

Česká zemědělská univerzita v Praze

2025

Detekce a analýzy exotických patogenů a využití výsledků při forenzních analýzách s cílem dokladování trestné činnosti spojené s obchodem se zvířaty.

Certifikovaná metodika

David Modrý, Jiří Černý, Petr Matějů, Seyma S. Celina, Allan O. Tekkara, Jignesh Italiya, Petr Cibulka, Sára Lukšíková, Ondřej Daněk, Barbora Černá Bolfíková, Ivana Jankovská, Richard Sehnal, Iva Langrová

Metodika byla vypracovaná jako výstup VK01010103-V2 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 978-80-213-3524-0

Příjemci podpory:

Poskytovatel:

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

Název předkládaného výsledku: Detekce a analýzy exotických patogenů a využití výsledků při forenzních analýzách s cílem dokladování trestné činnosti spojené s obchodem se zvířaty.

Typ výsledku dle Definice druhů výsledků	Evidenční číslo (příjemce)	Rok vzniku
metodika certifikovaná oprávněným orgánem <i>NmetC2</i>	21/2025	2025
ISBN/ISSN (pokud je k dispozici)	Webový odkaz na výsledek (pokud je k dispozici)	Kde a kdy publikováno (v případě publikačních výsledků)
978-80-213-3524-0	metodiky.agrobiologie.cz	Jednoznačný popis publikace, ve které daný výsledek vyšel.

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

K detekci patogenů v biologických vzorcích jsou použity i) morfologické a mikroskopické techniky, ii) serologické techniky a iii) molekulárně genetické techniky. V rámci této metodiky jsou popsány způsoby přípravy vzorků k detekci vybraných patogenů všemi těmito technikami, a to včetně fixace materiálu, jeho zpracování apod. Otestována bude i funkčnost těchto metod na simulovaných (experimentálně připravených vzorcích napodobujících reálné vzorky), tak i reálných vzorcích získaných z terénu.

.....

Řešitelský tým:

David Modrý, Jiří Černý, Petr Matějů, Seyma S. Celina, Allan O. Tekkara, Jignesh Italiya, Petr Cibulka, Sára Lukšíková, Ondřej Daněk, Barbora Černá Bolfíková, Ivana Jankovská, Richard Sehnal, Iva Langrová

Obsah:

1 Podstata a principy forezního využití exotických parazitárních patogenů identifikovaných v rámci importů exotických zvířat

- 1.1 Využití exotických parazitů identifikovaných v rámci importů exotických zvířat
- 1.2 Mikrobiální profil mnohobuněčných organismů a jeho využití v rámci forezní praxe
- 1.3 Novost navržených postupů

2 Metodika detekce kandidátních skupin parazitů s forezním potenciálem

- 2.1 Hemogregariny
- 2.2 Hemosporidie
- 2.3 Sarcosporidie
- 2.4 Motolice a tasemnice
- 2.5 Vrtejši
- 2.6 Heteroxenní nematoda
- 2.7 Jazyčnatky
- 2.8 Exotická klíšťata
- 2.9 Vši a všenky
- 2.10 Exotické parazitické houby

3. Metodické přístupy pro využití analýzy virových infekcí v rámci forezní praxe

- 3.1 Sběr, skladování a práce se vzorky
- 3.2 Metody detekce virové infekce
- 3.3 Fylogenetické analýzy
- 3.4 Limity analýzy

4. Literatura

5. Přílohy

Příloha 1: Základní metodické postupy parazitologické diagnostiky

Příloha 2: Modelové situace, použité forezní metodologie a interpretace výsledku

Příloha 3: Identifikační tabule

1 Podstata a principy forenzního využití exotických patogenů identifikovaných v rámci importů exotických zvířat

Nelegální obchod se zvířaty představuje jednu z největších hrozeb pro globální biodiverzitu, lidské zdraví i stabilitu ekosystémů (Rosen and Smith, 2010). Každoročně jsou miliony jedinců volně žijících i domestikovaných druhů zvířat nebo produkty z nich transportovány napříč kontinenty za účelem chovu, konzumace, tradiční medicíny nebo jako zdroje trofejí. Pokud tento obchod probíhá nelegálně, je skrytý, neregulovaný a odehrává se v prostředí, kde je obtížné přesně zjistit původ zabavených zvířat nebo živočišných produktů. Právě určení geografického původu je přitom klíčové pro i) forenzní dokazování v případech nelegálního odchytu a převozu, ii) ochranu postižených ekosystémů, protože teoreticky umožňuje vrátit zvířata zpět do vhodného prostředí nebo podniknout akce na nejvíce postižených lokalitách, které by vedly k snížení nelegálních aktivit, i iii) veřejné zdraví, protože mnohé onemocnění přenášená mezi zvířaty i ze zvířat na člověka (zoonózy) jsou vázané na specifické regiony a ekosystémy (Swift et al., 2007; Bezerra-Santos et al., 2021).

Kromě klasických přístupů, jako je genetická analýza materiálu odebraného z hostitelských tkání, izotopová analýza živočišných vzorků se stále více pozornosti věnuje také využití parazitů nebo sledování parazitů (včetně virů a patogenních hub a bakterií) jako „biologických markerů“ geografického původu (Gu et al., 2024; Bezerra-Santos et al., 2023; Kanthaswamy, 2024; Kwak et al., 2024). Ti totiž často vykazují specifické vzorce rozšíření, vysokou míru koevoluce se svými hostiteli a genetickou diverzitu, která odráží regionální původ. Rychlý evoluční vývoj některých parazitujících organismů jako například virů a bakterií a snadné hromadění nových mutací pak umožňuje také analýzy, které jsou schopné poměrně přesně určit původ vzorků, a to jak z hlediska místa. V případě vyšetření tkání, dokonce i času, kdy byl daný materiál odebrán.

V této metodice se dále diskutuje několik způsobů, jakými lze informace o parazitárních infekcích využít k určení geografického původu zvířat nebo živočišných produktů zabavených při nelegálním mezinárodním obchodu, včetně jejich praktického použití. Tyto metody ale mají také své limity, které je nutné při vyhodnocování výsledků vzít do úvahy.

1.1 Využití exotických parazitů identifikovaných v rámci importů exotických zvířat

1.1.1 Parazité a hostitelé s ohledem na požadavky forenzní práce, biologická podstata

Parazitismus patří k nejčastějším formám soužití organismů, obvykle definovaný jako takové soužití, ve kterém žije jeden organismus na úkor jiného. Ačkoli tradiční pohled na parazity akcentuje jejich negativní vliv na organismus hostitele (parazit = patogen), ve skutečnosti je jen těžko definovatelná hranice mezi parazitismem a komensalismem. Bez ohledu na patogenitu a detaily vztahu parazitů a jejich hostitelů je přítomnost parazitů neoddelitelná od života v přírodních populacích. Struktura společenstva parazitů (metapopulace) na úrovni jedince, populace hostitele a druhu jako takového odráží širokou škálu aspektů, zahrnující pozici v potravní síti, věk, pohlaví, populační hustotu a celou řadu dalších faktorů.

