

Česká zemědělská univerzita v Praze

2023

**Metodologie pro odběry, biologickou bezpečnost a archivaci
biologického materiálu ze zvířat zadrženého v rámci ilegálního
obchodu pro účely forenzních analýz**

Certifikovaná metodika

Barbora Černá Bolfíková, Jiří Černý, Petr Matějů, Iva Bernáthová, Divyadharshini Shanthakrishnan, Ivana Jankovská, Richard Sehnal, Tereza Modrá, David Modrý, Iva Langrová

Metodika byla vypracovaná jako výstup VK01010103-V1 výzkumného projektu VK01010103, Metodologie identifikace a dalších forenzních analýz biologického materiálu a patogenů z volně žijících a exotických živočichů v rámci programu 1.VS OPSEC.

Česká zemědělská univerzita v Praze

2023

**Metodologie pro odběry, biologickou bezpečnost a archivaci
biologického materiálu ze zvířat zadrženého v rámci ilegálního
obchodu pro účely forenzních analýz**

Certifikovaná metodika

Barbora Černá Bolfíková, Jiří Černý, Petr Matějů, Iva Bernáthová, Divyadharshini Shanthakrishnan, Ivana Jankovská, Richard Sehnal, Tereza Modrá, David Modrý, Iva Langrová

Metodika byla vypracovaná jako výstup VK01010103-V1 výzkumného projektu VK01010103, Metodologie identifikace a dalších forenzních analýz biologického materiálu a patogenů z volně žijících a exotických živočichů v rámci programu 1.VS OPSEC.

Vydala Česká zemědělská univerzita ve svém nakladatelství.

ISBN 978-80-213-3522-6

Příjemci podpory:**Poskytovatel:**

**Metodologie identifikace a dalších forenzních analýz biologického
materiálu a patogenů z volně žijících a exotických živočichů
VK 01010103**

**Název předkládaného výsledku: Metodologie pro odběry, biologickou bezpečnost a
archivaci biologického materiálu ze zvířat zadrženého
v rámci ilegálního obchodu pro účely forenzních analýz**

Typ výsledku dle Definice druhů výsledků	Evidenční číslo (příjemce)	Rok vzniku
metodika certifikovaná oprávněným orgánem <i>NmetC1</i>	01/2024	2023
ISBN/ISSN (pokud je k dispozici)	Webový odkaz na výsledek (pokud je k dispozici)	Kde a kdy publikováno (v případě publikačního výsledku)
978-80-213-3522-6	metodiky.agrobiologie.cz	Jednoznačný popis publikací které daný výsledek vyši

Stručná anotace k výsledku v českém jazyce: (max. 8 řádků)

Správný odběr, nakládání a archivace vzorku je klíčovou podmínkou pro jeho pozdější úspěšnou analýzu. Zachování zásad biologické bezpečnosti pak před infekcí potencionálně přítomnými patogeny chrání nejen samotné pracovníky, ale zabraňuje i další nechtěné šíření patogenů. V rámci této metodiky jsou otestovány a popsány postupy správného zacházení s biologickými vzorky a jejich limity.

.....

Řešitelský tým:

Barbora Černá Bolfíková, Jiří Černý, Petr Matějů, Iva Bernáthová, Divyadharshini
Shanthakrishnan, Ivana Jankovská, Richard Sehnal, Tereza Modrá, David Modrý,
Iva Langrová

Metodologie pro odběry, biologickou bezpečnost a archivaci biologického materiálu ze zvířat zadrženého v rámci ilegálního obchodu pro účely forenzních analýz

Certifikovaná metodika

Metodika byla vypracovaná jako výstup VK01010103-V1 výzkumného projektu VK01010103, Metodologie identifikace a dalších forenzních analýz biologického materiálu a patogenů z volně žijících a exotických živočichů v rámci programu 1.VS OPSEC.

Autoři:

Barbora Černá Bolfíková¹, Jiří Černý¹, Petr Matějů¹, Iva Bernáthová¹, Divyadharshini Shanthakrishnan¹, Ivana Jankovská², Richard Sehnal², Tereza Modrá², David Modrý² a Iva Langrová²

¹ Fakulta tropického zemědělství, Česká zemědělská univerzita v Praze

² Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Česká zemědělská univerzita v Praze

Oponenti:

Prof. MVDr. Daniela Lukešová, CSc., emerit. prof. MVDr. Daniela Lukesova, CSc. Havelkova 23 625 00 Brno-Bohunice

RNDr. Jindřich Novák, Ph.D., Česká inspekce životního prostředí, Oddělení mezinárodní ochrany biodiverzity a CITES.

Praha, listopad 2023

Obsah:

- 1. Úvod**
- 2. Cíl metodiky**
- 3. Metody pro odběr biologického materiálu**
 - 3.1 Bezpečnost při práci s biologickým materiálem
 - 3.2 Metody odběru biologických vzorků pro pozdější genetické vyšetření
 - 3.2.1 Odběry vzorků pro forenzní analýzy z předmětů živočišného původu
 - 3.2.2 Manipulace s různými typy materiálů a odběr vzorků z těchto materiálů
 - 3.2.3 Odběry vzorků pro forenzní analýzy ze živých zvířat
 - 3.3 Metody odběru vzorků pro pozdější parazitologické vyšetření
 - 3.3.1 Odběry vzorků pro parazitologické analýzy z předmětů živočišného původu
 - 3.3.2 Odběry vzorků pro parazitologické analýzy z živých případně mrtvých celých zvířat
 - 3.4 Metody odběru vzorků pro pozdější mikrobiologické vyšetření
 - 3.4.1 Odběry vzorků pro mikrobiologické analýzy ze živých zvířat
 - 3.4.2 Odběry vzorků pro mikrobiologické analýzy z materiálů živočišného původu
 - 3.4.3 Odběr environmentálních vzorků
 - 3.5 Dokumentace a značení vzorků
- 4. Technické přílohy**
- 5. Srovnání novosti postupů a popis uplatnění metodiky**
- 6. Ekonomické aspekty**
- 7. Literatura**
- 8. Seznam publikací, které předcházely metodice**
- 9. Prohlášení**

1. Úvod

Česká republika, stejně jako další země EU, se dlouhodobě potýká s problémy spojenými s environmentální kriminalitou, jako je například pytláctví, pašování produktů spojených nezákonným lovem zvířat nebo ilegální obchod s těmito zvířaty jako takovými (především exotičtí ptáci, plazi, obojživelníci, členovci). Do těchto aktivit se zapojují jak jednotlivci, tak i celé organizované skupiny. Výsledkem environmentální kriminality není jen poškození životního prostředí, úbytek ohrožených druhů zvířat a jejich genetické variability, která podmiňuje další přežití těchto zvířat v přírodě, ale i šíření infekčních onemocnění. Například koronavirus SARS-CoV-2, původce onemocnění COVID-19 se pravděpodobně vyvinul díky nelegálnímu obchodu se zvířaty v Číně, zatímco virus opičích neštovic, další patogen, s jehož epidemií se lidstvo v nedávné minulosti potýkalo, byl v minulosti spojen především s obchodem s exotickými zvířaty v USA. I přes to, že celní správa i další složky státu se v poslední době vyšetřování environmentální kriminality věnují se zvýšenou pozorností, vnímá celkově česká laická i odborná veřejnost tuto činnost jako nedostatečnou a množství pachatelů, které se podaří odhalit jako neúměrně malé. Důvodem jsou především objektivní problémy spojené s odhalováním tohoto druhu trestné činnosti, včetně nedostatku „know-how“ a to jak na úrovni existence vhodných metodologických přístupů, tak i na úrovni jejich používání.

Výsledkem národních i mezinárodních policejních operací je obvykle velké množství zadrženého biologického materiálu. Ať už se jedná o suroviny, produkty, části těl zvířat nebo živé jedince, tento biologický materiál vyžaduje velmi specifickou manipulaci a další zpracování, aby se předešlo znehodnocení nebo kontaminaci tohoto materiálu. Právě elementární nedodržení striktních metodik je mnohdy příčinou neúspěchu následných technologicky náročných forenzních přístupů založených na analýzách DNA. S ohledem na mnohdy nejasný zdroj zadrženého materiálu původem z tropických zemí a komplikovanou manipulaci při přepravě (související s ilegální podstatou vyšetřované činnosti) při podobných zásazích hrozí významné riziko přenosu infekcí na členy zasahujících složek státní správy a dále do populace v ČR. Podobná rizika pak souvisí s přenosem infekčních agens na volně žijící zvířata.

Komplexita environmentální kriminality a její výjimečná podstata a rozsah vyžaduje zásadní rozšíření metodických přístupů a spolupráci napříč složkami státu a odbornými institucemi s laboratorní expertízou. Problematika využití exotických patogenů, stejně jako otázky bezpečnosti manipulace s biologickým materiálem patogenů s ohledem na exotické patogeny, je v ČR zcela nová problematika.

Zadržený biologický materiál představuje rozsáhlý zdroj informací využitelných při dokladování jeho původu v rámci důkazních řízení (geografický původ, odlišení ilegálně odchycených a od v zajetí narozených CITES exemplářů, identifikace do druhů). Tyto metody jsou aplikovatelné především v situacích, kdy určení materiálu a identifikace jeho původu umožní odhalit případnou trestnou činnost. Nově využívaným přístupem ve forenzních diagnostikách je využití patogenů detekovaných v zadrženém materiálu, ať už se jedná o živá zvířata, mrtvé jedince

nebo části jejich těl. Tyto metodické přístupy jsou i přes řadu nesporných výhod a vysokou indikativní hodnotu jen omezeně využívány, především právě kvůli nutnosti nezbytné expertízy při analýzách a práci s takovým materiálem. Právě při obchodu s živými jedinci ohrožených druhů zvířat je využití parazitů jako bio-indikátoru původu zvířat velmi vhodné, neboť ukazuje nejen geografickou oblast původu, ale i ekologický kontext, z kterého daný jedinec pochází, např. tropický plaz zadržený v rámci transportu. Rychle se rozvíjející metodologie DNA/RNA analýz v biologii umožňuje aplikace i ve forenzní praxi. Jejich aplikace obvykle ale neumožňuje forenzní analýzy definující původ jedince. Zejména v případech mezinárodních chráněných druhů (CITES) je přitom odlišení v zajetí odchovaných zvířat od ilegálně odchycených naprosto klíčové. V těchto případech je možno využít spektrum patogenů (obvykle heteroxenní parazité a vektory přenášené patogeny), které mají vysokou indikativní hodnotu pro odhalení jedinců pocházejících z volné přírody. Dosavadní využití dokumentuje mj. studie z Německa (Moré et al., 2014). Podobným způsobem jsou využitelné tyto techniky u širokého spektra jiných druhů.

