

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Využití metody Mini-FLOTAC pro diagnostiku infekcí
gastrointestinálními helminty u drobných zemních savců**

Diplomová práce

**Bc. Eliška Skálová
Zájmové chovy zvířat**

Ing. Zuzana Čadková, Ph.D., DiS.

© 2021 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Využití metody Mini-FLOTAC pro diagnostiku infekcí gastrointestinálními helminty u drobných zemních savců" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze 26. 4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí Ing. Zuzaně Čadkové, Ph.D., DiS. za cenné rady a připomínky k práci, za trpělivost, vstřícnost a veškerý čas, který mi věnovala, ať už na terénních odchytech, v laboratoři či při konzultacích. Děkuji také své rodině, partnerovi a blízkým za podporu a každodenní motivaci v průběhu celého studia.

Využití metody Mini-FLOTAC pro diagnostiku infekcí gastrointestinálními helminty u drobných zemních savců

Souhrn

Mini-FLOTAC je inovativní koprologická metoda pro diagnostiku gastrointestinálních helmintů, která je mnohými parazitology doporučována jako vhodná alternativa metody Simple McMaster. Mnoho odborníků ve svých studiích v posledních letech testuje spolehlivost této metody pro využití u různých druhů obratlovců. Cílem této práce bylo ověřit vhodnost a relevantnost metody Mini-FLOTAC pro diagnostiku propagačních útvarů gastrointestinálních helmintů parazitujících u hlodavců. Toho bylo dosaženo pomocí umělé inokulace vzorků původně negativních exkrementů laboratorního potkana předem definovanými koncentracemi (50, 100, 1000) vajíček tasemnice *Hymenolepis diminuta* (každá koncentrace po deseti opakováních) a porovnání výsledků Mini-FLOTAC s výsledky Simple McMaster. Druhou částí experimentu byla detekce vajíček helmintů u volně žijících drobných zemních savců, přičemž kontrolní metodou k tomuto vyšetření byl přímý nález parazitů v trávicím traktu během parazitologické pitvy. Zjištěná spolehlivost této techniky pro diagnostiku helmintů drobných zemních savců zdaleka nedosáhla takového stupně, který uvádějí ostatní studie pro jiné hostitele. Při diagnostice *Hymenolepis diminuta* u uměle infikovaných vzorků dosáhla u Mini-FLOTAC a Simple McMaster preciznost (vyjádřená pomocí variačního koeficientu) 57 % a 40 %, přesnost (průměr/koncentrace*100) činila 58 % pro Mini-FLOTAC a 93 % pro metodu Simple McMaster. Koncentrace vajíček přitom neměla vliv na výsledek. U volně žijících drobných savců bylo dosaženo nejvyšší spolehlivosti při detekci vajíček rodu *Trichuris*, konkrétně 56 %. Naopak nejmenší spolehlivost vykazovala metoda při detekci vajíček třídy *Cestoda*, kdy bylo zachyceno pouze 12 % pozitivních jedinců. U rodu *Heligmosomum* odpovídala spolehlivost 14 %, u rodu *Heligmosomoides* 15 %, u oxyuridních hlístic 14 %. Celkem spolehlivost metody Mini-FLOTAC činila 20 %. Výsledky této práce ukázaly, že metoda Mini-FLOTAC není vhodnou metodou pro detekci propagačních útvarů gastrointestinálních helmintů parazitujících u hlodavců. Jedním z hlavních problémů bylo nedostatečné množství vzorku běžně získávané od jednoho hostitele potřebné pro naplnění jedné komory disku, dále špatná čitelnost u některých vzorků a tvorba vzduchových bublin, které zvyšovaly riziko chybovosti.

Klíčová slova: koprologické vyšetření, flotace, EPG, GI helminti, hlodavec

Mini-FLOTAC as a new diagnostic tool for gastrointestinal helminth infections in small terrestrial mammals

Summary

Mini-FLOTAC is an innovative coprological method of gastrointestinal helminths diagnosis, recommended by a large number of parasitologists as a suitable alternative to Simple McMaster method. Recently, numerous experts have verified the reliability of this method using a wide range of vertebrate host species in their studies. The aim of this thesis was to verify suitability and reliability of the Mini-FLOTAC method for the diagnostics of parasitic elements of gastrointestinal helminths parasitic in rodents. The aim was achieved by means of sample artificial spiking with (pre)defined concentrations of Cestoda *Hymenolepis diminuta* eggs (50, 100, 100) with 10 replicates and Mini-Flotac and McMaster results comparison. The second part of the experiment was a detection of helminths eggs in small terrestrial mammals, where a direct parasite finding during post-mortem examination of digestive tract was used as a control method. Ascertained reliability of this technique for diagnostics of helminths eggs in small terrestrial mammals did not reach the level stated for different hosts by other studies by far. Concerning the diagnostics of *Hymenolepis diminuta* in spiked samples the precision of Mini-Flotac and Simple McMaster coefficients of variation achieved 57 % and 40 %. Accuracy (mean/concentration*100) was 58 % for Mini-FLOTAC and 93 % for Simple McMaster. Egg concentration did not significantly influence the results. In small terrestrial mammals the highest reliability of eggs examination was accomplished with the genus *Trichuris*, specifically 56 %. On the contrary, the lowest eggs detection reliability was with the *Cestoda* class, only 12 % of positive specimen were detected. Concerning *Heligmosomum* sp., *Heligmosomoides* sp. and oxyurid nematodes the reliability was almost equal, reaching 14, 15 and 14%, respectively. Overall reliability of the Mini-FLOTAC method was 20 %. The thesis results showed that the Mini-FLOTAC method is not suitable for detection of propagational objects of gastrointestinal helminths in rodents. One of the crucial problems was an insufficient amount of samples obtained from one host necessary for one disc chamber fill. Furthermore, a poor reading ability and an occurrence of air bubbles in some samples have increased the risk of error.

Keywords: coprological examination, flotation, EPG, GI helminths, rodent

Obsah

1 Úvod	8
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3 Literární rešerše	10
3.1 Helminti drobných zemních savců	10
3.1.1 <i>Trematoda</i> Rudolphi, 1808.....	10
3.1.1.1 <i>Echinostoma</i> spp. Rudolphi, 1809.....	11
3.1.1.2 <i>Plagiorchis</i> spp. Lühe, 1899.....	11
3.1.2 <i>Cestoda</i>	11
3.1.2.1 Čeleď <i>Hymenolepididae</i> Ariola, 1899.....	11
3.1.2.2 Čeleď <i>Anoplocephalidae</i> Cholodkovsky, 1902.....	11
3.1.3 <i>Nematoda</i> Rudolphi, 1808.....	12
3.1.3.1 <i>Trichuris</i> spp. Röderer, 1761.....	12
3.1.3.2 <i>Heligmosomoides polygyrus</i> Dujardin, 1845.....	12
3.1.3.3 <i>Aspicularis tetraptera</i> Nitzsch, 1821.....	12
3.1.3.4 <i>Syphacia stroma</i> Linstow, 1884.....	13
3.2 Zájmové druhy drobných zemních savců	14
3.2.1 Hraboš polní (<i>Microtus arvalis</i> Pallas, 1778).....	14
3.2.2 Myšice křovinná (<i>Apodemus sylvaticus</i> Linnaeus, 1758).....	14
3.2.3 Myšice lesní (<i>Apodemus flavicollis</i> Melchior, 1834).....	15
3.2.4 Myšice temnopásá (<i>Apodemus agrarius</i> Pallas, 1771).....	15
3.2.5 Norník rudý (<i>Clethrionomys glareolus</i> Schreber, 1780).....	15
3.3 Přímé vyšetřovací metody	16
3.3.1 Koprologie.....	16
3.3.1.1 Flotace.....	16
4 Metodika	22
4.1 Uměle inokulované vzorky	22
4.2 Přirozeně infikované vzorky	22
4.3 Vyšetření metodami Mini-FLOTAC a Simple McMaster	23
4.4 Statistická analýza	23
4.4.1 Uměle infikované vzorky.....	23
4.4.2 Přirozeně infikované vzorky.....	23
5 Výsledky	25
5.1 Uměle infikované vzorky	25

5.2	Přirozeně infikované vzorky.....	26
6	Diskuze.....	30
7	Závěr	33
8	Literatura	34

1 Úvod

Koprologické metody jsou nedílnou součástí humánní i veterinární medicíny. Pro ušetření času, zjednodušení procesu, snížení ekonomické náročnosti či zvýšení citlivosti jsou tyto metody modifikovány nebo jsou vyvíjeny nové. Mini-FLOTAC je inovativní koprologická metoda pro diagnostiku gastrointestinálních helmintů, která je mnohými parazitology doporučována jako vhodná alternativa metody McMaster (Barda et al. 2013; Silva et al. 2013; Barda et al. 2014a; Barda et al. 2014b; Maurelli et al. 2014a; Maurelli et al. 2014b; Rinaldi et al. 2014; Kenyon et al. 2016; Dias de Castro et al. 2016). Celá řada vědců v posledních letech testuje spolehlivost této metody pro různé druhy hostitelů i samotných parazitů, proto bylo vhodné doplnit dosud získané výsledky těchto studií o další skupinu hostitelských obratlovců a rozšířit tak i skupinu již testovaných parazitů o další druhy.

Cílem práce je vyhodnotit, zda je testovaná metoda vhodná a relevantní pro diagnostiku propagačních útvarů gastrointestinálních helmintů u drobných zemních savců. V práci je porovnávána metoda Mini-FLOTAC (Cringoli et al. 2010) se standardizovanou metodou McMaster v modifikaci Simple McMaster (Roepstorff & Nansen 1998) a s přímým vyšetřením trávicího traktu pitvou. Z výsledků je možné zjistit, zda spolehlivost testované metody dosahuje stejné úrovně jako metoda Simple McMaster či zda je možné zachytit touto metodou infekce helmintů běžně se vyskytujících u volně žijících hlodavců České republiky.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem diplomové práce bude ověřit vhodnost a relevantnost metody Mini-FLOTAC pro diagnostiku propagačních útvarů gastrointestinálních helmintů parazitujících u hlodavců.

Vědecké hypotézy:

1. Koprologické vyšetření metodou Mini-FLOTAC poskytuje při stanovení EPG gastrointestinálních helmintů hlodavců stejně relevantní výsledky jako standardizovaná metoda McMaster.

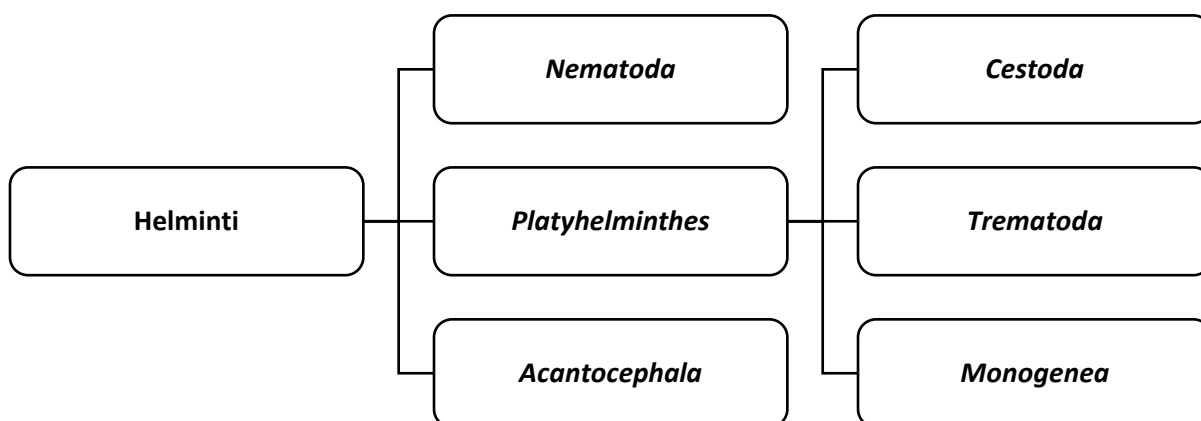
2. Intenzita infekce *Hymenolepis diminuta* zjištěná metodou Mini-FLOTAC odpovídá reálnému počtu vajíček ve výkalech hlodavců.

