophoresis and GelRed (Biotium). The ribosomal DNA (rDNA) region, consisting of internal transcribed spacer (ITS)-1, 5.8 gene and ITS-2, was amplified by the polymerase chain reaction (PCR), using a universal pair of primers: forward NC5 5'-GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT-3' and reverse NC2 5'-TTA GTT TCT TTT CCT CCG CT-3' (Zhu et al. 2000). The PCR reaction consisted of 15.5 µl of Combi PPP Master Mix (Top-Bio), 5 µl of each primer, 5 µl of template DNA and PRC water (Top-Bio), for a total volume of 50 µl. The PCR profile carried out on MJ Mini™ thermocycler (Bio-Rad) started with a 10-min period of initial denaturation at 94 °C, followed by 35 cycles. Each cycle consisted of a denaturation step at 94 °C for 1 min, a primer annealing step at 55 °C for 1 min and an elongation step at

72 °C for 1 min. The PCR was terminated at a final elongation period of 72 °C for 10 min. Products of the PCR were detected using 0.8 % agarose gel electrophoresis with GelRed (Biotium). The PCR products were purified and sequenced by MacroGen Inc., Korea. Each sample was sequenced from both (3' and 5') ends of both fragments using the same primers that are used for double-strand PCR amplification.

The raw chromatograms were manually assembled and checked by eye for potential errors using computer software BioEdit 5.0.9 (Hall 1999); the same program was used to align the sequences using the ClustalW algorithm. Sequences were compared with the online GenBank (NCBI) nucleotide database using the BLASTn program.

In addition to our samples, we used sequences of several *Trichuris* species downloaded from the GenBank database to set the phylogenetic position of our individuals within the genus. Detailed information regarding material used in our molecular study is listed in Table 1.

Our new six sequences of rDNA region consisting of ITS-1, 5.8 gene and ITS-2 were deposited into the GenBank database under the following accession numbers: KM877518–KM877523.

The phylogenetic relationships were estimated using the maximum parsimony (MP) method and Bayesian analysis (BAY). Equal weight was employed for all sites for the MP analysis, which was conducted using PAUP* version 4.0b10 (Swofford 2000). Tree searches were performed using heuristic searches with a stepwise addition of taxa and TBR branch swapping algorithm. Bootstrap analyses (1000 replicates) were used to assess the relative robustness of tree nodes. The Bayesian tree was constructed using MrBayes version 3.0 (Huelsenbeck and Ronquist 2001). Six Monte Carlo Markov chains ran simultaneously for 1,000,000 generations, with a sampling frequency of 100. Likelihood scores reached stability after c. 30,000 generations. The corresponding trees were discarded as a burn-in, and the remaining trees were used to construct a 50 % majority-rule consensus tree. The posterior probabilities were used to indicate branch supports in the final tree.

Results

Morphological study

The following is a brief description of the whipworm body found in nutria in the Czech Republic. This coincides with a description from Azerbaijan (Baruš et al. 1975); however, nematodes in our study were slightly longer (see Table 2).

The body of whipworms was white, the anterior part of the body gradually tapers towards the anterior end, and this part of body is distinctly narrower than the oesophageal region. The total male body length ranged from 21.38 to 49.44 mm, with

Table 1 List of samples used in molecular study

GenBank Acc. No.	Species	Host	Reference
FN543201	<i>T. muris</i>	<i>Mus domesticus</i>	Callejón et al. 2008
FN543197	<i>T. muris</i>	<i>Mus domesticus</i>	Callejón et al. 2008
JX683525	<i>Trichuris mastomysi</i>	<i>Mastomys natalensis</i>	Ribas et al. 2013
JX683517	<i>T. mastomysi</i>	<i>Mastomys natalensis</i>	Ribas et al. 2013
JX683524	<i>Trichuris carlieri</i>	<i>Gerbilliscus vicinus</i>	Ribas et al. 2013
JX683522	<i>T. carlieri</i>	<i>Gerbilliscus vicinus</i>	Ribas et al. 2013
FR849687	<i>T. arvicolae</i>	Unknown	Unpublished
FN543185	<i>T. arvicolae</i>	<i>Myodes glareolus</i>	Unpublished
KM877518	<i>T. myocastoris</i>	<i>Myocastor coypus</i>	This study
KM877519	<i>T. myocastoris</i>	<i>Myocastor coypus</i>	This study
KM877520	<i>T. myocastoris</i>	<i>Myocastor coypus</i>	This study
KM877521	<i>T. myocastoris</i>	<i>Myocastor coypus</i>	This study
KM877522	<i>T. myocastoris</i>	<i>Myocastor coypus</i>	This study
KM877523	<i>T. myocastoris</i>	<i>Myocastor coypus</i>	This study
JX218223	<i>T. discolor</i>	<i>Capreolus capreolus</i>	Salaba et al. 2013
JX218222	<i>T. discolor</i>	<i>Capreolus capreolus</i>	Salaba et al. 2013
JX218218	<i>T. ovis</i>	<i>Capreolus capreolus</i>	Salaba et al. 2013
JF680987	<i>T. ovis</i>	Domestic sheep	Unpublished
AJ489248	<i>T. skrjabini</i>	<i>Capra hircus</i>	Cutillas et al. 2004

Table 2 Biometrical data (mm) ± standard deviation (SD) of adults *Trichuris myocastoris*

	Locality			
	Czech Republic	Azerbaijan	Azerbaijan	Germany
	Study			
	Present study	Baruš et al. (1975)	Petrov (1941)	Enigk (1933)
Number of individuals	60	43		
Males				
Total length	37.86 (21.38–49.44)±7.02	22.94–35.25	38–46	30–38
Length of oesophagus	23.03 (13.01–32.25)±4.99	13.26–19.65	23.7–25.9	18–24
Length of posterior part	14.69 (8.31–17.72)±2.33	9.69–15.6	–	–
Width of body at level of oesophagus end	0.23 (0.14–0.30)±0.04	0.22–0.37	0.28–0.36	–
Maximum width of body	0.31 (0.21–0.47)±0.06	0.39–0.51	0.43–0.49	0.38–0.42
Length of spicule	3.89 (2.55–4.9)±0.69	3.47–3.74	3.7–3.9	2.7–3.2
Width of the spicule at the middle	0.031 (0.024–0.038)±0.0043	0.037–0.042	–	0.038–0.044
Females				
Total length	47.79 (33.89–61.56)±6.04	38.36–43.05	46–55	43–50
Length of oesophagus	30.21 (20.85–38.43)±3.76	24.64–28.08	27–34	26–32
Length of posterior part	17.61 (12.03–22.69)±2.35	13.14–14.97	–	16–18
Width of body at level of oesophagus end	0.27 (0.16–0.37)±0.05	0.29–0.33	0.24–0.28	0.17–0.22
Maximum width of body	0.37 (0.29–0.40)±0.04	0.48–0.66	0.35–0.39	0.48–0.54
Distance vulva to sphincter of uterus	1.39 (1.17–1.62)±1.5	1.12–1.85	–	0.7–0.9 ^a
Length of eggs	0.058 (0.043–0.066)±0.04	0.052–0.06	0.060–0.063	0.06
Width of eggs	0.027 (0.023–0.033)±0.02	0.03–0.034	0.030–0.033	–

^a Straight line of the vagina

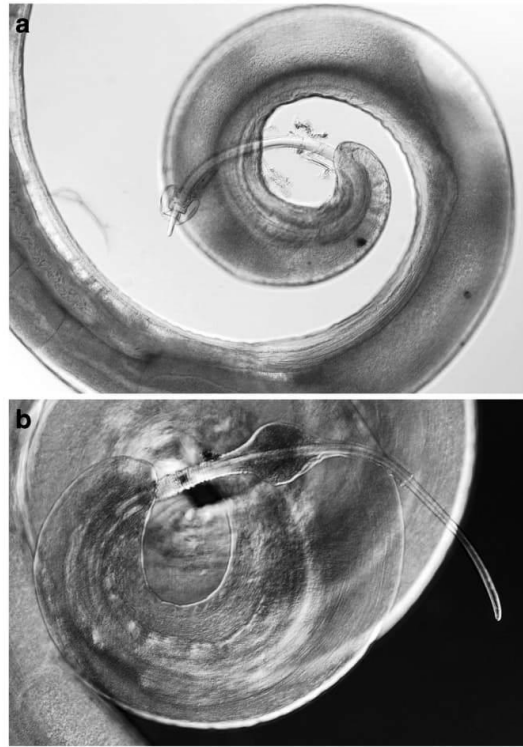


Fig. 1 a, b Males of *Trichuris myocastoris* isolated from nutria

the anterior part measuring 13.01–32.25 mm in length. Small rounded papillae are located on each side of the cloaca. The posterior end of the body is rounded. The spicule is markedly sclerotized, measuring 2.55–4.90 mm in length and 0.024–0.038 mm in width in the middle section and 0.012–0.017 mm in the distal section. Spicule sheath is tubular and covered with spines; however, the distal part of the bulb is covered with spines and the distal tubular part is without spines. The shape of the spicule sheath varies according to the evagination of the spicule, from tubular shape to the bulb (Fig. 1a, b).

The female body is 33.89–61.56 mm in length, and the anterior portion is 20.85–38.43 mm in length. The posterior part of the body measures 12.03–22.69 mm in length and 0.29–0.40 mm in maximum width. The vulva is located at the oesophagus end, and it is in the shape of a transverse slit with slightly frilled margins. It is situated in the centre of a circular cuticular disc, which has a distinctly smooth surface. The vagina extends in a straight line, loops three times and finally connects to the uterus (Fig. 2a, b). The distance from the vulva to the uterus ranged from 1.17 to 1.62 mm. The biometrical parameters of individuals are shown in Table 2.

Molecular study

The final matrix of 19 sequences consisted of 166 bp containing 20 variable characters with 14 parsimony informative sites. Altogether, the analyzed specimens of *Trichuris* revealed 14 haplotypes. Our six specimens from *M. coypus* represent six unique haplotypes. Employed methods have recovered trees of very similar topologies with high statistical supports and sorted sequences into well-supported clusters (Fig. 3).

Discussion

The nutria is indigenous to the southern part of South America, and both wild and captive-raised animals are used for fur and meat. Nutria breeding was mainly used to produce fur during the 1990s. Due to recent changes in the world market situation, meat has changed and become the main product of nutria breeding. In the Czech Republic, nutria meat is

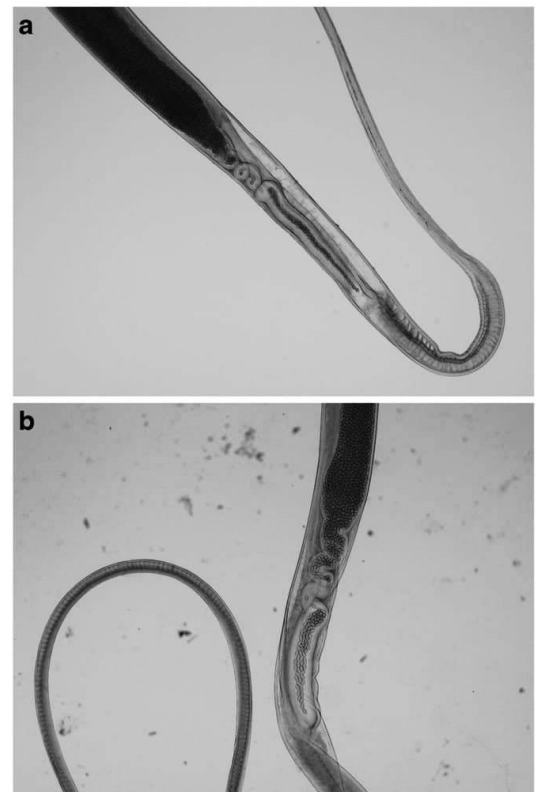
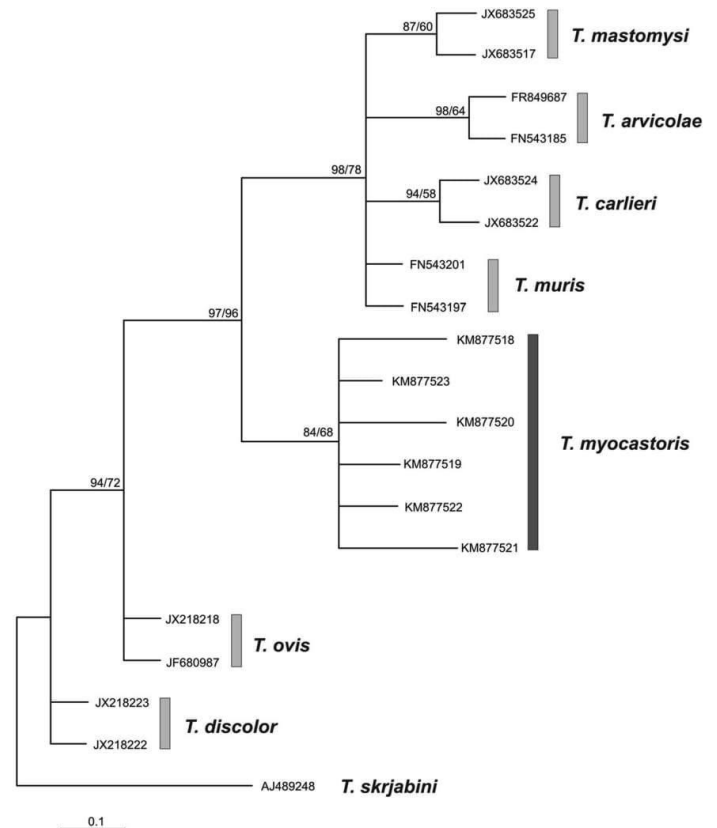


Fig. 2 a, b The vulval regions of *Trichuris myocastoris* isolated from nutria

Fig. 3 Reconstructed phylogeny of the *Trichuris* sequences. The numbers at the nodes represent statistical supports for BAY and MP analyses. Bootstrap supports below 50 and Bayesian posterior probabilities below 0.75 are not shown



similarly becoming popular, especially due to its high protein content and low fat and cholesterol content (Tůmová et al. 2013).