V ČR zásadně chybí povědomí o bezpečnostních hrozbách souvisejících s obchodem s takovým materiálem a metodologie eliminující rizika kontaktu složek Ministerstva financí při rutinní práci zahrnující biologický materiál z exotických zvířat. V ČR není při zásazích zainteresovaných složek státu (Policie, Celní správa, České inspekce životního prostředí – ČIŽP) uplatňována žádná definovaná metodika ochrany před infekcemi, a to ani v situacích, kdy podstata vyšetřované činnosti nebo zabaveného materiálu sama o sobě indikuje vysokou míru bezpečnostního rizika ve formě přenosu infekcí (biologický materiál neznámého původu z exotických zvířat, živá zvířata ze třetích zemí bez příslušné dokumentace a pod (viz např. Rush et al., 2021). Z podstaty věci a s ohledem na legislativu EU takový materiál splňuje minimálně úroveň biologické ochrany BSL2, v indikovaných případech dokonce BSL3. Vytvoření společné metodologie zahrnující tato rizika je pro ČR zcela nové, a i v rámci EU výjimečné.

2. Cíl metodiky

Tato metodika vznikla jako výsledek projektu VK01010103-V1 v rámci grantu VK01010103, Metodologie identifikace a dalších forenzních analýz biologického materiálu a patogenů z volně žijících a exotických živočichů podpořeného v rámci 1.VS OPSEC. Metodika je prvním dílčím výstupem souboru metodických doporučení, který ve finále poskytne ucelený pohled na problematiku odběru a vyšetřování materiálu, včetně navazujících laboratorních analýz.

Cílem této metodiky je poskytnout ve sjednocené, právně i metodicky správné formě návod, jak provádět odběry biologického materiálu ze zvířat a zvířecích produktů zadržovaných v rámci ilegálního obchodu pro účely pozdějších genetických, mikrobiologických a parazitologických forenzních analýz. Metodika byla vypracována v roce 2023 a veškerá právní i expertní biologická doporučení proto odrážejí stav platný v této době. Pro pozdější použití je nutné respektovat změny v právním systému i nově získané poznatky v oblasti biologických věd, řídit se aktuálně platnou právní legislativou a zohlednit také novější biologické poznatky.

Při práci s biologickým materiálem je nutné uvědomit si dvě důležité skutečnosti: Za prvé, jakýkoliv biologický materiál může potenciálně obsahovat infekční mikroorganismy a proto je nutné k němu přistupovat s obezřetností a odpovídajícím stupněm předběžné opatrnosti, omezit manipulaci s ním na nezbytně nutné úkony a využívat během této manipulace vhodných prostředků osobní ochrany. Za druhé, zajištěný biologický materiál může hrát důležitou roli v pozdějším vyšetřování. Proto je nutné z něj správným způsobem odebrat potřebné vzorky, s takto odebranými vzorky správným způsobem manipulovat a správným způsobem je uchovávat. Především je potřeba dbát na to, aby nedošlo k znehodnocení vzorků například jejich přirozeným biologickým rozkladem nebo kontaminací jiným biologickým materiálem (včetně materiálu pocházejícího od lidí, kteří se vzorky manipulují), a dále na to, aby s těmito vzorky bylo manipulováno tak, že nemůže dojít k úniku potencionálně nebezpečných mikroorganismů, které tyto vzorky mohou obsahovat.

Metodika je určena pro kohokoliv, kdo bude odebírat vzorky biologického materiálu pro pozdější genetické, parazitologické nebo mikrobiologické forenzní analýzy. Může se jednat o pracovníky Celní správy ČR, Policie ČR, České inspekce životního prostředí nebo dalších orgánů státní správy či odborníků, kteří byli těmito orgány zmocněni nebo pověřeni k odběru vzorků. Metodika je založena na současném stavu poznání, není direktivním dokumentem, a proto je možné se od ní, v odůvodněných případech, při odběru vzorku odchýlit. V takovém případě musí mít pracovník odebírající biologický vzorek k takového odchylce dobrý a dostatečně podložený důvod.

3. Metody pro odběr biologického materiálu

3.1 Bezpečnost při práci s biologickým materiálem

Při práci s jakýmkoliv biologickým materiálem je nutné si uvědomit, že tento materiál může obsahovat nebezpečné infekční organizmy a je k němu tedy potřeba přistupovat s obezřetností a předběžnou opatrností. Pokud to není nezbytně nutné, pro odběr vzorků, je vhodné omezit manipulaci takovým materiálem na minimální množství nezbytně nutných úkonů a vždy využívat vhodných prostředků osobní ochrany. Pravidla pro nakládání s potenciálně infekčním biologickým materiálem (za potenciálně infekční by měl být považován každý materiál, u kterého není prokázáno jinak) stanoví různé právní předpisy České republiky a Evropské unie. Těmi jsou především zákon č. 262/2006 Sb. (Zákoník práce), zákon č. 309/2006 Sb. (zákon o zajištění dalších podmínek bezpečnosti a ochrany zdraví při práci), nařízení vlády č. 361/2007 Sb. (nařízení vlády, kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci), vyhláška č. 432/2003 Sb. a další, a to včetně jejich pozdějších znění a aktualizací.

Všichni pracovníci, kteří přicházejí do styku s potenciálně nebezpečným biologickým materiálem by měli procházet pravidelnými zdravotními prohlídkami. Jejich součástí by mělo být i pravidelné očkování těchto pracovníků proti vybraným patogenům, které snižuje jak riziko jejich vlastní infekce, tak i toho, že by sami mohli být dalším zdrojem, ze kterého se patogen může dále šířit.

Pokud není stanoveno jinak, odběr biologických vzorků může provádět pouze adekvátně proškolená osoba, která při odběru vzorků dodržuje všechny postupy v oblasti bezpečnosti práce. Těmi je především využívání vhodných osobních ochranných pracovních prostředků, dodržování správných pracovních postupů vedoucích ke zvýšení standardů bezpečnosti práce, dodržování hygienických postupů vedoucích k zamezení infekce pracovníků a k jejímu dalšímu rozšíření.

Pokud není důvod očekávat, že vzorek by obsahoval nebezpečné patogenní mikroorganismy, je možné vzorek odebírat na místě kontroly, s využitím základních osobních ochranných pomůcek, např. chirurgické rukavice, chirurgické roušky, ideálně respirátor. Doporučit lze také ochranu obličeje, především očí, s využitím obličejového štítu nebo brýlí.

Odběr vzorků by měl být prováděn v prostředí, ze kterého lze po manipulaci se vzorkem snadno odstranit všechny potenciálně přítomné patogenní mikroorganismy. Pracovní plochy, na kterých je vzorek odebírán, by měly být z materiálu odolného k používaným čistícím prostředkům, neměly by na nich být pukliny, mezery či jiné netěsnosti, do kterých se může potenciálně část odebíraného biologického materiálu vsáknout. K očištění pracovních ploch je vhodné používat dezinfekční činidla na bázi lihu nebo chlóru (pozor, může způsobovat korozi na površích z nerezové ocele) o vhodné koncentraci, podle doporučení výrobce. Tyto prostředky je pak vhodné střídat, aby nemohlo dojít k potenciálnímu vývoji rezistence mikroorganismů na daný dezinfekční prostředek. Ideálně by bylo vhodné po skončení manipulace prostor, ve kterém jsou vzorky odebírány, osvětlit germicidní UV lampou.

Nástroje použité k odběru vzorku, stejně jako použité a kontaminované osobní ochranné pracovní pomůcky, mohou být potenciálním zdrojem infekce. Je vhodné používat jednorázové pomůcky a ihned po použití je bezpečně ošetřit, např. ponořením do vhodného dezinfekčního roztoku a následně předat k odborné likvidaci. V případě, že jsou některé pomůcky používány opakovaně, je nutné zajistit po každém použití jejich důkladnou sterilizaci.

Po práci s potenciálně nebezpečným biologickým materiálem je nutné dodržovat základní pravidla hygieny jako je důkladné mytí rukou za využití dezinfekčních mýdel a podobně. Správná hygiena je nutná především v případě, kdy dojde ke kontaktu mezi biologickým materiálem a pokožkou pracovníka, který se vzorkem nakládá. Pokud nedojde k poškození pokožky a není důvod se domnívat, že vzorek může obsahovat nebezpečné mikrobiální patogeny, stačí místo kontaktu ihned důkladně omýt pomocí dezinfekčního mýdla a opláchnout dostatečným množstvím vody. Pokud došlo k poškození pokožky, je nutné ránu vyčistit pomocí dezinfekčního činidla, zastavit případné krvácení a ihned kontaktovat lékaře a konzultovat s ním další postup.

Pokud je důvod očekávat, že vzorek může obsahovat nebezpečné patogenní mikroorganismy, nemělo by být s tímto vzorkem manipulováno v místech, kde může hrozit únik těchto mikroorganismů do prostředí. V takovémto případě by měl být vzorek zabezpečen zabalením do nepropustného obalového materiálu tak, aby s ním během adjustace bylo manipulováno co možná nejméně a vzorek byl následně převezen k dalšímu odběru biologického materiálu do specializované laboratoře.