3. Diverzita propagačních útvarů detekovaných metodou Mini-FLOTAC relevantně odráží druhové spektrum helmintů přítomných v gastrointestinálním traktu volně žijících hlodavců.

3 Literární rešerše

3.1 Helminti drobných zemních savců

Významnou biotickou složkou střeva savců jsou parazitičtí helminti, jako jsou tasemnice, hlístice, motolice a vrtejši. Helminti jsou běžní v gastrointestinálních traktech hospodářských zvířat, volně žijících zvířat i lidí, zejména v preindustriálních zemích, kde jsou celosvětově infikováni miliony lidí (Pullan et al. 2014; Kreisinger et al. 2015). Název helminti byl primárně používán k označení červů z kmenů *Platyhelminthes* Minot, 1876 a *Nemathelminthes* Rudolphi, 1808 (Mönnig 1949), později získal širší význam a nyní se využívá pro všechny druhy parazitických červů zahrnující skupiny uvedené na obrázku 1. Poznatky související s těmito skupinami představuje věda helmintologie. Častou cestou přenosu do hostitele je pro většinu druhů helmintů požití různých vývojových stádií (Kreisinger et al. 2015).



Obr. 1 Rozdělení helmintů

3.1.1 *Trematoda* Rudolphi, 1808

Ve třídě *Trematoda* se vyskytují hlavně jedinci mající nepřímý vývoj, který zahrnuje mezihostitele. Dospělci se vyskytují primárně ve žlučovodech, gastrointestinálním traktu a cévním systému. Většina motolic je dorzoventrálně zploštělá, má slepou trávicí soustavu, přísavky a jsou hermafrodité (pouze u *Schistosomatidae* Stiles & Hassall, 1898 mají oddělená pohlaví). V závislosti na druhu opouštějí vajíčka hostitele se stolicí nebo v moči, larva se následně vyvíjí v mezihostiteli, kterým je obvykle měkkýš. U některých druhů se vyskytují další mezihostitelé, ale měkkýši jsou nezbytní pro všechny skupiny této třídy (Taylor et al. 2015).

3.1.1.1 *Echinostoma* spp. Rudolphi, 1809

Jsou kosmopolitně rozšířené, mají nízkou specifitu, parazitují především ve střevech a žlučových cestách mnoha obratlovců. Vývoj *Echinostoma* probíhá přes meziphostitele. Jejich délka je asi 3x až 5x větší než šířka a charakteristickým morfoloogickým znakem je hlavový límec s trny. Vajíčka jsou oválného tvaru a mají zřetelné pólové víčko, viz obrázek 2. Vajíčka jsou odolná, jsou schopna dalšího vývoje i po 5 měsících uchovávání při 4 °C (Huffman & Fried 1990)

3.1.1.2 *Plagiorchis* spp. Lühe, 1899

Jedinci tohoto rodu mají vícehostitelský cyklus. Prvním meziphostitelem bývá měkkýš, druhým meziphostitelem je sladkovodní hmyz a korýši. Ptáci a savci (méně často obojživelníci a plazi) slouží jako definitivní hostitelé (Zikmundová et al. 2014).

Dalšími zástupci třídy *Trematoda* napadající drobné zemní savce České republiky jsou například *Alaria alata*, Goeze, 1782; *Brachylaemus recurvus* Dujardin, 1845; *Echinochasmus coaxatus* Dietz, 1909 (Tenora 2015).

3.1.2 *Cestoda*

Jedinci z této třídy jsou stejně jako *Trematoda* dorzoventrálně zploštělí, liší se ale článkovaným tělem a absencí trávicího traktu nebo tělní dutiny. Délka je velmi variabilní, od několika milimetrů do několika metrů. Dospělý jedinec má kulovitou hlavu neboli skolex a segmentované tělo (strobila) (Taylor et al. 2015).

3.1.2.1 Čeleď *Hymenolepididae* Ariola, 1899

Jedná se o parazity ptáků a savců. Meziphostiteli jsou korýši, měkkýši a hmyz. *Hymenolepis diminuta* Rudolphi, 1819 je neinvazivní tasemnice tenkého střeva (Harris & Turton 1973; Kreisinger et al. 2015). Je kosmopolitně rozšířená, dlouhá asi 60 cm. Nemá rostelní háčky. Vývoj probíhá přes meziphostitele, kterými jsou noční motýli, blechy, mnohonožky atd., definitivním hostitelem jsou hlodavci nebo člověk (Taylor et al. 2015). Do těla definitivního hostitele se dostává požitím infikovaného hmyzu (Kreisinger et al. 2015). Vajíčka jsou kulovitého tvaru, viz obrázek 3. Dalšími druhy napadajícími hlodavce v České republice jsou *Rodentolepis fraterna* Stiles, 1906 a *Rodentolepis straminea* Goeze, 1782 (Tenora et al. 2015).

3.1.2.2 Čeleď *Anoplocephalidae* Cholodkovsky, 1902

Jedná se především o parazity přežvýkavců, čeleď ale zahrnuje i některé druhy parazitující u hlodavců. Jedinci nemají na skolexu rostellum ani háčky. Meziphostiteli jsou pancířníci (*Oribatida* Duges, 1834) (Taylor et al. 2015). Rod *Paranoplocephala* tvoří dominantní

skupinu endoparazitů hlodavců ve vyšších zeměpisných šířkách na severní polokouli (Haukismalmi et al. 2014). V České republice, konkrétně na výsypkách Mostecká, byla u hrabošů zaznamenána dominantní infekce druhem *Anoplocephaloides dentata* Galli-Valerio, 1905, která je jinde poměrně vzácná (Bejček & Jirouš 1983).

3.1.3 *Nematoda* Rudolphi, 1808

Nematoda jsou protáhlí červi, jejichž tělo je na průřezu kulaté. Jsou volně žijící i parazitické (Taylor et al. 2015). Popsáno bylo přibližně 16 000 – 17 000 druhů tohoto kmenu, jejich skutečná početnost se odhaduje na 40 000 (Anderson 2000). Vyskytují se u nich různé typy životních cyklů, které do určité míry závisí na stupni adaptace na parazitický život. Čím větší je tato adaptace, tím je daný parazit méně schopný přežít mimo hostitele. Doba strávená ve venkovním prostředí před vstupem do definitivního hostitele se zkracuje například napadením dalšího mezihostitele (Mönnig 1949).

3.1.3.1 *Trichuris* spp. Röderer, 1761

Jedinci patřící do rodu *Trichuris* mají zadní část těla širokou, ta se zužuje do dlouhého vláknitého předního konce (přibližně dvakrát delší než zadní část), který se charakteristicky zanořuje do sliznice střeva hostitele (Taylor et al. 2015).

Taxonomie tohoto rodu je velmi nejasná, protože u mnoha popsáných druhů se může jednat o synonymum pro jeden druh (Taylor et al. 2015). *Trichuris muris* Schrank, 1788 je typickým zástupcem parazitujícím u hlodavců z podčeledi *Murinae*. Jeho vajíčka jsou typicky silnostěnná, rohlíčkovitého tvaru, se dvěma pólovými zátkami, viz obrázek 4. Definitivním hostitelem může být i člověk (Auer & Aspöck 2014). U jedinců z podčeledi *Arvicolinae* je častým zástupcem *Trichuris arvicolae* Feliu & al., 2000 (Deter et al. 2007).

3.1.3.2 *Heligmosomoides polygyrus* Dujardin, 1845

Dospělci jsou protáhlí, měří asi 0,6 – 1,3 cm (Taylor et al. 2015). Kolonizuje výlučně tenké střevo. Do těla definitivního hostitele se dostává infekční larva (Kreisinger et al. 2015).

3.1.3.3 *Aspiculuris tetraptera* Nitzsch, 1821

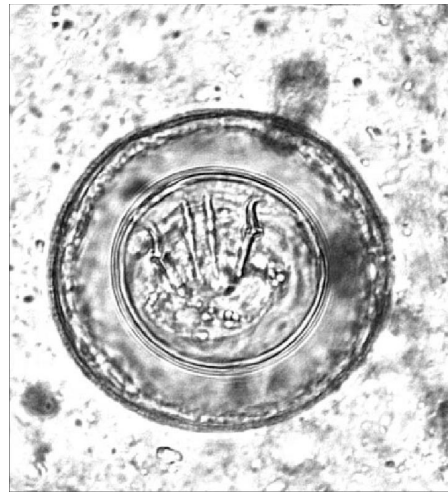
Vyskytuje se v tlustém střevě. Jejich životní cyklus je přímý, samice kladou vajíčka do perineální oblasti. Infekce probíhá přímo požitím vajíček z perinea, nepřímou s jídlem nebo autoinfekcí, kdy mohou migrovat zpět přes konečník (Taylor et al. 2015). Nákaza je většinou bezpříznaková, přemnožení parazita však může mít vážné následky (Whary et al. 2015). Vajíčka jsou elipsoidního tvaru, viz obrázek 5.

3.1.3.4 *Syphacia stroma* Linstow, 1884

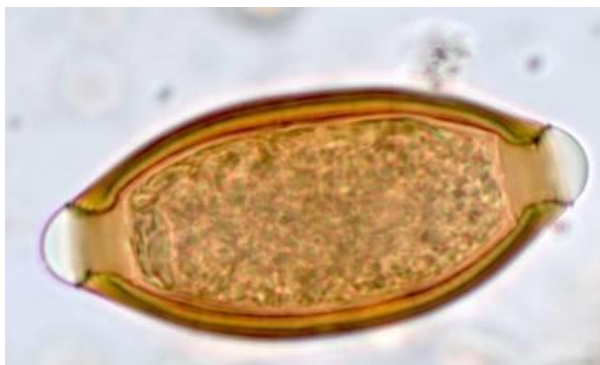
Kolonizuje slepé střevo, v menší míře tlusté střevo. Do těla definitivního hostitele se dostávají infekční vejce (Kreisinger et al. 2015). Tyto hlístice jsou ve většině případů nepatogenní, při přemnožení však mohou způsobit silné podráždění terminální části gastrointestinálního traktu (Tully 2009). Samice klade vajíčka na perianální oblast hostitele, což umožňuje autoinfekci hostitele během čištění. Tato reprodukční strategie způsobuje pozitivní vazbu, protože hostitelé s vyšší intenzitou podléhají vyšší míře sebeinfekce. Intenzita infekce u již infikovaných hostitelů by proto rostla rychleji než u neinfikovaných jedinců, což vede k vysoce agregované distribuci intenzity ve srovnání s jinými hostiteli. Srovnání *Syphacia* spp. u druhu *Apodemus* Kaup, 1829, s druhy parazitů, kteří nevyužívají sebeinfekci hostitele jako reprodukční strategii (*H. polygyrus*), ukazuje, že prevalence *H. polygyrus* je významně vyšší než u *Syphacia* spp., což podporuje teorii zpětné vazby (Taylor 2019).



