

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Využití koprologické metody Mini-FLOTAC pro
diagnostiku gastrointestinálních helmintóz u rodu *Rattus***

Diplomová práce

**Bc. Veronika Valentová
Zájmové chovy zvířat**

Ing. Zuzana Čadková, Ph.D., DiS.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Využití koprologické metody Mini-FLOTAC pro diagnostiku gastrointestinálních helmintóz u rodu *Rattus*" 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 15.04. 2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Zuzaně Čadkové, Ph.D., DiS., za ochotné převzetí vedení mé diplomové práce, za všechny cenné rady, trpělivost a pečlivost, které mi v rámci zpracování této diplomové práce, ať už v laboratoři, v terénu či za obrazovkou s úsměvem poskytla. Děkuji také svému partnerovi, rodině a blízkým za podporu, motivaci a trpělivost, kterou se mnou měli po celou dobu mého studia.

Využití koprologické metody Mini-FLOTAC pro diagnostiku gastrointestinálních helmintóz u rodu *Rattus*

Souhrn

Tato práce byla zaměřena na zhodnocení vhodnosti koprologické metody Mini-FLOTAC k diagnostice gastrointestinálních helmintóz u hlodavců rodu *Rattus*, vyskytujících se na území České republiky. Cílem práce bylo otestovat diagnostické parametry této metody s ohledem na její schopnost poskytnout relevantní výsledky pro stanovení intenzity infekce různými druhy gastrointestinálních helmintů a detekovat skutečné druhové složení helmintů přítomných v gastrointestinálním traktu vyšetřených hlodavců.

Praktická část diplomové práce byla rozdělena do dvou částí. První část experimentu se zabývala standardizací zvolené metody, přičemž byla ověřována její citlivost a přesnost na uměle inokulovaných vzorcích vajíčky tasemnice *Hymenolepis diminuta*. Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny za použití ANOVA analýzy a Scheffeho testu. Výsledky prokázaly nízkou přesnost metody u všech testovaných hladin EPG a nedostatečnou citlivost při definované hodnotě 10 EPG.

V druhé části experimentu bylo provedeno testování metody Mini-FLOTAC na přirozeně infikovaných vzorcích získaných z volně žijících hlodavců rodu *Rattus*. V rámci tohoto experimentu bylo zanalyzováno celkem 98 vzorků, ve kterých byly identifikovány propagační útvary druhů: *Hymenolepis spp.*, *Syphacia spp.*, *Trichuris muris*, *Aspicularis tetraptera* a *Heterakis spumosa*. Ke statistickému vyhodnocení této části experimentu byla použita regresní a korelační analýza, srovnávající získané hodnoty EPG s výsledky přímé pitvy gastrointestinálních traktů vyšetřovaných hlodavců. Metoda Mini-FLOTAC správně detekovala druhové spektrum helmintů, vyskytujících se v gastrointestinálních traktech hlodavců, avšak přesnost získaných výsledků byla variabilní pro jednotlivé druhy helmintů. Toto zjištění naznačuje, že metoda není univerzálně spolehlivá pro kvantifikaci zatížení gastrointestinálními helminty u hlodavců rodu *Rattus*.

Nejvýznamnějšími limitacemi tohoto výzkumu byl nízký počet vzorků, nedostatečné navážky k naplnění obou vyšetřovacích komor aparátu Mini-FLOTAC a možné narušení propagačních útvarů způsobem konzervace vzorků. Výsledky této práce zdůraznily nutnost dalšího metodického zdokonalení pro zlepšení výsledků získaných použitím metody Mini-FLOTAC, pro spolehlivou neinvazivní diagnostiku gastrointestinálních helmintóz u hlodavců.

Klíčová slova: Cestoda, Nematoda, *in-vivo* diagnostika, koprologické vyšetření, EPG, diverzita a intenzita infekce

Mini-FLOTAC coprological method for diagnostic of gastrointestinal helminthosis in *Rattus spp.*

Summary

This thesis was focused on the evaluation of the suitability of the Mini-FLOTAC coprological method for the diagnosis of gastrointestinal helminthosis in rodents of the genus *Rattus* occurring in the Czech Republic. The aim of this work was to test the diagnostic parameters of this method with regards to its ability to provide relevant results for determining the intensity of infection by different species of gastrointestinal helminths and to detect the actual species composition of helminths present in the gastrointestinal tracts of examined rodents.

The practical experiment of this thesis was split into two parts. The first part of the experiment dealt with the standardization of the chosen method, where its sensitivity and accuracy were verified on samples artificially inoculated with the eggs of the tapeworm *Hymenolepis diminuta*. The obtained results were statistically evaluated using ANOVA analysis and Scheffe's test. The results showed low accuracy of the method at all tested EPG levels and insufficient sensitivity at the defined value of 10 EPG.

In the second part of the experiment, the Mini-FLOTAC was tested on naturally infected samples obtained from wild rodents of the *Rattus* genus. In this experiment, a total of 98 samples were analysed, in which eggs of *Hymenolepis spp.*, *Syphacia spp.*, *Trichuris muris*, *Aspicularis tetraptera* and *Heterakis spumosa* were identified. Regression and correlation analysis was used to statistically evaluate this part of the experiment, comparing the obtained EPG values with the results of direct dissection of the gastrointestinal tracts of the rodents examined. The Mini-FLOTAC method correctly detected the helminth species spectrum present in the gastrointestinal tracts of the rodents, but the accuracy of the results obtained was variable for the different helminth species. This finding suggests that the method is not universally reliable for quantifying gastrointestinal helminth burden in rodents of the genus *Rattus*.

The most significant limitations of this research were the low number of samples, insufficient amounts of material to fill both flotation chambers of the Mini-FLOTAC apparatus, and possible damage to the parasite eggs by the method of sample preservation. The results of this thesis highlighted the need for further methodological refinement to improve the results obtained using the Mini-FLOTAC method, in order to get a reliable, non-invasive diagnosis of gastrointestinal helminthosis in rodents.

Keywords: Cestoda, Nematoda, *in-vivo* diagnostics, coprological diagnostics, EPG, diversity and intensity of infection

Obsah

1	Úvod	8
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	9
3	Literární rešerše	10
3.1	Ekologie a biologie rodu <i>Rattus</i>	10
3.1.1	Ekologie a biologie lokálně významných druhů rodu <i>Rattus</i>	10
3.1.2	Parazitární infekce u rodu <i>Rattus</i>	12
3.2	Gastrointestinální helminti u rodu <i>Rattus</i>	14
3.2.1	Cestoda	14
3.2.1.1	Rod <i>Hymenolepis</i>	14
3.2.2	Acanthocephala	15
3.2.3	Nematoda	17
3.2.3.1	Rod <i>Syphacia</i>	17
3.2.3.2	Rod <i>Aspiculuris</i>	18
3.2.3.3	Rod <i>Trichuris</i>	19
3.2.3.4	Rod <i>Calodium</i>	21
3.2.3.5	Rod <i>Heterakis</i>	22
3.3	Koprologické vyšetřovací metody	23
3.3.1	Kopromikroskopické metody	25
3.3.1.1	Larvoskopické metody	25
3.3.2	Vybrané kopromikroskopické metody na bázi flotace	26
3.3.2.1	McMaster	26
3.3.2.2	FLOTAC	27
3.3.2.3	Mini-FLOTAC	27
3.3.3	Diagnostické metody u hlodavců	29
4	Metodika	31
4.1	Původ použitých vzorků	31
4.2	Standartizace metody MF pomocí uměle inokulovaných vzorků	31
4.3	Ověření úspěšnosti a přesnosti metody MF u vzorků z přirozeně infikovaných hostitelů	32
4.4	Statistické zpracování dat	33
5	Výsledky	34
5.1	Standartizace metody MF pomocí uměle inokulovaných vzorků	34
5.2	Ověření úspěšnosti a přesnosti metody MF u vzorků z přirozeně infikovaných hostitelů	36
5.2.1	Úspěšnost	36
5.2.2	Přesnost	37
6	Diskuze	39
7	Závěr	44
8	Literatura	45
9	Samostatné přílohy	I
9.1	Příloha I	I
9.2	Příloha II	II

1 Úvod

Koprologické metody se staly nedílnou součástí neinvazivní diagnostiky endoparazitů u hostitelů a jsou v současnosti standardem v humánní i veterinární parazitologii. Tyto metody umožňují dlouhodobé monitorování parazitologické situace u vybraných druhů živočichů bez nutnosti jejich usmrcení či jiného zásahu do jejich integrity (Catalano et al. 2019). Při kvantifikaci zatížení parazity mohou však tyto metody mít své limity ve srovnání s invazivnějšími metodami, jako jsou přímé pitvy gastrointestinálních traktů studovaných hostitelů (Zajac & Conboy 2012).

Hlodavci představují jednu z nejhojnějších, geograficky nejrozšířenějších a nejničivějších skupin živočichů, kteří nejsou pouze zodpovědní za přímé i nepřímé škody na produktech člověka, ale jsou také významnými rezervoáry a přenašeči mnoha parazitárních infekcí a onemocnění (Pakdel et al. 2013; Khan et al. 2021). Zoonotický potenciál patogenů rodu *Rattus* je mezi hlodavci z hlediska lidského zdraví a ekonomiky obzvláště významný v kontextu současných ekologických změn, které mohou ovlivňovat druhové složení a početnost parazitů, jež se u krys a potkanů rodu *Rattus* vyskytují na území České republiky.

Navzdory tomu, že hlodavci rodu *Rattus* patří historicky mezi nejčastěji využívané experimentální živočichy (Baumans 2016), existuje relativní nedostatek vědecké literatury zabývající se diagnostikou gastrointestinálních helmintů pomocí koprologických metod. Doposud není k dispozici „zlatý standard“ splňující všechny požadované diagnostické parametry, který by byl univerzální pro použití u všech druhů hostitelů.

S cílem kombinovat přesné výsledky s vysokou citlivostí i při nízké prevalenci parazitů za nízkých nákladů byla vyvinuta metoda Mini-FLOTAC (Barda et al. 2013). Tato metoda byla úspěšně aplikována k diagnostice gastrointestinálních parazitů u různých druhů živočichů, včetně koní (Noel et al. 2017; Nápravníková et al. 2019), ptáků (Shifaw et al. 2021) přežvýkavců (Bosco et al. 2023), ale také kytovců (Marcer et al. 2022) a volně žijících hlodavců (Catalano et al. 2019). Diagnostikou gastrointestinálních helmintů u volně žijících hlodavců se doposud zabývali pouze Carrera-Játiva et al. (2023) kteří doporučili tuto metodu pro další výzkumy.

Tato práce si klade za cíl ověřit vhodnost metody Mini-FLOTAC pro diagnostiku gastrointestinálních helmintů u volně žijících hlodavců rodu *Rattus* a potenciálně přispět k rozvoji metodologických postupů v tomto výzkumném směru.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem diplomové práce je ověřit vhodnost (správnost, přesnost, citlivost a spolehlivost) koprologické metody Mini-FLOTAC pro diagnostiku gastrointestinálních helmintóz u hlodavců rodu *Rattus* žijících na území České republiky.

H1: Koprologické vyšetření metodou Mini-FLOTAC poskytuje při stanovení EPG gastrointestinálních helmintů hlodavců relevantní výsledky tzn. intenzita infekce *Hymenolepis diminuta* zjištěná výše uvedenou metodou odpovídá reálnému počtu vajíček ve výkalech hostitele.

H2: Diverzita propagačních útvarů detekovaných metodou Mini-FLOTAC relevantně odráží druhové spektrum a početnost helmintů přítomných v GI traktu volně žijících hlodavců.

3 Literární rešerše

3.1 Ekologie a biologie rodu *Rattus*

Řád hlodavců (Rodentia Bowdich, 1821) zahrnuje více než čtyřicet procent všech druhů savců (Feng & Himsforth 2014). Do rodu krys, (*Rattus* Fischer de Waldheim, 1803) spadajícího do čeledi myšovitých (Muridae Illiger, 1811), se dnes řadí až 61 druhů, čímž tvoří nejzastoupenější rod savců vůbec (Aplin et al. 2003).

První zástupci rodu *Rattus* jsou datováni přibližně do období konce Pliocénu asi před třemi miliony let (Aplin et al. 2003) a z Jihovýchodní Asie se rychle rozšířili do celého světa (Macdonald et al. 1999). Potomkům původního zástupce rodu *Rattus* se od té doby podařilo kolonizovat všechny typy prostředí a v současnosti se vyskytují na všech kontinentech kromě Antarktidy (Feng & Himsforth 2014). Zástupci tohoto rodu jsou klasickým příkladem synantropně žijících savců, protože jejich hlavní místo výskytu je vždy spojeno s člověkem, ať už na venkově, nebo ve městech (Aplin et al. 2003; Galán-Puchades et al. 2021). Někteří autoři je dokonce nazývají „obligátními škůdci“, protože se zdá, že k udržení svých populací člověka výslovně potřebují (Aplin et al. 2003; Feng & Himsforth 2014).

Zatímco habitat většiny druhů rodu *Rattus* je v lesích, Subalpínských až Alpínských biotopech či na oceánských ostrovech, pět z jednašedesáti druhů tohoto rodu se vyskytuje převážně v horských oblastech (Feng & Himsforth 2014). Na území české republiky se z rodu *Rattus* vyskytuje zejména druh potkan obecný (*Rattus norvegicus* Berkenhout, 1769) a krysa obecná (*Rattus rattus* Linnaeus, 1758) (Anděra 2011). Z tohoto důvodu budou dále rozepsány pouze informace týkající se těchto dvou druhů.

3.1.1 Ekologie a biologie lokálně významných druhů rodu *Rattus*

Potkan obecný (*Rattus norvegicus*) má malé uši a jeho ocas tvoří asi 85% délky těla, ve srovnání s krysou obecnou (*Rattus rattus*), která má uši větší a ocas výrazně delší než tělo (Otto et al. 2015). Relativně větší velikost a agresivnější povaha potkana pravděpodobně způsobila vytlačení velké části populace původní krysy z Evropy, po jeho příchodu z jihovýchodní Asie do Evropy v období 18. století (Macdonald et al. 1999; Otto et al. 2015).

Rozšíření potkanů a krys po celém světě je významně ovlivňováno klimatickými faktory, kde např. potkanu obecnému nejvíce vyhovuje mírné, až tropické podnebí (Marsh 1994). Průzkumy naznačují, že nejběžnějším druhem rodu *Rattus* v Evropských městech (např. v Itálii, Maďarsku, Rakousku či Anglii) je *R. norvegicus* (Cavia et al. 2009). Studie na zemědělských půdách různých oblastí mírného pásu ukazují, že pole a otevřené plochy jsou pro potkany obecně okrajovým prostředím, s výjimkou případů, kdy jsou jim plodiny dostupné jako potrava (Macdonald et al. 1999).

Výskyt potkanů je úzce spjat s lidskými sídly a oblastmi ovlivněnými lidskou činností. Procesy jako například urbanizace potkanům poskytují vynikající prostředí (Simões et al. 2016). V zimním období si městští potkani vyhledávají úkryt přímo v lidských obydlích, naopak venkov, kde je vyšší podíl půdy na úkor lidské zástavby, poskytuje potkanům vhodné

podmínky pro stavbu vlastních nor (Cavia et al. 2009). Autor také uvádí, že v městských parcích se potkan vyskytoval zejména na plochách s vysokou hustotou stromů a/nebo keřů.

Podobně jako v historii, i v současnosti pronikání potkanů do teritorií krysy způsobuje jejich vytlačování z hnízd a nucené stěhování do vyšších míst, např. na střechy či do potrubí lidských staveb (Barnett & Spencer 1951; Feng & Himsforth 2014). Krysy obecně jsou zdatné ve zdolávání vertikálních překážek a stavění hnízd z umělých materiálů, jsou proto k nalezení i v člověkem-hustě zastavěných oblastech (Cavia et al. 2009).

Na populace potkanů v rámci jednoho klimatického pásma má významný vliv také roční období, které ovlivňuje nejen jejich aktivitu, ale také reprodukci (Davis 1953; Feng & Himsforth 2014). V posledních letech bylo pozorováno, že mírné a vlhké zimy a jara mají pozitivní vliv na růst populací těchto hlodavců (Galán-Puchades et al. 2021). V mírném podnebí reprodukční aktivita vrcholí na jaře a na podzim, a v zimě klesá (Margulis 1977; Macdonald et al. 1999). Populace poté dosahuje nejvyšší hustoty koncem léta a začátkem podzimu, v důsledku skokového přírůstku juvenilních jedinců (Mcguire et al. 2006; Feng & Himsforth 2014). Rovněž samotná plodnost samců je závislá na ročním období a jím spojenou potravní nabídkou, jelikož omezený přístup k potravě opožděje nástup pohlavní dospělosti a fakultativní zastavení spermatogeneze (Macdonald et al. 1999).

Potravní preference potkanů jsou ovlivňovány předchozími zkušenostmi i nutriční hodnotou potravy (Barnett & Spencer 1953), avšak jako oportunisté se schopností se přizpůsobit různorodé potravě, je výběr potravy do značné míry ovlivňován její dostupností (Aplin et al. 2003). Oproti všežravosti potkanů, krysy rodu *Rattus* konzumují přednostně ovoce, ořechy a semena (Marsh 1994). Potkani se obecně vyhýbají otevřeným plochám a mají tendenci svou potravu konzumovat v blízkosti svých úkrytů (Takahashi & Lore 1980; Whishaw & Whishaw 1996; Feng & Himsforth 2014). Takahashi & Lore (1980) nenašli v nalezených potkaních norách žádné důkazy o uskladněné potravě.

Whishaw & Whishaw (1996) popisují, že většina aktivity potkanů se odehrává v nočních hodinách před půlnocí, juvenilní potkani však často vyhledávají potravu dříve, po západu slunce, aby se tak vyhnuli konkurenci starších a větších potkanů. Macdonald et al. (1999) popisují, že noční aktivita potkanů může působit střet zájmů mezi krmením a pářicími aktivitami např. v letním období, kdy je noc nejkratší, a obě tyto aktivity vrcholí právě během noci. Střídání ročních období také ovlivňuje délku doby, po kterou se zvíře musí během dne postit, než může jít bezpečně shánět potravu. Samice preferují potravu shánět v mnoha krátkých intervalech, zatímco samci potravu vyhledávají méně často, ale po delší dobu (Inglis et al. 1996).

U samic potkanů žijících ve skupinách byla pozorována synchronizovaná říje, která může vést ke koordinovanému populačnímu boomeru, kdy je ve stejnou dobu odstaveno velké množství mlád'at (Marsh 1994). Doba březosti potkanů je přibližně tři týdny (Feng & Himsforth 2014). V příznivých podmínkách, např. v městském prostředí, se potkani mohou rozmnožovat celoročně a mít až pět vrhů ročně, kde se počet mlád'at v jednom vrhu pohybuje mezi čtyřmi až osmi (Davis 1953; Marsh 1994). Počet mlád'at ve vrhu se zvyšuje také s velikostí a zralostí samice (Perry & Fetherston 1997).

Po narození jsou mláďata schopna přijímat pevnou potravu již ve věku tří týdnů a mohou být odstavena ve věku jednoho měsíce. Pohlavní dospělosti dosahují již ve věku tří měsíců věku (Marsh 1994). Samci potkanů mají přirozeně vyšší rychlost růstu a dorůstají do větších rozměrů než samice (Mcguire et al. 2006). Hmotnost a věk potkana však mají lineární vztah pouze v nejrannějším období života potkana. Po dosažení velikosti dospělého jedince již hmotnost neslouží jako užitečný ukazatel chronologického věku (Feng & Himsworth 2014).

U samic, které se rozmnožují synchronně, přežije do odstavu přibližně 80 % mláďat, oproti 28 % mláďat, která přežijí u samic rozmnožujících se asynchronně (Ziporyn & McClintock 1991). Pravděpodobnost úmrtí potkana v prvním roce života je až 90-95%, volně žijící potkani tedy mají velmi krátkou dobu života (Davis 1953). Autor také uvádí, že predátoři jako např. kočky mají tendence zabíjet právě juvenilní potkany, čímž způsobují významné úbytky juvenilních jedinců z populací. Bylo také popsáno, že samice se dožívají vyššího věku než samci (Margulis 1977).

Jako konzumenti prvního i druhého řádu v potravních řetězcích hrají hlodavci významnou roli v životních cyklech řady helmintů jako mezihostitelé i definitivní hostitelé. Podílejí se tak na udržování přirozených ohnisek parazitárních infekcí a invazí (Summers et al. 2003; Kononova & Prismany 2020). Významnou roli plní i u přenosu různých agens např. na hospodářská zvířata (Pakdel et al. 2013; Franssen et al. 2016). Zvýšený výskyt hlodavců v dané oblasti obývané lidmi může také přímo souviset se zvýšeným výskytem zoonóz u konkrétní lidské populace (Stojcevic et al. 2004). Jejich schopnost působit jako vektorů zoonotických parazitů je značně posílena jejich vysokou fyziologickou podobností s lidmi (Kataranovski et al. 2011).

3.1.2 Parazitární infekce u rodu *Rattus*

Parazitární infekce jsou jedním z významných faktorů ovlivňujících populační dynamiku potkanů a krysu (Stojcevic et al. 2004). Pozitivní korelace mezi věkem potkanů a intenzitou parazitární nákazy naznačuje, že počet parazitů se během života potkana kumuluje uvnitř těla, avšak nezpůsobuje obvykle mortalitu jedince, kvůli vzájemné adaptaci hostitele a parazita. Ačkoli není běžné, aby parazité své hostitele usmrtili, mohou jim způsobovat změny v tělesné hmotnosti, velikosti i změnu chování, což v konečném důsledku ovlivňuje jejich rozmnožování i přežití (Gomez Villafañe et al. 2008). Parazité však svým hostitelům mohou přinášet i určité výhody, z pohledu aktivace a posilování imunitního systému již od raného věku hostitele (Hewitson et al. 2009).