3.2 Metody odběru biologických vzorků pro pozdější genetické vyšetření

Národní i mezinárodní legislativa vztahující se k mezinárodnímu obchodu s komoditami živočišného původu ve své podstatě pracuje jen s taxonomicky určeným materiálem (např. seznamy CITES) a identifikace kontrolovaného nebo zadrženého materiálu či živých zvířat do druhu je prvním a klíčovým krokem. Nesprávné nebo neúplné (ať už cíleně nebo necíleně) uvedení druhu zvířete, z něhož materiál pochází (nebo zvířete jako takového) je jedním z nejčastějších problémů kontroly obchodu s těmito komoditami. Genetická vyšetření mohou pomoci nejen k určení biologického druhu, a to i v případě materiálů, u kterých takovéto určení není možné pomocí morfologie (např. mleté maso), avšak jejich využití je daleko širší. V případě dostatečného srovnávacího materiálu mohou být využita například k identifikaci konkrétních jedinců nebo mohou pomoci s určením místa původu daného biologického materiálu s přesností na desítky nebo nižší stovky kilometrů.

Podstatou genetických vyšetření je detekce a následná analýza nukleových kyselin. Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je dvouřetězcová nukleová kyselina, která je nositelkou dědičnosti u buněčných organismů. DNA je přítomna ve formě relativně stabilních makromolekul, které lze detekovat spektrem diagnostických postupů. S ohledem na vysokou citlivost použitých metod je při odběru vzorků nutné postupovat s maximální opatrností a předejít možnému znehodnocení vzorku kontaminací cizorodou DNA. Dále je nutné odebrat dostatečné množství materiálu pro pozdější analýzy, což se liší typem odebíraného vzorku.

Požadavky na jednotlivé typy materiálů budou uvedeny níže. V neposlední řadě je nutné materiál správně skladovat, aby nedošlo k degradaci v něm obsažené DNA.

3.2.1 Odběry vzorků pro forenzní analýzy z předmětů živočišného původu

3.2.1.1 Odběr celého předmětu

Celý důkazní předmět je vhodné uchovat v případě, že není příliš velký nebo vzorek nemůže být bezpečně odebrán mimo laboratoř. Je vhodné celý zabavený předmět předat laboratoři, která z něj odebere vzorek k extrakci DNA. Předmět by měl být po odebrání vzorku navrácen dožadujícímu orgánu. Samotné zabalení předmětu vychází z jeho podstaty, mělo by však vždy zamezit kontaminaci povrchu cizorodými molekulami.

3.2.1.2 Odběr části předmětu

Odebrat vzorek důkazního předmětu je vhodné v případě, že:

- a. předmět je příliš velký pro další manipulaci nebo předmět z jakéhokoli důvodu nemůže být zapůjčen laboratoři,
- b. se předpokládá, že předměty jsou původem z různých oblastí (kaviár, úlomky kostí, vyřezávané předměty, sošky apod.), v tomto případě je vhodné odebrat větší počet vzorků pro determinaci druhu nebo původu materiálu.

Předmět, ze kterého je odebírán vzorek, by měl být nezaměnitelně fotograficky zdokumentován (měřítko, pořadové číslo, číslo jednacích atd.) před samotným odběrem vzorku k extrakci DNA. Následující způsoby odběru lze využít u většiny druhů materiálů:

- a. odběr stěru pomocí štětičky
 - i. může být využito u živých zvířat, skvrn, v případě čerstvého masa, nebo pokud nelze část odstříhnout
 - ii. stěry se doporučuje odebrat minimálně dva, pro případné opakování extrakce DNA
 - iii. pokud je to možné, měla by zůstat část původního materiálu tzv. neovzorkovaná (pro případné opakování odběru)
- b. odběr části materiálu odstřížením/odlomením
 - i. velikost odstřížku/úlomku závisí na druhu materiálu, celkové velikosti a předpokládaném obsahu DNA, např. vystavení UV záření či vysoká teplota snižuje obsah a kvalitu DNA, kdy minimální objem by měl být 1cm³
 - ii. pokud je materiálu dostatek, doporučuje se odebrat materiál minimálně dvakrát
- c. oškrábání povrchu předmětu
 - i. z hladkých povrchů lze pomocí skalpelu oškrábat organický materiál na kousek navažovacího papíru
 - ii. pokud je to možné, měla by zůstat část původního materiálu tzv. neovzorkovaná (pro případné opakování odběru).

Technické doporučení – pokyny pro sterilizaci nástrojů

Nástroje používané k odběru vzorků musí být před použitím sterilizovány pomocí:

- a. dezinfekčních ubrousků napuštěných chlornanem sodným (čistící prostředkem obsahujícím chlornan sodný a hydroxid sodný, např. Savo) či přímým postřikem a následným opláchnutím destilovanou vodou
- b. žáru, kdy se nejdříve použije 96% etanol, do kterého nástroj ponoříme a poté jej sterilizujeme v plamenu (kahan, sirky, zapalovač).

Sterilizaci opakujeme po každém odběru vzorku. Pokud na nástrojích ulpí zbytky odebraného materiálu, je vhodné nástroj vyčistit pomocí detergentu a kartáčku, poté na cca 5 minut ponořit do bělidla, opláchnout destilovanou vodou a nechat uschnout.

Technické doporučení – skladování materiálu pro genetické analýzy

- a. Tkáně (včetně tepelně upraveného masa či čerstvého masa či kůže) lze odebírat do zkumavek a fixovat 96% etanolem. Poté skladovat při pokojové teplotě mimo dosah slunečního záření nebo, pokud je to možné, v mrazáku při -20 °C.
- b. Suché materiály (prášky, sušené maso, kostěné materiály, kůže, chlupy, šupiny) je třeba skladovat ve zkumavkách či uzavíratelných sáčkích na suchém místě, mimo dosah slunečního záření. Ke vzorkům je vhodné přidat několik kuliček silikagelu.
- c. Stěry lze po vysušení skladovat jako jiné suché materiály, případně lze štětičku umístit do zkumavky, fixovat etanolem a skladovat při pokojové teplotě či v mrazícím boxu.
- d. Krev nejlépe fixovat antikoagulantem (EDTA, heparin...) a skladovat při pokojové teplotě nebo v lednici při +4 °C.
- e. Pokud si nebudete jistí způsobem skladování, ve většině případů je možné odebraný materiál zafixovat ethanolem a uchovávat stejným způsobem jako tkáně.

3.2.2 Manipulace s různými typy materiálů a odběr vzorků z těchto materiálů

3.2.2.1 Materiály živočišného původu a výrobky z nich

1. skvrny (krev a jiné tekutiny)

- a. Skvrny na pevných materiálech mohou být odebrány pomocí štětičky nebo oškrábány pomocí sterilního skalpelu.
- b. Skvrny na měkkých a savých materiálech je potřeba odstříhnout (extrakce DNA bude provedena přímo z materiálu).

- c. Odebraný vysušený vzorek skladovat ve zkumavkách nebo uzavíratelných sáčkích při pokojové teplotě. V případě, že vzorek není kompletně suchý, fixovat etanolem a skladovat při pokojové teplotě nebo v mrazáku při -20 °C.

2. chlupy

- a. Chlupy je nutné odebírat i s chlupovou cibulkou, která se poté používá k extrakci DNA.
- b. Extrakci lze provést i z chlupu samotného, ale výtěžnost je minimální.
- c. Odebrané chlupy poté uchovávat ve sterilních uzavíratelných sáčkích se silikagelem při pokojové teplotě nebo v -20°C.
- d. Jsou-li chlupy pokryté tekutinou (krev, sérum apod.), lze zbytky tekutiny odebrat pomocí štětičky nebo smýt pomocí PBS (fosfátového) pufru.
- e. Štětičky uchovávat při pokojové teplotě a případně použitý PBS pufr ve zkumavkách při -20°C.

3. peří

- a. nejvhodnější na extrakci DNA jsou obrysová pera, se silným brkem)
- b. pokud lze na peru najít zbytky tkáně, je třeba odebrat a použít k extrakci DNA tuto tkáň
- c. pokud se na konci pera nachází zbytek krve, opět je vhodné krev použít k extrakci DNA
- d. k extrakci DNA z brku bez krve/tkáně se používá membrána z vnitřku brku
- e. menší prachová pera se používají k extrakci DNA celá, potřeba je odebrat minimálně jedno celé prachové pero
- f. brka, pokud jsou ještě v kůži, je nutné vytrhnout (nestříhat), čímž je zachována špička brku, pro izolaci a případná opakování odebrat 3–4 pera
- g. odebraný materiál skladovat v uzavíratelných sáčkích nebo mikrozkušavkách se silikagelem, při pokojové teplotě

4. zuby, kosti, paroží, slonovina

- a. zuby se buď rozdrtí celé nebo se odvrtá dřev z vnitřku zubu (měla by mít větší výtěžnost než sklovina a zubovina), je potřeba získat cca 1–1,5 ml prášku
- b. z větších kostí, zubů apod. lze odvrtat prášek a použít jej k extrakci, zaměřit se na místa, kde není kost dutá, případně tam, kde vedly cévy
- c. paroží lze odříznout pomocí pilky nebo pilníku
- d. k extrakci se v prvním kroku použije demineralizační pufr (s proteinázou)
- e. pokud se na kosti nachází zbytky tkáně, šlachy, vazy nebo je zachovalá kostní dřev, jsou tyto tkáně vhodným zdrojem DNA a mají větší výtěžnost než kostní tkáň
- f. slonovina je velmi tvrdá a musí být ve většině případů odvrtána vhodnými nástroji, je potřeba odvrtat cca 2–3 cm (1,5 g), záleží na tom, nakolik lze předmět ze slonoviny poškodit; je vhodné předat laboratoři celý předmět a ta zajistí získání potřebného množství materiálu (cca 300–500 mg na izolaci)
- g. odebraný materiál je třeba skladovat v uzavíratelných sáčkích se silikagelem (odlomené části) nebo zkumavkách (prášek) při pokojové teplotě

5. rohy, drápy, paznehty a další keratinové deriváty

- a. v případě drápů (obzvlášť z menších zvířat) je možné je předat do laboratoře vcelku nebo odebrat tenkou vrstvu keratinu z části drápu, která je blíž prstu
- b. keratinové deriváty lze navrtat nebo z nich odlomit/sloupnout/odstříhnout kousek a uchovávat tyto vzorky ve zkumavkách nebo uzavíratelných sáčkích