Obr. 2 Vajíčko *Echinostoma* spp.
(Chai et al. 2011)



Obr. 3 Vajíčko *Hymenolepis diminuta*
(Kołodziej et al. 2014)



Obr. 4 Vajíčko *Trichuris* spp.
(Kouassi et al. 2015)



Obr. 5 Vajíčko *Aspicularis tetraptera*
(Whary et al. 2015)

3.2 Zájmové druhy drobných zemních savců

3.2.1 Hraboš polní (*Microtus arvalis* Pallas, 1778)

Jedná se o nejznámější a nejběžnější druh hraboše. Je typickým obyvatelem stepního prostředí, ze kterého přešel do kulturní krajiny na pole, louky, pastviny, meze a úhory. V horách druhotně proniká nad horní hranici lesa, byl zastížen až na vrcholu Sněžky. Dává přednost zelené stravě bohaté na bílkoviny. Na podzim a v zimě přechází víc na podzemní části rostlin, v přemnožených populacích se běžně vyskytuje kanibalismus (Anděra 1999).

Území České republiky má vhodné předpoklady pro studium parasitofauny hraboše polního, neboť se zde nacházejí všechny biotopy, které tento druh obývá. Z motolic je popisován u hraboše polního druh *Plagiorchis muris* Tanabe, 1922. Z tasemnic není známý specifický druh pro hraboše polního. Hlavním hostitelem je však pro více druhů hlístic, například *Heligmosomum costellatum* Dujardin, 1845. Většina ostatních endoparazitů je pro hraboše nespecifická, to je způsobeno především širokou ekologickou valencí tohoto hlodavce (Kratochvíl 1959).

3.2.2 Myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus* Linnaeus, 1758)

Myšice křovinná je náš nejběžnější hlodavec. Vyskytuje se všude mimo souvislé lesy a jako průkopnický druh osidluje i haldy a výsypky dolů nebo městskou zástavbu (Anděra 1999). Sledována byla v prostředí od hladiny moře až po 2000 metrů nad mořem (Wilson et al. 2017). Jsou to všežravci, hlavní složkou potravy jsou však semena a plody (Anděra 1999), z živočišné složky přijímají hlemýžďe, žížaly, hmyz (Wilson et al. 2017).

Častými parazitárními helminty u rodu *Apodemus* jsou *Syphacia stroma* a *Heligmosomoides polygyrus* (Sharpe 1964; Abu-Madi et al. 2000), viz tabulka 1. Incidence infekce *Syphacia* je vysoká napříč věkem i pohlavím. Dospělé samice jsou méně náchylné. Úroveň nákazy parazity *Heligmosomoides* je také velmi vysoká, vyšší náchylnost k infekci však vykazují dospělí jedinci. Rozdíl mezi pohlavím není patrný (Sharpe 1964). Méně často se objevuje *Capillaria* spp. Zeder, 1800 (Abu-Madi et al. 2000).

Tab. 1 Prevalence vybraných helmintů u *Apodemus sylvaticus* ve Španělsku (Fuentes et al. 2004)

Helmint	mikrohabitat	prevalence (%)
<i>Syphacia</i> spp.	slepé střevo	18
<i>H. polygyrus</i>	tenké střevo	18
<i>T. muris</i>	slepé střevo	9
<i>A. tetraptera</i>	tlusté střevo	20

3.2.3 Myšice lesní (*Apodemus flavicollis* Melchior, 1834)

Je větší než myšice křovinná, na hrdle mívá protáhlou žlutavou skvrnu a na bocích ostrou hranici mezi hnědým a bílým břichem. Vyskytuje se pouze v souvislých lesích a na březích potoků se stromovou vegetací (Anděra 1999). Dokáže žít v prostředí do nadmořské výšky 2 500 m (Wilson et al. 2017).

Nejčastějšími helminty jsou u tohoto druhu *S. stroma*, *H. diminuta*, *H. polygyrus* (Ondříková et al. 2010) a *T. muris* (Kreisinger et al. 2015). *S. stroma* dominuje s nejvyšší prevalencí (Ondříková et al. 2010; Kreisinger et al. 2015). Větší diverzitu druhů helmintů vykazují dospělí jedinci před subadulty, stejně jako samice před samci (Ondříková et al. 2010).

Tab. 2 Průměrná prevalence vybraných helmintů u *A. flavicollis* v Itálii (Kreisinger et al. 2015)

Helmint	mikrohabitat	prevalence (%)
<i>Syphacia</i> spp.	slepé střevo	59
<i>H. polygyrus</i>	tenké střevo	45
<i>T. muris</i>	slepé střevo	3
<i>A. tetraptera</i>	tlusté střevo	3
<i>Hymenolepis</i> spp.	tenké střevo	59

3.2.4 Myšice temnopásá (*Apodemus agrarius* Pallas, 1771)

Ze všech našich druhů myšic je nejlépe rozpoznatelná, středem hřbetu se jí totiž táhne úzký tmavý pruh. Drží se v křovinách, při okraji lesů, na mezích (Anděra 1999) v rákosinách a močálech, na podzim se často stahují do stodol a budov. V Makedonii se vyskytují až do nadmořské výšky 1750 m (Wilson et al. 2017). Potravu hledá na zemi (Anděra 1999), hlavní složkou jsou semena a ovoce, doplněné hmyzem a měkkýši (Wilson et al. 2017).

U myšice temnopásé mají v prevalenci nákazy významnou roli vnitřní faktory. Významný vliv na diverzitu helmintů má věk hostitele. Na výskyt *H. polygyrus* a *S. stroma* má velký vliv také období odchytu, *H. diminuta* vykazuje rozdíly v počtu především dle věku hostitele (Ondříková et al. 2010).

3.2.5 Norník rudý (*Clethrionomys glareolus* Schreber, 1780)

Norníci rudí mají rezavě červenou srst, na břicho spíše šedou. Obývají lesní porosty od přírodě blízkých po kulturní (Anděra 1999).

Častými druhy helmintů parazitujícími u tohoto druhu jsou *Aspiculuris spp.* Nitzsch, 1821 a *Heligmosomoides spp.* (Sharpe 1964), *Heligmosomum spp.*, *Paranoplocephala spp.*, *Syphacia spp.* (Haukisalmi et al. 1988). Incidence infekce *Aspiculuris spp.* je vyšší u dospívajících jedinců. U dospělých hostitelů je popisován větší výskyt u samců, samice jsou méně náchylné k infekci. *Heligmosomoides spp.* se u norníků vyskytuje méně často a rozdíly v incidenci infekce mezi pohlavím nebo věkovou kategorií jedinců jsou pouze nepatrné (Sharpe 1964).

Prevalence většiny helmintů je u tohoto druhu striktně závislá na věkové skupině hostitelů, obecná prevalence druhů proto není relevantním údajem (Haukisalmi et al. 1988).

3.3 Přímé vyšetřovací metody

Přímé vyšetřovací metody spočívají v nálezů parazita nebo jeho vývojových stádií přímo ve vyšetřovaném materiálu. Nejčastěji se používá vyšetření výkalů. Pro zvýšení efektivity metod se využívají koncentrační metody.

3.3.1 Koprologie

Popisujeme vyšetřovací metody kvalitativní a kvantitativní. Kvalitativní metody poskytují informace o přítomných druzích, kvantitativní poskytují údaje o míře infekce. Oba typy jsou důležitým nástrojem pro posuzování zdravotního stavu populací živočichů. Vyšetření výkalů k diagnostice parazitárních vajíček je rozmanité, od jednoduchého přímého nátěru po složitější metody zahrnující centrifugaci a použití flotačních roztoků (Pereckienė et al. 2007).

3.3.1.1 Flotace

Všechny flotační metody fungují na principu oddělení vajíček od zbytků výkalů pomocí různých flotačních roztoků se specifickými hmotnostmi, díky kterým vajíčka vyplují na povrch suspenze (Whitlock 1948). Tento proces může zahrnovat pouhé ponechání vzorku na pracovní ploše po určitou dobu nebo centrifugaci. Centrifugace zvyšuje efektivnost a snižuje dobu přípravy vzorku. Na trhu jsou dostupné různé soupravy pro zjednodušení a zrychlení vyšetřovacího procesu, které však mohou snižovat citlivost prováděného testu (Zajac & Conboy 2012). Zejména při diagnostice parazitóz, při kterých se při diagnostice zobrazuje malé množství vajíček ve vzorku (*Trichuris*, *Giardia* Kunstler, 1882 atp. (Zajac & Conboy 2012), je důležité volit metodu co nejefektivnější, nejstabilnější a nejpresnější (Pereckienė et al. 2007). Pokud při posuzování zdravotního stavu populace využíváme množství vylučovaných vajíček, je důležité určit životaschopnost populací těchto stádií, protože právě ta indikuje potenciální infekčnost. Od zvolené metody proto očekáváme, že bude co nejpresněji odrážet poměr životaschopných a neživotaschopných vajíček, aby nedošlo k nesprávné interpretaci výsledků.

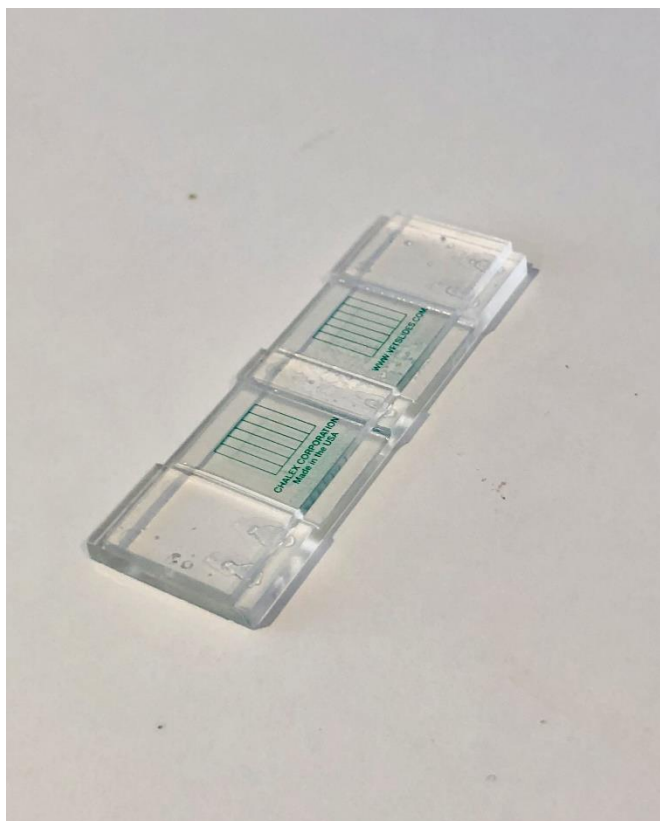
Totéž platí pro čištění vajíček od zbytku výkalů, je důležité zvolit takovou metodu, která má co nejmenší vliv na životaschopnost vajíček (Bukhari & Smith 1995).

3.3.1.1.1 McMaster

Nejčastěji používanou kvantitativní metodu vyvinuli v Austrálii Gordon a Whitlock (1939), je při ní využívána komora McMaster (Gordon & Whitlock 1939; Whitlock 1948). Původně sloužila pouze k počítání parazitů ovcí (Gordon & Whitlock 1939). Existuje mnoho modifikací této metody. Postup se liší různou hmotností zkoumaných výkalů, použitým flotačním roztokem, dobou flotace, přítomností či nepřítomností kroku centrifugace, desingem a počtem počítacích komor, způsobem počítání, použitými multiplikačními faktory atp. (Dunn & Keymer 1986).