Pro posouzení vlivu parazitů na populační dynamiku hostitele je nutné studovat jak populace parazita, tak i hostitele. Parazité mají nepřímý vliv na vnitrodruhové i mezidruhové interakce svých hostitelů, mohou snižovat jedincovu konkurenceschopnost či zvyšovat jeho zranitelnost vůči predátorům (Gomez Villafañe et al. 2008). Z evolučního hlediska je cílem parazita zvýšit šanci, že se jeho infekční vývojová stádia setkají s hostitelským druhem. Jednou z adaptivních cest k tomuto cíli je manipulace s hostitelovým chováním. Známým příkladem tohoto fenoménu je zvýšená fyzická aktivita krysy, nakažené *Toxoplasma gondii* (Nicolle & Manceaux, 1908) (Hay et al. 1983), která zvyšuje její atraktivitu pro definitivního hostitele této

kokcidie, kočky domácí (*Felis catus* Linnaeus, 1758). Zvýšený pohyb krysy stimuluje lovecký pud kočky, která naopak nejeví přílišný zájem o nepohyblivé objekty (Hubel & Wiesel 1962).

Stejně tak, jak kolísají populace hlodavců samotných byla nejvyšší prevalence parazitárních infekcí zaznamenána v létě a na podzim (Kataranovski et al. 2011). Sezónní kolísání intenzity infekce závisí jak na vlastnostech konkrétních hostitelů, tak i na řadě klimatických faktorů. Příkladem je maximální intenzita infekce ptačí škrkavky *Heterakis gallinarum* (Schränk, 1788) během léta, úměrně s maximálními počty populace žízá, které jsou nezbytné pro přenos této hlístice (Anderson 2000). Jiným příkladem byla nejvyšší intenzita infekce hlístice parazitující u potkana, *Nippostrongylus brasiliensis* (Travassos, 1914), na podzim, kdy ve studované oblasti dochází k nejvyššímu množství srážek, které jsou zásadní pro přežití vývojových stádií tohoto druhu. Tato vývojová stádia se vyskytují ve vnějším prostředí a jsou náchylná na vysychání (Gomez Villafaña et al. 2008).

Studie Galán-Puchades et al. (2018) vyhodnotila, že dospělí potkani vykazovali vyšší prevalenci nákazy tasemnicí *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi, 1819) než juvenilní potkani, pravděpodobně z důvodu kratší expozice prostředí. Dalším důvodem může být souvislost s potravou dospělých, která je bohatší na hmyz, který je mezipostitelem této tasemnice i jiných helmintů. Také Khan et al. (2021) zaznamenali vyšší prevalenci parazitů u dospělých potkanů (20 %) oproti necelým čtyřem procentům u subadultních jedinců. Jedinci s vysokou tělesnou hmotností jsou potenciálními cíli parazitů, protože jejich větší prostor těla představuje více místa pro kolonizaci parazity. Naopak, jedinci s nízkou tělesnou hmotností mohou být atraktivnější pro parazity z důvodu možné snížené imunitní kompetence a nedostatku živin z potravy (Morand 2015).

Někteří autoři (Rodríguez-Vivas et al. 2011; Pakdel et al. 2013) popsali souvislost mezi pohlavím hlodavce a mírou infekce gastrointestinálních parazitů, kde byla intenzita infekce u potkaních samců až o třetinu vyšší než u samic. Tato souvislost s mírou infekce a pohlavím hostitele byla mimo jiné popsána i u ektoparazitů, jako jsou například klíšťata (Harder et al. 1992).

Jedním možným důvodem, proč se u samců může vyskytovat vyšší míra infekce je negativní vliv samčího hormonu testosteronu na imunitní obranu jedince (Grossman 1989; Derothe 1997; Kataranovski et al. 2011), či na jeho chování, které ho dělá náchylnějším k infekci (Morand 2015; Biard et al. 2015). Tento fenomén byl experimentálně popsán v řadě studií na myšovitých, s použitím laboratorních parazitárních modelů, například *Nippostrongylus brasiliensis* (Bone & Bottjer 1986), *N. muris* (Haley 1958) či *Heterakis sp.* (Harder et al. 1992). Nepřímé důkazy naznačují, že vyšší hladiny testosteronu stimuluje také larvální vývoj gastrointestinálních helmintů, například *Trichinella spiralis* či vývoj cyst *Echinococcus granulosus* (Harder et al. 1992).

Bylo prokázáno, že samci jsou nositeli intenzivnějších infekcí než samice, na základě prodlouženého patentního období a zvýšeném množství vajíček uvolňovaných výkaly. Experimentální snížení hladiny testosteronu u samců, dosažené jejich kastrací, vedlo ke zkrácení patentních období a snížení počtu vajíček ve výkalech (Harder et al. 1992).

3.2 Gastrointestinální helminti u rodu *Rattus*

Pro účely této práce byli vybráni gastrointestinální parazité s nejvyšší prevalencí u druhů *Rattus rattus* a *Rattus norvegicus*, se kterými je možné se běžně setkat ve Středoevropských podmínkách včetně České republiky, odkud pochází také materiál použitý v praktické části této práce. Následující helminté budou popsáni se zvláštním důrazem na vývojové cykly a propagační stádia, která potenciálně mohou být nalezena ve vzorcích výkalů, které jsou zkoumány v rámci této práce. Z těchto důvodů pro tuto část rešerše nebyli vybráni jiní helminté, kteří se sice mohou u rodu *Rattus* vyskytovat i v relativně vysoké míře, avšak potkani a krysy nejsou jejich definitivními hostiteli, nebo se nevyskytují v našich zeměpisných podmínkách.

3.2.1 Cestoda

3.2.1.1 Rod *Hymenolepis*

Hymenolepis nana (Bilharz, 1851), autory označována také jako *Rodentolepis nana*, je v průměru 20 – 40 mm dlouhá a většinou méně než 1 mm široká tasemnice. Její scolex má čtyři přísavky a rostellum s dvaceti až sedmadvaceti háčky. Proglottidy u dospělých jedinců jsou ve tvaru lichoběžníku a mohou obsahovat až dvě stě vajíček s tenkým obalem, která jsou oválná, bezbarvá a se šesti polárními vlákny. Uvnitř vajíček se nachází embryo, tzv. onkosféra, se třemi páry háčeků ve vnitřním obalu. Vajíčka této tasemnice jsou velká přibližně 30 – 56 x 44 – 62 μm a mimo hostitele dlouho nepřežívají (Otto et al. 2015).

U tohoto druhu byl popsán i přímý vývojový cyklus, tedy že celý jeho vývoj může být dokončen v rámci jednoho hostitele (Webster & Macdonald 1995; Alvi et al. 2021). Vývojový cyklus u tohoto druhu trvá přibližně čtrnáct až šestnáct dní. Onkosféry se po pozření vajíček hostitelem líhnou v tenkém střevě. Pronikají do klků střeva a za circa čtyři až pět dní se z nich vyvíjejí cysticerkoidní larvy, které znovu přecházejí do lumen střeva, kde se scolex tasemnice vchlípí a přichytí na sliznici. Zralé proglottidy se vyvíjí po deseti až dvanácti dnech a dospělci poté žijí pouze několik týdnů (Otto et al. 2015; Alvi et al. 2021).

U potkanů a myší je tato tasemnice patogenní pouze při těžkých infekcích (Otto et al. 2015). Starší literatura popisuje vliv této tasemnice na zpomalení růstu, úbytky hmotnosti až úhyn (Hsu 1979). Infekce touto tasemnicí je nejčastější u čerstvě odstavených mláďat a juvenilů (Otto et al. 2015). Nakažení poté obvykle vede k určitému stupni imunity, která zabraňuje následovné autoinfekci. Pokud k autoinfekci však dojde, vajíčka se líhnou v tenkém střevě a vyvíjejí se bez toho, aniž by byla vylučována výkaly, a tím způsobují velmi vysoké zatížení gastrointestinálního traktu, v angličtině tzv. „syndrom nafouknutého břicha“ (Owen 1992).

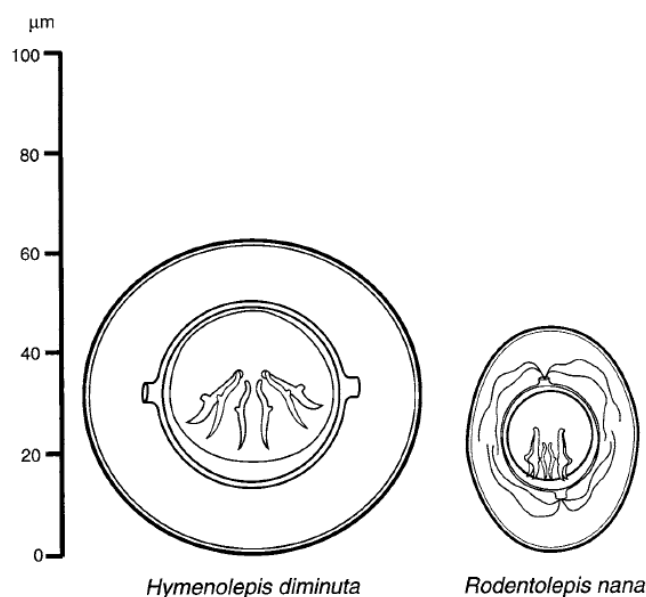
Scolex *Hymenolepis diminuta* (Rudolphi, 1819) má také čtyři přísavky, ale rostellum je bez háčeků. Vajíčka jsou velká 60-88 x 52-81 μm (srovnání viz Obr. 1) a onkosféra má tři páry háčeků, avšak bez polárních vláken (Otto et al. 2015).

Tento druh má vždy nepřímý vývojový cyklus. K přenosu vajíček s onkosférami mezi hostiteli dochází fekálně-orálním kontaktem, či náhodným pozřením mezihostitelů na obilovinách. Nejznámějším příkladem je brouk *Tribolium confusum* (Jacquelin du Val, 1868)

který v sobě nosí cysticerkoidy této tasemnice (Webster & Macdonald 1995; Franssen et al. 2016). Mezihostitelem mohou být také obilní brouci *Tenebrio molitor* (Linnaeus, 1758), *Tenebrio obscurus* (Fabricius, 1792) či blechy *Pulex irritans* (Linnaeus, 1758), *Ctenocephalides canis* (Curtis, 1826) nebo *Xenopsylla cheopis* (Rothschild, 1903) (Otto et al. 2015).

Definitivním hostitelem těchto dvou druhů tasemnic jsou primárně potkani a krysy, avšak žijí i v tenkém střevě jiných hlodavců, např. myši a křečků a také u primátů včetně člověka. To z nich dělá potenciálně zoonotické parazity (Webster & Macdonald 1995).

Ito et al. (1986) popsali na myších, že infekce i jednou onkosférou po ingesci několika vajíček vyvolává úplnou imunitu vůči reinfekci. Bylo také uvedeno, že jedinci *H. nana*, adaptovaní na vývoj v myších, se při infekci potkana dále nevyvíjí v dospělce (Ito 1983; Alvi et al. 2021).



Obr. 1: Relativní velikosti vajíček *H. diminuta* a *H. nana* (Pritchett 2007)

3.2.2 Acanthocephala

Vrtejší (Acanthocephala) jsou válcovité helminté, kteří vykazují tzv. pseudosegmentaci. Vyznačují se protáhlým, trubicovitým tělem, na jehož předním konci je obrácený hákovitý „chobot“ tzv. proboscis, který se nachází ve své vlastní schránce kulatého tvaru, až dokud nedojde ke kontaktu se tkání hostitele (Teimoori et al. 2011; Mathison et al. 2021). Z přední stěny těla vrtejšů visí oválná tělíska zvaná lemnisky, která slouží jako zásobárna tekutin, když je proboscis zatažen ve schránce, a může mít také funkci v metabolismu tuků (Nickol 1985; Lotfy 2020).

Stejně jako u třídy Cestoda, vrtejší postrádají trávicí ústrojí a vstřebávání živin tak probíhá výhradně přes tělní stěnu (Lotfy 2020; Mathison et al. 2021). Tito helminté jsou označováni za tzv. „perforující vrtejše“, protože mohou u svých definitivních hostitelů způsobit perforaci střev, kterou kromě mechanického poškození proboscisem vrtejše dále usnadňují také proteolytické enzymy, které vylučují (Teimoori et al. 2011).

V rámci této skupiny bylo popsáno asi 1100 druhů (Mathison et al. 2021). Délka těla se značně liší mezi jednotlivými druhy, od několika milimetrů až po 65 cm, jako například u druhu *Macracanthorhynchus hirudinaceus* (Pallas, 1781). Průměrná délka většiny známých druhů je však mezi deseti až pětadvaceti milimetry (Lotfy 2020).

Crompton et al. (1972) popisují, že *Moniliformis moniliformis* a *Moniliformis dubius*, jsou blízce příbuznými, možná až totožnými druhy. Dodává však, že existují mírné rozdíly v délce vývoje a věku, kdy dospělí jedinci začínají kopulovat a produkovat vajíčka. Prepatentní doba u druhu *M. dubius* je pět až šest týdnů, zatímco u *M. moniliformis* se vajíčka mohou objevit ve výkalech definitivního hostitele již dvaadvacet až osmatřicet dní po infekci. Z toho vyplývá, že *M. dubius* dospívá a produkuje vajíčka později (Crompton et al. 1972). Lackie (1975) již však uvádí, že se jedná o synonymní názvy pro stejný druh vrtejše. Tento druh je běžným parazitem vyskytujícím se ve většině částí světa (Lotfy 2020).

Definitivními hostiteli *Moniliformis spp.* jsou krysy a potkani rodu *Rattus*, ačkoli náhodnými hostiteli se mohou stát i jiné druhy hlodavců, šelem či primátů včetně člověka. (Teimoori et al. 2011; Richardson & Brink 2011). Paratenickými hostiteli tohoto vrtejše mohou být různé druhy obojživelníků a plazů (Lotfy 2020).

Vývojový cyklus tohoto rodu je nepřímý, a mezihostitelem jsou zpravidla švábi, *Periplaneta americana* (Linnaeus, 1758), *Periplaneta australasiae* (Fabricius, 1775), *Blatta orientalis* (Linnaeus, 1758) ((Chandler 1941; King & Robinson 1967). *M. moniliformis* se vzácně může vyskytovat také u brouků *Blaps mucronata* (Latreille 1804) (Lackie 1975). Předpokládá se, že specifita pro členovce je nízká (Mathison et al. 2021).

Dospělé samice *M. moniliformis* měří 10 – 27 cm, zatímco samci jsou menší, s rozměry circa 4 – 10 cm (Mathison et al. 2021). Dospělci tohoto druhu žijí v tenkém střevě definitivních hostitelů, kam kladou vajíčka, která se následně dostávají do prostředí výkaly hostitele. Plně embryonovaná vajíčka obsahují infekční larvu prvního stádia, tzv. akantor a po požití dochází k larválnímu vývoji uvnitř hemocoelu švába či brouka (Lotfy 2020; Mathison et al. 2021). Infikovaní švábi vykazovali sníženou aktivitu při vyhýbání se predátorům, což je jev výhodný pro parazita, jelikož tak zvyšuje pravděpodobnost požití švába hlodavcem, což je nezbytné pro dokončení vývojového cyklu parazita (Libersat & Moore 2000).

V hemocoelu mezihostitele dochází k larválnímu vývoji přes dvě stádia akantor a šest stádií tzv. akantel, než dosáhne finálního larválního stádia tzv. cystakant, které je infekční pro obratlovce (Moore 1946; King & Robinson 1967; Mathison et al. 2021). Uvnitř těla bezobratlého akantor migruje a zpočátku vyvolává mírnou enkapsulační reakci. Akantor si následně vytváří membránový obal, který zabraňuje obranné reakci členovce a umožňuje tak další růst akantoru až do třetího stádia akantely, kdy se místo membránového obalu vytváří pevná schránka. Tato schránka může být považována za jakési rozhraní mezi hostitelem a parazitem a je rozhodující pro vyhnutí se obranné reakci hostitelů. Při porušení či nevytvoření schránky dochází k enkapsulaci vrtejše (Lackie 1975). Cystakanty mohou být v hemocoelu švábů nalezeny circa po šesti týdnech vývoje (Moore 1946; Richardson & Brink 2011). Prvotní vývojová stádia larvy jsou kulovitěho tvaru a od 22. až 29. dne po vylíhnutí se začínají prodlužovat. Od 44. až 51. dne se začíná zřetelněji diferencovat proboscis a začínají se vyvíjet lemnisky. Postupně se přední část začíná rozšiřovat, čímž se larva stává zploštělou a

rovnoměrně se zužuje k zadnímu konci těla. Cystakant může být odlišen od nižšího stádia akantely invaginací proboscisu a tím, že hroty háčků již prorazily kutikulu schránky (Crompton et al. 1972).

Akantor je jediným kontinuálně pohyblivým stádiem ve vývojovém cyklu vrtejšů. Pozdější larvální stádia v mezihostiteli jsou nepohyblivá a dochází u nich především k růstu, vnitřní přestavbě a organogenezi, až se nakonec vyvíjí odolná larvální forma cystakant. Také dospělí vrtejši ve střevě definitivního hostitele jsou v podstatě přisedlí a pohybují se pouze během přísátí a páření (Whitfield 1971).

Definitivní hostitel se nakazí pozřením členovce s infekčním stádiem cystakanta. Larvy uvolněné z tělní dutiny mezihostitele se přichycují na sliznici tenkého střeva, kde dospívají a kopulují circa za osm až dvanáct týdnů po infekci (Mathison et al. 2021). Vajíčka mají elipsovitý tvar a jsou opatřena dvěma obaly. Průhledný, silný vnější obal je pokryt velmi silnou membránou, je hladký a navzdory své tloušťce není příliš pevný. Těsně pod vnějším obalem se nachází obal vnitřní, který má pevnou a „lomenou“ strukturu. Mezi tímto obalem a larvou je tenká elastická membrána, která těsně přiléhá k vyvíjející se larvě (Crompton et al. 1972). Rozměry těchto vajíček jsou circa 90 – 125 x 65 µm (Chandler 1941; Mathison et al. 2021).

3.2.3 Nematoda

3.2.3.1 Rod *Syphacia*

Syphacia muris (Yamaguti, 1935) je nejběžnějším roupem, kterého u potkanů a krysu lze diagnostikovat (Otto et al. 2015). Je to druhově specifický parazit a nepatří proto mezi zoonotické druhy (Webster & Macdonald 1995). Vývojový cyklus této hlístice je přímý a trvá jedenáct až patnáct dní (Baker 2007). Jedinci tohoto druhu osidlují slepé střevo hostitele, kde dospívají během sedmi až osmi dní (Sotillo et al. 2012). Gravidní samice kladou oplozená vajíčka do tlustého střeva a perianálních oblastí potkana (Lytvynets et al. 2010; Sousa et al. 2016). Jejich rozměr je přibližně 72-82 x 25-36 µm, tvarově jsou podlouhlá a z jedné strany mírně zploštělá (Otto et al. 2015).

Tato vajíčka se stávají infekčními během několika hodin, jsou velmi odolná vůči podmínkám prostředí a při pokojové teplotě mohou přežít po dobu několika týdnů až měsíců. Jsou zároveň velmi lehká a snadno se proto šíří vzduchem (Lytvynets et al. 2010; Otto et al. 2015; Sousa et al. 2016). Tato vajíčka jsou však citlivá na vysoké teploty, které se v laboratořích využívají k jejich likvidaci (Oldham 1967).

Dospělý samec této hlístice je dlouhý 1,2 – 1,3 mm a jeho ocas je tenký a asi dvakrát delší než šířka těla. Můžeme u něho pozorovat jednu štíhlou, dlouhou spikulum a gubernaculum. Samice tohoto druhu je dlouhá 2,8 až 4 mm a vulva se nachází v přední čtvrtině těla. Dospělí jedinci se nachází ve slepém střevě a přední části tlustého střeva (Lytvynets et al. 2010).

Hostitel se nakazí buď pozřením vajíček z perianální oblasti infikovaného potkana, např. během sociálního chování a vzájemné péče o srst, tzv. groomingu (Webster & Macdonald 1995; Franssen et al. 2016), nebo nepřímo prostřednictvím kontaminované vody, potravy a

jiných materiálů (Sousa et al. 2016). Potkan může být také nakažen tzv. retroinfekcí, tj. kdy v konečniku dojde k vylíhnutí larev a jejich přesunu zpět do tlustého střeva (Stahl 1963). Období prepatence trvá sedm až osm dní, během kterých se dospělí červi usídlí ve slepém střevě a vzestupném tračníku (Lytvynets et al. 2010).

Druh *Syphacia obvelata* (Rudolphi, 1802) se častěji vyskytuje u myší, křečků a pískomilů, ale příležitostně se může vyskytnout i u potkanů, zejména pokud se jejich teritoria překrývají s jinými druhy drobných hlodavců. Tento druh je charakteristický krátkým obdobím dospívání a jednorázovým, „explozivním“ uvolněním velkého množství vajíček v konečniku hostitele, doprovázeného následným úhynem dospělých hlístic. Vývoj vajíček do infekčního stádia larvy (L3) probíhá během prvních čtyřadvaceti hodin. K migraci dospívajících samic do slepého střeva dochází po dobu tří dnů, a poprvé začínají uvolňovat vajíčka circa 12. den po infekci (Chan 1952; Scott & Gibbs 1986).

