

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra etologie a zájmových chovů



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vliv skladování koprologického vzorku koně na
přesnost kvantifikace vajíček strongylidních hlístic
metodou Mini-FLOTAC**

Diplomová práce

**Autorka práce: Bc. Jana Belecová
Program: Zájmové chovy zvířat**

Vedoucí práce: Ing. Jana Nápravníková, DiS., Ph.D.

© 2025 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Vliv skladování koprologického vzorku koně na přesnost kvantifikace vajíček strongylidních hlístic metodou Mini-FLOTAC" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.



V Praze dne 20.4.2025

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Janě Nápravníkové, DiS., Ph.D. za vedení mé diplomové práce, cenné připomínky, praktickou pomoc, podporu a trpělivost. Velký dík patří též mému manželovi, který mi byl velkou oporou při studiu a vypracování této práce.

Vliv skladování koprologického vzorku koně na přesnost kvantifikace vajíček strongylidních hlístic metodou Mini-FLOTAC

Souhrn

Strongylidní hlístice představují nejrozšířenější skupinu endoparazitů u koní. Výskyt těchto parazitů je u populace koní prakticky všudypřítomný, a jejich přítomnost je považována za běžný nález při koprologickém vyšetření. Parazitární infekce obecně mohou významně přispívat k rozvoji různých patologických stavů u koní, a proto je včasná diagnostika a monitorování intenzity infekce klíčové pro zajištění zdraví koní.

K identifikaci a analýze množství vajíček parazitů se standardně využívá koprologické vyšetření. Koprologická vyšetření by měla být prováděna nejen u jedinců vykazujících klinické příznaky, ale i v rámci preventivních kontrol zdravotního stavu. Zásadní význam v tomto kontextu hraje kvalita preanalytické fáze, zejména správný odběr a následné uchování vzorku. Nedostatečné poučení chovatelů a držitelů koní o správných postupech při odběru vzorku často vede k chybám, které zásadně ovlivňují validitu vyšetření. Nejčastějšími pochybeními jsou prodleva mezi odběrem a vyšetřením, v jejímž důsledku dochází k vývoji parazitů ve vzorku, a dále nevhodné podmínky skladování, především teplotní režim.

Vzorky, které nejsou zpracovány včas nebo jsou uchovávány při nevhodných teplotách, mohou vykazovat zkreslené výsledky. V rámci této práce byly porovnávány různé metody uchovávání koprologických vzorků s cílem identifikovat podmínky, které nejlépe zachovávají diagnostickou výpovědní hodnotu materiálu.

Analýza byla realizována s využitím metody Mini-FLOTAC, která umožňuje kvantitativní stanovení počtu vajíček strongylidů a je ceněna pro svou vysokou senzitivitu a použitelnost v rutinní klinické praxi. Vyšetření byla prováděna s odstupem několika časových intervalů od odběru, což umožnilo sledovat dynamiku změn ve vzorcích v závislosti na čase a skladovacích podmínkách.

Klíčová slova: koně, strongylidní hlístice, koprologický vzorek, Mini-FLOTAC, skladování

The Effect of Storage Conditions of Equine Coprological Samples on the Accuracy of Strongylid Nematode Egg Quantification Using the Mini-FLOTAC Method

Summary

Strongylid nematodes represent the most widespread group of endoparasites in horses. Their occurrence is virtually ubiquitous within the equine population, and their presence is considered a common finding during coprological examination. Parasitic infections in general can significantly contribute to the development of various pathological conditions in horses; therefore, timely diagnosis and monitoring of infection intensity are crucial for maintaining equine health.

Coprological examination is routinely used for the identification and quantification of parasite eggs. This diagnostic procedure should be performed not only in individuals exhibiting clinical symptoms but also as part of preventive health monitoring. The quality of the pre-analytical phase plays a critical role in this context, particularly the proper collection and subsequent storage of the sample. Inadequate guidance provided to horse owners and caretakers regarding correct sampling procedures frequently results in errors that may substantially compromise the validity of the examination. The most common errors include delays between sample collection and analysis during which parasitic development within the sample may occur and inappropriate storage conditions, especially with regard to temperature control.

Samples that are not processed in a timely manner or stored under unsuitable temperature conditions may yield distorted results. This study compared various methods of storing coprological samples with the aim of identifying conditions that best preserve the diagnostic value of the material.

The analysis was conducted using the Mini-FLOTAC technique, which allows for the quantitative determination of strongylid egg counts and is highly regarded for its sensitivity and applicability in routine clinical practice. Examinations were performed at several time intervals following sample collection, enabling the monitoring of dynamic changes in the samples depending on time and storage conditions.

Keywords: horses, strongylid egg, fecal horse sample, Mini-FLOTAC, storage

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce.....	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Parazitě u koní.....	10
3.2	Strongylidi.....	10
3.2.1	Velcí strongylidi	10
3.2.1.1	Vývojový cyklus	11
3.2.1.2	Patogenita a klinické projevy	13
3.2.2	Malí strongylidi	13
3.2.2.1	Vývojový cyklus	14
3.2.2.2	Patogenita a klinické projevy	15
3.3	Koprologické vyšetření koní	16
3.3.1	McMasterova metoda	16
3.3.2	Wisconsin (centrifugační flotace)	17
3.3.3	FLOTAC	18
3.3.4	Mini-FLOTAC	19
3.3.5	FECPAK systém.....	21
3.3.6	Parasight a další automatizované systémy	22
3.3.7	Srovnání metod.....	23
3.4	Skladování koprologických vzorků	25
3.4.1	Skladování při pokojové teplotě.....	25
3.4.2	Skladování v chladničce	25
3.4.3	Skladování zmražených vzorků.....	25
3.4.4	Vliv přístupu vzduchu	26
3.4.5	Vliv přístupu světla	26
3.4.6	Chemická konzervace vzorků	27
4	Metodika.....	28
4.1	Zdroj koprologického materiálu.....	28
4.2	Vyšetřovací metoda.....	28
4.3	Skladovací materiál.....	29
4.4	Skladovací teplota	30
5	Výsledky	31
5.1	Skladovací materiál.....	31
5.1.1	Statistické vyhodnocení rozdílů mezi skladovacími materiály	34
5.1.2	Statistické vyhodnocení vlivu doby skladování při různých skladovacích materiálech	35

5.2	Skladovací teplota	36
5.2.1	Statistické vyhodnocení rozdílů mezi skladovacími teplotami	37
5.2.2	Statistické vyhodnocení vlivu doby skladování při různých skladovacích teplotách	38
6	Diskuse.....	39
6.1	Vliv skladovací teploty.....	39
6.2	Vliv skladovacího materiálu.....	40
6.3	Význam metody Mini-FLOTAC.....	40
6.4	Shrnutí.....	40
7	Závěr	41
7.1	Hypotézy.....	41
7.1.1	Hypotéza první – vliv doby skladování.....	41
7.1.2	Hypotéza druhá – vliv skladovací teploty	41
7.1.3	Hypotéza třetí – vliv skladovacího materiálu	42
7.2	Praktická doporučení.....	42
8	Literatura	43
9	Seznam tabulek, obrázků a grafů	50
9.1	Tabulky	50
9.2	Obrázky.....	50
9.3	Grafy.....	50
10	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	51

1 Úvod

Strongylidní hlístice jsou častým parazitem u koňovitých (Equidae), zahrnující koně, osly a jejich křížence, a mohou způsobit vážné poškození střev a v krajním případě i úhyn. Pravidelná koprologická vyšetření jsou proto nezbytná pro včasnou identifikaci a léčbu infekce způsobenou těmito parazity. Infekce se zjišťuje kvantifikací vajíček v koprologickém materiálu.

Z řady metod, které jsou využívány k vyšetření koprologického materiálu byla vybrána metoda Mini-FLOTAC. V porovnání s dalšími metodami jako např. McMasterova metoda se metoda Mini-FLOTAC ukázala jako citlivější, a tudíž vhodnější pro detekci vajíček strongylidních hlístic. Koprologický materiál byl podroben testování z hlediska vlivu teploty a času na skladovaný materiál.

Skladování koprologických vzorků má vliv na přesnost a kvantifikaci vajíček strongylidních hlístic. Zkoumány byly vzorky, které byly skladovány při různých teplotách a v časovém odstupu. Zvolený skladovací materiál taktéž ovlivňuje míru úbytku vajíček strongylidních hlístic. Jako skladovací materiál byly použity ZIP sáčky o různé gramáži a propustnosti světla. Způsob skladování koprologických vzorků byl v této práci posuzován se zaměřením jak na použitý materiál, tak i skladovací teplotu a čas skladování.

Experiment popsany v této práci může vést k lepšímu pochopení chovatelů koní, jakým způsobem mají odebrané koprologické vzorky skladovat. Optimální skladování vzorku při vhodných teplotách a jejich rychlá analýza pomocí citlivých metod, jako je Mini-FLOTAC, je klíčové pro zajištění nejlepších výsledků při detekci množství vajíček strongylidních hlístic přítomných ve zkoumaném vzorku. Cílem práce je formulace konkrétních doporučení pro chovatele a držitele koní týkajících se optimálního postupu při odběru, manipulaci a transportu koprologických vzorků s ohledem na zachování maximální diagnostické přesnosti.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem této práce je zhodnocení vlivu skladování koprologického vzorku koně na přesnost kvantifikace vajíček strongylidních hlístic prostřednictvím metody Mini-FLOTAC a na základě těchto poznatků stanovit nejvhodnější způsob skladování vzorku. Skladování vzorku bude posuzováno s ohledem na použitý skladovací materiál, teplotu a čas skladování.

Vědecké hypotézy, které budou v této práci ověřovány jsou:

1. Počet vajíček strongylidních hlístic se s narůstajícím časem skladování vzorku snižuje.
2. Teploty pod bodem mrazu značně redukují počet nalezených vajíček strongylidních hlístic.
3. Skladovací materiál významně ovlivňuje dobu, po kterou lze skladovaný materiál vyšetřit.

3 Literární rešerše

3.1 Parazité u koní

V odborné literatuře lze nalézt celou řadu obecných definic parazitů. Paraziti jsou nejčastěji charakterizováni jako organismy metabolicky a fyziologicky závislí na svém hostiteli (Elsheikha & Kahn 2011). Ve srovnání s hostitelem bývají menší a vykazují vyšší reprodukční kapacitu (Hampl 2010). Parazité jsou rovněž definováni jako organismy, které ke specifické fázi svého vývoje využívají jiný organismus. Z tohoto vztahu parazit významně profituje, zatímco hostitelský organismus je tímto vztahem poškozován (Flegr 2010).

Klasifikace parazitů se odvíjí od zvoleného předmětu zkoumání, který například zohledňuje typ vztahu k hostiteli – tedy zda se jedná o parazity vnitřní, nebo o parazity žijící na povrchu těla. Tato práce se zaměřuje na endoparazity trávicího traktu koní, konkrétně na zástupce kmene Nematoda z čeledi Strongylidae, kteří budou dále podrobněji popsáni. Obecně lze konstatovat, že kůň je hostitelem širokého spektra vnitřních parazitů, přičemž z klinického hlediska mají největší význam zástupci helmintů. Mezi nejrozšířenější a z hlediska chovu nejznámější jsou: malí strongylidi z podčeledi Cyathostominae, velcí strongylidi z podčeledi Strongylinae, škrkavka koňská (*Parascaris equorum*), tasemnice koňská (*Anoplocephala perfoliata*), roup koňský (*Oxyuris equi*), střechci z rodu *Gasterophilus*, hádě (*Strongyloides westeri*), filárie (*Habronema* spp., *Draschia megastoma*) a heteroxenní kokcidie (*Sarcocystis neurona*) (Bodeček et al. 2017).

3.2 Strongylidi

Čeleď *Strongylidae* (kmen Nematoda, třída Chromadorea, řád Rhabditida) se na základě charakteristických morfologických znaků dělí do dvou podčeledí: Strongylinae (tzv. velcí strongylidi), kteří jsou typičtí kulovitou či nálevkovitou bukální kapsulí, a Cyathostominae (tzv. malí strongylidi), jejichž zástupci disponují bukální kapsulí válcovitého tvaru (Dubinský & Jurásek 1993; Lichtenfels et al. 2008).

Hlístice z čeledi Strongylidae představují vysoce odolné parazity, kteří infikují pasoucí se koně po celém světě bez ohledu na klimatické či geografické podmínky. Tato skupina je druhově velmi pestrá a rozsáhlá – dosud bylo popsáno více než 50 druhů (Lichtenfels et al. 2008). Patří k nejčastěji diagnostikovaným parazitům u koní. Infekce je natolik rozšířená, že prakticky neexistuje kůň, který by během svého života nebyl těmito hlísticemi infikován. Počet parazitických jedinců může dosáhnout desítek až stovek tisíc na jednoho hostitele. S přibývajícím věkem koně navíc výskyt strongylidních hlístic klesá (Langrová & Jankovská 2002; Nielsen 2012).

3.2.1 Velcí strongylidi

Velcí strongylidi představují parazity náležející do podčeledi Strongylinae. Na rozdíl od malých strongylidů (podčeleď Cyathostominae) tato skupina zahrnuje několik rodů, z nichž nejznámější a nejpatogennější je rod *Strongylus*. Mezi nejvýznamnější zástupce patří *Strongylus vulgaris* (česky zubovka věncová), *Strongylus edentatus* a *Strongylus equinus*

(zubovka koňská). Do podčeledi *Strongylinae* však náleží i další rody, jako např. *Triodontophorus*, *Craterostomum* či *Oesophagodontus*, které mohou rovněž parazitovat ve střevě koně, ale jsou obvykle méně patogenní. Název „zubovka“ odkazuje na vývoj zubních struktur, které těmto parazitům umožňují snadnější přichycení ke střevní sliznici hostitele (viz obr. 1). V místě přísátí bývají patrné červenomodré skvrny jako důsledek lokálního poškození tkáně. Dospělci velkých strongylidů jsou robustní, červenohnědě zbarvené válcovité hlístice.

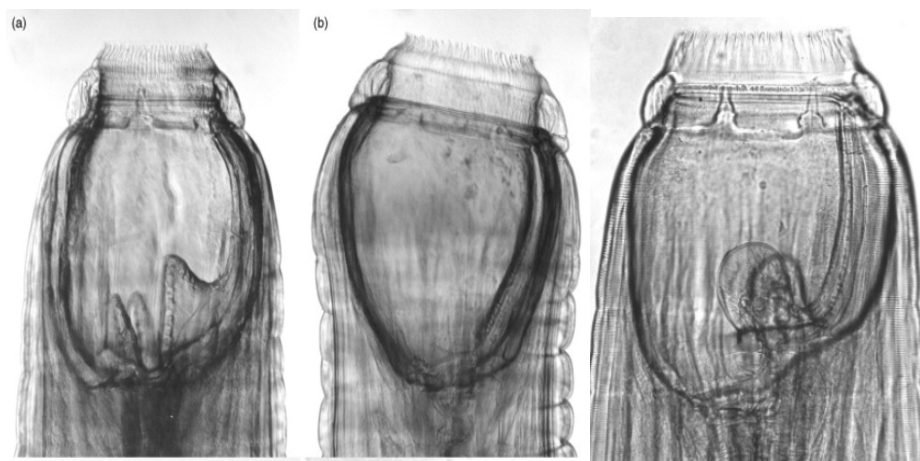
Charakteristickým znakem všech zástupců této skupiny je okrouhlá ústní kapsula (Langrová & Jankovská 2002; Koudela 2008).

