

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zoologie a rybářství**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Výskyt exogenních stádií parazitů v dětských pískovištích.**

**Bakalářská práce**

**Eliška Hastrdlová**

**Zoorehabilitace a asistenční aktivity se zvířaty**

**prof. Ing. Iva Langrová, CSc.**

**© 2023 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci " Výskyt exogenních stádií parazitů v dětských pískovištích " jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.4.2023

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala paní profesorce Ing. Ivě Langrové, CSc, za odborné vedení mé práce a neutuchající trpělivost, ochotu a vlídnost. Mé díky patří také probdělým nocím, rodině a přátelům za povzbudivá slova, pevnou ruku a laické oko.

# Výskyt exogenních stádií parazitů v dětských pískovištích.

## Souhrn

Tato práce se zabývá charakteristikou půdně-přenášenými endoparazity psů a koček se zoonotickým potenciálem, respektive výskytem a diagnostikou jejich exogenními stádií. Konkrétně to jsou *Toxocara* spp., čeleď Taeniidae a *Trichuris vulpis*.

Tito paraziti mají většinou složitý vícehostitelský vývojový cyklus, který zahrnuje mezihostitele v podobě přežvýkavců, hlodavců či zajícovců lovené masožravými definitivními hostiteli. K nákaze dochází převážně perorální cestou.

Z hlediska ohrožení zdraví člověka je třeba dbát na příslušná preventivní a hygienická opatření proti šíření zoonotických parazitóz. Nejvíce náchylní k infekci jsou imunodeficientní lidé, děti, obyvatelé rozvojových zemí a lidé stravující se syrovým masem nebo neomytou zeleninou.

Exogenní stádia těchto parazitů nalezneme v různých typech enviromentálního prostředí (voda, půda, rostliny) a místech, kde dochází k vyměšování definitivních hostitelů, a to i v úzkém kontaktu s lidskou populací (parky, dětská hřiště, zahrady atd.) skoro na všech kontinentech. To poukazuje na širokou variabilitu a vysokou odolnost přežití v extrémních podmínkách různého podnebí.

Metody detekce kontaminace prostředí nejsou ustálené, proto jsou v této rešerši zmíněné základní konvenční techniky založené na mikroskopii s popisem jednotlivých fází: separace vajíček; filtrace; sedimentace a centrifugace; flotace. Detail je kladen i na Kato-Katz tlustý stěr, FLOTAC a McMaster metodu.

Kromě mikroskopických metod se využívají i finančně a technicky náročnější molekulární metody PCR a LAMP, které jsou vysoce citlivé a dokáží rozlišovat mezi druhy a poddruhy. Navíc v diagnostice nepotřebují vycházet z morfologického tvaru. Výhledem do budoucna jsou PCR v digitální podobě a metoda BacLight.

**Klíčová slova:** *Toxocara*, *Echinococcus*, pískoviště, půda, *Taenia*

# Occurrence of parasite exogenous stages in children's sandpits.

## Summary

This thesis deals with the characterization of soil-transmitted endoparasites of dogs and cats with zoonotic potential, respectively the occurrence and diagnosis of their exogenous stages. Specifically, these are *Toxocara* spp., Taeniidae and *Trichuris vulpis*.

These parasites usually have a complex multi-host life cycle involving intermediate hosts in the form of ruminants, rodents or lagomorphs preyed upon by carnivorous definitive hosts. Infection occurs predominantly by the oral route.

With regard to the threat to human health, appropriate preventive and hygienic measures against the spread of zoonotic parasites should be taken. The most susceptible to infection are immunodeficient people, children, people living in developing countries and people eating raw meat or unwashed vegetables.

The exogenous stages of these parasites are found in various types of environmental settings (water, soil, plants) and sites where definitive hosts are excreted, even in close contact with human populations (parks, playgrounds, gardens, etc.) on almost all continents. This shows the wide variability and high survival resistance in extreme conditions of different climates.

Methods for detecting environmental contamination are not established, so the basic conventional techniques based on microscopy are mentioned in this review, with a description of the following steps: egg separation; filtration; sedimentation and centrifugation; flotation. Detail is also given to the Kato-Katz thick smear, FLOTAC and the McMaster method.

In addition to microscopic methods, the more costly and technically demanding molecular methods of PCR and LAMP are used, which are highly sensitive and can differentiate between species and subspecies. In addition, they do not need to be based on morphological shape for diagnosis. Future prospects include PCR in digital form and the BacLight method.

**Keywords:** *Toxocara*, *Echinococcus*, sandpits, soil, *Taenia*

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Cíl práce</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Vybraní půdně-přenosní zoonotičtí parazité</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1</b>	<b>Toxocara spp.</b> .....	<b>10</b>
3.1.1	Toxokaróza .....	12
<b>3.2</b>	<b>Taeniidae</b> .....	<b>13</b>
3.2.1	<i>Taenia</i> spp.....	13
3.2.1.1	Zoonózy.....	14
3.2.1.2	Přežvýkavci jako mezihostitelé.....	16
3.2.1.3	Zajícovci a holodavci jako mezihostitelé .....	19
3.2.1.4	Lokace psích tasemnic .....	20
3.2.2	<i>Echinococcus</i> spp.....	21
3.2.2.1	Echinokokóza .....	23
<b>3.3</b>	<b>Trichuris vulpis</b> .....	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>Výskyt exogenních stádií parazitů</b> .....	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>Metody detekce kontaminace prostředí exogenními stádii parazitů</b> .....	<b>28</b>
<b>5.1</b>	<b>Konvenční metody – mikroskopie</b> .....	<b>28</b>
5.1.1	Kato–Katz tlustý stěr .....	29
5.1.2	Základní techniky .....	29
5.1.2.1	Separace vajíček od velkých částic .....	29
5.1.2.2	Filtrace vzorku.....	30
5.1.3	Pasivní sedimentace nebo centrifugace .....	31
5.1.4	Flotační technologie.....	32
5.1.4.1	McMaster metoda.....	32
5.1.4.2	FLOTAC .....	32
<b>5.2</b>	<b>Kultivace</b> .....	<b>33</b>
<b>5.3</b>	<b>Molekulární techniky</b> .....	<b>33</b>
5.3.1	PCR, qPCR, LAMP .....	33
<b>5.4</b>	<b>Moderní techniky</b> .....	<b>34</b>
5.4.1	Digitální PCR, ddPCR, BacLight .....	34
<b>5.5</b>	<b>Skladování</b> .....	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>Životaschopnost/ infekceschopnost vajíček helmintů dle typu prostředí</b> .....	<b>36</b>
<b>6.1</b>	<b>Písek</b> .....	<b>36</b>
<b>6.2</b>	<b>Voda</b> .....	<b>37</b>
6.2.1	odpadní voda/kal.....	37

<b>6.3</b>	<b>Půda</b> .....	<b>38</b>
<b>6.4</b>	<b>Zelenina/traviny</b> .....	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>Literatura</b> .....	<b>41</b>

# 1 Úvod

S rostoucí oblibou chovu psů a koček u lidí stoupá i riziko v přenosu různých parazitárních infekčních onemocnění. Lidé jsou tak denně vystavováni skryté hrozbě v podobě endoparazitů přenášených přímým kontaktem s jejich domácími mazlíčky nebo nepřímým kontaktem s kontaminovaným prostředím (Rostami et al. 2019), kam docházejí vylučovat (parky, pískoviště apod.). Nejvyššímu riziku jsou tak vystavené děti, které mají nedostatečné hygienické návyky. Další ohroženou skupinou jsou lidé s imunitním oslabením, obyvatelé rozvojových zemí bez kvalitní lékařské péče nebo lidé, kteří preferují syrovou stravu (především maso). Ovšem největšímu riziku jsou vystavena samotná zvířata.

Tato práce se zabývá nejčastěji se vyskytujícími půdně-přenosnými endoparazitami se zoonotickým charakterem u volně pobíhajících šelem. Soustředí se zejména na jejich exogenní stádia v podobě vajíček, typická pro šíření těchto parazitů. Dospělci jsou schopni vyprodukovat až 200 000 vajíček za den (Rubinsky-Elefant et al. 2010; Strube et al. 2013).

Exogenní stádia těchto parazitů jsou téměř nezničitelná. Nebezpečí těchto parazitů tkví právě v množství a odolnosti jejich vajíček, kdy dokáží přežít extrémní teplotní podmínky, tak i v různých typech environmentálního prostředí, včetně vody, půdy, rostlin (Raičević et al. 2021), kde mohou setrvávat v prostředí po několik let (Overgaauw & Nederland 1997; Rubinsky-Elefant et al. 2010; Fan et al. 2013; Traversa et al. 2014; Rostami et al. 2019).

Tito parazité jsou celosvětově rozšířeni, porovnávám zde kromě životaschopnosti a možného výskytu i prevalenci v jednotlivých endemických státech celého světa.

Podstatnou částí v zamezení šíření zoonóz je nejen prevence v podobě podávání anthelmintik, mechanických zábran, dodržování hygienických návyků, ale i včasná a přesná diagnostika. I přes to, že neexistuje všeobecně uznávaná jednotná diagnostická metoda, vědci se stále posouvají vpřed a snaží se o vývoj nových diagnostických metod, kterými by mohly detekovat rozsah kontaminace v prostředí s co největší přesností. Avšak s rostoucí rychlostí provedení a přesností diagnostických technik, roste i jejich cena, proto se preferují nenáročné a jednoduché tzv. konvenční metody, které zahrnují mikroskopii.



## **2 Cíl práce**

Cílem práce bylo zpracování literární rešerše podle dostupné literatury. Porovnat a zjistit metody detekce kontaminace prostředí, životaschopnost a výskyt exogenních stádií parazitů dle typu prostředí. Většina parazitů volně pobíhajících šelem (psů, koček, lišek apod.) má zoonotický charakter a je tedy důležité znát míru nebezpečí pro malé děti a navrhnout vhodná preventivní opatření.

## 3 Vybraní půdně-přenosní zoonotičtí parazité

### 3.1 *Toxocara* spp.

*Toxocara* spp. obsadila deváté místo v žebříčku deseti nejčastěji potravinami přenášenými parazity v Evropě, za rok 2016 (Bouwknegt et al. 2018).

Patří tak mezi nejznámější z kmene hlístic (Nematoda) parazitující u šelem, řádu Ascaridida, nadčeledi Ascaridoidea (Fan et al. 2013). Ty jsou charakteristické třemi pysky kolem ústního otvoru. Rod *Toxocara* má obecně protáhlé až nitkovité tělo oblého tvaru.

Geograficky nejrozšířenější a nejvýznamnější zoonotický druh škrkavek, *Toxocara canis*, infikuje širokou škálu psovitých šelem, včetně psů, lišek, vlků, šakalů a dalších. Zatímco *Toxocara cati* a *Toxocara malaysiensis* infikují kočkovité šelmy (Rostami et al. 2019). Ačkoli infekce psů a koček těmito parazity byly popisovány po více než dvě století, teprve v 50. letech 20. století byly *Toxocara canis* a *Toxocara cati* uznány za důležité lidské patogeny (Rubinsky-Elefant et al. 2010).

Lokalizace těchto hlístic v definitivních hostitelích, jejich morfologie, stejně jako měření vajíček a dospělých červů jsou podobné. Vajíčka *T. canis* a *T. cati* lze morfologicky rozlišit na základě tvaru, velikosti jamek a jejich okolní albuminové elevace (Uga et al. 2000). Dospělí samci *T. canis* dorůstají délky kolem 6–18 cm, samice 4–10 cm. *Toxocara cati* měří až 10 cm (Glickman & Schantz 1981).

Celosvětové průzkumy *T. canis* ukázaly, že prevalence se pohybuje v rozmezí 86 až 100 % u štěňat a 1 až 45 % u dospělých psů. Zdá se, že podíl koček infikovaných *T. cati* je relativně vysoký, například 79 % toulavých koček v průzkumu provedeném v Dánsku a 91 % divokých koček na farmách ve Velké Británii (Fan et al. 2013).

Kromě definitivních hostitelů využívají i paratenické („transportní“ hostitelé, pouze parazita přenáší, nevyvíjí se v něm), mezi nimiž najdeme některé bezobratlé, ale i řadu dalších savců zahrnujících hlodavce (myši a potkani), zajícovce (králíci), přežvýkavce (skot), prasata (prasata), ptáky (kuřata) nebo člověka (Rostami et al. 2019; Magnaval et al. 2022).

Životní cykly *Toxocara canis* a *Toxocara cati* jsou složité. Jejich biologická podstata jim zajišťuje mimořádnou odolnost. Dokážou pozastavit vývoj svého životního cyklu v paratenickém hostiteli na úrovni larvy a pokračovat do stádia dospělce až po dosažení definitivního hostitele. Schopnost několika typů migrací přispívá k jejich rozšíření mezi jednotlivými druhy různých věkových kategorií, míra výskytu je však nejvyšší u mladých psů a koček, mnohem méně se vyskytuje u dospělých zvířat (Overgaauw & Nederland 1997; Maizels 2013).

Dospělci žijí v tenkém střevě volně žijících nebo domácích definitivních hostitelů, kteří po dobu patence vylučují vajíčka, která se šíří ve velkém množství výkaly (Rostami et al. 2019). Samice *Toxocara* produkují až 200 000 vajíček denně (Rubinsky-Elefant et al. 2010; Strube et al. 2013).

Tato vajíčka následně kontaminují životní prostředí nebo i srst hostitelů, kde se za příznivých teplotních a vlhkostních podmínek během několika týdnů až měsíční periodě embryonalizují (vyvíjí se v zárodek) a stávají se infekčními. Takto mohou setrvávat v prostředí po několik let i v drsných podmínkách (např. mohou odolávat chemickým látkám, širokému teplotnímu rozmezí atd.), a jsou tak k dispozici pro požití kdykoli vnímavými hostiteli (Overgaauw & Nederland 1997; Rubinsky-Elefant et al. 2010; Fan et al. 2013; Traversa et al. 2014; Rostami et al. 2019). K embryonalizaci konkrétně dochází v půdě během dvou až pěti týdnů v závislosti na teplotě a vlhkosti. Při teplotě 12–18 °C je k tomu zapotřebí 54 dní, zatímco při 25–30 °C se tato doba zkrátí na 14 dní. Nicméně bylo prokázáno, že infekční vajíčka za optimálních podmínek přežívají nejméně 1 rok (Fan et al. 2013).

Stejně jako vajíčka jiných Askaridů, plně embryonovaná vajíčka *Toxocar* obsahují larvy třetího stádia (L3), které jsou infekční pro savce, a protože zůstávají uvnitř kutikuly larvy druhého stadia, bývají za ně často zaměňovány (Rubinsky-Elefant et al. 2010).

Po požití vajíček *Toxocar* se začínají v tenkém střevě líhnout larvy třetího stádia, nebo se uvolňují z tkání během trávení, které migrují skrz střevní stěnu do krevního řečiště odkud prostupují portálními žilami do jater. Přes játra se dostávají plicním oběhem do plic, čímž znovu vstupují do systémového oběhu, který je rozvádí po celém těle. Jsou tak schopny po různé dlouhou dobu opakovaně migrovat buď do svaloviny nebo orgánů včetně jater, plic a centrálního nervového systému (Rubinsky-Elefant et al. 2010; Maizels 2013; Magnaval et al. 2022).

V tkáních se velký podíl L3 dostává do stavu dormace (hypobiózy; pozastavují svůj vývoj), pomocí čehož může zůstat životaschopná po dobu nejméně několika měsíců, než juvenilní paraziti pokračují v dokončení životního cyklu. Jiné se zachytí uvnitř granulomů a následně jsou zničeny hostitelem, přesněji imunologickou reakcí proti rozpustným larválním antigenům exkrementně-sekrecního původu (TES) (Magnaval et al. 2022).

Typ migrace závisí na druhu příjemce, věkové kategorii a aktuální reprodukční fázi jedince. U mladých psů a koček dochází k migraci tracheální cestou přes plíce a průdušnici do ústní dutiny, po polknutí se larvy dostanou do střeva, kde dospívají (Overgaauw & Nederland 1997).

U paratenických hostitelů a u většiny dospělých psů a koček, které mají určitý stupeň získané imunity, procházejí larvy somatickou migrací, kdy zůstávají larvy ve spící formě v tkáních. Po predaci paratenického hostitele psy nebo kočkami jsou tyto larvy uvolněny a vyvíjejí se z nich v dospělé škravku ve střevním traktu. U samic psovitých a kočkovitých šelem mohou larvy přebývat v tkáních až do doby, než dojde k březosti. Reaktivované larvy účelně infikují plod transplacentární cestou u fen, nebo novorozená štěňata a koťata prostřednictvím mleziva (Overgaauw & Nederland 1997; Maizels 2013).