T. myocastoris is a common parasite of wild and domestic nutria (Zajíček 1955; Hohner 1961; Babero and Lee 1961; Pastuszko 1991; Rossin et al. 2009; Martino et al. 2012). This parasite was identified by Enigk (1933) and Petrov (1941) and redescribed in detail by Baruš et al. (1975). The fine structures of the cuticle and oesophagus of this species were described by Wright (1968a, b, 1972).

In our study, 60 individuals (young as well-breeding animals) from three localities were described and measured. Morphometrical data of males and females correspond to the description of *Trichuris* nematodes reported by Baruš (1975) in Azerbaijan. The main diagnostic characteristics in *Trichuris* spp. are body length and spicule length and width (Špakulová 1994). With respect to our specimens, the spicule length ranged from 2.55 to 4.9 mm. The other authors reported spicule lengths from 2.7 mm (Enigk 1933) to 3.9 mm (Petrov 1941). The *Trichuris* individuals in this study were slightly longer than those in previous studies. This can be due to the

fact that the number of nutria that was dissected in this study was large individuals culled from breeding programs.

Trichuris spp. are common parasites of rodents. *Trichuris muris* and *Trichuris arvicolae* are the most commonly described species in rodents. The species designation *T. muris* (Schrank, 1788) is commonly used to refer to trichurids, which are found in Murinae; *T. arvicolae* is used to refer to the subfamily Arvicolinae (Feliu et al. 2000).

New *Trichuris* species (*Trichuris pardinasi* n. sp., *Trichuris bainaie* n. sp., *Trichuris thrichomysi* n. sp.) were recently described in rodents in South America (Robles et al. 2006; 2014; Torres et al. 2011), and *T. muris* and *T. arvicolae* were redescribed in Europe (Feliu et al. 2000). The genus is also commonly found in African rodents, with at least 12 species described to date (Ribas et al. 2013).

In order to describe a new species of the *Trichuris* genus nowadays, it is necessary to utilize morphological and molecular methods. This is necessary because many species, such as *T. arvicolae* and *T. muris* and females of the species *T. ovis* and *Trichuris discolor*, are morphologically indistinguishable (Feliu et al. 2000; Salaba et al. 2013). Conversely, Cutillas

et al. (2004) and Oliveros et al. (2000) could find no differences between sequences of *T. ovis* rDNA and *Trichuris globulosa* rDNA (internal transcribed spacers ITS1-5.8S-ITS2). Similarly, *Trichuris capreoli* is considered a synonym of *T. globulosa* by some authors (Cutillas et al. 2004; Oliveros et al. 2000; Gagarin 1972).

Currently, many *Trichuris* species are only morphologically defined. *T. myocastoris* was morphologically determined by Enigk 1933 and in detail by Baruš et al. (1975). This paper presents the first molecular description of *T. myocastoris*.

The BLASTn program within the GenBank database indicated that *Trichuris* individuals found in *M. coypus* did not match any of the genetically defined *Trichuris* species. Sequences are unique within the phylogenetic tree (Fig. 2), and they are clearly separated from other clusters. In particular, genetic differences between *T. myocastoris* and two trichurids native to the Czech Republic (*T. muris* and *T. arvicolae*) disprove the possibility that nutrias could be infected by local species of rodent trichurids after their translocation to the Czech Republic. Molecular analysis has proved that this is a unique genetic dataset, and it has confirmed that *T. myocastoris* is a separate species within the genus *Trichuris*. *Trichuris* nematodes were isolated from domestic *M. coypus*. The nematodes were identified using morphological and biometrical methods. Subsequently, genomic DNA was isolated and the ITS1-5.8S-ITS2 segment from ribosomal DNA (RNA) was amplified and sequenced using PCR techniques. Molecular analysis has proved the following: (1) this is a unique genetic dataset, which has confirmed that *T. myocastoris* is a separate species within the genus *Trichuris*, and (2) *T. myocastoris* was found to be significantly more closely related to *Trichuris* from rodents than to those from ruminants.

Acknowledgments This study has been funded by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Nutria Genetic Resources Programme) and the Grant of National Agency for Agricultural Research of the Czech Republic, v.v.i. CIGA No. 20152021. We would also like to thank Mr. Brian Kavalir for his proofreading services.

References

- Babero BB, Lee JW (1961) Studies on the helminths of nutria, *Myocastor coypus* (Molina), in Louisiana with check list of other worm parasites from this host. *J Parasitol* 47:378–390
- Baruš V, Majumdar G, Mikailov TK (1975) Morphology and taxonomy of *Trichocephalus myocastoris* (Enigk, 1933). *Folia Parasitologica Praga* 22:207–213
- Callejón R, de Rojas M, Ariza C, Ubeda JM, Guevara DC, Cutillas C (2008) Cytochrome oxidase subunit I and mitochondrial 16S rDNA sequences of *Trichuris skrjabini* (Tricocephalida: Trichuridae). *Parasitol Res* 104:715–716
- Cutillas C, Oliveros R, de Rojas M, Guevara DC (2004) Determination of *Trichuris skrjabini* by sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 segment of the ribosomal DNA: comparative molecular study of different species of *Trichurids*. *J Parasitol* 90(3):648–652
- Dobrovol'skii AV (1952) Parazitarnye zabollevaniya u ondatry (*Ondatra zibethica* L.). *Zoologicheskii Zhurnal* 31(4):640–642
- Enigk K (1933) Einige Nematoden aus der Nutria. *Parasitol Res* 6(3): 326–331
- Feliu C, Spakulova M, Casanova JC, Renaud F, Morand S, Hugot JP, Santalla F, Durand P (2000) Genetic and morphological heterogeneity in small rodent whipworms in southwestern Europe: characterization of *Trichuris muris* and description of *Trichuris arvicolae* n. sp. (Nematoda: Trichuridae). *J Parasitol* 86(3):442–449
- Gagarin VG (1972) Analiz vidogo sostava trihicefalov značnyh, zaregistrovannyh v Sovetskom Spuze. *Trudy Vsesojuznogo Instituta Gelmintologii K I Skrjabina* 19:39–75
- Gayo V, Cuervo P, Rosadilla D, Birriel S, Dell'Oca L, Trelles A, Cuire U, Sierra RMY (2011) Natural Fasciola hepatica infection in nutria (*Myocastor coypus*) in Uruguay. *J Zoo Wildl Med* 42(2):354–356
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
- Hohner L (1961) Die Endoparasiten des Sumpfbibers unter besonderer Berücksichtigung der Kokzidien. *Zoologischen Institut und Veterinär-Parasitologischen Institut der Karl-Marx Universität Leipzig*. pp. 98–151
- Huelsensbeck JP, Ronquist F (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754–755
- Martino PE, Radman N, Parrado E, Bautista E, Cisterna C, Silvestrini MP, Corba S (2012) Note on the occurrence of parasites of the wild nutria (*Myocastor coypus*, Molina, 1782). *Helminthologia* 49(3): 164–168
- Oliveros R, Cutillas C, de Rojas M, Arias P (2000) Characterization of four species of *Trichuris* (Nematoda: Enoplida) by their second internal transcribed spacer ribosomal DNA sequence. *Parasitol Res* 86:1008–1013
- Pastuszko J (1991) The examination of intestinal parasitofauna in coypu (*Myocastor coypus*, Molina 1782) from closed husbandries with particular regard to coccidia. *Akademia Rolniczej we Wrocławiu*. p. 41
- Pellérdy LP (1963) Catalogue of Eimeriidea (Protozoa, Sporozoa). *Akademiai Kiadó Budapest*. p. 122
- Pellérdy LP (1974) Coccidia and coccidiosis. *Verlag Paul Parey, Berlin*, p. 959
- Petrov AM (1941) Glistnye bolezni pushnykh zverey. *Mosqow*. pp. 1–227
- Ribas A, Lopez S, Makundi RH, Leirs H, de Bellocq JG (2013) *Trichuris* spp. (Nematoda: Trichuridae) from two rodents, *Mastomys natalensis* and *Gerbilliscus vicinus* in Tanzania. *J Parasitol* 99(5): 868–875
- Robles MD, Navone GT, Notamicola J (2006) A new species of *Trichuris* (Nematoda: Trichuridae) from Phyllotini rodents in Argentina. *J Parasitol* 92(1):100–104
- Robles MD, Cutillas C, Panei CJ, Callejón R (2014) Morphological and molecular characterization of a new *Trichuris* species (Nematoda: Trichuridae), and phylogenetic relationships of *Trichuris* species of coccitid rodents from Argentina. *PLoS One* 11(9):1–11
- Rossin MA, Varela G, Timi JT (2009) *Strongyloides myopotami* in ctenomyid rodents: transition from semi-aquatic to subterranean life cycle. *Acta Parasitologica* 54(3):257–262
- Salaba O, Rylková K, Vadlejch J, Petrář M, Schánková Š, Brožová A, Jankovská I, Jebavý L, Langrová I (2013) The first determination of *Trichuris* sp. from roe deer by amplification and sequencing of the ITS1-5.8S-ITS2 segment of ribosomal DNA. *Parasitol Res* 112(3): 955–960
- Torres E JL, Nascimento APF, Menezes AO, Garcia J, dos Santos MAJ, Maldonado A, Miranda K, Lanfredi RM, de Souza W (2011) A new species of *Trichuris* from *Thrichomys apereoides* (Rodentia:

- Echimyidae) in Brazil: morphological and histological studies. *Vet Parasitol* 176(2-3):226–235
- Tůmová E, Chodová D, Hrstka Z (2013) Hodnocení masné užitkovosti nutrii. Certifikovaná metodika ČZU v Praze, p. 27
- Woods CA, Contreras L, Willner-Chapman G, Whidden HP (1992) *Myocastor coypus*. *Mamm Species* 398:1–8
- Zajíček D (1955) Parazitární invaze u mladých nutrii. Sborník Vysoké školy zemědělské a lesnické v Brně, řada B, Spisy fakulty veterinární 3–4(224):95–104
- Zhu X, Gasser RB, Jacobs DE, Hung G-C, Chilton NB (2000) Relationships among some ascaridoid nematodes based on ribosomal DNA sequence data. *Parasitol Res* 86:738–744

PARASITES OF *MYOCASTOR COYPUS* – A COMPARISON IN FARM ANIMALS AND THEIR FERAL COUNTERPARTS*

S. Nechybová¹, I. Langrová¹, E. Tůmová²

¹Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Zoology and Fisheries, Prague, Czech Republic

²Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiolgy, Food and Natural Resources, Department of Animal Husbandry, Prague, Czech Republic

The parasitic status in the coypus (nutrias) *Myocastor coypus*, both farm-bred or free-living on river banks in the Czech Republic, was determined. Faecal samples were collected from 200 coypus originating from 11 farms (farm-bred animals) and from 20 individuals living at 14 natural localities (feral animals). Faeces were examined for nematode eggs and coccidian oocysts using the McMaster method. The evaluation of faeces from farm-bred coypus indicated infection with the following parasites: *Trichuris* sp., *Strongyloides* sp., *Trichostrongylus* sp., *Eimeria seidelli*, *Eimeria nutriae*, *Eimeria coypi*, and *Eimeria myopotami*. Free-living feral rodents harboured *Eimeria nutriae*, *E. coypi*, *Strongyloides* sp. and in one case also *Trichuris* sp. An additional visceral examination of 20 coypus originating from five farms revealed two nematode species in the gastrointestinal tracts, namely *Trichuris myocastoris* and *Strongyloides myopotami*. The study indicated that feral coypus are far less parasitized than their captive counterparts.

coypu, nutria, nematodes, *Trichuris myocastoris*, *Strongyloides myopotami*, coccidia, *Eimeria*



doi: 10.2478/sab-2018-0004

Received for publication on July 12, 2017

Accepted for publication on August 27, 2017

INTRODUCTION

Myocastor coypus (Molina, 1782) is named either coypu (name used in Europe and Latin America) or nutria (used in North America, Asia, and the former Soviet Union (see <https://www.nwrc.usgs.gov/special/nutria/>). The rodent is a large, semi-aquatic, invasive animal native to South America (Woods et al., 1992). The coypu has been introduced around the world for fur farming (Carter, Leonard, 2002), but it has also been released as a game animal and a means to control aquatic vegetation (Bounds, Carowan, 2000). Coypus were first imported to the Czech Republic in 1924 and became very popular due

to their high quality coats and meat. Since the 1990s, numbers of farm-bred animals have been declining, yet they remain a favourite source of healthy meat in some regions (Tůmová et al., 2015).

However, today the coypu is considered one of the worst invasive species (Lowe et al., 2000; Bertolino, Viterbi, 2010). This is due to the widespread damage it causes to ecosystems, including its effects on crops, riverine vegetation and riverbanks through grazing and burrowing (Carter, Leonard, 2002; Vila et al., 2010). We can see a similar situation in the Czech Republic, where numbers of coypus managed to escape from farms and began spreading in the feral during the 1970s. Currently, the number

* Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic, Project No. QJ1510038, and by the Internal Grant Agency of the Czech University of Life Sciences Prague (CIGA), Project No. 20152021.