- c. v případě použití vrtáku, je vhodné snížit otáčky a odebrat „spirálky“, které vzniknou odvrtáváním materiálu
 - d. je potřeba odebrat cca 2–3 cm (1–3 g) rohoviny (odvrtat nebo odlomit) a materiál uchovávat ve zkumavkách nebo uzavíratelných sáčkích při pokojové teplotě
- 6. šupiny**
- a. je potřeba odebrat 1–2 šupiny (u menších druhů zvířat i více), přednostně odebírat šupiny se zbytky kůže, pokud jsou šupiny ve více baleních, odebrat z každého balení alespoň jednu
 - b. uchovávat ve sterilních uzavíratelných sáčkích se silikagelem při pokojové teplotě, pokud je to možné, tak při -20 °C
- 7. kůže a kožešina**
- a. pomocí sterilních nůžek ustříhnout kus kožešiny (cca 5 cm²), k izolaci DNA je potřeba cca 200 mg, pokud možno odebrat větší množství materiálu, pro více izolací
 - b. pokud je potřeba kožešinu co nejméně poškodit, je možné pomocí sterilní pinzety vytrhnout chlupy s chlupovými cibulkami z kožešiny (nestříhat)
 - c. skladovat v uzavíratelných sáčkích se silikagelem při pokojové teplotě nebo ve zkumavkách s 96% etanolem při pokojové teplotě nebo při -20°C
- 8. trus, guáno**
- a. odebrat cca 1–1,5 ml guána do zkumavky
 - b. zafixovat vzorek 96% etanolem a uchovávat při -20 °C, krátkodobě i při pokojové teplotě

3.2.2.2 Potraviny

1. kaviár

- a. pokud se vajíčka (jikry) jeví vzhledem jako homogenní, stačí odebrat dvě jikry z balení, ideální je však odebrat 5–10 kusů pro případné opakování extrakce
- b. pokud se vzhledově jeví jako heterogenní, tj. že mohou pocházet z jiných oblastí nebo od různých druhů ryb, je potřeba odebrat minimálně pět jiker z každého balení
- c. fixovat vzorek 96% etanolem a uchovávat při -20 °C (krátkodobě při pokojové teplotě)

2. maso

- a. opláchnout PBS pufrem, sterilním skalpelem odstranit vrchní vrstvu tkáně (kvůli kontaminaci) a z vnitřních vrstev svalů odříznout cca 2-3 cm² tkáně (cca 0,1 g pro izolaci); v případně celých zvířat je možné odstříhnout periferní části (ucho, špičku ocasu, jazyk)
- b. stejný postup může být použit i u sušeného masa
- c. čerstvé nebo tepelně opracované maso fixovat 96% etanolem a uchovávat při -20 °C (krátkodobě při pokojové teplotě), sušené maso skladovat v uzavíratelných sáčkích nebo zkumavkách se silikagelem při pokojové teplotě

3. alkoholické nápoje

- a. pokud je v alkoholickém nápoji naložené zvíře (zpravidla plaz), je možné k určení druhu odebrat několik milimetrů, ideálně 2–3 cm² tkáně, např. z periferních částí těla, několik šupin
- b. vzorek opláchnout PBS puforem a fixovat 96% etanolem, uchovávat při -20 °C (krátkodobě při pokojové teplotě)

3.2.2.3 Tradiční čínská medicína

1. prášek, tablety a jiné suché přípravky

- a. odebrat do zkumavky cca 1–1,5 ml prášku
- b. uchovávat v suchu, pokojové teplotě, není potřeba mrazit

2. extrakty, maceráty, krémy

- a. odebrat do zkumavky cca 5 ml
- b. uchovávat je lze při pokojové teplotě, není potřeba mrazit

3. žluč, žlučníky

- a. odebrat minimálně 1–1,5 ml prášku či krystalků; v případě celých žlučníků odstříhnout 2–3 cm² tkáně
- b. skladovat v uzavíratelných sáčkích se silikagelem nebo ve zkumavkách při pokojové teplotě

3.2.3 Odběry vzorků pro forenzní analýzy ze živých zvířat

Legální, obdobně jako ilegální obchod se zvířaty může v indikovaných případech vyžadovat odběry biologického materiálu pro genetické analýzy. Základní principy se technicky významně neliší od postupů odběrů vzorků z materiálu neživého. Klíčovou odlišností je fakt, že v řadě případů jsou použité postupy dotčeny dalšími legislativními normami, a to především ustanoveními zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně souvisejících zákonů (tzv. veterinární zákon). Ten mj. určuje (§ 59a) odbornou způsobilost pracovníků provádějících úkony veterinární péče, mezi které odběry materiálu ze živých zvířat (biopsie tkání, krev) patří.

3.2.3.1 Odběr tkání (biopsie)

- a. Odběr tkáně ze živých zvířat (= obratlovců) je invazivní zákrok, který by měl provádět vždy odborník se vzděláním v oblasti manipulace a odběrů vzorků ze živých zvířat (zákon č. 166/1999 Sb.)
- b. U větších druhů zvířat lze k odběru tkáně použít bioptickou jehlu a odebraný kousek tkáně přemístit do zkumavky.

- c. U menších obratlovců, s ohledem na invazivitu zákroku, je vhodné odběr tkáně nahradit odběrem jiného materiálu (krev, bukální stěr, trus – viz níže)
- d. Odebraná tkáň je třeba fixovat 96% etanolem a skladovat při pokojové teplotě nebo při -20 °C.

3.2.3.2 Odběr krve

- a. Krev je cenným a relativně snadno dostupným biologickým materiálem. I tak je její odběr postupem invazivním a odběr krve ze živých zvířat vždy provádí odborník se získanou způsobilostí k manipulaci a odběru vzorků ze živých zvířat (zákon č. 166/1999 Sb.)
- b. Místo vpichu před a po odběru je třeba dezinfikovat.
- c. Krev odebranou pomocí odběrové jehly je nutné skladovat ve zkumavkách s antikoagulantem při pokojové teplotě nebo v lednici při 4 °C; vzorky sražené či nesražené krve je možno fixovat i 96% etanolem nebo mražením.
- d. K fixaci a uskladnění malého množství krve (včetně již sražené), lze využít kartu Flinders Technology Associates (FTA). Tu je třeba skladovat v uzavíratelném sáčku na suchém místě, mimo dosah slunečního světla.

3.2.3.2 Odběr bukálního stěru

- a. Odběr bukálního stěru u živých zvířat provádí odborník zaškolený na manipulaci s živými zvířaty.
- b. Bezprostředně před odběrem bukálního stěru by odebírané zvíře nemělo požívat potravu, ani například olizovat jiné zvíře, aby se zabránilo kontaminaci stěru.
- c. Sterilním vatovým tamponem lze odebrat buňky z vnitřní strany tváře nebo dásně, v případě nutnosti použít tupý nástroj k otevření tlamy (dřevěnou špachtli, lžící apod.).
- d. Odebraný a vysušený tampón lze skladovat při pokojové teplotě či v lednici při +4 °C. Čerstvý stěr na konci vatového tampónu lze odlomit do zkumavky, fixovat etanolem a skladovat při pokojové teplotě či při -20 °C.

3.2.3.3 Využití vzorků trusu pro genetické analýzy

- a. Trus zvířat obvykle obsahuje dostatečné množství hostitelské DNA využitelné pro forenzní analýzy. Pokud možno trus sbírejte co nejčerstvější, nejlépe s pomocí sterilních rukavic, sterilní pinzety či jiných sterilních nástrojů.
- b. Nasbíraný trus fixujte 96% etanolem a skladujte při pokojové teplotě nebo v mrazáku při -20 °C. Popřípadě lze trus vysušit na filtračním papíře, přemístit do zkumavek a skladovat se silikagelem při pokojové teplotě.

3.2.3.4 Ostatní typy vzorků

1. Ryby

- a. Při stěru z povrchu těla pomocí sterilní štětičky nebo tampónu – jemně setřete sliz z povrchu těla, směrem od žaber k ocasní ploutvi. Stěr před extrakcí skladujte ve sterilní zkumavce při -20 °C.
- b. Ustřížení části ocasní ploutve (0,5 cm průměr). Takovýto vzorek lze skladovat vysušený na filtračním papíře či v papírové obálce (při pokojové teplotě) nebo lze fixovat 96% etanolem ve zkumavce, při pokojové teplotě nebo při -20°C.
- c. Pokud není možné vzorkovat přímo zvířata, odeberte vzorek vody z nádoby, ve které jsou ryby umístěny – cca 50 ml vody do sterilní zkumavky. Následně je třeba vzorek důkladně promíchat a odebrat z nádoby 1,5–15 ml vody. Vzorek je nutné ihned zmrazit na -20 °C nebo zafixovat pomocí acetátu sodného a 96% etanolu (15 ml vody, 1,5 ml acetátu a 33 ml etanolu). Před laboratorním zpracováním uchovávat vzorek při teplotě - 20 °C v podmínkách bez přístupu světla a zpracovávat nejdříve po 24 hodinách. Tento postup předpokládá, že v nádrži není směs více druhů ryb a měl by jej tak provádět pracovník zkušený v identifikaci.

2. Obojživelníci (červoři, ocasatí, žáby)

- a. Bukální stěr proveďte sterilní štětičkou v tlamě po dobu minimálně 5 vteřin. Skladujte stěr před extrakcí ve sterilní zkumavce při - 20 °C nebo v suché obálce.
- b. Stěr z těla pomocí sterilní štětičky nejlépe zhotovte ze spodní strany těla (směrem od zadních končetin k předním). Skladujte stěr před extrakcí v 96% etanolu při - 20 °C.
- c. Pokud není možné vzorkovat přímo zvířata, je možné odebrat vzorek vody z nádoby, ve které jsou obojživelníci umístěni (viz část 1. c).