### 3.1.1 Toxokaróza

Toxokaróza je klinické onemocnění člověka způsobené infekcí zoonotickými škrkavkami masožravců, nejčastěji psů a koček *Toxocara canis* a *T. cati* (Overgaauw & Nederland 1997; Rostami et al. 2019). Představuje závažný epidemiologický problém v mnoha zemích světa (Strube et al. 2013; Fan et al. 2013). Prevalence *Toxocara* spp. v hostitelích závisí na prostředí i hygienických podmínkách v okolí (Strube et al. 2013).

Séroprevalence u lidí v evropských zemích, konkrétně ve Francii, České republice a Rakousku, se pohybuje od 2 % až 44 % s vyššími hodnotami ve venkovských oblastech. V tropických zemích se séroprevalence pohybuje v rozmezí od 6 % na Bali (Indonésii) a až po téměř 93 % na francouzském ostrově La Réunioni, což zdůrazňuje, že v této oblasti je zapotřebí zvýšit prevenci přenosu (Rubinsky-Elefant et al. 2010; Strube et al. 2013).

Riziko infekce se zvyšuje při geofágii neboli pojídání půdy a také při nedostatečné osobní hygieně (Strube et al. 2013). Lidé se infikují různými cestami a předpokládá se, že děti se obvykle nakazí náhodným požitím infekčních vajíček *Toxocar* z kontaminovaného prostředí (např. pískoviště) nebo příležitostně konzumací bezobratlých živočichů, jako jsou žížaly. Zatímco někteří lidé se nakazí požitím tkání infikovaných obratlovců (paratenických hostitelů). Člověk se tedy nakazí především pozřením vajíček parazita u nemyté zeleniny, nebo v menší míře konzumací nedostatečně tepelně upravených až syrových tkání, jater přežvýkavců či kuřat (Overgaauw & Nederland 1997; Fan et al. 2013).

Přestože mnoho infekcí způsobených *Toxocara* spp. jsou bezpříznakové (asymptomatické), migrace larev do vnitřních orgánů prostřednictvím krevního řečiště může vést k různým klinickým syndromům. Projevy příznaků u lidské toxokarózy závisí na mnoha faktorech, včetně toho, které orgány jsou postiženy, rozsahu infekce a věku hostitele. Toxokaróza je však obvykle onemocnění, které nevede k úmrtí. Jen vzácně byly hlášeny různé stupně zánětlivého poranění spojené s granulomatózní hepatitidou, astma, endomyokarditidou, generalizovanou lymfadenopatií, endoftalmitidou, kožními projevy a meningoencefalitidou v případech dětských nebo dospělých pacientů (Fan et al. 2013). Za bezprostřední původ symptomů se hlavně považuje reaktivní přecitlivělost na mrtvé larvy při migraci visceral larvy migrans (Strube et al. 2013).

Vzhledem k variabilitě příznaků a symptomů onemocnění, se v současné době lidská toxokaróza lze klasifikovat jako systémová (generalizovaná) nebo oddělená (kompartmentalizovaná). Systémové formy zahrnují hlavní syndrom viscerální larva migrans (VLM) a minoritní běžnou/skrytou toxokarózu. Mezi kompartmentalizované syndromy patří oční (OLM) nebo neurologická toxokaróza (NT) (Fan et al. 2013; Strube et al. 2013; Magnaval et al. 2022).

## 3.2 Taeniidae

Řád kruhovkovitých tasemnic (Cyclophyllidea) zahrnuje téměř všechny taxony, které jsou parazity suchozemských obratlovců. Mezi tuto rozmanitou skupinu patří i čeleď Taeniidae, podčeleď Taeniinae a Echinococcinae s nejvýznamnějšími rody *Taenia* a *Echinococcus*. Vyskytují se jako dospělci ve střevech masožravců a všežravců, včetně lidí, po celém světě (Hoberg 2002; Bobes et al. 2014).

### 3.2.1 *Taenia* spp.

Jedinci *Taenia* jsou obecně velcí a nápadní jako dospělci, často přesahující několik metrů délky, s výrazně segmentovaným stužkovitým strobilou a charakteristickým uspořádáním rostellárních háčků na scolexu (Hoberg 2002).

Druhy *Taenia* jsou jedny z nejstarších rozpoznávaných helmintů u lidí, písemné záznamy o těchto parazitech sahají až do antiky. Zvláště první složité životní cykly pro jakékoli tasemnice, s propojením larvální a dospělé morfologie a ontogeneze v souvislosti s uznáním ekologického základu pro přenos mezi mezihostitelem a definitivním hostitelem, byly prokázány před více než 150 lety (Hoberg 2002).

Životní cyklus *Taenia* je zpravidla dvouhostitelský, definitivním hostitelem jsou šelmy nebo všežravci (například kočkovití, psovití, lasicovití, hyenovití a lidé), mezihostitelem býložravci (především sudokopytníci, hlodavci a zajícovci). Mezihostitel je infikován cysticerky v svalovině, vnitřních orgánech nebo centrálním nervovém systému v závislosti na druhu *Taenie*. Dospělé tasemnice se vyvíjí v intestinálním (střevním) lumenu definitivního hostitele po požití infekčních cysticerků. Prepatentní doba se liší dle druhu. Vajíčka nebo gravidní proglottidy obsahující onkosféry jsou vylučovány výkaly a když jsou pozřeny vhodným býložravcem, dokončí vývoj do infekčního stádia cysticerků (Hoberg 2002).

Přenos je ekologicky podmíněný, životní cykly jsou spojeny s konkrétními vztahy mezi predátory a kořistí, každý druh má svou speciaci. Endemický původ *Taenia* spp. je charakteristický pro všechny kontinenty kromě Austrálie, Antarktidy a Jižní Ameriky. Geografické rozšíření některých druhů, zejména těch cirkulujících v synantropních cyklech mezi psy a domácími přežvýkavci (např. *Taenia hydatigena*, *Taenia multiceps*, *Taenia ovis*), mezi domácími psy nebo kočkami a hlodavci (*Taenia pisiformis*, *Taenia taeniaeformis*) a mezi lidmi a jejich hlavními zdroji živočišné potravy (*Taenia saginata*, *Taenia solium*, *Taenia asiatica*), bylo výrazně ovlivněno globální migrací a globalizací zemědělství (Hoberg 2002).

### 3.2.1.1 Zoonózy

*Taenia* spp. mají značný zoonotický potenciál, což vede k tomu, co se zdá být výjimečnými případy infekcí, cysticerkózy a koenurózy, u lidských hostitelů. Lidské infekce pro různé metacestody *Taenia* spp. však mohou být častější, než je v současné době dokumentováno, zejména pokud lokalizace larválních parazitů nezahrnuje životně důležité orgány. Infekce metacestodami *Taenia* u lidí často zahrnují ty druhy spojené se synantropickými cykly a jinak cirkulují mezi definitivními hostiteli, kterými jsou domácí zvířata, zejména psi a kočky. S výjimkou *T. solium*, byly u lidí dokumentovány i metacestody čtyř dalších druhů: *Taenia crassiceps*, *T. multiceps*, *Taenia serialis* a *T. taeniaeformis*. Zdá se, že schopnost některých druhů *Taenia* infikovat člověka jako mezihostitele nemá fylogenetický základ (Hoberg 2002; Symeonidou et al. 2018).

Potenciál šíření cysticerkózy nebo koenurózy u lidí se zvyšuje s následujícími faktory: prevalence tasemnic u psovitých nebo felidních definitivních hostitelů; četnost kontaktu mezi člověkem a definitivním hostitelem a možnost kontaktu s vajíčky tasemnic. U některých druhů jsou tedy domácí kočky a psi potenciálními zdroji infekcí pro člověka. Pravděpodobně k zvýšení rychlosti přenosu přispívá i větší náchylnost jedinců s poruchou imunitní funkce. Vajíčka jsou navíc vysoce odolná vůči vlivům prostředí a zůstávají životaschopná až 8 měsíců nebo déle ve teplém a vlhkém podnebí (Hoberg 2002; Symeonidou et al. 2018).

Aby se snížilo šíření infekčních onkosfér, je snaha o kontrolu a adekvátní, pravidelnou léčbu domácích i hospodářských zvířat. Avšak potenciál infekce řadou *Taenia* spp. u lidí a domácích zvířat nadále vede k potřebě přesných a rychlých metod diagnostiky (Hoberg 2002, Bobes et al. 2014).

#### 3.2.1.1.1 Člověk jako definitivní hostitel – cysticerkóza

U druhů *Taenia solium* a *Taenia saginata* mají lidé úlohu definitivního hostitele, infekce těmito parazity nese označení cysticerkóza. Cysticerkóza je v současné době považována za nejčastější parazitární onemocnění centrálního nervového systému a pokračuje jako hlavní problém v endemických oblastech Latinské Ameriky, Indie, Asie, východní Evropy a Afriky (Hoberg 2002; Symeonidou et al. 2018). Ve skutečnosti rozsáhlé lidské migrace dnes činí cysticerkózu *T. solium* globálně se znovu objevujícím onemocněním s rostoucími případy v neendemických zemích, jako jsou USA, Kanada, Austrálie, Japonsko, Evropa, a dokonce i muslimské země (Bobes et al. 2014; Symeonidou et al. 2018).

Příznaky spojené s cysticerkózou jsou často nespecifické, mohou být do značné míry asymptomatické, ale zahrnují i takové projevy, jako je nevolnost, změněný apetit k jídlu, ztráta hmotnosti, bolest břicha, zvracení, průjem a zácpa. Primárním patognomonickým znakem je spontánní uvolňování proglottidů (Hoberg 2002; Bobes et al. 2014; Symeonidou et al. 2018).

Luminální infekce u lidí mohou být dlouhodobé, možná přesahující 20-25 let, bez léčby. Cysticerkóza u lidí však není přispatelná *T. saginatum* a proto nemá významné důsledky pro veřejné zdraví jako *T. solium* (Hoberg 2002).

### ***T. solium***

Mezihostitelem této tasemnice je prase. Prodloužená životnost a vysoká plodnost dospělých parazitů a vajíček, která jsou vysoce odolné vůči podmínkám okolního prostředí a zůstávají životaschopné po dobu až 8 měsíců v teplém a vlhkém podnebí, zhoršují schopnost přerušit přenos mezi parazitem a hostiteli. Kontrola šíření cysticerkózy a neurocysticerkózy zůstává problematická a musí se spoléhat na různé strategie pro rozvojové a průmyslové regiony (Hoberg 2002; Symeonidou et al. 2018).

Predispozice k přetrvávání lidské cysticerkózy, kterou lze připsat *T. solium*, je spojena s dobře známými faktory: nedostatečná hygiena nebo likvidace lidských odpadních vod, zejména pro zemědělské pracovníky; prasata ve volném výběhu a absence chovu; neúčinné systémy kontroly masa; a požití nedostatečně tepelně upraveného vepřového masa, které udržuje oběh dospělých parazitů (např. je nutné vaření nad 77 °C po dobu 30 minut nebo zmrazení při teplotě -10 °C po dobu 10 dnů) (Hoberg 2002; Bobes et al. 2014; Symeonidou et al. 2018).

### ***T. saginata***

Mezihostitelem této tasemnice je skot. Skot se může parazitickými vajíčky nakazit i skrz ptáky, kteří je přenášejí z čistíren odpadních vod do zásobníků krmiv, siláží a kotců pro dobytek. Zejména vajíčka jsou rezistentní a mohou přežít a zůstat infekční po dobu několika měsíců za vhodných podmínek (Hoberg 2002).

Lidští hostitelé mohou denně vypouštět několik segmentů, z nichž každý obsahuje tisíce vajec, a jediný infikovaný zemědělský pracovník tak může být zodpovědný za epizootická ohniska skotu. Opatření pro tlumení bovinní cysticerkózy jsou obecně opatření pro lidskou taeniózu a spoléhají se na prohlídku masa, hygienu člověka, vzdělávání, dozor a léčbu, aby se přerušil cyklus přenosu (Hoberg 2002).

### **Diagnostika**

U druhů *T. solium* a *T. saginata* hraje významnou roli přesné diagnostikování, vzhledem k rozdílnému potenciálu onemocnění. K detekci a rozlišení *Taenia* spp. se využívají mikroskopické, imunologické a molekulární metody. Každá má své výhody i nevýhody. Kombinace dvou nebo více metod poskytuje vyšší citlivost. Po mnoho let byla diagnóza taeniázy založena na detekci vajíček mikroskopickým vyšetřením, které stále zůstává rutinou ve většině laboratoří. Nicméně, vzhledem k velké morfologické podobnosti mezi vajíčky tasemnic, identifikace druhu není dostatečně specifická. Kromě toho, morfologické vyšetření gravidních proglottid na základě vnitřních struktur (tj. počtu děložních větví) se opírá o jejich neporušenost, a proto ne vždy umožňuje přesnou identifikaci druhu (Symeonidou et al. 2018).

#### 3.2.1.1.2 Lidé jako mezihostitelé – koenuróza

U několika druhů čeledi Taeniidae jsou známa monocystická polycefalická larvální stadia, známá jako larvy typu coenurus, která způsobují onemocnění „koenuróza“. Faktory přispívající k distribuci cysticerkózy u atypických mezihostitelů jsou velké populace hlodavců, lišek a volně se pohybujících psů. Na rozdíl od cysticerkózy spojené s *T. solium*, většina případů koenurózy je pozorována u dětí. Lidé v tomto životním cyklu tasemnic zprostředkovávají roli mezihostitele, který je nakažen pozřením vajíček psi tasemnice (Hoberg 2002).

Konkrétní druhy tasemnic, kterým se připisuje zoonotický přenos a vznik koenurózy u lidí, díky téměř nerozlišitelným metacestodám, jsou *Taenia multiceps* (cerebrální koenuróza) a *Taenia serialis* (podkožní koenuróza). Oba druhy zahrnují životní cykly buď ovčí, koz a psových šelem nebo zajícovců, hlodavců a psových šelem a některých kočkovitých šelem. Spolehlivé morfologické rozlišení mezi *T. serialis* a *T. multiceps* je však možné pouze u dospělých stadií odebraných ze střev definitivních hostitelů. Ačkoli byla pro odlišení larev navržena délka rostelárního háčku, v současné době nejsou tato kritéria považována za spolehlivá. Mnoho autorů přiřadilo larvy coenurus k druhům na základě hostitele a/nebo anatomické lokalizace, nicméně to nejsou konzistentní rozlišovací kritéria. Proto většinu informací o larvách typu coenurus v různých hostitelích nelze spolehlivě přiřadit k druhu pouze v případě použití molekulárních nástrojů. K záznamům, kdy byl druh určen pouze na základě morfologických kritérií, by se mělo přistupovat s opatrností (Chanove et al. 2019).

Tito paraziti mají kosmopolitní distribuci, především *Taenia multiceps* je hojná ve všech zemích, kde pasení ovčí a koz zůstává důležitou součástí místních ekonomik. Celosvětově bylo zdokumentováno několik stovek případů, přičemž infekce jsou nejčastější v Africe (Hoberg 2002; Chanove et al. 2019).

*Taenia taeniaeformis* je jediným dalším druhem, o kterém je známo, že infikuje člověka, ale zprávy o charakteristických larvách typu strobilocercus jsou vzácné. Tato tasemnice je charakteristickým parazitem u felidních definitivních hostitelů a hlodavčích mezihostitelů. Existují ovšem zmínky o nálezích těchto strobilárních tasemnicích u luminálních infekcí lidí v Argentině, Japonsku a na Srí Lance (Hoberg 2002).

U jiných druhů tasemnic, které cirkulují v cyklech ovčí a psů (*T. ovis* a *T. hydatigena*), nebo mezi psy, vlky a volně žijícími jelenovitými včetně sobů, nebyla infekce vajíčky u lidí jako mezihostitelů prokázána (Hoberg 2002; Hajipour et al. 2020; Jarošová et al. 2022).

#### 3.2.1.2 Přežvýkavci jako mezihostitelé

##### ***Taenia hydatigena***

*T. hydatigena* je kosmopolitně rozšířená tasemnice, která se vyskytuje v tenkém střevě definitivních hostitelů, tedy psů a dalších volně žijících masožravců, jako jsou lišky, vlci, šakali, rysi, mývalové, medvědi a kočky. Larvy cysticerků se objevují v peritoneální dutině různých mezihostitelů, včetně koní, malých přežvýkavců (ovce, kozy) a méně často domácích prasat, divokých prasat nebo jelenů (Hoberg 2002; Jarošová et al. 2022).