Morfologie dospělců obou druhů rodu *Syphacia* je podobná, avšak *S. muris* je menší a samec má delší ocas v poměru k šířce těla (Baker 2007). Vajíčka *S. obvelata* jsou 118-153 x 35-55 μm velká, podlouhlá a z jedné strany téměř zcela plochá (Otto et al. 2015).

Detekce těchto dvou druhů hlístic může být snadno provedena Grahamovou metodou (1941), také zvanou „Cellophane tape test“ (Parkinson et al. 2011). Tato metoda spočívá ve vytvoření otisku perianální oblasti infikovaného hlodavce pomocí lepicí pásky a následnému mikroskopickému vyšetření a detekci nalepených vajíček (Hill et al. 2009). Vzhledem k tomu, že většina vajíček se nachází v perianální oblasti a pouze malá část se vyloučí s výkaly, sedimentace a další tradiční koprologické metody zahrnující sběr výkalů, stejně jako kvantifikace vajíček pomocí flotace jsou považovány za méně účinné a pravděpodobně podhodnocují míru infekce *Syphacia* spp. (Sousa et al. 2016).

Dva popsané sezónní vrcholy výskytu oxyuroidních hlístic odpovídají dvěma sezónním vrcholům rozmnožování a veškerých sociálních interakcí u potkanů, které jsou obvykle v létě a začátkem podzimu (Calhoun 1962; Webster & Macdonald 1995; Kataranovski et al. 2011). Infikovaní potkani jsou většinou asymptomatictí (Otto et al. 2015) a ačkoli jsou tyto hlístice obvykle považovány za nepatogenní, bylo prokázáno, že infekce roupy rodu *Syphacia* mají významný negativní vliv na stravitelnost živin a růst u laboratorních potkanů (Wagner 1988; Plachý et al. 2016). Bylo zjištěno, že i přes absenci zjevných histopatologických změn byl výrazně snížen střevní transport vody a elektrolytů (Lubcke et al. 1992). V behaviorálních studiích na myších bylo popsáno významné snížení aktivity u myší silně infikovaných *S. obvelata* (McNair & Timmons 1977). Těžké infekce byly spojeny se stavou jako prolaps konečniku, enteritidami, jaterními granulomy či perianální podráždění (Taffs 1976).

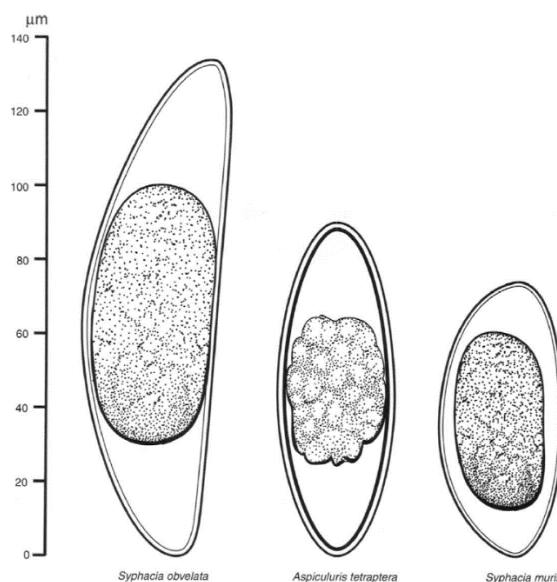
3.2.3.2 Rod *Aspiculuris*

Přímý vývojový cyklus u *Aspiculuris tetraptera* je delší než u rodu *Syphacia*, a trvá asi 24 dní (Taffs 1976; Scott & Gibbs 1986; Baker 2007). Dospělci *A. tetraptera* žijí přibližně dva až pět centimetrů kaudálně od slepého střeva hostitele, v místě, kde se vyskytují charakteristické záhyby sliznice (Anya 1966). Na rozdíl od *S. muris*, kteří vajíčka kladou na perianální kůži hlodavce, dospělé samice tohoto druhu vajíčka kladou do lumen tlustého střeva

a odtud jsou vylučována výkaly (Baker 2007; Lytvynets et al. 2010). Z tohoto důvodu jsou k diagnostice tohoto parazita účinné různé techniky na bázi flotace výkalů (Parkinson et al. 2011).

Tato vajíčka jsou velice odolná podmínkám vnějšího prostředí, a infekční schopnosti dosahují po šesti dnech na vzduchu. K nakažení hostitele dochází po pozření embryonovaných vajíček (Scott & Gibbs 1986; Lytvynets et al. 2013). Samice tohoto druhu vajíčka uvolňují po celou dobu života, která se odhaduje na nejméně dalších čtyřicet dní (Scott & Gibbs 1986). Vajíčka *A. tetraptera* jsou přibližně stejně velká jako vajíčka *S. muris* (Srovnání viz Obr. 2), měřící 89-93 x 36-42 μm, ale jsou bilaterálně symetrická (Otto et al. 2015).

Taffs (1976) popsal, že resistance myši vůči jedincům rodu *Aspiculuris* roste s věkem, kvůli přirozeným fyziologickým procesům stárnutí, spojeným např. se zvýšenou produkcí hlenu. Ve studii Jacoby & Fox (1984) bylo zjištěno, že infekce *S. obvelata* se obvykle vyskytují u juvenilních jedinců.



Obr. 2: Relativní velikosti vajíček *S. obvelata*, *S. muris* a *A. tetraptera* (Pritchett 2007)

3.2.3.3 Rod *Trichuris*

Tenkohlavci obývají zpravidla slepé a tlusté střevo hostitele. Jejich tělo je typické dvěma výrazně odlišnými konci: přední konec těla, tzv. „stichosom“, je dlouhá, bičovitá struktura, kterým se zavrtávají do střevního epitelu hostitele; širší, zadní konec zůstává volně v lumen střeva a zanechává tak prostor pro kopulaci (Panesar & Croll 1980; Upadhyay & Nanware 2020).

Trichuris muris (Schrank, 1788) je endoparazit hlodavců z čeledi myšovitých (Muridae Illiger, 1811), který byl popsán například u druhů: *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758), *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834), *Mus domesticus* (Schwarz & Schwarz, 1943) i *R. rattus*. Fylogenetické studie na různých hostitelích prokazují, že *T. muris* nemá hostitelsky specifické linie, avšak molekulární výsledky popisují dvě jasně vymezené geografické linie tohoto druhu. Tzv. „západoevropská linie“ je rozšířena od severního Španělska po Dánsko, a „východoevropská linie“ je rozšířena od Chorvatska, po Rumunsko a Turecko (Callejón et al.

2010). *Trichuris muris* sdílí rozsáhlou homologii s druhem *Trichuris trichiura* (Linnaeus, 1771) a z tohoto důvodu je hojně využíván v laboratořích pro studium tenkohlavců, kteří se mohou vyskytovat i u člověka (Yousefi et al. 2021).

Vývojový cyklus je přímý. Nový hostitel se nakazí tzv. fekálně-orální cestou, kde se parazit přenáší pozřením infekčních vajíček, která nakažený hostitel uvolní ve výkalech (Hayes et al. 2010). Po pozření se embryonovaná vajíčka pohybují střevním traktem a hromadí se ve slepém střevě, kde již devadesát minut po infekci dochází k jejich líhnutí v larvy prvního stádia (L1) (Panesar & Croll 1980; Cliffe & Grecis 2004). Panesar & Croll (1980) předpokládali, že relativně úzké rozmezí pH ve slepém a tlustém střevě (mezi pH 6 až 7) hraje důležitou roli při spouštění líhnutí larev.

Po vylíhnutí L1 larvy pronikají do proximální části tlustého střeva, kde procházejí vývojem v dalších třech stádiích: L2 (9 až 11 dní), L3 (17 dní) a L4 (22 dní). Dvaatřicátý den po vylíhnutí jsou dospělí jedinci pozorováni ve slepém střevě i proximálním tračníku infikovaných hlodavců (Klementowicz et al. 2012). Dospělé samice produkují 1000 – 2000 neembryonovaných vajíček denně, která jsou vylučována s výkaly hostitele. Vajíčka *T. muris* jsou soudkovitého tvaru s polárními zátkami na každém konci a obvykle dosahují velikosti 60x30 µm (Forman et al. 2021). Koyama (2013) popsal i vzácný výskyt vajíček, která byla více než 74 µm dlouhá a 38 µm široká.

Ve vhodných podmínkách prostředí dochází přibližně po dvou měsících k embryonizaci a vajíčka se tak stávají infekceschopnými, a jen poté jsou schopna infikovat další hostitele (Cliffe & Grecis 2004; Klementowicz et al. 2012).

Zajímavostí je, že pro samotnou indukci líhnutí larev tohoto druhu je důležitá interakce vajíček se střevní mikrobiotou hostitele (Wakelin 1969; Hayes et al. 2010; Klementowicz et al. 2012). Střevní mikrobiom ovlivňuje kolonizaci, reprodukci i míru infekčnosti parazita a může mít přímý vliv na vývojový cyklus *T. muris* tím, že se přichytává na polární zátky vajíček a usnadňuje tak líhnutí larev, a v konečném důsledku podporuje vznik infekce (Hayes et al. 2010). *T. muris* sám mění složení mikrobioty směrem k méně příznivému prostředí ve střevě, čímž brání dalšímu usídlení a líhnutí vlastních vajíček, a způsobuje tak rozvoj chronické infekce (White et al. 2018).

Při zavrtání hlavové části helminta do epitelu střev jsou narušovány buňky bočních stěn epitelu, avšak apikální a bazální povrch často zůstává neporušený, čímž dochází k vytvoření tzv. „syncytiálních tunelů“, v nichž parazit přebývá (Klementowicz et al. 2012; Yousefi et al. 2021). Wakelin (1969) popsal, že larvy pronikají do epitelových buněk sliznice střeva až poté, co nejprve proniknou otvory žláz. Během prvních pěti dnů po vylíhnutí zůstávají larvy uvnitř žláz, stočené kolem sliznice a až s růstem larvy zaujímají více superficiální polohu, až nakonec přední část těla zůstává zavrtaná do sliznice a zadní část je volně v lumen střeva.

Chronická infekce je popisována jako stav, kdy je hostitel infikován méně než čtyřiceti vajíčky *T. muris*, namísto akutní infekce, kdy jsou vajíčka najednou v počtu několika set (Bancroft et al. 1994). Pouze infekce vysokou dávkou vajíček umožňuje vytvoření rezistence vůči budoucím infekcím tímto druhem parazita (Bancroft et al. 2001).

Chronická infekce *T. muris* byla spojena s hyperplazií střevních krypt, doprovázenou zvýšenou proliferací i apoptózami epitelových buněk střevní stěny (Cliffe et al. 2007). Tyto dramatické změny však nebyly pozorovány ve střevě myšovitých, kteří si vytvořili rezistenci vůči infekci. Bylo popsáno, že rezistentní zvířata mají zrychlený obrat tvorby epiteliálních buněk, což je mechanismus přímo související s rychlejším vypuzováním parazitů (Cliffe et al. 2005). Na obranných reakcích proti infekci tenkohlavců se podílejí složky jak vrozené, tak i adaptivní imunity. Zdá se, že než se do místa infekce zapojí klasické imunitní buňky, první obrannou linii tvoří vrstva hlenu, enterocyty a specializované epiteliální buňky střeva, které omezují infekci i invazi *T. muris* (Yousefi et al. 2021). Řada imunologických mechanismů v reakci na infekci *T. muris* však doposud nebyly dostatečně prozkoumány (Klementowicz et al. 2012).

3.2.3.4 Rod *Calodium*

Calodium hepaticum (Bancroft, 1893), dříve označována jak *Capillaria hepatica*, je celosvětově rozšířená hlístice vyskytující se u nadčeledi Muroidea (Illiger, 1811) spadající do řádu hlodavců, jejímiž hlavními hostiteli a rezervoáry jsou zejména potkani, *Rattus norvegicus* (Fuehrer 2014; Berentsen et al. 2015). Infekce touto hlísticí byla současně popsána u více než sto čtyřiceti druhů savců, včetně člověka, psa, kočky nebo koně (Berentsen et al. 2015). Ceruti et al. (2001) popsali, že 36 % z odchycených potkanů z Milána v Itálii, bylo infikováno touto hlísticí. Studie Davoust et al. (1997) ve Francii popsala prevalenci kapilárie ve 44 % odchycených potkanů. Prevalence infikovaných potkanů v oblasti Baltimore, USA ve studii Farhang-Azad (1977) byla až 75 % z 845 odchycených potkanů.

Dospělci této hlístice parazitují v játrech savců a samice zde po oplození kladou vajíčka do jaterního parenchymu, kde způsobují tzv. „jaterní kapilarózu“ (Fuehrer 2014). Typický dospělý jedinec *C. hepatica* má úzkou přední část těla a postupně se zesilňující zadní část. U tohoto druhu byl popsán pohlavní dimorfismus, kdy samice je dlouhá od 27 - 100 mm a cirka 0,11 – 0,2 mm široká, zatímco samci měří od 15 - 50 mm a jsou tenčí než samice, s průměrnou šířkou mezi 0,07 až 0,1 mm. Jícen je dlouhý, zabírá až polovinu délky těla samice a třetinu u těla samce. Na terminální části těla samce může být viděna pářící spikula, u samice pochva (Ceruti et al. 2001; Li 2010; Fuehrer et al. 2011). Dospělé hlístice v játrech žijí krátce a obvykle hynou 18 až 72 dní po infekci. Samice se zpravidla dožívají delšího věku, než samci (Fuehrer 2014; Berentsen et al. 2015).

Vajíčka se podobají vajíčkům parazitů rodu *Trichuris*, avšak liší se svou velikostí. Jsou to vajíčka citronovitého tvaru s polárními zátkami na obou koncích. Vajíčka jsou typicky dlouhá v rozpětí od 40 do 67 μm a široká mezi 22 až 36 μm (Li 2010; Fuehrer et al. 2011; Sinniah et al. 2014). Dospělé samice vajíčka kladou do intracelulárních i intercelulárních jaterních prostor (Upadhyay & Nanware 2020).

Vývojový cyklus je přímý a vyžaduje jediného hostitele. Infekční, tzv. embryonovaná vajíčka se po požití líhnou ve střevech, kde larvy napadají střevní sliznici. Poté portální a mezenterickou žilou migrují do jater (Li 2010). První svlékání nastává tři až čtyři dny po příchodu do jater, a po dobu dalších cirka 20 dní dochází k dospívání do larvy čtvrtého stádia (L4). V tomto stádiu nastává pohlavní diferenciací a dospělé hlístice v játrech kopulují a

následně kladou shluky vajíček do jaterního parenchymu (Li 2010; Sinniah et al. 2014; Berentsen et al. 2015). Tato vajíčka nejsou hostitelem vylučována výkaly, ale do prostředí se dostávají následujícími způsoby: pasáží výkaly predátora, který hostitele pozřel; prostřednictvím kanibalismu či úhynem hostitele a rozkladem jeho těla v prostředí (Fuehrer 2014; Berentsen et al. 2015). Kanibalismus, který je u hlodavců běžný, je považován za hlavní mechanismus šíření vajíček této hlístice (Moreira et al. 2013).

Vajíčka se stávají infekčními až když dojde k jejich embryonizaci, pro kterou jsou nutné vhodné tepelné podmínky a vlhkost prostředí (Ceruti et al. 2001). Požití neembryonovaných vajíček vede k tzv. „pseudoparazitóze“, kdy taková vajíčka vyvolávají pouze mírné příznaky a dochází k jejich pasáží gastrointestinálním traktem a vyloučení výkaly (Fuehrer 2014). Predátoři, kteří pozřou infikovaného hostitele se tedy nutně nemusí nakazit kapiláriemi. Vajíčka, která zůstanou na povrchu půdy rychle zanikají, protože jsou náchylná k vysychání a na UV záření (Singleton et al. 1991).

Patogenita této hlístice u myšovitých hostitelů je obecně považována za nízkou, ačkoli bylo experimentálně prokázáno, že infekce potkanů a myši mohou vést až k jaternímu selhání a smrti hostitele (Singleton & Chambers 1996). Hlístice i jejich vajíčka způsobují v játrech chronický zánět a kolem nich se hromadí zánětlivé buňky, produkované imunitním systémem hostitele, například makrofágy či eozinofily. Zánětlivé procesy pokračují až dokud nedojde k enkapsulaci shluků vajíček a hlístic, a po jejich zahynutí dochází ke kalcifikaci jich i okolní tkáně. Tento stav je nazýván jaterní, či septální fibrózou (Li 2010; Sinniah et al. 2014). Makroskopicky se v infikovaných játrech objevují nepravidelné, žlutobílé skvrny, někdy v pruzích či uzlíčcích na vnějším povrchu i uvnitř parenchymu jater, a v některých případech mohou být v játrech pozorovány i dospělé hlístice (Ferreira & Andrade 1993).

3.2.3.5 Rod *Heterakis*

Škrkavky rodu *Heterakis* (Schränk, 1790) parazitují ve střevech zejména u ptáků a příležitostně i savců (Šnábel et al. 2014). Bylo popsáno celkem deset druhů, z nichž nejrozšířenějším a nejběžnějším je *Heterakis gallinarum* (Schränk, 1788), parazitující zejména u drůbeže. *Heterakis spumosa* (Schneider, 1866) je dalším celosvětově rozšířeným druhem, přirozeně parazitujícím u hlodavců (Zalesný et al. 2010).

Dle Šnábel et al. (2014) jsou ve střední Evropě definitivními hostiteli a hlavními přenašeči *H. spumosa* potkani a krysy rodu *Rattus* a *Apodemus flavicollis*, avšak byla popsána i u jiných hostitelů, například *A. agrarius* (Pallas, 1771), *A. sylvaticus* (Hildebrand et al. 2004, 2009), nebo *Mus musculus* (Smith 1953; Gomez Villafaña et al. 2008; Zalesný et al. 2010).

Tento druh má přímý vývojový cyklus (Winfield 1933; Saitoh et al. 1993) a není u něj znám žádný mezihostitel, na rozdíl od příbuzného druhu, *H. gallinarum*, který pro dokončení vývoje vyžaduje bezobratlého mezihostitele, například žížalu *Lumbricus terrestris* (Linnaeus, 1758) (Saitoh et al. 1993). Na rozdíl od *H. gallinarum*, která má dobře popsáný vývojový cyklus a faktory přenosu (Anderson 2000), je biologie *H. spumosa* doposud méně prozkoumána, jelikož tento druh byl studován pouze experimentálně k hodnocení vlivu testosteronu na míru parazitárních infekcí u myši (Harder et al. 1992).

K infekci hostitele dochází požitím embryonovaných vajíček (Šnábel et al. 2014). Většina vajíček se v tenkém střevě línne během několika hodin, avšak některá i zjevně normální vajíčka prochází trávicím traktem nevylíhnutá a mohou být následně nalezena ve výkalech hlodavce (Smith 1953). Vylíhnuté larvy (L2) prochází dalšími dvěma vývojovými stádii a dospělosti dosahují circa čtyři týdny po infekci (Harder et al. 1995). Dospělí samci dosahují velikosti circa šesti milimetrů, dospělé samice jsou delší, dosahující přibližně devíti milimetrů (Smith 1953). Dospělci rodu *Heterakis* jsou charakterističtí třemi pysky, složitým jícnem a u samců jsou patrné preanální přísavky a nestejně dlouhé pářící spikuly (Zalešny et al. 2010).

Winfield (1933) se domníval, že larvy se během svého raného života zdržují ve slepém střevě a až s blížící se pohlavní dospělostí migrují do oblasti prvních dvou centimetrů tlustého střeva potkana. Smith (1953) však prokázal, že nově vylíhnuté larvy se do osmačtyřiceti hodin přesouvají do tlustého střeva a zde zůstávají po celou dobu svého života. Pouze zřídka a na přechodnou dobu se mohou přesouvat do slepého, případně až tenkého střeva potkana.

Autor rovněž prokázal, že do sliznice střeva potkana pronikají pouze larvy druhého stádia, které ještě nezačaly rapidně růst. Invaze je pouze povrchová, zasahující epitel tkáně. Dospělci žijí v lumen střeva a nepoškozují střevní tkáně, jak je typické pro jiné gastrointestinální hlístice (Harder et al. 1992). Ve výkalech hostitele se vajíčka obvykle objevují třicet až šestačtyřicet dní po infekci. Vajíčka jsou charakteristická velmi silnou schránkou, jsou oválného až kulatého tvaru a dosahují velikosti 50-60 x 40-50 mikrometrů (Smith 1953; Raslan et al. 2020).

3.3 Koprologické vyšetřovací metody

V předchozí kapitole byli popsáni nejčastější gastrointestinální helminté, se kterými se lze setkat u rodu *Rattus* ve Středoevropských podmínkách. V následující části budou podrobněji popsány možné metody jejich detekce z koprologického materiálu.

Mezi obecně nejběžnější diagnostické metody parazitóz způsobených gastrointestinálními helminty patří např. „taping“ (tzv. Grahamova metoda), anální stěry, nekropsie s mikroskopickým vyšetřením obsahu gastrointestinálního traktu či histologická vyšetření (Pritchett & Johnston 2002; Hill et al. 2009; Shifaw et al. 2021).