Počet zubů v ústní kapsuli je druhově specifický. Nejmenší zástupce *Strongylus vulgaris* má pouze dva zuby, zatímco *Strongylus equinus*, největší druh z této skupiny, disponuje čtyřmi zuby. Naproti tomu *Strongylus edentatus* žádné zuby v ústní kapsuli nemá.

Rozměry jednotlivých druhů se liší až o několik milimetrů. Samci *Strongylus equinus* dosahují velikosti 22–26 mm, zatímco samice měří 32–45 mm. U *Strongylus vulgaris* dosahují samci délky 14–17 mm a samice 20–21 mm. *Strongylus edentatus* je největší: samci měří 27–37 mm a samice 35–50 mm. Vajíčka všech zástupců mají typické strongylidní morfologické znaky. Délka a šířka vajíček u *Strongylus edentatus* a *Strongylus equinus* se pohybují v rozmezí 85–92 × 41–54 μm. Vajíčka *Strongylus vulgaris* dosahují rozměrů 80–93 × 47–54 μm (Bodeček et al. 2017).

Samci všech druhů disponují výraznou kopulační bursou na kaudálním konci těla, která je typická pro nematody čeledi Strongylidae (Dyk et al. 1969).

Obrázek 1 Hlavové části druhů rodu *Strongylus*, boční pohled, zleva, *S. equinus*, *S. edentatus*, *S. vulgaris*



Zdroj: Lichtenfels (1975)

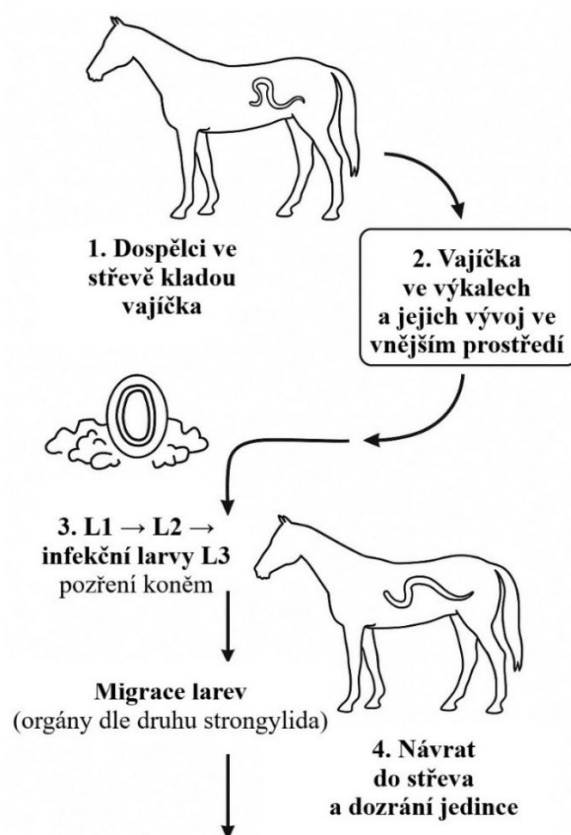
3.2.1.1 Vývojový cyklus

Velcí strongylidi mají přímý (monoxenní) životní cyklus, což znamená, že nepotřebují mezihostitele. Vývoj zahrnuje tato hlavní stádia:

1. Dospělci žijí ve slepém a tlustém střevě koně, kde kladou vajíčka.
2. Vajíčka jsou vylučována trusem do prostředí.

3. Ve vnějším prostředí se z vajíček líhnou larvy L1, které se dále svlékají do stádia L2 a infekčního stádia L3. Tento vývoj trvá přibližně 7–20 dní v závislosti na teplotě a vlhkosti prostředí.
4. Larvy L3 se nacházejí na pastvině a jsou pozřeny koněm.
5. Po pozření larvy migrují tělem koně specifickou cestou (liší se podle druhu):
 - *Strongylus vulgaris*: migrace přes střevní stěnu do tepen → vývoj v arteriích → návrat do tlustého střeva
 - *Strongylus edentatus*: migrace přes portální oběh do jater → pobřišnice → návrat do tlustého střeva
 - *Strongylus equinus*: migrace do jater → podél hepatického vazů k pankreatu → návrat do slepého a tlustého střeva
6. Larvy během migrace projdou dalšími svlékáními (L4 a L5).
7. Ve střevě larvy dospívají a kladou vajíčka – cyklus se uzavírá. (Langrová & Jankovská 2002; Volf & Horák 2007; Corning 20009; Bredtmann et al. 2017).
8. Prepatentní perioda se druhově liší:
 - S. vulgaris*: přibližně 6,5 až 7 měsíců
 - S. edentatus*: přibližně 12 měsíců
 - S. equinus*: přibližně 8 až 9 měsíců (Rommel et al. 2000).

Obrázek 2 Životní cyklus Strongylidních hlístic



Zdroj: Vlastní (2025)

3.2.1.2 Patogenita a klinické projevy

Dospělí jedinci velkých strongylidů se v tlustém střevě živí krví a tkáněmi hostitele. Pomocí robustních ústních kapsulí, které jsou pro tuto podčeleď typické, se přichytí ke střevní sliznici, čímž ji mechanicky narušují. Toto poškození vede ke vzniku krvácivých ulcerací (Mfitilodze et al. 1985). V případě silné infekce, čítající desítky až stovky parazitů, dochází k významným ztrátám krve a plazmatických proteinů a ke chronickému poškození střevní stěny. Klinicky se tento stav projevuje anémií, úbytkem hmotnosti a celkovým zhoršením kondice koně. Závažnost klinických příznaků závisí na intenzitě a délce trvání infestace. Mírné až středně těžké infekce často probíhají bez zjevných příznaků – mnozí koně nevykazují žádné symptomy ani při vysoké zátěži parazity (Jürgenschellert et al. 2022). Za nejvíce patogenní druh velkých strongylidů je jednoznačně považován *Strongylus vulgaris*, který během své zdoluhavé migrace v organismu hostitele působí závažná poškození. Během průniku tepnami vyvolává výraznou zánětlivou reakci cévní stěny, označovanou jako verminózní aneurysma, charakterizovanou masivní infiltrací leukocytů a ztlustěním vnitřních vrstev cév (McCraw 1976). Tromby, které se často tvoří zejména v oblasti *arteria mesenterica cranialis*, mohou vést k částečné nebo úplné obstrukci cévního řečiště, a tím i k ischemii nebo infarktu segmentů střeva (Lester et al. 1989). Snížené prokrvení se následně může projevit poruchou střevní motility, vedoucí ke kolikovým stavům, nebo v závažnějších případech ke komplikacím, jako je torze či intususcepce střeva (Klei 2019). V současnosti se infekce *Strongylus vulgaris* v mnoha chovech vyskytuje spíše sporadicky, přestože infekce strongylidními hlísticemi bývá zpravidla vícedruhová. Díky dlouhé prepatentní periodě tohoto druhu a strategickému přístupu k odčervování se prevalence výrazně snížila, často na jednotky procent. I přes nízký výskyt však *Strongylus vulgaris* představuje závažné riziko. Stále platí, že tento druh a jemu příbuzní zástupci patří mezi helminty koní s nejvyšší patogenitou, přestože jejich význam byl díky používání anthelmintik značně potlačen (Jürgenschellert et al. 2022). Larvy *Strongylus edentatus* a *Strongylus equinus* během své migrace poškozují jaterní tkáň, peritoneum a pankreas, což může vyvolat lokální zánětlivé reakce. Klinicky se infekce může projevit například horečkou, nechutenstvím nebo kolikovými obtížemi (McCraw et al. 1974; McCaw 1976).

3.2.2 Malí strongylidi

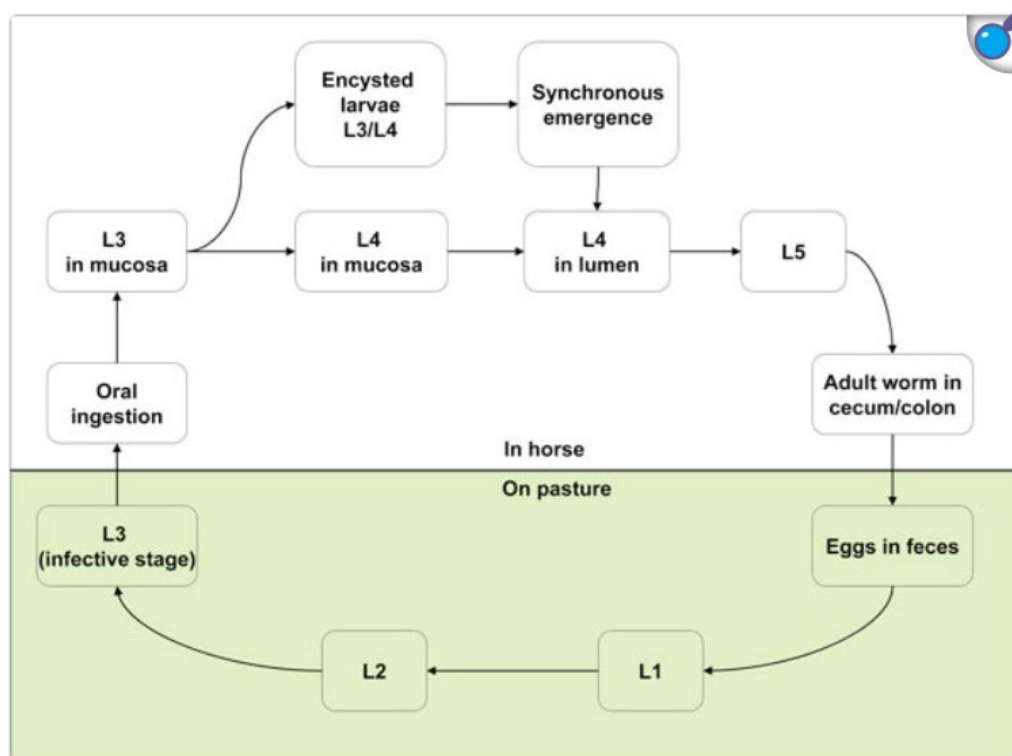
Malí strongylidi představují skupinu parazitických hlístic koní náležejících do podčeledi Cyathostominae. Na rozdíl od velkých strongylidů se jedná o početnější a kosmopolitně rozšířenou skupinu. K dnešnímu dni bylo popsáno více než 50 druhů náležejících do 14 rodů, mezi něž patří např. *Cyathostomum*, *Cylicocyclus*, *Cylicodontophorus*, *Cylicostephanus*, *Cylindropharynx*, *Gyalocephalus*, *Hsiungia*, *Parapoteriostomum*, *Corovinema*, *Cateriosonyc*, *Cateriostomum*, *Skrjabinodentus* a *Tridentoinfundibulum* (Langrová & Jankovská 2001; Lichtenfels et al. 2008; Bredtmann et al. 2017). Vzhledem k častému výskytu smíšených infekcí je spolehlivá identifikace jednotlivých druhů velmi obtížná. Mnozí zástupci se vzhledově podobají, a jejich přesné rozlišení vyžaduje detailní mikroskopické vyšetření (Lichtenfels et al. 2008; Bodeček et al. 2017). Malí strongylidi jsou drobnější a štíhlejší než zástupci velkých strongylidů. Dospělí jedinci parazitují v tlustém střevě a dosahují délky 0,5–2,5 cm. Oproti

velkým strongylidům jsou subtilnější (Corning et al. 2009). Mají charakteristickou válcovitou nebo prstencovitou ústní kapsli bez výrazných zubních struktur (Lichtenfels et al. 2002; Lichtenfels et al. 2008). Dospělci jsou často načervenalí v důsledku sání krve a tkáňových tekutin z lumen střeva hostitele (Corning et al. 2009). Vajíčka malých strongylidů jsou morfologicky téměř nerozeznatelná od vajíček velkých strongylidů. Jejich rozměry se pohybují kolem $90 \times 50 \mu\text{m}$ (Jurášek et al. 1993).

3.2.2.1 Vývojový cyklus

Stejně jako u velkých strongylidů, je i u malých strongylidů vývojový cyklus přímý, tedy bez účasti mezhlostitele (viz obr. 3) (Corning 2009).

Obrázek 3 Životní cyklus malých strongylidů



Zdroj: Corning (2009)

Dospělí jedinci malých strongylidů parazitují v lumen slepého a tlustého střeva, kde kladou vajíčka, která jsou následně vylučována trusem do vnějšího prostředí. Z vajíček se ve vhodných podmínkách vyvíjejí larvy L1 a L2, které se dále transformují do infekčního stádia L3. Tento vývoj může za optimálních teplotních podmínek proběhnout již za 3 až 5 dní. Infekční larvy L3 přežívají na pastvinách i během zimních měsíců. Po jejich pozření během pastvy koněm pronikají do trávicího traktu, kde se svlékají a migrují do sliznice tlustého střeva – zejména do mukózy a submukózy céka a ventrálního kolonu. Na rozdíl od velkých strongylidů v organismu nemigrují (Gasser et al. 2004; Corning 2009; Bredtmann et al. 2017). Uvnitř střevní stěny se larvy vyvíjejí dále do stádia L4. Část z nich se během 6–8 týdnů promění na larvy L4 a L5 a vrací se do lumen střeva jako mladí dospělci. V tomto případě je prepatentní

perioda přibližně 2 měsíce (Love & Duncan 1992). Významná část larev však vstupuje do inhibovaného vývojového stadia – tzv. hypobiózy – buď ve stadiu L3, nebo v časném stadiu L4. V tomto klidovém stavu mohou přežívat ve střevní stěně po mnoho měsíců, výjimečně až několik let (Proudman & Matthews 2000; Corning 2009). Tyto „spící“ larvy představují významnou rezervoárovou populaci, vůči níž jsou běžně používaná anthelmintika neúčinná (Corning 2009). K jejich synchronní aktivaci dochází zpravidla sezónně, nejčastěji na konci zimy nebo na jaře, případně v reakci na náhlé změny prostředí, jako je například podání anthelmintika. Aktivované larvy se hromadně svlékají do stadia L4 a opouštějí cysty, čímž se navracejí do lumen střeva (Baudena et al. 2000). Následně rychle dospívají. Samice začínají klást vajíčka, která jsou trusem opět uvolňována do prostředí, čímž se životní cyklus uzavírá. Jediný kůň tak může hostit rozsáhlou populaci malých strongylidů zahrnující současně dospělé, vyvíjející se larvy ve střevním lumen i encystované vývojové formy ve střevní stěně (Bodeček et al. 2017).