Vajíčka *Taenia hydatigena* se přenášejí s trusem psovitých šelem a jsou náhodně požitá mezihostiteli při pastvě na kontaminovaných pastvinách. Následně se vajíčka vylíhnou v tenkém střevě a zárodky hexakantů migrují do různých orgánů. Během 7-10 dnů po infekci lze migrující larvy nalézt většinou v jaterním parenchymu, což způsobuje traumatickou hepatitidu u mladých zvířat. Zralé cysticerky se obvykle nacházejí v omentu, mezenteriu, peritoneu a viscerálním povrchu jater, méně často v pleuře a perikardu. Jako neobvyklá místa výskytu metacestod *T. hydatigena* byly popsány plíce, ledviny, mozek, vaječníky, děloha a vejcovody. Bylo zjištěno, že metacestody nejsou v peritoneálním prostoru tak škodlivé, jako když se nacházejí v játrech (Jarošová et al. 2022).

Cysticercóza způsobená metacestodou *T. hydatigena* má veterinární význam a infekce může způsobit vážné ekonomické ztráty v živočišné výrobě v důsledku znehodnocení jater nebo celých jatečně upravených těl při porážce nebo dokonce úhynu mladých zvířat. Příležitostně se může vyskytnout i velké množství larev, což vede k závažným infekcím a traumatické hepatitidě. Klinické příznaky infekce u mezihostitelů se liší v závislosti na závažnosti a lokalizaci parazitů. Mnohé z nich jsou chronické a/nebo asymptomatické a jsou identifikovány až po porážce (Jarošová et al. 2022).

### ***Taenia ovis***

Infekce malých přežvýkavců larvami tasemnice *Taenia ovis*, často označované jako *Cysticercus ovis*, se vyskytuje na většině území světa, včetně Nového Zélandu, Austrálie, Kanady a některých afrických zemí, a v poslední době se objevují první zprávy o infekci v Evropě. Psi a vzácně kočky a lišky slouží jako definitivní hostitelé, přičemž dospělá tasemnice se zdržuje v tenkém střevě. U definitivního hostitele mohou být gravidní proglottidy vylučovány denně, přičemž každý proglottid denně infikuje prostředí více než 80 000 vajíčky. Ovce, kozy a další malí přežvýkavci se infikují při pastvě požitím vajíčka obsahujícího onkosféru. Ve střevě se onkosféra uvolní a krevním oběhem se dostane do jater, srdce, plic, sleziny, svalů a dalších orgánů a během tří měsíců se vyvine v cysticercus. Tyto cysty mají průměr 6 až 100 mm, jsou oválné, tenké, naplněné tekutinou a obsahují skolex. Cysty zůstávají životaschopné jen krátkou dobu, přibližně 6 týdnů, poté larva odumírá a cysta kalcifikuje. U malých přežvýkavců se sice vytvoří imunita proti reinfekci, ale doba, za kterou se vytvoří, závisí na imunitním stavu konkrétního zvířete, a i po získání imunity mohou kalcifikované cysty zůstat v tkáni po zbytek života hostitele (Hoberg 2002; Hajipour et al. 2020).

Definitivní hostitel, psi, se nakazí konzumací vnitřností malých přežvýkavců s živými cystami; růstem dospělých cestod a produkcí gravidních proglottid je životní cyklus parazita ukončen (Hajipour et al. 2020).

Infekce malých přežvýkavců *T. ovis* není považována za klinicky významnou, u infikovaných zvířat se nevyskytují žádné klinické příznaky. Přestože se však nejedná o zoonotického parazita, přítomnost životaschopných nebo kalcifikovaných cyst v mase a jiných orgánech ovcí a koz vede k znehodnocení orgánů nebo dokonce celého jatečně upraveného těla při prohlídce po porážce (Hoberg 2002; Hajipour et al. 2020).

Larvy *Taenia ovis* mohou vést k hospodářským ztrátám u malých přežvýkavců v důsledku likvidace infikovaných tkání nebo celých jatečně upravených těl. V letech 2017 až 2018 byl stanoven výskyt *T. ovis* u 16 180 ovcí a 7 560 koz na jatkách Najafabad v Isfahánu. Bylo zjištěno více infikovaných ovcí (477; 2,9 %) než koz (90; 1,2 %), přičemž prevalence byla vyšší u zvířat ve věku < 1 rok ( $p < 0,0001$ ) a vyšší na jaře u ovcí (8,2 %) i koz (2,2 %). Samice ovcí byly infikovány častěji než samci ( $p < 0,0001$ ); u koz to neplatilo. Ze zkoumaných tkání byla *T. ovis* častěji nalezena v srdečním svalu ovcí ve srovnání s ostatními tkáněmi; u koz však byly infekce v srdečním svalu, žvýkacím svalu, bránici a tricepsu podobné. Pouze na základě infikovaných tkání zjištěných v této studii byla ekonomická ztráta způsobená přítomností larev *T. ovis* odhadnuta na 4 167 amerických dolarů (USD). Pro snížení infekce a zabránění ekonomickým ztrátám u malých přežvýkavců jsou nezbytné kontrolní metody, jako je řádná likvidace infikovaných tkání a anthelmintická léčba infikovaných jedinců (Hajipour et al. 2020).

### ***Taenia multiceps***

*T. multiceps* využívá jako mezihostitele přežvýkavce, zejména ovce. U ovcí metacestody (*Coenurus cerebralis*) napadají centrální nervový systém a způsobují různé klinické příznaky a chorobný stav známý jako "koenuróza" nebo "gid" (Abo-Shehada et al. 2002).

*Taenia multiceps* v dospělosti obývá tenké střevo domácích i divokých masožravců, jako jsou psi, šakali, lišky a kojoti (Abo-Shehada et al. 2002). Délka dospělých tasemnic se pohybuje od 400 do 1 000 mm a jejich šířka je 5 mm. Scolex má průměr 746–956  $\mu\text{m}$ , čtyři přísavky a rostellum vyzbrojené různým počtem háčků (22 až 32), uspořádaných do dvou korun. Velké háčky jsou dlouhé 157–177  $\mu\text{m}$ , zatímco malé háčky měří 98–136  $\mu\text{m}$ . Nezralé i zralé proglottidy jsou zpočátku širší, směrem k zadní části těla se jejich délka postupně zvětšuje; jsou imbrikované, s vnitřním podélným svalovým obalem a silně vyvinutými příčnými svaly. Proglottidy mají nepravidelně se střídající pohlavní póry, četná varlata (284 až 354) v jediném předním poli a jsou umístěny laterálně a posteriorně od samičích orgánů. Vitelinní žláza je jednoduchá a je umístěna vzadu za vaječником, který je dvoupouzdrý. Proglottidy jsou pohyblivé a mohou také uvolňovat vajíčka před jejich vypuzením s výkaly definitivního hostitele, protože větve gravidní dělohy sahají až k přednímu okraji proglottid. Když se proglottidy oddělí, děložní větve explozivně prasknou a uvolní velké množství vajíček, což vede k jejich shlukování ve výkalech, což má tendenci podporovat jejich šíření v prostředí. Gravidní proglottidy jsou delší a užší a děloha se středním stonkem má na každé straně devět až 25 větví, z nichž každá obsahuje 32 000–37 000 vajíček o velikosti 30–35  $\mu\text{m}$ , která mají hnědou barvu a jsou obklopena radiálně pruhovanou vaječnou skořápkou obsahující hexakantový zárodek neboli onkosféru. Vajíčka *Taenia multiceps* nelze morfologicky odlišit od vajíček jiných taeniidních cestodů (Varcasia et al. 2022).

*Taenia multiceps* má složitý životní cyklus, který se vyznačuje různými stádii vývoje a migrace v rámci hostitele. Po prepatentním období trvajícím 40–60 dní uvolní definitivní hostitel tři nebo čtyři proglottidy, z nichž každá nese téměř 37 000 vajíček nebo vajíčka, která jsou z proglottid vylučována před jejich vylučováním se stolicí. Vajíčka kontaminují životní prostředí, kde zůstávají životaschopná 24 h při vysoké teplotě, 12–15 dní za sucha a 3 týdny ve vlhkém

prostředí, nebo mohou být pozřena mezihostitelem. V tenkém střevě mezihostitele se z vajíčka vylíhne onkosféra, která prochází střevní stěnou a krevním řečištěm se primárně dostává do CNS, kde encystuje a během několika měsíců dozrává v infekční coenurus. Metacestoda se může vyvíjet a dozrávat také v podkoží, intramuskulárních tkáních a peritoneálních oblastech a v orgánech, jako je srdce a plíce ovcí a koz. Onkosféra se vyvíjí v následujících fázích: 8.–10. den po infekci se dostává do CNS a poté aktivně migruje v CNS od 10. do 33. dne, aby dosáhla svého konečného cíle; 40. den se mění v pyriformní vezikulu s právě viditelnými skolexy; po 2 měsících má velikost třešně. Tři měsíce po infekci cysta dozrává s dobře vytvořenými protoskolexy a nakonec po 7–8 měsících dosahuje konečné velikosti 5–6 cm v průměru. Životní cyklus je ukončen, když definitivní hostitel pozře coenurus obsahující zralé protoskolexy (Varcasia et al. 2022).

Koenuróza způsobená larválním stadiem *T. multiceps* je rozšířena po celém světě a u mezihostitelů je často fatální, což může mít za následek značné ekonomické ztráty v chovech hospodářských zvířat. Koenurózu však lze účinně kontrolovat také preventivními opatřeními, jako je anthelmintická léčba psů a správná likvidace kadáverů mezihostitelů. Parazit je rovněž zoonotický a byly zaznamenány případy koenurózy u lidí s koenurií lokalizovanou v mozku, míše a očích (Abo-Shehada et al. 2002).

### 3.2.1.3 Zajícovci a hlodavci jako mezihostitelé

Divocí králíci jsou mezihostiteli dvou druhů tasemnic psovitých, *Taenia pisiformis* a *Taenia serialis*. Obě tasemnice jsou snadno identifikovatelné ve svém larválním stadiu, protože z vajíček *T. pisiformis* se v játrech a peritoneální dutině mezihostitele vyvíjí cysticerkus, který se skládá z jednoho měchýřku s jedním skolixem, a z vajíček *T. serialis* koenurus, který se skládá z jednoho měchýřku s mnoha skolexy, ve vnitřnostech nebo podkožních tkáních. Kromě toho lze protoskolexy obou cestod snadno rozlišit podle velikosti (první řada 220–294 µm a 110–177 µm, druhá řada 114–177 µm a 85–160 µm u *T. pisiformis*, respektive *T. serialis*) a počtu rostellárních háčků (32–48 u *T. pisiformis* a 22–34 u *T. serialis*). Tito parazité mají nepřímý životní cyklus zahrnující zajícovce jako mezihostitele a psovité šelmy jako definitivní hostitele. Ukázalo se však, že hlodavci a primáti fungují jako mezihostitelé u *T. serialis*. *T. pisiformis* byla detekována také u kočkovitých šelem (Remesar et al. 2021).

#### ***Taenia pisiformis***

Definitivními hostiteli *Taenia pisiformis* v přírodě jsou psovité šelmy a vzácně kočkovité, mezihostiteli jsou zajícovci a někteří hlodavci (Toral-Bastida et al. 2011; Remesar et al. 2021). Dospělé tasemnice *T. pisiformis* nejsou obvykle pro definitivního hostitele škodlivé, ačkoli mohou způsobit ztrátu chuti k jídlu, mírný průjem nebo dokonce intususcepci. Přestože je cysticerkóza u zajícovců obvykle asymptomatická, předchozí studie ukázaly, že infekce *Cysticercus pisiformis*, larválním stadiem *T. pisiformis*, může způsobit granulomy v játrech králíků a byla také spojena se ztrátou plodnosti, změnami chování a snížením fyzické kondice u tohoto druhu (Remesar et al. 2021).

### ***Taenia serialis***

Pro *T. serialis* jsou psi a lišky definitivními hostiteli (prepatence 5–6 dní), zatímco zajícovci a hlodavci jsou mezihostiteli. Mezihostitelé se nakazí po pozření vajíček (onkosfér), která byla vylučována výkaly definitivního hostitele. Onkosféry migrují střevním epitelem mezihostitele a oběhovým systémem se dostávají do predilekčních míst. Zde vytvářejí koenurus, který se skládá z cysty naplněné tekutinou s jednou nebo více skolexy, obklopené vláknitým pouzdem vytvořeným mezihostitelem (O'Reilly et al. 2002).

### ***Taenia taeniaeformis***

*Taenia taeniaeformis* je parazit, který se vyznačuje kosmopolitním geografickým rozšířením. Konečnými hostiteli jsou šelmy z čeledí Felidae, Canidae a Mustelidae, včetně domácích koček a psů. Dospělci dosahují délky až 60 cm. Scolex se skládá ze čtyř velkých přísavek uspořádaných po stranách s dvojitým kruhem háčků. Dospělci jsou lokalizováni v tenkém střevě definitivních hostitelů. Mezihostiteli *T. taeniaeformis* jsou hlodavci a zajícovci (myš, potkan, ondatra, veverka, králík, jiný hlodavec, netopýr), ojedinele člověk. *Cysticercus fasciolaris* je larvální stadium *T. taeniaeformis*, které se běžně vyskytuje v játrech mezihostitele, kam se dostane prostřednictvím kontaminované vody nebo krmiva feliními výkaly. U člověka bylo hlášeno několik ojedinelých případů nákazy z Argentiny, Československa, Dánska a Tchaj-wanu (Al-Jashamy & Islam 2007).

#### 3.2.1.4 Lokace psích tasemnic

Pitva psů 56 dní po infekci *T. pisiformis*, *T. ovis* nebo *T. hydatigena* ve studii Coman & Rickard (1975) ukázala, že tyto tasemnice mohou být nalezeny přichyceny v kterémkoli místě podél tenkého střeva, ale nejčastěji v jeho přední polovině. Průměrná délka uvolněného střeva *T. pisiformis*, *T. ovis* a *T. hydatigena* byla 107 cm, 156 cm a 177 cm. Přiložené gravidní proglotitidy obsahovaly průměrně 41 000 vajíček u *T. pisiformis*, 31 000 vajíček u *T. hydatigena* a 95 000 vajíček u *T. ovis*, zatímco proglotitidy volně ve střevě obsahovaly průměrně pouze 1 370, 500 a 1 400 vajíček; většina vajíček byla tedy uvolněna do střeva předtím, než segmenty odešly do trusu. Bylo prokázáno, že vajíčka všech 3 druhů tasemnic se líhnou a aktivují v tenkém střevě psa, zejména v jeho přední polovině. Vajíčka *T. pisiformis*, která prošla střevem psa a byla uložena ve výkalech po dobu 5 dnů, byla pro králíky méně infekční ve srovnání s vajíčky uloženými pouze ve výkalech. Byl tedy učiněn závěr, že při taeniidových infekcích psů hraje bod apolýzy ve střevě významnou roli při určování kontaminace prostředí vajíčky. Štěňata, která byla před infekcí cysticerky *T. ovis* krmena 10 000 vajíčky *T. ovis* denně po dobu 6 týdnů, nevykazovala žádný rozdíl v citlivosti k infekci ve srovnání s neléčenými štěňaty.

### 3.2.2 *Echinococcus* spp.

*Echinococcus* spp. jsou rozšířeny po celém světě a vyskytují se na všech kontinentech kromě Antarktidy. Infekce těmito parazity jsou považovány za mimořádně závažné a vedle značných ekonomických ztrát v živočišné výrobě přispívají ke značné nemocnosti a úmrtnosti. U všech druhů rodu byla zaznamenána zoonóza nebo existuje podezření, že jsou zoonotické. *Echinococcus granulosus* a *Echinococcus multilocularis*, způsobující cystickou echinokokózu (CE), resp. alveolární echinokokózu (AE), jsou dva hlavní druhy, které jsou předmětem zájmu z humánního a veterinárního hlediska (Eckert 1997; Woolsey & Miller 2021).

Některé druhy *Echinococcus* spp. se přenášejí prostřednictvím cyklů predátor-kořist, které zahrnují domácí zvířata, jiné využívají životní cykly zahrnující volně žijící druhy, ačkoli domácí zvířata mohou k přenosu přispívat (Woolsey & Miller 2021).

#### *Echinococcus multilocularis*

Rozsah geografického rozšíření *Echinococcus multilocularis* (tasemnice liščí) zahrnuje většinu teplých a studených zón severní polokoule včetně různých ekosystémů jako arktickou tundru, vysokohorské trávníky, zemědělské krajiny i města a městečka. Tento parazit je endemický v Belgii, Lucembursku, Francii, Švýcarsku, Lichtenštejnsku, Rakousku, Německu, Polsku a České republice (Eckert 1997; Romig et al. 2017).