3. Plazi

- a. Při stěru z kloaky vložte stěrku do kloaky cca 5 mm hluboko a krouživými pohyby setřete buňky ze sliznice kloaky. Stěr uchovávejte v 96% etanolu při -20 °C.
- b. Ze svlečené kůže (exuvie) je možné odebrat malý kousek (zvláště vhodné u drobných či jedovatých druhů). Ze svlečené kůže plaza odstříhněte přibližně 5 cm² a skladujte v suchu v uzavíratelném sáčku, při pokojové teplotě až do extrakce.
- c. Vejce vzorkujeme v případě vylíhnutého mláděte nebo z neživotaschopného vejce. Pinzetou odebrat blanku zevnitř vejce – přibližně 1 cm, skladujeme v suchém sáčku se silikagelem nebo ve zkumavce s 96% etanolem.

4. Ptáci

- a. Peří lze vzorkovat z vypelichaných per nebo opatrně jedním pohybem vytrhnout několik per z horní části hlavy nebo prsou. Vzorek je třeba uchovávat v uzavíratelném sáčku se silikagelem při pokojové teplotě.
- b. Vejce je třeba vzorkovat v případě vylíhlého mláděte nebo je-li vejce neživotaschopné. Pinzetou odebrat blanku zevnitř vejce (přibližně 1 cm), a uskladnit v suchém sáčku se silikagelem nebo ve zkumavce s 96% etanolem.

5. Savci

- a. Chlupy: vytrhnout 10–15 chlupů s chlupovým váčkem (nestříhat). Uchovávejte v sáčku se silikagelem při pokojové teplotě.
- b. Nehty a drápy je třeba ustříhnout přibližně v délce 1–1,5 cm a uchovávat v sáčku se silikagelem. Uchovávejte v suchu v pokojové teplotě. Před extrakcí DNA pak sterilním nožem nakrájet na 1,5 mm kousky.

3.3 Metody odběru vzorků pro pozdější parazitologické vyšetření

Parazitismus patří k dominantním formám koexistence organismů a je obvykle klasifikován jako soužití, kdy jeden organismus žije na úkor druhého. Podle dostupných odhadů diverzita parazitů zřejmě převyšuje diverzitu jejich hostitelů a není tak nijak překvapivé, že zřejmě každý druh zvířete je kolonizován jedním, nebo častěji i více druhy parazitů. Hlavním atributem diverzity parazitů je jejich asociace s konkrétními druhy hostitelů, označovaná jako hostitelská specifita. Ta je obvykle definována jako úzká v situacích, kdy je konkrétní druh parazita nalézán jen u jednoho nebo několika příbuzných hostitelů. Zatím co parazité s tzv. jednohostitelským nebo přímým vývojem nevyžadují více než jednoho hostitele, vícehostitelské druhy parazitů cyklují v různě komplikovaných vývojových cyklech mezi různými druhy hostitelů.

Geografické rozšíření těchto vícehostitelských parazitů je potom často evolučně vázáno na konkrétní prostředí, ve kterém tento vztah vznikl a kde existují jeho komponenty. Takové druhy parazitů se potom typicky vyskytují u zvířat pocházejících z volné přírody a jsou využitelné v situacích, kdy je původ živočicha z nějakých důvodů nejasný nebo úmyslně uvedený odlišně od reality. Zdokumentovaná přítomnost parazitů toho typu je pak forenzním nástrojem využívaným v zahraničí pro dokumentování ilegálního obchodu se zvířaty.

Pro odběry vzorků pro parazitologická vyšetření jsou logicky prioritizovány postupy s minimální invazivitou pro sledovaného jedince, jako je vyšetření a odběry z povrchu těla, dostupných sliznic, odběry trusu, případně moči. V indikovaných případech je možné přistoupit k odběrům krve nebo jiného biotického materiálu. Specifickou součástí materiálu odebraného pro forenzní účely jsou vzorky parazitických členovců z povrchu těla zvířete (blechy, klíšťata, vši a všenky).

3.3.1 Odběry vzorků pro parazitologické analýzy z předmětů živočišného původu

Materiál a předměty živočišného původu (tkáň, kůže) mohou obsahovat zbytky mikroskopických endopazitů (nebo jejich DNA) využitelné pro analýzy původu. Nejčastěji využitelným materiálem je svalovina, vnitřní orgány nebo jejich části a jakýkoli další materiál obsahující krev nebo tělní tekutiny. Ve většině případů postupujeme stejně jako při odběru materiálu pro genetické analýzy zacílené na genetické určení hostitele dle následujících postupů. Kůže, kožešiny a vzorky peří pak mohou obsahovat vnější parazity (= parazitické členovce).

1. Orgány, tkáň, krev a další tělní tekutiny

- a. Vzorky odebíráme dle jejich podstaty pomocí štětičky, pinzety nebo sterilního skalpelu, případně injekční stříkačky nebo jednorázové plastové pipety ideálně s přidaným silikagelem.
- b. Pochází-li vzorek z vysušeného materiálu, je možné jej skladovat ve zkumavkách nebo uzavíratelných sáčkích při pokojové teplotě. V případě, že vzorek není kompletně suchý, fixovat 96% etanolem a skladovat při pokojové teplotě nebo v mrazáku při -20 °C.

- c. Vzorky tkání je možné fixovat souběžně i v 10% formalínu (= 4% formaldehyd) pro případné histologické vyšetření. Vzorky fixované tímto způsobem ale prakticky nejde dále využít k molekulárně biologickým vyšetřením.

2. Peří, chlupy a kůže zvířat

- a. Vzorky kožních derivátů nebo povrch nepoškozené kůže prohlížíme s využitím lupy nebo stereomikroskopu.
- b. Vizually detekovatelné členovce nebo části jejich těl sesbíráme jemnou pinzetou, preparační jehlou nebo podobným nástrojem.
- c. V případech, kdy jsou pozorováni členovci pevně přichyceni na kožních derivátech (např. vši a všenky na srsti nebo všenky a péřoví roztoči na peří), odebíráme vzorek odstřížením chlupů nebo části per.
- d. Pochází-li vzorek z vysušeného materiálu, je možné jej skladovat ve zkumavkách nebo uzavíratelných sáčkích při pokojové teplotě. V případě, že vzorek není kompletně suchý, fixovat 96% etanolem a skladovat při pokojové teplotě nebo v mrazáku při -20 °C.

3.3.2 Odběry vzorků pro parazitologické analýzy z živých případně mrtvých celých zvířat

V podstatě každý živý organismus může být kolonizován různě širokým spektrem parazitických organismů. Jejich identifikace může přinést velmi cenné poznatky, materiál pro parazitologická vyšetření vyžaduje specifické postupy odběru a skladování (a následných analýz). V případě práce s uhynulým jedincem (např. při úhynech v rámci hromadných zásilek menších druhů obratlovců) se pro vyšetření do laboratoře odesílá celý jedinec. V případech, kdy je materiál možno doručit během téhož nebo následujícího dne, se kadáver zvířete ve vhodném obalu jen schladí na 4–5 °C a přepravuje na ledu nebo v chladicím boxu. Delší skladování a přeprava je možné jen ve zmraženém stavu.

Základní principy se významně neliší od postupů odběrů vzorků z materiálu neživého. Odběry ze živých zvířat metodicky rozlišují invazivní a neinvazivní postupy. V případě invazivních odběrů jsou použité postupy dotčeny dalšími legislativními normami, a to především ustanoveními zákona č. 166/1999 Sb., o veterinární péči a o změně souvisejících zákonů (tzv. veterinární zákon). Ten mj. určuje (§ 59a) odbornou způsobilost pracovníků provádějících úkony veterinární péče, mezi které odběry materiálu ze živých zvířat (biopsie tkání, krev) patří. S ohledem na bezpečnost a welfare zvířat, která jsou předmětem šetření, je třeba zajistit, že všechny úkony budou aktuálně prováděny pro daný druh pomocí nejšetrnější známé metody.

V případě zadržených jedinců a jejich přechodného umístění (např. v záchraném centru) by odběr biologických vzorků měl být součástí vstupní a pokračující veterinární péče o zadržená zvířata. Zejména v takových případech je třeba potřeby možného forenzního šetření zohlednit a část odebraných vzorků správným způsobem uskladnit.

Některé druhy parazitů mohou ohrozit zdraví nebo životy deponovaných zvířat a jejich likvidace, resp. terapie souvisejících stavů a je základním kamenem veterinární péče o takováto zvířata. V těchto případech je nutné vzorky odebrat před začátkem aplikace antiparazitární terapie!

3.3.2.1 Odběr tkání (biopsie)

Odběr tkání pro parazitologická vyšetření je invazivní metoda, ke které je možno sáhnout jen v krajních případech.

- a. Odběr tkáně ze živých zvířat (= obratlovců) je invazivní zákrok který by měl provádět vždy odborník se vzděláním v oblasti manipulace a odběrů vzorků ze živých zvířat (zákon č. 166/1999 Sb.)
- b. U větších druhů lze k odběru tkáně použít bioptickou jehlu, odebraný kousek tkáně přemístíte do zkumavky.
- c. U menších obratlovců je s ohledem na invazivitu zákroku odběr tkáně vhodné nahradit odběrem jiného materiálu (krev, bukalní stěr, trus – viz níže)
- d. Odebraná tkáň je třeba fixovat 96% etanolem a skladovat buď při pokojové teplotě nebo při -20 °C.

3.3.2.2 Odběr krve

- a. Krev je cenným a relativně snadno dostupným biologickým materiálem. Obvykle je odebírána jako součást klinické diagnostiky. I tak je její odběr postupem invazivním a odběr krve ze živých zvířat by měl provádět vždy provádět odborník proškolený na manipulaci a odběr vzorků z živých zvířat (zákon č. 166/1999 Sb.)
- b. Místo vpichu před a po odběru je nutné vydezinfikovat.
- c. Krev odebranou pomocí odběrové jehly uchovávat ve zkumavkách s antikoagulantem při pokojové teplotě nebo v lednici při 4 °C; vzorky sražené či neražené krve je možno fixovat i 96% etanolem nebo mražením.
- d. K fixaci a uskladnění malého množství krve (včetně již sražené) lze také využít kartu Flinders Technology Associates (FTA) a poté ji vložit do uzavíratelného sáčku a ponechat na suchém místě, mimo dosah slunečního světla.
- e. K identifikaci parazitů a odhadu jejich množství je vhodné zhotovit i krevní roztěr standardními postupy, tj. na mikroskopické sklíčko.