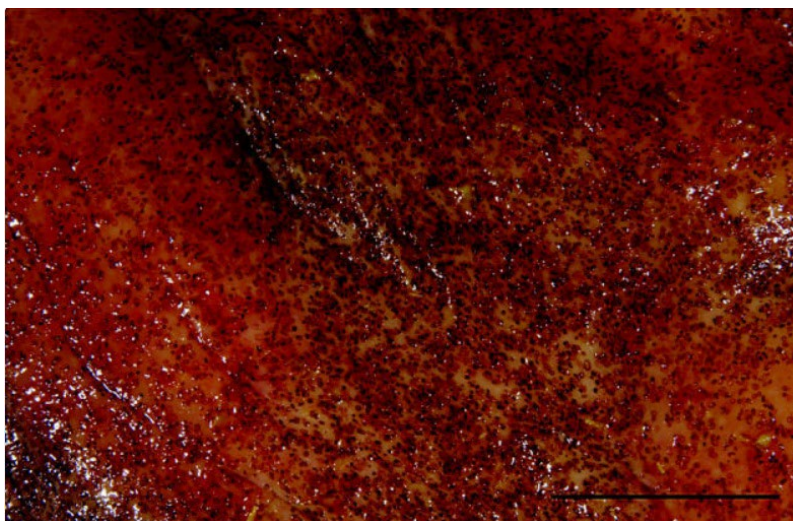
3.2.2.2 Patogenita a klinické projevy

Většina koní infikovaných dospělými malými strongylidy nevykazuje žádné klinické příznaky, a to ani při přítomnosti několika tisíc až stovek tisíc jedinců (Love et al. 1999). Patogenní potenciál této skupiny spočívá především v larválních stádiích. Během invaze L3 larev do střevní sliznice dochází k poškození epitelu a submukózy, což vede k lokální zánětlivé reakci a narušení resorpce živin. Při masivní infestaci může být sliznice střev prakticky pokryta encystovanými larvami, jichž může být až několik set tisíc (Collobert-Laugier et al. 2002).

Závažnou formou onemocnění způsobenou malými strongylidy je tzv. larvální cyathostominóza, vyvolaná synchronním uvolněním inhibovaných larev čtvrtého stadia ze střevní stěny do lumenu. Tento proces vede k náhlému těžkému poškození střevní sliznice a vyvolává akutní kolitidu. Klinické projevy zahrnují vodnatý průjem, silné kolikové bolesti, horečku, rychlé zhoršení celkového stavu a v některých případech i úhyn zvířete (Reid et al. 1995; Love et al. 1999). Nejvíce ohroženou skupinou jsou mladí koně ve věku 1–5 let, nicméně onemocnění může postihnout jedince jakéhokoliv věku (Love et al. 1992; Love et al. 1999).

Dlouhodobé časté používání anthelmintik vedlo k selekčnímu tlaku, na který malí strongylidi zareagovali vývojem lékové rezistence. Ta je v současnosti u této skupiny rozšířená celosvětově, zejména vůči benzimidazolům a tetrahydropyrimidinům (např. pyrantel) (Kaplan 2004; Matthews 2014; Peregrine et al. 2014; Nielsen 2022). Tento vývoj vedl k přehodnocení anthelmintických strategií v chovech koní. Moderní přístupy kladou důraz na cílenou a strategickou kontrolu zahrnující pravidelný monitoring infekce pomocí kvantitativního vyšetření vajíček ve výkalech (FEC, fecal egg count), selektivní terapii jedinců s vysokou intenzitou infekce, rotaci účinných látek a zachování části parazitární populace v refugiu (Saeed et al. 2019). Cílem těchto opatření je omezení kontaminace pastvin, snížení vylučování vajíček a minimalizace rizika larvální cyathostominózy (Mathew 2008). Výzkum v oblasti malých strongylidů tak i nadále zůstává prioritou (Corning 2009).

Obrázek 4 Sliznice tlustého střeva koně s larvální cyathostominózou (měřítko = 3 cm). Mnohočetná hnědo-černá ohniska obsahují larvy cyathostomin.



Zdroj: Peregrine et al. (2006)

3.3 Koprologické vyšetření koní

Koprologická vyšetření představují klíčové diagnostické nástroje využívané k posouzení zdravotního stavu koně na základě analýzy trusu. Umožňují identifikaci a kvantifikaci parazitických stadií, zejména vajíček a larev, což má zásadní význam nejen pro klinickou diagnostiku, ale také pro epidemiologický výzkum a potlačování parazitárních onemocnění. Správný odběr a skladování vzorku jsou nezbytné pro zajištění přesnosti výsledků, zejména při stanovení intenzity infekce strongylidními hlísticemi. Vzorek by měl být odebrán co nejdříve po defekaci, aby se předešlo dalšímu vývoji vajíček. Teplota a způsob uchování vzorku rovněž významně ovlivňují kvantitativní nálezy. V praxi se rutinně využívají jak kvantitativní, tak kvalitativní metody koprologického vyšetření. Základní kvantitativní přístup představuje stanovení počtu vajíček na gram trusu (EPG – eggs per gram), které umožňuje cílenou anthelmintickou léčbu a monitorování účinnosti podaných anthelmintik. Níže jsou popsány hlavní používané metody, jejich princip, výhody, nevýhody a oblasti praktického využití.

3.3.1 McMasterova metoda

Klasická McMasterova metoda je flotační technika s ředěním, původně vyvinutá Gordonem a Whitlockem (1939). Stanovené množství trusu (např. 4 g) se smísí s definovaným objemem nasyceného flotačního roztoku (obvykle solný nebo cukerný). Po přefiltrování se suspenze naplní do McMasterovy počítací komůrky s vyznačenou mřížkou a objemem 0,3 ml. Vajíčka, která vyplavou, se mikroskopicky počítají a výsledný počet se přepočítá pomocí přepočítávacího koeficientu na hodnotu EPG (Zajac et al. 2021).

Při použití 4 g trusu a 56 ml roztoku odpovídá jedno nalezené vajíčko 50 EPG (Ghafar et al. 2021). Metoda je jednoduchá a levná, avšak citlivost je nízká – detekční limit bývá cca 50 EPG. Slabé infekce proto mohou uniknout detekci. Kvůli malému analyzovanému objemu

(např. 0,3 ml z 56 ml suspenze) je metoda náchylná k vysoké variabilitě výsledků (Cringoli et al. 2004; Lejeune et al. 2023). Přesto je McMasterova metoda velmi rozšířená v terénu díky jednoduchosti a dostačuje pro účely cílené selektivní terapie, kde často stačí určit, zda EPG překračuje prahovou hodnotu pro aplikaci anthelmintika (např. 200 EPG) (Ballweber et al. 2014). Existují i různé modifikace McMasterovy metody zaměřené na zvýšení citlivosti. Například Whitlockova modifikace využívá větší objem počítací komůrky nebo více komůrek, což snižuje detekční limit na cca 15 EPG (Ghafar et al. 2021). Prakticky toho lze dosáhnout např. trojnásobným odčítáním (použití tří komůrek nebo tří opakování) a zprůměrováním výsledků, případně použitím komůrek s větším objemem. Tyto úpravy zlepšují šanci zachytu nízkých infekcí, avšak za cenu zvýšené pracnosti.

Výhody:

- Jednoduchá, rychlá a levná metoda nevyžadující složité vybavení (pouze základní laboratorní sklo a McMasterovu komůrku (Ghafar et al. 2021)).
- Umožňuje kvantifikaci intenzity infekce parazity (EPG) a sledování efektu léčby v běžné praxi.

Nevýhody:

- Nízká citlivost – nezachytí velmi nízké infekce (Bosco et al. 2018; Cringoli et al. 2010).
- Nižší přesnost a opakovatelnost – vysoká variabilita mezi opakovanými vzorky zvláště při nízkém počtu vajíček (Lejeune et al. 2023).
- Může docházet k podhodnocení počtu vajíček vlivem nehomogenní distribuce vajíček v malém odebraném objemu (Lejeune et al. 2023).

3.3.2 Wisconsin (centrifugační flotace)

Metody typu Wisconsin jsou založeny na koncentraci vajíček pomocí centrifugace namísto pouhého naředění vzorku. Klasická technika známá jako „Wisconsinská metoda“ (Cox & Todd 1962) a její varianta označovaná jako Cornell-Wisconsin (Egwang & Slocombe 1982) vznikly jako modifikace původní Stollovy metody (Ghafar et al. 2021). V nejčastěji používané úpravě známé jako „Wisconsin double centrifugation“ se 1–5 g trusu suspenduje ve vodě, přefiltruje přes síto a přelije do centrifugační zkumavky. První odstředění ve vodě slouží k odstranění hrubých nečistot. Po vylití supernatantu se sediment promíchá s hustým cukerným roztokem (Sheatherův roztok s měrným objemem SG 1,27–1,33), zkumavka se doplní až po okraj a uzavře krycím sklíčkem. Během druhé centrifugace se vajíčka koncentrují na povrchu, odkud se zachytí na krycím sklíčku (Lejeune et al. 2023). Poté se sklíčko přeneso na podložní sklo a všechna vajíčka z celého objemu zkumavky se spočítají pod mikroskopem. Výsledné EPG (vajíčka na gram trusu) se následně vypočítá přepočtem na použitou hmotnost trusu. Například při vyšetření 5 g vzorku znamená nález pěti vajíček hodnotu 1 EPG. Díky použití většího množství vzorku a koncentraci vajíček patří centrifugační metody typu Wisconsin mezi nejcitlivější dostupné metody. Detekční limit se uvádí přibližně 1 EPG (Ghafar et al. 2021). To činí tuto metodu vhodnou jako referenční standard pro zachycení nízkých stupňů infekcí. Například infekce produkující již kolem 23 vajíček/gram byly úspěšně detekovány touto metodou, zatímco méně citlivé techniky vykazovaly negativní výsledek (O'Grady & Slocombe 1980; Rehbein et al. 2011). Tato vysoká citlivost je však vyvážena nižší přesností

a opakovatelností výsledků. Opakovaná vyšetření stejného vzorku mohou vykazovat značnou variabilitu (Egwan & Slocombe 1982). Příčinou jsou četné manuální kroky – např. přelévání, pipetování, přenos sedimentu – které mohou vést ke ztrátám vajíček nebo k drobným rozdílům v objemu analyzovaného materiálu. Systematické přehledy tak hodnotí Wisconsin metodu jako časově náročnou, s potenciálně nižší kvantifikační přesností, a to navzdory její výjimečné citlivosti (Egwan & Slocombe 1982).

Výhody:

- Nejcitlivější dostupná metoda – odhalí i minimální počet vajíček (teoreticky 1–5 EPG) (Ghafar et al. 2021).
- Vhodná jako referenční metoda při validaci nových technik nebo výzkumu anthelmintické účinnosti, kde je potřeba maximalizovat záchyt.

Nevýhody:

- Pracná a časově náročná – vyžaduje centrifugu, více manipulačních kroků a zkušený personál (Cox & Todd 1962).
- Nižší preciznost – výsledky mohou vykazovat větší variabilitu při opakovaném testování téhož vzorku (Egwan & Slocombe 1982) V rutinní praxi méně vhodná pro větší množství vzorků kvůli zdlouhavosti (používá se spíše v laboratoři než přímo v terénu).

3.3.3 FLOTAC

FLOTAC je inovativní kvantitativní metoda, kterou vyvinul Cringoli et al. (2006) původně za účelem detekce parazitů u zvířat. Principem vychází z centrifugační flotace obdobné metodě Wisconsin, avšak využívá speciální zařízení zvané FLOTAC, které zvyšuje citlivost i přesnost vyšetření. Do přístroje se vkládá směs trusu a flotačního roztoku – obvykle 5 g trusu smíchaných s 45 ml flotačního roztoku. Tato směs je následně centrifugována přímo v tzv. FLOTAC komorách. Po odstředění následuje tzv. „translace“: otočením mechanismu přístroje se horní koncentrovaná vrstva obsahující vajíčka přesune do dvou pozorovacích komůrek (Ghafar et al. 2021). Celý obsah těchto komůrek je poté podroben mikroskopickému vyšetření. Díky analýze téměř celého objemu směsi (prakticky celé množství 45 ml po odečtení sedimentu) je FLOTAC schopen zachytit skoro všechna přítomná vajíčka. Detekční limit této metody se uvádí na úrovni až 1 vajíčko/gram (při vyšetření 5 g trusu), což je srovnatelné s metodou Wisconsin. Oproti ní však FLOTAC vykazuje vyšší přesnost a opakovatelnost měření, což je dáno omezením manuálních zásahů během zpracování a schopností analyzovat větší počet vajíček najednou. Literatura opakovaně uvádí FLOTAC jako jednu z nejpřesnějších metod pro kvantitativní vyšetření vajíček parazitů (Ghafar et al. 2021).

Ve srovnávacích studiích s McMasterovou metodou – jak u koní, tak i jiných hostitelů – bylo opakovaně potvrzeno, že FLOTAC zaznamenává významně vyšší hodnoty EPG. Tento rozdíl je způsoben vyšší schopností metody zachytit přítomná vajíčka, zejména v případech slabších infekcí. Například Noel et al. (2017) a další autoři prokázali, že FLOTAC a jeho modifikované varianty kvantifikují strongylidní vajíčka přesněji než McMasterova metoda, která má tendenci hodnoty EPG podhodnocovat.

Výhody:

- Vysoká citlivost, srovnatelná s nejcitlivějšími metodami.
- Vysoká přesnost a opakovatelnost – minimální ztráty, možnost kvantifikovat i nízké nálože s menší chybou.
- Umožňuje současně detekovat více skupin parazitů v jednom vyšetření díky velkému objemu vyšetřovaného materiálu.

Nevýhody:

- Vyžaduje speciální vybavení – FLOTAC zařízení a kompatibilní centrifugu (Ghafar et al. 2021).
- Delší doba zpracování – nutnost centrifugace a manipulace s přístrojem. Metoda je méně vhodná pro rychlou terénní diagnostiku.
- Metoda zatím méně rozšířená v rutinní praxi. Hlavní využití je ve výzkumu a specializovaných laboratořích.

3.3.4 Mini-FLOTAC

Mini-FLOTAC je zjednodušená verze metody FLOTAC, která byla vyvinuta pro praktičtější použití v terénních podmínkách (Barda et al. 2013). Na rozdíl od plné verze FLOTAC nevyžaduje centrifugaci, neboť je založena na principu gravitační flotace ve speciální dvoukomorové komůrce (Cringoli et al. 2017; Zajac et al. 2021). Vyšetření začíná smísením 2–5 g trusu s flotačním roztokem (v případě koní se nejčastěji používá nasycený solný nebo cukerný roztok v objemu 38–45 ml). Přípravu vzorku usnadňuje Fill-FLOTAC, speciální nádobka určená pro homogenizaci vzorku, filtraci a transfer suspenze do komůrek. Po důkladné homogenizaci se suspenze naplní do obou komůrek Mini-FLOTAC zařízení. Komůrky se poté uzavřou a nechají stát 10 minut, během nichž vajíčka vystoupají k hornímu okraji komůrek (Lejeune et al. 2023). Následně se otočením mechanismu o 90° horní vrstva uzavře na odečítací ploše. Celý objem obou komůrek, tedy celkem 2 ml (Ghafar et al. 2021), se následně vyšetří mikroskopicky. Spočítaný počet vajíček se přepočítává pomocí přepočítávacího koeficientu (multiplikačního faktoru) – v závislosti na použitém množství trusu, obvykle jedno nalezené vajíčko odpovídá 5 až 10 EPG. Například při použití 2 g trusu představuje jedno vajíčko 10 EPG (Lejeune et al. 2023).

Obrázek 5 Mini-FLOTAC zařízení se dvěma flotačními komůrkami



Zdroj: Vlastní (2024)

Mini-FLOTAC si zachovává vysokou citlivost, která se přibližuje citlivosti plné FLOTAC metody. Detekční limit je 5 EPG (Ghafar et al. 2021), což je výrazně vyšší citlivost než u McMasterovy metody, jejíž detekční limit je obvykle 50 EPG. Několik komparativních studií potvrdilo, že Mini-FLOTAC dosahuje vyšší přesnosti a citlivosti než McMaster. Například Scare et al. (2017) a Bosco et al. (2018) prokázali, že Mini-FLOTAC zachytí více vajíček strongylidů a zároveň vykazuje nižší variabilitu výsledků při opakovaných vyšetřeních. Pro kvantitativní vyšetření vzorků koní je Mini-FLOTAC metoda, ve srovnání s tradiční McMasterovou metodou, hodnocena jako spolehlivější a přesnější (Ghafar et al. 2021).