Ve vědecké literatuře zabývající se diagnostikou parazitóz se od 90. let 20. století začaly výrazněji prosazovat moderní molekulární metody k diagnostice parazitů (Hide & Tait 1991). Tyto metody obcházejí některé limitace, se kterými se setkáváme při použití konvenčních mikroskopických metod. Jedná se například o limitace v náročnosti na pracovní sílu, zejména v situacích, kdy je potřeba vyšetřit vysoké množství vzorků ve velmi krátkém čase, například během epidemiologických situací (Singh 1997).

Mezi nejpoužívanější molekulární metody patří například PCR, DNA sondy či fluorescenční metody (Zalešny et al. 2010; Hussein et al. 2017). Bylo prokázáno, že PCR je z hlediska citlivosti diagnostiky gastrointestinálních helmintů srovnatelná s opakovaným koprologickým vyšetřením vzorku výkalu (Mayta et al. 2008; Schär et al. 2013). Citlivost této metody je ovlivněna schopností detekce veškeré parazitární DNA, např. z kutikulárních buněk, a nespolehání se tak čistě na přítomnost celého parazita nebo jeho

propagačních útvarů ve vzorku. Limitací PCR metod však je, že vyžadují předem navolit DNA primery, umožňující detektovat konkrétní druhy parazitů (Wong et al. 2014).

Přestože jsou tyto metody vysoce citlivé, jsou příliš nákladné na to, aby mohly být rutinně používány v malých laboratořích či v oblastech s minimálními zdroji na pořízení a údržbu drahých přístrojů, které tyto metody vyžadují (Wong et al. 2014; Hussein et al. 2017). Molekulární metody nemohou zatím plně nahradit mikroskopii pro rutinní diagnostické testy, ale mohou být velmi užitečné pro studium konkrétního parazita či skupiny parazitů (Wong et al. 2014). Mikroskopické metody jsou tedy nadále standardem pro parazitologickou diagnostiku, protože jsou relativně jednoduché, univerzální a obvykle nevyžadují drahé laboratorní vybavení pro jejich provedení (Singh 1997).

Tyto metody se od sebe liší například citlivostí, dobou potřebnou ke zpracování vzorků i technickými znalostmi potřebnými k interpretaci výsledků (Dias de Castro et al. 2017). Volba metody pro diagnostiku a determinaci parazitů se odvíjí od cíle zkoumání. Například, pro terapeutické účely není někdy nutná přesná determinace druhu, protože hostitel se dvěma blíže příbuznými druhy parazitů může být léčen stejným antiparazitárním přípravkem. To ale neplatí v případě, kdy mají tyto druhy rozdílný vývojový cyklus či odlišné meziphostitele. V takovém případě zde může být přímý dopad jak na samotnou detekci parazita, tak i na možné kontrolní programy (Wong et al. 2014). Molekulární metody umožňují rozlišit i morfologicky velmi podobné druhy (Feliu et al. 2000; Zalesný et al. 2010).

Přesnost je nejdůležitějším diagnostickým parametrem pro odhad míry infekce helmintů u přirozených infekcí, kde skutečná hodnota vajíček na gram vzorku (EPG) není známa, a vzorky v terénu bývají většinou analyzovány pouze v jednom opakování (Paras et al. 2018; Shifaw et al. 2021). Nízká přesnost může být vysvětlena jako nezáměrné nadhodnocení či podhodnocení výsledků. Další parametry, které se používají k hodnocení diagnostických metod jsou citlivost, vysvětlena jako počet falešně negativních výsledků, a preciznost, která je vysvětlována jako opakovatelnost/reprodukovatelnost výsledků (Cringoli et al. 2010; Levecke et al. 2011).

Přesnost diagnostiky může být závislá na konkrétním druhu hostitelského zvířete (Paras et al. 2018), ale přesnost u různých technik se může lišit i při posuzování intenzity infekce různých druhů parazitů u jednoho hostitelského druhu (Daş et al. 2020). Nápravníková et al. (2019) popisují, že spolehlivost různých koprologických technik může přímo záviset také na konkrétním druhu helminta, i na množství investovaného času. Nejpřesnější technika často bývá ta, která vyžaduje nejvíce času. Becker et al. (2016) poukazují na fakt, že výsledky získané pro jeden druh parazita nelze jednoduše aplikovat na jiný druh, a to ani u blízké příbuzných druhů, a že by zvolená metoda měla být validována pro každý druh zvlášť.

Nepravidelné vylučování vajíček gastrointestinálními helminty může významně ztěžovat provedení a efektivní diagnostiku parazitóz při využití kopromikroskopických metod. Lehké infekce v takovýchto situacích mohou být nesprávně vyhodnoceny jak negativní (Wong et al. 2014). Negativní vyhodnocení kopromikroskopického vyšetření nemusí nutně znamenat, že hostitel není nositelem parazita, nebo, že nevylučuje vajíčka parazita do prostředí (Becker et al. 2016).

3.3.1 Kopromikroskopické metody

Tzv. koncentrační metody se používají k oddělení propagačních útvarů parazitů od zbytku výkalu a nečistot, pro zvýšení šance na jejich detekci během mikroskopického vyšetření. Koncentrační metody mohou být rozděleny na sedimentační a flotační, dle použití konkrétních roztoků s nižší nebo vyšší specifickou hmotností, než jsou hmotnosti hledaných propagačních útvarů parazitů (Ballweber et al. 2014; Roldán et al. 2020).

Někteří autoři (Garcia 2001), doporučují současně využít flotační i sedimentační postupy, protože ani jedna z technik sama o sobě nemůže identifikovat zaručeně všechny parazity z jednoho koprologického vzorku. Tento přístup je však pro většinu laboratoří nepraktický, z důvodu vysoké náročnosti na čas i na zdroje (Katagiri & Oliveira-Sequeira 2010).

Efektivita sedimentačních a flotačních technik je srovnávána již desítky let, ale obecně platí, že to významně závisí na konkrétních druzích parazitů, které v analyzovaných vzorcích mohou být očekávány – s ohledem na druh hostitele. Bylo například popsáno, že vajíčka většiny tasemnic rodu *Taenia* (Robertson et al. 2000) se lépe koncentrují pomocí spontánní či odstředivé sedimentace (Katagiri & Oliveira-Sequeira 2010). Naopak záchyt propagačních útvarů některých druhů měchovců, giardií či např. tasemnice *H. nana* byl vyšší při použití technik za využití flotačního roztoku síranu zinečnatého (Truant et al. 1981). Autor také uvádí, že detekce parazitů rodů *Ascaris*, *Clonorchis* či *Trichuris* byla vyšší při použití sedimentačních technik koncentrovaných formalín-etherem.

Výhodou formalín-etherové sedimentace je, že může být využita pro širokou škálu parazitů k detekci vajíček, larev či cyst, a přitom nenarušuje strukturu těchto propagačních útvarů (Truant et al. 1981; Katagiri & Oliveira-Sequeira 2010). Tato chemická látka má schopnost vázat lipidy ze vzorku, díky čemuž zlepšuje viditelnost parazitů i jejich vajíček v sedimentu (Baker 2007). Tato metoda však vyžaduje poměrně vysoké náklady na její provedení, představuje značné riziko požáru či výbuchu. Zvláštní nevýhodou této metody pro účely mé práce je její neoptimální schopnost koncentrace vajíček *H. nana* (Truant et al. 1981). Další nevýhodou sedimentačních technik je, že analyzovaný vzorek obsahuje vysoké množství nečistot, které i po koncentraci vzorku ztěžují identifikaci parazitárních útvarů ze vzorku (Truant et al. 1981; Garcia 2001).

Ve srovnání se sedimentačními technikami mají flotační techniky výhodu v tom, že získaný materiál pro analýzu je zpravidla „čistší“ a snadnější na prohlížení a identifikaci parazitů. Jejich nevýhodou však je, že látky využívané pro přípravu flotačních roztoků mohou deformovat až porušovat stěny hledaných propagačních útvarů, komplikující tak jejich detekci a determinaci (Ballweber et al. 2014; Roldán et al. 2020).

3.3.1.1 Larvoskopické metody

V situacích, kdy je potřeba ze vzorku determinovat několik rozdílných druhů helmintů, kteří však mají od sebe neodlišitelná vajíčka, nabízí se využití larvoskopických metod. Z vajíček mohou být kultivovány larvy, které jsou zpravidla od sebe rozlišitelné a determinovatelné. Tyto metody mohou být také využity v případech, kdy ve vzorku výkalu již jsou přítomny vylíhnuté larvy (Zajac & Conboy 2012).

Jednou z nejnámějších metod k izolaci larev ze vzorků výkalů je tzv. Baermannův test. Pro použití Baermannova testu je nutné, aby byl vzorek výkalu čerstvý. Pokud je sebraný vzorek již starší, mohou se do něj z prostředí dostat volně žijící helminté, což značně ztěžuje identifikaci jednotlivých helmintů, popř. může dojít k vylíhnutí larev z vajíček těchto volně žijících helmintů (Zajac & Conboy 2012). Zmražení vzorku může způsobit deformaci až narušení vajíček a smrt již přítomných larev (Halvorsen & Wissler 1983).

Baermannův test bývá nejčastěji využíván pro diagnostiku plicních červů. U potkanů byla Baermannova metoda využita ke kultivaci larev ze střev ve studii Domínguez et al. (2000), kteří sledovali vliv anthelmintik na vývoj a migraci *Nippostrongylus brasiliensis* (Travassos, 1914).

Existuje mnoho variant postupu k provedení tohoto testu, ale všechny jsou založeny na stejném základním principu, který využívá tendenci larev helmintů migrovat do vlhčího a teplejšího prostředí. Larvy helmintů jsou aktivní, a když je vzorek výkalu umístěn do vody, larvy migrují ze vzorku a sedimentují. Tradiční princip Baermannova testu je následující:

Vzorek se umístí do nálevky, připevněné ke kovovému stojanu, jejíž dno je připojeno ke krátkému kusu gumové trubičky uzavřené svorkou. Nálevka je naplněna vodou a vzorek v kontaktu s vodou se nechá několik hodin odstát, během čehož larvy sedimentují na dno nálevky, odkud jsou poté vyjmuty uvolněním svorky. Sediment s larvami je následně prohlížen pod mikroskopem při zvětšení 4x až 10x. (McKenna 1999; Zajac & Conboy 2012).

3.3.2 Vybrané kopromikroskopické metody na bázi flotace

3.3.2.1 McMaster

Tuto metodu k počítání vajíček z výkalů vyvinuli v Austrálii Gordon & Whitlock (1939) za použití tzv. McMasterovy komůrky, která se prvotně používala k počítání propagačních útvarů parazitů u ovcí. Tato metoda je doposud nejpoužívanější technikou počítání vajíček pro zjišťování parazitárních infekcí u řady živočišných druhů (Cringoli et al. 2004; Nápravníková et al. 2019).

Základní princip této metody byl popsán Whitlock (1948) následovně: 2,5g vzorku výkalu je zředěno 47,5ml nasyceného roztoku soli o hustotě 1,20. Směs je poté důkladně homogenizována, sceděna a vrchní část o objemu 0,5ml je vložena do McMasterovy komůrky a vyšetřena pod mikroskopem při čtyřicetinasobném zvětšení. Spočítaná vajíčka jsou poté vynásobena čtyřiceti, aby se získala hodnota počtu vajíček v jednotkách EPG (Eggs per gram) (Shifaw et al. 2021). Bylo popsáno, že tato metoda není dostatečně citlivá, zejména při nízkých počtech vajíček (Mes 2003; Mes et al. 2007; Bergquist et al. 2009).

V současnosti má McMasterova metoda nejméně tři varianty. McMaster lze upravit podle hmotnosti výkalů či objemu připraveného flotačního roztoku, ale nejčastěji se využívají modifikace, které dosahují detekčního limitu 5, 20, 50 nebo 100 EPG (Noel et al. 2017). Při tzv. Modifikované McMasterově metodě je dosažena citlivost až 50 EPG. V případě „speciální modifikace McMasterovy metody“ je citlivost až 10EPG. Je však zřejmé, že ani nejvyšší analytická citlivost není dostatečná k dosažení maximální přesnosti parazitologické diagnózy (Mes et al. 2007).

3.3.2.2 FLOTAC

Metoda FLOTAC byla vyvinuta v roce 2006 jako alternativa McMasterovy metody pro diagnostiku gastrointestinálních parazitů u různých druhů savců, s očekáváním vyšší přesnosti, citlivosti a preciznosti (Cringoli et al. 2010, 2017). Tato technika byla původně vyvinuta pro veterinární parazitologii, ale v současnosti je již rozšířena i v lidské parazitologii a probíhá její rozsáhlé testování na diagnostiku hlístic, motolic i střevních prvoků (Rinaldi et al. 2007; Levecke et al. 2009).

Tato metoda je založena na odstředivé flotaci suspenze vzorku výkalu a následné translaci její horní vrstvy (Dias de Castro et al. 2017). Zařízení FLOTAC je polykarbonátový amorfní termoplast válcového tvaru, skládajícího se ze tří fyzických částí: základny, translačního disku a čtecího disku. V každé flotační komoře jsou dvě 5ml flotační komory, které byly navrženy pro optimální vyšetření velkých suspenzí vzorků výkalů (Cringoli et al. 2010).

Hlavním rysem metody FLOTAC je to, že umožňuje počítat parazitární útvary ve velkém množství vzorku výkalu (více než 1 g) najednou. Četné studie prokazují, že technika FLOTAC překonává klasické kopromikroskopické techniky z hlediska citlivosti, přesnosti i preciznosti detekce a kvantifikace larev, vajíček, oocyst i cyst parazitů ve vzorcích výkalů různých zvířecích druhů (Cringoli et al. 2010). Nevýhodou této metody je její časová a pracovní náročnost a nutnost laboratorního vybavení, jelikož pro její provedení je nutné vzorek centrifugovat (Knopp et al. 2009). Nedostupnost tohoto laboratorního vybavení může bránit jejímu širokému uplatnění v prostředí s omezenými zdroji, kde je často nejvíce potřebná. V řadě studií na výkalech různých druhů zvířat byly průměrné diagnostikované hodnoty EPG helmintů metodou FLOTAC stejné nebo vyšší, ve srovnání s jinými metodami (Cringoli et al. 2010).

3.3.2.3 Mini-FLOTAC

Pro překonání limitací, které má metoda FLOTAC, byl pro zlepšení kopromikroskopické diagnostiky vyvinut nový, zjednodušený nástroj, nazvaný Mini-FLOTAC (MF), který vynechává nutnost centrifugace vzorku (Barda et al. 2013). Metoda s využitím soupravy Mini-FLOTAC je uživatelsky přívětivá, poskytuje vysoce reprodukovatelné výsledky a je obzvláště užitečná na místech, kde je třeba relativně rychle a přitom spolehlivě vyšetřit velké množství vzorků trusu (Cringoli et al. 2017).

Zařízení Mini-FLOTAC se skládá ze dvou fyzických součástí: základny a čtecího disku, které jsou vyrobeny z polykarbonátového amorfního termoplastu. Tento materiál byl zvolen pro svou vynikající propustnost světla, vysokou tepelnou odolnost a rozměrovou stabilitu. V základně jsou dvě flotační komůrky, každá o objemu 1 ml, které jsou svrchu překryty čtecím diskem, navrženým pro optimální vyšetření suspenze koprologického vzorku o celkovém objemu 2 ml. Povrch čtecího disku mřížkou rozděluje každou komoru na dvanáct sekcí. K disku Mini-FLOTAC dále náleží klíč k otočení disku, a adaptér pro mikroskop (Cringoli et al. 2017).

Vyšetření za pomoci tohoto zařízení umožňuje maximální zvětšení 400x (Barda et al. 2013). Toto zvětšení je nutné pro detekci a diagnostiku střevních prvoků, či larev různých druhů plicních červů. Tato metoda se skládá ze čtyř po sobě jdoucích kroků: odběr a vážení vzorku,

homogenizace vzorku, filtrace a plnění komůrek (Cringoli et al. 2017). Počet vajíček přečtených z čtecích disků po deseti minutách flotace se násobí faktorem 5x, aby spočítané množství vajíček bylo v jednotkách EPG (Shifaw et al. 2021).

Součástí soupravy Mini-FLOTAC je také Fill-FLOTAC, plastové zařízení sloužící k homogenizaci, filtraci a nalití vzorku přímo do flotačních komůrek (Cringoli et al. 2010). Toto zařízení se skládá z nádoby, sběrače a filtru. Po důkladném omytí jsou obě tato zařízení opakovaně použitelná (autoři uvádějí až padesátkrát), což snižuje náklady na jeden analyzovaný vzorek trusu (Cringoli et al. 2017). Při využití obou těchto zařízení dochází k práci v „uzavřeném systému“, který zaručuje bezpečnost obsluhy, jelikož minimalizuje riziko vystavení potenciálně infekčnímu materiálu či potenciálně toxickým fixačním prostředkům (Barda et al. 2013). Fill-FLOTAC umožňuje odběr a analýzu čerstvých vzorků trusu, ale také nabízí možnost přidání fixačního činidla, takže vzorky lze přenést a skladovat až do doby vyšetření (Cringoli et al. 2017).

Diagnostika jednoho vzorku pomocí MF trvá přibližně 12 minut (Barda et al. 2013; Cringoli et al. 2017), což jí dělá časově náročnější oproti jiným kopromikroskopickým technikám, které jsou však méně citlivé, přesné a precizní než Mini-FLOTAC. Uváděný čas u metody McMaster ke zpracování jednoho vzorku je poloviční oproti metodě MF (Noel et al. 2017; Daş et al. 2020). Důvodem je například, že zkoumaná čtecí plocha u MF je mnohem větší, než čtecí plocha u McMasterovy komůrky (Daş et al. 2020).

Pro tuto metodu je typické využití dvou typů flotačního roztoku, v závislosti na tom, jaký typ parazita chceme detekovat při použití této metody (Barda et al. 2013). Ve studii El-Nadi et al. (2019) byli helminti přesněji detekováni při použití solného roztoku o hustotě 1,20, zatímco stádia prvoků byla lépe diagnostikována pomocí roztoku síranu zinečnatého o hustotě 1,35. Výhodou solného roztoku je zejména, že je levný a relativně snadno dostupný. Roztok ze síranu zinečnatého je hůře dostupný, zejména v prostředích s omezenými zdroji. Barda et al. (2013), srovnávajíc metody McMaster, Kato-Katz a Mini-FLOTAC u *H. nana* a *A. lumbricoides*, popisují citlivost až 10 EPG pro solný roztok, a 12,5 EPG pro roztok síranu zinečnatého.

Dosavadní zkušenosti naznačují, že použití čerstvých výkalů poskytuje nejpresnější výsledky. Při nutnosti konzervace se pak jeví jako nejvhodnější fixace výkalů 5% formalínem (Cringoli et al. 2017).

Výhodou této metody je, že díky absenci kroku centrifugace je snadno přenosná či dokonce proveditelná přímo v terénu (Cringoli et al. 2010, 2017; Barda et al. 2013). Tyto logistické výhody usnadňují práci v terénu v odlehlých oblastech, kde laboratoře mohou být daleko od míst sběru (Cringoli et al. 2017).

Řada studií byla provedena ke srovnání technik Mini-FLOTAC a McMaster. Noel et al. (2017) vyhodnotili, že přesnost i preciznost techniky McMaster byla nižší než u Mini-FLOTAC. Oproti tomu Daş et al. (2020) tvrdí, že metoda McMaster je rychlejší a relativně přesnější než Mini-FLOTAC, avšak je méně citlivá, obzvláště při nízkých hodnotách EPG. Shifaw et al. (2021) popsali až čtyřikrát delší dobu vyšetření vzorku metodou Mini-FLOTAC

oproti metodě McMaster, avšak i v této studii byla vyhodnocena metoda MF jako citlivější i při velmi nízkých hodnotách EPG.

U kočičích výkalů byl Mini-FLOTAC v diagnostice *Toxoplasmy gondii* (Nicolle et Manceaux, 1908) citlivější než metoda Kova slide (Djokic et al. 2014). Více vajíček bylo také spočítáno při využití MF než u metody Kato-Katz, která není doporučována pro hodnocení intenzity infekce *H. nana* (Barda et al. 2013). Metoda Kato-Katz také není doporučována pro diagnostiku larev helmintů. Metoda McMaster je schopná detekce střevních prvoků i larev helmintů, avšak nebývá doporučována jako metoda první volby pro jejich diagnostiku, z důvodu poskytování výsledků s velkou mírou variability (Borrelli et al. 2015). Přesnost a správnost této metody se však zlepšuje se zvyšujícím se množstvím vylučovaných parazitárních propagačních útvarů (Levecke et al. 2012).

Mini-FLOTAC je univerzální metodou, která je schopna diagnostikovat vajíčka i larvy helmintů, oocysty prvoků i kvasinky (Borrelli et al. 2015). Mini-FLOTAC byl vyhodnocen také jako velmi dobrý pro detekci konkrétních druhů helmintů, např. *H. nana* či *Ascaris lumbricoides* (Linnaeus, 1758) (Cringoli et al. 2017).

Barda et al. (2013) také popisuje vysokou citlivost MF pro detekci *H. nana* ve srovnání s metodami McMaster či Kato-Katz, zejména při použití solného roztoku. Technika Mini-FLOTAC se doporučuje k diagnostice parazitů zejména tam, kde je očekávané nízké EPG, díky čemuž se můžeme vyhnout falešně pozitivním výsledkům (Dias de Castro et al. 2017). Ze studií: Godber et al. (2015); Dias de Castro et al. (2017); Paras et al. (2018); Amadesi et al. (2020) vyplývá, že MF je citlivější než McMasterova metoda u přirozeně infikovaných vzorků. Hlavním omezením této metody, stejně jako u všech kopromikroskopických technik založených na flotaci, je volba fixačního činidla, použitého pro konzervaci výkalů, doba konzervace výkalů před analýzou i samotný výběr flotačního roztoku (Barda et al. 2013). Volba flotačního roztoku může přímo ovlivnit množství detekovaných vajíček parazitů, v důsledku jejich rozdílné specifické hmotnosti a rozdílné hustotě roztoků (Norris et al. 2018; Daş et al. 2020).