1.1.2. Diverzita a hostitelská specifita parazitů

V odhadech diverzity parazitů obratlovců se autoři shodují na tom, že diverzita parazitů diverzitu jejich hostitelů zásadně převyšuje a že v podstatě každý jeden exemplář volně žijícího obratlovce je kolonizován jedním, obvykle však více druhy parazitů. V praxi to současně znamená, že s importem živočicha z volné přírody spolu s ním importujeme i celou škálu symbiotických organismů. Jejich význam závisí od celé řady

dílčích aspektů. Zatímco řada z takových organismů nemá velký praktický význam, existuje hned několik situací, ve kterých je třeba takovémuto “nechtěným” doprovodným organismům věnovat pozornost:

- celá řada parazitů se u hostitele (= v našem případě importovaný exotický obratlovec) může projevit jako primární nebo sekundární patogen s dopadem na zdravotní stav
- někteří z takových parazitických organismů mohou přenést na další jedince /druhy v zajetí chovaných zvířat (včetně hospodářsky významných druhů) a působit endemické infekce v chovech
- někteří z takových parazitických organismů mohou proniknout do populace volně žijících živočichů na území ČR a způsobit případné onemocnění (emerging disease)
- řada z parazitických organismů je schopna různými cestami infikovat člověka a způsobit více či méně závažné onemocnění (zoonóza)

Problematika importovaných patogenů jako taková spadá do gesce Státní veterinární správy ČR a je řešena cestou a obecných i specifických opatření definovaných v podmínkách dovozu exemplářů (Zákon č. 166/1999 Sb. - Zákon o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů; vyhláška č. 176/2023 Sb. o zdraví zvířat; Vyhláška č. 299/2003 Sb.; Vyhláška č. 379/2003 Sb. o veterinárních požadavcích na obchodování s živočišnými produkty... a další). Méně obvyklým druhům zvířat (ryby, obojživelníci, plazi, drobní savci) je s výjimkou rutinní kontroly na pohraniční veterinární stanici a povinné karanténizace věnována malá pozornost. Ve finále se tak na území ČR (případně EU v širším slova smyslu) dostávají importovaní obratlovci s pestrou škálou parazitických organismů. Pochopitelně v podmínkách ilegálního obchodu je veškerá kontrola nulová. Taková situace nabízí nečekanou škálu biologického materiálu, který může být, je-li správně odebrán, analyzován a zdokladován, využit v praxi při odhalování komplikovaných případů ilegálního obchodu s volně žijícími druhy živočichů a při dokladování původu analyzovaných exemplářů. Popisované stopy jsou, kvůli své biologické podstatě, velmi citlivé a nedodržení metodik odběru vzorků vede ke ztrátě spektra informací významných pro forenzní práci. Interpretace takovýchto dat není jednoduchá a pro lepší pochopení jejich podstaty následující odstavce přináší základní biologické informace, nezbytné pro posouzení forenzního významu toho kterého parazita detekovaného v rámci šetření při podezření na ilegální dovoz nebo původ importovaných jedinců volně žijících obratlovců.

1.1.3 Vývojové cykly parazitů s hledem na využitelnost dat ve forenzní práci

Podmínkou přežívání parazitů v populacích hostitelů je najít vhodného hostitele, rozmnožit se a přenést potomstvo na jiného hostitele. Celý tento proces se obvykle nazývá vývojový cyklus. Různí parazité v populaci hostitelů cirkulují v různých typech životních cyklů, které odrážejí ekologické podmínky a vztahy původním prostředím. Životní cykly parazitů lze v zásadě popsat jako monoxenní a heteroxenní. **Monoxenní** parazité se mezi svými hostiteli přenášejí obvykle environmentálně odolnými stádii (cysty, vajíčka, larvy...) kontaminujícími vnější prostředí. **Heteroxenní** parazité vyžadují přenos prostřednictvím střídání hostitelů, ve kterých se nachází obvykle jasně oddělné části vývojového cyklu. Tento typ vývoje se také nazývá nepřímý životní cyklus. Podle počtu hostitelů se tyto paraziti nazývají diheteroxenní (dixenní) nebo triheteroxenní (trixenní).

1.1.4 Parazité jako “biotagy” - biologická podstata využití

Rozšíření většiny parazitů v sobě obvykle nese geografický element. V případě monoxenních parazitů specifických pro hostitele, se geografický rozsah rozšíření vždy řídí rozsahem rozšíření jejich hostitele. Mnoho z těchto parazitů má životní cyklus natolik jednoduchý, že jej lze dokončit i v podmínkách, ve kterých chováme zvířata v lidské péči. Frekvence výskytu (prevalence) a početnost u hostitelů chovaných v zajetí pak může být stejná nebo dokonce vyšší než u volně žijících hostitelů. Tyto typy parazitů mají omezenou, resp. takřka nulovou hodnotu pro sledování původu zvířat a dále nejsou popisovány.

Geografické rozšíření parazitů s heteroxenním životním cyklem je více vázáno na konkrétní prostředí, ve kterém jsou přítomny všechny nezbytné komponenty. Obvykle to znamená nejen konkrétního hostitele, ale také konkrétní mezipřehostitele/vektory. Obvykle se jedná o složky přirozeného potravního spektra nebo krevsající členovce, jejichž přítomnost je úzce spojena s konkrétním prostředím a ekologickými podmínkami. Další přenos těchto parazitů vždy závisí na přítomnosti/nepřítomnosti všech složek životního cyklu v daném prostředí. Paraziti, kteří z jakéhokoli důvodu nejsou schopni dokončit životní cyklus v umělých podmínkách, jsou kandidáty pro další výzkum jako tzv. **biotagy** a jsou základem níže popisovaných metodik.

Využití parazitů jako biotagů se v biologickém výzkumu rozvinulo společně s výzkumem migrujících organismů (MacKenzie, 2002). Logicky se většina studií zabývá buď migrujícími ptáky, nebo migrujícími mořskými živočichy (ryby i savci). Mezi jinými byly publikovány studie potvrzující původ konkrétních subpopulací migrujících ryb s ekonomickým významem (Williams et al., 1992, Lester a MacKenzie, 2009). Studie o kytovcích se například zabývají přítomností tropických vilejšů na velrybách, které migrují na dlouhé vzdálenosti z tropických oblastí do arktických vod. Často diskutovanými jsou výsledky DNA barcodingu hemosporidií u migrujících ptáků (např. Levin et al., 2013). A v neposlední řadě mají velký význam tropická klíšťata na migrujících ptácích a také na obchodovaných plazech (např. Čapek et al., 2014).

1.1.5 Hlavní kritéria pro využití parazitů jako biotagů při dokladování původu obchodovaných exemplářů volně žijících zvířat v mezinárodním obchodu

V rozsáhlé studii hodnotící metodiky rozlišování mezi hady chovanými ve volné přírodě a v zajetí Lyons a Natusch (2019, IUCN-SSC Boa and Python Specialist Group) sestavili seznam důležitých atributů, které je třeba vzít v úvahu. Některé z nich souvisejí s typy obchodu a chovem v dané zemi, jiné s logistickou náročností implementace a spolehlivostí dané metody. Mezi nejdůležitější atributy definované v zahraničních studiích, zahrnujících i parazity, tak patří:

- náklady na forenzní činnost
- náročnost na erudovanou pracovní sílu/expertizu
- vhodnost pro živé jedince
- vhodnost jak pro velké, tak malé počty sledovaných exemplářů
- spolehlivost resp. výpovědní hodnota v případě navazujících trestně právních řízení

Před analýzou jednotlivých skupin parazitů u jednotlivých skupin obratlovců, které jsou předmětem zájmu, je třeba shrnout požadavky, které by měly vybrané markery/biotagy splňovat. Tento postup je nezbytný jak se zohledněním skupiny forenzně významných parazitů, tak s ohledem na konkrétní typ hostitele (zadrženého živočicha) i použité metodologie. Pro účely této metodiky je hlavním cílem forenzních postupů rozlišit mezi zvířaty, která pocházejí z volně žijících populací (= pocházejí z volné přírody), a těmi, která se narodila v zajetí. Je však třeba vzít v úvahu, že je třeba rozlišovat i několik dalších „podkritérií“: například potomci narození v zajetí se mohou narodit buď v geografické oblasti původu (= hadí farmy v jihovýchodní Asii), nebo v umělých podmínkách mimo přirozený areál (evropští chovatelé). Dalšími důležitými kritérii jsou podmínky a chovatelské postupy v jednotlivých chovných zařízeních, včetně složení chovných skupin (narozené v zajetí, ulovené ve volné přírodě, smíšené), typu chovných zařízení (venkovní, vnitřní, smíšené), převládajícího typu krmiva atd. Tyto aspekty jsou dále diskutovány v závěrečných metodologických kapitolách.