Metoda McMaster vykazuje nižší citlivost zejména při nízkém počtu vajíček helmintů ve vzorku (Mes 2003). Tato metoda je vhodná k rychlému a jednoduchému stanovení počtu vajíček a navrhnutí vhodné léčby zvířete či populace, ze které pochází vzorek. Pro použití selektivní terapie a zvýšení účinnosti antihelmintik je vhodnější využít citlivější metodu, například Mini-FLOTAC, který má větší sčítací plochu (Dias de Castro et al. 2017).

Vzhledem k široké škále modifikací McMaster metody musí parazitologické laboratoře rozhodnout, která metoda bude nejvhodnější pro získání cílových dat. Některé modifikace jsou určeny k prokázání přítomnosti vajíček hlístic, jejich determinaci a stanovení koncentrace ve výkalech (Pereckienė et al. 2007). Pro usnadnění prohlížení se využívá odstředování pro odstranění jemných částic a barvení, při kterém se zjednodušuje identifikace vajíček (MAFF 1986).



Obr. 6 McMaster (McMaster Precision Chambered Counting Slides for Faecal Egg Counting)

Citlivost metody

Citlivost při použití McMaster komor je 50 vajíček na gram výkalů (egg per gram of feces = EPG) (Dias de Castro et al. 2017).

Doba přípravy jednoho vzorku je 7 min., čtení trvá 5 minut (Barda et al. 2014a).

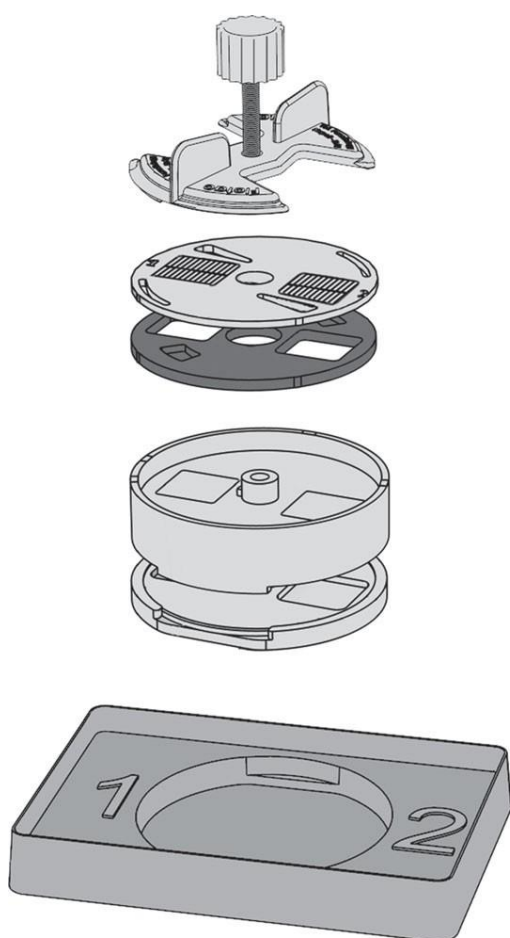
3.3.1.1.2 FLOTAC

FLOTAC je relativně nová, citlivá a přesná metoda pro kvalitativní a kvantitativní kopro-mikroskopickou analýzu. Využívá se zde aparát FLOTAC, což je válcové zařízení se dvěma 5ml flotačními komorami, které umožňuje analyzovat až 1 gram výkalů. V porovnání s běžně používanými diagnostickými metodami pro detekci parazitů (McMaster, Kato-Katz atp.) vykazuje metoda FLOTAC vyšší citlivost a přesnost (Cringoli et al. 2010). Tento postup také umožňuje zobrazit několikanásobně vyšší počet vajíček v daném množství stolice (Steinmann et al. 2012). Metoda může být prováděná s čerstvým vzorkem, stejně tak se vzorkem konzervovaným. Příprava jednoho vzorku před samotným mikroskopováním trvá 12–15 minut (Cringoli et al. 2010).

Princip

Aparát FLOTAC (na obrázku 7) je válcovitého tvaru a je vyroben z polykarbonátového amorfního termoplastu. Tento materiál byl vybrán kvůli vynikající propustnosti světla a vysoké tepelné odolnosti, robustnosti (lze používat opakovaně). Zařízení se skládá ze tří složek. Základna, překladový disk a čtecí disk. Jsou zde dvě 5ml flotační komory, které jsou navrženy pro optimální vyšetření suspenzí velkých vzorků stolice (celkový možný objem = 10 ml). Dále obsahuje šroub, klíč, dno, adaptér do centrifugy a adaptér k mikroskopu. Bez tohoto příslušenství nebude FLOTAC správně fungovat a centrifugace ani následné vyšetření pod mikroskopem nebude možné (Cringoli et al. 2010). Souprava také obsahuje Fill-FLOTAC, odběrovou sadu, která eliminuje kontakt se vzorkem v průběhu procesu přípravy. Pomocí této sady se dá vzorek odměřit, homogenizovat, filtrovat a plnit do komor FLOTAC (Maurelli et al. 2014b).

Existují dvě varianty, FLOTAC-100, který umožňuje maximální zvětšení x 100, a FLOTAC-400, vylepšená verze, který umožňuje zvětšení x 400. FLOTAC-100 je však stále doporučován k diagnostice vajíček helmintů, protože čtecí disk je podstatně silnější a odolnější a flotační komory lze snadněji plnit (Cringoli et al. 2010).



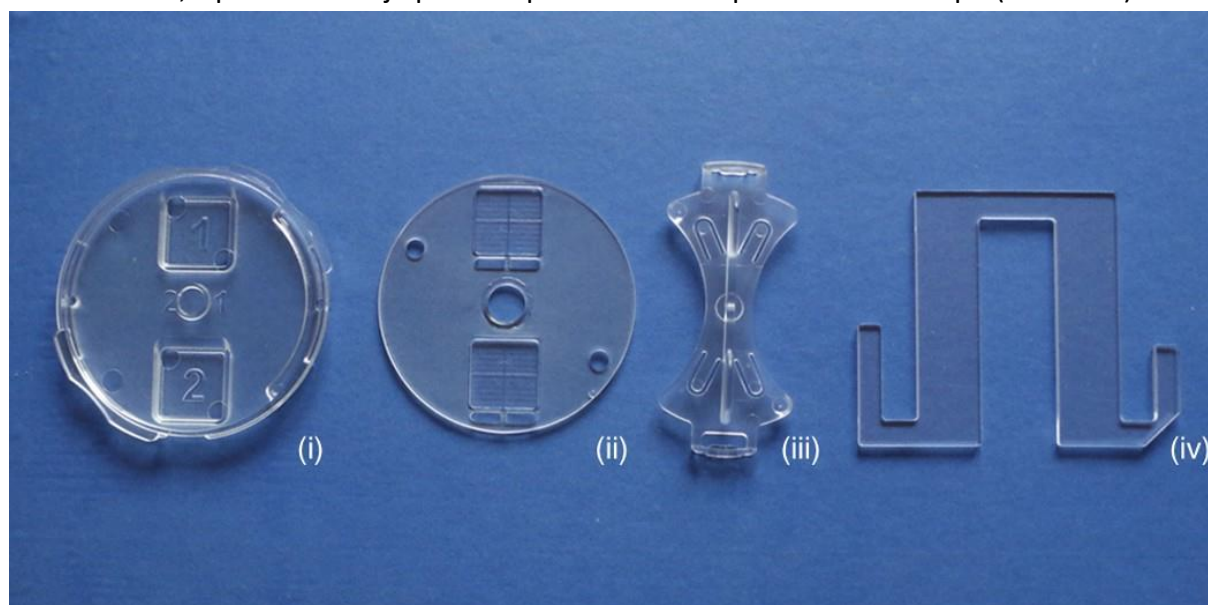
Obr. 7 Aparát FLOTAC; odshora: šroub, klíč, čtecí disk, překládací disk, základna, dno, adaptér do centrifugy (Cringoli et al. 2010).

Postup pro vyšetření hospodářských zvířat

Do 2 patnáctimililitrových zkumavek přeneseme pomocí pipety přečizenou suspenzi trusu a centrifugujeme po dobu 3 minut při 170x g. Supernatant odlijeme a zkumavky naplníme do 6 ml zvoleným flotačním roztokem. Obsah zkumavek promícháme a 5 ml suspenze přeneseme pomocí jednorázové pipety do jedné ze dvou komor aparátu FLOTAC. Aparát vložíme do centrifugy na 5 minut při 120x g a poté přeložíme pro separování plovoucích vajíček od sedimentovaného zbytku. Všechna vajíčka viditelná skrz čtecí disk spočítáme pod mikroskopem se 100x zvětšením (Knopp et al. 2009; Cringoli et al. 2010; (Steinmann et al. 2012).

3.3.1.1.3 Mini-FLOTAC

Mini-FLOTAC je zjednodušená verze FLOTAC aparátu. Skládá se pouze ze základny a čtecího disku, z příslušenství je potřeba pouze klíč a adaptér do mikroskopu (viz obr. 8).



Obr. 8 (i) základna; (ii) čtecí disk se dvěma mřížkami; (iii) klíč; (iv) adaptér do mikroskopu (Cringoli 2017).

Nachází se zde dvě 1ml komory využívající dvě mřížky na čtecím disku, každá rozdělená na 12 sekcí (Obr -, ii) (Cringoli et al. 2017). Souprava také obsahuje Fill-FLOTAC, odběrovou sadu, která eliminuje kontakt se vzorkem (Maurelli et al. 2014a). Mini-FLOTAC umožňuje pozorování při maximálním zvětšení 400x (Cringoli et al. 2017).

Největším rozdílem mezi metodou Mini-FLOTAC a FLOTAC je analytická citlivost, možná citlivost FLOTAC je 1 vajíčko/larva/oocysta/cysta na gram výkalů (EPG/LPG/OPG/CPG), citlivost Mini-FLOTAC je 5 EPG/LPG/OPG/CPG. Nižší citlivost je způsobena 5x nižším objemem vzorku v komorách (2 ml v MF, 10 ml ve FLOTAC) (Cringoli et al. 2017).

Doba přípravy vzorku je 12 min. (Silva et al. 2013) až 13 min. (Barda et al. 2014b), tedy více než u metody McMaster. Čtení při použití síranu zinečnatého trvá 7 min./vzorek, při použití nasyceného roztoku chloridu sodného je to 5 min./vzorek (Barda et al. 2014b).

Postup přípravy vzorku se liší dle studovaného živočišného druhu.

Postup pro hospodářská zvířata

1. 45 ml zvoleného flotačního roztoku a 5 g výkalů umístíme do Fill-FLOTAC.
2. Homogenizujeme po dobu 10-20 s (v závislosti na konzistenci vzorku), zvláště při nízké intenzitě infekce je homogenizace vzorku důležitá kvůli zabránění falešně negativnímu výsledku.
3. Pomocí špičky nasazené na vrchním otvoru Fill-FLOTAC naplníme komory Mini-FLOTAC. Před plněním každé komory pětkrát obrátíme Fill-FLOTAC pro důkladné promíchání vzorku těsně před aplikací. Pro eliminaci vzniku vzduchových bublin by měly být komory plněny s aparátem nakloněným v úhlu cca 45 °.
4. Po 10 minutách použijeme klíč k otočení čtecího disku o 90 ° pro separování plovoucích parazitárních elementů od části komor se zbytkem usazeného vzorku. Odstraníme klíč.
5. Prohlížíme pod mikroskopem (Cringoli et al. 2017).

Dosud získané výsledky naznačují, že Mini-FLOTAC má vyšší citlivost než ostatní diagnostické metody detekce parazitických vajíček ve výkalech a moči lidí i zvířat (Barda et al. 2013; Silva et al. 2013; Barda et al. 2014a; Barda et al. 2014b; Maurelli et al. 2014a; Maurelli et al. 2014b; Rinaldi et al. 2014; Kenyon et al. 2016; Noel et al. 2017).