Mimo již výše zmíněné, se autoři věnovali testování metody Mini-FLOTAC u řady dalších živočišných druhů, například u: ptáků (Borrelli et al. 2015; Daş et al. 2020), ovcí (Kenyon et al. 2016), koček (Djokic et al. 2014), skotu (Malrait et al. 2015) nebo bizonů (Johnson et al. 2022).

3.3.3 Diagnostické metody u hlodavců

V rámci psaní této literární rešerše se mi nepodařilo nalézt mnoho studií, které by testovaly účinnost konkrétních diagnostických metod u hlodavců, zejména u potkana či krysy obecné. Duthaler et al. (2010) se věnovali srovnání sedimentační metody s metodou FLOTAC u potkanů experimentálně infikovaných motolicí *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758). Autor uvádí, že sedimentační metody, metoda Kato-Katz nebo formalin-etherová koncentrační metoda jsou poměrně citlivé u středních a silných infekcí *F. hepatica*, avšak citlivost je nízká při slabých infekcích. Jejich výsledky prokázaly vyšší citlivost metody FLOTAC ve srovnání se sedimentací pro detekci *F. hepatica* ze vzorků výkalů.

Jak již bylo zmíněno v předchozí části práce, Sousa et al. (2016) se zabývali „Grahamovou metodou“ lepící pásky k detekci vajíček *Syphacia sp.* Autoři popisují, že právě kvůli tomu, že velice málo vajíček se vyloučí s výkaly hlodavce, jsou metody zaměřené na sběr a rozbor výkalů málo účinné pro detekci tohoto druhu a mohou infekci *Syphacia* významně podhodnotit. I při použití lepící pásky k obtisku perianální oblasti hlodavce existuje řada faktorů, které mohou ovlivnit diagnostiku syphacií, např. četnost produkce vajíček, zatížení helminty uvnitř GIT, pohlaví a věk hlodavců i samotné technické provedení testu (Taffs 1976; Hill et al. 2009).

Šnábel et al. (2014) se zabývali molekulárními metodami k osekvenování DNA *Heterakis spumosa*, typického pro krysy a potkany rodu *Rattus*. Autoři tento druh odlišili od příbuzných druhů na základě sekvence části mtDNA.

Diagnostikou motolic u volně žijících hlodavců se zabývali Catalano et al. (2019), kteří srovnávali výsledky pitev gastrointestinálních traktů, koprologické vyšetření metodou Mini-FLOTAC a molekulární analýzy k ověření validity metody Mini-FLOTAC k prokázání volně žijících hlodavců jako rezervoárů zoonotických i nezoontických motolic. Na základě získaných výsledků metodu Mini-FLOTAC doporučují k budoucí neinvazivní diagnostice parazitóz u hlodavců.

Carrera-Játiva et al. (2023) byli doposud prvními, kteří zkoumali použití metody Mini-FLOTAC pro diagnostiku GI helmintů u hlodavců. Jejich výsledky popisují, že citlivost této metody dosahuje až 90 % ve srovnání s jinými koprologickými metodami, jako například pomocí metody „koncentrace formol-etherem“, která dosáhla 60% citlivosti.

4 Metodika

4.1 Původ použitých vzorků

Všichni zástupci rodu *Rattus*, konkrétně *Rattus rattus* a *Rattus norvegicus*, jejichž koprologické vzorky byly využity v mé práci, byli získáni zejména ze zemědělských oblastí ve Středočeském kraji. Jedinci byli odchytáváni od ledna roku 2019 až do září 2023. Nejvyšší počet vzorků pocházel z oblasti Vyšíněk. Jedinci dále byli odchytáváni v oblastech: Buštěhrad, Hodkovice, Lotouš, Plchov, Slaný a Třebíz. Několik jedinců bylo také odchyceno v městském prostředí: Praha – Nusle.

Hostitelé byli získáni od zaměstnanců VÚRV v městské části Praha - Ruzyně, kteří je na výše uvedených lokalitách usmrcují za účelem objasnění vývoje rezistence rodu *Rattus* k aktuálně používaným rodenticidům. Pro jejich výzkum byly z každého jedince využity pouze tkáně z konce ocasu a zbytek kadaveru včetně kompletního zažívacího traktu zůstal neporušený. Jedinci byli vloženi do individuálních plastových pytlíčků, označeni identifikačními údaji, které se shodovaly s papírovým záznamem a zamrazeni až do dne jejich dalšího zkoumání.

Takto zpracovaní jedinci byli převzati parazitologickou laboratoří FAPPZ a mimo jiné využití pro výzkum v rámci mé diplomové práce. Měla jsem k dispozici celkem 108 vzorků, z nichž 98 pocházelo od krys *Rattus rattus* a zbylých 18 vzorků pocházelo od potkanů *Rattus norvegicus*. Z nich bylo identifikováno 45 samic a 62 samců. U jednoho jedince pohlaví zůstalo neurčené, z důvodu přítomnosti pouze torsa.

Všichni jedinci byli vypitváni a jejich orgány, konkrétně plíce, ledviny, játra a gastrointestinální trakty byly odděleny pro další vědecké účely. Zadní části trávicích traktů s formovanými výkaly jsem pro výzkum následně převzala já, k provedení koprodiagnostické metody Mini-FLOTAC.

4.2 Standartizace metody MF pomocí uměle inokulovaných vzorků

Spolehlivost metody Mini-FLOTAC pro detekci gastrointestinálních helmintů u rodu *Rattus* byla hodnocena u přirozeně i uměle infikovaných vzorků výkalů. Jelikož není technicky možné ověřit přesnost testované metody u přirozeně infikovaných vzorků, bylo nejprve provedeno testování u vzorků uměle infikovaných vajíčky *Hymenolepis diminuta* (viz Obr. 3).

Vajíčka *Hymenolepis diminuta* byla získána od experimentálně infikovaných laboratorních potkanů a izolována za pomoci koncentrační metody Cornell-Wisconsin. U takto získaných vajíček byly následně stanoveny koncentrace pro EPG 10, 100 a 1000.

Negativní vzorky výkalů byly získané od laboratorních potkanů z jiného chovu v rámci ČZU, a absence vajíček (0 EPG) byla ověřena pomocí Cornell-Wisconsinovy metody.

K negativním vzorkům potkaních výkalů byla přidána získaná vajíčka ve stanovených koncentracích a následně byla provedena metoda Mini-FLOTAC k vyšetření těchto vzorků pro každou stanovenou koncentraci EPG, vždy po deseti opakováních, aby byla ověřena citlivost, a přesnost metody MF při různých intenzitách infekce (bližší popis metody v kapitole 4.3).



Obr. 3: Vajíčko *H. diminuta* při zvětšení 20x (Autor: Vlastní fotografie)

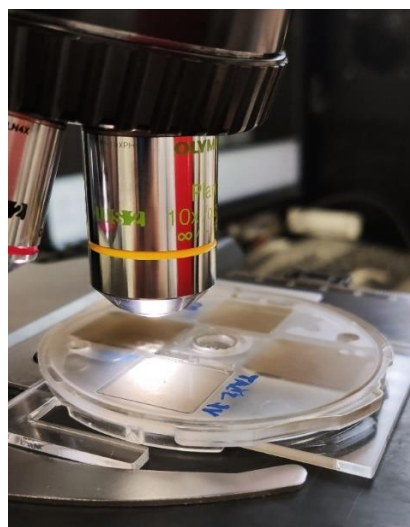
4.3 Ověření úspěšnosti a přesnosti metody MF u vzorků z přirozeně infikovaných hostitelů

Prvním krokem v přípravě vzorku bylo rozstříhnutí tkáně střeva a následné oddělení veškerého obsahu terminální části tlustého střeva a konečníku peánem. V případě nedostatečného množství fekálního materiálu byl testovaný jedinec vyřazen z experimentu.

K vyšetření vzorků pomocí metody Mini-FLOTAC byl použit modifikovaný postup dle Cringoli et al. (2017):

Získaný fekální materiál byl zvážen a přidán do třecí misky, kde bylo odměřeno množství flotačního roztoku v poměru 1 g výkalu : 9 ml flotačního roztoku. Z důvodu velmi nízkých hmotností navážených vzorků bylo upuštěno od použití aparátu Fill-FLOTAC.

Směs byla manuálně homogenizována tloučkem a scezena přes čajové sítko do kádinky, odkud byla napipetována po 1 ml do každé ze dvou komůrek zařízení Mini-FLOTAC. Po deseti minutách byl klíčem otočen disk Mini-FLOTAC a vrchní vrstva čtecích komůrek byla prohlížena pod mikroskopem při zvětšení 10x (viz Obr. 4). Vajíčka byla spočítána a následně vynásobena koeficientem 5.



Obr.4: Mikroskopické vyšetření komůrky Mini-FLOTAC při zvětšení 10x (Autor: Vlastní fotografie)

4.4 Statistické zpracování dat

Data byla zpracována v programech Microsoft Excel a Statistica 12. Data získaná v pokusu s uměle inokulovanými vzorky byla shrnuta do tabulek (viz Příloha I).

Získané hodnoty pro každou kategorii EPG byly převedeny pomocí Arcsinové transformace (viz Příloha), aby byly splněny předpoklady pro provedení parametrického testu - jednofaktorové ANOVA analýzy. Pro podrobnější vyhodnocení byl zvolen Scheffeho test.

Data získaná z testování přirozeně infikovaných vzorků byla zaznamenávána do tabulek Microsoft Excel. Data získaná koprologickou analýzou byla porovnávána s daty o přítomnosti gastrointestinálních parazitů zjištěných během pitev příslušných hostitelů (blíže viz. výsledky diplomové práce Bc. Věry Kratochvílové, FAPPZ ČZU v Praze, 2024). Úspěšnost metody Mini-FLOTAC byla posuzována analýzou shody přítomnosti dospělých helmintů v gastrointestinálním traktu s nálezem vajíček stejného druhu helminta v koprologickém rozboru. Přesnost metody Mini-FLOTAC byla posuzována pomocí regresní a korelační analýzy.

5 Výsledky

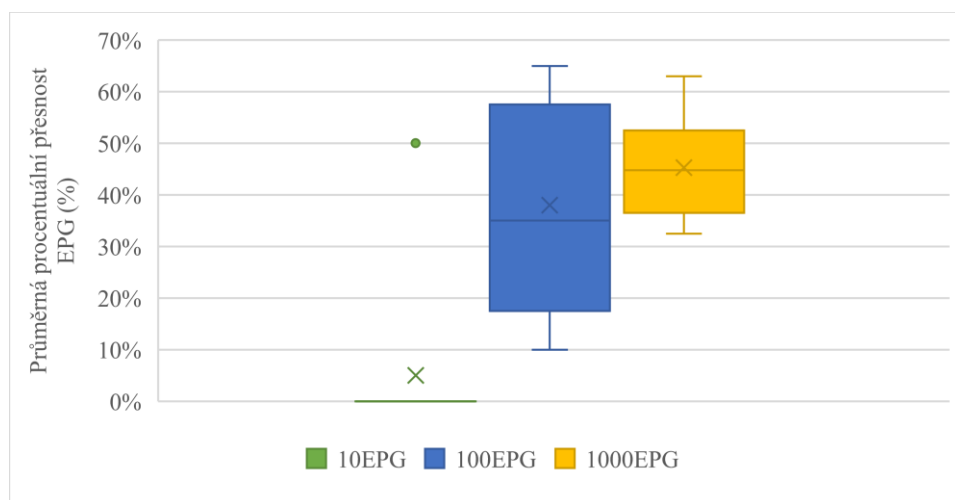
5.1 Standartizace metody MF pomocí uměle inokulovaných vzorků

Pro každou testovanou kategorii EPG byly spočítány hodnoty průměrného EPG a z nich spočítány směrodatné odchylky. Pro každou hodnotu byl výsledek vyjádřen v procentech a následně vypočítána průměrná procentuální přesnost pro každou kategorii EPG, a z procentuálních hodnot byla vypočítána směrodatná odchylka (viz Tab. 1).

Tab. 1: Souhrnná tabulka vypočítaných hodnot pro testované hodnoty EPG 10, 100, 1000.

Hodnota EPG	Průměrná hodnota EPG	Směrodatná odchylka	Průměrná procentuální přesnost EPG (%)	Procentuální směrodatná odchylka
10	0.5	1.58	5	0.16
100	38	21.24	38	0.21
1000	452.5	95.55	45.25	0.10

Byl sestaven boxplot (viz Obr. 5) z hodnot procentuální přesnosti, ke srovnání tří testovaných kategorií EPG. Nejvyšší variabilita hodnot byla pozorována u kategorie 100 EPG, kde směrodatná odchylka dosahovala hodnoty 0,21. V kategorii 1000 EPG směrodatná odchylka dosáhla hodnoty 0,1, poukazující na menší míru variability výsledků. Z těchto hodnot může být usouzeno, že s vyšší hodnotou variability naměřených výsledků klesá míra preciznosti měření, neboli reprodukovatelnost výsledků, pomocí metody Mini-FLOTAC.



Obr. 5: Boxplot srovnávající procentuální přesnost 3 kategorií hodnot EPG vajíček *Hymenolepis diminuta*, kde krabicové části grafu označují 68,2% všech dat jednotlivých souborů. Mezi svorkami se nachází 95% všech dat jednotlivých souborů. Průměrná hodnota je značena symbolem x. Může být pozorována jedna odlehlá hodnota v kategorii 10 EPG.

Před samotným testováním přesnosti metody Mini-FLOTAC, tedy srovnání přidaného EPG k získanému EPG, byly získané hodnoty převedeny pomocí Arcsinové transformace, pro splnění předpokladu pro provedení jednofaktorové ANOVA analýzy. Následně byla provedena ANOVA analýza s hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ (viz Tab. 2).

Tab. 2: ANOVA test k otestování přesnosti metody Mini-FLOTAC.

Jednorozměrné testy významnosti pro Procentuální přesnost (Tabulka1)						
Sigma-omezená parametrizace						
Dekompozice efektivní hypotézy						
Efekt	SC	Stupně volnosti	PC	F	p	
Abs. člen	2.852119	1	2.852119	90.87904	0.000000	
EPG	1.008877	2	0.504439	16.07328	0.000025	
Chyba	0.847359	27	0.031384			

Provedením ANOVA analýzy byla získaná hodnota $p < 0,05$, existují tedy statisticky významné rozdíly v přesnosti při předem známých hodnotách EPG. K další analýze byl vybrán Scheffeho test (viz Tab. 3).

Tab. 3: Scheffeho test k porovnání přesnosti u jednotlivých kategorií EPG.

Scheffeho test; proměnná Procentuální přesnost (Tabulka1)					
Pravděpodobnosti pro post-hoc testy					
Chyba: meziskup. PC = .03138, sv = 27.000					
C. bunky	EPG	{1}	{2}	{3}	
		.05236	.40025	.47240	
1	10		0.000692	0.000066	
2	100	0.000692		0.664708	
3	1000	0.000066	0.664708		

Přesnost metody Mini-FLOTAC je při definované hodnotě 10 EPG signifikantně nižší než při hodnotách 100 a 1000 EPG.

5.2 Ověření úspěšnosti a přesnosti metody MF u vzorků z přirozeně infikovaných hostitelů

5.2.1 Úspěšnost

Ze získaných dat mého testování metody Mini-FLOTAC byla pro každý druh gastrointestinálního helminta vyjádřena procentuální „úspěšnost“ metody ve srovnání s daty z pitvy gastrointestinálních traktů (viz Tab. 4). Následně byly vyhodnoceny falešně pozitivní a falešně negativní výsledky koprologie (viz Tab. 5 a Tab. 6).

Tab. 4: Souhrnná tabulka shod = „úspěšnost“ pro jednotlivé druhy nalezených gastrointestinálních helmintů.

<i>Helmint</i>	Celkový počet hostitelů s tímto druhem parazita	Počet shodujících se vzorků koprologie	„Úspěšnost“ (%)
<i>Trichuris muris</i>	2	2	100
<i>Aspicularis tetraptera</i>	8	5	63
<i>Hymenolepis spp.</i>	41	26	63
<i>Heterakis spumosa</i>	9	5	56
<i>Syphacia spp.</i>	19	8	42

Tab. 5: Falešně pozitivní výsledky koprologie.

<i>Helmint</i>	Celkový počet pozitivních výsledků koprologie	Pozitivní koprologie při negativní pitvě	Falešně pozitivní výsledky koprologie (%)
<i>Heterakis spumosa</i>	6	1	17
<i>Hymenolepis spp.</i>	36	9	25
<i>Syphacia spp.</i>	22	14	64
<i>Aspicularis tetraptera</i>	16	11	69
<i>Trichuris muris</i>	7	5	71

Tab. 6: Falešně negativní výsledky koprologie.

<i>Helmint</i>	Celkový počet hostitelů s tímto druhem parazita	Negativní koprologie při pozitivní pitvě	Falešně negativní výsledky koprologie (%)
<i>Trichuris muris</i>	0	0	0
<i>Hymenolepis spp.</i>	41	14	34
<i>Aspicularis tetraptera</i>	8	3	38
<i>Heterakis spumosa</i>	9	4	44
<i>Syphacia spp.</i>	19	11	58

Pro nalezené druhy helmintů byla sestavena souhrnná tabulka (viz Tab 7.), zobrazující jejich pořadí v procentuální „úspěšnosti“, v zastoupení falešně pozitivních (% FP) a falešně negativních vzorků (% FN), kde 1 = nejlepší výsledek pro danou kategorii a 5 = nejhorší výsledek pro danou kategorii. Je žádoucí, aby se druhy umístily co „nejlépe“ v kategorii procentuální „úspěšnosti“, ale co nejhůře v zastoupení falešně pozitivních i falešně negativních

vzorků. Z těchto tří hodnot bylo vypočítána průměrná „známka“, poukazující na úspěšnost mého měření pomocí Mini-FLOTAC k detekci jednotlivých druhů parazitů.

Tab. 7: Souhrnná tabulka pořadí jednotlivých druhů, kde FP (%) = falešně pozitivní nález, FN (%) = falešně negativní nález

Helmint	"úspěšnost" (%)	FP (%)	FN (%)	Výsledná "známka"
<i>Trichuris muris</i>	1	5	1	2
<i>Hymenolepis spp.</i>	3	2	2	2
<i>Aspicularis tetraptera</i>	2	4	3	3
<i>Heterakis spumosa</i>	4	1	4	3
<i>Syphacia spp.</i>	5	3	5	4

5.2.2 Přesnost

Z výsledků koprologie pomocí metody Mini-FLOTAC a dat získaných z pitev gastrointestinálních traktů byla provedena regresní a korelační analýza pro jednotlivé druhy nalezených helmintů (viz Tab. 8).

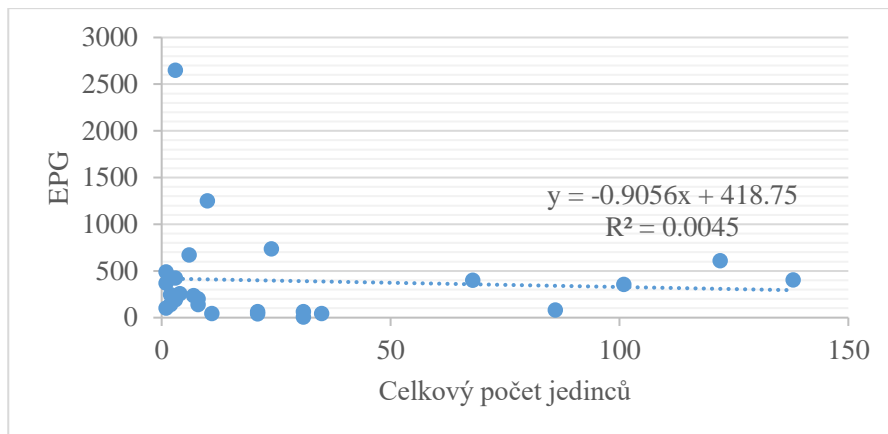
U *Hymenolepis spp.* hodnota korelačního koeficientu dosáhla -0,067. Koeficient determinace (R^2) (viz Obr. 6) pro *Hymenolepis spp.* dosahuje hodnoty 0,00, což znamená, že hodnota EPG není vysvětlena množstvím jedinců nalezených při pitvě.

U druhu *Trichuris muris* (n=2) nebylo možné analýzu provést. Statisticky průkazné výsledky byly pozorovány u *Aspicularis tetraptera*, kde korelační koeficient pro všechny jedince = 0,991 a pro samice s vajíčky = 0,992, což představuje silnou závislost mezi počtem nalezených dospělců a hodnotou EPG. Koeficient determinace pro tento druh (viz Obr. 7) je 0,98. To znamená, že hodnota EPG je z 98 % vysvětlena množstvím jedinců nalezených při pitvě.