Ačkoli fylogenetické studie identifikovaly tento druh jako samostatnou jednotku od komplexu *E. granulosus*, rod je složitý, což vede k obtížím při interpretaci jeho taxonomie. Vnitrodruhové genetické strukturování *E. multilocularis*, které původně bylo rozděleno na asijské, evropské a severoamerické linie, vyžaduje další výzkum, protože izoláty severoamerické linie byly nalezeny také v severovýchodním Rusku, linie asijské se vyskytují v evropské části Ruska a linie evropské jsou zaznamenány v různých lokalitách v západní Kanadě. Zatím není jasné, zda tento složitý geografický vzorec odráží globální polymorfismus parazita nebo byl ovlivněn antropogenním pohybem hostitelských zvířat (Romig et al. 2017).

Parazit se přenáší převážně prostřednictvím volně žijícího cyklu zahrnujícího psovitě šelmy (typicky lišky) jako definitivní hostitele a různé druhy hlodavců (převážně pišťuchy Arvicolinae) sloužící jako mezihostitelé. Jako kompetentní definitivní hostitelé však mohou sloužit i psi a kočky (Romig et al. 2017; Woolsey & Miller 2021).

Obecně lze říci, že „dobří“ definitivní hostitelé pro *E. multilocularis* v sobě spojují kompetenci k infekci a k vývoji fertálních dospělých parazitů, potravu, která zahrnuje velký podíl vnímavých druhů mezihostitelů, a relativně vysokou populační hustotu ve srovnání s jinými sympatrickými druhy hostitelů. Navíc jejich teritoriální a disperzní chování je činí dobrými šířiteli, protože značí celé své území trusem a mladí jedinci se obvykle rozptylují z míst svého výskytu, čímž se parazit šíří mimo svůj původní home range. Kromě toho existují důkazy, že některé druhy konečných hostitelů specificky značují místa, kde predují mezihostitele, a tím usnadňují přenos parazita (Romig et al. 2017).

Dospělý *Echinococcus multilocularis* (1,2-4,5 mm dlouhý) žije v tenkém střevě definitivního hostitele. Gravidní proglottidy uvolňují vajíčka, která jsou vylučována stolicí a jsou okamžitě infekční. Po požití vhodným mezihostitelem se vajíčka líhnou v tenkém střevě a uvolňují šestihrotou onkosféru, která proniká střevní stěnou a migruje oběhovým systémem do různých orgánů (u *E. multilocularis* především do jater). Onkosféra se vyvine v multilokulární, tenkostěnnou (alveolární) hydatidovou cystu, která se množí postupným pučením směrem ven. V těchto cystách se vyvíjejí četné protoskolexy. Definitivní hostitel se nakazí požitím orgánů infikovaného mezihostitele obsahujících cysty. Po požití se protoskolexy evaginují, přichytí se na střevní sliznici a za 32 až 80 dní se vyvinou v dospělá stádia (Romig et al. 2017).

Člověk je aberantním mezihostitelem a nakazí se požitím vajíček. Ve střevě se uvolňují onkosféry a v játrech se vyvíjejí cysty. V případě uvolnění protosfér z cyst může dojít k metastázám nebo rozšíření do jiných orgánů (např. plic, mozku, srdce, kostí), což se někdy nazývá sekundární echinokokóza (Romig et al. 2017).

Ve studii autorů Veit et al. (1995) byla testována citlivost vajíček *Echinococcus multilocularis* na prostředí a kontrolované laboratorní podmínky. Materiál s vajíčky byl vystaven a infekčnost byla následně sledována aktivací in vitro a orální infekcí přirozeného hostitele *Microtus arvalis*. Pro studium vlivu podmínek prostředí v endemické oblasti jihozápadního Německa byla vajíčka uzavřena do sáčků z nylonové síťoviny a vystavena přirozenému klimatu během různých ročních období. Maximální doba přežití vajíček byla 240 dní v pokusu prováděném na podzim a v zimě a 78 dní v létě. Studie odolnosti vajíček v laboratorních podmínkách odhalila vysokou citlivost vůči zvýšeným teplotám a vysychání. Při teplotě 45 °C a relativní vlhkosti 85–95 % došlo ke ztrátě infekčnosti po 3 hodinách stejně jako po 4 hodinách vystavení teplotě 43 °C suspendované ve vodě. Vystavení 27% relativní vlhkosti při 25 °C a 15% relativní vlhkosti při 43 °C vedlo k úplné ztrátě infekčnosti během 48, resp. 2 hodin. Teploty 4 °C a -18 °C byly dobře snášeny (478 dní, resp. 240 dní přežití), zatímco vystavení teplotám -83 °C a -196 °C vajíčka rychle zahubilo (během 48 h, resp. 20 h). Vajíčka *E. multilocularis* nebyla usmrcena působením různých komerčně dostupných dezinfekčních prostředků aplikovaných podle návodu výrobce ani působením nízkých koncentrací ethanolu po dobu 24 h. Ozáření 40 krad ze zdroje 137 °C zabránilo vývoji metacestod, ale umožnilo sérokonverzi infikovaných hlodavců.

### ***Echinococcus granulosus***

*E. granulosus* má v Evropě nerovnoměrné zeměpisné rozšíření s velmi nízkou prevalencí v některých zemích severní a střední Evropy, se střední endemicitou v jiných zemích a vysokou endemicitou v oblastech jižní a východní Evropy (Eckert 1997).

*E. granulosus* sensu lato (s.l.) byl dříve považován za jediný druh, ale nyní je uznáván jako soubor kryptických druhů s rozdílnou hostitelskou specifitou, která zahrnuje patogenitu a infekčnost pro člověka. *E. granulosus* s.l. se v současnosti dělí na *E. granulosus* sensu stricto (s.s.) (s genotypovými variantami G1-G3), *Echinococcus felidis*, *Echinococcus equinus*, *Echinococcus ortleppi* (G5) a *Echinococcus canadensis* (genotypové varianty: G6/G7, G8 a G10). Liší se jak svým životním cyklem, tak morfologickými, biochemickými, genetickými

a některými dalšími znaky. V současné době je k dispozici několik molekulárních technik, které umožňují identifikaci druhů *Echinococcus* a některých kmenů pomocí genetických markerů. Epidemiologické důkazy a molekulární studie naznačují, že ovce, skot a jelenovité kmeny *E. granulosus* jsou infekční pro člověka, zatímco kmen koní nemusí mít žádnou nebo nízkou infekčnost. Bylo zjištěno, že polští pacienti jsou infikováni *E. granulosus* podobným prasečím kmeni (Eckert 1997; Romig 2003; Woolsey & Miller 2021).

Zdá se, že *E. granulosus* s.s. je nejvýznamnější u lidí a hospodářských zvířat. *E. granulosus* s.l. obvykle nezpůsobuje na oko viditelné onemocnění živých zvířat a jako takový není z agropastorálního hlediska prioritní; může však způsobovat ekonomické ztráty v důsledku snížené hmotnosti nebo celkového odsouzení jatečně upravených těl. *E. granulosus* s.l. se přenáší převážně mezi psy a různými mezihostiteli, ale vzácně zahrnuje cyklus predátor-kořist volně žijících zvířat bez antropogenní účasti (Eckert 1997; Woolsey & Miller 2021).

Dospělec *Echinococcus granulosus* sensu lato (2-7 mm dlouhý) se nachází v tenkém střevě definitivního hostitele. Gravidní proglottidy uvolňují vajíčka, která jsou vylučována stolicí a jsou okamžitě infekční. Po požití vhodným mezihostitelem se vajíčka líhnou v tenkém střevě a uvolňují šestihroté onkosféry, které pronikají střevní stěnou a migrují oběhovým systémem do různých orgánů, zejména do jater a plic. V těchto orgánech se onkosféra vyvine v tlustostěnnou hydatidovou cystu, která se postupně zvětšuje a vytváří protoskolexy a dceřiné cysty, které vyplňují vnitřek cysty. Definitivní hostitel se nakazí pozřením orgánů infikovaného mezihostitele obsahujících cysty. Po požití se protoskolexy evaginují, přichytí se na střevní sliznici a za 32 až 80 dní se vyvinou v dospělá stádia (Eckert 1997; Woolsey & Miller 2021).

Člověk je aberantním mezihostitelem a nakazí se pozřením vajíček. Onkosféry se uvolňují ve střevě a hydatidové cysty se vyvíjejí v různých orgánech. Pokud cysty prasknou, mohou uvolněné protoskolexy vytvořit sekundární cysty na jiných místech v těle (sekundární echinokokóza) (Eckert 1997; Woolsey & Miller 2021).

### 3.2.2.1 Echinokokóza

Lidskou echinokokózu (hydatidózu) způsobují larvální stadia tasemnic rodu *Echinococcus*. *Echinococcus granulosus* způsobuje cystickou echinokokózu (CE) a je nejčastěji se vyskytující formou, zejména ve středomořské oblasti. Další druh, *E. multilocularis*, způsobuje alveolární echinokokózu (AE) a je stále častější. Dva výhradně novosvětské druhy, *Echinococcus vogeli* a *Echinococcus oligarthrus*, jsou spojovány s "neotropickou echinokokózou"; *E. vogeli* způsobuje polycystickou formu, zatímco *E. oligarthrus* způsobuje extrémně vzácnou unicystickou formu (Eckert 1997; Romig et al. 2017).

Lidé infikovaní *Echinococcus* spp. jsou považováni za dead-end hostitele, a proto nepřispívají k udržení životního cyklu parazita. K infekci člověka dochází fekálně-orální cestou, tedy pozřením životaschopných vajíček. Mezi potenciální cesty infekce patří úzký kontakt s definitivními hostiteli, kteří produkují infikované výkaly, požití kontaminovaných potravin, vody nebo půdy a interakce s kontaminovanými fomity. AE u psů je vzácné onemocnění, může se však vyskytnout v důsledku toho, že tito definitivní hostitelé pozřou vajíčka

z kontaminované vegetace nebo se autoinfekčně nakazí po primární infekci dospělými červy. Jako jeden z nejrizikovějších faktorů pro výskyt *E. multilocularis* i *E. granulosus* s.l. je uváděno vlastnictví psů. Infikovaní psi (a další definitivní hostitelé) vylučují vajíčka ve výkalech a vajíčka z infikovaných výkalů mohou být zadržována v jejich srsti. Novější výzkumy naznačují, že přinejmenším pro *E. granulosus* s.l. může představovat největší riziko infekce interakce s koncentrovanými oblastmi kontaminované půdy. Ačkoli byla zdokumentována přítomnost vajíček *Taenií* a DNA *Echinokoků* v potravinách, význam přenosu prostřednictvím potravin a vodních zdrojů zůstává nejasný (Woolsey & Miller 2021).

Medián incidence na 100 000 obyvatel byl vypočten na 0,6 (95% UI 0,4-5) pro CE a 0,1 (95% UI 0,01-0,2) pro AE s nejvyšším mediánem incidence v evropských a jihovýchodních asijských regionech pro CE, těsně následovaných africkými a východními středomořskými regiony. Medián incidence na 100 000 obyvatel pro AE byl nejvyšší v evropském a západním pacifickém regionu. Odhaduje se, že Čína je zodpovědná za více než 90 % případů AE na celém světě. V roce 2015 činila zátěž pro člověka u obou druhů dohromady 871 000 let života korigovaných na invaliditu. Individuálně připadalo na CE 184 000 (95% UI 88 100-1,59 milionu) s AE 688 000 (95% UI 409 000-1,1 milionu). Pro monitorování infekce v konečných hostitelských populacích jsou nyní k dispozici nové techniky, zejména koproantigen ELISA a pro vybrané případy také detekce vajíček polymerázovou řetězovou reakcí (Eckert 1997; Woolsey & Miller 2021).

To nemění nic na tom, že AE je mimořádně závažné onemocnění, které si v Asii, zejména v autonomní oblasti Tibet, vyžádalo značné lidské oběti, a to především kvůli nedostatku možností léčby (Lundström-Stadelmann et al. 2020).

Ačkoli CE není tak patogenní pro lidské pacienty, je kromě značných ekonomických nákladů zodpovědná za značnou zátěž pro veřejné zdraví a její endemičnost je rozšířenější (Woolsey & Miller 2021).

### 3.3 *Trichuris vulpis*

Hlístice rodu *Trichuris* (Nematoda, Trichuridae) tvoří skupinu nejběžnějších parazitických patogenů v různých klimatických a geografických oblastech. Dospělí a larvální parazité žijí v organismech savců, jako jsou přežvýkavci, vačnatci, šelmy, hlodavci a primáti. Embryonální stádia parazitů se vyvíjejí v prostředí, označují se jako exogenní (Yevstafieva et al. 2019).

V současné době existuje téměř 80 druhů rodu *Trichuris* a většina z nich jsou parazité specifických hostitelských taxonů. Vědci v mnoha zemích se zajímají o tuto parazitickou skupinu, vzhledem k riziku, které představuje pro člověka. Podle některých statistik je trichuriózou nakaženo celkem 465 000 000 lidí (Adriko et al. 2018; Yevstafieva et al. 2019).

*Trichuris vulpis* je široce rozšířen u domácích i volně žijících šelem. Jeho výskyt byl prokázán také u lidí. Přenos zoonotické infekce na člověka je možný od definitivních hostitelů, tedy psů a koček žijících v jedné domácnosti (Yevstafieva et al. 2019).



Tento druh je běžný v populacích psa domácího. Například Ramos et al. (2015) uvádějí, že 43 % vyšetřených psů v Brazílii bylo infikováno *T. vulpis*, kdy index početnosti byl 10,03, přičemž intenzita infekce se pohybovala v rozmezí 1 až 181 exemplářů hlístic. V různých oblastech Itálie se prevalence tohoto druhu hlístice u psů pohybovala v rozmezí od 5,8 % do 11,1 % (Zanzani et al. 2014; Scaramozzino et al. 2018). V Jihoafrické republice byla trichurióza diagnostikována u 7,9 % psů, v porovnání s maximálně 3 % v Chile a 4 % v Německu (Barutzki & Schaper 2003; Mukaratirwa & Singh 2010; Opazo et al. 2019; Yevstafieva et al. 2019).

Taxony nematod jsou identifikovány na základě několika morfologických a metrických znaků. Nematody rodu *Trichuris* si jsou podobné svou tělesnou strukturou: přední část je protáhlá do nitkovitého tvaru a zadní část je silnější. Při identifikaci druhů se proto zohledňují následující znaky: délka těla u samců a samic; povrchová úprava, tvar a ornamenty spikuly; délka spikuly a tvar jejího proximálního a distálního konce; morfologie vulvy, strukturální specifika kutikuly (Yevstafieva et al. 2019).

Koprologické rozlišení vajíček *T. trichiura* a *T. vulpis* má epidemiologický význam, proto je podrobnější morfometrické studium embryonálních stadií *T. vulpis* zajímavé pro zlepšení diagnostiky onemocnění způsobených tímto druhem *Trichuris*. Adaptace podporující široké rozšíření parazitických hlístic v hostitelských populacích jsou do značné míry utvářeny několika faktory, mezi něž patří biologické vlastnosti parazitických druhů, jako např. povaha jejich interakcí s prostředím ve všech fázích ontogeneze (Yevstafieva et al. 2019).

Rozdíly mezi vývojovými stadii vajíček, životaschopností a metrickými parametry specifickými pro jednotlivé druhy, mohou být použity k identifikaci druhu. Ve studii Yevstafieva et al. (2019) bylo zjištěno, že proces embryogeneze *T. vulpis* v laboratorních podmínkách probíhá v pěti stadiích: protoplast (1.–6. den), štěpení blastomery (3.–9. den), fazolovité embryo (6.–12. den), larva (9.–15. den), pohyblivá larva (12.–18. den). Vajíčka se stávají infekčními za 18 dní a jejich průměrná přežitelnost je 76,6 %. Při identifikaci vajíček *T. vulpis* v koprologických studiích vzorků získaných z lidí a zvířat je třeba zohlednit metrické parametry vajíček s ohledem na vývojové stadium vajíček. V průběhu embryogeneze se mění následující znaky: délka (zmenšuje se od 86,4  $\mu\text{m}$  na 76,3  $\mu\text{m}$ ), šířka skořápky (zmenšuje se z 1,5  $\mu\text{m}$  na 1,3  $\mu\text{m}$ ), šířka (zvětšuje se z 35,3 na 43,6  $\mu\text{m}$ ), šířka zátky (zvětšuje se z 10,0 na 11,2  $\mu\text{m}$ ) a délky zátky (zvyšuje se z 6,1 na 6,5  $\mu\text{m}$ ).

## 4 Výskyt exogenních stádií parazitů

Exogenní stadia parazitů mohou být přítomna v různých typech environmentálního prostředí, včetně vody, půdy, potravin a zvířat. Jejich výskyt je důležitý pro šíření infekcí, jejich diagnostiku a prevenci (Raičević et al. 2021).