Table 1. Results of faecal samples ($n = 200$ per each parasite) examination of farm-bred coypus (*Myocastor coypus*)

Parasite	Prevalence (%)	EPG/OPG			
		mean	SD	min	max
Nematoda					
<i>Trichuris</i> sp.	57.0	416.3	901.5	20	6 000
<i>Strongyloides</i> sp.	11.5	8.3	35.5	20	300
<i>Trichostrongylus</i> sp.	4.0	2.3	11.8	20	80
Coccidia					
<i>Eimeria seideli</i>	26.0	674.4	3 664.7	20	28 800
<i>Eimeria myopotami</i>	5.0	9.4	34.8	20	220
<i>Eimeria coypii</i>	37.0	1 325.7	3 264.9	20	18 040
<i>Eimeria nutriae</i>	23.0	274.9	1 007.0	20	8 980

EPG = eggs per g of faeces, OPG = oocysts per g of faeces, SD = standard deviation

of these rodents in free nature is increasing. They do not have any enemy in Central Europe and occur here in little isolated areas (K r i s t o f i k , D a n k o , 2012).

Like other animals, *M. coypus* suffers from many diseases and parasitic infections. However, studies dealing with its parasites are sporadic and focus mainly on wild populations from the Americas. B a b e r o , L e e (1961) found various helminths, namely 11 species of trematodes (including *Echinostoma revolutum*, *Heterobilharzia americana*, and *Psilostomum* sp.), 21 species of cestodes (including *Anoplocephala* sp.), one acanthocephalan (*Neoechinorhynchus* sp.), and 31 species of nematodes (including *Trichostrongylus sigmondontis*, *Longistriata maldonadoi*, *Strongyloides myopotami*, and *Trichuris myocastoris*) in coypus from Luisiana. M a r t i n o et al. (2012) examined the endoparasites of wild coypus from their native region in South America. The rodents were infected with Nematoda (82.0%), Trematoda (33.3%), Cestoda (12.8%), and various unicellular parasites (*Eimeria*, *Cryptosporidium*, *Giardia*) (46.1%). Monoxenic coccidia *Eimeria myopotami* and *Eimeria nutriae* (phylum Apicomplexa), and nematodes *Strongyloides myopotami* and *Trichuris myocastoris* were the most prevalent parasites. E l - K o u b a et al. (2009) examined coprologically 16 animals from a protected area in Curitiba, Brazil. The overall prevalence rates were 56.25% for trematode eggs, 87.50% for cestode eggs, 56.25% for Strongyloidea nematodes eggs, and 50% for coccidia (Eimeriidae) oocysts.

Information regarding parasites in captive-bred coypus is scarce. Frequently occurring parasites in breeds are monoxenic coccidia. According to M e r t i n et al. (2005), coccidiosis is the most dangerous parasitic disease in coypus and can cause considerable losses in young offspring. S c h e u r i n g (1990) determined six species of the genus *Eimeria* in 19.5% of coypus from farms in Poland, these animals were further

infected with nematodes (28.5%), comprising mostly *T. myocastoris* and *S. myopotami*, and rarely one case of *Trichostrongylus* sp.

Similarly, surveys of gastrointestinal parasites of feral coypus in Europe are scarce. L e w i s , B a l l (1984) revealed exclusively coccidia in feral coypus from England; however, recent study by Z a n z a n i et al. (2016) detected much wider spectrum of feral coypu parasites in England which included *S. myopotami*, *Trichostrongylus duretteae*, *Eimeria coypii*, and *Eimeria seideli*.

However, the coypu is also capable of spreading zoonotic agents such as *Toxoplasma gondi*, *Fasciola hepatica*, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, *Taenia* metacestodes, *Capillaria hepatica*, and several others (e.g. B a b e r o , L e e , 1961; B o l l o et al., 2003; G a y o et al., 2011; N o r d o n i et al., 2011; U m h a n g et al., 2013; Z a n z a n i et al., 2016).

The aim of the present work was to determine the parasitic status in Czech farm coypus in order to evaluate the potential risk of the spread of parasitic diseases, which may pose a danger to both animals and humans. Another equally important goal was to compare the degree of parasitization of farm and feral coypu populations in the Czech Republic.

MATERIAL AND METHODS

Faecal samples were collected from *M. coypus* individuals originating from 11 farms (farm-bred animals) and 14 natural localities (feral animals) of the Czech Republic. The faecal samples were stored in plastic tubes at 4°C for a week prior to analysis. All samples were examined individually for gastrointestinal nematode eggs (faecal egg counts, FEC) and coccidial oocysts (faecal oocyst counts, FOC) using the McMaster method (V a d l e j c h et al., 2013).

Table 2. Results of faecal samples ($n = 20$ per each parasite) examination of feral coypus (*Myocastor coypus*)

Parasite	Prevalence (%)	EPG/OPG			
		mean	SD	min	max
Nematoda					
<i>Trichuris</i> sp.	5.0	3.0	13.4	60	60
<i>Strongyloides</i> sp.	30.0	71.0	179.4	20	740
Coccidia					
<i>Eimeria coypi</i>	60.0	197.0	354.7	40	1 280
<i>Eimeria nutriae</i>	45.0	1 577.0	6 038.5	60	27 160

EPG = eggs per g of faeces, OPG = oocysts per g of faeces, SD = standard deviation

Table 3. Results of necropsy examinations of farm-bred coypus (*Myocastor coypus*)

Parasite	Coypus n	Prevalence (%)	Intensity of infection			
			mean	SD	min	max
<i>Trichuris myocastoris</i>	20	40	11.3	19.9	4	66
<i>Strongyloides myopotami</i>	20	25	5.2	10.9	1	23

SD = standard deviation

Eimeria oocysts were determined using descriptions from Prasad (1960), Lewis, Ball (1984), and Scheuring (1990).

The viscera (abomasum, small intestines, colon, and caecum) of coypus originating from five Czech farms were collected and processed for worm recovery. The worms were separated according to sex and rinsed in a physiological saline solution (0.9 w/v NaCl) in order to remove contaminants, and stored in 70% ethanol. Parasites were identified according to Skrjabin et al. (1957), Sato et al. (2008), and Rylkova et al. (2015).

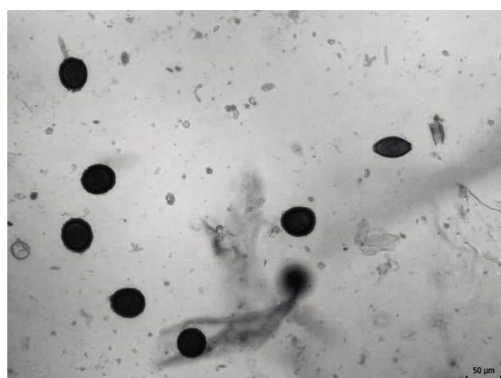


Fig. 1. Oocysts of *Eimeria seideli* and an egg of *Trichuris* sp.

RESULTS

Results of coprological examinations are summarized in Tables 1, 2. Evaluation of faecal samples from farm-bred coypus indicated infection with unidentified species of three nematode genera (*Trichuris* sp., *Strongyloides* sp., and *Trichostrongylus* sp.) and four coccidian species (*Eimeria seideli*, *Eimeria myopotami*, *Eimeria coypi*, and *Eimeria nutriae*) (Table 1, Fig. 1). The most prevalent and frequent parasites were *Trichuris* sp., *E. coypi*, *E. seideli*, and partially *E. nutriae*. In 11 farms, all examined rodents were infected with *Trichuris* sp.

Faecal samples from feral coypus, collected from 14 natural localities, contained eggs of only two nematode genera (*Trichuris* and *Strongyloides*) and two coccidian species (*E. nutriae* and *E. coypi*) (Table 2). Here, *Strongyloides* sp., *E. nutriae*, and *E. coypi* were the most frequent parasites.

Two nematode species were also identified in the gastrointestinal tracts of 20 animals, namely *Trichuris myocastoris* (8 positive cases, $P = 40\%$) and *Strongyloides myopotami* (5 positive cases, $P = 25\%$). The number of whipworms *T. myocastoris* varied slightly from 4 to 66, the mean intensity of infection (II) was 19.9 (Table 3). The number of *S. myopotami* roundworms varied from 1 to 23 and the mean II was 5.2 (Table 3). No other nematode species was revealed in the gastrointestinal tract of examined animals, despite the fact that the *Trichostrongylus duretteae* could be hypothetically expected here (Zanani et al., 2016).

DISCUSSION

This study has shown that the feral coypus are far less parasitized than their captive counterparts, although we examined fewer faecal samples of feral coypus than of the farm-bred animals. The free living coypus defecate mostly in water, which makes obtaining the faecal samples difficult. The narrower spectrum of their parasites is largely due to the unlimited environment of the feral coypus on the river banks. Contrariwise, farmed animals are kept in groups in concrete tanks, where the only water source is a water feeder. These conditions facilitate the spread of parasites, especially those having part of their life cycle in the environment and needing no intermediate hosts.

Our results dealing with parasitic load of farm coypu are comparable to those of studies from neighbouring Poland (Scheuring, 1990). In the both countries, farm coypus are parasitized by nematodes *S. myopotami*, *T. myocastoris*, and *Trichostrongylus* sp., and a series of coccidian species. In the Czech Republic, however, there is a higher incidence of *Trichuris* nematodes, which can reach an average egg prevalence of 57%. Moreover, on certain Czech farms all animals became infected with this parasite. In Poland, Scheuring (1990) reported prevalences of *T. myocastoris* from 7.2% in August to 34.2% in December. Prevalences of another nematode, *Strongyloides myopotami*, ranged from 6% in April to 25% in December. Our study showed a similar infection rate for this nematode: 11.5% (coprological examination) and 25% (necropsy examination). *Trichostrongylus* nematodes were only diagnosed using the coprological method; none of these nematodes were detected in the digestive tract of necropsied animals.

In the present study, four *Eimeria* species were discovered: *E. seideli*, *E. nutriae*, *E. coypi*, and *E. myopotami* and the prevalences on the Czech farms were much higher (in some cases 100%) than on the Polish farms (9–31.6%); there, however, also *E. fluviatilis* was detected (Scheuring, 1990).

In feral coypus from the Czech Republic, mainly coccidia were detected, most often *E. coypi* and *E. nutriae*. *Trichuris* sp. was revealed in only one sample; *Strongyloides* sp. occurred more frequently in feral coypus than in their farm counterparts.

The feral coypu population has increased in the Czech Republic in recent years. This increase is partially due to mild winters and to the fact that local people have developed a habit of feeding these animals. Feral coypus in the Czech Republic do not pose a threat to other animals or humans from a parasitic point of view. Nevertheless, coypu breeders should put more effort into monitoring their animals for parasitic infection. Young animals can be especially susceptible to the effects of parasitic infection, which are reflected in growth rates and fur quality.

CONCLUSION

Evaluation of faecal samples from farm-bred animals indicated infection with the coccidia, *Trichuris* sp., *Strongyloides* sp., and *Trichostrongylus* sp. Feral coypus harboured mainly coccidia and *Strongyloides* sp., in one case also *Trichuris* sp. Two nematode species of parasites (*Trichuris myocastoris* and *Strongyloides myopotami*) were identified in the gastrointestinal tracts of 20 animals. The study revealed that feral coypus are far less parasitized than their captive counterparts. Feral coypus in the Czech Republic do not, at least from a parasitic point of view, pose a threat to other animals or humans.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank Brian Kavalir for his proof-reading services.

REFERENCES

- Babero BB, Lee JW (1961): Studies on the helminths of nutria, *Myocastor coypus* (Molina), in Louisiana with check-list of other worm parasites from this host. *The Journal of Parasitology*, 47, 378–390. doi: 10.2307/3275359.
- Bertolino S, Viterbi R (2010): Long-term cost-effectiveness of coypu (*Myocastor coypus*) control in Piedmont (Italy). *Biological Invasions*, 12, 2549–2558. doi: 10.1007/s10530-009-9664-4.
- Bollo E, Pregel P, Gennero S, Pizzoni E, Rosati S, Nebbia P, Biolatti B (2003): Health status of a population of nutria (*Myocastor coypus*) living in a protected area in Italy. *Research in Veterinary Science*, 75, 21–25. doi: 10.1016/S0034-5288(03)00035-3.
- Bounds D, Carowan Jr. GA (2000): Nutria: a nonnative nemesis. *Transactions of the North American Wildlife and Natural Resources Conference*, 65, 405–413.
- Carter J, Leonard BP (2002): A review of the literature on the worldwide distribution, spread of, and efforts to eradicate the coypu (*Myocastor coypus*). *Wildlife Society Bulletin*, 30, 162–175.
- El-Kouba MMAN, Marques SMT, Pilati C, Hamann W (2009): Presence of *Fasciola hepatica* in feral nutria (*Myocastor coypus*) living in a public park in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 40, 103–106. doi: 10.1638/2008-0064.1.
- Gayo V, Cuervo P, Rosadilla D, Birriel S, Dell'Oca L, Trelles A, Cuore U, Sierra RM (2011): Natural *Fasciola hepatica* infection in nutria (*Myocastor coypus*) in Uruguay. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 42, 354–356. doi: 10.1638/2010-0226.1.
- Kristofik J, Danko S (2012): Mammals of Slovakia, distribution, bionomy and protection. VEDA Publishing House of the Slovak Academy of Science, Bratislava. (in Slovak)