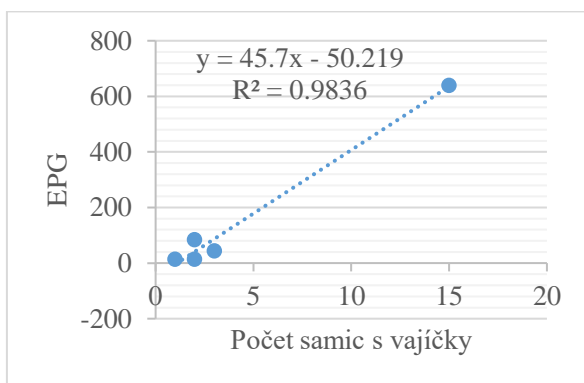
Středně silná závislost mezi počtem dospělých jedinců a hodnotou EPG může být pozorována u druhu *Heterakis spumosa*, kde hodnota korelačního koeficientu = 0,736. Pro samice s vajíčky pak tato hodnota vychází = 0,794. Koeficient determinace pro tento druh dosahuje 0,63 (viz Obr. 8). Limitací u obou těchto druhů je však nízký počet vzorků (n=5), který analýzu významně zkresluje.

Helmint	R (Celkový počet jedinců/EPG)	R (Samice s vajíčky/EPG)
<i>Hymenolepis spp.</i>	-0.067	x
<i>Aspicularis tetraptera</i>	0.991	0.992
<i>Syphacia spp.</i>	0.381	0.104
<i>Heterakis spumosa</i>	0.736	0.794

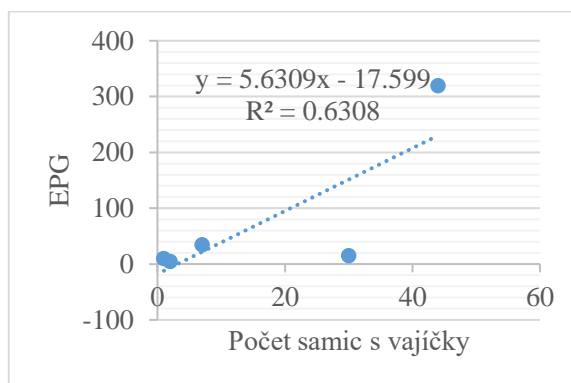
Tab. 8: Tabulka korelačních koeficientů (R) pro jednotlivé druhy; *Rod *Trichuris* nebylo možné statisticky vyhodnotit.



Obr. 6: Regresní analýza závislosti naměřeného EPG na celkovém počtu nalezených jedinců pro *Hymenolepis* spp.



Obr. 7: Regresní analýza závislosti naměřeného EPG na počtu nalezených samic s vajíčky pro druh *A. tetraptera*



Obr. 8: Regresní analýza závislosti naměřeného EPG na počtu nalezených samic s vajíčky pro druh *H. spumosa*

6 Diskuze

Cílem diplomové práce bylo ověřit vhodnost (správnost, přesnost, citlivost a spolehlivost) koprologické metody Mini-FLOTAC pro diagnostiku gastrointestinálních helmintóz u hlodavců rodu *Rattus* žijících na území České republiky.

K naplnění cíle práce byly stanoveny dvě hypotézy. První část experimentu, provedena na uměle inokulovaných vzorcích, byla zaměřena na ověření hypotézy 1, která říká, že „Koprologické vyšetření metodou Mini-FLOTAC poskytuje při stanovení EPG gastrointestinálních helmintů hlodavců relevantní výsledky, tzn. Intenzita infekce *Hymenolepis diminuta* zjištěná výše uvedenou metodou odpovídá reálnému počtu vajíček ve výkalech hostitele“.

V této části experimentu bylo metodou Mini-FLOTAC otestováno celkem 30 vzorků, se třemi koncentracemi EPG: 10, 100 a 1000 EPG, každý po deseti vzorcích. Průměrná procentuální přesnost pro EPG 1000 byla: 45 %, pro 100 EPG: 38 % a pro 10 EPG: 5 %.

Provedením Scheffeho testu byly zjištěny statisticky významné rozdíly v přesnosti metody Mini-FLOTAC mezi srovnávanými hodnotami EPG. Přesnost metody v mém provedení pokusu byla při definované hodnotě 10 EPG signifikantně nižší, než při hodnotách 100 a 1000 EPG. Výsledné hodnoty EPG nedosahovaly ani k padesáti procentům reálné hodnoty přidaných vajíček. Jelikož jsem při mém testování 10 EPG dosahovala velice nízkých hodnot, nebylo relevantní provádět testování s nižší hodnotou, např. 1 EPG.

Mé výsledky korespondují se zjištěními autorů Assefa et al. (2014) a Bosco et al. (2023), kteří popisují, že při nízké míře infekce citlivost metody Mini-FLOTAC významně klesá. Bosco et al. (2023) ve svých výzkumech motolic u přežvýkavců uvádějí, že nejvyšší procento získaných vajíček při vyšetření metodou Mini-FLOTAC u EPG 10, 50 a 100 dosáhli při definované hodnotě 100 EPG. Autoři naopak uvedli, že při grafické estimaci citlivosti metody dosahovala metoda MF nejnižších hodnot u EPG 15 a méně ve srovnání s jinými diagnostickými metodami. I při mém testování definovaných hodnot EPG 10, 100 a 1000 bylo nejpřesnějších výsledků dosaženo v nejvyšší definované kategorii EPG, ale přesto byly dosažené výsledky významně podhodnoceny.

Tato zjištění však odporují výsledkům Dias de Castro et al. (2017), kteří metodu Mini-FLOTAC doporučují k diagnostice parazitů pro vzorky, kde může být očekávána i velice nízká hodnota EPG. I další autoři (Barda et al. 2013; Cringoli et al. 2017) uvádějí, že metoda Mini-FLOTAC je citlivá k detekci parazitárních propagačních útvarů již při koncentraci 5 EPG.

Dle Cringoli et al. (2017), použití čerstvých výkalů pro diagnostiku metodou Mini-FLOTAC poskytuje nejpřesnější výsledky za nejvyšší citlivosti metody. V tomto případě nemohu sníženou citlivost metody připisovat stavu vzorků ani přidaných vajíček, jelikož jsem v této části experimentu pracovala s čerstvými vzorky a vajíčka byla extrahována těsně před přimícháním do negativního vzorku, docházelo tedy k minimálnímu porušení materiálu před jeho použitím. Cringoli et al. (2004) uvedli, že k podhodnocení přesnosti metody může dojít již při samotné extrakci vajíček a inokulaci negativního vzorku, kdy může dojít ke ztrátám transferovaných vajíček. K zabránění této skutečnosti byla extrahovaná vajíčka opakovaně

přepočítána pro ověření počtu vajíček v připraveném roztoku a vajíčka byla předem promíchána k zamezení sedimentace na dno kádinky a nepřesného nabrání pipetou, před samotným přimícháním do negativního vzorku.

Jelikož jsem se v mém experimentu nezabývala srovnáváním jednotlivých diagnostických metod, nemohu svá data k tomuto účelu využít. Avšak ze získaných hodnot, kdy při stanovené hodnotě 10 EPG bylo při deseti opakováních celkem získáno pouze 1% vajíček, si dovolím hodnotit, že při takto nízké míře infekce nemusí být metoda Mini-FLOTAC nejspolehlivější pro detekci vajíček *Hymenolepis sp.* u rodu *Rattus*.

V druhé části práce jsem se zaměřila na testování úspěšnosti a přesnosti metody Mini-FLOTAC k ověření Hypotézy 2, která říká: „Diverzita propagačních útvarů detekovaných metodou Mini-FLOTAC relevantně odráží druhové spektrum a početnost helmintů přítomných v GI traktu volně žijících hlodavců“.

V druhé části práce bylo celkem vyšetřeno 98 vzorků. Zbylých deset jedinců z celkového počtu 108 nebylo možné vyšetřit, kvůli nedostatečnému množství koprologického materiálu v trávicím traktu. Při vyšetření byla počítána a zahrnuta jen jednoznačně identifikovatelná vajíčka, což představovalo významný problém, kvůli různorodé průhlednosti vzorku, přítomnosti vzduchových bublin, ale také pseudoparazitů a různému stavu propagačních útvarů reálných parazitů. V některých vzorcích byly propagační útvary významně porušené, popřípadě mohly být viděny pozůstatky obalů, které se však nedaly považovat za plnohodnotná vajíčka. To mohlo být ovlivněno tím, že až do doby použití byly vzorky uchovávány v zamraženém stavu, a zamražení a následné rozmražení mohlo porušit buněčné struktury propagačních útvarů helmintů.

Barda et al. (2015) a Cringoli et al. (2017) doporučují vzorek výkalu konzervovat v 5% formalinu v poměru 1:1 v případech, kdy není možné ihned vyšetřit vzorek čerstvě získaný. Autoři uvádějí, že u takto konzervovaného vzorku bude citlivost vyšetření metodou Mini-FLOTAC nezměněna po několik týdnů až měsíc. Catalano et al. (2019) však popsali, že citlivost diagnostiky nebyla narušena ani po době delší než jeden měsíc při konzervaci ve zmíněné koncentraci formalinu.

Ze všech vyšetřených vzorků bylo pozitivních 57 na alespoň jeden druh gastrointestinálního helminta. Byly identifikovány druhy *Aspicularis tetraptera*, *Heterakis spumosa*, *Trichuris muris*, jedinci rodu *Syphacia* a tasemnice rodu *Hymenolepis*. Z těchto vzorků pozitivních při vyšetření metodou Mini-FLOTAC se shodovalo 46 vzorků s pozitivními výsledky z pitvy. Procentuální úspěšnost metody Mini-FLOTAC byla počítána pro každého detekovaného parazita zvlášť. Stoprocentní úspěšnosti shody bylo dosaženo u rodu *T. muris*, avšak celkový počet čítal pouze 2 vzorky, proto tento výsledek není příliš relevantní. Nejvíce zastoupenými byly tasemnice rodu *Hymenolepis*, u kterých došlo ke shodě s výsledky z pitvy ve 26 vzorcích, přesto bylo dosaženo jen 63 % úspěšnosti. Například Barda et al. (2013) a Cringoli et al. (2017) popsali, že aparát Mini-FLOTAC je obzvláště citlivý pro detekci těchto tasemnic.

Nejvíce falešně pozitivních nálezů bylo u druhů *T. muris* (71 %) a *A. tetraptera* (69 %). Možným důvodem pro nalezení propagačních útvarů v koprologickém vzorku bez přítomnosti

dospělého parazita v GIT může být například vyloučení vajíček parazitem a jeho následnou migrací do jiné části těla hlodavce. Z druhů parazitů detekovaných v mém experimentu však nebyl u žádného popsán vývojový cyklus, který by migraci po těle zahrnoval. Z tohoto důvodu může situaci lépe vysvětlit skutečnost, že stejně jako u jiných hlodavců se i u potkanů a krysu rodu *Rattus* může vyskytnout kanibalismus (Moreira et al. 2013), který by zapříčinil pasáž propagačních útvarů některých parazitů výkaly, aniž by došlo k zahájení vývojového cyklu parazita uvnitř těla hlodavce. K pasáži propagačních útvarů helmintů však může dojít i po samotném pozření propagačních útvarů, které doposud nejsou infekceschopné, například s potravou, a k jejich dalšímu vývoji dochází znovu až po průchodu gastrointestinálního traktu hlodavce.

Nejvíce falešně negativních nálezů bylo u rodu *Syphacia*, kde z celkového počtu 19 hostitelů s tímto parazitem byly výsledky koprologie negativní u jedenácti z nich. Tento výsledek by se však dal považovat za biologicky správný, jak již bylo zmíněno v kapitole 3.2.3.1., protože většina vajíček, které oplozená samice vyloučí, může být nalezena v perianální oblasti potkana či krysy a jen zlomek z celkového počtu se vyloučí s výkaly jedince. Vyšetření metodou Mini-FLOTAC tedy s větší pravděpodobností může podhodnotit míru infekce tímto parazitem (Sousa et al. 2016). Mé výsledky korespondují se zjištěními Carrera-Játiva et al. (2023) kteří popsali nízkou citlivost metody Mini-FLOTAC pro vajíčka *Syphacia sp.* Tato zjištění souhlasí i s nižším procentem falešně negativních vzorků pro druh *A. tetraptera* (38 %), u kterého dochází k vylučování vajíček s výkaly a je zde tedy vyšší pravděpodobnost, že vajíčka budou nalezena při koprologickém vyšetření.

K omezení falešně negativních výsledků je autory (Knopp et al. 2009; Carrera-Játiva et al. 2023) doporučováno provádět alespoň tři opakování pro každého vyšetřovaného jedince, čímž lze kompenzovat i nižší míru citlivosti vybrané metody. K zajištění co nejpřesnější diagnózy je autory současně doporučováno odebrat co největší vzorek a důkladně ho homogenizovat, jelikož propagační útvary parazitů zpravidla nebývají rovnoměrně rozloženy ve vzorku výkalu, naopak se shlukují (Engels et al. 1997; Torgerson et al. 2012; Cringoli et al. 2017). Při koprologickém vyšetření výkalu hlodavce tento poznatek představuje určitou výhodu, jelikož při jeho vyšetření dochází zpravidla ke zpracování celého vzorku, na rozdíl od vyšetření vzorku skotu či koně domácího. Představuje to však i určité omezení, protože při využití celého vzorku je zamezeno opakovatelnosti vyšetření.

K finálnímu zhodnocení úspěšnosti mého měření metodou Mini-FLOTAC byla sestavena souhrnná tabulka pro jednotlivé druhy helmintů. I tyto výsledky však mají určitou míru zkreslení, kvůli odlišnému počtu nalezených parazitů daného druhu ve vzorcích, a současně odlišným vývojovým cyklům. Nejlépe na této stupnici se umístily druhy *Trichuris muris* a *Hymenolepis spp.*, které se však značně lišily v počtu detekovaných útvarů a počtu shodných výsledků. Rod *Syphacia* se sice umístil na posledním místě v hodnocení, ale s ohledem na vývojový cyklus je to očekávaný výsledek, protože vajíčka této hlístice primárně nehledáme v koprologických vzorcích.

K ověření přesnosti metody byla vypracována korelační analýza pro detekované druhy helmintů samostatně, s ohledem na jejich rozdílnou biologii. V analýze byla data získaná

z pitev GIT korelována s daty koprologického vyšetření metodou Mini-FLOTAC. Získané výsledky korelace byly značně variabilní mezi druhy.

Variabilní výsledky přesnosti této metody byly získány také u předchozích autorů (Barda et al. 2014; Noel et al. 2017; Dias de Castro et al. 2017; Paras et al. 2018; Nápravníková et al. 2019), kteří však srovnávali dvě až tři koprologické metody mezi sebou u různých druhů hostitelských zvířat.

Nejvyšší závislost mezi počtem dospělých samic helmintů v GIT a množstvím nalezených vajíček ve vzorku výkalu byla u druhů *A. tetraptera* (0,992) a *H. spumosa* (0,794). Slabá závislost (0,381) mezi počtem dospělých helmintů a množstvím nalezených vajíček zjištěna u *Syphacia spp.* je však pozoruhodným výsledkem, při srovnání s nižším získaným korelačním koeficientem pro samice s vajíčky a množstvím nalezených vajíček (0,104). To by mohlo být vysvětleno charakteristickou vlastností *Syphacia sp.*, kdy dochází k jednorázovému uvolnění vysokého množství vajíček, která se hromadí na perianální oblasti hostitele, s následným úhynem dospělých samic (Sousa et al. 2016).

Catalano et al. (2019) věnující se ve své práci motolicím u volně žijících hlodavců, také provedli korelační analýzu mezi dospělými jedinci v GIT a propagačními útvary z vyšetření Mini-FLOTAC, avšak zjistili slabou závislost pro oba testované druhy motolic.

U druhů *Hymenolepis spp.* korelační koeficient v mé práci nedosahoval přímé úměry (-0,067), a koeficient determinace (0 %) značí, že hodnota EPG není vysvětlena množstvím jedinců nalezených při pitvě.

Limitací tohoto zjištění však může být i fakt, že vajíčka tasemnic rodu *Hymenolepis* byla zdaleka nejnáročnější na identifikaci. V reálných vzorcích tato vajíčka mnohdy vypadala naprosto jinak, než vajíčka v uměle inokulovaných vzorcích (viz Obr. 9). Čerstvě získaná vajíčka byla vždy zřetelná, pravidelného tvaru a jednotné velikosti (viz Obr. 3), zatímco v přirozeně inokulovaných vzorcích jsem se setkávala s rozpětím velikosti vajíček od 40 μm až po 80 μm .

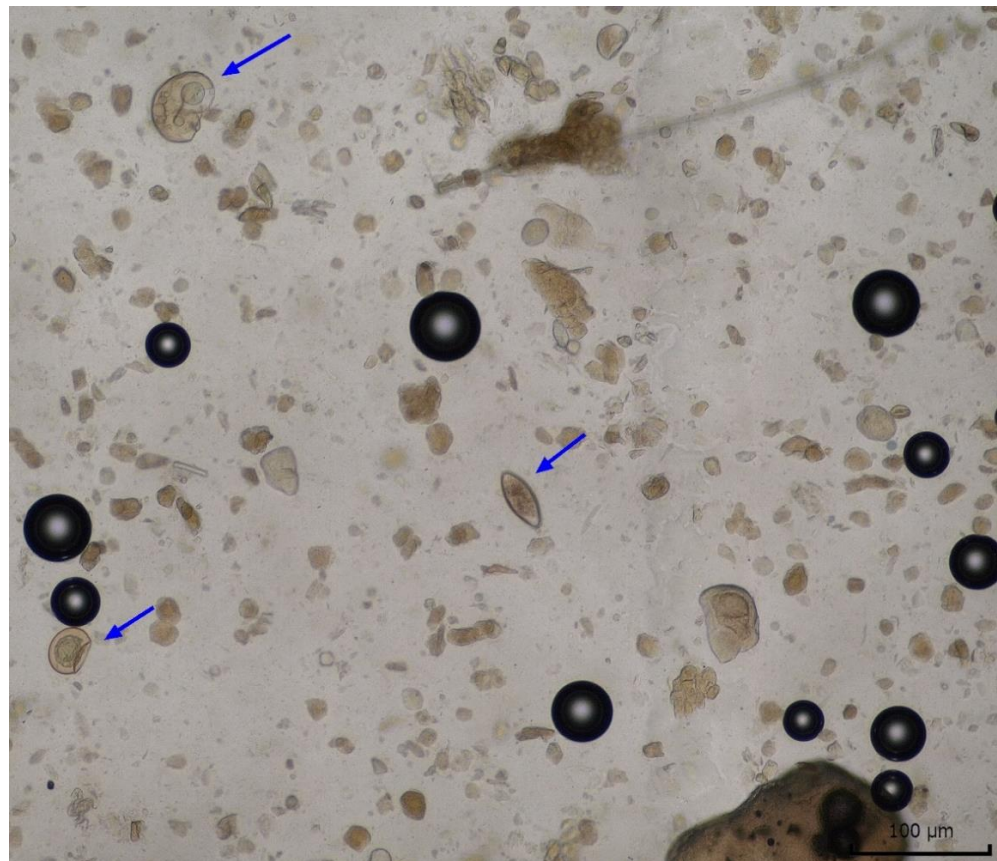
K podhodnocení výsledků u přirozeně infikovaných vzorků může dojít v důsledku mnoha faktorů, například v prepatentní fázi infekce, kdy doposud nedochází k vylučování vajíček helminty, či v případě, kdy se v gastrointestinálním traktu nachází pouze parazité jednoho pohlaví. Dalšími významnými faktory je samotná plodnost gravidní samice, přerušované vylučování vajíček, či vylučování nízkého množství vajíček, což je v případě využití Mini-FLOTAC tedy množství nižší než 5 EPG (Cringoli et al. 2017). To odpovídá skutečnosti, že pro zástupce řádu Cyclophillidea, do kterého patří i tasemnice rodu *Hymenolepis*, je typické nepravidelné vylučování gravidních proglottid v gastrointestinálním traktu a výkalech hostitele, což může znemožnit detekci jejich propagačních útvarů při vyšetření (Marcer et al. 2022).

Faktory, které mohly ovlivnit viditelnost vajíček při mikroskopickém vyšetření byly zejména průhlednost vzorku, jelikož i po scezení a pečlivém převedení do komůrky Mini-FLOTAC vzorek obsahoval velké množství částic a vzduchových bublin, které mohly zastínit přítomná vajíčka, popřípadě bránit jejich vyflotování k hladině flotační komůrky. Některá

vajíčka mohla zůstat na spodní straně aparátu, a po „odříznutí“ horní vrstvy tedy nebyla přítomna ve vyšetřovací komůrce ke spočítání.

Volba flotačního roztoku není univerzální pro propagační útvary všech helmintů. Jak již bylo popsáno v 3.3.2.3, někteří autoři (Barda et al. 2013; El-Nadi et al. 2019) uvádí vyšší citlivost detekce gastrointestinálních helmintů při použití solného roztoku, než při použití roztoku síranu zinečnatého, který umožňuje lepší detekci prvoků v koprologickém vzorku. Citlivost detekce bude vždy ovlivněna hustotou zvoleného flotačního roztoku a současně hmotností hledaných propagačních útvarů. Současně s tímto efektem, vyšší hustota zvoleného roztoku může kromě vyššího množství vyflotovaných propagačních útvarů způsobit vyšší míru flotace nečistot, a ztížit tím prohlížení samotného vzorku (Ballweber et al. 2014; Daş et al. 2020).

Citlivost, přesnost i preciznost jsou zásadními faktory k hodnocení spolehlivosti vybrané koprologické metody. Má zjištění se přidávají k autorům předchozích prací, kteří prokazují že přesnost zvolené metody se výrazně liší u různých druhů detekovaných helmintů.