3.3.2.3 Podkožní parazité

Přítomnost larválních stádií helmintů v podkoží zvířat je s ohledem na identifikaci původu zvířat jednou z klíčových indikací původu z volné přírody.

- a. Přítomnost parazitů v podkožní tkáni obvykle doprovází formování různě velkých zduření s pevným nebo fluktuujícím obsahem.
- b. Parazity z takovýchto povrchových změn vyjme veterinární lékař po jemném nastřížení kůže a vybavení obsahu léze.
- c. Odstraněné helminty nebo jejich části fixujeme v 96% etanolu pro pozdější identifikaci.

3.3.2.4 Parazité z povrchu těla

Parazitictí členovci a další ektoparazité patří k nejcennějším forenzním nálezům a jejich přítomnost na kůži a kožních derivátech (šupiny, chlupy, peří atd.) zvířat je jednou z klíčových indikací původu zvířete z volné přírody. Vysokou indikativní hodnotu mají např. klíšata, larvy dvoukřídlého hmyzu a pijavice.

- a. Přítomnost parazitických členovců nebo jiných vnějších cizopasníků obvykle odhalí veterinární lékař při vstupní veterinární prohlídce.
- b. Pro kontrolu povrchu kůže je vhodné využít lupu; zvíře musím být patřičně znehybněno, aby se vyloučila možnost jeho poranění, případně poranění vyšetřující osoby.
- c. Pozornost je třeba věnovat veškerým záhybům kůže, ušnímu otvoru a jeho okolí, zevnímu zvukovodu savců, okolí očí, okolí análního otvoru a genitálu. V případě sledování želv je nezbytné zkontrolovat i prostor při bázi krku, končetin a ocasu, který je obvykle velmi těžko dostupný. Právě na těchto místech jsou přichycena klíšata nebo u vodních plazů pijavice.
- d. Vizually detekované členovce nebo části jejich těl sesbíráme jemnou pinzetou preparační jehlou nebo podobným nástrojem. Při odstraňování pevně přichycených členovců je třeba je nepoškodit.
- e. Jsou-li pozorovaní členovci pevně přichyceni na kožních derivátech, např. vši a všenky na srsti nebo všenky a péřoví roztoči na peří, lze odebrat vzorek odstřížením chlupů nebo části per
- f. Je-li možná doprava do specializované laboratoře v rámci téhož dne, odebrané členovce je možné vkládat do zkumavek nebo uzavíratelných sáčků při pokojové teplotě. V případě delšího transportu fixovat ve vhodných epruvetách 96% etanolem a skladovat při pokojové teplotě nebo při -20 °C.

3.3.2.5 Odběry vzorků trusu pro parazitologické analýzy

Trus zvířat je klíčovým materiálem pro neinvazivní sledování výskytu vnitřních parazitů v organismu zvířete. Trusem se do vnějšího prostředí dostávají stadia parazitů trávicího traktu, stejně jako parazité dýchacího aparátu, jater a krevního systému.

- a. Trus pro parazitologická vyšetření je třeba sbírat čerstvý, ještě před jeho vyschnutím, s pomocí sterilních rukavic, sterilní pinzety či jiných sterilních nástrojů.

- b. U menších zvířat odebíráme celý exkrement, u větších zvířat pak objem odpovídající odhadnuté hmotnosti 5–20 gramů.
- c. Vzorek odebraného trusu je vhodné dopravit do laboratoře k dalšímu vyšetření v čerstvém stavu, po přechodném zchlazení na 4–5 °C.
- d. Před vlastním parazitologickým vyšetřením je vhodné alikvotní část vzorku uchovat pro pozdější genetické analýzy, a to fixací 96% etanolem. Takový vzorek je možno skladovat při pokojové teplotě nebo při -20 °C.

3.3.2.6 Ostatní typy vzorků

V případě skupinových nebo individuálních zásilek zvířat má klíčový význam kontrola a případné uschování přepravních obalů. Ty obsahují cenné vzorky trusu, kožní deriváty (srst, peří, exuvie plazů) a v neposlední řadě i ektoparazity, zvláště členovce, kteří opustili povrch těla zvířat. Vysokou indikativní hodnotu pro forenzní sledování mají např. klíšťata a pijavice.

- a. Vizually detekovatelné členovce či jiné živočichy, nebo části jejich těl, je potřeba sbírat jemnou pinzetou, preparační jehlou nebo podobným nástrojem. Při odstraňování pevně přichycených členovců je třeba je nepoškodit.
- b. Je-li možná doprava do specializované laboratoře v rámci téhož dne, odebrané členovce je možné vkládat do zkumavek nebo uzavíratelných sáčků při pokojové teplotě. V případě delšího transportu fixovat ve vhodných epruvetách 96% etanolem a skladovat při pokojové teplotě nebo při -20 °C.
- c. Vysokou pozornost je třeba věnovat kontrole materiálu, kterým jsou přepravní boxy vybaveny, stejně jako přepravním obalům jako takovým. Klíčová je důkladná kontrola záhybů a skulin v kartonových nebo dřevěných obalech apod.
- d. V případech, kde je to možné, je do specializované laboratoře vhodné dopravit obaly nebo materiál z přepravních boxů, uzavřený v nepropustných plastových sáčcích. V takových případech je třeba věnovat maximální pozornost zabránění úniku pohyblivých členovců, s využitím vícenásobných obalů.

3.4 Metody odběru vzorků pro pozdější mikrobiologické vyšetření

Mikrobiologická vyšetření mohou pomoci s řešením různých problémů. Mimo odhalení potencionálně nebezpečných mikroorganismů je lze provádět i za dalšími účely. Složení mikrobiálních populací (takzvaný mikrobiom) na povrchu i uvnitř těl různých jedinců je velmi specifické, a to jak na úrovni druhů, tak i na úrovni populací, a dokonce i jedinců. Některé složky mikrobiomu jsou získávány během narození nebo velmi brzy po něm a ukazují tedy na původ daného jedince. Tyto složky se mohou lišit v závislosti na lokalitě odkud jedinec pochází a mohou odlišovat i jedince chované v zajetí o jedince z volné přírody. Jiné složky mikrobiomu jsou velmi proměnlivé a ukazují na nedávné zacházení s biologickým materiálem nebo zkoumaným zvířetem, mohou pomoci odhalit kontakt mezi různými materiály nebo různými jedinci a podobně.

Při odběru vzorku pro mikrobiologická vyšetření u živých zvířat jsou prioritizovány postupy s minimální invazivitou pro sledovaného jedince, jako je vyšetření a odběry z povrchu těla, dostupných sliznic, odběry trusu, případně moči. V indikovaných případech je možné přistoupit k odběrům krve nebo jiného biotického materiálu. Specifickou součástí materiálu odebraného pro forenzní účely jsou vzorky mikroorganismů z parazitických členovců z povrchu těla zvířete (blechy, klíšťata, vši a všenky).

K mikrobiologickému vyšetření je možné využívat široké spektrum metod od přímého pozorování daných mikroorganismů za využití různých mikroskopů, přes kultivaci těchto mikroorganismů v laboratoři, až po různé molekulárně biologické a biochemické analýzy. Vzhledem k jejich robustnosti, velké vypovídající hodnotě a poměrně snadnému provedení se poslední době nejčastěji využívají právě tyto molekulárně biologické a biochemické analýzy. Nejvyužívanějším je genetické vyšetření těchto mikroorganismů. Níže popsaná metodika odběru a skladování vzorků počítá s jejich pozdějším genetickým vyšetřením.

Důležitou věcí, kterou je nutné si v této souvislosti uvědomit je to, že ačkoliv všechny eukaryotické mikroorganismy, bakterie a část virů používají k ukládání genetické informace poměrně stabilní molekulu DNA, některé viry, a to včetně významných lidských a zvířecích patogenů, používají molekulu RNA. Ta je méně stabilní a pokud se do budoucna plánuje vyšetřit vzorek i na takovéto RNA viry, je nutné jej odebírat a skladovat odpovídajícím způsobem.

3.4.1 Odběry vzorků pro mikrobiologické analýzy ze živých zvířat

3.4.1.1 Odběr tkání (biopsie)

- a. Odběr tkáně ze živých zvířat (= obratlovců) je invazivní zákrok který by měl provádět vždy odborník se vzděláním v oblasti manipulace a odběrů vzorků ze živých zvířat (zákon č. 166/1999 Sb.)
- b. U větších druhů lze k odběru tkáně použít biotickou jehlu, odebraný kousek tkáně přemístíte do zkumavky.
- c. U menších obratlovců je s ohledem na invazivitu zákroku odběr tkáně vhodné nahradit odběrem jiného materiálu (krev, bukalní stěr, trus – 3.4.1.2-4)
- d. Odebraná tkáň fixovat 96% etanolem a skladovat buď při pokojové teplotě nebo při -20 °C.
- e. V případě plánovaného vyšetření RNA virů je vzorek nutno co nejdříve hluboce zmrazit (na teplotu okolo -80°C). Pokud toto není možné, vzorek je třeba odebrat do speciálních roztoků, které zvyšují stabilitu RNA a uchovávat jej v nich podle instrukcí výrobce.

3.4.1.2 Odběr krve

- a. Krev je cenným a relativně snadno dostupným biologickým materiálem. I tak je její odběr postupem invazivním a odběr krve ze živých zvířat by měl provádět vždy

provádět odborník proškolený na manipulaci a odběr vzorků z živých zvířat (zákon č. 166/1999 Sb.)

- b. Místo vpichu před a po odběru je třeba vydezinfikovat.
- c. Krev odebranou pomocí odběrové jehly skladovat ve zkumavkách s antikoagulantem při pokojové teplotě nebo v lednici při 4 °C; vzorky sražené či neražené krve je možno fixovat i 96% etanolem nebo mražením.
- d. K fixaci a uskladnění malého množství krve (včetně již sražené) lze také využít kartu Flinders Technology Associates (FTA). Tu poté skladovat v uzavíratelném sáčku na suchém místě mimo dosah slunečního světla.
- e. V případě plánovaného vyšetření RNA virů je z odebrané krve nutné co nejdříve separovat sérum, a to následně hluboce zmrazit (na teplotu okolo -80°C). Pokud toto není možné, je nutné sérum odebrat do speciálních roztoků, které zvyšují stabilitu RNA a uchovávat je v těchto roztocích podle instrukcí výrobce.