- Lewis DC, Ball SJ (1984): *Eimeria fluviatilis* n. sp. and other species of *Eimeria* in wild coypus in England. *Systematic Parasitology*, 6, 191–198. doi: 10.1007/BF00009227.
- Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M (2000): 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the Global Invasive Species Database. The Invasive Species Specialist Group (ISSG), Auckland.
- Martino PE, Radman N, Parrado E, Bautista E, Cisterna C, Silvestrini MP, Corba S (2012): Note on the occurrence of parasites of the wild nutria (*Myocastor coypus*, Molina, 1782). *Helminthologia*, 49, 164–168. doi: 10.2478/s11687-012-0033-y.
- Mertin D, Banak M, Barta M, Hanusova E, Hanusova J, Kaplan J, Parkanyi V, Suvegova K. (2005): Biological aspects of breeding of river coypus (*Myocastor coypus*). Research Institute for Animal Production, Nitra. (in Slovak)
- Nordoni S, Angelici MC, Mugnaini L, Mancianti F (2011): Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in *Myocastor coypus* in a protected Italian wetland. *Parasites and Vectors*, 4, 240. doi: 10.1186/1756-3305-4-240.
- Prasad H (1960): Two new species of coccidia of the coypu. *The Journal of Protozoology*, 7, 207–210. doi: 10.1111/j.1550-7408.1960.tb00731.x.
- Rylkova K, Tumova E, Brozova A, Jankovska I, Vadlejch J, Cadkova Z, Frydlova J, Perinkova P, Langrova I, Chodova D, Nechybova S, Schankova S (2015): Genetic and morphological characterization of *Trichuris myocastoris* found in *Myocastor coypus* in the Czech Republic. *Parasitology Research*, 114, 3969–3975. doi: 10.1007/s00436-015-4623-8.
- Sato H, Tanaka S, Une Y, Torii H, Yokoyama M, Suzuki K, Amimoto A, Hasegawa H (2008): The stomal morphology of parasitic females of *Strongyloides* spp. by scanning electron microscopy. *Parasitology Research*, 102, 541–546. doi: 10.1007/s00436-007-0800-8.
- Scheuring W (1990): Examination of the intestinal parasite fauna of nutria (*Myocastor coypus*, Molina 1782) from enclosed breeding units with particular reference to coccidia. *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej we Wrocławiu*, 81. (in Polish)
- Skrjabin KI, Shikhobalova NP, Orlov IV (1957): Trichocephalidae and Capillariidae of animals and man and the diseases caused by them. In: Skrijabin KI (ed.): *Essentials of nematodology VI*. Izdatelstvo Akademii nauk SSSR, Moscow. (in Russian)
- Tumova E, Chodova J, Svobodova J, Uhlirva L, Volek Z (2015): Carcass composition and meat quality of Czech genetic resources of nutrias (*Myocastor coypus*). *Czech Journal of Animal Science*, 60, 479–486. doi: 10.17221/8556-CJAS.
- Umhang G, Lahoreau J, Nicolier A, Boue F (2013): *Echinococcus multilocularis* infection of a ring-tailed lemur (*Lemur catta*) and nutria (*Myocastor coypus*) in a French zoo. *Parasitology International*, 62, 561–563. doi: 10.1016/j.parint.2013.08.011.
- Vadlejch J, Petryl M, Lukesova D, Cadkova Z, Kudrnacova M, Jankovska I, Langrova I (2013): The concentration McMaster technique is suitable for quantification of coccidia oocysts in bird droppings. *Pakistan Veterinary Journal*, 33, 291–295.
- Vila M, Basnou C, Pysek P, Josefsson M, Genovesi P, Gollasch S, Nentwig W, Olenin S, Roques A, Roy D, Hulme PE, DAISIE partners (2010): How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European, cross-taxa assessment. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 8, 135–144. doi: 10.1890/080083.
- Woods CA, Contreras L, Willner-Chapman G, Whidden HP (1992): *Myocastor coypus*. *Mammalian Species*, 398, 1–8. doi: 10.2307/3504182.
- Zanzani SA, Di Cerbo A, Gazzonis AL, Epis S, Invernizzi A, Tagliabue S, Manfredi MT (2016): Parasitic and bacterial infections of *Myocastor coypus* in a metropolitan area of northwestern Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 52, 126–130. doi: 10.7589/2015-01-010.

Corresponding Author:

Ing. Stanislava Nechybová, Czech University of Life Sciences Prague, Faculty of Agrobiology, Food and Natural Resources, Department of Zoology and Fisheries, 165 00 Prague 6-Suchbát, Czech Republic, phone: +420 224 383 643, e-mail: nechybova@af.czu.cz

6. Výsledky a souhrnná diskuse

6.1 Výsledky a diskuse v rámci dílčích cílů

Publikace 1:

Práce byla zaměřena na kombinovanou morfologicko-molekulární studii hlístic rodu *Trichuris*, parazitujících u ovcí a srnců v České republice. Molekulární analýza ribozomálních genů všech získaných hlístic umožnila spolehlivou druhovou identifikaci a vyústila do designu druhově specifických markerů. Dalším cílem byla analýza reálného výskytu obou druhů u uvedených hostitelů a vyhodnocení morfologické variability a spolehlivosti druhových diferenciálních znaků u samic zjištěných druhů *Trichuris ovis* a *T. discolor*.

Pro molekulární studium obou druhů rodu *Trichuris* bylo použito 240 hlístic rodu *Trichuris*, získaných ze dvou druhů přežvýkavců, ovce domácí *Ovis orientalis* f. *aries* a srnce obecného *Capreolus capreolus*. Z těchto hlístic byla izolována genomická DNA a byl amplifikovaný a osekvenovaný ITS1-5,8S RNA-ITS2 segment genu pro ribozomální RNA, zahrnující vnitřní transkribované mezerníky ITS1 a ITS2 a dále 5,8S jednotku.

Informace o zjištěných sekvencích rDNA byly uloženy v genové databázi GenBank (přístupové kódy jsou uvedeny v příložené publikaci 1). Porovnáním s již známými sekvencemi z genové banky se zjistilo, že se u ovcí i srnců v České republice vyskytují pouze dva druhy trichurů, *T. ovis* a *T. discolor*. Úseky ITS1, obsahující inserce/delece specifické pro oba druhy, byly využity pro design PCR markerů INDEL1 a INDEL2, které dále sloužily pro diferenciaci těchto druhů (sekvence jsou uvedeny v publikaci 1).

Aplikací těchto originálních PCR markerů byla potvrzena příslušnost 155 samic k druhu *T. discolor* a 80 samic k druhu *T. ovis*. Pět získaných samců patřilo k druhu *T. ovis* a nebyl nalezen žádný samec *T. discolor*. Potvrdilo se, že oba druhy přežvýkavců, tj. ovce i srnci, mohou být hostiteli obou druhů trichurů. Samice *T. discolor* převládaly u srnců (132 samic) a byly ojedinělé u ovcí (5 samic). Zatímco *T. ovis* byl častější u ovcí (80 samic a 3 samci) než u srnců (18 samic a 2 samci). Naprostou většinu hlístic tedy představovaly samice. Celkově bylo nalezeno jen pět samců, kteří všichni patřili k druhu *T. ovis*.

Nové údaje o sekvencích ITS1-5,8S RNA-ITS2 byly využity pro konstrukci fylogenetického stromu za použití metody maximální věrohodnosti (maximum likelihood), spolu s dříve publikovanými relevantními informacemi o geograficky vzdálených populacích trichurů (Itagaki et al. 2007; Callejón et al. 2012; Salaba et al. 2013). Ukázalo se, že *T. discolor* z České republiky, Španělska a Japonska představuje jednu poměrně homogenní linii, která se však výrazně liší od populací *T. discolor* z Iránu. Značné rozdíly byly detekovány i v rámci druhu *T. ovis*, kdy většinová evropská populace zahrnovala Českou republiku a Irsko a značně odlišné haplotypy byly nalezeny u hlístic *T. ovis* z dobytka ve Španělsku.

Hlístice, které byly identifikovány pomocí molekulárních markerů, byly rovněž charakterizovány morfologicky a biometricky. Rozměry těla i dalších morfologických znaků samic *T. ovis* a *T. discolor* včetně rozměrů jejich vajíček se v průměru mírně lišily (*T. ovis* má větší průměrné hodnoty). Avšak intervaly minimo-maximálních hodnot se ve všech případech překrývaly. Statistické porovnání nemělo signifikantní výsledek (hodnoty měření uvedeny v publikaci 1). Vysoká míra variability morfologických znaků samic u většiny druhů rodu *Trichuris* je zřejmá i z přehledných údajů prezentovaných v této práci v Tabulkách 2, 4, 6, 8, 10 a 12. Podobně rozporné výsledky uvádějí i novější práce, které analyzují morfologickou variabilitu geograficky vzdálených populací *T. ovis* a *T. discolor* (Callejón et al. 2012, 2015; Salaba et al. 2013).

Za spolehlivý diagnostický znak samic druhů *T. ovis* a *T. discolor* byl dlouhou dobu považován tvar vulvy. U druhu *T. ovis* byla charakterizovaná jako finální část vagíny vytvářející vulvu – útvar či přívěsek, výrazně vystupující nad povrch těla, který je pokrytý šupinovitými ostny. Naopak *T. discolor* měl být charakterizovaný tím, že finální část vagíny nevystupuje nad povrch těla a vulva není zřetelná (Skrjabin et al. 1957; Baruš et al. 1978). Při analýze velkého počtu molekulárně identifikovaných samic se však zjistila značná míra variability i u tohoto znaku. Proto jsme vytvořili čtyři kategorie, morfotypy MT1 – MT4. MT1 je vystupující vagína s výrazným vulvárním přívěskem, MT2 nevystupující vagína s vulvárním otvorem bez jakékoliv vyvýšeniny, MT3 je přechodný typ vagíny s velmi malou vulvární vyvýšeninou a MT4 je vystupující vagína s viditelným kutikulárním výběžkem na vulvě (fotodokumentace v práci 1).

Výsledky jasně ukázaly, že mezní typy vulvy MT1 a MT2 skutečně jednoznačně definovaly druhy *T. ovis* (MT1, vid' Skrvjabin et al. 1957; Knight 1971; Cutillas et al. 1995) a *T. discolor* (MT2). Přejídný typ MT3 se však vyskytoval u obou druhů parazitů i obou hostitelů. Morfotyp MT3 se vyskytoval u 1,29 % samic *T. discolor*. Oba morfotypy MT3 a MT4 byly nacházeny u 11,25 % mladých, juvenilních samic *T. ovis*. Přejídné formy vulvy poprvé zaznamenali Olivero & Cutillas (2003) u několika juvenilních samic *T. ovis*.

Komplexní studie ukázala, že spolehlivé druhové určení hlístic rodu *Trichuris* cizopasících u přeživkavců je možné pouze při kombinování morfologických a molekulárních přístupů. Podobné výsledky byly prezentovány i u dalších fylogeneticky blízkých skupin trichurů, vázaných například na různé skupiny hlodavců (Robles et al. 2014).

Publikace 2:

Cílem studie bylo kombinovanými morfologicko-molekulárními metodami spolehlivě určit druhy hlístic rodu *Trichuris*, které byly získány v České republice při helmintologických pitvách pěti druhů volně žijících přeživkavců v průběhu devíti let (2009 - 2017) a zjistit přesné hodnoty prevalence a intenzity infekce druhů rodu *Trichuris*. Simultánní realizace pitevního vyšetření střevních traktů a koprologických metod umožnila posoudit spolehlivost McMasterovy koprologické metody pro detekci vajíček hlístic rodu *Trichuris*.

Pitvy a souběžné koprologické vyšetření 176 kusů volně žijících přeživkavců ukázaly, že v České republice byly u této zvěře přítomny výlučně dva druhy rodu *Trichuris*, a to *T. discolor* a *T. ovis* u srnce obecného, daňka evropského, jelena siky a muflona, zatímco u jelena evropského byl nalezen pouze *T. discolor*. Celkem bylo získáno ze všech hostitelů 790 samic a 51 samců trichurů. Druh *T. discolor* byl zastoupen výhradně samicemi (700 jedinců). U druhu *T. ovis* se vyskytovaly samice (90) i samci (51). U všech studovaných druhů přeživkavců byla prevalence *T. discolor* zřetelně vyšší než prevalence *T. ovis*, a proto *T. discolor* představuje u spárkaté zvěře v České republice převládající druh rodu *Trichuris*. Nevyšší výskyt *T. discolor* byl u srnce obecného a daňka evropského v porovnání s jelenem evropským a jelenem sikou, což se shoduje s podobnými studiemi z Rakouska, Německa

a Belgie (Rehbein 2010; Bernard et al. 1988). Vysoká infikovanost *T. discolor* byla zřetelná i u muflona (P = 60%).

Trichuris ovis může být u spárkaté zvěře považovaný za minoritní druh, občas se vyskytující u srnce a daňka, ale úplně nebo téměř chybějící u jelenů. Naopak u muflonů zvěře a v chovech ovcí je druh *T. ovis* velmi hojný (P = 25%, respektive 81.6%), jak ukázala tato studie a předcházející práce č. 1.

Další druhy rodu *Trichuris*, popisované ve starší literatuře, u našich volně žijících přežvýkavců nebyly v této práci zjištěny. Je však potřebné konstatovat, že například druh *T. skrjabini* je v současnosti charakterizován i po molekulární stránce (Callejon et al. 2009). Jeho výskyt například u koz a dalších přežvýkavců, kteří nebyli součástí této studie, je v Čechách velmi pravděpodobný. Naopak *T. globulosa* je podle nejnovějších molekulárních analýz navrhována jako synonymum *T. ovis* (Callejon et al. 2015). Platnost druhu *T. capreoli* by bylo potřebné taxonomicky prověřit, jelikož morfologicky se *T. capreoli* značně přibližuje charakteristikám druhu *T. discolor*.