Používané roztoky

Pro tyto metody se nejčastěji využívá nasycený roztok chloridu sodného (densita = 1,20), síranu zinečnatého (densita = 1,35) (Barda et al. 2014b) nebo Sheatherův cukerný roztok (Allam et al. 2021).

4 Metodika

Spolehlivost metody Mini-FLOTAC pro detekci gastrointestinálních helmintů u drobných zemních savců byla hodnocena pomocí přirozeně i uměle infikovaných vzorků výkalů.

4.1 Uměle inokulované vzorky

V první části experimentu bylo potřeba ověřit spolehlivost metody Mini-FLOTAC (MF) pro detekci gastrointestinálních helmintů drobných zemních savců. To bylo provedeno pomocí srovnání výsledků Mini-FLOTAC se standardizovanou metodou Simple McMaster (SMM). Citlivost a spolehlivost byla testována pomocí negativních vzorků výkalů, do kterých byla přidána vajíčka v různých koncentracích vždy po 10 opakování.

Laboratorním potkanům byly odebrány vzorky výkalů. Absence vajíček (0 EPG) v negativním vzorku byla ověřena metodou MF i SMM. Vajíčka byla získána z pozitivního vzorku výkalů od laboratorních potkanů s vysokou intenzitou infekce tasemnicí *Hymenolepis diminuta*. Dále byla potvrzena pozitivita pomocí SMM a následně provedena koncentrační Cornell-Wisconsinova metoda pro izolaci vajíček. Posléze byla získaná vajíčka rozmíchána s vodou na cílovou koncentraci, která byla ověřena pomocí nátěru 5 kapek požadovaného množství a sčítáním vajíček v 10 vzorcích. Negativní vzorky výkalů byly infikovány požadovanou koncentrací vajíček (100, 500 a 1000), s 10 opakováními pro každou koncentraci a metodu, pro ověření citlivosti při různých intenzitách infekce. Vzorek byl homogenizován a vyšetřen požadovanou metodou.

4.2 Přirozeně infikované vzorky

Ve druhé části experimentu byly použity trávicí trakty a jejich obsah z volně žijících drobných savců. Ti byli odchytáváni v červnu 2020 a v září 2020 v Krušných horách a na Mostecku. K odchytům byly využity sklapovací a živolovné pasti. Získaní jedinci byli označeni, zchlazeni a následně u nich proběhla helmintologická pitva.

Trávicí trakt byl oddělen od zbytku kadáveru a zkoumán v Petriho misce. Zde bylo separováno tlusté střevo od tenkého a prohlíženo každé zvlášť. Nejprve bylo zapotřebí rozstříhnout tkáň střeva, dále pomocí peánu oddělit veškerý obsah střev kromě materiálu z tračníku. Následně se zkoumaný materiál promíchal s vodou a na vhodném podkladu byli vyhledáváni a identifikováni parazité. Pokud byl při pitvě vzorek popsán jako pozitivní na jakýkoli druh gastrointestinálních parazitů, využil se materiál z tračníku pro ověření výskytu vajíček parazita metodou Mini-FLOTAC dle postupu popsaného v rešeršní části práce. V případě nedostatečného množství materiálu byl testovaný jedinec vyřazen z experimentu.

4.3 Vyšetření metodami Mini-FLOTAC a Simple McMaster

Pro vyšetření pomocí Mini-FLOTAC byl 1 gram výkalů rozmělněn v hmoždíři a doplněn 9 ml roztoku NaCl. Suspenze byla důkladně promíchána tloučkem a přes čajové sítko přecezena do nové nádoby. Zde byla suspenze promísena pomocí pipety, jeden mililitr suspenze byl odebrán z různých částí vzorku a napipetován do komory Mini-FLOTAC. Stejně byla naplněna druhá komora. Po deseti minutách byl pomocí klíče otočen disk Mini-FLOTAC a odříznuta horní vrstva suspenze s plovoucími vajíčky. Vajíčka byla spočítána a celkový počet byl vynásoben koeficientem 5.

Vyšetření pomocí Simple McMasteru probíhalo obdobně, 1 gram výkalů byl smíchán s 14 ml roztoku NaCl, směs byla homogenizována a pomocí pipety přenesena do komor McMaster. Po 5 minutách byla vajíčka spočítána a vynásobena koeficientem 50.

Všechny vzorky byly prohlíženy pomocí mikroskopu Olympus BX51 při celkovém zvětšení 10x. Výsledky obou metod byly srovnány a jsou uvedeny v tabulce č. 1.

4.4 Statistická analýza

4.4.1 Uměle infikované vzorky

Nejprve byla otestována normalita výběrů. Kromě sady vzorků se 100 implementovanými vajíčky je všude rozdělení normální. Ke zjištění významnosti rozdílů mezi metodami byla u vzorků s normálním rozdělením použita parametrická metoda – t-test, u zbylých testovaných dat bylo provedeno párové srovnání pomocí Mann-Whitneyho testu (pomocí programu Microsoft Excel) dle následujícího vzorce:

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2$$

Výsledky statistické analýzy byly vizualizovány pomocí boxplotů.

Preciznost představuje hodnota variačního koeficientu, který byl počítán vždy pro celou sadu vzorků určité koncentrace pomocí vzorce směrodatná odchylka/průměr*100.

Přesnost je vyjádřena pomocí střední odchylky od skutečného počtu vajíček aplikovaných do vzorku, dle vzorce: průměr/koncentrace*100, vyjádřeno v procentech.

4.4.2 Přirozeně infikované vzorky

U přirozeně infikovaných vzorků byla sledována procentuální úspěšnost metody Mini-FLOTAC pomocí vzorce celkový počet vzorků/počet shod*100. Pro statistické vyhodnocení byl

použit Fisherův exaktní test pro srovnání kontingenčních tabulek. Ten byl použit pro srovnání očekávané shody mezi metodami (optimálně všech 96 pozorování ve shodě).

5 Výsledky

5.1 Uměle infikované vzorky

V první části experimentu bylo celkem otestováno 60 vzorků, 30 pomocí metody MF a 30 metodou SMM. Signifikantní rozdíly ($P \leq 0.05$) mezi technikami a hodnoty P (U) jsou uvedeny v tabulce 3. Spolehlivost je graficky znázorněna v tabulce 4 pomocí barevné škály (zelená – nejlepší, červená – nejhorší) (Microsoft Excel).

Tab. 3 Porovnání metody Mini-FLOTAC a Simple McMaster u vzorků infikovaných 3 koncentracemi vajíček tasemnice *Hymenolepis diminuta*

Koncentrace	T-test			Mann-Whitney test		
	t	df	P	U stat.	U critical	Komentář
100				20	23	signif. rozdíl
500	2.1575	18	0.04473			
1000	2.24	18	0.01727			

U koncentrace 100 není normální rozdělení dat, proto byly výsledky hodnoceny pomocí Mann-Whitneyho testu. Zde je místo hodnoty P uvedena kritická hodnota U. $U \text{ stat.} < U \text{ critical}$, rozdíl mezi metodami u této koncentrace je tedy také signifikantní, stejně jako u ostatních koncentrací.

Tab. 4 Preciznost vyjádřená pomocí variačního koeficientu (%) pro obě metody (MF, SMM) testované při 3 různých koncentracích aplikovaných vajíček

<i>H. diminuta</i>	50 vajíček	100 vajíček	1000 vajíček	Průměr
MF	65	56	50	57
SMM	44	46	31	40

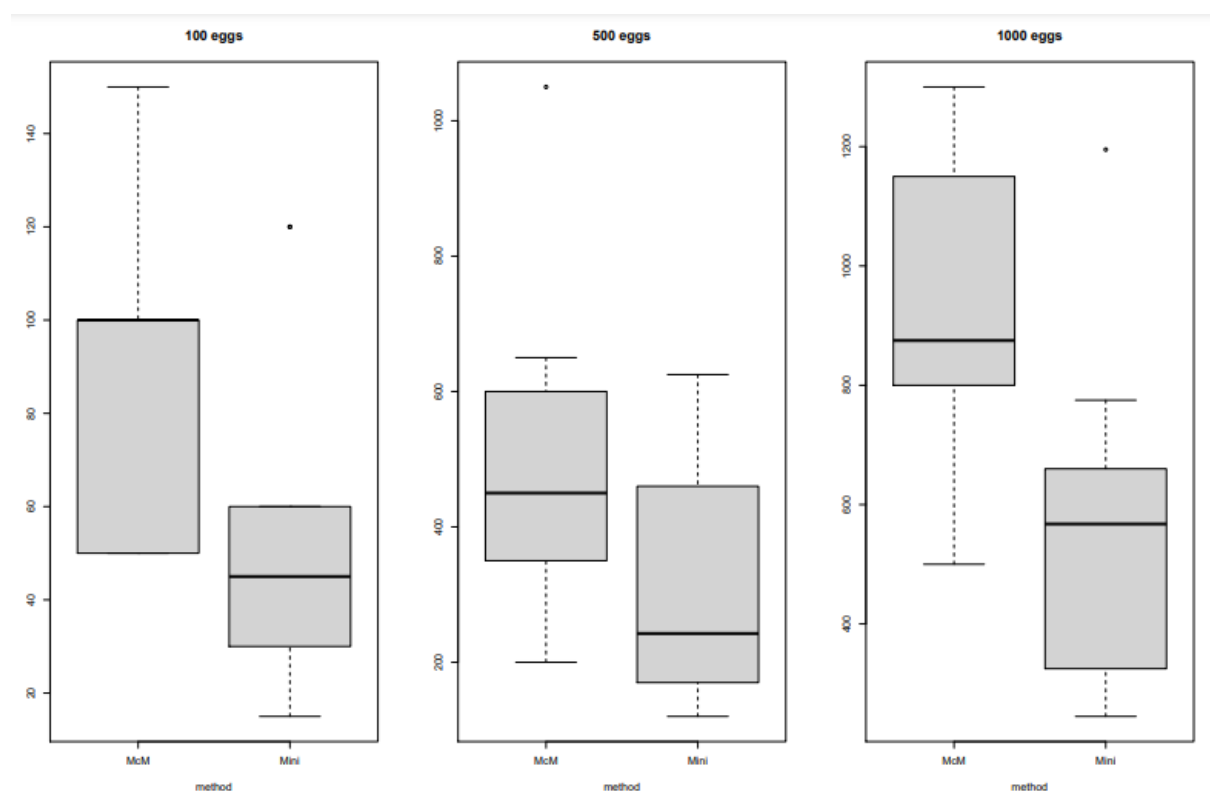
Variační koeficienty výsledků pro ověření preciznosti obou metod u testování uměle infikovaných vzorků jsou zobrazeny v tabulce 4. Nejvyšší preciznost u obou metod byla zaznamenána u nejvyšší koncentrace vajíček. Preciznost je zřetelně vyšší u metody Simple McMaster.

Přesnost

Přesnost obou diagnostických technik z uměle infikovaných vzorků je zobrazena v tabulce 5. Nacházejí se zde relativní četnosti pro porovnání jednotlivých koncentrací a četnost absolutní. Přesnost Simple McMaster je zřetelně vyšší (93,3 %) než přesnost Mini-FLOTAC (57,72 %).