Hlavní kritéria pro použití parazitického druhu jako bioindikátoru původu lze shrnout (a diskutovat) následovně

- vybraný parazit/biotag by se měl vyskytovat v konkrétním a dobře definovatelném ekologicky a/nebo geograficky ohraničeném areálu

- konkrétním parazitem (nebo jeho stadiem) se lze nakazit pouze v přírodním (=původním) prostředí, obvykle v důsledku konkrétního vztahu mezi dravcem a kořistí nebo přenosem specifickým vektorem (viz charakteristiky životních cyklů výše)
- vybraný parazit/biotag by měl přežít relativně dlouhou dobu ve svém hostiteli
- konkrétní parazit musí být rozlišitelný na základě stadií, která jsou sbírána s minimálním dopadem na živé hostitele (obvykle z povrchu těla, výkalů nebo krve, o význam pitvy viz dále)
- daný parazit/biotag nesmí být schopen přenosu z volně žijících zvířat na zvířata chovaná v zajetí v případě jejich fyzické blízkosti

1.1.6 Cíle předkládané metodiky s ohledem na forenzní využití parazitů

Klasifikace obchodovaných zvířat podle CITES rozlišuje zvířata do kategorií na základě jejich původu a původu rodičovské generace. Trvalé riziko falšování původu obchodovaných zvířat vyžaduje použití široké škály technik, včetně stanovení parazitů. Hlavním cílem forenzního použití parazitologických nástrojů je rozlišení mezi zvířaty chovanými v zajetí (C, F, R) a zvířaty pocházejícími z volné přírody (W). Jak bylo uvedeno výše a dále, parazity, které lze použít jako biotagy, jsou ty, které nemohly dokončit svůj životní cyklus v zajetí. Hlavním problémem ve většině situací s doporučeným forenzním parazitologickým nástrojem je přesná definice místních podmínek v zařízení původu. Ve většině případů paraziti obecně nemohou pomoci rozlišit mezi kategoriemi C/F/R. Na základě dostupných údajů tvoří v obchodě s druhy regulovanými úmluvou CITES plazi až více než 80 %. V souladu s prioritami CITES je možno jako primární cíl doporučený pro aplikace navržené metodologie pět vybraných skupin obchodovaných zvířat; použití parazitů jako biotagů v forenzních aplikacích je však mnohem širší a v koncepci předložených metodik téměř univerzální.

V reakci na potřeby vývoje dalších nástrojů pro kontroly importu a obchodu s ohroženými druhy a pro odhalování a dokumentaci možné trestné činnosti související s ilegálními importy z volné přírody si předložená metodika klade za cíl:

- sumarizovat biologickou podstatu využití parazitických organismů při dokladování původu obchodovaných exemplářů volně žijících zvířat v mezinárodním obchodu
- poskytnout kritický přehled hlavních skupin využitelných organismů, včetně obrazové dokumentace využitelné pro identifikaci v rámci reálných případů
- poskytnout technické detaily využitých diagnostických metod, od odběru vzorků až po jejich analýzu
- na základě analýzy dostupných dat začlenit do použitých metodik minimalizaci rizik lidské infekce
- na příkladu modelových případových studií poskytnout návod pro řešení konkrétních případů

Předkládaná metodologie vychází z metaanalýz literárních dat z parazitologických studií na dovezených exotických obratlovcích a z výzkumu realizovaného expertním týmem forenzní parazitologie FAPPZ ČZU, a to jak u volně žijících obratlovců v mírných a tropických oblastech, tak u zvířat čerstvě importovaných do zajetí nebo dlouhodobě v zajetí žijících. Aby byla studie komplexní a univerzální, byly taxonomické detaily vynechány nebo nahrazeny odkazy na hlavní revize. Pokud není uvedeno jinak, autorem poskytnutých informací a fotografií je David Modrý a tým forenzní parazitologie FAPPZ ČZU.

1.2 Mikrobiální profil mnohobuněčných organismů a jeho využití v rámci forenzní praxe

1.2.1 Mikrobiální „profil“ hostitele

Každý jedinec nebo populace jedinců nese unikátní soubor mikroorganismů – tzv. mikrobiom (Lloyd-Price et al., 2016). Součástí mikrobiomu je i soubor virů, které na/v daném organismu žijí – tzv. virom. Složení mikrobiomu je výsledkem dlouhodobé expozice daného jedince jeho životnímu prostředí i vzájemných biologických interakcí mezi různými jedinci. Vzhledem k této masivní kolonizaci mnohobuněčných živočichů různými mikrobiálními organismy se v poslední době prosazuje pojem „holobiont“, který říká, že pro mnohé interpretace biologických procesů, včetně například forenzních analýz, je nutné chápat organismus nejen jako soubor buněk daného jedince, ale i jeho mikrobiálních symbiontů (Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2018).

Přesný vliv složení mikrobiomu na zdraví a fitness jedince se intenzivně zkoumá. Je známo, že složení bakteriálních společenství má významný vliv na mnoho aspektů života svého hostitele jako například metabolismus, vývoj imunitního systému, reprodukční úspěšnost, chování a odolnost vůči patogenům (Shapira, 2016). Přesný význam viromu zatím není příliš prozkoumaný (Virgin, 2014). Jeví se ale, že většina virů v něm představuje bakteriální viry, bakteriofágy, které infikují symbiotické bakterie. Viry infikující přímo hostitelské buňky jsou výrazně méně časté. Očekává se ale, že podobně jako bakteriální mikrobiom, bude mít i virom výrazný vliv na svého hostitele (Lathakumari et al., 2025).

Díky velké variabilitě mikrobiomu (včetně viromu) a jeho značnému ovlivnění životním prostředím, ze kterého daný jedinec pochází, může analýza některých složek souboru mikrobiálních symbiontů vyskytujících se na daném organismu sloužit jako „otisk prstu“ místa původu (Franzosa et al., 2015; Cho & Eom, 2021; Robinson et al., 2021). Pro přesné určení místa původu je ale nutné mít dobrá srovnávací data. Poté je možné provést statistické porovnání podobnosti mikrobiomů mezi jednotlivými oblastmi a zkoumanými vzorky a posoudit, jestli a s jakou pravděpodobností je možné vzorek přiřadit k té které oblasti. K těmto analýzám je možné využít i modely vytrénované na velkém množství dat z různých oblastí pomocí strojového učení (umělá inteligence), které dokážou identifikovat vzorce v souborech infekcí a pomoci s jejich interpretací (Kumari et al., 2022). V kombinaci s dalšími forenzními daty je možné využít data získaná analýzou mikrobiomu pro vícevrstvé určení původu zkoumaných vzorků jak z hlediska místa, tak i času jeho původu (Afshinnekoo et al., 2015).

Vzhledem k vysokým nárokům na srovnávací data a samotné statistické analýzy je ale využití analýzy celého mikrobionu ve forenzní praxi zatím velmi komplikované. Do budoucna se ale s masivním rozšířením nových sekvenačních technologií a modelů umělé inteligence dá očekávat, že se tato situace změní (He et al., 2022). Využití analýzy přítomnosti jednotlivých složek mikrobiomu, zejména medicínsky a veterinárně důležitých virů a bakterií, je ale možné už nyní. Vzhledem ke specializaci týmu Ekologie, evoluce a epidemiologie emergentních virových patogenů (e⁴ research team) na FTZ ČZU se dále zaměříme především na viry a jejich využití v rámci forenzní praxe.

1.2.2 Biogeografie virů

Mnoho virů je vázáno na specifické prostředí, které určuje například i) přítomnost rezervoárových hostitelů (např. netopýři, hlodavci, primáti), ii) specifických přenašečů (např. komáři rodu *Aedes*, klíšťata *Ixodes*), iii) ekologické podmínky, které ovlivňují přenos (klíma, vegetace, hustota hostitelů) a další (Noll et al., 2023). Například virus Mayaro je prakticky omezen na tropické oblasti Jižní Ameriky a výskyt infekce u zadrženého zvířete by silně naznačoval jeho původ z tohoto regionu (Caicedo et al., 2021). Podobně je například virus Krymsko-Konžské hemorhagické horečky vázán na oblast Starého světa a jeho přítomnost není možná ve

vzorcích ze zvířat nebo zvířecích produktů s deklarovaným původem z Nového světa (Hawman & Feldmann, 2023).