Obr. 9: Porušené obaly vajíčka tasemnice *Hymenolepis* sp. (vlevo nahoře a vlevo dole) a intaktní vajíčko *Aspicularis tetraptera* (uprostřed) (Autor: Vlastní fotografie)

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo ověřit vhodnost koprologické metody Mini-FLOTAC pro diagnostiku gastrointestinálních helmintóz u hlodavců rodu *Rattus* žijících na území České republiky. K naplnění tohoto cíle byly zformulovány dvě hypotézy. K ověření první hypotézy bylo provedeno testování na uměle inokulovaných vzorcích výkalů potkana *Rattus norvegicus*. Z mých výsledků je patrné, že metoda Mini-FLOTAC nedosahuje dostatečné citlivosti pro detekci vajíček tasemnice *Hymenolepis diminuta* při definované hodnotě 10 EPG. Přesnost metody Mini-FLOTAC při hodnotě 10 EPG byla významně nižší, než při definovaných hodnotách 100 a 1000 EPG. Tato hypotéza nebyla potvrzena.

Druhá hypotéza byla ověřována na přirozeně infikovaných vzorcích získaných z hlodavců rodu *Rattus*, odchycených na sedmi lokalitách ve Středočeském kraji. Získané výsledky byly statisticky porovnány s výsledky pitev gastrointestinálních traktů příslušných jedinců. Při vyšetření metodou Mini-FLOTAC byly detekovány druhy *Hymenolepis spp.*, *Syphacia spp.*, *Aspicularis tetraptera*, *Trichuris muris* a *Heterakis spumosa*, což se shoduje s helminty detekovanými při pitvě GI traktů vyšetřovaných hlodavců. Získané výsledky koprologie metodou Mini-FLOTAC tedy relevantně odráží druhové spektrum gastrointestinálních helmintů.

Přesnost získaných výsledků se značně lišila mezi detekovanými druhy gastrointestinálních helmintů, což se shoduje se zjištěními předchozích autorů. Nejnižší přesnosti v mém experimentu metoda Mini-FLOTAC dosáhla u druhů *Hymenolepis spp.*, což koresponduje s výsledky první hypotézy. Nejvyšší přesnosti, ověřované korelační analýzou metoda dosáhla u druhů *Aspicularis tetraptera* a *Heterakis spumosa*, avšak získané výsledky mohly být značně zkreslené nízkým počtem získaných pozitivních vzorků, které byly do statistické analýzy následně zahrnuty. Druhá hypotéza byla tedy potvrzena částečně.

Faktory, které limitoval výsledky práce byly zejména omezený počet vyšetřovaných a pozitivních vzorků, nízké hmotnosti navážek jednotlivých vzorků a možná omezení, vyplývající z formy skladování vzorků před jejich vyšetřením. Pro další výzkum bych tedy doporučila vyšetřit vyšší množství vzorků a zvážit metodologické úpravy, které by mohly napomoci k vyšší spolehlivosti metody Mini-FLOTAC.

Přestože mými zjištěními nebyla potvrzena vhodnost testované metody pro vyšetření gastrointestinálních helmintóz u hlodavců rodu *Rattus*, věřím, že tato práce přinesla cenné poznatky a doufám, že bude podnětem pro navazující výzkumy v této oblasti parazitologie.

8 Literatura

- Alvi MA, Li L, Ohiolei JA, Qamar W, Saqib M, Tayyab MH, Altaf J, Ashfaq K, Hassan A, Jamal M, Wahab A, Alvi AA, Usman M, Bajwa MRK, Fu BQ, Yan HB, Jia WZ. 2021. Hydatigera taeniaeformis in urban rats (*Rattus rattus*) in Faisalabad, Pakistan. *Infection, Genetics and Evolution* **92**:104873.
- Amadesi A, Bosco A, Rinaldi L, Cringoli G, Claerebout E, Maurelli MP. 2020. Cattle gastrointestinal nematode egg-spiked faecal samples: High recovery rates using the Mini-FLOTAC technique. *Parasites and Vectors* **13**:230.
- Anděra M. 2011. Current distributional status of rodents in the Czech Republic (Rodentia) Aktuální stav poznání výskytu hlodavců v České republice (Rodentia) **42**:5–82.
- Anderson RC. 2000. Order Ascaridida. Pages 245–347 in Anderson RC, editor. *Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission*. CABI Publishing, UK.
- Anya AO. 1966. Studies on the Biology of some Oxyurid Nematodes. II. The Hatching of Eggs and Development of *Aspiculuris tetraptera* Schulz, within the Host. *Journal of Helminthology* **40**:261-268.
- Aplin KP, Chesser T, ten Have J. 2003. Evolutionary biology of the genus *Rattus*: profile of an archetypal rodent pest. Pages 487–498 in Singleton GR, Hinds LA, Krebs CJ, Spratt DM, editors. *Rats, mice and people: rodent biology and management*. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Assefa LM, Crellen T, Kepha S, Kihara JH, Njenga SM, Pullan RL, Brooker SJ. 2014. Diagnostic Accuracy and Cost-Effectiveness of Alternative Methods for Detection of Soil-Transmitted Helminths in a Post-Treatment Setting in Western Kenya. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**:e2843.
- Baker DG. 2007. Parasites of Rats and Mice. Pages 303–397 in Baker DG, editor. *Flynn's Parasites of Laboratory Animals*. Wiley-Wiley-Blackwell.
- Ballweber LR, Beugnet F, Marchiondo AA, Payne PA. 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? *Veterinary Parasitology* **204**:73–80.
- Bancroft AJ, Else KJ, Grecis RK. 1994. Low-level infection with *Trichuris muris* significantly affects the polarization of the CD4 response. *European Journal of Immunology* **24**:3113–3118.
- Bancroft AJ, Else KJ, Humphreys NE, Grecis RK. 2001. The effect of challenge and trickle *Trichuris muris* infections on the polarisation of the immune response. *International Journal for Parasitology* **31**:1627–1637.
- Barda B et al. 2015. How Long Can Stool Samples Be Fixed for an Accurate Diagnosis of Soil-Transmitted Helminth Infection Using Mini-FLOTAC? *PLoS Neglected Tropical Diseases* **9**:e0003698.

- Barda B, Cajal P, Villagran E, Cimino R, Juarez M, Krolewiecki A, Rinaldi L, Cringoli G, Burioni R, Albonico M. 2014. Mini-FLOTAC, Kato-Katz and McMaster: Three methods, one goal; Highlights from north Argentina. *Parasites and Vectors* **7**:271.
- Barda BD, Rinaldi L, Ianniello D, Zepherine H, Salvo F, Sadutshang T, Cringoli G, Clementi M, Albonico M. 2013. Mini-FLOTAC, an Innovative Direct Diagnostic Technique for Intestinal Parasitic Infections: Experience from the Field. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **7**:e2344.
- Barnett SA, Spencer MM. 1951. Feeding, Social Behaviour and Interspecific Competition in Wild Rats. *Behaviour* **3**:229-242.
- Barnett SA, Spencer MM. 1953. Experiments on the food preferences of wild rats (*Rattus norvegicus* Berkenhout). *The Journal of hygiene* **51**:16–34.
- Baumans V. 2016. The Aspects of the Use of Rodents in Experimental Research. Pages 7–12 in Andersen ML, Tufik S, editors. *Rodent Model as Tools in Ethical Biomedical Research*. Springer International Publishing, Cham.
- 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.
- Berentsen AR, Vogt S, Guzman AN, Vice DS, Pitt WC, Shiels AB, Spraker TR. 2015. *Capillaria hepatica* infection in black rats (*Rattus rattus*) on Diego Garcia, British Indian Ocean Territory. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **27**:241–244.
- Bergquist R, Johansen MV, Utzinger J. 2009. Diagnostic dilemmas in helminthology: what tools to use and when? *Trends in Parasitology* **25**:151–156.
- Biard C, Monceau K, Motreuil S, Moreau J. 2015. Interpreting immunological indices: The importance of taking parasite community into account. An example in blackbirds *Turdus merula*. *Methods in Ecology and Evolution* **6**:960–972.
- Bone LW, Bottjer KP. 1986. *Nippostrongylus brasiliensis*: effect of host hormones on helminth ingestion in vivo. *International Journal for Parasitology* **16**:77–80.
- Borrelli L, Dipineto L, Rinaldi L, Romano V, Noviello E, Menna LF, Cringoli G, Fioretti A. 2015. New Diagnostic Insights for *Macrorhabdus ornithogaster* Infection. *Journal of Clinical Microbiology* **53**:3448–3450.
- Bosco A, Ciuca L, Maurelli MP, Vitiello P, Cringoli G, Prada JM, Rinaldi L. 2023. Comparison of Mini-FLOTAC, Flukefinder® and sedimentation techniques for detection and quantification of *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi* eggs using spiked and naturally infected bovine faecal samples. *Parasites & Vectors* **16**:260.
- Calhoun JB. 1962. Population Density and Social Pathology. *Scientific American* **206**:139–149.
- Callejón R, De Rojas M, Nieberding C, Foronda P, Feliú C, Guevara D, Cutillas C. 2010. Molecular evolution of *Trichuris muris* isolated from different Muridae hosts in Europe. *Parasitology Research* **107**:631–641.

- Carrera-Játiva PD, Torres C, Figueroa-Sandoval F, Beltrami E, Verdugo C, Landaeta-Aqueveque C, Acosta-Jamett G. 2023. Gastrointestinal parasites in wild rodents in Chiloé Island-Chile. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria* **23**:e017022.
- Catalano S et al. 2019. Mini-FLOTAC as an alternative, non-invasive diagnostic tool for *Schistosoma mansoni* and other trematode infections in wildlife reservoirs. *Parasites and Vectors* **12**:439.
- Cavia R, Cueto GR, Suárez OV. 2009. Changes in rodent communities according to the landscape structure in an urban ecosystem. *Landscape and Urban Planning* **90**:11–19.
- Ceruti R, Sonzogni O, Origgi F, Vezzoli F, Cammarata S, Giusti AM, Scanziani E. 2001. *Capillaria hepatica* infection in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) from the urban area of Milan, Italy. *Journal of Veterinary Medicine* **48**:235–240.
- Chan K-F. 1952. Life cycle studies on the nematode *Syphacia obvelata*. *American Journal of Epidemiology* **56**:14–21.
- Chandler AC. 1941. The Specific Status of *Moniliformis* (Acanthocephala) of Texas Rats, and a Review of the Species of This Genus in the Western Hemisphere. *The Journal of Parasitology* **27**:241-244.
- Cliffe LJ, Grensis RK. 2004. The *Trichuris muris* system: A paradigm of resistance and susceptibility to intestinal nematode infection. *Advances in Parasitology* **57**:255-307.
- Cliffe LJ, Humphreys NE, Lane TE, Potten CS, Booth C, Grensis RK. 2005. Accelerated Intestinal Epithelial Cell Turnover: A New Mechanism of Parasite Expulsion. *Science* **308**:1463–1465.
- Cliffe LJ, Potten CS, Booth CE, Grensis RK. 2007. An increase in epithelial cell apoptosis is associated with chronic intestinal nematode infection. *Infection and Immunity* **75**:1556–1564.
- Cringoli G, Maurelli MP, Levecke B, Bosco A, Vercruyssen J, Utzinger J, Rinaldi L. 2017. The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nature Protocols* **12**:1723–1732.
- 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.
- Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Capelli G, Scala A. 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Parasitology* **123**:121–131.
- Crompton DWT, Arnold S, Barnard D. 1972. The patent period and production of eggs of *Moniliformis dubius* (Acanthocephala) in the small intestine of male rats. *International Journal for Parasitology* **2**:319–320.

- 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.
- Davis DE. 1953. The Characteristics of Rat Populations. *The Quarterly Review of Biology* **28**:373-401.
- Davoust BM, Branquet D, de Ducos LJ, Martet G. 1997. Research on three parasitic infestations in rats captured in Marseille: evaluation of the zoonotic risk. *Bulletin de L'academie Nationale de Medecine* **181**:887–895.
- Derothe J. 1997. Comparison between patterns of pinworm infection (*Aspicularis tetraptera*) in wild and laboratory strains of mice, *Mus musculus*. *International Journal for Parasitology* **27**:645–651.
- Dias de Castro LL, Abrahão CLH, Buzatti A, Molento MB, Bastianetto E, Rodrigues DS, Lopes LB, Silva MX, de Freitas MG, Conde MH, de Borges FA. 2017. Comparison of McMaster and Mini-FLOTAC fecal egg counting techniques in cattle and horses. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* **10**:132–135.
- Djokic V, Blaga R, Rinaldi L, Le Roux D, Ducry T, Maurelli MP, Perret C, Djurkovic Djakovic O, Cringoli G, Boireau P. 2014. Mini-FLOTAC for counting *Toxoplasma gondii* oocysts from cat feces – Comparison with cell counting plates. *Experimental Parasitology* **147**:67–71.
- Domínguez L, Saldaña J, Chernin J. 2000. Use of L4 larvae of *Nippostrongylus brasiliensis* for the in vivo screening of anthelmintic drugs. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire* **64**:160–3.
- Duthaler U, Rinaldi L, Maurelli MP, Vargas M, Utzinger J, Cringoli G, Keiser J. 2010. *Fasciola hepatica*: Comparison of the sedimentation and FLOTAC techniques for the detection and quantification of faecal egg counts in rats. *Experimental Parasitology* **126**:161–166.
- El-Nadi N, Ahmed A, Ahmed N, El-Laah A. 2019. Evaluation of mini-FLOTAC method for diagnosing intestinal parasitic infections. *Parasitologists United Journal* **12**:147–152.
- Engels D, Nahimana S, De Vlas SJ, Gryseels B. 1997. Variation in weight of stool samples prepared by the Kato–Katz method and its implications. *Tropical Medicine & International Health* **2**:265–271.
- Farhang-Azad A. 1977. Ecology of *Capillaria hepatica* (Bancroft 1893) (Nematoda). II. Egg-Releasing Mechanisms and Transmission. *The Journal of Parasitology* **63**:701.
- Feliu C, Spakulová M, Casanova JC, Renaud F, Morand S, Hugot JP, Santalla F, Durand P. 2000. Genetic and morphological heterogeneity in small rodent whipworms in southwestern Europe: Characterization of *Trichuris muris* and description of *Trichuris arvicolae* n. Sp. (Nematoda: Trichuridae). *Journal of Parasitology* **86**:442–449.
- Feng AYT, Himsforth CG. 2014. The secret life of the city rat: A review of the ecology of urban Norway and black rats (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*). *Urban Ecosystems* **17**:149–162.

- Ferreira LA, Andrade ZA. 1993. *Capillaria hepatica*: a cause of septal fibrosis of the liver. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz **88**:441–447.
- Forman R, Partridge FA, Sattelle DB, Else KJ. 2021. Un-‘Egg’-Plored: Characterisation of Embryonation in the Whipworm Model Organism *Trichuris muris*. Frontiers in Tropical Diseases **2**:790311.
- Franssen F, Swart A, van Knapen F, van der Giessen J. 2016. Helminth parasites in black rats (*Rattus rattus*) and brown rats (*Rattus norvegicus*) from different environments in the Netherlands. Infection Ecology and Epidemiology **6**.
- Fuehrer HP. 2014, February. An overview of the host spectrum and distribution of *Calodium hepaticum* (syn. *Capillaria hepatica*): Part 1 - Muroidea. Parasitology Research **113**:619-640.
- Fuehrer HP, Igel P, Auer H. 2011. *Capillaria hepatica* in man-an overview of hepatic capillariosis and spurious infections. Parasitology Research **109**:969-979.
- Galán-Puchades MT, Trelis M, Sáez-Durán S, Cifre S, Gosálvez C, Sanxis-Furió J, Pascual J, Bueno-Marí R, Franco S, Peracho V, Montalvo T, Fuentes MV. 2021. One health approach to zoonotic parasites: Molecular detection of intestinal protozoans in an urban population of norway rats, *Rattus norvegicus*, in Barcelona, Spain. Pathogens **10**:311.
- Galán-Puchades MT, Sanxis-Furió J, Pascual J, Bueno-Marí R, Franco S, Peracho V, Montalvo T, Fuentes M V. 2018. First survey on zoonotic helminthosis in urban brown rats (*Rattus norvegicus*) in Spain and associated public health considerations. Veterinary Parasitology **259**:49–52.
- Garcia LS. 2001. Diagnostic Medical Parasitology. Pages 1-1092 in Garcia LS, editor. ASM Press.
- 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.
- Gomez Villafañe IE, Robles MR, Busch M. 2008. Helminth communities and host-parasite relationships in argentine brown rat (*Rattus norvegicus*). Helminthologia **45**:126–129.
- Gordon H, Whitlock H V. 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. Journal of the council for Scientific and Industrial Research **12**:50–52.
- Grossman C. 1989. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. Journal of Steroid Biochemistry **34**:241–251.
- Haley AJ. 1958. Sex difference in the resistance of hamsters to infection with the rat nematode, *Nippostrongylus muris*. Experimental Parasitology **7**:338–348.
- Halvorsen O, Wissler K. 1983. Methods for estimating the density of *Elaphostrongylus rangiferi* Mitskevich (Nematoda, Metastrongyloidea) larvae in faeces from reindeer, *Rangifer tarandus* L. Rangifer **3**:33.

- Harder A, Danneschewski A, Wunderlich F. 1995. Egg Deposition of the Intestinal Nematode *Heterakis spumosa*: Stimulation by Soluble Colon Factors of Mice. *The Journal of Parasitology* **81**:733.
- Harder A, Wunderlich F, Marinovski P. 1992. Effects of testosterone on *Heterakis spumosa* infections in mice. *Parasitology* **105**:335–342.
- Hay J, Hutchison WM, Aitken PP, Graham DI. 1983. The effect of congenital and adult-acquired *Toxoplasma* infections on activity and responsiveness to novel stimulation in mice. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **77**:483–495.
- Hayes KS, Bancroft AJ, Goldrick M, Portsmouth C, Roberts IS, Grecis RK. 2010. Exploitation of the Intestinal Microflora by the Parasitic Nematode *Trichuris muris*. *Science* **328**:1391–1394.
- Hewitson JP, Grainger JR, Maizels RM. 2009. Helminth immunoregulation: The role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Molecular and Biochemical Parasitology* **167**:1-11.
- Hide G, Tait A. 1991. The molecular epidemiology of parasites. *Experientia* **47**:128–142.
- Hildebrand J, Popiołek M, Okulewicz A, Zalesny G. 2004. Helminthfauna of mice of *Apodemus* genus from Wrocław area. *Wiadomosci parazytologiczne* **50**:623–8.
- Hildebrand J, Zalesny G, Okulewicz A, Baszkiewicz K. 2009. Preliminary studies on the zoonotic importance of rodents as a reservoir of toxocarasis from recreation grounds in Wrocław (Poland). *Helminthologia* **46**:80–84.
- Hill WA, Randolph MM, Mandrell TD. 2009. Sensitivity of perianal tape impressions to diagnose pinworm (*Syphacia spp.*) infections in rats (*Rattus norvegicus*) and mice (*Mus musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* **48**:378–80.
- Hsu CK. 1979. Parasitic diseases. Pages 307-331 in Baker HJ, Lindsey JR, Weisbroth SH, editors. *The Laboratory Rat*. Academic Press, New York.
- Hubel DH, Wiesel TN. 1962. Receptive fields, binocular interaction and functional architecture in the cat's visual cortex. *The Journal of Physiology* **160**:106–154.
- Hussein AH, Rashed SM, El-Hayawan IA, Aly NSM, Abou Ouf EA, Ali AT. 2017. Intestinal parasite infections and accuracy of direct thin and thick smear, formol-ether sedimentation, centrifugal flotation, and mini-FLOTAC techniques among patients with gastrointestinal tract disorders from the Greater Cairo Region, Egypt. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **96**:589–594.
- Inglis IR, Shepherd DS, Smith P, Haynes PJ, Bull DS, Cowan DP, Whitehead D. 1996. Foraging behaviour of wild rats (*Rattus norvegicus*) towards new foods and bait containers. *Applied Animal Behaviour Science*. **47**:175-190.
- Ito A. 1983. *Hymenolepis nana*: Maturation in an immunosuppressed unnatural rat host. *Experimental Parasitology* **56**:318–326.