Tab. 5 Přesnost zobrazená pomocí střední odchylky od skutečného počtu vajíček u obou metod a 3 koncentrací, vyjádřeno v procentech

<i>H. diminuta</i>	50 vajíček	100 vajíček	1000 vajíček	Průměr
MF	55,5	60,8	56,85	57,72
SMM	90	100	90	93,33



Obr. 9 Boxploty spolehlivosti obou metod diagnostiky vajíček *Hymenolepis diminuta* u 3 koncentrací. Boxploty představují mediány (střední čáry), 25-75 percentily (boxy), odlehle hodnoty (tečky) a rozsah neodlehlejších hodnot (svorky). McM představuje McMaster, Mini je Mini-FLOTAC, EPG je svislá osa.

5.2 Přirozeně infikované vzorky

Trávicí trakt byl pitvou vyšetřen u 342 jedinců volně žijících hlodavců. Z tohoto počtu bylo 151 jedinců pozitivních a 191 jedinců negativních. Mini-FLOTAC byl použit u 96 vzorků, ze zbytku pozitivně testovaných trávicích traktů nebylo možné získat dostatečné množství výkalů (nejmenší možné množství bylo 0,03 g) k další diagnostice, proto u nich další část experimentu neproběhla. Vyšetřené druhy hostitelů a jejich počty jsou uvedeny v tabulce 6. Je zde také uvedena prevalence gastrointestinálních helmintů u hostitelů, u kterých byl vyšetřen dostatečný počet jedinců pro dosažení relevantního výsledku.

Tab. 6 Vyšetřené druhy hostitelů a počty jedinců

Vyšetřené druhy	celkem	pozitivní	negativní	prevalence GIH
<i>Microtus arvalis</i>	259	110	149	42,47 %
<i>Apodemus sylvaticus</i>	57	26	31	45,61 %
<i>Apodemus flavicollis</i>	16	8	8	50 %
<i>Myodes glareolus</i>	5	4	1	
<i>Arvicola amphibius</i>	3	2	1	
<i>Microtus agrestis</i>	2	1	1	
Celkem	342	151	191	44,15 %

Prevalence jednotlivých druhů helmintů byla vypočítána ze všech testovaných jedinců, u kterých byla prokázána pozitivita alespoň jednou ze dvou vyšetřovacích metod, a je zobrazena v tabulce č. 7. Vajíčka tasemnic a oxyuridních hlístic nebyla vždy rozlišena do jednotlivých rodů, proto je prevalence vypočítána pro celou skupinu.

Tab. 7 Prevalence helmintů u drobných zemních savců na Sokolovsku a Mostecku (%)

<i>Cestoda</i>	<i>Heligmosomum</i>	<i>Heligmosomoides</i>	<i>Trichuris</i>	<i>Capillaria</i>	Oxy. hlístice
22,51	5,26	8,77	8,48	3,22	11,70

Nejčastěji byli nalézáni parazité třídy *Cestoda*, kteří byli diagnostikováni celkem u 77 jedinců z celkového počtu 342 vyšetřených vzorků (22,51 %, viz tabulka 7). Následují oxyuridní hlístice s prevalencí 11,70 %, dále rody *Heligmosomoides* a *Trichuris*, u kterých je prevalence okolo 8,5 %.

Hlavním bodem druhé části experimentu bylo zjistit skutečnou spolehlivost diagnostiky vajíček gastrointestinálních parazitů metodou Mini-FLOTAC u volně žijících jedinců, kde kontrolní metodou pro ověření bylo přímé nalezení dospělců v trávicím traktu. V tabulce 8 jsou zobrazeny dosažené výsledky. Zde bylo hodnoceno procento shody metody MF a pitvy u pozitivních jedinců pro vyloučení navyšování procentní úspěšnosti na základě shody u negativních vzorků. Procentuální spolehlivost ze všech provedených testů je uvedena v tabulce číslo 9.

Tab. 8 Shoda metody Mini-FLOTAC s pitvou při diagnostice gastrointestinálních helmintů u pozitivních jedinců

	<i>Cestoda</i>	<i>Heligmosomum</i>	<i>Heligmosomoides</i>	<i>Trichuris</i>	<i>Capillaria</i>	Oxy. Hlístice	Celkem
Celkem poz.	39	14	26	16	5	22	122
Shoda poz.	5	2	4	9	2	3	25
Shoda %	12,82	14,29	15,38	56,25	40,00	13,64	20,49

Z tabulky 8 je patrná velmi nízká shoda obou diagnostických metod, přičemž nejúspěšněji byl metodou Mini-FLOTAC diagnostikován *Trichuris spp.* s procentuální úspěšností 56 %. Dalším rodem s vyšším procentem je rod *Capillaria*, u kterých je ovšem tento výsledek způsoben nízkým množstvím pozitivních vzorků spíše než výraznou shodou obou metod. Celková shoda výsledků obou metod byla 20,5 %, respektive ze 122 pozitivních vzorků bylo oběma metodami současně diagnostikováno pouze 25 vzorků (vyšší počet pozitivních výsledků než vyšetřených jedinců je způsoben kombinovanými infekcemi několika jedinců).

Tab. 9 Vyhodnocení shody metody Mini-FLOTAC s pitvou při diagnostice gastrointestinálních helmintů u všech testovaných jedinců

96 opakování	<i>Cestoda</i>	<i>Heligmosomum</i>	<i>Heligmosomoides</i>	<i>Trichuris</i>	<i>Capillaria</i>	Oxy. Hlístice	CELKEM
pitva pozitivní	38	10	26	15	2	19	110
koprol. pozitivní	6	6	4	10	5	6	37
přítomnost vajíček u pozitivní pitvy	5	2	4	9	2	3	25
A – shoda pitvy s koprol.	62	84	74	89	93	77	479
N – neshoda pitvy s koprol.	34	12	22	7	3	19	97
shoda v procentech	64,58	87,5	77,08	92,71	96,88	80,21	83,16

Při hodnocení všech vyšetřovaných vzorků bylo dosaženo vyšší procentuální úspěšnosti především pro vysoký počet negativních vzorků. Celková úspěšnost byla 83 %, pro závěry však toto procento není relevantní především právě v důsledku nízkého počtu pozitivních vzorků u některých druhů helmintů. Například u *Capillaria* je stejně jako u předchozích výsledků dosažená úspěšnost nejvyšší, téměř 97 %, ovšem z celkového počtu je nepřítomnost tohoto druhu zjištěna u 95 % jedinců, což značně zkresluje získaný výsledek shody obou metod.

Pro úplnost výsledků byl proveden Fisherův exaktní test, výsledek je uveden v tabulce 10. Jak je patrné, vše kromě *Capillaria* vykazuje signifikantní rozdíl ($p < 0,05$), tzn. liší se od očekávaných hodnot (stavu, kdy jsou obě metody 100% shodné). U *Capillarie* je to ovšem způsobeno nikoli vysokou úspěšností metody Mini-FLOTAC, ale opět malým počtem pozitivních jedinců.

Tab. 10 Výsledky Fisherova exaktního testu

	Cestoda	Heligmosomum	Heligmosomoides
p-value	3.29e-12	0.0003387	1.226e-07
	Trichuris	Capillaria	Oxy. Hlístice
p-value	0.01395	0.2461	1.421e-06
			CELKEM
			p-value < 2.2e-16

6 Diskuze

V práci byla hodnocena především spolehlivost relativně nové metody Mini-FLOTAC pro diagnostiku gastrointestinálních helmintů drobných zemních savců. Vedlejším výsledkem je prevalence těchto parazitů na Mostecku a Sokolovsku. V první části experimentu při ověřování předem definovaných počtů vajíček byl použit materiál z chovu laboratorních potkanů na ČZU, v druhé části testování byly použity výkaly a trávící trakty volně žijících jedinců.

Prevalence gastrointestinálních helmintů u vyšetřených jedinců volně žijících drobných zemních savců byla 45 %, což přibližně odpovídá zjištěné prevalenci v práci Čadkové a Válka (2013), ve které byly zkoumány podobné lokality a prevalence byla okolo 52 %.

Dle předchozích studií je Mini-FLOTAC nadějnou metodou pro diagnostiku gastrointestinálních parazitů především pro jeho nízkou cenu, vysokou citlivost a snadný postup přípravy vzorku zvířat (Barda et al. 2013; Silva et al. 2013; Barda et al. 2014a; Barda et al. 2014b; Maurelli et al. 2014a; Maurelli et al. 2014b; Rinaldi et al. 2014; Kenyon et al. 2016; Noel et al. 2017). Stejně jako v této práci je nejčastěji srovnáván se standardizovanou metodou McMaster v různých modifikacích (Silva et al. 2013; Barda et al. 2014a; Rinaldi et al. 2014; Noel et al. 2016; Nápravníková et al. 2019), případně s metodou Kato-Katz (Barda et al. 2014a, Nápravníková et al. 2019).

Nejuniverzálnější metodou ve veterinární parazitologii je technika McMaster (Vadlejch et al. 2011), která vykazovala v této práci jen nevýznamné odchylky od skutečnosti. V první části pokusu byla porovnána spolehlivost metody Mini-FLOTAC s metodou Simple McMaster pro detekci tasemnice *Hymenolepis diminuta*. Jak je však ukázáno v kapitole výsledky, spolehlivost metody Mini-FLOTAC v tomto experimentu nekoresponduje s dosud získanými poznatky. Zjištěná přesnost metody Mini-FLOTAC byla pouze 57,72 %, přesnost SMM vyšla 93,33 %. Variační koeficient MF byl 57 %, pro SMM 40 %. Významný rozdíl mezi různými koncentracemi není patrný. Barda et al. (2014a) uvádí pro tasemnici *Hymenolepis nana* Siebold, 1852 při použití shodného roztoku přesnost metody Mini-FLOTAC 92,7 %. Vajíčka *H. diminuta* jsou přibližně dvojnásobně větší než vajíčka *H. nana*, nelze je tedy zcela relevantně srovnávat. Nápravníková et al. (2019) ve své studii vyhodnotila spolehlivost MF pro detekci vajíček *Strongyloides* Grassi, 1879 na 74 %, SMM zde vykazoval 97% přesnost. Rinaldi et al. (2014) uvádí naproti tomu procento spolehlivosti u *Strongyloides* u ovcí 100 % pro MF a 75,9 % pro McMaster. Noel et al. (2017) prezentovala u koňských *Strongyloides* 42% přesnost u MF, 23% pak u McMasteru. Naopak při diagnostice vajíček *Ascaris* Linnaeus, 1758 u koní uvádí Nápravníková et al. (2019) vyšší přesnost MF, a to 90 %, SMM pouze 65 %, podobně jako Barda et al. (2014a), který zjistil pro MF spolehlivost 61 % oproti SMM – 48 %. Rozdíly ve výsledcích dosud provených studií mohou být způsobeny množstvím kritických bodů a chybami lidského faktoru. Vyloučena také není možnost, že testovaná metoda není citlivá na některé druhy helmintů.

Spolehlivost metody závisí na mnoha faktorech. Jak je uvedeno výše, jedním z faktorů může být druh parazita. Dalšími kritickými body mohou být: čerstvost vzorku, použitý flotační roztok, dodržení metodiky techniky, homogenizace, doba flotace, čitelnost/průhlednost vzorku, respektive vhodné cezení pro odstranění hrubých částí, chyba lidského faktoru. Porovnání výsledků studií je proto velice obtížné.

Ve druhé části experimentu byli diagnostikováni parazité volně žijících drobných zemních savců. Porovnávána byla metoda MF a přímá diagnostika parazitů z trávicího traktu pitvou. Limitujícím faktorem bylo především množství vzorku, pro naplnění alespoň jedné komory Mini-FLOTACU je potřeba 1 ml tekutiny. Nejmenší možné množství pro diagnostiku bylo 0,03 gramu výkalů, které se poté naředily vhodným poměrem flotačního roztoku. Někteří jedinci museli být proto z experimentu vyřazeni.