Riziko nákazy u dětí je v korelaci s pobytem na kontaminovaných veřejných prostranstvích (zelené plochy a písek). Zvláštní epidemiologický význam má souvislost mezi lidskou toxokarózou a kontaminací veřejných parků vajíčky *Toxocara canis* z infikovaných psích výkalů, která se vyskytuje celosvětově. Lidé se mohou nakazit také vajíčky tasemnic z čeledi Taeniidae, z nichž nejnebezpečnější je *Echinococcus granulosus* (Raičević et al. 2021).

Ve studiích prováděných ve Srbsku bylo zjištěno kolem 80 % pozitivních vzorků na zoonotické endoparazity, z toho 85 % pocházelo z mateřských škol, 78,1 % z parků a 77,5 % z veřejných prostranství. Studie se shodují v nejčastěji diagnostikovaných vajíčkách (viz zástupci z předchozích kapitol) a to *Toxocara canis* (29,1 %), *Taenia* spp. (15,6 %), *Trichuris vulpis* (6,7 %) (Ristic et al. 2020; Raičević et al. 2021).

Na jaře bylo diagnostikováno více (81,6 %) pozitivních vzorků, zatímco na podzim výrazně méně (72,5 %). Takové zjištění lze vysvětlit tím, že se mladá zvířata rodí převážně na jaře a jsou pouze příležitostně voděna na veřejná místa nebo prostory pro socializaci psů, protože ještě nejsou zcela očkována (Ristic et al. 2020; Raičević et al. 2021).

Procento vzorků půdy z parků s pozitivním nálezem vajíček *T. canis* ve světě se pohybovalo mezi 17,4 % a 60,3 % v Brazílii, 14,4 % a 20,6 % v USA, 13 % a 87,1 % v Evropě, 30,3 % a 54,5 % v Africe a 6,6 % a 63,3 % v Asii. Zajímavé je, že těžká kontaminace prostředí vajíčky byla nalezena i v zemích s mírným podnebím, jako je Německo a Japonsko. Většina (51 % až 95 %) nalezených vajíček v půdních vzorcích v mírném podnebí byla plně embryonovaná a tudíž infekční pro člověka (Rubinsky-Elefant et al. 2010). Podle některých světových výzkumů se výsledky pohybují od 8,6 % v Itálii (Papini et al. 2012) do 98,0 % v Mexiku (Alvarado-Esquivel et al. 2015). Rozdíly ve výsledcích výzkumů ve světě mohou souviset s různými faktory, jako jsou různé diagnostické techniky, socioekonomický status zemí, kde byl výzkum prováděn (veterinární kontrola a péče o zvířata, hygienické standardy), věk psů, odhadovaný počet psů (bez majitele nebo ve vlastnictví) atd. (Raičević et al. 2021).

Studie prováděné v jiných evropských zemích, jako je Portugalsko (0–5 %) (Ferreira et al. 2017), střední Itálie (7,5 %) (Riggio et al. 2013) a Španělsko (10,2 %) (Martínez-Moreno et al. 2007), ukazují na nižší výskyt *T. canis* oproti Srbsku (Ristic et al. 2020).

Ve srovnání s Evropou je výsledek srbské studie nejvíce v souladu s prevalencí 75,7 % v Albánii (Xhaxhiu et al. 2011; Raičević et al. 2021).

V porovnání s výsledky ve Srbsku (Raičević et al. 2021) byl výrazně vyšší výskyt *T. canis* zaznamenán v Albánii (Xhaxhiu et al. 2011) a u toulavých psů v Íránu (Hajipour 2019). Přibližně stejná prevalence tohoto parazita byla zaznamenána ve výzkumu týkajícím se psích výkalů z veřejných prostranství na severu Polska (Felsmann et al. 2017), u toulavých psů

ve střední Itálii (De Liberato et al. 2018) a v Libyi u psů ve vlastnictví, kde rizikovými faktory pro infekci psů byla absence léčby a věk psů (El Maghrbi et al. 2019). Na rozdíl od výzkumu ve Srbsku byl nižší výskyt zjištěn v Moskvě (Kurnosova et al. 2019), České republice (Dubná et al. 2007) a Německu (Barutzki & Schaper 2011). V Itálii je nízká prevalence *T. canis* v psích výkalech zanedbatelným zdrojem kontaminace veřejných prostor, což minimalizuje riziko zoonotických infekcí (Papini et al. 2012; Raičević et al. 2021).

Výsledky výzkumu Raičević et al. (2021) ukazují vysoké zastoupení *Taenia* spp. ve vzorcích psiho trusu, což je v rozporu s výrazně nižším uváděným výskytem u vlastněných psů v Moskvě (Kurnosova et al. 2019), tříletým výzkumem v městské a venkovské oblasti Prahy (Dubná et al. 2007) a na veřejných prostranstvích na severu Polska (Felsmann et al. 2017). Ve srovnání s výzkumem Raičević et al. (2021) bylo ve výzkumu v Jihoafrické republice (Minnaar et al. 2002) zaznamenáno výrazně vyšší zastoupení *Taenia* spp. u toulavých psů. Samotný výskyt vajíček čeledi Taeniidae lze považovat za potenciálně pozitivní pro rod *Echinococcus*, protože koprologickým vyšetřením nelze rozlišit vajíčka rodu *Taenia* od vajíček rodu *Echinococcus* (Balkaya & Avcioğlu 2001; Felsmann et al. 2017). Epidemiologické studie provedené v Srbsku poukazují na výskyt echinokokózy/hydatózy v jednotlivých okresech, procento se však pohybuje v rámci evropských hodnot a nedochází k výrazným odchylkám (Raičević et al. 2021).

Avila et al. (2023) se ve své studii zabývali analýzou vzorků psích výkalů z 34 hlavních městských parků a náměstí města San Juan (Argentina), kde byla zjištěna přítomnost různých druhů půdně-přenosných helmintů, včetně *Toxocara* spp.. Celková prevalence helmintů přenosných půdou zjištěná v této studii byla 8,9 %, což je méně než prevalence uvedená v jiných studiích z městských oblastí v Argentině a podobná prevalenci uvedené v Ushuaie. Zde byl nejrozšířenějším půdně-přenosným helmintem *T. vulpis*, zatímco v jiných studiích byl nejčastěji zjištěným druhem *Ancylostoma caninum*. Stejný průběh byl pozorován i v jiných zemích, například v Austrálii a Nigérii, kde byl tento druh měchovce nejrozšířenější. V některých z těchto studií byla infekce protozoárními druhy vyšší než infekce helminty; v této studii nebyli protozoární paraziti zjištěni, ačkoli nebyla použita modifikovaná Ziehl-Neelsenova technika, která je citlivější (Avila et al. 2023).

Nejčastějším nálezem *T. vulpis*, by mohlo být způsobeno delší dobou přežívání vajíček tohoto druhu v půdě; to by mohlo zvyšovat pravděpodobnost, že se psi, kteří často navštěvují parky/náměstí, znovu nakazí. *T. vulpis* má navíc prepatentní období 3 měsíce, proto by se antiparazitární léčba měla rutinně opakovat v měsíčních intervalech, aby se zničili všichni červi v době jejich dospívání a zabránilo se kontaminaci prostředí. Naproti tomu *Toxocara* spp. a *T. leonina* potřebují k dozrání jen několik týdnů (1-2 měsíce) a při druhé dávce anthelmintik podaných 2 nebo 3 týdny po první dávce by psi byli zbaveni všech parazitů. Vzhledem k tomu, že zde (Argentina) analyzované vzorky pocházejí z prostředí a že není znám stav jednotlivých definitivních hostitelů, lze předpokládat, že odčervení psů se buď neprovádí, nebo se nepodává v pravidelných intervalech (Avila et al. 2023).

Kromě toho by rozdíly v prevalenci mohly být způsobeny také klimatickými a půdními podmínkami v San Juanu, vzhledem k tomu, že se jedná o oblast s velmi nízkým množstvím

srážek a jiné studie ukázaly, že průměrné množství srážek bylo shledáno jako silně související s kontaminací prostředí parků půdně-přenosnými helminty. Prostřednictvím analýzy souvislosti mezi výskytem *Toxocara* spp. a charakteristikami prostředí v této studii regresní analýza odhalila, že stín významně přispívá ke zvýšenému výskytu parazitů měřeného pomocí TMI, jak bylo již dříve pozorováno v jiných studiích. Přítomnost stromů a jejich stín spolu s dalšími faktory, jako je zavlažování a správa parku (v této studii nebyly brány v úvahu), by mohly vytvořit ekologickou městskou niku pro vývoj parazitů v půdě bez ohledu na celkově suché prostředí San Juanu. Výrazně vyšší výskyt *Toxocara* spp. pozorovaný na podzim se shoduje se zvýšenou vlhkostí vzduchu, nižší rychlostí větru a slunečním zářením, tyto podmínky prostředí by mohly potenciálně usnadnit přenos vajíček *Toxocara* spp. Kromě toho jiné studie ukázaly, že Argentina a Brazílie mají optimální vlhkostní podmínky pro vývoj vajíček *Toxocara* spp.. Nicméně extrémní teploty (vysoké nebo nízké) jsou také důležité, protože mohou vést k vysychání vajíček a larválních stádií nebo k zastavení vývoje infekčních stádií v prostředí (Avila et al. 2023).

## **5 Metody detekce kontaminace prostředí exogenními stádii parazitů**

Epidemiologická data ukazují zvýšenou prevalenci infekcí způsobených půdně přenášenými helminty ve spojitosti s přímým kontaktem s fekálně znečištěnou vodou, půdou nebo kontaminovanými potravinami a při zvýšení rizika infekcí v důsledku opětovného využívání odpadních vod a kalů v zemědělství (Amoah et al. 2017; Khurana et al. 2021).

Navzdory značnému pokroku v boji proti helmintům přenášených půdou v průběhu několika desetiletí, kdy byly vyvinuty různé metody detekce a kvantifikace jejich vajíček ve vzorcích životního prostředí, nebyla dosud stanovena všeobecně uznávaná technika, či jednotný adekvátní diagnostický test pro srovnávací hodnocení koncentrací vajíček helmintů v různých matricích vzorků i mezi jednotlivými lokalitami (Amoah et al. 2017; Khurana et al. 2021).

Přesná detekce a kvantifikace vajíček půdně-přenosných parazitů ve vzorcích životního prostředí je náročná. Heterogenita jejich výskytu ve vzorcích životního prostředí je pro laboratorní testování problematická kvůli různému množství vlhkosti, pevných látek, množství vzorků a půdních částic. Dalším problémem u environmentálních vzorků je potřeba získat malé množství vajíček helmintů z velkých objemů vzorků. Výběr použité techniky je do značné míry ovlivněn různými typy vzorků (Amoah et al. 2017).

### **5.1 Konvenční metody – mikroskopie**

Většina metod používaných pro detekci a kvantifikaci půdně-přenosných helmintů ve vzorcích životního prostředí zahrnuje obnovu vajíček z matrice vzorku a kvantifikaci vajíček nebo larev parazitů pomocí mikroskopie (Amoah et al. 2017). Tyto metody se souhrnně označují jako „konvenční metody“ vzhledem k použití základních technik, které zahrnují sedimentaci, po níž následuje fáze extrakce a poté flotace síranem zinečnatým před prohlížením pod mikroskopem (Amoah et al. 2017; Collender et al. 2015; Khurana et al. 2021).

Konvenční metody založené na mikroskopii, jako je přímý Kato-Katzův stěr nebo nátěry po centrifugaci stolice/flotační koncentrační techniky, byly základem diagnostiky zejména v rozvojových zemích s omezenými finančními zdroji, kde se tyto infekce hojně vyskytují. V poslední době se však tyto metody neustále upravují a vylepšují do uzavřených, snadno proveditelných digitálních formátů, čímž se zlepšuje citlivost i kvalita vyšetření (Khurana et al. 2021).

Detekce půdních helmintů pomocí mikroskopu je jednoduchá a nízko nákladová. Postrádá však přiměřenou citlivost a stává se nepřesnou vzhledem k možným chybám ve sběru vzorků, např. jejich nesprávná přeprava nebo skladování a popř. rozpad. Může také docházet ke zkreslení morfologie parazita v důsledku okolních vlivů a tím i možným chybám v měření (Khurana et al. 2021).

### **5.1.1 Kato–Katz tlustý stěr**

V současnosti je tato metoda doporučena WHO jako „zlatý standard“ pro detekci vajíček půdně-přenosných helmintů. V principu jsou velké částice odstraněny tím, že se výkaly protlačí síťovinou, následně se známé množství vzorku přenesou na sklíčko pomocí šablony s otvorem, která drží pevné množství výkalů (např. otvor o průměru 9 mm na 1 mm tlusté šabloně drží asi 50 mg výkalů). Šablona se odstraní a zbytek vzorku se zakryje celofánem namočeným v glycerol-methylen modrém roztoku. Sklíčka se doporučuje uchovávat při pokojové teplotě nebo v inkubátoru při 40 °C, aby se vyčistily výkaly. Mikroskopické vyšetření se nejlépe provádí po 24–48 hodinách (Khurana 2021).

Tato metoda je nejefektivnější pro snadnou detekci a několika měsíční výdrž viditelnosti vajíček *T. trichiura*. Oproti tomu je prokázána špatná účinnost pro detekci infekce škrkavkou, protože tyto vajíčka mají tendenci se rychle rozpadat (během 60 minut), což vede k falešně negativním výsledkům (Khurana 2021).

I když je Kato-Katz cenově efektivní a snadno prováděná metoda, vzorky s nízkou intenzitou infekce a různými časy rozpadu vajíček mohou znemožnit současné detekce různých půdně-přenosných helmintů (Khurana 2021).

### **5.1.2 Základní techniky**

#### **5.1.2.1 Separace vajíček od velkých částic**

##### **Půda**

Oddělení vajíček půdně-přenosných helmintů od pevných částic ve vzorku je velkým problémem zejména při posuzování kalů, kompostů a biosolidů vzhledem k jejich heterogenitě. Vzorky s vysokou koncentrací částic (včetně půdních částic) by mohly vajíčka snadno zachytit nebo se na ně navázat, což bude mít za následek nižší výtěžnost (Collender et al. 2015; Amoah et al. 2017).

Vajíčka helmintů přenosných půdou jsou vychytávána z namíchaných roztoků obsahujících většinou aniontové detergenty, které rozbíjejí vazby mezi vajíčky a částicemi ve vzorcích. Nejčastěji používanými roztoky detergentů jsou Tween 80, Triton X-100, 7X a hydrogenuhličitan amonný. Ačkoli většina výzkumníků upřednostňuje použití detergentů pro disociaci, někteří uvádějí nižší výtěžnost u ošetřených vzorků oproti neošetřeným. Dřívější zprávy ukázaly, že použití detergentů snižuje životaschopnost vajíček v důsledku poškození jejich integrity (Collender et al. 2015; Amoah et al. 2017).

Ačkoli chybí srovnávací údaje pro určení nejlepšího detergentu pro disociaci vajíček helmintů ze vzorků z životního prostředí, uvádí se, že použití 7X poskytuje lepší výtěžnost. Tento detergent je rozpustný ve vodě ve všech koncentracích a skládá se z aniontové povrchově aktivní látky a speciálních rozpouštědel, což může být příčinou lepší výtěžnosti. Kromě toho 7X nevytváří sraženiny při kontaktu s roztoky solí používaných během flotačního kroku (Amoah et al. 2017).

## **Zelenina**

Získání půdně-přenosných helmintů ze vzorků rostlinné hmoty vyžaduje oplachovací krok, například pomocí Tris-buffered saline (TBS), Tween 20, Nacconolu nebo fyziologického roztoku, po kterém se oplach zadrží a podle potřeby zpracuje pomocí membránové filtrace, sedimentace a/nebo flotace (Collender et al. 2015; Amoah et al. 2017).

## **Odpadní voda/kal**

Běžně se používají roztoky jako fyziologický roztok, fosfátový pufovaný roztok, Tween 80 a voda. Na rozdíl od Tweenu 80/20 nebo 1% 7X, který je běžnější u jiných matic vzorků (Amoah et al. 2017).

Opět platí, že vzhledem k nedostatku srovnávacích údajů o nejvhodnějších roztocích pro promývání rostlinných vzorků je volba většinou závislá na uvážení výzkumníka (Amoah et al. 2017).

### **5.1.2.2 Filtrace vzorku**

Po disociaci vajíček od větších částic ve vzorcích je třeba vajíčka od těchto částic oddělit. Jedním z kroků používaných k dosažení této separace je filtrace nebo použití síta k zadržení větších částic, zatímco se umožní, aby se příslušná vajíčka dostala do filtrátu pro další analýzu (Collender et al. 2015; Amoah et al. 2017).