3.4.1.3 Odběr bukálního stěru

- a. Odběr bukálního stěru u živých zvířat provádí odborník proškolený na manipulaci s živými zvířaty.
- b. Bezprostředně před odběrem bukálního stěru by odebírané zvíře nemělo požívat potravu, ani například olizovat jiné zvíře, aby se zabránilo kontaminaci stěru.
- c. Sterilním vatovým tamponem lze odebrat buňky z vnitřní strany tváří nebo dásně, v případě nutnosti použít tupý nástroj k otevření mordy/tlamy (dřevěnou špachtli, lžíci apod.).
- d. Odebraný a vysušený tampón lze skladovat při pokojové teplotě či v lednici při +4 °C. Čerstvý stěr na konci vatového tampónu lze odlomit do zkumavky, fixovat etanolem a skladovat při pokojové teplotě či při -20 °C.
- e. V případě plánovaného vyšetření RNA virů je vzorek nutno co nejdříve hluboce zmrazit (na teplotu cca -80 °C). Pokud toto není možné, je nutné vzorek odebrat do speciálních roztoků, které zvyšují stabilitu RNA a uchovávat jej v těchto roztocích podle instrukcí výrobce.
- f. Další variantou je odběr bukálních stěrů do speciálních médií, které jsou přímo určeny k další analýze na RNA viry.

3.4.1.4 Využití vzorků trusu pro mikrobiologické analýzy

- a. Trus zvířat obvykle obsahuje dostatečné množství hostitelské i mikrobiální DNA a RNA využitelné pro forenzní analýzy. Pokud je to možné, trus sbírejte co nejčerstvější, nejlépe s pomocí sterilních rukavic, sterilní pinzety či jiných sterilních nástrojů.
- b. Vzorek trusu je potřeba fixovat 96% etanolem a skladujte při pokojové teplotě nebo v mrazáku při -20 °C. Popřípadě lze trus vysušit na filtračním papíře, přemístit do zkumavek a skladovat se silikagelem při pokojové teplotě.

- c. V případě plánovaného vyšetření RNA virů je vzorek nutno co nejdříve hluboce zmrazit (na teplotu cca -80 °C). Pokud toto není možné, je nutné vzorek odebrat do speciálních roztoků, které zvyšují stabilitu RNA a uchovávat jej v těchto roztocích podle instrukcí výrobce.

3.4.2 Odběry vzorků pro mikrobiologické analýzy z materiálů živočišného původu

V případě odběrů vzorků z materiálu biologického původu je nutné si uvědomit, že vysoce zpracované materiály, např. vyčíněné kůže nebo vysoce zpracované potraviny atd., již nebudou pravděpodobně obsahovat žádné mikroorganismy, které by pocházely z původního biologického zdroje. Naopak čerstvý biologický materiál (např. sirové maso, kaviár atd.) může stále obsahovat mikroorganismy o podobném složení jako u živého jedince.

- a. Při odběru takovýchto vzorků se postupuje podobně, jako při odběru tkání z živých zvířat
- b. Při odběru hlenu nebo jiného mukózního materiálu se postupuje jako při odběru bukalního stěru

3.4.3 Odběr environmentálních vzorků

K mikrobiologickému vyšetření jde používat i environmentální vzorky, které pochází z míst, kde se zkoumaný jedinec po nějakou dobu nacházel. V takovém případě je nutno zvážit, zda v konkrétních podmínkách nemohlo dojít ke kontaminaci vzorků i od jiných jedinců, kteří toto prostředí sdíleli nebo kteří se vyskytovali v jiném, blízkém a částečně propojeném prostředí. V některých případech, např. při plánovaném využití mikrobiomu pro identifikaci jednice či jeho životní historie, je možnost takových kontaminací tak důležitá, že environmentální vzorky využít nejde nebo pouze v případě, že je kontaminace vyloučena. V takovém případě je tedy vhodné odebírat environmentální vzorky pouze z prostředí (např. klecí), které bylo před umístěním zkoumaného jedince důkladně vyčištěno. V jiných případech, například při detekci patogenů u zvířat, které spolu byla v předchozím těsném kontaktu, je naopak výhodou odebírat směsný vzorek obsahující vzorky pocházející s nejvyšší pravděpodobností od všech těchto zvířat a v případě pozitivního nálezu pak se všemi zvířaty nakládat jako by byla infikována.

3.4.3.1 Odběr vody

- a. Vodu odebíráme s využitím sterilní pipety.
- b. Je vhodné odebrat vzorek obsahující i možné usazeniny na dně nádrže
- c. K analýzám odeberte alespoň 1ml vzorku vody, pokud možno, odeberte z jedné nádrže více vzorků
- d. Odebranou vodu a skladujte ve sterilních zkumavkách buď při pokojové teplotě nebo při -20 °C.

- e. V případě plánovaného vyšetření RNA virů je vzorek nutné co nejdříve hluboce zmrazit (na teplotu okolo -80 °C). Není-li možno zajistit tuto adjustaci, je třeba vzorek odebrat do speciálních roztoků, které zvyšují stabilitu RNA a uchovávat jej v těchto roztocích podle instrukcí výrobce.

3.5 Dokumentace a značení vzorků

Při odběru vzorků je vždy nutné zjistit co nejvíce doplňujících informací k danému vzorku.

- a. Důležitými informacemi jsou informace o osobě, která materiál převážela nebo přechovávala nebo jej odesílala či které byl určen, údaje o zemi původu materiálu, o transportní cestě, o délce transportu, o druhu zvířete, ze kterého materiál pochází (pokud je deklarován nebo jej lze zjistit na místě morfologicky), o typu a množství odebraného vzorku a podobně.
- b. Je vhodné doplnit tyto sebrané informace o fotodokumentaci materiálu, i odebraného vzorku.
- c. Odebrané vzorky je nutno řádně označit správným, unikátním a předem domluveným způsobem značení, který zaručí pozdější jednoznačnou identifikaci vzorku, umožní spojení vzorku s ostatními sebranými informacemi a vyloučí jakoukoliv záměnu vzorku za jiný. Značení musí být dostatečně trvalé, aby přečkalo převoz i dlouhodobé skladování vzorku.
- d. K označování vzorků přepravovaných nebo uložených v etanolu je nezbytné používat značení odolávající účinkům etanolu. Pro tyto účel jsou k dispozici speciální popisovače nebo lze využít štítky s čárovým kódem.

4. Technické přílohy

4.1 přehled spotřebního materiálu k zajištění odběru vzorků

Dostatečné technické vybavení je nezbytnou součástí realizovaných odběrů. V případě odběrů většího množství vzorků nebo vzorků z většího množství jedinců je třeba počítat s tím, že vlastní nástroje použitelné pro odběry jsou využitelné jen pro jednoho jedince. Sety nástrojů tak musí obsahovat větší počty kusů. Před každým odběrem je třeba zajistit nejen mikrobiologickou sterilitu, ale vyloučit také přítomnost kontaminativní DNA.

Odběrové nástroje:

- sterilní nůžky chirurgické rovné 15-18 cm
- sterilní nůžky oční rovné 10-12 cm
- anatomická pinzeta 12-16 cm
- anatomická pinzeta jemná 10-12 cm
- skalpelové čepelky

- bioptická punkční jehla
- injekční stříkačky 1, 2, 5 a 10 ml
- injekční jehla 22 G
- injekční jehla 21 G
- inzulinová stříkačka s jehlou

Spotřební plast:

- plastové zkumavky typu eppendorf nebo podobné 1-2,5 ml
- plastové odběrové zkumavky o objemech 5-50 ml
- PET sáčky s uzávěrem (zip), různé velikosti
- odběrové zkumavky s EDTA

Chemikálie:

- 96% ethanol
- silikagel
- roztoky zvyšující stabilitu RNA (např. RNAlater nebo RNashield)
- sterilní virové transportní médium

Ostatní:

- sterilní vatové tampony
- sterilní rukavice, roušky, respirátory, brýle, obličejové štíty a další OOPP
- filtrační papír
- FTA karta

5. Srovnání novosti postupů a popis uplatnění metodiky

V současné době neexistuje žádný jednoduchý systém efektivního postupu odběrů materiálu ze zadržených nebo nalezených živočichů spadajících pod ochranu CITES, orgány státní správy. V České republice je podle zákona č. 100/2004 Sb. speciálním kontrolním orgánem pro CITES Česká inspekce životního prostředí (ČIŽP), která je členěna na ředitelství v Praze a deset oblastních inspektorátů (Praha, Brno, Plzeň, České Budějovice, Ústí n. L., Liberec, Hradec Králové, Havlíčkův Brod, Olomouc a Ostrava). S ohledem na odbornou náročnost kontrol a nutnost specializace byla v roce 2003 problematika CITES vyčleněna do samostatného útvaru na ředitelství ČIŽP, který se věnuje pouze problematice ochrany ohrožených druhů živočichů a rostlin. Kontrolní činnost je zaměřena na mezinárodní transakce (dovozy a vývozy) i na vnitrostátní aktivity (prodej, chov, odchyt, sběr z přírody atd.).

Celní orgány jsou podle nařízení (ES) č. 338/97 a zákona č. 100/2004 Sb. také, vedle inspekce, oprávněny provádět kontrolu exemplářů při celním dohledu v okamžiku dovozu, vývozu, zpětného vývozu a tranzitu. Ve spolupráci s orgánem veterinární správy nebo orgánem rostlinolékařské péče celní orgány také kontrolují, zda exemplář odpovídá údajům uvedeným na dokladech CITES a stanoveným veterinárním a rostlinolékařským podmínkám. Celní orgány jsou oprávněny zadržet exempláře, pokud zjistí porušení nařízení (ES) č. 338/97 nebo zákona č. 100/2004 Sb. anebo v případě pochybností. Po zadržení exempláře celní orgány neprodleně informují inspekci. Bez speciálních znalostí či dostupného jednotného metodického postupu je problematika jednoznačné determinace zdlouhavá a aby se vyloučilo riziko nesprávného postupu a omylů je třeba následné účasti odborníků. Pro efektivní, jednoduchou a přesnou determinaci chybí ověřené nástroje (zoologické klíče, příručky, certifikované metodiky, atlasy, manuály). Poptávka ze strany celních orgánů tedy existuje, lze očekávat zájem i od dalších státních orgánů, dále univerzit vyučujících příslušnou problematiku, navíc se zahraničním přesahem, a to nejen do sousedních států EU.