Vzhledem k opatřením souvisejícím s koronavirovou krizí byl experiment zjednodušen, protože v některých měsících nebyl možný vstup do laboratoře. Identifikování vajíček do druhu by bylo časově velmi náročné, parazité byli proto sloučeni do skupin a hodnoceni dohromady, například celá třída *Cestoda*. Nebylo také porovnáváno EPG s množstvím nalezených pohlavně dospělých jedinců, hodnocena byla pouze shoda pitvy a MF.

Nejvyšší úspěšnost vykazovala metoda při detekci vajíček *Trichuris* a *Capillaria*, která mají podobný tvar a velikost. Stejně tak vajíčka *Heligmosomoides* a *Heligmosomum* dosahovala podobné úspěšnosti (okolo 15 %). Tyto výsledky naznačují, že metoda Mini-FLOTAC by mohla být citlivější na některé tvary a typy vajíček, případně že pro detekci určitých tvarů či rozměrů je potřeba upravit postup přípravy vzorku, čas flotace nebo použitý roztok.

Kvalita čtení disku Mini-FLOTAC byla u většiny vzorků dobrá, u některých tmavších vzorků byl však problém s průhledností a tmavostí, což je způsobeno silnou vrstvou tvrdého plastu a relativně vysokou vrstvou tekutiny (u SMM je objem tekutiny pod 1 mřížkou 0,15 ml, v jedné komoře MF je 1 ml), kterou musí světlo projít. Především při použití již opakovaně používaných testovacích sad byla čitelnost horší. Stejně tak čáry sloužící k orientaci ve vzorku jsou široké a nevýrazné, což zvyšuje riziko chybovosti (započítání jednoho vajíčka vícekrát) a ztěžuje orientaci ve vzorku (Silva et al. 2013). Viditelnost těchto čar se také snižovala s počtem provedených opakování jednou sadou.

Výhodou metody MF je nízký multiplikační faktor, díky kterému je možné detekovat i velmi nízkou intenzitu infekce. Jak uvádí Cringoli et al. (2004) a Silva et al. (2013), metoda McMaster by mohla nadhodnocovat skutečnou hodnotu EPG/OPG právě kvůli vyššímu multiplikačnímu faktoru.

Pro experiment byl použit nasycený roztok NaCl. V případě drobného pochybení při přípravě vzorku bylo následně ve čtecím disku mnoho malých vzduchových bublin, které snižovaly čitelnost a zvyšovaly riziko nezapočítání vajíček. Mimo experiment bylo provedeno kontrolní otestování několika vzorků s použitím nasyceného roztoku síranu zinečnatého. Tyto vzorky neobsahovaly tolik vzduchových bublin a čitelnost byla výrazně lepší. Testování metody MF za použití jiných roztoků by mohlo být předmětem dalších studií.

Metoda Mini-FLOTAC je časově náročnější, vyžaduje 10 minut flotaci oproti 5 minutám u Simple McMaster. Noel et al. (2017) uvádí dokonce dvojnásobnou dobu potřebnou k celému provedení vzorku. V tomto experimentu byla doba přípravy jednoho vzorku zhruba 30 minut (10 minut flotace).

K setu Mini-FLOTAC je dodáván Fill-FLOTAC, který usnadňuje homogenizaci a celkovou přípravu vzorku. Při tomto experimentu však nemohl být použit, protože množství vzorku bylo v průměru 0,2 gramu. Z tohoto množství nebylo možné vzorek pomocí Fill-FLOTAC připravit. Homogenizace proto probíhala stejně jako při přípravě vzorku pro SMM, čímž byla jedna z výhod metody MF bohužel vyřazena.

Výsledky tohoto experimentu nekorespondují s doposud získanými výsledky ze studií porovnávajících Mini-FLOTAC a McMaster u různých druhů parazitů i hostitelů. Možnou příčinou je pohlavní nedospělost parazitů nalezených při pitvě, kterou nebylo možné z výše uvedených důvodů prokázat. V navazujícím výzkumu by bylo relevantní zhodnotit právě pohlavní dospělost parazitů a jejich počet a následně porovnat, zda koncentrace vajíček odpovídá jedincům detekovaným při parazitologické pitvě.

Problémem byla také nízká prevalence některých druhů helmintů u volně žijících drobných savců. Pro další studie by bylo vhodné vyhodnotit větší množství vzorků, případně odchytávat jedince na lokalitách s předpokládanou vyšší prevalencí.

7 Závěr

Hlavním cílem této práce bylo ověřit vhodnost a relevantnost metody Mini-FLOTAC pro diagnostiku propagačních útvarů gastrointestinálních helmintů parazitujících u hlodavců. Této metodě je v posledních letech věnována velká pozornost, protože se dle dosud dosažených výsledků jeví jako adekvátní alternativa metody McMaster, Mini-FLOTAC ovšem dokáže zachytit i nižší míru infekce díky nižšímu multiplikačnímu faktoru pro stanovení EPG. Spolehlivost Mini-FLOTAC byla v předešlých studiích ověřována u různých druhů obratlovců, hodnocena byla také pro mnohé druhy parazitů. V první části této práce byly využity výkaly laboratorních potkanů, do kterých byla uměle infikována vajíčka v předem definovaných koncentracích (50, 100, 1000). Vzorky byly vyšetřeny metodou Mini-FLOTAC a standardizovanou metodou Simple McMaster a výsledky byly porovnány.

První hypotéza říká, že koprologické vyšetření metodou Mini-FLOTAC poskytuje při stanovení EPG gastrointestinálních helmintů hlodavců stejně relevantní výsledky jako standartizovaná metoda McMaster. Tato hypotéza se nepotvrdila, zjištěná přesnost metody Mini-FLOTAC byla pouze 57,72 %, přesnost Simple McMaster odpovídala 93,33 %. Variační koeficient MF byl 57 %, SMM 40 %.

Druhá hypotéza tvrdí, že intenzita infekce *Hymenolepis diminuta* zjištěná metodou Mini-FLOTAC odpovídá reálnému počtu vajíček ve výkalech hlodavců. Toto tvrzení bylo také vyvráceno, výsledná přesnost vykazovala u koncentrace 50 přidaných vajíček 55,5 %, u 100 přidaných vajíček 60,8 %, u 1000 přidaných vajíček 56,9 %.

Ze třetí hypotézy vyplývá, že diverzita propagačních útvarů detekovaných metodou Mini-FLOTAC relevantně odráží druhové spektrum helmintů přítomných v gastrointestinálním traktu volně žijících hlodavců. I tato hypotéza byla zamítnuta. Celkové procento zachycení pozitivního jedince na jednotlivé druhy helmintů odpovídá pouze 20. Nejúspěšněji byl pomocí metody diagnostikován rod *Trichuris* (56 %). *Capillaria* dosahovala úspěšnosti 40 %, *Heligmosomoides* 15 %, *Heligmosomum* 14 %, oxyuridní hlístice 13,6 %, *Cestoda* pak pouze 12,8 %. Výsledná procenta jsou značně ovlivněna malou prevalencí některých druhů, například *Capillaria* byla identifikována pouze u 5 jedinců (u 2 byla infekce potvrzena metodou Mini-FLOTAC).

Vzhledem k velkému množství rizikových faktorů objevujících se v průběhu procesu přípravy vzorku je možné, že tento výsledek neodpovídající výsledkům ostatních studií je způsoben chybami lidského faktoru. Dominantním problémem bylo však nedostatečné množství vzorku, které je možné získat od jednoho hostitele (průměrně 0,2 gramu). Naplnění jedné komory Mini-FLOTAC (1 ml) bylo proto velmi obtížné.

Při opakování pokusu by bylo vhodné odchyťovat jedince na lokalitách s vyšší prevalencí, případně pokus opakovat pro získání většího počtu hostitelů. Dalším předmětem výzkumu může být testování Mini-FLOTAC za použití jiného roztoku. V tomto experimentu se v použitém roztoku NaCl tvořilo velké množství bublin. Použití například roztoku síranu zinečnatého by mohlo tento problém eliminovat.

8 Literatura

Abu-Madi, M., Behnke, J., Lewis, J., Gilbert, F. 2000. Seasonal and site specific variation in the component community structure of intestinal helminths in *Apodemus sylvaticus* from three contrasting habitats in south-east England. *Journal of Helminthology*. vol. **74** (issue 1). 7-15. doi: 10.1017/S0022149X00000020.

Allam, A. F., Farag, H. F., Lotfy, W., Fawzy, H. H., Elhadad, H., Shehab, A. Y. 2021. Comparison among FLOTAC, Kato-Katz and formalin ether concentration techniques for diagnosis of intestinal parasitic infections in school children in an Egyptian rural setting. **148** (3). 289-294. doi: 10.1017/S0031182020001675.

Anděra, M. 1999. *Savci* (2). Praha. Albatros. p. 147. ISBN: 80-000-0677-4.

Anderson, R. C. 2000. *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission* [Online]. Ed. 2. Wallingford. CABI. ISBN: 9780851994215.

Auer, H., Aspöck, H. 2014. Helminths and helminthoses in Central Europe: general overview and diseases caused by trematodes (flukes). **164** (19-20). 405-413. doi: 10.1007/s10354-014-0316-7.

Barda, B., Cajal, P., Villagran, E., Cimino, R., Juarez, M., Krolewiecki, A., Rinaldi, L., Cringoli, G., Burioni, R., Albonico, M. 2014. Mini-FLOTAC, Kato-Katz and McMaster: three methods, one goal; highlights from north Argentina. *Parasites & Vectors*. vol. **7** (issue 1). doi: 10.1186/1756-3305-7-271.

Barda, B., Ianniello, D., Zepheryne, H., Rinaldi, L., Cringoli, G., Burioni, R., Albonico, M. 2014. Parasitic infections on the shore of Lake Victoria (East Africa) detected by Mini-FLOTAC and standard techniques. *Acta Tropica*. vol. **137**. 140-146. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.05.012.

Barda, B., Rinaldi, L., Ianniello, D., Zepherine, H., Salvo, F., Sadutshang, T., Cringoli, G., Clementi, M., Albonico, M., Steinmann, P. 2013. Mini-FLOTAC, an Innovative Direct Diagnostic Technique for Intestinal Parasitic Infections: Experience from the Field. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. vol. **7** (issue 8). doi: 10.1371/journal.pntd.0002344.

Bejček, V., Jirouš, J. 1983: O savcích mosteckých výsypek a jejich endoparazitech. *Živa*. **2**. 74-76

Bukhari, Z., Smith, H. V. 1995. Effect of Three Concentration Techniques on Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts Recovered from Bovine Feces. **33** (10). 2592–2595.

Cringoli, G., Maurelli, M. P., Levecke, B., Bosco, A., Vercruysse, J., Utzinger, J., Rinaldi, L. 2017. The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. **12** (9). 1723-1732. doi: 10.1038/nprot.2017.067.

- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M. P., Utzinger, J. 2010. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. **5** (3). 503-515. doi: 10.1038/nprot.2009.235.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., Scala, A. 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. **123** (1-2). 121-131. doi: 10.1016/j.vetpar.2004.05.021.
- Čadková, Z., Válek, P. 2013. Prevalence gastrointestinálních helmintů u drobných zemních savců v oblasti severozápadních Čech. In Sborník Oblastního muzea v Mostě, řada přírodovědná. **34/2012** (2013). --s.3-13
- Deter, J., Chaval, Y., Galan, M., Berthier, K., Salvador, A. R., Casanova Garcia, J. C., Morand, S., Cosson, J. -F., Charbonnel, N. 2007. Linking demography and host dispersal to *Trichuris arvicolae* distribution in a cyclic vole species. **37** (7). 813-824. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.01.012.
- Dias de Castro, L. L., Abrahão, C. L. H., Buzatti, A., Molento, M. B., Bastianetto, E., Rodrigues, D. S., Lopes, L. B., Silva, M. X., de Freitas, M. G., Conde, M. H., Borges, F. de A. 2017. Comparison of McMaster and Mini-FLOTAC fecal egg counting techniques in cattle and horses. **10**. 132-135. doi: 10.1016/j.vprsr.2017.10.003
- Dunn, A., Keymer, A. 1986. Factors affecting the reliability of the McMaster technique. **60** (4). 260-262. doi: 10.1017/S0022149X00008464.
- Fuentes, M., Fuentes, M., Sáez, S., Trelis, M., Galán-Puchades, M., Esteban, J. 2004. The helminth community of the wood mouse, *Apodemus sylvaticus*, in the Sierra Espuña, Murcia, Spain. Journal of Helminthology. vol. **78** (issue 3). 219-223. doi: 10.1079/JOH2003226.
- Gordon, H., Whitlock, H. V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **12** (1). 50-52.
- Harris, W. G., Turton, J. A. 1973. Antibody Response to Tapeworm (*Hymenolepis diminuta*) in the Rat. **246** (5434). 521-522. doi: 10.1038/246521a0.
- Haukisalmi, V., Hardman, L., Hoberg, E., Henttonen, H. 2014. Phylogenetic relationships and taxonomic revision of *Paranoplocephala* Lühe, 1910 sensu lato (*Cestoda*, *Cyclophyllidea*, *Anoplocephalidae*). Zootaxa. vol. **3873** (issue 4). 371-415. doi: 10.11646/zootaxa.3873.4.3.
- Haukisalmi, V., Henttonen, H., Tenora, F. 1988. Population Dynamics of Common and Rare Helminths in Cyclic Vole Populations. The Journal of Animal Ecology. vol. **57** (issue 3). doi: 10.2307/5094.

Huffman, J. E., Fried, B. 1990. *Echinostoma* and Echinostomiasis. In: Advances in Parasitology Vol. **29**. pp. 215-269. Elsevier. ISBN: 9780120317295.

Chai, J. -Y., Sohn, W. -M., Na, B. -K., Van De, N. 2011. *Echinostoma revolutum: Metacercariae* in Filopaludina Snails from Nam Dinh Province, Vietnam, and Adults from Experimental Hamsters. Korean J parasitol. **49** (4). 55. doi: 10.3347/kjp.2011.49.4.449.

Kenyon, F., Rinaldi, L., McBean, D., Pepe, P., Bosco, A., Melville, L., Devin, L., Mitchell, G., Ianniello, D., Charlier, J., Vercruyse, J., Cringoli, G., Levecke, B. 2016. Pooling sheep faecal samples for the assessment of anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC in gastrointestinal strongyle and *Nematodirus* infection. Veterinary Parasitology. vol. **225**. 53-60. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.03.022.

Knopp, S., Rinaldi, L., Khamis, I. S., Stothard, J. R., Rollinson, D., Maurelli, M. P., Steinmann, P., Marti, H., Cringoli, G., Utzinger, J. 2009. A single FLOTAC is more sensitive than triplicate Kato-Katz for the diagnosis of low-intensity soil-transmitted helminth infections. **103** (4). 347-354. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.11.013.

Kołodziej, P., Rzymowska, J., Stępień-Rukasz, H., Lorencowicz, R., Lucińska, M., Dzióbek, M. 2014. Analysis of a child infected with *Hymenolepis diminuta* in Poland. Annals of Agricultural and Environmental Medicine. vol. **21** (issue 3). 510-511. doi: 10.5604/12321966.1120592.

Kouassi, R., McGraw, S., Yao, P., Abou-Bacar, A., Brunet, J., Pesson, B., Bonfoh, B., N'goran, E., Candolfi, E. 2015. Diversity and prevalence of gastrointestinal parasites in seven non-human primates of the Taï National Park, Côte d'Ivoire. Parasite. vol. **22**. doi: 10.1051/parasite/2015001.

Kratochvíl, J. 1959. Hraboš polní: *Microtus arvalis*. Československá akademie věd, Praha.

Kreisinger, J., Bastien, G., Hauffe, H., Marchesi, J., Perkins, S. 2015. Interactions between multiple helminths and the gut microbiota in wild rodents. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. vol. **370** (issue 1675). doi: 10.1098/rstb.2014.0295.

MAFF, 1986. Manual of veterinary parasitological laboratory techniques. London. H.M. Stationery Off. p. 24 pp. ISBN: 0112409180.

Maurelli, M., Rinaldi, L., Alfano, S., Pepe, P., Coles, G., Cringoli, G. 2014. Mini-FLOTAC, a new tool for copromicroscopic diagnosis of common intestinal nematodes in dogs. Parasites & Vectors. vol. **7** (issue 1). doi: 10.1186/1756-3305-7-356.

Maurelli, M., Rinaldi, L., Rubino, G., Lia, R., Musella, V., Cringoli, G. 2014. FLOTAC and Mini-FLOTAC for uro-microscopic diagnosis of *Capillaria plica* (syn. *Pearsonema plica*) in dogs. BMC Research Notes. vol. **7** (issue 1). doi: 10.1186/1756-0500-7-591.

McMaster Precision Chambered Counting Slides for Faecal Egg Counting. McMaster Precision Chambered Counting Slides for Faecal Egg Counting. [Online] In: Evidence Based Worming. Retrieved from <https://evidencebasedworming.com.au/product/chalex-precision-chambered-counting-slides/>

Mes, T. H. M. 2003. Technical variability and required sample size of helminth egg isolation procedures. **115** (4). 311-320. doi: 10.1016/S0304-4017(03)00219-X.

Mönnig, H. 1949. Veterinary helminthology and entomology: the diseases of domesticated animals caused by helminth and arthropod parasites. Baltimore. Williams & Wilkins.

Nápravníková, J., Petrtýl, M., Stupka, R., Vadlejch, J. 2019. Reliability of three common fecal egg counting techniques for detecting strongylid and ascarid infections in horses. Veterinary parasitology. **272**. 53-57. doi: 10.1016/j.vetpar.2019.07.001.

Noel, M., Scare, J., Bellaw, J., Nielsen, M. 2017. Accuracy and Precision of Mini-FLOTAC and McMaster Techniques for Determining Equine Strongyle Egg Counts. [Online] Journal of Equine Veterinary Science. vol. **48**. 182-187.e1. doi: 10.1016/j.jevs.2016.09.006.

Ondříková, J., Miklisová, D., Ribas, A., Stanko, M. 2010. The helminth parasites of two sympatric species of the genus *Apodemus* (*Rodentia*, *Muridae*) from south-eastern Slovakia. Acta Parasitologica. vol. **55** (issue 4). doi: 10.2478/s11686-010-0043-1.

Pereckienė, A., Kaziūnaitė, V., Vyšniauskas, A., Petkevičius, S., Malakauskas, A., Šarkūnas, M., Taylor, M. 2007. A comparison of modifications of the McMaster method for the enumeration of *Ascaris suum* eggs in pig faecal samples. Veterinary Parasitology. vol. **149** (1-2). 111-116. doi: 10.1016/j.vetpar.2007.04.014.

Pullan, R., Smith, J., Jasrasaria, R., Brooker, S. 2014. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. Parasites & Vectors. vol. **7** (issue 1). doi: 10.1186/1756-3305-7-37.

Rinaldi, L., Levecke, B., Bosco, A., Ianniello, D., Pepe, P., Charlier, J., Cringoli, G., Vercruyse, J. 2014. Comparison of individual and pooled faecal samples in sheep for the assessment of gastrointestinal strongyle infection intensity and anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC. Veterinary Parasitology. vol. **205** (1-2). 216-223. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.06.011.

Roepstorff, A., Nansen, P. 1998. Epidemiology, Diagnosis and Control of Helminth Parasites of Swine. Rome. FAO. ISBN: 92-5-104220-9.

Sharpe, G. I. 1964. The helminth parasites of some small mammal communities. I. The parasites and their hosts. **54** (1). 145-154. doi: 10.1017/S0031182000074436.

Silva, L., Vila-Viçosa, M., Maurelli, M., Morgoglione, M., Cortes, H., Cringoli, G., Rinaldi, L. 2013. Mini-FLOTAC for the diagnosis of *Eimeria* infection in goats: An alternative to McMaster. *Small Ruminant Research*. vol. **114** (2-3). 280-283. doi: 10.1016/j.smallrumres.2013.06.017.

Steinmann, P., Cringoli, G., Bruschi, F., Matthys, B., Lohourignon, L. K., Castagna, B., Maurelli, M. P., Morgoglione, M. E., Utzinger, J., Rinaldi, L. 2012. FLOTAC for the diagnosis of *Hymenolepis spp.* infection: proof-of-concept and comparing diagnostic accuracy with other methods. **111** (2). 749-754. doi: 10.1007/s00436-012-2895-9.

Taylor, M. A., Coop, R. L., Wall, R. L. 2015. *Veterinary Helminthology*. In: *Veterinary Parasitology*. pp. 1-109. Hoboken, NJ, USA. John Wiley. ISBN: 9781119073680.

Taylor, R. 2019. Nematodes and other worms. In: *Taylor's Power Law*. pp. 143-234. Elsevier. ISBN: 9780128109878.

Tenora, F. 2015. Corrections in the taxonomic position in the helminth-fauna of *Apodemus spp.* (*Rodentia*) in the Czech Republic. **52** (2). 7-14. doi: 10.11118/actaun200452020007.

Tenora, František, Vlastimil Baruš, and Miroslav Prokeš. 2015. "Discussion to several tapeworm species from the families *Hymenolepididae*, *Anoplocephalidae* and *Davaineidae* parasitizing rodents and man." *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* **52.1** (2015): 23-28.

Tully, T. 2009. MICE AND RATS. In: *Manual of Exotic Pet Practice*. pp. 326-344. Elsevier. ISBN: 9781416001195.

Vadlejch, J., Petrtýl, M., Zaichenko, I., Čadková, Z., Jankovská, I., Langrová, I., Moravec, M. 2011. Which McMaster egg counting technique is the most reliable? **109** (5). 1387-1394. doi: 10.1007/s00436-011-2385-5.

Whary, M., Baumgarth, N., Fox, J., Barthold, S. 2015. *Biology and Diseases of Mice*. In: *Laboratory Animal Medicine*. pp. 43-149. Elsevier. ISBN: 9780124095274.

Whitlock, H. V. 1948. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. *Journal Of The Council For Scientific And Industrial Research*. **21**. 177-180.

Wilson, D. E., Lacher, T. E., Mittermeier, R. A. 2017. *Handbook of the Mammals of the World – Vol. 7: Rodents II*. Barcelona. Lynx Edicions. p. 1008. ISBN: 978-84-16728-04-6.

Zajac, A. M., Conboy, G. A. 2012. *Veterinary Clinical Parasitology*. 8th. Hoboken. Wiley-Blackwell. ISBN: 978-0-813-82053-8.

Zikmundová, J., Georgieva, S., Faltýnková, A., Soldánová, M., Kostadinova, A. 2014. Species diversity of *Plagiorchis* Lühe, 1899 (*Digenea: Plagiorchiidae*) in lymnaeid snails from

freshwater ecosystems in central Europe revealed by molecules and morphology. **88** (1). 37-54. doi: 10.1007/s11230-014-9481-8