Výhody:

- Vysoká citlivost (detekuje 5 EPG), podstatně lepší záchyt nízkých hladin infekcí oproti McMaster metodě
- Vyšší přesnost a opakovatelnost – menší variabilita mezi opakováními díky většímu počtu vyšetřených vajíček
- Bez potřeby centrifugace – vhodná i pro terénní podmínky, zařízení je kompaktní a snadno použitelné.
- Validována výzkumy napříč různými hostiteli (koně, malí přežvýkavci, prasata), nižší detekční limit než McMaster metoda (Ghafar et al. 2021; Lejeune et al. 2023)

Nevýhody:

- Větší časová náročnost na zpracování než McMaster metoda (10 minut pro pasivní flotaci vajíček).
- Vyžaduje speciální Mini-FLOTAC komůrku, i když cenově dostupnou.
- U některých těžších vajíček (např. motolic) nemusí být pasivní flotace dostatečná. U těchto parazitů je Mini-FLOTAC bez centrifugace méně vhodná (Ghafar et al. 2021), ovšem pro kvantifikaci vajíček strongylidů koní je dostačující.

3.3.5 FECPAK systém

FECPAK je komerčně dostupný systém vyvinutý původně na Novém Zélandu (Presland et al. 2005) za účelem zjednodušení koprologických vyšetření v terénních podmínkách. Jeho modernizovaná verze, FECPAK G2 (Tyson et al. 2020), se uplatňuje i při vyšetření trusu koní. Princip metody spočívá v kombinaci klasické flotace s digitální analýzou obrazu. Obvykle se používá větší množství trusu (například 10–20 g), které se smísí s flotačním roztokem ve speciální kazetě. Po dostatečné době, umožňující vajíčkům vyplavat, jsou tato nasáta do pozorovací komory, která je následně digitálně nasnímána pomocí kamery nebo skeneru (Ghafar et al. 2021). Pořízené snímky jsou nahrány do cloudového úložiště, kde jsou buď automaticky vyhodnoceny softwarem, nebo analyzovány vzdáleně odborníkem. Ačkoliv použití většího objemu vzorku může teoreticky zvýšit pravděpodobnost záchytu vajíček parazitů, v praxi vykazuje systém FECPAK pouze střední citlivost a relativně nižší přesnost ve srovnání s laboratorními metodami. Terénní studie ukazují, že při nízké intenzitě infekce může FECPAK v detekci vajíček selhat. Výsledné hodnoty EPG často vykazují vyšší variabilitu a nižší kvantifikační spolehlivost (Ghafar et al. 2021). Systematické přehledy hodnotí FECPAK jako metodu s nižší přesností a precizností, přičemž její celková citlivost se pohybuje na střední úrovni. Výhodou však zůstává možnost analyzovat relativně velké množství trusu, což zvyšuje pravděpodobnost záchytu vajíček alespoň při silnějších infekcích. V některých studiích byla citlivost FECPAK systému dokonce vyšší než u McMasterovy metody (Presland et al. 2005; Fukumoto et al. 2011; Tomczuk et al. 2014; Becker et al. 2016; Bosco et al. 2018; Cain et al. 2020). Nicméně automatizované počítání z obrazového záznamu a lidský faktor při přípravě vzorku způsobují, že kvantitativní výstupy systému mohou být méně spolehlivé. FECPAK je proto vhodnější spíše pro hrubé screeningové hodnocení v podmínkách, kde není k dispozici specializované laboratorní vybavení ani odborný personál.

Výhody:

- Jednoduché použití v terénu – obsluha nevyžaduje detailní parazitologické znalosti; vzorek lze zpracovat na farmě a odeslat jen digitální snímek k analýze (Ghafar et al. 2021).
- Umožňuje zpracovat větší množství trusu (10–20 g), potenciálně zvyšuje záchyt infekcí v porovnání s metodami využívajícími menší vzorek.
- Digitalizace – snímky vajíček jsou archivovány, lze je sdílet online, vzdálené vyhodnocení specialistou nebo algoritmem.

Nevýhody:

- Nižší přesnost a preciznost výsledků – EPG hodnoty mohou být nepřesné, s větší variabilitou.
- Střední citlivost – navzdory velkému vzorku nemusí odhalit velmi nízké infekce, detekční limit se pohybuje kolem 25–45 EPG.
- Časová náročnost – flotace může trvat déle, až desítky minut, a dále je nutné do časové dotace zahrnout i pořízení a odeslání snímku.
- Náklady na vybavení – systém FECPAK (kamera/skener, kazety) je finančně náročnější v porovnání s ostatními metodami a nemusí být pro každého dostupný (Ghafar et al. 2021).

3.3.6 Parasight a další automatizované systémy

Nejnovějším trendem v oblasti koprologických vyšetření u koní je využívání automatizovaných systémů založených na digitální analýze obrazu a algoritmech umělé inteligence (AI). Mezi tyto inovativní nástroje patří např. komerční systém Parasight (Slusarewicz et al. 2016) a řada výzkumných prototypů využívajících strojové učení (Ballweber et al. 2014; Scare et al. 2016; Scare et al. 2017; Cain et al. 2020; Elghryani et al. 2020; Nagamori et al. 2020; Tyson et al. 2020; Cringoli et al. 2021; Nielsen 2021). Systém Parasight funguje na takovém principu, že se vzorek trusu rozmíchá ve vodě a následně přefiltruje za účelem odstranění hrubých nečistot. Vajíčka parazitů jsou poté obarvena fluorescenčním barvivem, díky čemuž je možné je snadno vizualizovat. Automatizovaný optický systém následně provede nasnímání vzorku a software pomocí algoritmů rozpoznávání obrazu spočítá počet vajíček (Ghafar et al. 2021). Jelikož systém pracuje s definovaným objemem vzorku, je výsledkem standardizovaná hodnota EPG. V ideálním případě není třeba lidského zásahu – výstup je k dispozici v digitální podobě s minimálním zpožděním. Z hlediska citlivosti a přesnosti vykazují tyto automatizované systémy velmi slibné výsledky. Parasight například prokázal ve studiích vysokou shodu s tradičními metodami, jako jsou McMaster a Wisconsin, přičemž citlivost detekce přesahovala 98 % (Cain et al. 2020). Preciznost systému – tedy opakovatelnost výsledků – byla dokonce vyšší než u manuálních metod, protože algoritmus analyzuje systematicky větší počet zorných polí bez subjektivního zkreslení (Ghafar et al. 2021). Přes tyto výhody mají automatizované systémy i své limity. Software může například chybně interpretovat nečistoty, jako jsou vzduchové bubliny či zbytky rostlinného materiálu, jako vajíčka, což snižuje specifitu a vyžaduje vizuální kontrolu sporných nálezů (Cain et al. 2020).

U silně kontaminovaných vzorků nebo při shlucích vajíček může docházet k chybám v detekci. Systém Parasight navíc nedokáže morfologicky rozlišit podobná vajíčka různých druhů. V případě strongylidních nematod to však není zásadní překážka, protože jejich vajíčka jsou morfologicky uniformní. Nicméně při výskytu různých druhů parazitů současně může být identifikace omezená. Přesto jsou tyto automatizované systémy obecně hodnoceny jako velmi perspektivní nástroje, které mohou zásadně urychlit a zpřesnit koprologickou diagnostiku – zejména při analýze většího množství vzorků nebo v prostředí s omezenou dostupností odborného personálu (Cain et al. 2020).

Výhody:

- Automatizace a rychlost – výsledek EPG je získán velmi rychle bez zdlouhavého ručního počítání; vhodné pro velké počty vzorků.
- Vysoká preciznost – eliminace lidské chyby, konzistentní analýza; vysoká opakovatelnost výsledků.
- Minimální požadavek na odbornost obsluhy – vzorek připraví technik podle návodu a software provede identifikaci a kvantifikaci (Ghafar et al. 2021).
- Digitalizované snímky – možnost archivace a nezávislého ověření, telemedicína (sdílení dat na dálku).

Nevýhody:

- Vysoké počáteční náklady – přístroj a software jsou drahé, což limituje dostupnost.
- Technická omezení – při silně znečištěném vzorku nebo shlucích vajíček může dojít k neúplné detekci. Při sporných nálezech je nutná kontrola člověkem (Ghafar et al. 2021).
- Druhová neselektivita – většina automatických systémů rozpozná jen vajíčko určité velikosti a tvaru, není schopen diferencovat druhy parazitů.

3.3.7 Srovnání metod

Z hlediska efektivity platí, že neexistuje jedna univerzálně nejlepší metoda, ale vhodná volba závisí na cíli vyšetření (Ghafar et al. 2021). Pokud potřebujeme maximálně citlivě zjistit i nízké infekce (např. při sledování ERP – Egg reappearance period), tedy doby znovuobjevení vajíček po anthelmintické terapii), jsou lepší koncentrační techniky jako Wisconsin nebo FLOTAC. Pro rutinní monitoring a selektivní terapii v terénu, kde nás zajímají hlavně vysoce pozitivní jedinci nad prahovou hodnotou, postačí méně citlivé ale operativnější metody jako McMaster (Ballweber et al. 2014; Nielsen 2021).

Mini-FLOTAC představuje vhodnou alternativu. Značně zlepšuje citlivost a přesnost oproti McMaster při zachování poměrně jednoduché techniky, a proto se stále více prosazuje. FECPAK a Parasight pak ilustrují moderní snahy o usnadnění diagnostiky přímo v podmínkách chovu a automatizaci. FECPAK zvyšuje dostupnost testů pro chovatele, byť s jistou ztrátou přesnosti. Oproti tomu Parasight ukazuje směr k plně automatizované digitální koprologické diagnostice s vysokou spolehlivostí (Cain et al. 2020). V tabulce č. 1 jsou uvedeny metody, které jsou v poslední dekádě vědecky relevantní (Ghafar et al. 2021).

Tabulka 1. Srovnání koprologických metod

Metoda	Princip	Výhody	Nevýhody
Přímý nátěr	Malé množství čerstvého výkalu smíchané se solným roztokem (nebo jódem) na mikroskopickém sklíčku	Levné, krátká doba zpracování	Kvalitativní, velmi nízká přesnost, citlivost a přesnost výsledku
Cornell-Wisconsin	Využívá centrifugační flotace vajíček v solném roztoku ve zkumavce, následné přenesení na krycí sklíčko a odečítání	Levné, vysoký detekční limit	Časově náročné, nízká přesnost
McMaster	Výkal smíchaný s flotačním roztokem je naplněn do komor sklíčka, kde jsou vajíčka počítána	Levné, střední doba zpracování	Nízká citlivost
FLOTAC®	Využívá centrifugační flotace vajíček ve specializovaném zařízení a následný transfer horní vrstvy obsahující vajíčka	Levné, vysoká citlivost, velmi vysoká přesnost a preciznost	Časově náročné, vyžaduje speciální zařízení (rotory pro centrifugaci)
Mini-FLOTAC®	Modifikovaná verze FLOTAC bez nutnosti centrifugace a se sníženým objemem pro odečítání	Vysoká citlivost, přesnost a preciznost, střední doba zpracování	Omezená detekce některých parazitů (např. motolic)
FECPAK®	Vajíčka jsou ve flotačním roztoku shromážděna do jednoho zobrazovacího pole a snímána	Nevyžaduje odborné znalosti, protože vajíčka jsou identifikována a počítána na dálku, digitalizované snímky	Nízká přesnost, preciznost a střední citlivost, časově náročné
Parasight System®	Vzorek výkalu smíchaný s vodou je filtrován za účelem odstranění nečistot, vajíčka jsou označena fluorescenčním barvivem, snímána a počítána pomocí automatizovaného algoritmu	Vysoká přesnost, nevyžaduje technické dovednosti, rychlé, automatizované počítání, digitalizované snímky	Drahé, některé výsledky je nutné potvrdit vizuálně, nedetekuje překrývající se vajíčka, nedokáže rozlišit vajíčka v prostředí s vysokým podílem nečistot

Zdroj: Ghafar et al. (2021)

3.4 Skladování koprologických vzorků

Koprologické vzorky se do laboratoří transportují v různých typech skladovacích obalů. Vhodný výběr skladovacího materiálu a doba uchovávání vzorku má zásadní vliv na přesnost výsledků koprologického vyšetření. Správně zvolený obal zároveň usnadňuje manipulaci se vzorkem. Mezi běžně používané skladovací materiály patří plastové nádobky (vzorkovnice), skleněné sklenice, jednorázové gumové rukavice a sáčky typu ZIP. Nevhodná volba obalu může manipulaci se vzorkem zkomplikovat a zvýšit riziko kontaminace. Za nejvhodnější obal pro manipulaci a krátkodobé uchovávání koprologického vzorku jsou považovány sáčky typu ZIP, které po vytlačení vzduchu snižují rychlost degradace vzorku (vývoj vajíček). Jednotlivé typy ZIP sáčků se liší zejména gramáží a propustností světla (Sengupta et al. 2016).

3.4.1 Skladování při pokojové teplotě

Skladování vzorků trusu při pokojové teplotě (20–25 °C) by mělo být co nejkratší. Podle dostupných studií dochází již po 24 hodinách ke znatelnému poklesu životaschopnosti parazitů a zároveň k úbytku vajíček (Maya et al. 2012; Papaiaková et al. 2018). Ve vzorku ponechaném v teplém prostředí déle, než jeden den může vést k líhnutí larev nebo pokračování v embryonálním vývoji, což způsobuje nepřesnosti při odečítání vajíček a výsledné vyšetření může nesprávně indikovat nižší počet vajíček (Reinhard & Bryant 1992). Zvláště u strongylidních a příbuzných hlístic může při pokojové teplotě dojít k vývoji infekčních larev během 1–2 dnů, a to v závislosti na vlhkosti prostředí. Naopak v podmínkách s nízkou vlhkostí může dojít k vyschnutí vzorku, čímž se zamezí líhnutí larev a přežívají pouze odolná vývojová stadia. Výsledky vyšetření takto uskladněného vzorku pak mohou připomínat nálezy z vyschlých koprolitů. Vysoká vlhkost v kombinaci s pokojovou teplotou může naopak vést k vývoji vajíček až do larválních stadií, která se však následně rozpadají a zanikají (pozorováno např. u strongylidů jelenů běloocasých) (Shostak & Samuel 1984).

3.4.2 Skladování v chladničce

Nízké kladné teploty, typické pro prostředí chladničky, zpomalují metabolické procesy ve vzorku a přispívají k uchování počtu a morfologie vajíček po delší dobu. Bylo prokázáno, že skladování při teplotě 4 °C je nejvhodnější pro zachování počtu strongylidních vajíček. Ve vzorcích uchovávaných v chladničce nedocházelo ani po několika dnech k významnému poklesu počtu vajíček (Nielsen et al. 2009; Crawley et al. 2016).