Pro zřidkavější výskyt trichurů u jelenů v porovnání se srncí zvěří, žijící ve stejných oblastech, není snadné vysvětlení. Určitou roli mohou hrát rozdíly v imunitním systému, ve fyziologii gastrointestinálního traktu a ve způsobu získávání potravy a jejím zpracování u jelenů a srnců. Existují práce, které poukazují na rozdíly v behaviorálních strategiích ovlivňujících regulaci gastrointestinálních nematodových infekcí u ovcí a koz (Hoste et al. 2010). Rozdíly v imunitní odpovědi a způsobu získávání potravy se vyvinuly v důsledku osobitých evolučních procesů. Podobné rozdíly v způsobu získávání potravy existují i mezi srnci a jeleny a různé potravní typy mohou vést k odlišným schémátům infikovanosti těchto zvířat nematody. Hofmann (1989) stanovil tři základní potravní typy evropských přežvýkavých kopytníků na základě anatomie a fyziologie jejich trávicího traktu. Srnec obecný a los evropský jsou zařazeni mezi okusovače. Jelen evropský, jelen sika, daněk evropský, kamzík horský a koza bezoárová jsou potravní oportunisté. Muflon evropský spolu s hospodářskými druhy jako je ovce a skot patří mezi spásače. Tyto tři typy se navzájem liší především rozdílnou schopností trávit buněčné stěny rostlin. Srnec, který patří mezi okusovače, se živí částmi rostlin, které jsou lehce stravitelné a bohaté na živiny, jako mladé listy, výhonky dřevin a byliny. Přijatá potrava prochází trávicím traktem rychle, proto má jeho

potravní cyklus v průběhu 24 hodin 11 až 12 pastevních period (Van Wieren 1995; Hofmann 1989). Okusovači však nejsou schopni dobře trávit potravu bohatou na vlákniny, jako je tráva. Jeleni a kozy patří mezi přizpůsobivé potravní oportunisty, kteří jsou schopni konzumovat jak lehce, tak i hůře stravitelné potravní složky a podle nabídky se mohou živit jako okusovači i jako spásači. Potravní oportunisté se velmi dobře přizpůsobují danému stanovišti (Homolka 1996). Jelení zvěř potřebuje 5 až 7 pastevních period za 24 hodin (Lochman et al. 1964). V období pastvy jsou kozy významně více infikovány než ovce, které patří mezi spásače (Le Jambre & Royal 1976; Jallow et al., 1994; Huntley et al., 1995; Pomroy et al. 1986). Několik studií dále ukázalo, že imunitní odpověď proti infekci hlístic je méně účinná u koz než u ovcí (Pomroy et al., 1986; Huntley et al., 1995; Vlassoff et al. 1999; Hoste et al., 2010). Je pravděpodobné, že podobné rozdíly existují u jelenů a srnců.

Nákaza hlísticemi rodu *Trichuris* byla zjištěná u všech věkových skupin zvěře, ale nejvíce postihovala mladé jedince do jednoho roku věku a tyto rozdíly byly signifikantní u všech zkoumaných druhů zvěře ($\chi^2 = 32.02$, $p = 0.00$). Vyšší prevalenci trichurů u mladých zvířat než u dospělých zaznamenali rovněž Rehbein (2010) a Body et al. (2011).

Navzdory dostupnosti mnoha nových diagnostických metod zůstává koprologie důležitou neinvazivní metodou pro studium parazitů. Spolehlivost této metody se liší u různých typů parazitů a hostitelů (Becker et al. 2016). Rieu et al. (2007) zjistili shodu mezi výsledky koprologických metod a pitvami při diagnostikování *Paramphistomum cervi* u skotu. Naproti tomu koprologická diagnóza různých druhů tasemnic jako je *Anoplocephala perfoliata* (Meana et al. 1998) nebo *Taenia saginata* (Hall et al. 1981) byla pozitivní pouze u 54% respektive 68% infikovaných hostitelů. Gasso et al. (2015) uvádějí falešně negativní koprologickou diagnostiku 24% u *Trichuris suis*, 28% u *Metastrongylus* spp. a 33% u *Ascaris suum*. V naší studii byla použita koncentrační technika McMaster (Roepstorff & Nansen 1998), která je podle porovnávací studie Vadlejch et al. (2011) vysoce citlivá. Souběžná koprologická a pitevní vyšetření 175 zvířat ukázala, že prevalence hlístic rodu *Trichuris* spp., zjišťovaná těmito přístupy, se významně lišila ve prospěch pitev ($\chi^2 = 16,26$, $p = 0,00$). Na základě těchto výsledků byl vytvořen teoretický lineární model závislosti a bylo zjištěno, že na zjištění jediného vajíčka flotační metodou je nutná přítomnost sedmi samic v jediném hostiteli, a dále že plné shody mezi pozitivními výsledky získanými koprologickou metodou

a pitvou bylo dosaženo, pokud počet samic hlístic rodu *Trichuris* v jednom hostiteli překročil 51 jedinců.

Publikace 3:

Cílem studie bylo morfologicky a molekulárně charakterizovat *Trichuris myocastoris* z nutrie říční z různých chovatelských farem v České republice a ověřit druhovou příslušnost a fylogenetickou pozici této hlístice v rámci druhu *Trichuris*.

Trichuris myocastoris je běžný parazit volně žijících i farmových nutrií (Zajíček 1955; Hohner 1961; Babero & Lee 1961; Pastuszko 1991; Rossin et al. 2009; Martino et al. 2012). Originálně byl tento druh popsán v Německu (Enigk 1933) a následně byla publikována morfologická charakteristika parazita z území Ruska (Petrov 1941). Podrobnou druhovou redeskripci publikoval Baruš et al. (1975) na základě nematodů z nutrií z Ázerbájdžánu.

Ve studii bylo celkem morfometricky charakterizováno 60 červů (30 samců a 30 samic) nalezených u nutrií za tří farem v České republice. Morfometrické údaje samců a samic odpovídají relevantnímu popisu *T. myocastoris* (Baruš et al. 1975). Hlavními diagnostickými charakteristikami *T. myocastoris* jsou délka a šířka těla a délka a šířka spikuly, což platí i pro jiné druhy tohoto rodu (Špakulová 1994). Délka těla hlístic v naší studii byla mírně větší v porovnání se studií Baruš et al. (1975), což může být způsobeno skutečností, že v této studii byli pitváni velcí jedinci hostitele z chovatelských programů. Celková délka těla samců byla v rozmezí od 21,4 do 49,4 mm, s délkou přední části těla 13,0 – 32,2 mm. Samice měly délku těla 33,9 – 61,6 mm a délku přední část 20,8 – 38,4 mm. U našich vzorků se délka spikuly pohybovala od 2,5 do 4,9 mm, zatímco ostatní práce uváděly spikulu o délce od 2,7 mm (Enigk 1933) do 3,9 mm (Petrov 1941).

V současné době je mnoho klasických druhů *Trichuris* definováno pouze morfologicky, avšak k popisu nových taxonů a k ověření platnosti existujících druhů se stále častěji využívají i molekulární metody umožňující i zjištění mezidruhových fylogenetických vztahů.

Tato studie představuje celkově první molekulární charakteristiky *T. myocastoris*. Z genomické DNA, izolované ze šesti jedinců *T. myocastoris*, byl amplifikovaný a sekvenovaný segment ribozomálního genu (rDNA) zahrnující vnitřní transkribované mezerníky ITS1 a ITS2 a dále 5,8S jednotku.

Zjištěné sekvence rDNA o 651 bázových párech byly uloženy v genové databázi GenBank pod kódy KM877518 až 23 a byly porovnány s údaji o těchto genech u sedmi jiných druhů rodu *Trichuris*, které jsou dostupné v GenBank. Po zpracování programem BLASTn se zjistilo, že *T. myocastoris* se signifikantně odlišuje jak od trichurů parazitujících u přežvýkavců (*T. skrjabini*, *T. ovis*, *T. discolor*), ale i od všech dosud analyzovaných hlístic hlodavců (*T. mastomysi*, *T. arvicolae*, *T. carlieri*, *T. muris*). Sekvence *T. myocastoris* jsou jedinečné a ve fylogenetickém stromu představují samostatnou linii.

Současné výsledky komplexní studie druhu *T. myocastoris* v České republice jasně ukázaly, že tento druh je specificky vázaný na svého hostitele – nutrii říční a naopak, že jiné místní druhy rodu *Trichuris*, cizopasíci u malých hlodavců v České republice (*T. muris* a *T. arvicolae*), s vysokou pravděpodobností nejsou schopné infikovat nutrie ani v případě sympatrického výskytu.

Nejnovější molekulární studie autorů Eberhart et al. (2019), zaměřená na trichury hlodavců Jižní Ameriky potvrdila, že *T. myocastoris* je specifickým parazitem nutrií i v původním areálu tohoto hostitele. V práci byly analyzovány morfologické charakteristiky a sekvence ITS1 a ITS2 druhu *Trichuris* sp. cizopasíciho u největšího hlodavce světa – kapybary *Hydrochoerus hydrochaeris* (L., 1766), u níž byl v minulosti jako parazit zmiňován *T. myocastoris*. V současnosti však byl na základě druhově specifických rozdílů u kapybary popsán nový druh hlístice, *Trichuris cutillasae* n. sp. Parazit nutrií *T. myocastoris* je jeho sesterským, nejbližše příbuzným druhem. V studii Eberhart et al. (2019) byly použity sekvence DNA, pocházející z této naší práce (Rylková et al. 2015) a uložené v GenBank.

Publikace 4:

Cílem této studie bylo zjištění výskytu *Trichuris myocastoris* a jiných parazitických hlístic u nutrií chovaných na farmách v České republice a posouzení možného rizika jejich šíření. Analyzovaný byl i výskyt protozoí u nutrií, protože získaný materiál trusu byl vzácný a komplexní informace o spektru parazitů jsou vědecky hodnotné. Dalším cílem bylo porovnat spektrum a míru výskytu parazitů u chovných nutrií a u populací nutrií sekundárně usídlených ve volné přírodě v Čechách.

Hlavním metodickým přístupem bylo v této studii vyšetření trusu nutrií chovaných na 11 farmách (200 vzorků) a nutrií volně žijících na 14 vzájemně geograficky vzdálených lokalitách (20 vzorků). V pěti farmových chovech byly koprologické analýzy doplněny helmintologickými pitvami celkem 20 zvířat a tímto způsobem byly dva ze tří koprologicky zjištěných rodů hlístic určeny do druhů. Konkrétně byl v gastrointestinálních traktech osmi nutrií přítomen druh *T. myocastoris* (prevalence $P = 40 \%$) a u pěti nutrií byl nalezen *Strongyloides myopotami* ($P = 25 \%$). Zástupce posledního rodu *Trichostrongylus* sp., jehož vajíčka byla nalezena v trusu nutrií, nebyl prokázán i při pitvách, přestože údaje o druhu *Trichostrongylus duretteae* u nutrií existují z Itálie (Zanzani et al. 2016).

Koprologickým vyšetřením bohatšího materiálu z dvojnásobného počtu farem (200 vzorků trusu nutrií z 11 farem) se zjistilo širší spektrum parazitických druhů, konkrétně tři výše uvedené taxony hlístic a dále čtyři druhy kokcií (*Eimeria seideli*, *Eimeria myopotami*, *Eimeria coypi* a *Eimeria nutriae*). Nejčastěji se vyskytovaly druhy *Trichuris* sp. ($P = 57,0 \%$), *E. coypi* ($P = 37,0 \%$), *E. seideli* ($P = 26,0 \%$) a částečně *E. nutriae* ($P = 23,0 \%$). Vajíčka *Trichuris* sp. byla přítomna u nutrií ze všech 11 farem s prevalencí $P = 57 \%$.

Trus divoce žijících nutrií (20 vzorků ze 14 přírodních lokalit) obsahoval vajíčka pouze dvou rodů hlístic (*Trichuris* a *Strongyloides*) a dvou druhů kokcií, které byly velmi časté: *E. coypi* s prevalencí $P = 60,0 \%$ a *E. nutriae* ($P = 45,0 \%$). Vajíčka hlístic *Strongyloides* sp. byla nalézána poměrně často ($P = 30,0 \%$), avšak vajíčka *Trichuris* sp. byly přítomné pouze v jediném vzorku. Hlístice rodu *Trichuris* byly tedy frekventnější u farmových nutrií. Naopak tři další společně detekované druhy parazitů, tj. hlístice rodu *Strongyloides* a kokcidie *E. coypi* a *E. nutriae* byly častější i nutrií ve volné přírodě než ve farmových chovech.

Informace o parazitech u nutrií z farmových chovů jsou vzácné. Je však patrné, že často se vyskytujícími parazity jsou u nich monoxenní kokcidie. Mertin et al. (2005) považují kokcidiózu za nejnebezpečnější parazitární nemoc u nutrií, která může působit značné ztráty u mladých jedinců. Scheuring (1990) našel u farmových nutrií v Polsku šest druhů kokcidií rodu *Eimeria*. Prevalence se pohybovala mezi 9 – 31,6 %, což jsou obdobné výsledky jako v naší studii. Scheuring (1990) dále v těchto chovech pitevně zjistil přítomnost hlístic *T. myocastoris* (P = 7,2 – 34,2 %), *S. myopotami* (P = 6,0 – 25,0 %) a ojediněle i *Trichostrongylus* sp. Naše studie odhalila vyšší infikovanost u *T. myocastoris* (40 % pitvy, 57 % koprologie) a podobnou míru infekce u posledně jmenované hlístice (25, 0 % pitvy, 11,5 % koprologie).