Volba velikosti pórů pro tento krok je nejdůležitějším faktorem, který je třeba zvážit. Většina vajíček parazitů má rozměry mezi 25  $\mu\text{m}$ -150  $\mu\text{m}$ . Proto se pro průchod vajíček běžně používají póry o velikosti od 4  $\mu\text{m}$  do 125  $\mu\text{m}$  (velikost se liší podle vajíčka helminta, který je předmětem zájmu). V některých případech je naopak zájmem vajíčka na sítích zadržet, a proto se volí menší velikost pórů, např. 20  $\mu\text{m}$ , nebo dokonce jen 8  $\mu\text{m}$ . V případech, kdy jsou předmětem zájmu půdně-přenosných helmintů pouze hlístice, se používají síta o velikosti pórů 32 až 36  $\mu\text{m}$ . Je zřejmé, že rozdíly ve velikosti pórů jsou nejvíce ovlivněny zájmovým druhem

helmintha a také maticí vzorku. Například většina výzkumníků pracujících se vzorky zeleniny nebo rostlin tento krok nezařazuje kvůli sníženému množství pevných částic (Collender et al. 2015; Amoah et al. 2017).

Filtrace může snížit množství pevných částic ve vzorku, což by usnadnilo krok mikroskopování a zároveň zvýšilo přesnost identifikace a kvantifikace vajíček. Účinnost mikroskopické fáze se zvyšuje díky snížení množství částic, které mohou překážet vajíčkům na sklíčkách. Filtrace však může mít za následek také nižší výtěžnost vajíček v důsledku zachycení vajíček spojených s částicemi nebo shluků vajíček (Collender et al. 2015; Amoah et al. 2017).

### 5.1.3 Pasivní sedimentace nebo centrifugace

Vajíčka ve filtrátu je třeba oddělit od kapalné fáze. Oddělení pevných částic (mezi něž patří vajíčka) ve vzorcích od kapalné fáze se většinou provádí sedimentací. Sedimentace může být pasivní nebo s použitím centrifugace, kde se používají různé rychlosti. Tento rozdíl v rychlostech odstředování může vnést rozdíly do koncentrace získaných vajíček, nicméně neexistují žádné údaje, které by umožnily určit nejlepší rychlost. Doba použitá pro pasivní sedimentaci se u jednotlivých použitých metod liší, přičemž doba nastavení se pohybuje od 1 h až přes noc (Collender et al. 2015; Amoah et al. 2017).

Vliv pasivní sedimentace na obnovu vajíček může být ovlivněn několika faktory. Patří mezi ně matrice a objem vzorku, rozměr nádoby použité pro sedimentaci a doba trvání sedimentace. Vysoký obsah pevných látek ve vzorku může narušit usazování vajíček s možnou ztrátou některých z nich. Metoda WHO doporučuje použití nádoby s otevřeným dnem a rovnými stranami o objemu nejméně 10 l, jejímž cílem je usnadnit odstraňování supernatantu a umožnit důkladné proplachování. Kromě toho je rozhodující délka sedimentace, rychlost sedimentace se u jednotlivých druhů helmintů liší. Pro usazení vajíček je nutná přiměřená doba, která zohledňuje viskozitu vzorku i rozměry nádoby. Například vajíčka *Ascaris* spp. (relativní hustota 1,13) mají rychlost usazování 0,65 m/h, vajíčka *Trichuris* spp (relativní hustota 1,15) 1,53 m/h, zatímco vajíčka *Taenia* spp (relativní hustota 1,23) budou mít rychlost usazování téměř 2 m/h (Ayres & Mara 1996; Collender et al. 2015; Amoah et al. 2017).

Metodu centrifugace lze použít jak pro čerstvé, tak pro konzervované vzorky a umožňuje získání parazitů centrifugací do fekálního pelletu. Metoda funguje na principu odstředivé síly. Malé množství vzorku stolice je přidáno přes dvě vrstvy gázy do kónické zkumavky obsahující 0,85% fyziologického roztoku nebo 10% formalínu a poté se promíchá. Následně je přidán ethylacetát pro extrakci tuku a nečistot a zkumavka se odstředí (500 g po minimálně 10 minut), přičemž parazité zůstanou v sedimentu. Supernatant se dekantuje a sediment se resuspenduje s fyziologickým roztokem nebo 10% formalínem a vyšetří se jako mokrý preparát s použitím objektivů 10x a 40x, s nebo bez použití jódu. Zředěný formalín nebo octan-octová kyselina sodná se použije k inaktivaci organismů a minimalizuje riziko laboratorní infekce z fekálií. Vzorky stolice lze vyšetřit v několika hodinách nebo dnech po uchování vzorku ve formalínu. Tato metoda má však kromě časové náročnosti nedostatky způsobené použitím etheru, který je výbušný, dráždí dýchací cesty a může být škodlivý pro laboratorní personál (Ayres & Mara 1996; Khurana 2021).

#### 5.1.4 Flotační technologie

Hlavním cílem flotace je oddělit vajíčka od ostatních materiálů ve vzorku, které nebyly odstraněny během filtrace nebo sedimentace. Flotační technologie jsou založené na principu odlišné hustoty vajíček, kdy většina má specifickou hmotnost v rozmezí 1,05–1,20, což jim umožňuje vynořit se na povrch, když je vzorek stolice smíchán v roztoku s vysokou měrnou hmotností (v rozmezí 1,18–1,27). Běžně používanými flotačními roztoky jsou síran zinečnatý nebo solný roztok (Collender et al. 2015; Amoah et al. 2017; Khurana 2021).

##### 5.1.4.1 McMaster metoda

Tato metoda používá počítací komoru, která umožňuje mikroskopické vyšetření známého objemu suspenze stolice a vypočítat z něj počet helmintích vajíček nebo larev. Komora McMaster je rozdělena na dvě části, z nichž každá má na horní ploše vyleptanou mřížku. Přesný objem obsažený pod každou z těchto mřížek je 0,15 ml. Když je naplněna, suspenzí stolice ve flotační tekutině, většina odpadu klesá na dno, zatímco vajíčka plavou na povrchu pod mřížkou, kde je lze relativně rychle snadno vidět a počítat (Ayres & Mara 1996; Khurana 2021).

Účinnost flotace je ovlivněna vlastnostmi flotačního roztoku, charakteristikami půdní matrice a plochou příčného průřezu, která je k dispozici pro pohyb půdně-přenosných helmintů ve flotačním roztoku v poměru k objemu přítomné matrice. Aby se zmírnil nedostatečný výtěžek, mohou se flotační kroky opakovat, aby se získaly všechna vajíčka zachycená mezi částicemi matrice během předchozích flotací. Bylo zjištěno, že postupná flotace umožňuje získat až 10–20 % dalších nasazených vajíček (Collender et al. 2015).

Metoda McMaster je levná, snadná a byla rozsáhle používána ve veterinární parazitologii a i v lidských studiích pro odhad míry vyléčení antihelmintiky (Khurana 2021).

##### 5.1.4.2 FLOTAC

Funguje na principu centrifugální flotace. Technologie FLOTAC se skládá z válcového zařízení se dvěma flotačními komorami o objemu 5 ml, umožňujících analýzu většího množství stolice ve srovnání s metodou Kato-Katz (100 mg versus 42 mg) (Khurana et al. 2021).

Tato metoda má vysokou citlivost, další výhodou je uzavřený systém, který chrání laboratorní personál, uchovává vzorek, a dokonce umožňuje opakované následné vyšetření vzorku. Nicméně, metodologická složitost a potřeba specifického zařízení pro centrifugaci vzorků může omezit jeho použitelnost v laboratořích s omezenými zdroji. Mini-FLOTAC je zjednodušená verze tohoto zařízení bez kroku odstředování (Khurana et al. 2021).

Nedávná metaanalýza odhalila citlivost přibližně 92,7 % pro FLOTAC oproti 42,8 % pro přímou mikroskopii. Metoda Kato-Katz měla citlivost 74–95 % pro detekci všech půdně-přenosných helmintů ve vysokých intenzitách infekce, která klesá na 53–80 % v prostředí s nízkou intenzitou infekce. Metoda FLOTAC má nejvyšší citlivost jak v prostředí s nízkou, tak i vysokou intenzitou infekce (Khurana et al. 2021).



## 5.2 Kultivace

Použití kultivace půdně-přenosných helmintů a jejich infekcí je zřídka základem pro diagnostiku a používá se především ve výzkumných zařízeních. Je však třeba dbát velké opatrnosti, protože larvy jsou infekční a mohou představovat biologické nebezpečí pro laboratorní personál (Khurana et al. 2021).

## 5.3 Molekulární techniky

Genetické techniky pro identifikaci a kvantifikaci půdně-přenosných helmintů mají také potenciál přinést rychlejší a spolehlivější analýzu vzorků. Genetické metody, jako je izotermická amplifikace zprostředkovaná smyčkou (LAMP) a polymerázová řetězová reakce (PCR), byly použity k detekci helmintů přenášených půdou v širokém spektru kontextů. Genetické metody mohou být druhově nebo poddruhově specifické, jsou vysoce citlivé (mnoho testů se zaměřuje na sekvence DNA s několika kopiemi na buňku a mohou detekovat ekvivalent méně než jednoho zralého vajíčka na gram stolice) a na rozdíl od mikroskopických nebo imunologických testů nezávisí na morfologii parazita, která zůstává nezměněna vlivem prostředí nebo laboratorních procesů. Diagnostická spolehlivost molekulárních metod závisí také na účinnosti extrakce DNA a konzervace vzorku před jeho testováním. Nicméně testy, které se spoléhají na mikroskopickou analýzu, jsou pravděpodobně praktičtější pro prostředí s nízkými finančními zdroji, kde nemusí být k dispozici vybavení pro termocyklaci a kvantifikaci produktů fluorescenčních reakcí. LAMP může být vhodná pro detekci půdně-přenosných helmintů v prostředí s nízkými zdroji, protože ji lze provádět s jednoduchým vybavením, jako je vodní lázeň (dokonce i termoska s horkou vodou), a vytváří dostatečně velký precipitát pyrofosforečnanu hořečnatého, aby bylo možné rozeznat pozitivní reakci pouhým okem. Multiplexní postupy pro současnou detekci více půdně-přenosných helmintů jsou k dispozici pro PCR, ale zatím ne pro LAMP (Collender et al. 2015; Khurana et al. 2021).

Zatímco většina výzkumníků, kteří používají genetické metody k detekci helmintů přenášených půdou v environmentálních matricích, provádí extrakci nukleových kyselin po získání vajíček flotací, někteří úspěšně provedli extrakci přímo na environmentální matici. Některé protokoly vyžadují narušení vnějšího obalu některých vajíček helmintů (především *Trichuris* a *Baylisascaris procyonis*), aby bylo možné účinně extrahovat genetický materiál; toho lze dosáhnout pomocí zmrazovacích a rozmrazovacích cyklů, zahříváním/vařením, protřepáváním skleněnými kuličkami nebo trávením proteinázou K (Collender et al. 2015).

### 5.3.1 PCR, qPCR, LAMP

Některé sloučeniny přítomné v environmentálních matricích mohou inhibovat reakce LAMP a PCR, včetně jílu, huminových a fulvokyselin, polysacharidů, solí, těžkých kovů a různých organických molekul, ačkoli polymeráza BstDNA používaná v LAMP bývá vůči inhibitorům odolnější než polymeráza Taq používaná v PCR. Odstranění inhibitorů lze částečně dosáhnout pomocí odstředivé flotace k získání vajíček, ačkoli bylo zjištěno, že i po flotaci přidání antiinhibičních látek zvyšuje citlivost genetických testů na půdně-přenášené helminty.

Ke zjištění, zda inhibitory ovlivňují reakce v genetickém testu, lze použít vnitřní kontrolní cíle (Collender et al. 2015).

Hlavní výhodou testů založených na PCR spočívá v jejich vyšší citlivosti a schopnosti multiplexovat pro detekci souběžných infekcí, ačkoli singleplexová PCR je mírně citlivější ve srovnání s multiplexními testy. Používání kvantitativní PCR (qPCR) poskytuje ještě přesnější odhady prevalence ve srovnání s mikroskopii a je možné je multiplexovat. Nicméně, qPCR může být technicky náročná, složitá a nákladná. V různých laboratořích chybí standardizace. Dále není příliš jednoduché korelovat kopie molekulárního cíle s počtem vajíček ve výkalech a počtem dospělců ve střevech, protože počet kopií daného cíle a rozdíl ploidie mezi neoplozenými a oplozenými vajíčky se liší (Khurana et al. 2021).

V nedávné studii, jejímž cílem bylo vyhodnotit diagnostickou účinnost Kato-Katz, Mini-FLOTAC a qPCR vykazaly všechny diagnostické techniky citlivost  $\geq 90\%$  pro všechny infekce střední až vysoké intenzity půdně-přenosných helmintů. Nicméně pouze qPCR měla vyšší citlivost než metoda Kato-Katz pro všechny druhy půdně-přenosných helmintů a infekcí velmi nízké intenzity (Khurana et al. 2021).

Novější molekulární nástroj, amplifikace zprostředkovaná smyčkou (Loop-mediated amplification/LAMP) je jednokroková metoda amplifikace cílové sekvence DNA izotermickou cestou (Deng et al. 2019). Vyžaduje pouze teplotní blok nebo inkubátor/vodní lázeň a je více tolerantní vůči biologické inhibici. Pro zvýšení citlivosti se používají fluorescenční sondy, lze použít DNA-funkcionalizované nanočástice zlata atd. Vzhledem k obtížím při navrhování primerů však dochází k falešně pozitivním výsledkům a kontaminaci mezi vzorky, je třeba provést další validaci těchto metod. Nedávno byl vyvinut barvicí izotermický test s využitím SmartAmp2 primeru pro identifikaci půdně-přenosných helmintů cílením amplifikace specifické sekvence  $\beta$ -tubulinového genu, vizualizované pomocí hydroxynaftolové modři v LAMP formátu (Rashwan et al. 2017). Unikátní asymetrický primer design činí tento test velmi specifickým se snadnou vizuální kontrolou výsledků a umožňuje jeho vývoj jako přenosného nástroje pro terénní průzkumy (Khurana et al. 2021).

## **5.4 Moderní techniky**

### **5.4.1 Digitální PCR, ddPCR, BacLight**

#### **ddPCR**

Kapková digitální PCR (ddPCR), technologie PCR třetí generace, byla zavedena za účelem absolutní kvantifikace cílových genů použitelných pro patogeny. Digitální kapková PCR využívá mikrodestičky nebo mikrofluidní komůrky, které se zjednodušeně označují jako jamky, které rozdělují vzorky na několik nanolitrových oddílů (Hindson et al. 2013). Výhody ddPCR oproti testům založeným na qPCR spočívají v tom, že ddPCR je založena na koncové PCR (účinnost žihání primerů/sond je minimalizována) a nevyžaduje použití standardů pro přesnou kvantifikaci. A co je nejdůležitější, ddPCR je vysoce výkonný test s přibližně 15 000-20 000 reakcemi PCR na jamku (Baker & Ensink 2012; Amoah et al. 2017).

## Digitální PCR

Baker & Ensink (2012) popsali komerčně dostupné digitální PCR založené buď na čipu, nebo na kapátkách. O použití kapkové digitální PCR při detekci zoonotických patogenů ve vzorcích vody ze zpracování drůbeže informovali Rothrock et al. (2013). Výsledky ukázaly, že ddPCR předčila metody qPCR a metody založené na kultivaci používané pro zpracování zoonotických patogenů drůbeže. Časté použití digitální PCR (na bázi čipů nebo kapek) pro detekci půdně-přenosných helmintů ve vzorcích životního prostředí nebylo dosud zkoumáno. Je zapotřebí dalšího výzkumu k optimalizaci této metody z hlediska citlivosti a přesnosti pro detekci helmintů přenášených půdou ve vzorcích životního prostředí (Amoah et al. 2017).

## BacLight

Tato metoda je založena na soupravě BacLight LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit a byla původně vyvinuta pro stanovení počtu životaschopných bakterií. Je založena na zjišťování rozdílu v integritě membrány životaschopných a neživotaschopných buněk. Ty mají rozdílný příjem dvou specializovaných barviv propouštějících membránu DNA, Syto 9, které fluoreskuje zeleně s maximem emise 498 nm, a propidium jodidu (PI), který fluoreskuje červeně s maximem emise 617 nm. Detekce životaschopných vajíček pomocí této techniky je založena na diferenciálním barvení životaschopných vajíček pomocí Syto 9, zatímco PI barví neživotaschopná vajíčka (Amoah et al. 2017). Dabrowaska et al. (2014) zjistili ve vzorcích kalů 58 % živých, 38 % mrtvých a 3,7 % nedostatečně obarvených vajíček *Ascaris* spp., *Toxocara* spp. a *Trichuris* spp.. Autoři dospěli k závěru, že metoda je vhodná pro stanovení životaschopnosti. Tyto výsledky byly získány z nasazených vzorků a její účinnost nebyla porovnávána s jinými metodami. Nicméně Karkashan et al. (2015) zaznamenali 78 až 85 % životaschopnost vajíček *Ascaris* spp. pomocí techniky barvení BacLight LIVE/DEAD. Došli také k závěru, že barvení touto soupravou je jediným postupem, který neovlivňuje životaschopnost vajíček po analýze. Proto se použití barvení BacLight LIVE/DEAD ukazuje jako rychlý způsob stanovení životaschopnosti vajíček STHs bez nutnosti inkubace.