3.4.3 Skladování zmrazených vzorků

Zmrazení trusu (–20 °C a nižší teploty) má na parazitologické vyšetření dvojí efekt. Na jedné straně mrazení spolehlivě inaktivuje většinu vajíček. Při těchto teplotách dochází k zastavení dalšího vývoje vajíček, což je žádoucí z hlediska biologické bezpečnosti (např. kvůli eliminaci infekčnosti vzorku). Bylo zjištěno, že mrazení při –20 °C po dobu 24 hodin inaktivuje ≥99 % vajíček měchovců a tenkohlavců (*Trichuris* spp.) (Kines et al. 2021). Na druhé straně však mrazení může vajíčka fyzicky poškodit a snížit jejich detekovatelnost při mikroskopickém vyšetření. Zvláště vajíčka strongylidů jsou na nízké teploty citlivá. Bylo

prokázáno, že výkaly koní po zmrazení vykazují signifikantně nižší počty strongylidních vajíček než čerstvé vzorky. V některých původně pozitivních vzorcích dokonce vajíčka po zmrazení zcela vymizela, a vzorky se tak staly falešně negativními (Schurer et al. 2014).

Jagła et al. (2013) kvantifikovali tento efekt: již třídenní zmrazení vedlo k poklesu detekovatelnosti vajíček ze 100 % na 94,1 %, přičemž průměrná hodnota EPG klesla z původních 1239 na 984. Při prodloužení doby zmrazení na 14 dní poklesla pozitivita vzorků na 85,3 % a průměrná hodnota vajíček na gram se snížila více než dvojnásobně (na 504). Delší doba mražení (30 dní) již nevedla k dalšímu významnému úbytku oproti 14 dnům. Z těchto výsledků vyplývá, že k největší destrukci vajíček dochází krátce po zmrazení a prodlužování doby mražení již počet nalezených vajíček výrazně neovlivňuje.

Pro praxi to znamená, že zmrazování vzorků může vést k podhodnocení počtu vajíček strongylidů a některých dalších helmintů. Pokud je cílem kvantitativní koprologické vyšetření (stanovení EPG), neměly by být vzorky před analýzou zmrazovány, případně je nutné počítat s možnou ztrátou části vajíček (Schurer et al. 2014). Naopak pro účely molekulární analýzy (např. PCR detekce DNA parazitů) se mražení používá běžně, protože efektivně zachovává DNA a zároveň zabraňuje vývojovým změnám. V takových případech je mražení vhodné, pokud není vyžadováno přesné mikroskopické sčítání vajíček (Jeffery et al. 2004; Saeed et al. 2006).

3.4.4 Vliv přístupu vzduchu

Významným faktorem při uchovávání koprologických vzorků je způsob balení a míra kontaktu se vzduchem. Vzorky uložené v otevřených nebo špatně těsnících obalech rychle vysychají v důsledku odpařování vody, přičemž dochází k jejich tvrdnutí. Tento proces má několik důsledků: vyschnutí zastavuje další vývoj parazitů, vajíčka v suchém prostředí obvykle nepokračují v embryogenezi ani se z nich nelíhnou larvy, a mohou se tak krátkodobě zachovat pro mikroskopické vyšetření (Shostak & Samuel 1984). Přestože se tím může zpomalit degradace vajíček, nedochází ke konzervaci vzorku v plném smyslu slova, a dlouhodobé vystavení vzduchu není doporučováno.

3.4.5 Vliv přístupu světla

Světlo, a především jeho ultrafialová (UV) složka, má výrazný vliv na životaschopnost mikroorganismů a parazitárních stádií. Vystavení koprologického vzorku přímému slunečnímu záření může vést k degradaci vajíček parazitů. UV záření působí na vajíčka helmintů germicidně – narušuje DNA i buněčné struktury embrya, a tím znemožňuje jejich další vývoj. Studie ukázaly, že i relativně krátká expozice UV záření může zcela zničit životaschopnost některých vajíček. Například třicetiminutové vystavení UV záření zcela znemožnilo dalšímu vývoji vajíček tasemnice *Hymenolepis diminuta*, která již nebyla schopna vytvořit infekční cysticerkoid (McGavock & Howard 1980; Lipatov et al. 2015). Ačkoliv mohou vajíčka zůstat morfologicky rozeznatelná, jejich viabilita je významně snížena. Z tohoto důvodu se doporučuje uchovávat vzorky mimo dosah světla, ideálně v uzavřených boxech nebo neprůhledných obalech, zejména pokud hrozí vystavení slunečnímu záření.

3.4.6 Chemická konzervace vzorků

Alternativní možností uchování koprologických vzorků je chemická konzervace prostřednictvím přidavku fixativ, jako je formalín nebo etanol, přímo do odebraného trusu. Tato metoda je vhodná v případech, kdy je třeba vzorky uchovat po dobu několika týdnů či déle, nebo pokud je cílem eliminace potenciálních patogenů přítomných ve vzorku. Z hlediska kvantitativního stanovení počtu vajíček však není ideální, neboť konzervační roztoky snižují míru zachytu vajíček ve srovnání s čerstvými vzorky. Bylo prokázáno, že přídavek formalínu nebo etanolu v koncentraci 5–10 % vedl již po dvou týdnech ke znatelnému poklesu počtu strongylidních vajíček. Po dalším skladování v intervalu 2–4 týdnů se tento pokles již výrazněji nezměnil, stabilizoval se a byl rovnoměrný napříč všemi testovanými vzorky (Crawley et al. 2016).

4 Metodika

4.1 Zdroj koprologického materiálu

Koprologický materiál pro realizaci tohoto experimentu byl získán ze soukromého chovu. Byly použity dva výkaly roční klisny plemene Českého teplokrevníka. Odebrané vzorky byly ihned homogenizovány a rozděleny do ZIP sáčků po 20 g. Následně proběhlo první vyšetření vzorků (T0), pro stanovení výchozí hodnoty.

K experimentu, kdy byl zkoumán vliv skladového materiálu na koprologický vzorek bylo použito 15 kusů 50 μ m transparentního, 15 kusů 50 μ m černého a 15 kusů 100 μ m transparentního ZIP sáčku. Všechny sáčky byly uskladněny v pokojové teplotě.

K experimentu, kdy byl zkoumán vliv teploty na koprologický vzorek bylo použito 63 kusů 100 μ m transparentního ZIP sáčku. Sáčky byly umístěny do chladničky, mrazničky a zbylé byly ponechány při pokojové teplotě.

4.2 Vyšetřovací metoda

Vyšetření vzorků probíhalo v laboratoři České zemědělské univerzity. Ke kvantitativnímu vyšetření byla zvolena vyšetřovací metoda Mini-FLOTAC, mikroskop Olympus CX23 se zvětšením 40 $\times$ a další použité laboratorní vybavení (Obrázek 6). Pro tuto metodu byl použit solný flotační roztok o hustotě 1,28 g.cm⁻³.

Obrázek 6 Laboratorní vybavení – sítko, odměrný válec, pinzeta, stopky a kelímek



Zdroj: Vlastní (2024)

Bylo odváženo 5 g výkalu a v kelímku byl vzorek za postupného přilévání 45 ml. flotačního roztoku homogenizován. Vzniklá směs byla přefiltrována přes sítko do kelímku, aby byly odstraněny hrubé nečistoty a získán tzv. fekální filtrát obsahující vajíčka strongylidních hlístic. Fekální filtrát byl pomocí piletu naplněn do komůrek sestaveného Mini-FLOTAC sklíčka tak, aby se zabránilo vzniku vzduchových bublin a vzorek zcela vyplnil prostor pod odečítacím sklíčkem. Takto připravený vzorek se nechal 10 min. ležet na pracovní desce. Po uplynutí stanoveného času se pomocí klíče otočilo plastovým sklíčkem o 90°, čímž se flotovaná vrstva vajíček oddělila od zbytku filtrátu. Analýza připraveného preparátu probíhala při zvětšení 40×. K lepší orientaci při počítání vajíček napomáhala mřížka přímo zakreslena na sklíčku. Každé identifikované vajíčko bylo zaznamenáno stisknutím tlačítka na ručním počítadle, které po analýze obou sklíček ukázalo číselný údaj o nalezených vajíčkách ve vzorku. Tento údaj byl vynásoben koeficientem 5. Výsledné číslo představovalo hodnotu EPG ve vzorku.

4.3 Skladovací materiál

Pro tuto práci byl zvolen skladovací materiál v podobě tří typů ZIP sáčků stejné velikosti, které se od sebe lišily gramáží a barvou (Obrázek 7).

- transparentní ZIP sáček 50 µm, 80 × 120 mm;
- černý ZIP sáček 50 µm, 80 × 120 mm;
- transparentní ZIP sáček 100 µm, 80 × 120 mm.

K testování skladovacího materiálu byl použit čerstvý výkal. Okamžitě po vykání byl pečlivě homogenizován, tak aby vznikla konzistentní hmota. Homogenizace probíhala v nádobce pomocí špachtle. Poté byl výkal rozdělen na tři části. Tyto části byly znovu homogenizovány a rozděleny do tří různých typů sáčků (50 µm transparentní, 50 µm černý a 100 µm transparentní ZIP sáček) po 20 g hmoty. Celkem 45 sáčků. Po vytlačení vzduchu byly sáčky uzavřeny a uchovány v pokojové teplotě 20 °C po dobu 14 dní. Tyto vzorky byly vyšetřovány denně, ve třech opakováních, vyšetřovací metodou Mini-FLOTAC. Celkem bylo provedeno 135 vyšetření pro testování skladovacího materiálu.

Obrázek 7 Různé skladovací ZIP sáčky (z leva transparentní sáček 100 μm , transparentní sáček 50 μm , černý sáček 50 μm)



Zdroj: Vlastní (2024)

4.4 Skladovací teplota

K testování vlivu skladovací teploty na kvantifikaci vajíček byl použit druhý čerstvý výkal, který byl stejně tak, jako v případě testování skladového materiálu, okamžitě po vykání zvířete pečlivě homogenizován a rozdělen na tři části. Jednotlivé části byly znovu homogenizovány a rozděleny po 20 g do 100 μm ZIP sáčků a uchovány v pokojové teplotě (20 $^{\circ}\text{C}$), chladničce (4 $^{\circ}\text{C}$) a mrazničce (-23 $^{\circ}\text{C}$) po dobu 28 dní (Obrázek 7). Vzorky byly vyšetřovány 1., 3., 7., 14., 21. a 28. den ve třech opakováních. Celkem bylo provedeno 63 vyšetření.

Obrázek 8 Vzorky skladované při různých teplotách v 100 μm ZIP sáčcích



Zdroj: Vlastní (2024)

5 Výsledky

5.1 Skladovací materiál

V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky kvantifikace vajíček strongylidních hlístic v průběhu 14 dní. T0–T14 označuje počet dnů od odebrání vzorku. Každý den probíhalo vyšetření ve třech opakováních pro každý typ skladovacího materiálu. Hodnoty jsou uváděny v EPG, což odpovídá počtu vajíček na gram po vynásobení koeficientem 5.

Tabulka 2 Výsledky vyšetření vzorků skladovaných při pokojové teplotě v rozdílném skladovacím materiálu

Den	Opakování	ZIP 50 μm transparentní (EPG)	ZIP 50 μm černý (EPG)	ZIP 100 μm transparentní (EPG)
T0	1	1155		835
	2	1025		995
	3	1060		1150
T1	1	1030		1085
	2	1020		990
	3	1040		1020
T2	1	1020		1015
	2	985		960
	3	995		990
T3	1	925		1035
	2	1060		1005
	3	1005		975
T4	1	965		920
	2	990		1220
	3	945		905
T5	1	930		935
	2	940		935
	3	945		985
T6	1	870		820
	2	885		930
	3	905		1045
T7	1	870		940
	2	890		955
	3	940		920
T8	1	900		955
	2	920		995
	3	900		920
T9	1	855		965
	2	840		1025
	3	945		865
T10	1	890		1005
	2	855		900
	3	850		925
T11	1	910		865
	2	870		870
	3	850		905
T12	1	905		840
	2	895		895
	3	920		875
T13	1	895		845
	2	860		885
	3	845		855
T14	1	840		790
	2	990		925
	3	895		1050

Zdroj: Vlastní (2024)

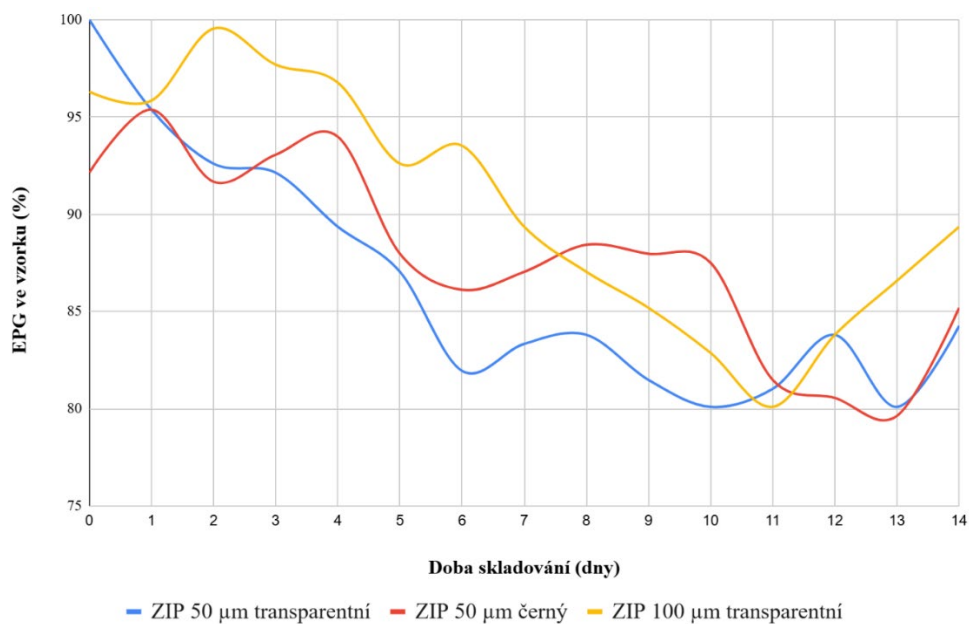
Pro jednotlivé dny byly stanoveny průměrné hodnoty EPG v procentech vůči nejvyšší hodnotě EPG což byla hodnota T0 pro sáček ZIP 50 µm transparentní. Dále byl pro každý typ sáčku vypočten variační koeficient. Tento průměrný variační koeficient je 5,23 % (Tabulka 3). Dále jsou v této tabulce uvedeny pro jednotlivé dny a jednotlivé typy sáčků směrodatné odchylky SD.