- Ito A, Kano S, Hioki A, Kasuya S, Ohtomo H. 1986. Reduced fecundity of *Hymenolepis nana* due to thymus-dependent immunological responses in mice. *International Journal for Parasitology* **16**:81–85.
- Jacoby R, Fox J. 1984. Biology and diseases of mice. Pages 31–89 in Fox J, Cohen B, Loew F, editors. *Laboratory Animal Medicine*. American College of Laboratory Animal Medicine, Academic Press.
- Johnson WL, Reynolds S, Adkins CL, Wehus-Tow B, Brennan J, Krus CB, Buttke D, Martin JM, Jesudoss Chelladurai JRJ. 2022. A comparison of Mini-FLOTAC and McMaster techniques, overdispersion and prevalence of parasites in naturally infected North American bison (*Bison bison*) in the USA. *Current Research in Parasitology and Vector-Borne Diseases* **2**:100103.
- Katagiri S, Oliveira-Sequeira TCG. 2010. Comparison of three concentration methods for the recovery of canine intestinal parasites from stool samples. *Experimental Parasitology* **126**:214–216.
- Kataranovski M, Mirkov I, Belij S, Popov A, Petrović Z, Gačić Z, Kataranovski D. 2011. Intestinal helminths infection of rats (*Ratus norvegicus*) in the Belgrade area (Serbia): the effect of sex, age and habitat. *Parasite* **18**:189–196.
- Kenyon F, Rinaldi L, McBean D, Pepe P, Bosco A, Melville L, Devin L, Mitchell G, Ianniello D, Charlier J, Vercruysse J, Cringoli G, Levecke B. 2016. Pooling sheep faecal samples for the assessment of anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC in gastrointestinal strongyle and *Nematodirus* infection. *Veterinary Parasitology* **225**:53–60.
- Khan W, Noor-un-Nisa, Rafiq N, Masood Z, Salim Ahmed M, Ur Rahman H, Kabir M, Ghaffar R, Naz A, Ali Shah MI. 2021. Zoonotic and non-zoonotic helminths in black rats of rain-fed and irrigated areas of Swat, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan. *Saudi Journal of Biological Sciences* **28**:2285–2290.
- King D, Robinson ES. 1967. Aspects of the Development of *Moniliformis dubius*. *The Journal of Parasitology* **53**:142-149.
- Klementowicz JE, Travis MA, Grecis RK. 2012. *Trichuris muris*: A model of gastrointestinal parasite infection. *Seminars in Immunopathology* **34**:815-828.
- Knopp S, Glinz D, Rinaldi L, Mohammed KA, N’Goran EK, Stothard JR, Marti H, Cringoli G, Rollinson D, Utzinger J. 2009. FLOTAC: A promising technique for detecting helminth eggs in human faeces. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **103**:1190–1194.
- Kononova MI, Prisniy YA. 2020. Helminthes of mouse-like rodents in the belogorye state nature reserve (Russia). *Nature Conservation Research* **5**:11–18.
- Koyama K. 2013. Characteristics and incidence of large eggs in *Trichuris muris*. *Parasitology Research* **112**:1925–1928.
- Lackie JM. 1975. The host specificity of *Moniliformis dubius* (Acanthocephala), a parasite of cockroaches. *International Journal for Parasitology* **5**:301–307.

- Levecke B, Behnke JM, Ajjampur SSR, Albonico M, Ame SM, Charlier J, Geiger SM, Hoa NTV, Kamwa Ngassam RI, Kotze AC, McCarthy JS, Montresor A, Periago MV, Roy S, Tchuem Tchuenté LA, Thach DTC, Vercruyse. 2011. A comparison of the sensitivity and fecal egg counts of the McMaster egg counting and Kato-Katz thick smear methods for soil-transmitted helminths. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **5**:e1201.
- Levecke B, De Wilde N, Vandenhoute E, Vercruyse J. 2009. Field Validity and Feasibility of Four Techniques for the Detection of Trichuris in Simians: A Model for Monitoring Drug Efficacy in Public Health? *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**:e366.
- Levecke B, Rinaldi L, Charlier J, Maurelli MP, Bosco A, Vercruyse J, Cringoli G. 2012. The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods. *Veterinary Parasitology* **188**:194–199.
- Li C-D. 2010. *Capillaria hepatica* in China. *World Journal of Gastroenterology* **16**:698.
- Libersat F, Moore J. 2000. The Parasite *Moniliformis moniliformis* Alters the Escape Response of its Cockroach Host *Periplaneta americana*. *Journal of Insect Behavior* **13**:103-110.
- Lotfy W. 2020. Neglected rare human parasitic infections: Part III: Acanthocephaliasis. *Parasitologists United Journal* **13**:145–150.
- Lubcke R, Hutcheson FAR, Barbezat GO. 1992. Impaired intestinal electrolyte transport in rats infested with the common parasite *Syphacia muris*. *Digestive Diseases and Sciences* **37**:60–64.
- Lytvynets A, Langrova I, Lachout J, Vadlejch J. 2013. Detection of pinworm eggs in the dust of laboratory animals breeding facility, in the cages and on the hands of the technicians. *Laboratory Animals* **47**:71–73.
- Lytvynets A, Langrová I, Lachout J, Vadlejch J, Fučíková A, Jankovská I. 2010. Drinking water ivermectin treatment for eradication of pinworm infections from laboratory rat colonies. *Helminthologia* **47**:233–237.
- Macdonald DW, Mathews F, Berdoy M. 1999. The Behaviour and Ecology of *Rattus norvegicus*: from Opportunism to Kamikaze Tendencies. Pages 49-80 in Singleton GR, Hinds LA, Leirsand H, Zhang Z, editors. Ecologically-based management of rodent pests. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra.
- Malrait K, Verschave S, Skuce P, Van Loo H, Vercruyse J, Charlier J. 2015. Novel insights into the pathogenic importance, diagnosis and treatment of the rumen fluke (*Calicophoron daubneyi*) in cattle. *Veterinary Parasitology* **207**:134–139.
- Marcer F, Cassini R, Parisotto N, Tessarin C, Marchiori E. 2022. A Comparative Study of Mini-FLOTAC With Traditional Coprological Techniques in the Analysis of Cetacean Fecal Samples. *Frontiers in Veterinary Science* **9**:908486.
- Margulis HL. 1977. Rat Fields, Neighborhood Sanitation, and Rat Complaints in Newark, New Jersey. *Geographical Review* **67**:221.

- Marsh RE. 1994. Roof Rats. Pages 125–132 in Hygnstro SE, Timm RM, Larson GE, editors. Prevention and Control of Wildlife Damage Handbook. University of Nebraska.
- Mathison BA, Mehta N, Couturier MR. 2021. Human Acanthocephaliosis: a Thorn in the Side of Parasite Diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology* **59**:e02691-20.
- Mayta H, Gilman RH, Prendergast E, Castillo JP, Tinoco YO, Garcia HH, Gonzalez AE, Sterling CR, Cysticercosis Working Group in Peru. 2008. Nested PCR for specific diagnosis of *Taenia solium* taeniasis. *Journal of clinical microbiology* **46**:286–9.
- Mcguire B, Pizzuto T, Bemis WE, Getz LL. 2006. General Ecology of a Rural Population of Norway Rats (*Rattus norvegicus*) Based on Intensive Live Trapping. *American Midland Naturalist* **155**:221.
- McKenna PB. 1999. Comparative evaluation of two emigration/sedimentation techniques for the recovery of dictyocaulid and protostrongylid larvae from faeces. *Veterinary Parasitology* **80**:345–351.
- McNair D, Timmons E. 1977. Effects of *Aspiculuris tetraptera* and *Syphacia obvelata* on exploratory behavior of an inbred mouse strain. *Laboratory Animal Science* **27**:38–42.
- Mes THM. 2003. Technical variability and required sample size of helminth egg isolation procedures. *Veterinary Parasitology* **115**:311–320.
- Mes THM, Eysker M, Ploeger HW. 2007. A simple, robust and semi-automated parasite egg isolation protocol. *Nature Protocols* **2**:486–489.
- Moore D V. 1946. Studies on the Life History and Development of *Moniliformis dubius* Meyer, 1933. *The Journal of Parasitology* **32**:257.
- Morand S. 2015. (macro-) Evolutionary ecology of parasite diversity: From determinants of parasite species richness to host diversification. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **4**:80–87.
- Moreira VLC, Giese EG, Silva DCB da, Melo FT de V, Furtado AP, Maldonado Jr A, Santos JN dos. 2013. *Calodium hepaticum* (Nematoda: Capillariidae) in synanthropic rodents (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*) in Eastern Amazonia. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **22**:265–269.
- Nápravníková J, Petrtýl M, Stupka R, Vadlejch J. 2019. Reliability of three common fecal egg counting techniques for detecting strongylid and ascarid infections in horses. *Veterinary Parasitology* **272**:53–57.
- Nickol BB. 1985. Epizootiology. Pages 307-346 in Crompton DWT, Nickol BB, editors. *Biology of the Acanthocephala*. Cambridge University Press, UK.
- Noel ML, Scare JA, Bellow 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**:182-187.

- Norris JK, Steuer AE, Gravatte HS, Slusarewicz P, Bellow JL, Scare JA, Nielsen MK. 2018. Determination of the specific gravity of eggs of equine strongylids, *Parascaris* spp., and *Anoplocephala perfoliata*. *Veterinary Parasitology* **260**:45–48.
- Oldham JN. 1967. Helminths, ectoparasites, and protozoa in rats and mice. Pages 641–680 in Cotchin E, Roe FJC, editors. *Pathology of laboratory rats and mice*. Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- Otto GM, Franklin CL, Clifford CB. 2015. Chapter 4 - Biology and Diseases of Rats. Pages 151–207 in Anderson LC, Fox JG, Otto G, Pritchett-Corning KR, Whary MT, editors. *Laboratory Animal Medicine: Third Edition*. Elsevier Inc.
- Owen DG. 1992. Parasites of Laboratory Animals. *Laboratory Animals Handbook*. Royal Society of Medicine Pr Ltd.
- Pakdel N, Naem S, Rezaei F, Chalehchaleh A-A, Dvm SN. 2013. A survey on helminthic infection in mice (*Mus musculus*) and rats (*Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*) in Kermanshah, Iran. *Veterinary Research Forum*. **4**:105-109.
- Panesar TS, Croll NA. 1980. The location of parasites within their hosts: Site selection by *Trichuris muris* in the laboratory mouse. *International Journal for Parasitology* **10**:261–273.
- Paras KL, George MM, Vidyashankar AN, Kaplan RM. 2018. Comparison of fecal egg counting methods in four livestock species. *Veterinary Parasitology* **257**:21–27.
- Parkinson CM, O'Brien A, Albers TM, Simon MA, Clifford CB, Pritchett-Corning KR. 2011. Diagnosis of Ecto- and Endoparasites in Laboratory Rats and Mice. *Journal of Visualized Experiments*. **6**:e2767.
- Perry RD, Fetherston JD. 1997. *Yersinia pestis*-Etiologic Agent of Plague. *Clinical Microbiology Reviews*. **10**:35-66.
- Plachý V, Litvinec A, Langrová I, Horáková B, Sloup V, Jankovská I, Vadlejch J, Čadková Z, Borkovcová M. 2016. The effect of *Syphacia muris* on nutrient digestibility in laboratory rats. *Laboratory Animals* **50**:39–44.
- Pritchett KR, Johnston NA. 2002. A review of treatments for the eradication of pinworm infections from laboratory rodent colonies. *Contemporary topics in laboratory animal science* **41**:36–46.
- Pritchett RK. 2007. Helminth Parasites of Laboratory Mice. Pages 551–564 in Fox JG, Quimby FW, Newcomer CE, Davisson MT, Barthold SW, Smith AL, editors. *The Mouse in Biomedical Research*. Elsevier.
- Raslan A-F, Saulol Hamid N-F, Md Isa N-M, Abd Rahaman Y, Fazil M-A, Hamka N-K. 2020. Incidental Findings of *Heterakis spumosa* and *Chirodiscoides caviae* with Pinworms in Sprague Dawley Rats. *Sains Malaysiana* **49**:1097–1106.
- Richardson DJ, Brink CD. 2011. Effectiveness of various anthelmintics in the treatment of moniliformiasis in experimentally infected Wistar rats. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **11**:1151–1156.

- Rinaldi L, Calabria G, Carbone S, Carrella A, Cringoli G. 2007. *Crenosoma vulpis* in dog: first case report in Italy and use of the FLOTAC technique for copromicroscopic diagnosis. *Parasitology Research* **101**:1681–1684.
- Robertson ID, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. 2000. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology* **30**:1369–1377.
- Rodríguez-Vivas RI, Panti-May JA, Parada-López J, Hernández-Betancourt SF, Ruiz-Piña HA. 2011. The occurrence of the larval cestode *Cysticercus fasciolaris* in rodent populations from the Cuxtal ecological reserve, Yucatan, Mexico. *Journal of Helminthology* **85**:458–461.
- Roldán WH, Martins de Paula F, Gryscek RCB. 2020. A simple method for purification of *Strongyloides venezuelensis* eggs from rat faeces. *Journal of Helminthology* **94**:e210.
- Saitoh Y, Yokokura Y, Itagaki H. 1993. Earthworms as a Transport Host of the Rat Cecal Worm, *Heterakis spumosa*. *Japanese Journal of Parasitology*. **42**:392-397.
- Schär F, Odermatt P, Khieu V, Panning M, Duong S, Muth S, Marti H, Kramme S. 2013. Evaluation of real-time PCR for *Strongyloides stercoralis* and hookworm as diagnostic tool in asymptomatic schoolchildren in Cambodia. *Acta Tropica* **126**:89–92.
- Scott ME, Gibbs HC. 1986. Long-Term Population Dynamics of Pinworms (*Syphacia obvelata* and *Aspiculuris tetraptera*) in Mice. *The Journal of Parasitology*. **72**:652-662.
- Shifaw A, Feyera T, Elliott T, Sharpe B, Walkden-Brown SW, Ruhnke I. 2021. Comparison of the Modified McMaster and Mini-FLOTAC methods for the enumeration of nematode eggs in egg spiked and naturally infected chicken excreta. *Veterinary Parasitology* **299**:109582.
- Simões RO, Luque JL, Gentile R, Rosa MCS, Costa-Neto S, Maldonado A. 2016. Biotic and abiotic effects on the intestinal helminth community of the brown rat *Rattus norvegicus* from Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Helminthology* **90**:21–27.
- Singh B. 1997. Molecular methods for diagnosis and epidemiological studies of parasitic infections. *International Journal for Parasitology* **27**:1135–1145.
- Singleton G, Chambers LK. 1996. A manipulative field experiment to examine the effect of *Capillaria hepatica* (Nematoda) on wild mouse populations in southern Australia. *International Journal for Parasitology* **26**:383–398.
- Singleton GR, Spratt DM, Barker SC, Hodgson PF. 1991. The geographic distribution and host range of *Capillaria hepatica* (Bancroft) (Nematoda) in Australia. *International Journal for Parasitology* **21**:945–957.
- Sinniah B, Narasiman M, Habib S, Gaik Bei O. 2014. Prevalence of *Calodium hepaticum* and *Cysticercus fasciolaris* in Urban Rats and Their Histopathological Reaction in the Livers . *Journal of Veterinary Medicine* **2014**:1–5.
- Smith PE. 1953. Life History and Host-Parasite Relations of *Heterakis spumosa*, a Nematode Parasite in the Colon of the Rat. *American Journal of Epidemiology* **57**:194–221.

- Šnábel V, Utsuki D, Kato T, Sunaga F, Ooi H-K, Gambetta B, Taira K. 2014. Molecular identification of *Heterakis spumosa* obtained from brown rats (*Rattus norvegicus*) in Japan and its infectivity in experimental mice. *Parasitology Research* **113**:3449–3455.
- Sotillo J, Trelis M, Cortés A, Valero ML, del Pino MS, Esteban JG, Marcilla A, Toledo R. 2012. Proteomic analysis of the pinworm *Syphacia muris* (Nematoda: Oxyuridae), a parasite of laboratory rats. *Parasitology International* **61**:561–564.
- Sousa JEN, Carvalho EFG, Levenhagen MA, Chaves LA, Costa-Cruz JM. 2016. Diagnosis of the pinworm *Syphacia muris* in the Wistar rat *Rattus norvegicus*. *Journal of Helminthology* **90**:117–120.
- Stahl W. 1963. Studies on the life cycle of *Syphacia muris*, the rat pinworm. *The Keio Journal of Medicine* **12**:55–60.
- Stojcevic D, Mihaljevic Z, Marinculic A. 2004. Parasitological survey of rats in rural regions of Croatia. *Veterinárni medicína* **49**:70–74.
- Summers K, McKeon S, Sellars J, Keusenkothen M, Morris J, Gloeckner D, Pressley C, Price B, Snow H. 2003. Parasitic exploitation as an engine of diversity. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*. **78**:639–675.
- Taffs LF. 1976. Pinworm infections in laboratory rodents: A review. *Laboratory Animals* **10**:1–13.
- Takahashi LK, Lore RK. 1980. Foraging and food hoarding of wild *Rattus norvegicus* in an urban environment. *Behavioral and Neural Biology* **29**:527–531.
- Teimoori S, Gharaguzlu M, Makki M, Shahbazi F, Mobedi I, Saboor Yaraghi A, Hasanpour G, Rokni M, Mowlavi G. 2011. Heavy Worm Burden of *Moniliformis moniliformis* in Urban Rats with Histopathological Description. *Iranian Journal of Parasitology*. **6**:107–112.
- Torgerson PR, Paul M, Lewis FI. 2012. The contribution of simple random sampling to observed variations in faecal egg counts. *Veterinary Parasitology* **188**:397–401.
- Truant AL, Elliott SH, Kelly MT, Smith JH. 1981. Comparison of Formalin-Ethyl Ether Sedimentation, Formalin-Ethyl Acetate Sedimentation, and Zinc Sulfate Flotation Techniques for Detection of Intestinal Parasites. *Journal of Clinical Microbiology*. **13**:882–884.
- Upadhyay SK, Nanware SS. 2020. Parasitoses and Histopathological Consequences of *Trichuris trichiura* (Nematoda: Enoplida) in Rodents, *Rattus rattus* (Mammalia: Rodentia). *Asian Journal of Biological and Life sciences* **9**:74–78.
- Wagner M. 1988. The effect of infection with the pinworm (*Syphacia muris*) on rat growth. *Laboratory animal science* **38**:476–8.
- Wakelin D. 1969. The Development of the Early Larval Stages of *Trichuris muris* in the Albino Laboratory Mouse. *Journal of Helminthology*. **43**:427–436.
- Webster JP, Macdonald DW. 1995. Parasites of wild brown rats (*Rattus norvegicus*) on UK farms. *Parasitology*. **111**:247–255.

- Whishaw IQ, Whishaw GE. 1996. Conspecific Aggression Influences Food Carrying: Studies on a Wild Population of *Rattus norvegicus*. *Aggressive behavior*. **22**:47-66.
- White EC, Houlden A, Bancroft AJ, Hayes KS, Goldrick M, Grecis RK, Roberts IS. 2018. Manipulation of host and parasite microbiotas: Survival strategies during chronic nematode infection. *Science Advances* **4**:eaap7399.
- Whitfield PJ. 1971. The locomotion of the acanthor of *Moniliformis dubius* (Archiacanthocephala). *Parasitology*. **62**:35-47.
- Whitlock H V. 1948. Some modifications of the McMaster helminth egg-counting technique and apparatus. *Journal of the Council for Scientific and Industrial Research, Australia* **21**:177–180.
- Winfield GF. 1933. Quantitative Experimental Studies on the Rat Nematode *Heterakis spumosa*, Schneider, 1866. *American Journal of Epidemiology* **17**:168–228.
- Wong SSY, Fung KSC, Chau S, Poon RWS, Wong SCY, Yuen KY. 2014. Molecular diagnosis in clinical parasitology: When and why? *Experimental Biology and Medicine* **239**:1443–1460.
- Yousefi Y, Haq S, Banskota S, Kwon YH, Khan WI. 2021. *Trichuris muris* model: Role in understanding intestinal immune response, inflammation and host defense. *Pathogens* **10**:925.
- Zajac AM, Conboy GA. 2012. *Veterinary Clinical Parasitology*, 8th edition. Wiley-Blackwell.
- Zaleśny G, Hildebrand J, Popiołek M. 2010. Molecular Identification of *Heterakis spumosa* Schneider, 1866 (Nematoda: Ascaridida: Heterakidae) with Comparative Analysis of Its Occurrence in Two Mice Species. *Annales Zoologici* **60**:647–655.
- Ziporyn T, McClintock MK. 1991. Passing as an Indicator of Social Dominance among Female Wild and Domestic Norway Rats. *Behaviour*. **118**:26-41.

9 Samostatné přílohy

9.1 Příloha I

<i>1000EPG</i>	Pořadí	Komůrka 1	Komůrka 2	Celkem	EPG (x5)	Procentuální přesnost
	1	60	51	111	555	56%
	2	44	48	92	460	46%
	3	37	28	65	325	33%
	4	44	38	82	410	41%
	5	41	33	74	370	37%
	6	40	63	103	515	52%
	7	58	68	126	630	63%
	8	50	45	95	475	48%
	9	53	34	87	435	44%
	10	40	30	70	350	35%

<i>100EPG</i>	Pořadí	Komůrka 1	Komůrka 2	Celkem	EPG (x5)	Procentuální přesnost
	1	4	2	6	30	30%
	2	1	1	2	10	10%
	3	2	2	4	20	20%
	4	9	2	11	55	55%
	5	3	3	6	30	30%
	6	4	9	13	65	65%
	7	0	2	2	10	10%
	8	6	7	13	65	65%
	9	3	5	8	40	40%
	10	5	6	11	55	55%

<i>10EPG</i>	Pořadí	Komůrka 1	Komůrka 2	Celkem	EPG (x5)	Procentuální přesnost
	1	0	0	0	0	0%
	2	0	0	0	0	0%
	3	0	0	0	0	0%
	4	1	0	1	5	50%
	5	0	0	0	0	0%
	6	0	0	0	0	0%
	7	0	0	0	0	0%
	8	0	0	0	0	0%
	9	0	0	0	0	0%
	10	0	0	0	0	0

9.2 Příloha II

<i>% Přesnost</i>	Arcsin % přesnost	EPG
56%	59%	1000
46%	48%	1000
33%	33%	1000
41%	42%	1000
37%	38%	1000
52%	54%	1000
63%	68%	1000
48%	49%	1000
44%	45%	1000
35%	36%	1000
30%	30%	100
10%	10%	100
20%	20%	100
55%	58%	100
30%	30%	100
65%	71%	100
10%	10%	100
65%	71%	100
40%	41%	100
55%	58%	100
0%	0%	10
0%	0%	10
0%	0%	10
50%	52%	10
0%	0%	10
0%	0%	10
0%	0%	10
0%	0%	10
0%	0%	10
0%	0%	10
0%	0%	10