Podobně ojedinělé jsou i reference o výskytu gastrointestinálních parazitů u volně žijících nutrií v Evropě. Lewis & Ball (1984) našli u divokých nutrií v Anglii výhradně pět druhů kokcidií. Čtyři druhy kokcidií byly shodné s druhovým spektrem nalezeným u nás, pátý druh byl v Anglii popsán jako nový druh *Eimeria fluviatilis* Lewis et Ball, 1984. Novější studie z Itálie (Zanzani et al. 2016) uvádí na základě koprologií i pitevních vyšetření nutrií z přírody širší spektrum parazitů, které kromě *E. coypi* (86.3 %) a *E. seidelii* (6.8 %) zahrnovalo i hlístice *S. myopotami* (63.4 %) a *T. duretteae* (28.1 %). Zajímavé bylo zjištění protilátek proti *Toxoplasma gondii* a *Leptospira interrogans* a také bakterií *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Streptococcus* spp., takže práce připouští možnost, že volně žijící nutrie by mohly mít negativní medicínský potenciál. Mnohé práce referovaly o možné infekci nutrií i dalšími parazity, které by mohly být přeneseny na člověka, jako jsou motolice *Fasciola hepatica*, *Echinococcus granulosus*, *Echinococcus multilocularis*, larvy tasemnic rodu *Taenia* nebo hlístice *Capillaria hepatica* nebo kokcidie *Toxoplasma gondii* (Babero & Lee 1961; Gayo et al. 2011; Nordoni et al. 2011; Umhang et al. 2013; Zanzani et al. 2016). V podmínkách České republiky se však u nutrií zatím nepotvrdila přítomnost žádného ze závažných parazitů člověka ani hospodářských zvířat a proto nemusí být považovány za epidemiologicky významné. Další výzkum škály jejich parazitů je však žádoucí. Naše studie ukázala, že volně žijící nutrie jsou daleko méně parazitovány, než farmově chované nutrie. Zjištěné rozdíly byly natolik zřetelné, že rozdíl v počtu vyšetřených vzorků trusu divokých nutrií a zvířat z farmových chovů tento výsledek nemohl podstatně ovlivnit. U volně žijících nutrií je obtížné získat jejich trus, protože ho odkládají většinou do vody a jen občas ho lze nalézt

na místě pastvy nebo v blízkosti nor na náplavech, kde nutrie odpočívají. Užší spektrum parazitů u volně žijících nutrií je velmi pravděpodobně způsobeno jejich rozsáhlým areálem ve volném životním prostředí na březích řeky a tedy rozptýlením infekčních stádií parazitů. Naopak farmová zvířata jsou chována ve skupinách v relativně malých a izolovaných betonových nádržích, kde jediným zdrojem vody je napáječ vody. Tyto podmínky usnadňují šíření těch parazitů, kteří mají přímý vývojový cyklus a nevyžadují žádné mezihostitele.

6.2 Souhrn výsledků analýzy hlístic rodu *Trichuris* cizopasících u volně žijících přežvýkavců v České republice

6.2.1 Druhy rodu *Trichuris* zjištěné u vybraných přežvýkavců v České republice

Z devítiletého výzkumu hlístic rodu *Trichuris* cizopasících u přežvýkavců v České republice vyplynulo, že se na tomto území u zkoumaných hostitelů vyskytují pouze dva druhy rodu *Trichuris*, a to *T. discolor* a *T. ovis*. Převládajícím druhem u většiny spárkaté zvěře (srnec obecný, daněk evropský, jelen sika) byl *T. discolor*, zatímco u ovce domácí a muflona obecného byl hojnější *T. ovis*. Jelen evropský byl infikován pouze hlísticemi *T. discolor* a nálezy byly zřídka (infikovaní byli 2 mladí jeleni z 36). Nákaza hlísticemi rodu *Trichuris* byla zjištěná u všech věkových skupin zvěře, ale signifikantně více postihovala mladé jedince do jednoho roku věku.

6.2.2 Morfologická analýza

Morfologicky a biometricky vyhodnocované hlístice byly předběžně určeny do druhu na základě molekulárních markerů. Rozměry těla a dalších morfologických znaků samic *T. ovis* a *T. discolor* se signifikantně neodlišovaly a intervaly minimo-maximálních hodnot se ve všech případech překrývaly. Analýza klasického diagnostického znaku – tvaru vulvy u samic *T. ovis* a *T. discolor* ukázala značnou míru variability u obou druhů. Kromě morfotypu s výrazným vulvárním přívěškem typického pro *T. ovis* (MT1; 88,75%) se u tohoto druhu

nacházely juvenilní samice s malými přívěsky (MT3, MT4). Rovněž i u samic *T. discolor* byly nalezeny dva morfotypy. Typický byl tvar vulvy bez vyvýšeniny (MT2, 98,71 %), ale ojediněle byl přítomen i morfotyp s malou vyvýšeninou (MT3; 1,29 %). Spolehlivou determinaci všech jedinců tak poskytla až molekulární metoda.

6.2.3 Molekulární analýza

Genomická DNA byla izolována jednotlivě z 240 *Trichuris* spp. získaných z ovcí domácích a srnců obecných. Byl amplifikovaný a osekvenovaný ITS1-5,8S RNA-ITS2 segment genu pro ribozomální RNA. Informace o zjištěných sekvencích rDNA byly uloženy v GenBank a porovnáním s již známými sekvencemi byly všechny hlístice zařazeny do dvou druhů trichurů, *T. ovis* a *T. discolor*. Úseky ITS1, obsahující inzerce/delece specifické pro oba druhy, byly využity pro design PCR markerů INDEL1 a INDEL2, které sloužili pro druhovou diferenciaci dalších 841 hlístic.

6.2.4 Fylogenetické vztahy

Fylogenetický strom konstruovaný na základě našich sekvencí a informací o rDNA z GenBank ukázal, že *T. discolor* z České republiky, Španělska a Japonska tvoří poměrně homogenní linii, která se výrazně odlišuje od *T. discolor* z Iránu, který by snad mohl být v budoucnosti považovaný za odlišný druh. Značné rozdíly byly detekovány i v rámci druhu *T. ovis*, kdy většinová evropská populace zahrnovala Českou republiku a Irsko a značně odlišné haplotypy byly nalezeny u hlístic *T. ovis* z dobytka ve Španělsku.

6.2.5 Praktické aspekty diagnostických metodik

Na základě souběžných vyšetření hostitelských zvířat koprologickými metodami i helmintologickými pitvami střev bylo zjištěno, že prevalence *Trichuris* spp. zjištěná u všech hostitelských druhů (infikovaní/neinfikovaní hostitelé: 17/159) byla při aplikaci koprologické metody výrazně nižší ($\chi^2 = 16,26$, $p = 0,00$) v porovnání s prevalencí hlístic

(infikovaní/neinfikovaní hostitelé: 46/130), která byla zjištěná pitvou střev. Všechna zvířata vyšetřená helmintologickou pitvou, u kterých nebyl nalezen *T. discolor* ani *T. ovis*, byla také koprologicky negativní na hlístice rodu *Trichuris*. Všichni hostitelé byli koprologicky pozitivní až v případě, kdy počet samic rodu *Trichuris* byl vyšší než 51 u jednoho hostitele.

6.3 Souhrn výsledků analýzy hlístic rodu *Trichuris* cizopasících u farmových a volně žijících nutrií v České republice

6.3.1 Druhy rodu *Trichuris* zjištěné u nutrií v České republice

Kombinovaný morfologický a molekulární výzkum farmových i volně žijících nutrií na celém území České republiky dokázal, že se u těchto introdukovaných živočichů vyskytuje jediný druh rodu *Trichuris*, konkrétně *T. myocastoris*. Tento druh je na nutrie striktně vázaný a v současnosti se nalézá jak v původním areálu nutrie, v jižní Americe, tak i v jiných světadílech kam byl introdukován spolu s hostitelskými nutriemi.

6.3.2 Morfologická analýza

Druh *T. myocastoris* byl v této práci morfologicky redeskribovaný a údaje o variabilitě znaků byly porovnány s literárními daty. Morfologická variabilita druhových znaků byla vázaná pouze na větší velikost hostitelských zvířat z farmových chovů, ale neovlivňovala druhové diferenciační znaky. Těmi jsou u samců spikula dlouhá 3 – 4,5 mm a charakteristický tvar spikulární pochvy s ostnatým povrchem. U samic vulva nevyčnívající nad povrch těla.

6.3.3 Molekulární analýza

Genomická DNA byla izolována z 30 samic a 30 samců *T. myocastoris*. Byla získána originální informace o 651 bázových párech úseku ribozomálního genu ITS1-5,8S RNA-ITS2 (rDNA), který zahrnuje vnitřní transkribované mezerníky a 5,8S jednotku. Naše údaje uložené v genové bance už byly použity pro fylogenetickou studii autorů Eberhardt et al. (2019).

6.3.4 Fylogenetické vztahy

Naše údaje o sekvencích ribozomálního genu byly porovnány s relevantními charakteristikami sedmi dalších druhů rodu *Trichuris*, které jsou uvedeny v genové bance. Zjistilo se, že *T. myocastoris* představuje samostatnou linii, vzdálenou jak od skupiny druhů rodu *Trichuris*, které cizopasí u myšovitých hlodavců (*T. arvicolae*, *T. carlieri*, *T. mastomysi* a *T. muris*), tak i od hlístic z přežvýkavců (*T. discolor*, *T. ovis* a *T. skrjabini*).

6.3.5 Praktické aspekty diagnostických metodik

Porovnáním druhového spektra parazitů u nutrií žijících v podmínkách farmových chovů a ve volné přírodě se zjistilo, že volně žijící nutrie jsou daleko méně parazitovány, než farmově chované nutrie. Tento fakt se týká jak střevních nematodů, tak i kokcií, které byly vyšetřeny souběžně se střevními hlísticemi. V podmínkách České republiky se u nutrií prozatím nepotvrdila přítomnost žádného ze závažných parazitů člověka ani hospodářských zvířat.

7. Závěr

Byla potvrzena hypotéza, že tradiční taxonomie hlístic rodu *Trichuris*, založená pouze na morfologických znacích, neposkytuje dostatečné diferenciační znaky pro odlišení jednotlivých druhů těchto hlístic parazitujících u volně žijících přežvýkavců v České republice. Je tedy nezbytné k jejich druhovému určení použít kombinaci morfologických a molekulárních analýz. U nutrií v České republice byl morfologicky i molekulárně potvrzen jediný druh *Trichuris myocastoris*, který je specifickým parazitem nutrie říční.

V České republice byly u zkoumaných druhů volně žijících přežvýkavců potvrzeny pouze dva druhy rodu *Trichuris*, a to *T. ovis* a *T. discolor*. Oba druhy byly podrobně biometricky redeskribovány a charakterizovány i molekulárně. Ověření možné existence dalších druhů rodu *Trichuris* u přežvýkavců v České republice by mělo být předmětem dalšího studia širšího spektra hostitelských zvířat.

Dlouhodobé morfologicko-molekulární studium hlístic rodu *Trichuris* u spárkaté zvěře naznačilo další možný směr výzkumu hojně se vyskytujícího druhu *Trichuris discolor*, u něhož byly v horizontu devíti let nalezeny pouze samice. Tento fakt může mít dvě příčiny, a to extrémně nízkou životaschopnost samců, nebo přechod celé populace na nepohlavní rozmnožování. Další výzkum by proto mohl přinést překvapivé výsledky.

V podmínkách České republiky se u nutrií zatím nepotvrdila přítomnost žádného ze závažných parazitů člověka ani hospodářských zvířat, a proto nemusí být považovány za epidemiologicky významné. Další výzkum škály jejich parazitů je však žádoucí.

8. Seznam použité literatury

- Allen RW. 1955. Parasites of mountain sheep in New Mexico, with new host records. *The Journal of Parasitology* **41**:583-587.
- Anděra M. 2011. Current distributional status of rodents in the Czech Republic (Rodentia). *Lynx, n. s. Praha* **42**:5-82.
- Anděra M, Červený J. 2007. Nutrie – z farem do přírody. *Živa* **55**: 182-184.
- Andrews JS. 1969. Experimental trichostrongylosis in sheep and goats. *Journal of Agricultural Research* **58**:761-770.
- Aysha A, Khan AR. 2008. Prevalence of endohelminth parasites in sheep of Doda district of Jammu and Kashmir state. *Proceedings of 2nd JK Science Congress, University of Kashmir, Srinagar, India.*
- Babero BB, Lee JW. 1961. Studies on the helminths of nutria *Myocastor coypus* (Molina), in Louisiana with check-list of other worm parasites from this host. *The Journal of Parasitology* **47**:378-390.
- Baer JG. 1950. Etude critique des helminthes parasites de l'Okapi. *Acta Tropica* **7**:164-186.
- Balicka-Ramisz A, Cisek A, Ramisz A, Pilarczyk B. 2003. Investigation of the lung, stomach and intestine helminth infections of roe deer in North-West Poland. *Tierärztliche Umschau* **58**:489-491.
- Barth D, Schaich K. 1971. Zur Wirksamkeit von thibenzole beim Magen-Darmwurmbefall des Rehwildes. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* **17**:240-243.
- Baruš V, Majumdar G, Mikailov TK. 1975. Morphology and taxonomy of *Trichocephalus myocastoris* (Enigk, 1933). *Folia Parasitologica* **22**:207-213.
- Baruš V, Kotrlá B, Tenora F. 1978. Scanning elektronmicroscopic study of the vulva of some trichurids (Nematoda). *Folia Parasitologica*. **25**:31-34.
- Baskakov VP. 1924. The fauna of parasitic worms in Turkestan camels. *Trudy Gosudarstvennogo Instituta Eksperimentalnoi Veterinarii* **2**:92-105.
- Becker AC, Kraemer A, Epe C, Strube C. 2016. Sensitivity and efficiency of selected coproscopical methods-sedimentation, combined zinc sulphate sedimentation-flotation, and McMaster method. *Parasitol Research* **115**: 2581-2587.
- Bernard J, Biesemans W, Mathy P. 1988. Nematodes parasites gastrointestinaux des Ongules gibier dans les Ardennes belges. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* **130**:77-103.