Geografickou stratifikaci je možné pozorovat i u virů, které mají jinak globální geografické rozšíření. V takovém případě mohou být na různé geografické oblasti vázány různé genetické varianty daného viru. Například jednotlivé kmeny viru západonilské horečky se liší mezi Evropou, Afrikou a Severní Amerikou (Srihi et al., 2021; Mencattelli et al., 2023). Pokud zadržené zvíře nese specifický kmen, lze jeho původ geograficky ohraničit. Podobně tomu je i u viru slintavky a kulhavky, který se vyskytuje na velmi rozsáhlém území, ale jeho jednotlivé kmeny mají oblast geografického výskytu už výrazně užší (Brito et al., 2017). Přehled geografického rozšíření jednotlivých virů a jejich specifických variant shrnuje Tabulka 1.1

Při vyhodnocování výsledků je ale nutné vzít v potaz, že geografické rozšíření jednotlivých virů se může v čase měnit (Jones et al., 2008). Pro detekci virů ve zkoumaném vzorku se ale většinou používají metody, které vedou nebo alespoň mohou vést k detekci a následné sekvenaci virové genomové nukleové kyseliny. Takto získané sekvence mohou být následně použity ve fylogenetických analýzách (Faria et al., 2018) (popsaných níže v kapitole 3.3), jež umožní geografický kontext blíže specifikovat a kvantifikovat míru neurčitosti provedené analýzy. Sekvence virových genů nebo celých genomů často odráží evoluční historii zkoumaných virů na daném geografickém území. Porovnáním virové sekvence s databázemi lze tedy zjistit, odkud daný virový kmen pochází a často i v jaké přibližné době byl vzorek tento virus obsahující odebrán. Přesné postupy, které se těmito analýzám věnují budou popsány dále v textu. Vzhledem k tomu, že tyto mikroorganismy jsou většinou velmi malé pro to, aby identifikace mohla proběhnout mikroskopicky, je nutné využívat metod, klasické mikrobiologie a virologie i molekulární genetiky nebo imunologie.

1.3 Novost navržených postupů

Předložená metodika vychází z literárních rešerší a rozsáhlého terénního a laboratorního výzkumu a přináší postupy a řešení nová pro forenzní vyšetřovací postupy. Navržené inovativní postupy vyšetřování jsou využitelné v praxi Policie ČR, Celní správy i dalších orgánů činných v trestním a správním řízení, a to zejména v situacích, kdy klasické analýzy neposkytují dostatek informací k dokladování možné trestné činnosti spojené s obchodem se zvířaty. S ohledem na fakt, že řada z popisovaných organismů může vyvolávat onemocnění člověka a zvířat a má potenciál se v rámci obchodu se zvířaty šířit, praktické uplatnění navržených postupů přináší současně efekt prohloubené ochrany státního území ČR před zavlečením nových infekcí.

Tabulka 1: Vybrané viry, jejich taxonomické zařazení, hostitelé, způsoby přenosu a geografické rozšíření.

Virus	Taxonomické zařazení (čeleď, rod)	Hlavní hostitelé	Způsob přenosu	Typické geografické rozšíření
Vesicular stomatitis virus (Indiana vesiculovirus, VSV)	Rhabdoviridae, <i>Vesiculovirus</i>	skot, koně, prasata, výjimečně ovce, kozy a lamy	přímý kontakt, hmyzem (<i>Lutzomyia shannoni</i>)	endemicky Střední Amerika, sever Jižní Ameriky, Mexiko; sporadické případy v USA
Sheeppox virus (SPPV) a Goatpox virus (GTPV)	Poxviridae, <i>Capripoxvirus</i>	ovce a kozy	přímý kontakt s infikovanými zvířaty, aerosolové kapénky při blízkém kontaktu a nepřímý kontakt s kontaminovanými předměty, jako je podestýlka nebo vybavení	endemicky severní a východní Afrika, Střední východ, Střední/jižní Asie; u SPPV nově epizootie i v EU (2022–2024)
Lumpy skin disease virus (LSDV)	Poxviridae, <i>Capripoxvirus</i>	především skot (<i>Bos indicus</i> a <i>Bos taurus</i>) a vodní buvol (<i>Bubalus bubalis</i>), může infikovat i některé divoké přežvýkavce, jako jsou žirafy, impaly a jiné druhy antilop	především prostřednictvím hmyzu živícího se krví, jako jsou komáři, ovádové a klíšťata, kteří mechanicky přenášejí virus mezi zvířaty	endemicky Afrika, Blízký východ, outbreaky v jižní Evropě a jižní, jihovýchodní a východní Asii
African horse sickness virus (AHSV)	Sedoreoviridae, <i>Orbivirus</i>	koňovití (koně, osli, zebry)	pakomárci neboli tiplíci rodu <i>Culicoides</i>	Subsaharská Afrika; v minulosti i dočasné zavlečení do severní Afriky a Středomoří
Bluetongue virus (BTV)	Sedoreoviridae, <i>Orbivirus</i>	domácí a divocí přežvýkavci, obzvláště ovce, kozy, skot a jelenovití, může infikovat i lamy, alpaky a velbloudy	pakomárci neboli tiplíci rodu <i>Culicoides</i>	globalně v oblastech s výskytem tiplíků rodu <i>Culicoides</i> ; Evropa – výrazná aktivita BTV-3 od 2023
Rift Valley fever virus (RVFV)	Phenuiviridae, <i>Phlebovirus</i>	domácí zvířata (skot, ovce, kozy a velbloudi) různé druhy volně žijících zvířat, lidé	především prostřednictvím komářích kousnutí (zejména z rodu <i>Aedes</i> a <i>Culex</i>), přímým kontaktem s infikovanými zvířaty nebo jejich tkáněmi, tekutinami či masem, vertikálně v matky na plod	Subsaharská Afrika, Arabský poloostrov; expanze v souvislosti s klimatem
West Nile virus (WNV)	Flaviviridae, <i>Orthoflavivirus</i>	ptáci, koně, lidé	komáři rodu <i>Culex</i>	Afrika, Evropa, Blízký východ, Amerika, Austrálie
Crimean–Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV)	Nairoviridae, <i>Orthonairovirus</i>	široké spektrum domácích i volně žijících zvířat, lidé	především prostřednictvím klíšťat (zejména z rodu <i>Hyalomma</i>), přímým kontaktem s infikovanými zvířaty nebo jejich tkáněmi, tekutinami či masem, přímým kontaktem s nakaženým pacientem	starý svět (Afrika, Asie, jižní a jihovýchodní Evropa); expanze areálu vektorů
Mayaro virus (MAYV)	Togaviridae, <i>Alphavirus</i>	primáti, lidé	komáři rodu <i>Haemagogus</i>	tropická Střední/Jižní Amerika; případy a importy v Karibiku; možné šíření