Tabulka 3 Průměrné hodnoty počtu strongylidních vajíček pro jednotlivé dny vyjádřené v procentech a směrodatná odchylka (SD)

Den	ZIP 50 µm transparentní		ZIP 50 µm černý		ZIP 100 µm transparentní	
	$\bar{x}$ EPG (%)	SD	$\bar{x}$ EPG (%)	SD	$\bar{x}$ EPG (%)	SD
T0	100	13,45	92,1	31,50	96,3	13,01
T1	95,4	2,00	95,4	9,71	95,8	7,55
T2	92,6	3,61	91,7	5,51	99,5	3,06
T3	92,1	13,58	93,1	6,00	97,7	9,07
T4	89,4	4,51	94,0	35,54	96,8	24,17
T5	87,0	1,53	88,0	5,77	92,6	4,73
T6	81,9	3,51	86,1	22,50	93,5	15,01
T7	83,3	7,21	87,0	3,51	89,4	6,56
T8	83,8	2,31	88,4	7,51	87,0	6,03
T9	81,5	11,36	88,0	16,17	85,2	20,55
T10	80,1	4,36	87,5	10,97	82,9	8,14
T11	81,0	6,11	81,5	4,36	80,1	5,13
T12	83,8	2,52	80,6	5,57	83,8	3,61
T13	80,1	5,13	79,6	4,16	86,6	8,62
T14	84,3	15,18	85,2	26,01	89,4	12,58

Zdroj: Vlastní (2024)

Graf 1 Průměrná hodnota EPG vyjádřená v procentech v jednotlivých dnech v závislosti na skladovacím materiálu



Zdroj: Vlastní (2024)

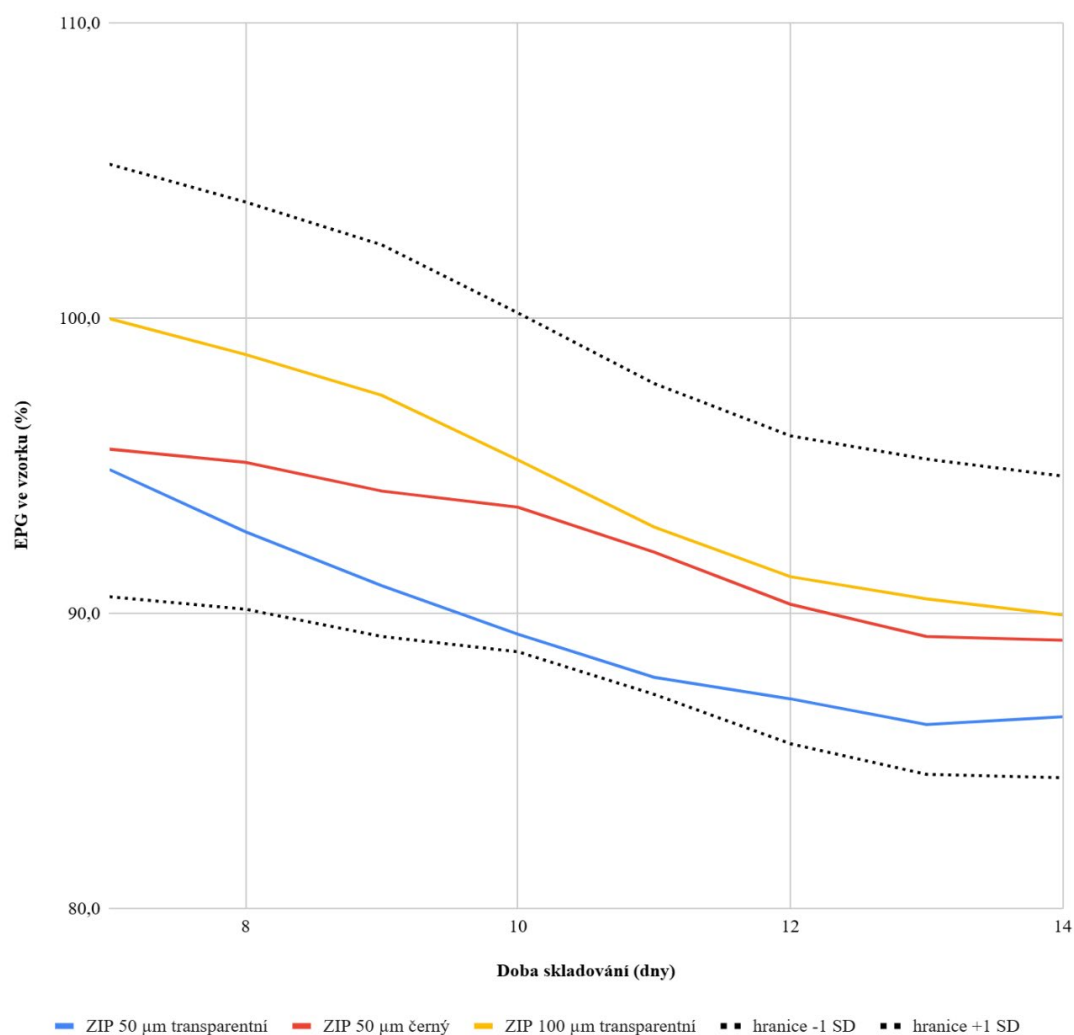
Aby bylo možné sledovat trend a snadněji posoudit vývoj EPG v čase, byl vypočten sedmidenní klouzavý průměr procentních hodnot EPG pro jednotlivé typy sáčků (Tabulka 4).

Tabulka 4 Klouzavé průměry počtu vajíček vyjádřené v procentech.

	ZIP 50 µm transparentní 7DMA EPG (%)	ZIP 50 µm černý 7DMA EPG (%)	ZIP 100 µm transparentní 7DMA EPG (%)
T7	94,9	95,6	100,0
T8	92,8	95,1	98,8
T9	91,0	94,2	97,4
T10	89,3	93,6	95,2
T11	87,9	92,1	92,9
T12	87,1	90,3	91,3
T13	86,3	89,2	90,5
T14	86,5	89,1	90,0

Zdroj: Vlastní (2024)

Graf 2 Klouzavé sedmidenní průměry EPG vyjádřené v procentech a standardní interval rozptylu v závislosti na čase.



Zdroj: Vlastní (2024)

5.1.1 Statistické vyhodnocení rozdílů mezi skladovacími materiály

Ke zjištění, zda se mezi jednotlivými typy skladovacích materiálů vyskytuje statisticky významný rozdíl v počtu vajíček strongylidních hlístic, byl použit Kruskal–Wallisův test. Tento neparametrický test je vhodný pro porovnání více než dvou skupin nezávislých pozorování.

Data zahrnovala tři typy skladovacích materiálů:

- ZIP sáček 50 µm transparentní
- ZIP sáček 50 µm černý
- ZIP sáček 100 µm transparentní

Každý den po dobu 14 dní byly analyzovány vzorky po třech opakování pro každý skladovací materiál, celkem tedy 135 měření. Hodnoty byly následně sloučeny a testovány s následujícím výsledkem:

- Testovací statistika (H) = 1,85
- p-hodnota = 0,397

5.1.2 Statistické vyhodnocení vlivu doby skladování při různých skladovacích materiálech

K vyhodnocení vlivu doby skladování byla použita lineární regrese. Regrese byla provedena zvlášť pro každý ze tří typů skladovacího materiálu. Závislou proměnnou byl počet vajíček strongylidních hlístic (EPG) a nezávislou proměnnou byl počet dní od odběru vzorku. Ve všech případech byl zaznamenán pokles EPG v závislosti na době skladování (Tabulka 5).

Tabulka 5 Parametry lineární regrese výsledků EPG ve vzorcích skladovaných v různých skladovacích materiálech v závislosti na době skladování

Typ obalu	Směrnice (EPG/den)	Nulový bod (EPG)	R ²
ZIP sáček 50 µm transparentní	-12,61	1022,14	0,583
ZIP sáček µm 50 černý	-9,73	1018,31	0,253
ZIP sáček 100 µm transparenční	-12,13	1061,36	0,447

Zdroj: Vlastní (2024)

5.2 Skladovací teplota

Po dobu 28 dnů od odebrání materiálu byl sledován vliv skladovací teploty na počet strongylidních vajíček ve vzorku. V tabulce 5 jsou uvedeny výsledky vyjádřené v EPG. Výsledné hodnoty jsou součtem vajíček vynásobených koeficientem 5. Hodnota TX označuje počet dní od odebrání materiálu. V tabulce 6 jsou pak uvedeny průměrné denní hodnoty vyjádřené v procentech.

Tabulka 6 Výsledky vyšetření vzorků skladovaných při různých teplotách

Den	Opakování	20 °C EPG	4 °C EPG	-23 °C EPG
T0	1	1105	1110	1240
	2	1045	1005	1050
	3	975	1010	950
T1	1	1000	960	990
	2	1075	1075	865
	3	1030	1045	900
T3	1	1035	1025	700
	2	1105	1050	860
	3	1020	1155	805
T7	1	930	1070	575
	2	970	995	645
	3	995	960	790
T14	1	955	990	625
	2	905	970	600
	3	1030	935	700
T21	1	770	955	565
	2	610	940	670
	3	710	1025	650
T28	1	505	940	570
	2	545	1035	635
	3	550	940	600

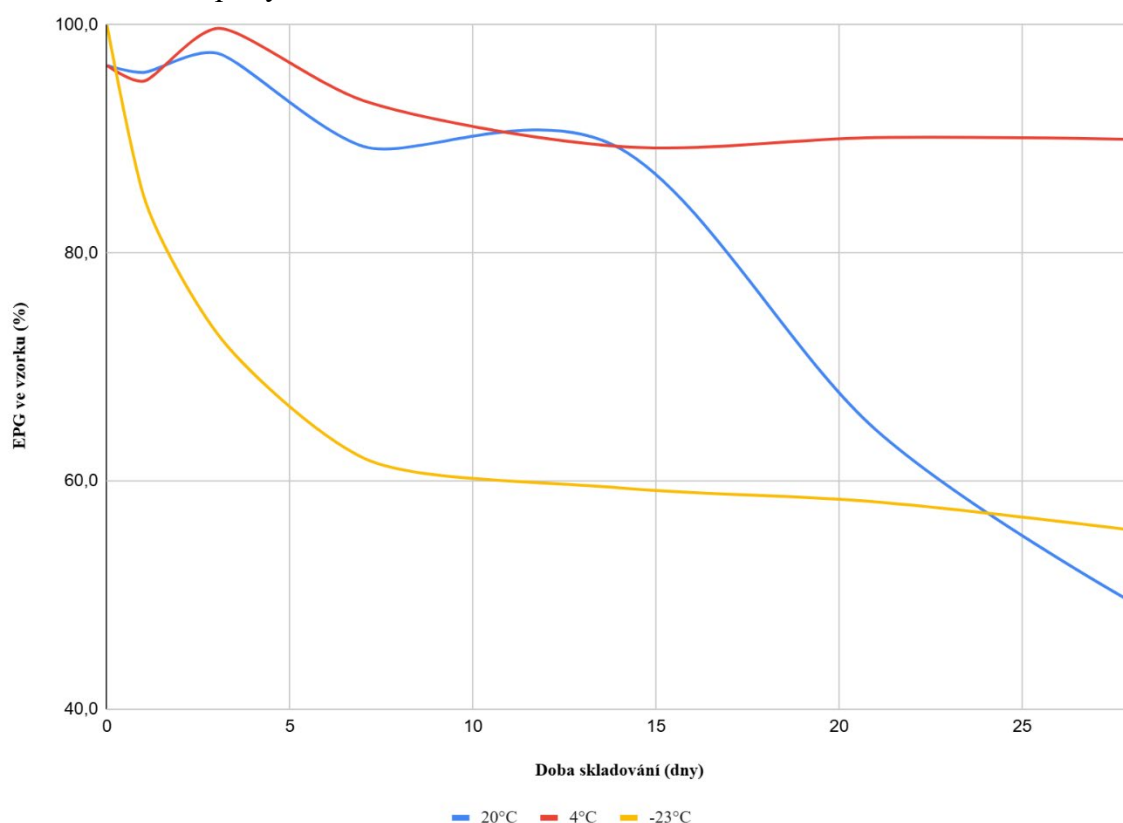
Zdroj: Vlastní (2024)

Tabulka 7 Průměrné hodnoty počtu strongylidních vajíček vyjádřené v procentech pro tři různé teploty skladování.

Den	EPG při 20 °C (%)	EPG při 4 °C (%)	EPG při -23 °C (%)
T0	96,5	96,5	100,0
T1	95,8	95,1	85,0
T3	97,5	99,7	73,0
T7	89,4	93,4	62,0
T14	89,2	89,4	59,4
T21	64,5	90,1	58,2
T28	49,4	90,0	55,7

Zdroj: Vlastní (2024)

Graf 3 Graf průměrných denních hodnot EPG ve vzorku vyjádřených v procentech pro tři teploty skladování



Zdroj: Vlastní (2024)

5.2.1 Statistické vyhodnocení rozdílů mezi skladovacími teplotami

Pro ověření vlivu teploty skladování na počet strongylidních vajíček byl použit Kruskal–Wallisův test, který porovnával hodnoty EPG mezi třemi teplotními režimy (20 °C, 4 °C a -23 °C). Výsledná testová statistika $H = 0,082$ a p -hodnota = 0,960 naznačují, že rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné ($p > 0,05$).

5.2.2 Statistické vyhodnocení vlivu doby skladování při různých skladovacích teplotách

K vyhodnocení vlivu doby skladování byla použita lineární regrese. Regrese byla provedena zvlášť pro každou skladovací teplotu. Závislou proměnnou byl počet vajíček strongylidních hlístic (EPG) a nezávislou proměnnou počet dní od odběru vzorku.

Ve všech případech byl zaznamenán pokles EPG v závislosti na době skladování. Při teplotě 4 °C byla však strmost poklesu mnohem menší (Tabulka 8).

Tabulka 8 Parametry lineární regrese výsledků EPG ve vzorcích skladovaných při různých teplotách v závislosti na době skladování

Skladovací teplota	Směrnice (EPG/den)	Nulový bod (EPG)	R ²
20 °C	-17,88	1087,37	0,861
4 °C	-3,15	1042,35	0,283
-23 °C	-13,37	902,55	0,550

Zdroj: Vlastní (2024)

6 Diskuse

Správné podmínky uchování fekálního materiálu jsou klíčové pro zachování věrohodnosti koprologické analýzy. Pokud se vzorky výkalů skladují nevhodně (např. při vysokých nebo nízkých teplotách), může dojít k negativním změnám. Vajíčka parazitů se mohou začít vyvíjet, líhnout nebo degradovat, což vede ke zkreslení výsledků (Nielsen et al. 2010).

Výsledky této práce jasně ukazují, že způsob skladování koprologického vzorku hraje zásadní roli v přesnosti kvantifikace vajíček strongylidních hlístic u koní metodou Mini-FLOTAC. Bylo potvrzeno, že jak doba uchovávání vzorku, tak teplotní režim mohou významně ovlivnit výsledek parazitologického vyšetření.

Studie potvrdila pokles počtu vajíček v závislosti na délce doby mezi odběrem a vyšetřením. Tento výsledek potvrzuje první vědeckou hypotézu, že s narůstajícím časem skladování se snižuje počet detekovaných vajíček. Tento úbytek je způsoben pokračujícím vývojem vajíček ve vzorku, především embryogenezí a líhnutím larev, jak uvádějí i autoři Reinhard & Bryant (1992) nebo Shostak & Samuel (1984).

Práce Papaiaakova et al. (2018) rovněž potvrdila, že prodleva delší než 48 hodin významně snižuje kvalitu a diagnostickou výpovědní hodnotu vzorku. Z této práce plyne, že i prodleva delší než 24 hodin, již představuje významné riziko zkreslení výsledků. Od 11 dne začaly zjištěné hodnoty EPG stoupat. Nepravděpodobnější příčinou bylo vysychání vzorku.

6.1 Vliv skladovací teploty

Dalším klíčovým faktorem je teplota skladování. Při testování vzorků skladovaných při teplotě $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ se během sedmi dnů projevil pokles EPG o 38 %, pokles dále pokračoval. Zamrazení vzorků není doporučeno. Při teplotě $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ klesaly stanovené hodnoty EPG během prvních 14 dní jen mírně, po této době následoval výrazný pokles na hodnoty srovnatelné se vzorky skladovaných při $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$. Skladování při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ poskytovalo ve sledovaném období nejstabilnější výsledky. Po čtrnácti dnech se opět projevil mírný nárůst hodnot. Z grafu 1 plyne, že během prvních deseti dnů docházelo u všech použitých skladovacích materiálů k poklesu EPG v čase, při této teplotě však pokles byl pouze mírný. Rozdíl EPG mezi maximálními a minimálními hodnotami byl 20 %. Od jedenáctého dne docházelo k nárůstu EPG, což může být způsobeno vysycháním vzorku a otvírá se zde prostor pro další výzkum. Při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ docházelo k destrukci vajíček, pravděpodobně vlivem krystalizace vody a mechanického poškození obalů vajíček během mražení (Maya et al. 2012).