- Blaxter M, Koutsovoulos G. 2015. The evolution of parasitism in Nematoda. *Parasitology* **142**:26-39.
- Body G, Ferte H, Gaillard JM, 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.
- Bolukbas CS, Gurler AT, Beyhan YE, Acici M, Umur S. 2012. Helminths of roe deer (*Capreolus capreolus*) in the Middle Black Sea Region of Turkey. *Parasitology International* **61**:719-730.
- Borgsteede FHM, Jansen J, van Nispen tot Pannerden HPM, van der Burg WPJ, Noorman N, Poutsma J, Kotter JF. 1990. An investigation of the endoparasitic helminth fauna of roe deer (*Capreolus capreolus* L.) in the Netherlands. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* **36**:104-109.
- Bütner K. 1978. Untersuchungen zur Parasitierung des Rehwildes bei steigendem Jagddruck. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* **24**:139-155.
- Callejón R, de Rojas M, Ariza C, Ubeda JM, Guevara DC, Cutillas C. 2009. Cytochrome oxidase subunit 1 and mitochondrial 16S rDNA sequences of *Trichuris skrjabini* (Tricocephalida: Trichuridae). *Parasitology Research* **104**:715-716.
- Callejón R, Halajian A, de Rojas M, Marrugal A, Guevara D, Cutillas C. 2012. 16S partial gene mitochondrial DNA and internal transcribed spacers ribosomal DNA as differential markers of *Trichuris discolor* populations. *Veterinary Parasitology* **186**:350-363.
- Callejón R, Gutiérrez-Avilés L, Halajian A, Zurita A, de Rojas M, Cutillas C. 2015. Taxonomy and phylogeny of *Trichuris globulosa* Von Linstow, 1901 from camels. A review of *Trichuris* species parasitizing herbivorous. *Infection, Genetics and Evolution* **34**:61-74.
- Carter J, Leonard BP. 2002. A review of the literature on the worldwide distribution, spread of, and efforts to eradicate the coypu (*Myocastor coypus*). *Wildlife Society Bulletin* **30**: 162-175.
- Cisek A, Balicka-Ramisz A, Ramisz A, Pilarczyk B. 2003. Occurrence of gastro-intestinal nematodes in cervids (Cervidae) of north-western Poland. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Series Animal Husbandry* 6 DOI: <http://www.ejpau.media.pl>

- Cutillas C, German P, Arias P, Guevara D. 1995. *Trichuris ovis* and *Trichuris globulosa*: Morphological, biometrical, and genetic studies. *Experimental Parasitology* **81**:621-625.
- Cutillas C, German P, Arias P, Guevara D. 1996. Characterization of *Trichuris skrjabini* by isoenzyme gel electrophoresis: comparative study with *Trichuris ovis*. *Acta Tropica* **62**: 63-69.
- Cutillas C, Callejón R, de Rojas M, Tewes B, Ubeda JM, Ariza C, Guevara DC. 2009. *Trichuris suis* and *Trichuris trichiura* are different nematode species. *Acta Tropica* **111**:299-307.
- Čermák P, Mrkva R. 2003. Browsing damage to broadleaves in some national nature reserves (Czech Republic) in 2000-2001. *Ekologia Bratislava* **22**:394-403.
- De Ley P, Blaxter M. 2002. Systematic Position and Phylogeny. Pages 1-30 in Lee D, editor. *The Biology of Nematodes*. Taylor & Francis, New York.
- De Ley P, Blaxter M. 2004. A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. *Nematology Monographs and Perspectives* **2**:633-653.
- Dell Inc. (2015) Dell Statistica (data analysis software system), version 13. software.dell.com
- Dobrovol'skii AV. 1952. Parazitarnye zabolevaniya u ondatry (*Ondatra zibethica* L.). *Zoologicheskii Zhurnal* **31**:640-642.
- Dollinger P. 1973. Beitrag zur Kenntnis der Magen-Darm-Parasitenfauna des Rehwildes der Nordostschweiz. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* **19**:14-25.
- Drózd J. 1966. Studies on helminths and helminthiasis in Cervidae. II. The helminth fauna in Cervidae in Poland. *Acta Parasitologica Polonica* **14**:1-13.
- Dyk V, Chroust T. 1974. Helminths and Coccidia of roe deer in two neighbouring ecologically different regions. *Acta veterinaria Brno* **43**:65-77.
- Eberhardt AT, Robles MDR, Monje LD, Beldomenico PM, Callejón R. 2019. A new *Trichuris* species (Nematoda: Trichuridae) from capybaras: Morphological-molecular characterization and phylogenetic relationships. *Acta Tropica* **190**:244-252.
- Ecker J, Kutzer E, Rommel M, Bürger HJ, Körting W. 1992. *Veterinärmedizinische Parasitologie*. Parey, Berlin.
- Enigk K. 1933. Einige Nematoden aus der Nutria. *Parasitology Research* **6**:326-331.

- Erhardová B, Kotrlý A, Páv J, Ryšavý B. 1953. Choroby lovné zvěře. Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Erhardová B, Kotrlý A. 1955. Cizopasní červi zažívacího ústrojí našich volně žijících přežvýkavců. Československá parazitologie **2**:41-68.
- Feliu C, Špakulov M, Casanova JC, Renaud F, Morand S, Hugot JP, Santalla F, Durand P. 2000. Genetic and morphological heterogeneity in small rodent whipworms in southwestern Europe: characterization of *Trichuris muris* and description of *Trichuris arvicolae* n. sp (Nematoda: Trichuridae). Journal of Parasitology **86**: 442-449.
- Gagarin VG. 1972. Analysis of the species structure of trichocephalids of ruminants, registered in the Soviet Union. Trudy Vsesoiuznogo Instituta Gelmintologii imeni Kl. Skrjabina **19**:39-57.
- Galuppi R, Aureli S, Bonoli S, Caffara M, Tampieri MP. 2011. Detection and molecular characterization of *Theileria* sp. in fallow deer (*Dama dama*) and ticks from an Italian natural preserve. Research in Veterinary Science **91**:110-115.
- Gassó D, Feliu C, Ferrer D, Mentaberre G, Casas-Díaz E, Velarde R, Fernández-Aguilar X, Colom-Cadena A, Navarro-Gonzalez N, López-Olvera JR, Lavín S, Fenández-Llario P, Segalés J, Serrano E. 2015. Uses and limitations of faecal egg count for assessing worm burden in wild boars. Veterinary Parasitology **209**:133-137.
- Gasser RB, Stewart LE, Spaere R. 1996. Genetic markers in ribosomal DNA for hookworm identification. Acta Tropica **62**:15–21.
- Gayo V, Cuervo P, Rosadilla D, Birriel S, Dell’Oca L, Trelles A, Cuore U, Sierra RM. 2011. Natural *Fasciola hepatica* infection in nutria (*Myocastor coypus*) in Uruguay. Journal of Zoo and Wildlife Medicine **42**:354-356.
- Guichón ML, Borgnia M, Fernández Righi C, Cassini GH, Cassini MH. 2003. Social behavior and group formation in the coypu (*Myocastor coypus*) in the Argentinean Pampas. Journal of Mammalogy **84**: 254-262.
- Hall A, Latham MC, Crompton DWT, Stephenson LS 1981. *Taenia saginata* (Cestoda) in western Kenya: the reliability of faecal examinations in diagnosis. Parasitology **83**: 91-101.
- Hanzal V. 2000. O zvěři a myslivosti. 2. vydání. Dona, České Budějovice.

- Haupt W, Danner G. 1980. Zur Parasitenfauna des Magen-Darm-Kanals und der Atmungsorgane beim Muffelwid (*Ovis ammon musimon* Pallas, 1811) in der DDR. Beiträge zur Jagd- und Wildforschung **11**:212-217.
- Haupt W, Stubbe I. 1973. Untersuchungen zur Parasitierung der Rehwildpopulation im Wildforschungsgebiet Hakel unter besonderer Berücksichtigung von Alter, Geschlecht und Gewicht. Beiträge zur Jagd- und Wildforschung **8**:171-185.
- Hofmann RR. 1989. Evolutionary steps of ecophysiological adaptation and diversification of ruminants: a comparative view of their digestive system***. Oecologia **78**:443-457.
- Hohner L. 1961. Die Endoparasiten des Sumpfbibbers unter besonderer Berücksichtigung der Kokzidien. Zoologischen Institut und Veterinär-Parasitologischen Institut der Karl-Marx Universität Leipzig. 98-151.
- Homolka M. 1996. Foraging strategy of large herbivores in forest habitats. Folia Zoologica **45**:127-136.
- Horák P, Scholz T. 1998. Biologie helmintů. Karolinum, Praha.
- Hoste H, Sotiraki S, Landau SY, Jackson F, Beveridge I. 2010. Goat – nematode interactions: think differently. Trends in Parasitology **26**:376-381.
- Chandler AC. 1930. Specific characters in the genus *Trichuris* with a description of the new species *Trichuris tenuis* from a camel. The Journal of Parasitology **16**:198-206.
- Itagaki T, Ohtori M, Aki M, Ichinomiya M. 2007. Molecular phylogenetic analysis of gastrointestinal helminth from Japanese serow (*Capricornis crispus*) in North region. National Center for Biotechnology Information, Bethesda <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AB367795>. Accessed 23 November 2016.
- Jallow OA, McGregor BA, Anderson N, Holmes JH. 1994. Intake of trichostrongylid larvae by goats and sheep grazing together. Australian Veterinary Journal **71**:361-364.
- Jansen J. 1992. On the nematode parasite fauna of Friesian roe deer (*Capreolus capreolus*). Pages 301-307 in Hernandez S, editor. "In Memoriam" al Profesor Dr. Francisco de Paula Martinez Gomez. Servicio de Comunicaciones de la Universidad de Cordoba, Cordoba, Spain.
- Jíra J. 1998. Lékařská helmintologie: Helminthoparazitární nemoci. Galén, Praha.

- Kamler J, Homolka M, Barančková M, Krojerová-Prokešová J. 2010. Reduction of herbivore density as a tool for reduction of herbivore browsing on palatable tree species. *European Journal of Forest Research* **129**:155-162.
- Kaur H, Duggal C. 2007. Studies on the male and female copulatory apparatus of *Trichuris globulosa* (Nematoda, Trichuridae). *Helminthologia* **44**:151-156.
- Klimeš J. 2009. Svět červů pohledem zoologa aneb nadešel soumrak linnéovské taxonomie? *Folia Gastroenterol Hepatol* **7**:3-4.
- Knight RA. 1971. Redescriptions of *Trichuris discolor* (Von Linstow, 1906) and *T. skrjabini* (Baskakov, 1924) from domestic ruminants in the United States and comparisons with *T. ovis* (Abildgaard, 1795). *The Journal of Parasitology* **57**:302-310.
- Knight RA. 1984. Morphological differences in *Trichuris ovis* associated with different host species. *The Journal of Parasitology* **70**:842-843.
- Kotrlá B, Kotrlý A. 1977. Helminths of wild ruminants introduced into Czechoslovakia. *Folia Parasitologica* **24**:35-40.
- Kotrlá B, Černý V, Kotrlý A, Minář J, Ryšavý B, Šebek Z. 1984. Parazitózy zvěře. Academia, Praha.
- Kotrlý A, Kotrlá B. 1972. Helminthofauna spárkaté zvěře v ČSSR. *Folia venatoria* **2**:141-158.
- Kotrlý A, Krul J. 1961. Nález podkožních vlasovců u čeledi Cervidae v ČSSR a změny, které svou lokalizací vyvolávají. *Veterinární medicína* **6**:315-322.
- Kotrlý A, Tarczynski S. 1958. Filariinae Stiles, 1907 in the subcutaneous tissue of deer *Cervus elaphus* L. in Poland and Czechoslovakia and its taxonomical position. *Wiadomosci parazytologiczne* **4**:721-722.
- Koždoň O. 1975. Srovnávací výzkum helmintofauny spárkaté zvěře a pasených domácích přežvýkavců v oblasti Doupovských hor. Dizertační práce. Univerzita Karlova. Přírodovědecká fakulta, Praha.
- Kuchai JA, Ahmad F, Chishti MZ, Dar JA, Tak H. 2013. On morphology and morphometry of *Trichuris ovis* Abildgaard, 1795 recovered from ruminants of Ladakh, India. *Journal of Buffalo Science* **2**:49-52.
- Kutzer E, Knaus E. 1969. Untersuchungen über die Endoparasitenfauna eines Rehbestandes in der freien Wildbahn. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* **15**:62-72.