Foot-and-mouth disease virus (FMDV)	Picornaviridae, <i>Aphthovirus</i>	více než 70 druhů sudokopytníků, především skot, prasata, ovce a kozy, divoká zvířata jako africký buvol (rezervoárový hostitel), jelenovití a antilopy, velmi výjimečně lidé	přímý kontakt s infikovanými zvířaty, jejich sekrety nebo exkrementy; nepřímý kontakt prostřednictvím kontaminovaných objektů (fomity), jako jsou vozidla nebo krmivo; a přenos vzduchem prostřednictvím vdechování	různá endemická napříč Asií, Afrikou; rozdíly ve výskytu různých serotypů
African swine fever virus (ASFV)	Asfarviridae, <i>Asfivirus</i>	domácí a divoká prasata (vysoce smrtelné onemocnění), bezpříznakově u afrických druhů divokých prasat (např. prase bradavičnaté - rezervoár)	přímý a nepřímý kontakt s infikovanými prasaty, jejich tělními tekutinami nebo kontaminovanými předměty	Afrika; od 2007 masivní šíření genotypu II v Evropě a Asii
Avian influenza A (H5/H7 aj.)	Orthomyxoviridae, <i>Alphainfluenzavirus</i>	divocí vodní ptáci, jako jsou kachny, husy a pobřežní ptáci, domácí drůbež, široké spektrum savců, lidé	přímý kontakt s infikovanými ptáky, kontaminovaným prostředím a částicemi ve vzduchu, alimentárně v kontaminovaném mléce	celosvětově; v posledních sezónách častý výskyt v Evropě i Severní a Jižní Americe
Rabies virus (RABV)	Rhabdoviridae, <i>Lyssavirus</i>	téměř všechna savčí zvířata, přičemž primárními hostiteli jsou psi, netopýři, mývalové, skunci a lišky	především prostřednictvím slin infikovaného zvířete, nejčastěji kousnutím	z globálního hlediska celosvětově (s výjimkou několika ostrovů), vymýcena v některých státech (např. v zemích západní a střední Evropy)
Canine distemper virus (CDV)	Paramyxoviridae, <i>Morbillivirus</i>	široká škála domácích i divokých zvířat, nejčastěji z řádu šelem, jako jsou psi, vlci, lišky, mývalové a fretky, infikuje ale i kočkovité šelmy (např. lvi)	respirační kapénky přenášené vzduchem od infikovaných zvířat, přímý kontakt s tělními tekutinami infikovaných zvířat (např. slinami) a přes kontaminované povrchy (fomity)	celosvětově; geografická struktura u různých kmenů
Peste-des-petits-ruminants virus (PPRV)	Paramyxoviridae, <i>Morbillivirus</i>	především domácí ovce a kozy, dále také skot, velbloudi, afričtí buvoli, antilopy a prasata.	přímým kontaktem s infikovanými zvířaty, jejich tělesnými sekrety (například z očí, nosu a úst) a na krátké vzdálenosti prostřednictvím respiračních aerosolů, nepřímo prostřednictvím kontaminovaného prostředí	Afrika, Asie; šíření na západ a na sever, v posledních letech outbreaky v Evropě

Equine infectious anemia virus (EIAV)	Retroviridae, <i>Lentivirus</i>	všichni členové čeledi koňovitých (koně, osli, zebry aj.)	především prostřednictvím hmyzu živícího se krví, jako jsou ovádi a pakomáři, kteří fungují jako mechanické vektory, kontaminovanými jehlami, injekčními stříkačkami nebo jiným zdravotnickým vybavením, méně často vertikálně	celosvětově; fylogeografické vazby mezi Evropou, Amerikou a Asií
Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)	Arteriviridae, <i>Betaarterivirus</i>	prasata	přímý a nepřímý kontakt, včetně přímého kontaktu mezi prasaty, kontaminovaným spermatem a přenosem aerosolem	PRRSV-1 převážně Evropa (ale i Asie), PRRSV-2 převážně Asie; v EU se PRRSV-2 vyskytuje omezeně
Swine vesicular disease virus (SVDV)	Picornaviridae, <i>Enterovirus</i>	domácí a divoká prasata	přímým kontaktem s infikovanými prasaty, kontaminovaným prostředím a požitím kontaminovaných zbytků	dříve Evropa a Asie; nyní téměř eradikováno (v posledních letech jen velmi sporadické nálezy)
Classical swine fever virus (CSFV)	Flaviviridae, <i>Pestivirus</i>	domácí a divoká prasata	přímý kontakt s infikovanými prasaty a nepřímý kontakt prostřednictvím kontaminovaných předmětů, krmiv a živočišných produktů	Asie (dominance 2.1), Evropa (převaha 2.x v historických ohniscích), Latinská Amerika dříve 1.x, eradikované v USA, Kanadě, větší části západní Evropy, Austrálii a na Novém Zélandu
Newcastle disease virus (NDV)	Paramyxoviridae, <i>Orthoavulavirus</i>	široká škála ptačích druhů, včetně domácích drůbeže, jako jsou kuřata, krůty, husy a kachny, ale také divokých ptáků, jako jsou pštrosi, bažanti a holubi, vzácně lidé	především přímým kontaktem s infikovanými ptáky nebo nepřímým kontaktem prostřednictvím kontaminovaných předmětů, potravin, vody a částic ve vzduchu	celosvětově; rozdíly ve výskytu jednotlivých genetických variant

2 Metodika detekce kandidátních skupin parazitů s forenzním potenciálem

2.1 Hemogregariny

2.1.1 Popis skupiny

Hemogregariny jsou vektory přenášení jednobuněční parazité patřící do skupiny Apicomplexa, popsáno je více než 400 druhů z různých hostitelů (Perkins et al. 2001). Jejich životní cyklus probíhá v krvi a tkáních mezihostitelů, kterými jsou savci, ptáci, ryby, krokodýli, hadi, ještěrky a želvy (Desser, 1993; Smith, 1996). Definitivními hostiteli a také vektory hemogregarin je široká škála bezobratlých sajících krev, včetně klíšťat, roztočů, komárů, jiných členovců a pijavic (Desser, 1993; Smith, 1996; Davies a Johnston, 2000). Paratenický hostitel v životním cyklu je také možný u některých druhů vyžadujících masožravost (Smith, 1996). U druhů rodu *Hepatozoon* může být vývoj dokončen v rámci životního cyklu tří hostitelů v pořadí: komár-ještěr-had (Landau et al. 1972), komár-žába-had (Smith et al. 1994; Smith et al. 1999), komár-hlodavec-had (Sloboda et al. 2008, 2009) nebo požitím infikované kořisti hady živícími se hady. Kromě toho byl zaznamenán také vertikální přenos u ovoviviparních hadů (Lowichik a Yaeger, 1987; Telford, 1984).

Hemogregariny patří k nejvíce hostitelsky specializované skupině parazitů v krvi plazů a jsou dominantními hemoparazity u hadů, želv a krokodýlů (Telford, 1984). Navzdory velkému počtu popsaných druhů zůstávají u většiny z nich neúplné informace o kompletním vývojovém cyklu, včetně znalostí o biologii, vektorech a způsobech přenosu (Desser, 1993). Přenašeči byly dosud identifikováni u méně než stovky druhů. Životní cyklus je typicky dixenní (u některých druhů s možným zapojením dalšího paratenického hostitele), vektory jsou krevsající bezobratlí (hlavně klíšťata, pijavice a komáři).

Základní aspekty využití skupiny jako biotagu ve forenzní praxi

- většina druhů se přenáší pouze krevsajícími bezobratlými živočichy (=veктоři)
- vektorů se obvykle nevyskytují v podmínkách chovu v zajetí
- typičtí vektorů mají geograficky omezené rozšíření (např. určité druhy klíšťat)
- diagnosticky významná stadia se vyskytují v krvi a lze je detekovat z krevních nátěrů
- infekce je pravděpodobně celoživotní (u druhu *Hemolivia mauritanica* u želv rodu *Testudo* byla infekce zaznamenána až 9 let po importu) (Široký et al., 2004, 2007)

Kritické limity využití skupiny jako biotagu ve forenzní praxi

- u živorodých/vejcorodých hadů může být infekce přenesena na potomstvo. Rozsah přenosu není znám. To může představovat omezení u některých hadů čeledi Boidae.
- Zástupci rodu *Hemolivia* se přenáší požitím infikovaného klíštěte, které se odloučilo od infikované želvy. Želva chovaná v zajetí může pozřít klíště, které spadlo z želvy ulovené ve volné přírodě. Je to velmi nepravděpodobné, ale teoreticky možné.
- Druhy rodu *Hepatozoon* se přenášejí komáři (viz např. Sloboda et al., 2008, 2009). Ve venkovních klecích v tropickém prostředí může k přenosu teoreticky dojít, ale nikdy to nebylo prokázáno (ani vyloučeno).

2.1.2 Metodologie

2.1.2.1 Materiál a metodika odběru

- Živí zvířata: plná žilní nebo kapilární krev odebraná veterinárním lékařem nebo oprávněnou osobou
- Pitva: krevní koagulum nebo tkáňový vzorek (játra, plíce, slezina)

2.1.2.2 Příprava pro diagnostická vyšetření

- z plné krve bezprostředně po odběru zhotovit dva krevní nátěry
- krevní nátěr obarvit standardními hematologickými metodikami (Giemsa, DiffQuick)
- zbylou část krve, případně odebrané tkáňové vzorky fixovat do 96% EtOH pro pozdější izolaci DNA v indikovaných případech

2.1.2.3 Vlastní vyšetření a identifikace

Mikroskopie: v případě poikilotermních hostitelů mikroskopie barvených nátěrů odhalí typické gametocyty lokalizované v erytrocytech (**Identifikační obrázková tabule T1**)

DNA analýza: DNA izolovaná tradičními postupy s využitím tkáňových izolačních kitů, následně PCR se skupinovými specifickými primery (typicky HepF300 a HepR900) amplifikujícími přibližně 600 bp 18S rDNA, poté analýza sekvencí s využitím BLAST nebo fylogenetická analýza sekvencí erudovaným molekulárním fylogenetikem (de Oliveira et al., 2018; Maričić et al., 2023).