Naopak uchovávání vzorků při chladničkové teplotě ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) bylo ve většině případů spojeno s nejnižším úbytkem vajíček v čase. Tato teplota zpomaluje metabolické a vývojové procesy ve vzorku a zároveň zabraňuje dehydrataci nebo nadměrnému rozvoji mikroflóry, která by mohla parazitární struktury degradovat. Shodné výsledky přináší i studie Papaiaakova et al. (2018), která považuje skladování při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ za optimální kompromis mezi zachováním vitality vajíček a prevencí před jejich vývojem.

Přestože test nepotvrdil statistickou významnost, při vizuálním hodnocení vývoje hodnot EPG v čase je patrný zřetelný pokles počtu vajíček ve vzorcích skladovaných při $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tento trend může poukazovat na citlivost strongylidních vajíček k opakovanému zmrazování

a rozmrazování. Výsledky tedy mohou mít biologický význam, který není vzhledem k malé velikosti vzorku a vysoké variabilitě mezi replikacemi statisticky prokazatelný. Další experimenty s větším počtem měření by mohly tento trend potvrdit.

6.2 Vliv skladovacího materiálu

V tabulce 1 jsou uvedeny naměřené hodnoty. Za účelem analýzy byly vypočteny průměrné hodnoty měření v jednotlivých dnech, směrodatné odchylky, průměrný variační koeficient a sedmidenní klouzavé průměry. Rozdíly mezi sadami naměřených hodnot pro různé skladovací materiály byly v mezích intervalu standardního rozptylu založeném na vypočteném průměrném variačním koeficientu 5,23 %. Pokud však jsou vzorky uchovávány v méně těsných nebo prodyšných nádobách může dojít k výraznému úbytku EPG hodnot (Maya et al. 2012). V případě alternativních obalů, (rukavice, sklenice, improvizované nádoby) mohou být vzorky kontaminovány nebo špatně těsní. Tento aspekt nebyl primárně testován v této studii, ale literární rešerše (např. Ghafar et al. 2021) naznačují, že tyto faktory mohou negativně ovlivnit výsledky analýzy.

Protože p-hodnota je vyšší než hladina statistické významnosti $\alpha=0,05$, nelze zamítnout nulovou hypotézu o shodnosti rozdělení mezi skupinami. To znamená, že mezi jednotlivými skladovacími materiály nebyl prokázán statisticky významný rozdíl v počtu EPG během sledovaného období.

6.3 Význam metody Mini-FLOTAC

Metoda Mini-FLOTAC se v této studii osvědčila jako vhodná pro kvantifikaci vajíček strongylidních hlístic ve vzorcích různé kvality. I přes negativní vliv skladování na kvalitu vzorků, Mini-FLOTAC poskytovala konzistentní a relativně reprodukovatelné výsledky, jakmile byly dodrženy základní standardy přípravy. Tím se potvrdila i validita výběru této metody jako preferované v praktických podmínkách, jak uvádějí i práce Bosco et al. (2018) nebo Lejeune et al. (2023). Zajímavým poznatkem bylo, že i u vzorků, které již podléhaly degradaci, metoda Mini-FLOTAC často zachytila reziduální množství vajíček, zatímco méně citlivé metody (např. McMaster) by s velkou pravděpodobností poskytly falešně negativní výsledek. Tento rozdíl je zásadní zejména v preventivní a kontrolní diagnostice, kde cílem není pouze potvrdit masivní infekci, ale také identifikovat jedince s nízkou intenzitou nálezů.

6.4 Shrnutí

Diskuse prokázala, že přesnost diagnostiky parazitární infekce u koní pomocí koprologického vyšetření je silně závislá na preanalytické fázi. Teplota a čas od odběru mají efekt na kvalitu výsledku. Při správném postupu lze minimalizovat úbytek kvantifikovatelných vajíček a tím zvýšit výpovědní hodnotu vyšetření. Z výsledků této práce vyplývá jasná potřeba zavést standardizovaná doporučení pro odběr a transport koprologických vzorků v rámci veterinární praxe i chovatelského sektoru.

7 Závěr

Odebrané koprologické vzorky byly testovány metodou Mini-FLOATAC. Naměřená data byla statisticky zpracována a zobrazena v grafech. Na základě získaných výsledků bylo možné jednotlivé hypotézy formulované v úvodu této práce potvrdit nebo vyvrátit a současně vyvodit závěry s významným praktickým dopadem pro veterinární a chovatelskou praxi. Použitá diagnostická metoda Mini-FLOTAC prokázala vysokou míru citlivosti i při práci se vzorky, jejichž kvalita byla částečně narušena skladováním. Tato práce přispívá nejen k hlubšímu pochopení významu preanalytických podmínek v diagnostice parazitárních infekcí u koní, ale rovněž poskytuje podklady pro tvorbu standardizovaných pracovních postupů v oblasti veterinární parazitologie.

Do budoucna by bylo přínosné rozšířit výzkum o:

- Analýzu vlivu relativní vlhkosti a pH vzorku na integritu vajíček.
- Vyhodnocení dalších diagnostických metod v kombinaci s různými skladovacími režimy.
- Zjištění limitní doby zpoždění vyšetření, kdy je výsledek ještě klinicky relevantní.
- Vzdělávání chovatelů a ošetřovatelů formou informačních kampaní nebo metodických doporučení.

Lze konstatovat, že dodržování doporučených postupů při manipulaci se vzorky trusu je klíčovým předpokladem pro získání spolehlivého a validního výsledku parazitologického vyšetření. Zjištění této práce mají bezprostřední aplikaci v každodenní veterinární praxi a představují významný krok směrem ke zvýšení efektivity kontroly parazitóz v chovech koní.

7.1 Hypotézy

7.1.1 Hypotéza první – vliv doby skladování

„Počet vajíček strongylidích hlístic se s narůstajícím časem skladování vzorku snižuje“ se potvrdila v časovém intervalu deset dní. Po této době se objevil mírný nárůst, který byl způsoben pravděpodobně vysycháním odebraného vzorku. Výsledky jednoznačně ukázaly, že časový odstup delší než 24 hodin vede k významnému úbytku kvantifikovatelných vajíček. Tento efekt je ještě výraznější, pokud je vzorek skladován při pokojové teplotě, neboť dochází k vývoji vajíček do larválních stádií, která již nelze metodou Mini-FLOTAC detekovat. Tímto se významně snižuje výpovědní hodnota vyšetření a roste riziko falešně negativních výsledků.

7.1.2 Hypotéza druhá – vliv skladovací teploty

Hypotéza „Teploty pod bodem mrazu redukují počet nalezených vajíček strongylidních hlístic.“ se taktéž potvrdila. V tomto případě byl úbytek vajíček rychlý a razantní již v prvních dnech skladování. Hypotéza, že skladování vzorku při teplotách pod bodem mrazu negativně ovlivňuje detekovatelnost vajíček, byla rovněž potvrzena. Výsledky prokázaly, že zamražením vzorku dochází k destrukci vajíček, pravděpodobně v důsledku krystalizace vody, která mechanicky narušuje struktury parazitárních vajíček. Naopak skladování při teplotě 4 °C bylo

hodnoceno jako optimální z hlediska zachování diagnostické validity a minimalizace biologických změn ve vzorku.

7.1.3 Hypotéza třetí – vliv skladovacího materiálu

Hypotéza „Skladovací materiál významně ovlivňuje dobu, po kterou lze skladovaný materiál vyšetřit.” nebyla potvrzena.

7.2 Praktická doporučení

Významným výstupem této práce je formulace praktických doporučení pro preanalytickou fázi koprologického vyšetření. Tato doporučení zahrnují:

- Odběr vzorku realizovat co nejdříve po defekaci, ideálně do 1–2 hodin.
- Uchovávat vzorky při teplotě 4 °C.
- Vzorky doručovat do laboratoře nejpozději do 12 hodin, maximálně 24 hodin od odběru.
- Používat vhodné, těsně uzavíratelné obaly nepropouštějící světlo.
- Vzorky nemrazit.
- Je-li skladovací teplota 20 °C, je nepřesnost měření vyšší. Pro orientační zjištění EPG ve vzorcích je tento postup použitelný.
- Při dlouhodobějším skladování je vhodné vzorky skladovat při teplotě 4 °C.
- Barva a tloušťka ZIP sáčku nemá vliv na testovaný materiál.

8 Literatura

- Ballweber L, Beugnet F, Marchiondo A, Payne P. 2014. American Association of Veterinary Parasitologists' review of veterinary fecal flotation methods and factors influencing their accuracy and use – is there really one best technique? 2014. *Veterinary Parasitology*. **204**:73–80. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.05.009.
- Barda BD, Rinaldi L., Ianniello D., Zepherine H., Salvo F., Sadutshang T. a kol. Mini-FLOTAC, an Innovative Direct Diagnostic Technique for Intestinal Parasitic Infections: Experience from the Field. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013;7:e2344. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002344.
- Baudena M, Chapman M, French D, Klei T. 2000. Seasonal development and survival of equine cyathostome larvae on pasture in south Louisiana. *Veterinary Parasitology*. **88**:51–60. DOI: 10.1016/S0304-4017(99)00198-3.
- Becker AC, Kraemer A, Epe C, Strube C. 2016. Sensitivity and efficiency of selected coproscopical methods - sedimentation, combined zinc sulfate sedimentation-flotation, and McMaster method. *Parasitology Research*. **115**:2581–2587. DOI: 10.1007/s00436-016-5003-8.
- Bodeček S, Kecerová Z, Drahoňovská A. 2017. Endoparazité u koní: diagnostika, terapie, prevence. Interní vzdělávací agentura IVA VF U Brno. Brno.
- Bosco A, Maurelli MP, Ianniello D, Morgoglione ME, Amadesi A, Coles GC, Cringoli G, Rinaldi L. 2018. The recovery of added nematode eggs from horse and sheep faeces by three methods. *BMC Veterinary Research* **14**: 1–6.
- Bredtmann CM, Krucken J, Murugaiyan J, Kuzmina T, von Samson-Himmelstjerna G. 2017. Nematode species identification current status, challenges and future perspectives for cyathostomins. *Front Cell Infect Microbiol*. **7**:283. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00283
- Britt AD, Kaplan RM, Paras KL, Turner KK, Abrams AW, Duberstein KJ. 2017 A comparison of McMasters versus mini-FLOTAC techniques in quantifying small strongyles in equine fecal egg assessments. *Journal of Equine Veterinary Science*. **52**:97. DOI: 10.1016/j.jevs.2017.03.143.
- Cain JL, Slusarewicz P, Rutledge MH, McVey MR, Wielgus KM, Zynda HM, Wehling LM, Scare JA, Steuer AE, Nielsen MK. 2020. Diagnostic performance of McMaster, Wisconsin, and automated egg counting techniques for enumeration of equine strongyle eggs in fecal samples. *Veterinary Parasitology*. **284**:109199. DOI: 10.1016/j.vetpar.2020.109199.
- Corning S. 2009. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasites Vectors*. **2** (Suppl 2), S1. DOI: 10.1186/1756-3305-2-S2-S1.
- Cox P, Todd A. 1962. Survey of gastrointestinal parasitism in Wisconsin dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. **141**:706–709.

- Crawley JA, Chapman SN, Lummaa V, Lynsdale CL. 2016. Testing storage methods of faecal samples for subsequent measurement of helminth egg numbers in the domestic horse. *Veterinary Parasitology*. **221**:130-3. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.03.012.
- Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Capelli G, Scala A. 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the fecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Parasitology*. **123**:121–131. DOI: 10.1016/j.vetpar.2004.05.021.
- Cringoli G, Rinaldi L, Maurelli MP, Utzinger J. 2010. FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols*. **5**:503–515. DOI: 10.1038/nprot.2009.235.
- Cringoli G, Maurelli MP, Levecke B, Bosco A, Vercruysse J, Utzinger J, Rinaldi L. 2017. The Mini – FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humus and animals. *Nature Protocols* **12**:1723-1732. DOI: 10.1038/nprot.2017.067.
- Daş G, Klauser S, Stehr M, Tuchscherer A, Metges CC. 2020. Accuracy and precision of McMaster and Mini-FLOTAC egg counting techniques using egg-spiked faeces of chickens and two different flotation fluids. *Veterinary Parasitology*. **283**:109158. DOI: 10.1016/j.vetpar.2020.109158.
- Dyk V, Chroust K, Zavadil R. 1969. *Parazitologie a invázni choroby*. Brno.
- Egwan T, Slocombe J. 1982. Evaluation of the Cornell-Wisconsin centrifugal flotation technique for recovering trichostrongylid eggs from bovine feces. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. **46**:133–137.
- Elsheikha M.H., Khan A.N., 2011. *Essential of Veterinary Parasitology*. Caister Academic Press, Norfolk
- Fukumoto S, Sato R, Nagata M, Arakaki H, Goto T, Mochizukio R, Ikeda K, Nagahata H, Kurosawa T, Sanada Y. 2011. Comparison of four floating methods of fecal examination for equine cestode eggs. *Japanese Journal of Animal Hygiene*. **36**:131–135.
- Flegr J., 2010. Vítejte v báječném novém světě parazitů. *Živa*, **5**, 197–199.
- Gasser RB, Hung GC, Chilton NB, Beveridge I. 2004. Advances in developing molecular-diagnostic tools for strongyloid nematodes of equids: fundamental and applied implications. *Molecular and cellular probes*. **18**:3–16. DOI: 10.1016/j.mcp.2003.10.001.
- Ghafar A., Abbas G., King J., Jacobson C., Hughes K. J., El-Hage Ch., Beasley A., Bauquier J., Wilkes E.J.A., Hurley J., Cudmore L., Carrigan P., Tennent-Brown B., Nielsen M. K., Gauci Ch. G., Beveridge I., Jabbar A. 2021. Comparative studies on faecal egg counting techniques used for the detection of gastrointestinal parasites of equines: A systematic review, *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*, Volume 1. 100046, DOI: org/10.1016/j.crpvbd.2021.100046.