- Kutzer E, Sugár L, Buchacher-Tonitz S. 1987. Beiträge zur Parasitenfauna der wildlebenden Wiederkäuer Ungarns. I. Zur Parasitenfauna von Rehkitzten und Jungrehen (*Capreolus c. capreolus*). Parasitologia Hungarica **20**:81-90.
- Kutzer E, Sugár L, Buchacher-Tonitz S. 1988. Beiträge zur Parasitenfauna der wildlebenden Wiederkäuer Ungarns. II. Aufbauentwicklung des Parasitenbefalles bei Rehen (*Capreolus c. capreolus*). Parasitologia Hungarica **21**:85-97.
- Kuzmina T, Kharchenko VA, Malega AM. 2010. Helminth fauna of roe deer (*Capreolus capreolus*) in Ukraine: Biodiversity and parasite community. Vestnik zoologii **44**:5-22.
- Lanfredi RM, Souza WD, Gomes DC. 1995. Comparative study of four species of *Trichuris* Roederer, 1761 (Nematoda, Trichurinae) by scanning electron microscopy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **90**:489-496.
- Lewis DC, Ball SJ. 1984. *Eimeria fluviatilis* n. sp. and other species of *Eimeria* in wild coypus in England. Systematic Parasitology **6**: 191-198.
- Liu GH, Wang Y, Xu MJ, Zhou DH, Ye YG, Li JY, Song HQ, Lin RQ, Zhu XQ. 2012. Characterization of the complete mitochondrial genomes of two whipworms *Trichuris ovis* and *Trichuris discolor* (Nematoda: Trichuridae). Infection, Genetics and Evolution **12**:1635-1641.
- Lochmann J, Tvrđíková A, Melicharová A. 1964. Spotřeba živin u jelení zvěře (*Cervus elaphus*). Lesnický časopis **10**:495-522.
- Macháček Z, Dvořák S, Ježek M, Zahradník D. 2014. Impact of interspecific relations between native red deer (*Cervus elaphus*) and introduced sika deer (*Cervus nippon*) on their rutting season in the Doupovské hory Mts. Journal of Forest Science **60**:272-280.
- Magomedbekov UA. 1956. Razvitie nematody *Trichocephalus skrjabini* (Baskakov,1924). Trudy Instituta Zhivotnovodstva Dagestanskii Filial. Akademia nauk SSSR **3**:65-76.
- Martino PE, Radman N, Parrado E, Bautista E, Cisterna C, Silvestrini MP, Corba S. 2012. Note on the occurrence of parasites of the wild nutria (*Myocastor coypus*, Molina, 1782). Helminthologia **49**:164-168.
- Meana A, Luzon M, Corchero J, Gómez-Bautista M. 1998. Reliability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection. Veterinary Parasitology **74**: 79-83.
- Melhorn H. 2016. *Trichuris* Species: Hosts. In: Mehlhorn H. (eds) Encyclopedia of Parasitology. Springer, Berlin, Heidelberg

- Mertin D, Banak M, Barta M, Hanusova E, Hanusova J, Kaplan J, Parkanyi V, Suvegova K. 2005. Biological aspects of breeding of river coypus (*Myocastor coypus*). Research Institute for Animal Production. Nitra. Slovensko
- Nickel S, Hiepe T, Ness H, Pingel H. 1978. Beiträge zur Parasitenfauna der DDR 2. Mitteilung. Untersuchungen zum Helminthenvorkommen beim Reh (*Capreolus capreolus*). Angewandte Parasitologie **19**:194-202.
- Noda R. 1955. *Trichuris* species from giraffe and cattle. Bulletin of University of Osaka Prefecture **5**:119-127.
- Nordoni S, Angelici MC, Mugnaini L, Mancianti F. 2011. Prevalence of *Toxoplasma gondii* infection in *Myocastor coypus* in a protected Italian wetland. Parasites and Vectors **4**:240
- Oliveros R, Cutillas C. 2003. Redescrición de *Trichuris ovis* (Nematoda) (Abildgaard, 1795) parásito de *Ovis aries* (Linné, 1758) y *Capra hircus* (Linné, 1758). Revista Ibérica de Parasitología **63**:77-83.
- Osakwe IR. 1970. Morphometry of geohelminthic roe-deer intestine nematodes in two southern Moravian enclosures. Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemicae, Brno **4**:1-45.
- Pastuszko J. 1991. The examination of intestinal parasitofauna in coypu (*Myocastor coypus*, Molina 1782) from closed husbandries with particular regard to coccidia. Akademii Rolniczej we Wrocławiu.
- Pato FJ, Vázquez L, Díez-Baños N, López C, Sánchez-Andrade R, Fernández G, Díez-Banos P, Panadero R, Díaz P, Morrodo 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.
- Petrov AM. 1941. Glistnye bolezni pushnykh zverey. Mosqow.
- Pilarczyk B, Balicka-Ramisz A, Ramisz A, Lachowska S. 2005. Występowanie pasożytów przewodu pokarmowego u saren i jeleni na terenie województwa zachodniopomorskiego. Wiadomości Parazytologiczne **51**:307-310.
- Pomroy WE, Lambert MG, Betteridge K. 1986. Comparison of faecal strongylate egg counts of goats and sheep on the same pasture. New Zealand Veterinary Journal **34**:36-37.
- Popova TI. 1954. Osnovy nematodologii, Tom 5. Strongiloidei zhivotnykh i cheloveka. Academy of Sciences of the USSR, Moscow.

- Rehbein S, Lutz W, Visser M, Winter R. 2000. Beiträge zur Kenntnis der Parasitenfauna des Wildes in Nordrhein-Westfalen. 1. Der Endoparasitenbefall des Rehwildes. Zeitschrift für Jagdwissenschaft **46**:248-269.
- Rehbein S, Lutz W, Visser M, Winter R. 2001. Beiträge zur Kenntnis der Parasitenfauna des Wildes in Nordrhein-Westfalen. 2. Der Endoparasitenbefall des Damwildes. Zeitschrift für Jagdwissenschaft **47**:1-16.
- Rehbein S, Lutz W, Visser M, Winter R. 2002. Beiträge zur Kenntnis der Parasitenfauna des Wildes in Nordrhein-Westfalen. 3. Der Endoparasitenbefall des Rotwildes. Zeitschrift für Jagdwissenschaft **48**:69-93.
- Rehbein S, Visser M. 2007 Die Endoparasiten des Sikawildes (*Cervus nippon*) in Österreich. Wiener Klinische Wochenschrift **119**:96-101.
- Rehbein S. 2010. Die Endoparasiten des Sikawildes in Deutschland und Österreich. Dissertation. Paris Lodron-Universität Salzburg. Naturwissenschaftlichen Fakultät. Salzburg.
- Rehbein S, Visser M, Jekel I, Silaghi C. 2014. Endoparasites of the fallow deer (*Dama dama*) of the Antheringer Au in Salzburg, Austria. Wiener Klinische Wochenschrift **126**:37-41.
- Rieu E, Recca A, Bénet JJ, Saana M, Dorchies P, Guillot J. 2007. Reliability of coprological diagnosis of Paramphistomum sp. infection in cows. Veterinary Parasitology **146**:249-253.
- Robles MR. 2011. New species of *Trichuris* (Nematoda:Trichuridae) from *Akodon montensis*, Thomas, 1913, of the Paranaense Forest in Argentina. The Journal of Parasitology **97**: 319-327.
- Robles MD, Cutillas C, Panei CJ, Callejón R. 2014. Morphological and molecular characterization of a new *Trichuris* species (Nematoda-Trichuridae), and phylogenetic relationships of *Trichuris* species of cricetid rodents from Argentina. PLoS One **11**:1-11.
- Roepstorff, A., Nansen, P. 1998. Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine. FAO Animal Health Manual. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Rommel M, Eckert J, Kutzer E, Körting W, Schneider T. 2000. Veterinärmedizinische Parasitologie. Verlag Paul Parey Berlin und Hamburg, Berlin.

- Rossin MA, Varela G, Timi JT. 2009. *Strongyloides myopotami* in ctenomyid rodents: transition from semi-aquatic to subterranean life cycle. *Acta Parasitologica* **54**: 257-262.
- Rylková K, Tůmová E, Brožová A, Jankovská I, Vadlejch J, Čadková Z, Frýdlová J, Peřínková P, Langrová I, Chodová D, Nechybová S, Scháňková Š. 2015. Genetic and morphological characterization of *Trichuris myocastoris* found in *Myocastor coypus* in the Czech Republic. *Parasitology Research* **114**:3969-3975.
- Salaba O, Rylková K, Vadlejch J, Petrtýl M, Scháňková Š, Brožová A, Jankovská I, Jebavý L, Langrová I. 2013. The first determination of *Trichuris* sp. from roe deer by amplification and sequenation of the ITS1-5.8S-ITS2 segment of ribosomal DNA. *Parasitology Research* **112**:955-960.
- Sarwar MM. 1959. Reconstruction of the genus *Trichuris* and a short review of its taxonomy and morphology. *Biologia (Lahore)* **5**:19-35.
- Shimalov VV, Shimalov VT. 2003. Helminth fauna of cervids in Belorussian Polesie. *Parasitology Research* **89**:75-76.
- Scheuring W. 1990. Examination of intestinal parasitofauna in coypu (*Myocaster coypus*, Molina 1782) from closed husbandries with particular regard to coccidia. Edited by Akademii Rolniczej, Wroclaw, Polska DOI: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=PL9100074>
- Schwarz L, Frena M, Skalicky M, Prosl H. 2011. Endoparasitenbefall von Rehen in einem Revier in Niederösterreich. *Die Wiener Tierärztliche Monatsschrift* **98**:285-291.
- Skrjabin KI, Shikhobalova NP, Orlov IV. 1957. Trichocephalidae and Capillariidae of animals and man and the diseases caused by them (Trikhotssefalidy i kapillyariidy zhivotnykh i cheloveka i vzyvaemye imi zabolvaniya). Academy of Sciences of the USSR, Moscow.
- Soulsby E.J.L. 1982. Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals. Baillière Tindall, London.
- Spellmeyer O. 1996. Untersuchungen zur Helminthenfauna von Reh- und Schwarzwild aus Norddeutschland. Dissertation. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.
- Špakulová M. 1994. Discriminant analysis as a method for the numerical evaluation of taxonomic characters in male trichurid nematodes. *Systematic Parasitology* **29**:113-119.

- Tenora F, Ooi HK, Stanek M, Kamiya M. 1992. Some novel features of male posterior end of *Trichuris discolor* as revealed by scanning electron microscopy. Japanese Journal of Parasitology **41**:487-491.
- Tománek J. 1967. Příspěvek k poznání helmintofauny srnčí zvěře severomoravského kraje. Veterinární Medicína (Praha) **12**:739-744.
- Umhang G, Lahoreau J, Nicolier A, Boue F. 2013. *Echinococcus multilocularis* infection of a ring-tailed lemur (*Lemur catta*) and nutria (*Myocastor coypus*) in a French zoo. Parasitology International **62**:561-563.
- Vadlejch J, Petrtýl M, Zaichenko I, Čadková Z, Jankovská I, Langrová I, Moravec M. 2011. Which McMaster egg counting technique is the most reliable? Parasitology Research **109**:1387-1394.
- Van Megen H, van den Elsen S, Holterman M, Karssen G, Mooyman P, Bongers T, Holovachov O, Bakker J, Helder J. 2009. A phylogenetic tree of nematodes based on about 1200 full-length small subunit ribosomal DNA sequences. Nematology **11**:927-950.
- Van Wieren SE. 1995. The potential role of large herbivores in nature conservation and extensive land use in Europe. Biological Journal of the Linnean Society **56**:11-23.
- Vetýška V. 1980. Endoparasites of roe deer in the Strakonice Region. Acta Veterinaria Brno **49**:91-103.
- Volf P, Horák P, Čepička I, Flegr J, Lukeš J, Mikeš L, Svobodová M, Vávra J 2007. Paraziti a jejich biologie. Triton, Praha.
- Woods CA, Contreras L, Willner-Chapman G, Whidden HP. 1992. *Myocastor coypus*. Mammalian Species **398**:1-8.
- Zajac AM, Conboy GA. 2006. Veterinary clinical parasitology. Seventh Edition. Blackwell Publishing Ltd., Oxford.
- Zajíček D. 1955. Parazitární invaze u mladých nutrií. Sborník Vysoké školy zemědělské a lesnické v Brně, řada B, Spisy fakulty veterinární 3-4:95-104.
- Zanzani SA, Di Cerbo A, Gazzonis AL, Epis S, Invernizzi A, Tagliabue S, Manfredi MT. 2016. Parasitic and bacterial infections of *Myocastor coypus* in a metropolitan area of northwestern Italy. Journal of Wildlife Diseases **52**: 126-130.
- Zhu X, Gasser RB, Jacobs DE, Hung GC, Chilton NB. 2000. Relationships among some ascaridoid nematodes based on ribosomal DNA sequence data. Parasitol Reseach **86**:738-744.

Zrzavý J. 2015. Fylogeneze živočichů: ohlédnutí roku 2015. Živa **63**:201-203.

9. Seznam obrázků

Obrázky 1 – 12 slouží pro ilustraci tvaru druhových charakteristik hlístic rodu *Trichuris*.

1. Samec hlístice *Trichuris ovis*
2. Samice hlístice *Trichuris ovis*
3. Samec hlístice *Trichuris discolor*
4. Samice hlístice *Trichuris discolor*
5. Samec hlístice *Trichuris skrjabini*
6. Samice hlístice *Trichuris skrjabini*
7. Samec hlístice *Trichuris globulosa*
8. Samice hlístice *Trichuris globulosa*
9. Samec hlístice *Trichuris capreoli*
10. Samice hlístice *Trichuris capreoli*
11. Samec hlístice *Trichuris myocastoris*
12. Samice hlístice *Trichuris myocastoris*
13. Mapa vybraných honiteb, označeno červeně
14. Mapa sledovaných lokalit nutrie říční

10. Seznam tabulek

Rozměry jednotlivých částí těla hlístic rodu *Trichuris* jsou uvedeny v tabulkách 1 – 12.

1. Biometrické parametry samců *Trichuris ovis*
2. Biometrické parametry samic *Trichuris ovis*
3. Biometrické parametry samců *Trichuris discolor*
4. Biometrické parametry samic *Trichuris discolor*
5. Biometrické parametry samců *Trichuris skrjabini*
6. Biometrické parametry samic *Trichuris skrjabini*
7. Biometrické parametry samců *Trichuris globulosa*
8. Biometrické parametry samic *Trichuris globulosa*
9. Biometrické parametry samců *Trichuris capreoli*
10. Biometrické parametry samic *Trichuris capreoli*
11. Biometrické parametry samců *Trichuris myocastoris*
12. Biometrické parametry samic *Trichuris myocastoris*
13. Morfologické znaky samců *Trichuris* spp.
14. Morfologické znaky samic *Trichuris* spp.
15. Prevalence hlístic rodu *Trichuris* u vybraných hostitelů v Evropě kromě České republiky
16. Prevalence hlístic rodu *Trichuris* u srnce obecného v České republice