2.1.2.4 Dokumentace výsledků

- Fotodokumentace odběru krve
- Nález v krevních nátěrech: mikrofotografie stadií při zvětšení 1000x
- Archivované DNA sekvence

2.1.2.5 Archivace materiálu

- Krevní nátěry v plastových nebo papírových boxech při pokojové teplotě
- Krev fixovanou v EtOH krátkodobě v mrazicím boxu (-18 C), dlouhodobý bio-banking při -80C
- Kryo-archivovaná DNA
- Archivované DNA sekvence

Tabulka 2: Příklady forenzně významných druhů hemogregarin a jejich asociace s hostitelem.

Taxon doporučený pro forenzní využití	Hostitel	Geogr. oblast	Poznámka pro forenzní využití	Odkaz na literaturu pro expertní stanovisko
<i>Hemolivia mauretanica</i>	<i>Testudo</i> spp.	Balkán, S Afrika	Evropské želvy v ilegálním obchodu, vysoká průkaznost původu z přírody	Kvičerová et al., 2014
<i>Hemolivia parvula</i>	<i>Stigmochelys pardalis</i>	Jižní Afrika	Africké želvy v ilegálním obchodu, vysoká průkaznost původu z přírody	Cook et al., 2015
<i>Hemolivia pulcherrima</i>	<i>Rhinoclemmys pulcherrima</i>	Střední Amerika	Vysoká průkaznost původu z přírody	Živčicová et al., 2024
<i>Hemolivia mariae</i>	<i>Tiliqua rugosa</i>	Austrálie	Australští scinkovití v ilegálním obchodu	Kvičerová et al., 2014
<i>Hepatozoon ayorghbor</i>	<i>Python regius</i>	Západní Afrika	Vysoká průkaznost původu z Afriky, zejména ve spojení s nálezem klíšťat	Sloboda et al., 2007
<i>Haemogregarina stepanowi</i>	<i>Emys</i> , <i>Mauremys</i>	Evropa, Blízký Východ	Vodní želvy	Özvegy et al., 2015 Dvořáková et al., 2014
<i>Haemogregarina</i> spp.	želvy	Jižní Amerika	Jihoamerické vodní želvy v rámci ilegálního obchodu	de Oliveira et al., 2018

2.1.3 Závěr

S ohledem na výše popsané aspekty představují hemogregariny jedinečné biotagy s velkým forenzním potenciálem. Přítomnost *Hemolivia mauritanica* u evropských druhů *Testudo* spp. je jasným důkazem toho, že tato zvířata se nenarodila na území střední Evropy. Specifickým vektorem je klíště *Hyalomma aegyptium*, typický středomořský klíště spojený s volně žijícími populacemi *Testudo* (Široký et al., 2005, 2006). Podobně je přítomnost hemogregarin, významná u afrických želv. Tropické a subtropické druhy hadů jsou infikovány hemogregarinami r. *Hepatozoon*, příkladem takových hostitelů jsou krajty jako např. *Python regius*, *Morelia* spp., a hroznější *Corallus* spp. atd. Podobná situace je také u varanů, jak z Afriky, tak z tropické Asie. Správné zařazení hemogregarin z plazů do druhů vyžaduje molekulární genotypizaci, která je dobře zavedena (např. Kvičarová et al., 2014, Tomé et al., 2014, Cook et al., 2015). Druhy rodu *Hepatozoon* se vyskytují také u savců, jejich prediktivní hodnota je však nižší, protože mohou být přenášeni např. blechami. U savců jsou molekulární data k dispozici především pro druhy, které parazitují na šelmách. Vodní želvy jsou infikovány zástupci rodu *Haemogregarina*, infekce se přenáší pijavicemi (*Placobdella* v Evropě) a je obvykle velmi rozšířená (např. Dvořáková et al., 2015). *H. stepanowi* se vyskytuje u evropských druhů *Emys* a *Mauremys* v celém areálu jejich rozšíření.

2.2 Hemosporidie

2.2.1 Popis skupiny

Haemosporidia je další diverzifikovaná skupina apicomplex, která zahrnuje čtyři čeledi: Garniidae, Leucocytozoidae, Plasmodiidae a Haemoproteidae. Všichni tito prvoci jsou přenášeni vektory, ve většině případů se jedná o dvoukřídlé hmyzy živící se krví. Hemosporidie se vyskytují ve všech třídách suchozemských obratlovců, včetně palearktické fauny. Hostitelská specifita je málo prozkoumána. Vzhledem k odlišným technickým aspektům použitelnosti jako biotagy, hemosporidie jsou níže rozděleny na základě jejich hostitelů do sekcí savců, ptáků a plazů pro účely této analýzy.

2.2.2 Hemosporidie u exotických plazů

Rod *Haemoproteus* Kruse, 1890 zahrnuje parazitické prvoky obojživelníků, plazů a ptáků (Valkiūnas, 2005, Valkiūnas et al., 2010; Telford, 2009). Paraziti se vyznačují pigmentovanými gametocyty v erytrocytech a absencí merontů v periferních krvinkách (Lainson & Naiff, 1998).

2.2.2.3 Hemosporidie u exotických ptáků

U ptáků se v krvinkách vyskytují tři rody haemosporidiálních protistů: *Haemoproteus*, *Plasmodium* a *Leucytozoon*. Hemosporidie se přenášejí krevsajícími dvoukřídlými hmyzem. Ve srovnání s extrémní rozmanitostí haemosporidií (popisují se stovky druhů) jsou údaje o hostitelské specifitě omezené. Zjevně existuje mnoho haemosporidií, které mají úzké spektrum hostitelů a úzké geografické rozšíření, ale existují i jiné (např. *Plasmodium relictum*), které považujeme za generalisty infikující široké spektrum hostitelů napříč kontinenty. Podobně chybí také údaje o vektorech většiny druhů. Nedávno byla zavedena klasifikace haemosporidií pomocí polymorfismu sekvencí cytochromu b a tato metoda je široce používána (např. Valkiūnas, 2005, Valkiūnas et al., 2010). Postupně se buduje společná databáze (viz dále), která obsahuje tisíce sekvencí/čárových kódů. Je zřejmé, že tato metoda má obrovský potenciál pro forenzní aplikace u obchodovaných ptáků.

2.2.2.4 Hemosporidie u savců

Mezi protisty v krvi savců mají členové rodu *Plasmodium* velkou prediktivní hodnotu u některých obchodovaných savců. Zejména u primátů existuje několik druhů *Plasmodium* specifických pro daného

hostitele (souvisejících s malárií u lidí), které se mohou přenášet pouze lokálně v oblasti výskytu specifických komárů jako vektorů (Verhulst et al., 2012). Detekce malárie byla nedávno zdokonalena a DNA *Plasmodium* lze detekovat také ve výkalech zvířat (Liu et al., 2010). Taková pozitivní diagnostika následovaná sekvenováním je pak jasným důkazem původu primátů. Vysoká prevalence ve studovaných populacích goril nížinných (Mapua et al., 2015) a šimpanzů (až 80 %) (např. Rayner et al., 2011) činí z *Plasmodium* spp. poměrně užitečný marker, avšak vzhledem k omezenému množství obchodovaných zvířat je širší použití nepravděpodobné. Stejně principy lze aplikovat i na jiné savce.