6. Ekonomické aspekty

Metodika nastavuje zásady práce s biologickým materiálem získaným ze zvířat pro forenzní účely s cílem regulace environmentální kriminality související s obchodem s ohroženými druhy živočichů. Vyčíslení přímého ekonomického dopadu není reálné. Správné využívání popsané metodologie zvýší úspěšnost realizovaných analýz a ve finále se tak promítne do snížené ekonomické náročnosti popisovaných forenzních postupů.

7. Literatura

- Animal Care and Use Committee (1998). Guidelines for the capture, handling, and care of mammals as approved by the American Society of Mammalogists. *Journal of Mammalogy*, 79(4): 1416-1431.
- Bartolozzi, L., & Werner, K. (2004). Illustrated Catalogue of the Lucanidae from Africa and Madagascar. Taita Publishers, Hradec Králové, 191 pp.
- Guidelines on Methods and Procedures for Ivory Sampling and Laboratory Analysis (Global Programme for Combating Wildlife and Forest Crime, Sustainable Livelihoods Unit, UN Office on Drugs and Crime Vienna, 2014.
- Challender, W. S., Hoffmann, M., Hoffmann, R., Cremona, P., Hilton-Taylor, C., Jenkins, R. K. B., Malsch, K., Conde, D., De Meulenaer, T. (2019). Criteria for CITES species protection. *Science*, 346 (6437): 247.
- Kovařík, F. (2009). Illustrated catalog of Scorpions. Part I. Introductory remarks; keys to families and genera; subfamily Scorpioninae with keys to Heterometrus and Pandinus species. *Clarion Production*, Prague, 170 pp.
- Lester, R.J.G. MacKenzie, K (2009). The use and abuse of parasites as stock markers for fish. *Fisheries Research* 97:1-2.
- Lin, B., Dietrich, M. L., Senior, R. A., & Wilcove, D. S. (2021). A better classification of wet markets is key to safeguarding human health and biodiversity. *The Lancet Planetary Health*, 5(6), e386-e394.
- Linacre, A. M., & Tobe, S. S. (2013). Wildlife DNA analysis. In: A. M. T. Linacre, S.S. Tobe: Wildlife DNA Analysis: Applications in Forensic Science, Wiley, Chichester, UK, doi:10.1002/9781118496411 .
- Lyons, J. A., & Natusch, D. J. (2011). Wildlife laundering through breeding farms: illegal harvest, population declines and a means of regulating the trade of green pythons (*Morelia viridis*) from Indonesia. *Biological Conservation*, 144(12), 3073-3081.
- MacKenzie, K. (2002) Parasites as biological tags in population studies of marine organisms: an update. *Parasitology*, 124(07), 153-163.
- Moré, G., Pantchev, N., Herrmann, D. C., Vrhovec, M. G., Öfner, S., Conraths, F. J., & Schares, G. (2014). Molecular identification of *Sarcocystis* spp. helped to define the origin of green pythons (*Morelia viridis*) confiscated in Germany. *Parasitology*, 141(5), 646-651.
- Nakae, M. (2021). Papilionidae of the World. Roppon – Ashi Entomological Books, Tokyo, 336 pp.
- Nellemann et al., 2014. (Eds). The Environmental Crime Crisis – Threats to Sustainable Development from Illegal Exploitation and Trade in Wildlife and Forest Resources. A UNEP Rapid Response Assessment. United Nations Environment Programme and GRID-Arendal, Nairobi and Arendal, www.grida.no).

- Phelps, J., Biggs, D., & Webb, E. L. (2016). Tools and terms for understanding illegal wildlife trade. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 14(9), 479-489.
- Rush, E. R., Dale, E., & Aguirre, A. A. (2021). Illegal Wildlife Trade and Emerging Infectious Diseases: Pervasive Impacts to Species, Ecosystems and Human Health. *Animals*, 11(6), 1821. <https://doi.org/10.3390/ani11061821>.
- Schaedla, W. H. (2016). Local sociocultural, economic and political facilitators of transnational wildlife crime. In *Handbook of Transnational Environmental Crime*. Edward Elgar Publishing.
- Wyatt, T., van Uhm, D., & Nurse, A. (2020). Differentiating criminal networks in the illegal wildlife trade: organized, corporate and disorganized crime. *Trends in Organized Crime*, 23, 350-366.

8. Seznam publikací, které předcházely metodice

Mendoza-Roldan JA, Modry D, Otranto D. Zoonotic Parasites of Reptiles: A Crawling Threat. *Trends Parasitol.* 2020 Aug;36(8):677-687. doi: 10.1016/j.pt.2020.04.014. Epub 2020 May 7. PMID: 32448703; PMCID: PMC7203055.

Modrý D, Beck R, Hrazdilová K, Baneth G. A Review of Methods for Detection of Hepatozoon Infection in Carnivores and Arthropod Vectors. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017 Jan;17(1):66-72. doi: 10.1089/vbz.2016.1963. PMID: 28055571.

Tinsman J, Gruppi C, Bossu CM, Prigge TL, Harrigan RJ, Zaunbrecher V, Koepfli KP, LeBreton M, Njabo K, Wenda C, Xing S, Abernethy K, Ades G, Akeredolu E, Andrew IB, Barrett TA, Bernáthová I, Černá Bolfíková B, Dikko JL, Fopa GD, Ebong LE, Godwill I, Koumba Pambo AF, Labuschagne K, Mbekem JN, Momboua BR, Mousset Moumbolou CL, Ntie S, Rose-Jeffreys E, Simo FT, Sundar K, Swiacká M, Takuo JM, Talla VNK, Tamoufe U, Dingle C, Ruegg K, Bonebrake TC, Smith TB 2023 Genomic analyses reveal poaching hotspots and illegal trade in pangolins from Africa to Asia. *Science*, *in press*

Hulva P, Černá Bolfíková B, Woznicová V, Jindřichová M, Benešová M, Myslajek RW, Nowak S, Szewczyk M, Niedzwiecka N, Figura M, Hájková A, Sándor AD, Zyka V, Romportl D, Kutal M, Findo V, Antal V. (2018). Wolves at the crossroad: fission-fusion range biogeography in the Western Carpathians and Central Europe. *Diversity and Distributions*, 24, 179-192.

9. Prohlášení

Metodika byla vypracovaná v rámci výzkumného projektu VK01010103, Metodologie identifikace a dalších forenzních analýz biologického materiálu a patogenů z volně žijících a exotických živočichů v rámci programu 1.VS OPSEC a je poskytnuta bezplatně Celní správě ČR.

GENERÁLNÍ ŘEDITELSTVÍ ČEL
Budějovická 7, 14096 Praha 4
Odbor Dohledu

Osvědčení

o uznání certifikované metodiky

vydané v souladu s podmínkami Metodiky hodnocení výzkumných organizací
a hodnocení programů účelové podpory výzkumu, vývoje a inovací

Název metodiky:	Metodologie pro odběry, biologickou bezpečnost a archivaci biologického materiálu ze zvířat zadrženého v rámci ilegálního obchodu pro účely forenzních analýz
Autor/autorský kolektiv:	Barbora Černá Bolfiková Jiří Černý Petr Matějů Iva Bernáthová Divyadharshini Shanthakrishnan Ivana Jankovská Richard Sehnal Tereza Modrá David Modrý Iva Langrová
Žadatel (příjemce podpory):	Česká zemědělská univerzita Kamýcká 129 165 00 Praha – Suchbát
Projekt/program:	Ministerstvo vnitra České republiky Bezpečnostní výzkum VK01010103 Program 1 VS OPSEC

Schváleno pod č. j.:
4531/2024-900000-33

Evidenční číslo osvědčení: 01/2024

V Praze dne 17. 1. 2024

plk. Ing. Petr Müller
ředitel odboru 33 Dohledu





MINISTERSTVO VNITRA
ČESKÉ REPUBLIKY

PID: VK01010103

**Metodologie identifikace a dalších forenzních analýz
biologického materiálu a patogenů z volně žijících a
exotických živočichů.**

Poskytovatel podpory:	MINISTERSTVO VNITRA
Program:	VK – Otevřené výzvy v bezpečnostním výzkumu 2023-2029
Funding sub-programme identification:	Podprogram 1 - Rozvoj schopností vymáhání práva
Veřejná soutěž:	1. veřejná soutěž programu OPSEC
Doba řešení:	01/2023 – 12/2026
Stupeň důvěrnosti údajů:	S – Úplné a pravdivé údaje o projektu nepodléhající ochraně podle zvláštních právních předpisů.
Hlavní příjemce:	Česká zemědělská univerzita v Praze
Řešitel:	prof. Ing. Iva Langrová CSc.

**Název: Metodologie pro odběry, biologickou bezpečnost a archivaci biologického materiálu ze zvířat
zadrženého v rámci ilegálního obchodu pro účely forenzních analýz**

Certifikovaná metodika

Autor: Barbora Černá Bolfíková, Jiří Černý, Petr Matějů, Iva Bernáthová, Divyadharshini Shanthakrishnan, Ivana Jankovská, Richard Sehnal, Tereza Modrá, David Modrý, Iva Langrová

Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze

Adresa vydavatele: Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, Praha –Suchdol, 165 00

Pořadí vydání: 1.

Rok vydání: 2025

ISBN 978-80-213-3522-6

Náklad: on line

Určeno: pro odbornou veřejnost

Povoleno: děkanátem FAPPZ ČZU v Praze

Počet stran: 29

Vydala Česká zemědělská univerzita ve svém nakladatelství