## 5.5 Skladování

Podmínky skladování jsou důležitým faktorem ovlivňujícím výtěžnost životaschopných vajíček a larev půdně-přenášených helmintů. Vajíčka *Ascaris* a *Trichuris* jsou trvanlivá a mohou být skladována při 4 °C nebo pokojové teplotě po dobu několika týdnů, resp. dnů bez ztráty životaschopnosti. Vajíčka měchovců jsou však méně odolná a bylo prokázáno, že se při pokojové teplotě rozloží během několika hodin, pokud jsou uchovávána v prostředí s nízkou vlhkostí. Larvy měchovců jsou ještě méně odolné a vzorky by měly být skladovány nejdéle 7 dní při 4 °C, aby bylo zajištěno spolehlivé posouzení životaschopnosti. Je důležité poznamenat, že rozdíly ve fyzikálně-chemických vlastnostech vajíček u různých druhů helmintů mohou vyžadovat úpravy pro optimalizaci dalších aspektů metod obnovy specifických pro daný druh, včetně flotace, disociace a sedimentačních protokolů (Collender et al. 2015).

## 6 Životaschopnost/ infekceschopnost vajíček helmintů dle typu prostředí

Nejpoužívanější metodou hodnocení životaschopnosti je časově náročná inkubace k dosažení vývoje larev. Po inkubaci za příznivých podmínek po dobu 10–21 dnů se vajíčka obsahující viditelně vyvinuté larvy zaznamenají jako životaschopná a nevyvinutá vajíčka se považují za neživotaschopná. Jiní autoři uvádějí životaschopnost na základě morfologické integrity vajíček a jejich reakce na barvení vitálními barvivy. Metoda hodnocení životaschopnosti je ovlivněna faktory, jako jsou materiály a dostupné vybavení, zkušenosti výzkumníka a osobní preference. Morfologická stanovení zahrnují velikost, tvar a přítomnost viditelných larev a používají se jako kritérium životaschopnosti vajíček při mikroskopování. Stanovení životaschopnosti na základě přítomnosti viditelných pohyblivých larev může být subjektivní na základě zkušeností mikroskopujících (Collender et al. 2015; Khurana et al. 2021).

Minimální doba potřebná k embryonalizaci byla u *Ascaris* uvedena jako 13 dní a u *Trichuris* jako 16 dní při inkubaci při 30 °C za stálého provzdušňování. Vajíčka měchovců se líhnou v půdě během 1–2 dnů po vylučování a larvy přežívají v prostředí maximálně několik týdnů. Proto existuje riziko, že kvantifikace životaschopných vajíček *Ascaris* a *Trichuris* pomocí embryonálního testu nemusí vést k přesnému odhadu kontaminace vzorku měchovci – v době, kdy vajíčka *Ascaris* nebo *Trichuris* dozrají, se vajíčka měchovců vylíhnou a larvy mohou být mrtvé a rozložené (Collender et al. 2015).

Mezi měření, která různí výzkumníci používají ve studiích in vitro a in vivo k posouzení životaschopnosti vajíček *Taenia* spp., patří barvení, analýza aktivace onkosfér, kultivace, infekce meziphostitelů a laboratorních zvířat (Buttar et al. 2013).

Perzistence životních cyklů Taeniidae souvisí s dlouhodobou životaschopností a infekčností jejich vajíček v prostředí. Je dobře známo, že vajíčka Taeniidů mohou v prostředí zůstat infekční nejméně několik měsíců v závislosti na ročním období, teplotě, vlhkosti a srážkách, přičemž vlhké a chladné podmínky jsou pro jejich přežívání příznivější. Teplé letní počasí v době sběru proto může přispívat k rychlejší degeneraci vajíček. Naopak v různých záznamech bylo v půdě a zelenině zjištěno výrazně více vajíček tasemnic v suchém období ve srovnání s chladným. Možným vysvětlením může být časté používání kontaminované vody k zavlažování během jara a léta. Případně srážky v chladných obdobích zintenzivňují erozi a odplavování vajíček z povrchu do vody. Souhrnně lze říci, že podrobné znalosti o fyzikální odolnosti vajíček *Taenií* v různých klimatických podmínkách jsou důležité pro určení vlivu na prevalenci, životaschopnost a distribuci parazitární kontaminace v prostředí (Saelens et al. 2022).

### 6.1 Písek

Písečné půdy mají také za následek menší rozdíly v počtu získaných vajíček, což může být způsobeno homogenitou písčitých půd založenou na větší velikosti částic, které jsou ve srovnání s jinými typy půd volně pohromadě (Amoah et al. 2017).

## 6.2 Voda

Riziku nákazy půdně-přenášenými helminty se může jedinec vystavit i po přímém styku s kontaminovanou vodou (nejčastěji fekáliemi obsahujícími vajíčka) nebo po opětovném užití této vody a kalů v zemědělství. V endemických oblastech se odhaduje, že odpadní voda obsahuje až ~3000 vajíček/l (Amoah et al. 2017), přičemž by odpadní voda určená k neomezenému opětovnému použití v zemědělství měla obsahovat  $\leq 1$  vajíčko helminta na litr, aby se snížilo riziko infekcí helmintů přenosnými půdou pod cílovou úroveň stanovenou směrnicemi Světové zdravotní organizace (WHO 2006). To vyžaduje citlivou detekci a konzistentní kvantifikaci vajíček půdně-přených helmintů v odpadních vodách, kalech nebo jiných matricích vzorků (Amoah et al. 2017).

Většina metod používaných pro detekci vajíček půdně-přených helmintů doporučují používat vzorky o objemu jednoho litru. Ve skutečnosti je ale koncentrace vajíček helmintů v upravených odpadních vodách a ve vodě obvykle velmi nízká, a to zejména v důsledku zředění koncentrace vajíček v prostředí. Proto většina metod při nízké prevalenci používá pro detekci velké objemy vzorků (Amoah et al. 2017).

Metody, jejichž cílem je stanovit kvalitu odpadní vody pro zavlažování, musí brát v úvahu objem dostatečný k dosažení meze detekce. Vysoký obsah pevných látek ve vzorku může mít za následek nižší míru výtěžnosti vajíček v důsledku interference pevných látek. Při stejných objemech vzorků se množství vajíček helmintů v odpadní vodě v jednotlivých regionech značně liší (Amoah et al. 2017). Koncentrace do značné míry závisí na prevalenci ve studované oblasti, například v Peru odebraný vzorek obsahoval  $194 \pm 79$  vajíček na litr (Yaya-Beas et al. 2016), což je v porovnání s Evropou až 2000krát více (Levantesi et al. 2010).

### 6.2.1 odpadní voda/kal

Vajíčka střevních parazitů jsou běžně přítomna v odpadních vodách. Čištění těchto vod je zásadní pro prevenci šíření nemocí (Zdybel et al. 2015; Amoah et al. 2017). Během procesu čištění odpadních vod se počet vajíček parazitů může snížit o 78 %, až ojediněle o 100 % (Zdybel et al. 2015). Zdybel et al. (2015) ve své studii poukázali, že žádná z běžně používaných etap čištění odpadních vod nemá vždy 100% účinnost v eliminaci vajíček parazitů. Přítomnost parazitů byla potvrzena také v kalu podrobeném fermentaci a aerobní stabilizaci (Zdybel et al. 2015).

Vajíčka mohou být částečně přítomna v čištěných odpadních vodách a nejvyšší počet životaschopných vajíček dle Zdybel et al. (2015) druhu *Ascaris* spp., *Toxocara* spp. a *Trichuris* spp. byl nalezen v předběžném kalu čerpacích nádrží, kde se usazují mnohem snadněji než bakterie a viry, díky své větší velikosti (Amoah et al. 2017).

Nižší počet vajíček byl nalezen v kalu sekundárním, což naznačuje, že sedimentační proces v čerpacích nádržích není dostatečně časově dlouhý k efektivnímu oddělení vajíček parazitů z čištěné odpadní vody. Oproti tomu kvantita vajíček ve fermentovaném kalu byla téměř třikrát nižší než v kalu předběžném (Zdybel et al. 2015).

Při anaerobní digestaci se snižuje počet životaschopných vajíček *Ascaris* spp. a *Toxocara* spp. téměř o třetinu, ale u *Trichuris* spp. nebylo pozorováno žádné snížení (Zdybel et al. 2015).

Nejoblíbenější metodou hygienizace je použití vápna, které je účinné proti parazitickým vajíčkům po aplikaci nejvyšších dávek. Toto činidlo je však poměrně drahé, proto se přidává v nižších dávkách, které nestačí k inaktivaci vajíček. Hygienizace vápnem se tedy ukázala jako neúplně účinná, a to i při použití nejvyšších dávek. Neúčinnost hygienizace by mohla být způsobena mimo jiné nesrovnalostmi v používaných postupech (např. příliš malá dávka CaO, aplikace pouze na vrchní povrch prismu vytvořeného z odvodněného kalu, příliš nízká vlhkost kalu a nedostatek produkce vysoké teploty) (Zdybel et al. 2015).

Kvůli nedostatečně vysokým teplotám v prizmě ( $> 60$  °C), nenapomáhá úplné inaktivaci vajíček ani kompostování (Zdybel et al. 2015).

Studie provedené ve vyspělých zemích (Francie, Itálie atd.) uvádějí nižší koncentraci vajíček půdně-přenosných helmintů v kalu ve srovnání se studii v rozvojových zemích (Ghana, Mexiko, Burkina Faso). Při větších velikostech vzorků je koncentrace hlášených vajíček vysoká bez ohledu na místo studie (Amoah et al. 2017).

Je tedy třeba zdůraznit, že vajíčka střevních parazitů jsou přítomna v odpadních vodách i po průchodu běžnými etapami čištění a vzrůstá tak poptávka po efektivnějších způsobech jejich eliminace z důvodu rizika pro lidské zdraví při využívání dehydratovaného kalu jako organického hnojiva v zemědělství (Zdybel et al. 2015).

### 6.3 Půda

Koncentrace vajíček půdních helmintů v půdě může být velmi vysoká v závislosti na místě odběru vzorků, zejména v nehygienickém prostředí nebo tam, kde se praktikuje otevřená defekace. Odběr vzorků půdy na přítomnost dalších helmintů kromě vajíček půdně-přenosných helmintů je důležitý kvůli možnosti zoonotických infekcí od infikovaných zvířat, zejména psů a koček (např. *Toxocara canis*, *Toxocara cati* a *Ancylostoma caninum*) (Amoah et al. 2017).

Velikost vzorku půdy se měří v sušíně odebrané ze svrchní vrstvy cca do 5 cm, přičemž se jeho hmotnost pohybuje mezi 10 a 50 g (Amoah et al. 2017).

Mezi důležité faktory, které ovlivňují výtěžnost vajíček helmintů z půdy, patří její typ a textura. Uvádí se, že hlinité, jílovité a jílovitohlinité půdy jsou poměrně obsahově chudšího objemu helmintů oproti půdám písčitém. Míra regenerace z jílovitých půd je trvale nižší a variabilnější než z písčitém. To může být způsobeno tím, že vajíčka půdně-přenosných helmintů patří mezi lehčí prvky přítomné v písčité půdě a usazují se v nejsvrchnější vrstvě suspenze, zatímco v suspenzích z hlíny a jílu mají tendenci sedimentovat pod vrstvou lehčích částic. Podobně může složení biosložek a kalů ovlivnit výtěžnost; bylo zjištěno, že heterogenní biosložky (např. smíchané s půdou) poskytují variabilnější výtěžnost. Bylo zjištěno, že chemické ošetření aplikované na biosolidy ovlivňuje chemii disociačních a flotačních procesů, což má vliv na účinnost využití (Collender et al. 2015; Amoah et al. 2017).

## 6.4 Zelenina/traviny

U různých druhů rostlin zavlažovaných odpadní vodou nebo hnojených kaly se zvyšuje pravděpodobnost kontaminace patogeny nebo šíření půdně-přenosných helmintů na spotřebitele. Druhy rostlin mají odlišné možnosti v podobě přenosu vajíček, to se může projevit ve strategii odběru vzorků i v míře kontaminace. Množství/hmotnost odebraných nebo analyzovaných vzorků zeleniny se u jednotlivých metod liší. Preferovaná hmotnost vzorků rostlin obvykle spadá do rozmezí 100 až 250 g. Tyto hmotnosti jsou většinou u zeleniny, u travin jsou nižší (Amoah et al. 2017).

Rude et al. (1984) uvádí průměrnou účinnost výtěžnosti 38,5 % pro metodu centrifugace na bázi nakonolového éteru k záchytu *Ascaris* a *Trichuris* z velkých agregátních vzorků zeleniny.

## 7 Závěr

Cíle této bakalářské práce byly splněny. Pomocí dostupné literatury jsem popsala nejznámější půdně-přenášené helminty šelmami, hlavně psy a kočkami. Zaměřila se blíže na výskyt a životaschopnost exogenních stádií v jednotlivých enviromentálních podmínkách a v neposlední řadě jsem porovнала a blíže specifikovala základní diagnostické metody používané pro kontaminaci prostředí.

Nejčastěji nalézaná vajíčka ve sběrných vzorcích z daných parazitů byla v sestupném pořadí u *Toxocara canis*, *Taenia* spp. a *Trichuris vulpis*. Jaro nebo podzim bylo nejvhodnější roční období k diagnostice nejvíce pozitivních vzorků, což bylo ovlivněno geografickým umístěním a podnebnými pásmy. Vajíčka obecně preferovala vlhké oblasti s nižší rychlostí větru a slunečním zářením; kdy stín významně přispíval ke zvýšenému výskytu parazitů. Naopak extrémní teploty v létě a zimě vedly k vysychání vajíček a larválních stádií nebo k zastavení vývoje infekčních stádií.

S přímým kontaktem s fekálně znečištěnou vodou, půdou, opětovného využívání odpadních vod a kalů v zemědělství nebo kontaminovanými potravinami stoupala prevalence infekcí.

K poměrně velmi přesné detekci helmintů v prostředí byly vyvinuty laboratorní metody, avšak celková diagnostika je náročná, kvůli heterogenitě výskytu ve vzorcích životního prostředí a různému množství vlhkosti, pevných látek a půdních částic. Metoda hodnocení životaschopnosti je ovlivněna faktory, jako jsou materiály a dostupné vybavení, zkušenosti výzkumníka a osobní preference. Nebyla dosud stanovena všeobecně uznávaná technika, či jednotný adekvátní diagnostický test pro srovnávací hodnocení koncentrací vajíček helmintů v různých maticích vzorků. Díky tomu vznikají chyby, které mají vliv na získané informace a jejich porovnávání se poté zdá mírně zavádějící a musí se počítat s odchylkami.

Pro svou nenáročnost a finanční úsporu byla v dostupných studiích dávána přednost konvenčním metodám. Technika FLOTAC ukázala nejvyšší citlivost jak v prostředí s nízkou, tak i vysokou intenzitou infekce.

Genetické metody byly vysoce citlivé, s výhodou druhové nebo poddruhové specifity. Navíc jejich vyhodnocení nezáleží na morfologii parazita na rozdíl od mikroskopických nebo imunologických testů. Nevýhodou však zůstává vysoká cena a speciální vybavení, které není vždy přenosné.