2.2.3 Metodologie

2.2.3.1 Materiál a metodika odběru

- Živá zvířata: plná žilní nebo kapilární krev odebraná veterinárním lékařem nebo oprávněnou osobou
- Živá zvířata (primáti): trus
- Pitva: krevní koagulum nebo tkáňový vzorek (játra, plíce, slezina)

2.2.3.2 Příprava pro diagnostická vyšetření

- z plné krve bezprostředně po odběru zhotovit dva krevní nátěry
- krevní nátěr obarvit standardními hematologickými metodikami (Giemsa, DiffQuick)
- zbylou část krve, případně odebrané tkáňové vzorky fixovat do 96% EtOH pro pozdější izolaci DNA v indikovaných případech
- trus primátů fixovat zamražením nebo v EtOH pro pozdější izolaci DNA v indikovaných případech

2.2.3.3 Vlastní vyšetření a identifikace

Mikroskopie: v případě poikilothermních hostitelů mikroskopie barvených nátěrů odhalí vývojová stadia lokalizované v erytrocytech (*Plasmodium*, *Haemoproteus*) nebo buňkách bílé krevní řady (*Leucocytozoon*). U ptáků mikroskopie barvených nátěrů odhalí vývojová stadia lokalizované v erytrocytech (*Plasmodium*, *Haemoproteus*) nebo buňkách bílé krevní řady (*Leucocytozoon*). U savců vývojová stadia lokalizované v erytrocytech (*Plasmodium*) (Identifikační obrázková tabule T1).

DNA analýza: DNA izolovaná tradičními postupy s využitím tkáňových izolačních kitů, v případě vzorků trusu (primáti) izolace odpovídajícím kitem. DNA izolovaná z krve amplifikována pomocí PCR se skupinovými specifickými primery (typicky HemNFI a HaemNR3 amplifikujícími okolo 479 bp genu pro cytB, poté analýza sekvencí s využitím BLAST nebo fylogenetická analýza sekvencí erudovaným molekulárním fylogenetikem. V případě sekvencí cytochrom B z ptáků možnost využití databáze MalAvi (<http://mbio-serv2.mbioekol.lu.se/MalAvi>) sloužící jako úložiště haplotypů sekvencí cytB. Každá jedinečná sekvence je považována za jedinečný haplotyp a je pojmenována kódem. Databáze lze prohledávat také na základě zkoumaného hostitele a její použití je bezplatné (Tamayo-Quintero et al., 2025, Olias et al., 2011). V případě DNA ze savců nutnost využití série primerů pro 18SrDNA (Assis et al., 2016) poté analýza sekvencí s využitím BLAST nebo fylogenetická analýza sekvencí erudovaným molekulárním fylogenetikem

2.2.3.4 Dokumentace výsledků

- Fotodokumentace odběru krve
- Nález v krevních nátěrech: mikrofotografie stadií při zvětšení 1000x
- Archivované DNA sekvence

2.2.3.5 Archivace materiálu:

- Krevní nátěry v plastových nebo papírových boxech při pokojové teplotě
- Krev fixovanou v etanolu krátkodobě v mrazicím boxu (-18 C), dlouhodobý bio-banking při -80C
- Kryo-archivovaná DNA

2.2.4 Závěr

Nález hemosporidií v erythrocytech u plazů má vysokou forenzní hodnotu s ohledem na jejich původ, obecně je přenos *Haemoproteus* u plazů chovaných v interiéru nepravděpodobný a zvířata, u nichž byly tyto stadia zjištěny v krvi, lze považovat za pocházející z volné přírody. Hodnocení zvířat chovaných na farmách v tropických oblastech ve venkovních klecích může být problematické, protože krev sající hmyz se k nim může snadno dostat a přenášet infekci. V případě ptáků je nezbytná detailní analýza sekvencí DNA a identifikace haplotypu cytB, ideálně s využitím databáze MalAvi. V případě savců je praktické využití náročné, limitované obvykle na primáty z potenciálně ilegálních zdrojů. S ohledem na závažnost této formy ilegálního obchodu však může mít detekce plasmodií velmi vysokou hodnotu v dokumentaci případu. Možnost využití trusu těchto zvířat k analýze DNA představuje extrémní výhodu ve srovnání s technickými a legálními aspekty odběrů krve u zadržených primátů.

2.3 Sarcosporidie (Sarcocystidae)

2.3.1 Popis skupiny

Dvojhostitelské kokcidie čeledi Sarcocystidae (především *Sarcocystis* spp.) jsou jednobuněční parazité z řádu Apicomplexa, kteří se přenášejí v rámci vztahů mezi predátory a jejich a kořistí. Typickými definitivními hostiteli jsou draví masožraví obratlovci, zejména hadi, někteří ještěři, draví ptáci a sovy a masožraví savci. Druhy rodu *Sarcocystis* vykazují určitou míru hostitelské specifity (a z toho vyplývající rozmanitost) jak na úrovni definitivního hostitele (= predátor), tak na úrovni mezihostitele (= kořist). U hadů různé druhy rodu *Sarcocystis* cyklují ve vývojových cyklech had-hlodavec nebo had-ještěř. Mezihostitel (hlodavec nebo ještěř) se nakazí požitím infekčních sporocyst, které se vylučují ve výkalech hadů a kontaminují prostředí. V mezihostitelích se *Sarcocystis* spp. rozmnožuje nepohlavně, vstupuje do svalových buněk a tvoří cysty, ve kterých paraziti zůstávají životaschopní po několik let, někdy po zbytek života. Sarcosporidie se vyskytují také u dravých ptáků a sov, kde se obvykle přenášejí mezi dravými ptáky a hlodavci, některé také mezi dravci a zpěvnými ptáky. Nelze-li vyloučit požití kořisti pocházející z volné přírody, je použitelnost přítomnosti *Sarcocystis* jako predikce původu omezená.

2.3.2 Metodologie

2.3.2.1 Materiál a metodika odběru

- živá zvířata: trus
- pitva: obsah střeva nebo svalová tkáň

2.3.2.2 Příprava pro diagnostická vyšetření

- čerstvý trus připravit pro vyšetření flotačním postupem (A1.3)
- odebranou svalovou tkáň možno vyšetřit prostým roztakovým preparátem, v případě nálezu svalových stadií tkáň připravit k izolaci DNA

2.3.2.3 Vlastní vyšetření a identifikace

Mikroskopie: mikroskopické vyšetření výsledku flotačního vyšetření při zvětšení minimálně 400x, v případě nálezu sporocyst fotodokumentace a příprava materiálu k izolaci DNA (Příloha: Identifikační obrázková tabule T1).

DNA analýza: DNA izolovaná tradičními postupy s využitím tkáňových izolačních kitů (svalovina), v případě vzorků trusu izolace odpovídajícím kitem. V izolované DNA amplifikace fragmentu 18SrDNA nebo 28SrDNA

pomocí PCR se skupinově specifickými primery (viz přílohy v Lee and Muthu, 2021, poté analýza sekvencí s využitím BLAST nebo fylogenetická analýza sekvencí erudovaným molekulárním fylogenetikem.

2.3.2.4 Dokumentace výsledků

- Fotodokumentace výsledku flotačního vyšetření - mikrofotografie sporocyst při zvětšení 1000x
- Archivované DNA sekvence

2.3.2.5 Archivace materiálu

- Trus do 96% EtOH
- Trus fixovaný v EtOH krátkodobě v mrazicím boxu (-18 C), dlouhodobý bio-banking při -80C
- Kryo-archivovaná DNA
- Archivované DNA sekvence

2.3.3 Závěr

Sarcocystis spp. jsou paraziti, kteří mají významný význam v forenzních vyšetřováních, a jako takoví byli dříve používáni (viz další diskuse). Aby však bylo možné jejich přítomnost použít jako důkaz původu vyšetřovaného jedince z volné přírody, musí být potvrzeno, že vyšetřovaný obratlovec neměl přístup k živým obratlovcům z volného prostředí, podávaným jako potrava. Negativní výsledky vyšetření výkalů nemají žádnou hodnotu. Pozitivní výsledky silně naznačují původ vyšetřovaného jedince z volné přírody, protože přenos v zajetí je velmi nepravděpodobný. Výše popsané situace však komplikují skutečnou forenzní hodnotu v situacích s právními důsledky. *Sarcocystis* spp. lze použít také pro forenzní účely u různých obratlovců, kteří slouží jako meziphostitelé v životním cyklu. Jelikož se cysty vyskytují ve svalech, nelze je u živých zvířat detekovat. Naopak, tkáňové cysty lze snadno pozorovat a izolovat z mrtvých jedinců během pitvy. I v těchto případech je obvykle nutná molekulární identifikace a až na úroveň druhu pomocí analýz sekvencí DNA.