- Godber OF, Phythian CJ, Bosco A, Ianniello D, Coles G, Rinaldi L, Cringoli G. 2015. A comparison of the FECPAK and Mini-FLOTAC faecal egg counting techniques. *Veterinary Parasitology*. **207**: 342-345. DOI: org/10.1016/j.vetpar.2014.12.029
- Gordon HM, Whitlock HV. 1939 A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research*. **12**:50–52.
- Hampel V. 2010. Diverzita parazitů. *Živa* **5**: 200-201.
- Jagła E, Śpiewak J, Zaleśny G, Popiołek M. 2013. Effect of Storage and Preservation of Horse Faecal Samples on the Detectability and Viability of Strongylid Nematode Eggs and Larvae. *Journal of Veterinary Research*. **57**: 161-165. DOI: org/10.2478/bvip-2013-0030
- Jeffery RA, Lankester MW, McGrath MJ, Whitney HG. 2004. *Angiostrongylus vasorum* and *Crenosoma vulpis* in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Newfoundland. Canada. *Canadian Journal of Zoology*. **82**: 66–74. DOI: 10.1139/z03-211.
- Jürgenschellert L, Krücken J, Bousquet E, Bartz J, Heyer N, Nielsen MK, von Samson-Himmelstjerna G. 2022. Occurrence of Strongylid Nematode Parasites on Horse Farms in Berlin and Brandenburg, Germany, With High Seroprevalence of *Strongylus vulgaris* Infection. *Frontiers in Veterinary Science*. Volume 9. DOI: 10.3389/fvets.2022.892920
- Jurášek V, Dubinský P, Bírová V, Borošková Z, Breza M, Csizsmárová G, Corba J, Goldová M, Hanzelová V, Juris P, Krupice I, Leciak V, Novela M, Peřko B. 1993. Veterinářna parazitológia. *Přiroda*. 227–239, 273–277, 283–284.
- Kaplan RM. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*. **20**:477–481. DOI: 10.1016/j.pt.2004.08.001.
- Kim MK, Pyo KH, Hwang YS, Park KH, Hwang IG, Chai JY, Shin EH. 2012. Effect of temperature on embryonation of *Ascaris sum* eggs in an environmental chamber. *The Korean Journal of Parasitology*. **50**:239–242. DOI: 10.3347/kjp.2012.50.3.239.
- Kines KJ, Fox M, Ndubuisi M, Verocai GG, Cama V, Bradbury RS, 2021. Inactivating Effects of Common Laboratory Disinfectants, Fixatives, and Temperatures on the Eggs of Soil Transmitted Helminths. *Microbiology Spectrum* 9:e01828-21. DOI: org/10.1128/Spectrum.01828-21.
- Klei T. R. 2019. Gastrointestinal Parasites of Horses. *Merck Veterinary Manual*. 05 available at <https://www.merckvetmanual.com/horse-owners/digestive-disorders-of-horses/gastrointestinal-parasites-of-horses>
- Koudela B. 2008. Vnitřní parazité koní. Aktuální parazitózy koní, 1–8; 15–19.
- Langrová I, Jankovská I. 2002. Hlístice čeledi Strongylidae – nejčastější parazité koní. Náš chov. Dostupné z <https://naschov.cz/hlistice-celedi-strongylidae-nejcastejsiparazite-koni/>
- Lejeune M, Mann S, White H, Maguire D, Hazard J, Young R, Stone C, Antczak D, Bowman D. 2023. Evaluation of Fecal Egg Count Tests for Effective Control of Equine Intestinal Strongyles. *Pathogens*. **12(11)**:1283. DOI: 10.3390/pathogens12111283. PMID: 38003748; PMCID: PMC10674696.

- Lester GD, Bolton JR, Cambridge H, Thurgate S. 1989. The effect of *Strongylus vulgaris* larvae on equine intestinal myoelectrical activity. *Equine Veterinary Journal*. **7**:8–13. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1989.tb05646.x.
- Lester, HE, Morgan, ER, Hodgkinson, JE a Matthews, JB 2018. Analysis of Strongyle Egg Shedding Consistency in Horses and Factors That Affect It. *Journal of Equine Veterinary Science*. **60**:113–119.
- Lichtenfels J.R. 1975. Helminths of domestic equids. Illustrated keys to genera and species with emphasis on North American forms. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*. **42**:1–92
- Lichtenfels JR, Kharchenko VA, Dvojnós GM. 2008. Illustrated identification keys to strongylid parasites (strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). *Veterinary Parasitology*. **156**:4–161.
- Lichtenfels JR, Gibbons LM, Kreček RC. 2002. Doporučená terminologie a pokroky v systematice Cyathostomina (Nematoda: Strongyloidea) koní. *Veterinář Parasitol*. **107**:337–342. DOI: 10.1016/S0304-4017(02)00167-X.
- Lima VF, Cringoli G, Rinaldi L, Monteiro MF, Calado AM, Ramos RA, Meira-Santos PO, Alves LC. 2015. A comparison of mini-FLOTAC and FLOTAC with classic methods to diagnosing intestinal parasites of dogs from Brazil. *Parasitology Research*. **114**: 3529-3533. DOI: org/10.1007/s00436-015-4605-x
- Lipatov EI, Sosnin EA, Avdeev SM. 2015. The inactivation of eggs of helminthes under the action of narrowband ultraviolet radiation of excilamps. *Proc. SPIE 9810, International Conference on Atomic and Molecular Pulsed Lasers XII*, 98100Z. DOI: org/10.1117/12.2228995
- Love S, Duncan J. 1992. Development of cyathostome infection of helminth naïve foals. *Equine Veterinary Journal*. **24**:S13:93–98.
- Love S, Murphy D, Mellor D. 1999. Patogenita cyathostomové infekce. *Veterinary Parasitology*. **85**:113–122. DOI: 10.1016/s0304-4017(99)00092-8.
- Matthews JB. 2014. Anthelmintic resistance in equine nematodes. *International Journal of Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. **4**:310–315. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2014.10.003.
- Matthews JB. 2008. An update on cyathostomins: anthelmintic resistance and worm control. *Equine Veterinary Journal*. **20**:552–560. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2011.00397.x.
- Maya C, Torner-Morales FJ, Lucario ES, Hernandez E, Jimenez B. 2012. Viability of six species of larval and non-larval helminth eggs for different conditions of temperature, pH and dryness. *Water Research*. **46**:4770–4782. DOI: 10.1016/j.watres.2012.06.014.
- McCoy MA, Edgar HWJ, Kenny J, Gordon AW, Dawson LER, Carson AF. 2005. *Veterinary Record*. **156**(1):21–23
- McCraw B, Slocombe J. 1976. *Strongylus vulgaris* u koně: recenze. *Can Vet J*. **17**:150.

- McGavock W, Howard K. 1980. Effects of ultraviolet light on *Hymenolepis diminuta* ova and cysticercoids. *Journal of the Tennessee Academy of Science*. **55**(3):106–7.
- Mfitilodze MW, Hutchinson GW. 1985. The site distribution of adult strongyle parasites in the large intestines of horses in tropical Australia. *Internacional Journal for Parasitology*. **15**:313–319. DOI: 10.1016/0020-7519(85)90069-4
- Nápravníková, J., Petrtyl, M., Stupka, R., & Vadlejch, J. 2019. Reliability of three common faecal egg counting techniques for detecting strongylid and ascarid infections in horses. *Veterinary parasitology*. **272**:53–57.
- Nielsen, M. K., Vidyashankar, A. N., Andersen, U. V., DeLisi, K., Pilegaard, K., & Kaplan, R. M. 2010. Effects of faecal collection and storage factors on strongylid egg counts in horses. *Veterinary parasitology*, **167**(1):55–61.
- Nielsen M.K., Reinemeyer CR. 2018. *Handbook of equine parasite control*. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Nielsen M.K. 2021. What makes a good fecal egg count technique? *Veterinary Parasitology*. **296**:109509. DOI: 10.1016/j.vetpar.2021.109509.
- Noel ML, Scare JA, Bellaw JL, Nielsen MK. 2017. Accuracy and Precision of mini- FLOTAC and McMaster techniques for determining equine strongyle egg counts *Journal of Equine Veterinary Science*. **48**:1-6. DOI: org/10.1016/j.jevs.2016.09.006
- Nielsen M.K. 2022. Equine anthelmintic resistance: current status and emerging trends. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance* **20**:76–88. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2022.10.005.
- O’Grady MR, Slocombe JO. 1980. An investigation of variables in a fecal flotation technique. *Canadian Journal of Comparative Medicine*. **44**:148–157.
- Papaiakovou M, Pilotte N, Baumer B, Grant J, Asbjornsdottir K, Schaer F, Hu Y, Aroian R, Walson J, Williams SA. et al. 2018. A comparative analysis of preservation techniques for the optimal molecular detection of hookworm DNA in a human faecal specimen. *PLoS Negl Trop Dis*. **12**(1):e0006130. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006130.
- Peregrine AS, Molento MB, Kaplan RM, Nielsen MK. 2014. Anthelmintic resistance in important parasites of horses: does it really matter? *Veterinary Parasitology*. **201**:1–8. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.01.004.
- Peregrine AS, McEwen B, Bienzle D, Koch TG, Weese JS. 2006. Larval cyathostomiasis in horses in Ontario: an emerging disease? *The Canadian Veterinary Journal*. **47**(1):80-2.
- Presland S, Morgan E, Coles G. 2005. Counting nematode eggs in equine faecal samples. *The Veterinary Record*. **156**:208–210. DOI: 10.1136/vr.156.7.208.
- Proudman CJ, Matthews JB. 2000. Control of Intestinal Parasites in Horses. *In Practice*. **22**:90–97

- Rehbein S, Lindner T, Visser M, Winter R. 2011. Evaluation of a double centrifugation technique for the detection of *Anoplocephala* eggs in horse faeces. *J. Helminthol.* **85**:409–414. DOI: 10.1017/S0022149X10000751.
- Reid SWJ, Mair TS, Hillyer MH, Love S. 1995. Epidemiological risk factors associated with a diagnosis of clinical cyathostomiasis in the horse. *Equine Veterinary Journal.* **27**:127–130. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1995.tb03048.x.
- Reinhard K, Bryant B. 1992. Coprolite analysis: a biological perspective on archaeology. *Archaeological Method and Theory.* **4**:245–288.
- Reinemeyer CR, Nielsen MK. 2012. Handbook of equine parasite control. Blackwell publishing. **34**:45– 60.
- Rommel M, Eckert J, Kutzer E, Boch J, Supperer R. 2000. Veterinärmedizinische Parasitologie. Parey Buchverlag. Berlin.
- Saeed I, Maddox-Hyttel C, Monrad J, Kapel CMO. 2006. Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark. *Veterinary Parasitology.* **139**:168–179. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.02.015.
- Saeed MA, Beveridge I., Abbas G., Beasley A., Bauquier J., Wilkes E., Jacobson C., Hughes KJ, El-Hage C., O'Handley R., Hurley J., Cudmore L., Carrigan P., Walter L., Tennent-Brown B., Nielsen MK. 2019. Systematic review of gastrointestinal nematodes of horses from Australia. *Parasites & Vectors.* **12**:188. DOI: 10.1186/s13071-019-3445-4.
- Scare J, Slusarewicz P, Mills C, Pagano S, Hauck E, Nielsen M. 2016. Comparison of a smart-phone based automated parasite egg count system to the McMaster & mini-FLOTAC methods. *Journal of Equine Veterinary Science.* **39**:S49.
- Scare JA, Slusarewicz P, Noel ML, Wielgus KM, Nielsen MK. 2017. Evaluation of accuracy and precision of a smartphone based automated parasite egg counting system in comparison to the McMaster and Mini-FLOTAC method *Veterinary Parasitology.* **247**: 85-92. DOI: org/10.1016/j.vetpar.2017.10.005
- Sengupta ME, Thapa S, Thamsborg SM, Mejer H. 2016. Effect of vacuum packing and temperature on survival and hatching of strongyle eggs in faecal samples. *Veterinary Parasitology.* **217**:21–24. DOI: .org/10.1016/j.vetpar.2015.12.014
- Slusarewicz M, Slusarewicz P, Nielsen MK. 2019. The effect of counting duration on quantitative fecal egg count test performance. *Veterinary Parasitology.* **2**:100020. DOI: 10.1016/j.vpoa.2019.100020.
- Shostak AW, Samuel WM. 1984. Moisture and temperature effects on survival and infectivity of first-stage larvae of *Parelaphostrongylus odocoilei* and *P. tenuis* (Nematoda: Metastrongyloidea) *The Journal of Parasitology.* **70**:261–269. DOI: 10.2307/3281873.
- Schurer J, Davenport L, Wagner B, Jenkins E. 2014. Effects of sub-zero storage temperatures on endoparasites in canine and equine feces. *Veterinary Parasitology.* **204(3-4)**:310-5. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.05.008.

- Tomczuk K, Kostro K, Szczepaniak KO, Grzybek M, Studzinska M, Demkowska-Kutrzepa M, Roczen-Karczmarz M. 2014. Comparison of the sensitivity of coprological methods in detecting *Anoplocephala perfoliata* invasions. *Parasitology Research*. **113**:2401–2406. DOI: 10.1007/s00436-014-3919-4.
- Tyson F, Dalesman S, Brophy PM, Morpew RM. 2020. Novel Equine Faecal Egg Diagnostics: Validation of the FECPAKG2. *Animals*. **10**:1254. DOI: org/10.3390/ani10081254
- Volf, P, & Horák P. 2007. *Paraziti a jejich biologie*. Triton. Praha
- Went H.A., Scare J.A., Steuer A.E., Nielsen M.K. 2018 Effects of homogenizing methods on accuracy and precision of equine strongylid egg counts. *Veterinary Parasitology*;261:91–95. DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.09.001.
- Zajac AM, Conboy GA, Little SE, Reichard MV. 2021. *Veterinary Clinical Parasitology*. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken.

9 Seznam tabulek, obrázků a grafů

9.1 Tabulky

Tabulka 1: Srovnání koprologických metod.

Tabulka 2: Výsledky testování vzorků při pokojové teplotě v rozdílném skladovacím materiálu

Tabulka 3: Průměrné hodnoty zátěže pro jednotlivé dny vyjádřené v procentech a směrodatná odchylka

Tabulka 4: Klouzavé průměry zátěže vyjádřené v procentech.

Tabulka 5: Parametry lineární regrese výsledků EPG ve vzorcích skladovaných v různých materiálech v závislosti na době skladování

Tabulka 6: Výsledky měření EPG při různých teplotách

Tabulka 7: Průměrné hodnoty EPG vyjádřené v procentech pro tři různé teploty skladování.

Tabulka 8: Parametry lineární regrese výsledků EPG ve vzorcích skladovaných při různých teplotách v závislosti na době skladování

9.2 Obrázky

Obrázek 1: Hlavové části druhů rodu *Strongylus*, boční pohled, zleva, *S. equinus*, *S. edentatus*, *S. vulgaris*

Obrázek 2: Životní cyklus Strongylidních hlístic

Obrázek 3: Životní cyklus malých strongylidů

Obrázek 4: Sliznice tlustého střeva koně s larvální cyathostominózou

Obrázek 5: Dvoukomorová komůrka Mini-FLOTAC

Obrázek 6: Laboratorní vybavení – sítko, odměrný válec, pinzeta, stopky a kelímek

Obrázek 7: Různé skladovací ZIP sáčky (zleva transparentní sáček 100 μm , transparentní sáček 50 μm , transparentní sáček 50 μm černý)

Obrázek 8: Vzorky skladované při různých teplotách v 100 μm ZIP sáčcích

9.3 Grafy

Graf 1: Průměrná hodnota EPG vyjádřené v procentech v jednotlivých dnech v závislosti na skladovacím materiálu.

Graf 2: Klouzavé sedmidenní průměry EPG vyjádřené v procentech a standardní interval rozptylu v závislosti na čase.

Graf 3: Graf průměrných denních hodnot EPG vyjádřených v procentech pro tři teploty skladování.

10 Seznam použitých zkratek a symbolů

Zkratka	Význam
AI	Artificial Intelligence
CV	Koeficient variability
EPG	Počet vajíček v jednom gramu výkalu
FEC	Počet vajíček ve výkalu
FECRT	Testy redukce počtu vajíček ve výkalu
L _{1,2,3,4,5}	Larvální stádia
SD	Směrodatná odchylka
SG	Specifická hmotnost (Specific Gravity)
ZIP	Uzavíratelný plastový sáček („zip-lock bag“)