## 8 Literatura

- Abo-Shehada MN, Jebreen E, Arab B, Mukbel R, Torgerson PR. 2002. Prevalence of *Taenia multiceps* in sheep in northern Jordan. *Preventive Veterinary Medicine* **55**:201–207.
- Adriko M, Tinkitina B, Arinaitwe M, Kabatereine NB, Nanyunja M, Tukahebwa EM. 2018. Impact of a national deworming campaign on the prevalence of soil-transmitted helminthiasis in Uganda (2004-2016): Implications for national control programs. *PLOS Neglected Tropical Diseases* (e0006520) DOI: 10.1371/journal.pntd.0006520.
- Al-Jashamy K, Islam MN. 2007. Morphological Study Of *Taenia taeniaeformis* Scolex Under Scanning Electron Microscopy Using Hexamethyldisilazane. *Annals of Microbiology* **7**:80–83.
- Alvarado-Esquivel C, Romero-Salas D, Aguilar-Domínguez M, Cruz-Romero A, Ibarra-Priego N, Pérez de León AA. 2015. Epidemiological assessment of intestinal parasitic infections in dogs at animal shelter in Veracruz, Mexico. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **5**:34–39.
- Amoah ID, Singh G, Stenström TA, Reddy P. 2017. Detection and quantification of soil-transmitted helminths in environmental samples: A review of current state-of-the-art and future perspectives. *Acta Tropica* **169**:187–201.
- Avila HG, Sandon L, Anes PE, Meli SA, Giboin GA, Pérez VM, Periago MV. 2023. Environmental *Toxocara* spp. presence in crowded squares and public parks from San Juan Province, Argentina: A call for a “One Health” approach. *Frontiers in Medicine* **10**:1102396.
- Ayres RM, Mara DD., World Health Organization. 1996. *Analysis of Wastewater for Use in Agriculture: a Laboratory Manual of Parasitological and Bacteriological Techniques*. World Health Organization, Geneva, Switzerland. ISBN 92 4 154484
- Baker SM, Ensink JHJ. 2012. Helminth transmission in simple pit latrines. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **106**:709–710.
- Barutzki D, Schaper R. 2003. Endoparasites in dogs and cats in Germany 1999–2002. *Parasitology Research* **90**:148–150.
- Barutzki D, Schaper R. 2011. Results of parasitological examinations of faecal samples from cats and dogs in Germany between 2003 and 2010. *Parasitology Research* **109**:45–60.
- Bobes RJ, Fragoso G, Fleury A, García-Varela M, Sciutto E, Larralde C, Laclette JP. 2014. Evolution, molecular epidemiology and perspectives on the research of taeniid parasites with special emphasis on *Taenia solium*. *Infection, Genetics and Evolution* **23**:150–160.
- Bouwknegt M, Devleeschauwer B, Graham H, Robertson LJ, van der Giessen JWB, the Euro-FBP workshop participants. 2018. Prioritisation of food-borne parasites in Europe, 2016. *Euro Surveill* **23**:17–00161.
- Buttar BS, Nelson ML, Rusboom JR, Hancock DD, Walsh DB, Jasmer DP. 2013. Effect of heat treatment on viability of *Taenia hydatigena* eggs. *Experimental Parasitology* **4**:421–426.

- Collender PA, Kirby AE, Addiss DG, Freeman MC, Remais JV. 2015. Methods for Quantification of Soil-Transmitted Helminths in Environmental Media: Current Techniques and Recent Advances. *Trends in Parasitology* **31**:625–639.
- Colovic Calovski I, Barac A, Golubovic Z, Karamarkovic A, Mitrovic S, Milicevic M, Cvetkovic M, Dzamic AM. 2018. Case-series study of hepatic echinococcal cysts in Serbia: viability of scolices, seropositivity and epidemiological characteristics. *Journal of Helminthology* **92**:161–167.
- Coman BJ, Rickard MD. 1975. The location of *Taenia pisiformis*, *Taenia ovis* and *Taenia hydatigena* in the gut of the dog and its effect on net environmental contamination with ova. *Zeitschrift für Parasitenkunde* **47**:237–248.
- Dabrowaska J, Zdybel J, Karamon J, Kochanowski M, Stojceki K, Cencek T, Klapac T. 2014. Assessment of viability of the nematode eggs (*Ascaris*, *Toxocara*, *Trichuris*) in sewage sludge with the use of LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* **21**:35–41.
- Despommier D. 2003. Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. *Clinical Microbiology Reviews* **16**:265–272.
- De Liberato C, Berrilli F, Odorizi L, Scarcella R, Barni M, Amoruso C, Scarito A, Filippo MMD, Carvelli A, Iacoponi F, Scaramozzino P. 2018. Parasites in stray dogs from Italy: prevalence, risk factors and management concerns. *Acta Parasitologica* **63**:27–32.
- Deng MH, Zhong LY, Kamolnetr O, Limpanont Y, Lv ZY. 2019. Detection of helminths by loop-mediated isothermal amplification assay: a review of updated technology and future outlook. *Infectious Diseases of Poverty* **8**:1–22.
- Dubná S, Langrová I, Nápravník J, Jankovská I, Vadlejch J, Pekár S, Fechtner J. 2007. The prevalence of intestinal parasites in dogs from Prague, rural areas, and shelters of the Czech Republic. *Veterinary Parasitology* **145**:120–128.
- Eckert J. 1997. Epidemiology of *Echinococcus multilocularis* and *E. granulosus* in central Europe. *Parassitologia* **39**:337–44.
- El Maghrbi A, Hosni M, Dayhum A, Belhage A. 2019. Prevalence and associated risk factors of *Toxocara canis* eggs in dogs in Tripoli, Libya. *Advances in Animal and Veterinary Sciences* **7**:326–334.
- Fan ChK, Liao ChW, Cheng YCh. 2013. Factors affecting disease manifestation of toxocarosis in humans: Genetics and environment. *Veterinary Parasitology* **193**:342–352.
- Felsmann M, Michalski M, Felsmann M, Sokół R, Szarek J, Strzyżewska-Worotyńska E. 2017. Invasive forms of canine endoparasites as a potential threat to public health—A review and own studies. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* **24**:245–249.
- Ferreira A, Alho AM, Otero D, Gomes L, Nijse R, Overgaauw PAM, Madeira De Carvalho L. 2017. Urban dog parks as sources of canine parasites: contamination rates and pet owner behaviours in Lisbon, Portugal. *Journal of Environmental and Public Health* **2017**:1–7.

- Glickman LT, Schantz PM. 1981. Epidemiology and pathogenesis of zoonotic toxocariasis. *Epidemiologic Reviews* **3**:230–250.
- Hajipour N. 2019. A survey on the prevalence of *Toxocara cati*, *Toxocara canis* and *Toxascaris leonina* eggs in stray dogs and cats faeces in Northwest of Iran: a potential risk for human health. *Trop Biomed* **36**:143–151.
- Hajipour N, Rashidzadeh HA, Ketzis J, Seraji RE, Azizi H, Karimi I, Bagherniaee H, Montazeri R. 2020. *Taenia ovis* in Small Ruminants in Iran: Prevalence, Pathology, and Economic Loss. *Veterinary Sciences* **7**:34.
- Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, Vessella RL, Tewari M. 2013. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature Methods* **10**:1003–1005.
- Hoberg EP. 2002. *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. *Microbes and Infection* **4**:859–866.
- Chanove E, Ionică AM, Hochman D, Berchtold F, Gherman CM, Mihalca AD. 2019. Severe coenurosis caused by larvae of *Taenia serialis* in a live baboon (*Papio anubis*) in Benin. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **9**:134–138.
- Jarošová J, Antolová D, Iglodyová A, Königová A, Dolinská MU, Víchová B. 2022. Molecular identification of *Taenia hydatigena* from domestic and free-living animals in Slovakia, Central Europe. *Parasitology Research* **121**:1345–1354.
- Karkashan A, Khallaf B, Morris J, Thurbon N, Rouch D, Smith SR, Deighton M. 2015. Comparison of methodologies for enumerating and detecting the viability of *Ascaris* eggs in sewage sludge by standard incubation-microscopy, the BacLight Live/Dead viability assay and other vital dyes. *Water Research* **68**:533–544.
- Khurana S, Singh S, Mewara A. 2021. Diagnostic Techniques for Soil-Transmitted Helminths – Recent Advances. *Research and Reports in Tropical Medicine* **12**:181–196.
- Kurnosova OP, Arisov MV, Odoyevskaya IM. 2019. Intestinal parasites of pets and other house-kept animals in Moscow. *Helminthologia* **56**:108–117.
- Levantesi C, La Mantia R, Masciopinto C, Böckelmann U, Ayuso-Gabella MN, Salgot M, Tandoi V, Van Houtte E, Wintgens T, Grohmann E. 2010. Quantification of pathogenic microorganisms and microbial indicators in three wastewater reclamation and managed aquifer recharge facilities in Europe. *Science of The Total Environment* **408**:4923–4930.
- Lundström-Stadelmann B, Rufener R, Hemphill A. 2020. Drug repurposing applied: Activity of the anti-malarial mefloquine against *Echinococcus multilocularis*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **13**:121–129.

- MagnaVal JF, Bouhsira E, Fillaux J. 2022. Therapy and Prevention for Human Toxocariasis. *Microorganisms* **10**:241.
- Maizels RM. 2013. *Toxocara canis*: Molecular basis of immune recognition and evasion. *Veterinary Parasitology* **193**:365–374.
- Martínez-Moreno FJ, Hernández S, López-Cobos E, Becerra C, Acosta I, Martínez-Moreno A. 2007. Estimation of canine intestinal parasites in Córdoba (Spain) and their risk to public health. *Veterinary Parasitology* **143**:7–13.
- Minnaar WN, Krecek RC, Fourie LJ. 2002. Helminths in dogs from a peri-urban resource-limited community in Free State Province, South Africa. *Veterinary Parasitology* **107**:343–349.
- Mukaratirwa S, Singh VP. 2010. Prevalence of gastrointestinal parasites of stray dogs impounded by the Society for the Prevention of Cruelty to Animals (SPCA), Durban and Coast, South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association* **81**:123–125.
- Opazo A, Barrientos C, Sanhueza AM, Urrutia N, Fernández I. 2019. Fauna parasitaria en caninos (*Canis lupus familiaris*) de un sector rural de la región central de Chile. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú* **30**:330–338.
- O'Reilly A, McCowan Ch, Hardman Ch, Stanley R. 2002. *Taenia serialis* causing exophthalmos in a pet rabbit. *Veterinary Ophthalmology* **5**:227–230.
- Overgaauw PAM, Nederland V. 1997. Aspects of *Toxocara* Epidemiology: Human Toxocarosis. *Critical Reviews in Microbiology* **23**:215–231.
- Overgaauw PAM, van Knapen F. 2013. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. *Veterinary Parasitology* **193**:398–403.
- Papini R, Campisi E, Faggi E, Pini G, Mancianti F. 2012. Prevalence of *Toxocara canis* eggs in dog faeces from public places of Florence, Italy. *Helminthologia* **49**:154–158.
- Raičević JG, Pavlović IN, Galonja-Coghill TA. 2021. Canine intestinal parasites as a potential source of soil contamination in the public areas of Kruševac, Serbia. *The Journal of Infection in Developing Countries* **15**:147–154.
- Ramos DG de S, Zocco BKA, Torres M de M, Braga ÍA, Pacheco R de C, Sinkoc AL. 2015. Helminths parasites of stray dogs (*Canis lupus familiaris*) from Cuiabá, Midwestern of Brazil. *Semina: Ciências Agrárias* **36**:889–894.
- Rashwan N, Diawara A, Scott ME, Prichard RK. 2017. Isothermal diagnostic assays for the detection of soil-transmitted helminths based on the SmartAmp2 method. *Parasit Vectors* **10**:496.
- Remesar S, Castro-Scholten S, Jimenez-Martin D, Camacho-Sillero L, Morrondo P, Rouco C, Gomez-Guillamon F, Cano-Terriza D, Garcia-Bocanegra I. 2021. Spatiotemporal monitoring of *Cysticercus pisiformis* in European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Mediterranean ecosystems in southern Spain. *Preventive Veterinary Medicine* **197**:105508.

- Riggio F, Mannella R, Ariti G and Perrucci S. 2013. Intestinal and lung parasites in owned dogs and cats from central Italy. *Veterinary Parasitology* **193**:78–84.
- Ristic M, Dimitrijevic S, Višnjic A, Bogunovic D, Cgajic B, Stojanovic M and Ilic T. 2020. Dogs from public city parks as a potential source of pollution of the environment and risk factor for human health. *Indian Journal of Animal Sciences* **90**:535–542.
- Romig T. 2003. Epidemiology of echinococcosis. *Langenbecks Arch Surg* **388**:209–217.
- Romig T, Deplazes P, Jenkins D, Giraudoux P, Massolo A, Craig PS, Wassermann M, Takahashi K, de la Rue M. 2017. Chapter Five – Ecology and Life Cycle Patterns of *Echinococcus* Species. *Advances in Parasitology* **95**:213–314
- Rostami A, Ma G, Wang T, Koehler AV, Hofmann A, Chang BCH, Macpherson CN, Gasser RB. 2019. Human toxocariasis – A look at a neglected disease through an epidemiological ‘prism’. *Infection, Genetics and Evolution* **74**:104002.
- Rothrock Jr. MJ, Hiatt KL, Kiepper BH, Ingram K, Hinton A. 2013. Quantification of zoonotic bacterial pathogens within commercial poultry processing water samples using droplet digital PCR. *Advances in Microbiology* **3**:403–411.
- Rubinsky-Elefant G, Hirata CE, Yamamoto JH, Ferreira MU. 2010. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **104**:3–23.
- Rude RA, Jackson GJ, Bier JW, Sawyer TK, Risty NG. 1984. Survey of Fresh Vegetables for Nematodes, Amoebae, and *Salmonella*. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* **67**:613–615.
- Saelens G, Robertson L, Gabriël S. 2022. Diagnostic tools for the detection of taeniid eggs in different environmental matrices: A systematic review. *Food and Waterborne Parasitology* **26** (e00145). DOI: 10.1016/j.fawpar.2022.e00145.
- Scaramozzino P, Carvelli A, Iacoponi F, De Liberato C. 2018. Endoparasites in household and shelter dogs from Central Italy. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* **6**:45–47.
- Strube Ch, Heuer L, Janecek E. 2013. *Toxocara* spp. infections in paratenic hosts. *Veterinary Parasitology* **193**:375–389.
- Symeonidou I, Arsenopoulos K, Tzilvesb D, Sobac B, Gabriëld S, Papadopoulos E. 2018. *Annals of Gastroenterology* **31**:40.
- Toral-Bastida E, Garza-Rodriguez A, Jimenez-Gonzalez DE, Garcia-Cortes R, Avila-Ramirez G, Maravilla P, Flisser A. 2011. Development of *Taenia pisiformis* in golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Parasites Vectors* **4**:147.

- Traversa D, di Regalbono AF, Di Cesare A, La Torre F, Drake J, Pietrobelli M. 2014. Environmental contamination by canine geohelminths. *Parasites & Vectors* **7**:67.
- Uga S, Matsuo J, Kimura D, Rai SK, Koshino Y, Igarashi K. 2000. Differentiation of *Toxocara canis* and *T. cati* eggs by light and scanning electron microscopy. *Veterinary Parasitology* **92**:287–294.
- Varcasia A, Tamponi C, Ahmed F, Cappai MG, Porcu F, Mehmood N, Dessi G, Scala A. 2022. *Taenia multiceps* coenurosis: a review. *Parasites & Vectors* **15**:84.
- Veit P, Bilger B, Schad V, Schäfer J, Frank W, Lucius R. 1995. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitology* **110**:79–86.
- WHO. 2006. WHO Guidelines for the Safe Use of Wastewater, Excreta and Greywater (Volume IV: Excreta and greywater use in agriculture). World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland. ISBN: 92 4 154685 9.
- Woolsey ID, Miller AL. 2021. *Echinococcus granulosus sensu lato* and *Echinococcus multilocularis*: A review. *Research in Veterinary Science* **135**:517–522.
- Xhaxhiu D, Kusi I, Rapti D, Kondi E, Postoli R, Rinaldi L, Dimitrova ZM, Visser M, Knaus M, Rehbein S. 2011. Principal intestinal parasites of dogs in Tirana, Albania. *Parasitology Research* **108**:341–353.
- Yaya-Beas RE, Cadillo-La-Torre EA, Kujawa-Roeleveld K, van Lier JB, Zeeman G. 2016. Presence of helminth eggs in domestic wastewater and its removal at low temperature UASB reactors in Peruvian highlands. *Water Research* **90**:286–293.
- Yevstafieva VA, Kravchenko SO, Gutyj BV, Melnychuk VV, Kovalenko PN, Volovyk LB. 2019. Morphobiological analysis of *Trichuris vulpis* (Nematoda, Trichuridae), obtained from domestic dogs. *Regulatory Mechanisms in Biosystems* **10**:165–171.
- Zanzani SA, Gazzonis AL, Scarpa P, Berrilli F, Manfredi MT. 2014. Intestinal Parasites of Owned Dogs and Cats from Metropolitan and Micropolitan Areas: Prevalence, Zoonotic Risks, and Pet Owner Awareness in Northern Italy. *BioMed Research International* (696508) DOI: 10.1155/2014/696508.
- Zdybel J, Cencek T, Karamon J, Kłapeć T. 2015. Effectiveness of selected stages of wastewater treatment in elimination of eggs of intestinal parasites. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* **59**:51–57.