2.4 Motolice a tasemnice

2.4.1 Popis skupiny

Motolice (Digenea, trematodes) jsou obligátně heteroxenní helminti obratlovců, kteří vykazují obrovskou rozmanitost ve všech třídách obratlovců. Jejich životní cyklus je vždy heteroxenní a může zahrnovat až tři různé meziphostitele (nebo paratenické hostitele). U absolutní většiny druhů je životní cyklus závislý na měkkýších (obvykle vodních) jako prvních meziphostitelích. Díky tomu lze životní cyklus jen stěží dokončit mimo přirozené prostředí. Obratlovci mohou sloužit buď jako definitivní hostitelé, vajíčka motolic se obvykle vylučují v trusu, nebo obratlovci (obvykle plazi a obojživelníci) slouží jako meziphostitelé, kdy jsou stadia motolic (obvykle metacerkárie) přítomna v tkáních a orgánech, u obojživelníků také pod kůží. Popis enormní rozmanitosti motolic jasně přesahuje rámec této studie a jejich taxonomie vyžaduje vyškolené odborníky. Veškerá taxonomie je založena na morfologii helmintů odebraných z orgánů.

Tasemnice (Cestoda, cestodes) jsou helminti s typicky heteroxenním (obvykle dixenním) životním cyklem. Jejich rozmanitost u poikilotermních hostitelů je obrovská a většina druhů pravděpodobně ještě čeká na taxonomický popis. Obratlovci mohou být v životním cyklu tasemnic buď definitivními hostiteli, nebo meziphostiteli. V případě, že je obratlovec definitivním hostitelem, jsou tasemnice lokalizovány ve střevě a vajíčka a proglotidy jsou (i když nepravidelně) vylučovány v trusu, kde mohou být detekovány a dále zkoumány. V situaci, kdy konkrétní obratlovec slouží jako meziphostitel pro konkrétní tasemnici, jsou larvální stadia, tzv. larvocysty, přítomna v orgánech, břišní dutině nebo podkoží. Zatímco larvy v orgánech nelze u

živých hostitelů detekovat, subkutánní stadia pseudofylidních tasemnic (nazývaná plerocercoidy nebo spargana, hlavně rodu *Spirocerca*) lze detekovat v podkožních zduřeninách a chirurgicky vyjmout. Tato situace je charakteristická a forenzně významná pro hady dovezené z jihovýchodní Asie. Odstranění vyžaduje zapojení zkušeného veterináře a může být pro vyšetřované zvíře škodlivé. V ideálním případě by odstranění mělo být provedeno na klinice za sterilních podmínek. Zkoumání a diskuse o rozmanitosti tasemnic jasně přesahuje rámec této analýzy. Rozsáhlé seznamy druhů jsou k dispozici online (Caira et al., 2015). Pro účely forenzní parazitologie u obchodovaných zvířat mají však tasemnice zásadní význam, a to kvůli jejich složitému životnímu cyklu a nemožnosti přenosu v podmínkách chovu v zajetí. V případě hadů a varanů přítomnost tasemnic silně naznačovala původ v přírodě, což dobře odpovídá publikovaným údajům o zabavených plazech z Německa a hadech dovezených např. do České republiky.

2.4.2 Metodologie

2.4.2.1 Materiál a metodika odběru

- živá zvířata: trus
- živá zvířata: larvální stadia tasemnic vyjmutá z podkoží
- pitva: obsah střeva, tělní dutiny, tkáň orgánů

2.4.2.2 Příprava pro diagnostická vyšetření

- čerstvý trus připravit pro vyšetření flotačním a sedimentačním postupem (A1.3, A1.4)
- stadia tasemnic vyjmutá z podkoží materiál fixovat v 70% etanolu a připravit k identifikaci expertem a/nebo izolaci DNA
- kompletní parazitologická pitva provedená erudovaným parazitologem, v případě nálezu helmintů ze skupin motolic nebo tasemnic materiál fixovat v 70% etanolu a připravit k identifikaci expertem a/nebo izolaci DNA

2.4.2.3 Vlastní vyšetření a identifikace

Mikroskopie: mikroskopické vyšetření výsledku flotačního a sedimentačního vyšetření při zvětšení minimálně 200x, v případě nálezu typických vajíček fotodokumentace a příprava materiálu k izolaci DNA (Příloha: Identifikační obrázková tabule T2). Dospělce motolic nebo tasemnic nalezené při pitvě je možno dále zpracovat, obarvit specifickými postupy ve specializované helmintologické laboratoři a následně identifikovat klasickými taxonomickými postupy. Analogicky se zpracují larvální stadia tasemnic vyjmutá z podkoží.

DNA analýza: DNA izolovaná tradičními postupy s využitím tkáňových izolačních kitů (dospělci nebo larvální stadia motolic a tasemnic), v případě vzorků trusu izolace (obvykle ze sedimentu) odpovídajícím kitem. V izolované DNA amplifikace fragmentu 18SrDNA nebo dalších genů pomocí PCR se skupinově specifickými primery (nutná a priori konzultace s expertem na danou skupinu), poté analýza sekvencí s využitím BLAST nebo fylogenetická analýza sekvencí erudovaným molekulárním fylogenetikem.

2.4.2.4 Dokumentace výsledků

- Fotodokumentace výsledku flotačního a sedimentačního vyšetření – mikrofotografie vajíček při zvětšení 400x
- Fotodokumentace z pitev
- Fotodokumentace nalezených helmintů
- Archivované DNA sekvence

2.4.2.5 Archivace materiálu

- Trus do 96% EtOH
- Trus fixovaný v EtOH krátkodobě v mrazicím boxu (-18 C), dlouhodobý bio-banking při -80C
- Kryo-archivovaná DNA
- Archivované DNA sekvence
- Trvalé mikroskopické mprepráty helmintů nebo jejich částí
- Helminti fixovaní v EtOH krátkodobě v mrazicím boxu (-18 C), dlouhodobý bio-banking při -80C

2.4.3 Závěr

Negativní výsledky vyšetření trusu nemají v případě obou skupin žádnou forenzní hodnotu. Pozitivní výsledky (ať už je to nález vajíček v trusu nebo přítomnost helmintů obou skupin při pitvě) silně naznačují původ vyšetřovaného jedince z volně žijící populace v místě původního výskytu, protože přenos v zajetí je velmi nepravděpodobný. Ačkoli je přesné určení na základě vajíček v trusu živých zvířat téměř nemožné, pro forenzní účely to není nutné. Nález tasemnic v trusu dravých plazů (hadi a varani) s vysokou pravděpodobností vypovídá o původu zvířete ve volně žijící populaci. U hadů dovezených z jihovýchodní Asie lze v podkožních združeninách nalézt larvální stadia pseudofylidních tasemnic (*spargana*). Tato situace má vysokou forenzní hodnotu, protože plerocerkoidy se nemohou vyskytovat u jedinců narozených v zajetí.

Ve výjimečných případech mohou některé hymenolepidní a anoplocephalidní tasemnice (*Hymenolepis* in u hlodavců, *Oochoristica* spp. u ještěrů – např. u leguánů zelených *Iguana iguana*) dokončit vývojový cyklus a cirkulovat v populaci hostitele v zajetí, díky možnosti využití bezobratlých mezipřehostitelů v ubikacích. Významným faktem je, že tasemnice *Hymenolepis nana* a *H. diminuta* jsou běžné tasemnice u hlodavců chovaných v zajetí, včetně těch z kolonií hlodavců používaných jako potrava pro hady, jiné velké plazy a masožravé ptáky. Přítomnost typických vajíček těchto tasemnic ve výkalech masožravce je tedy případem pseudoparazitismu (= pasivní přenos vajíček z potravy do výkalů) a nemá žádnou forenzní hodnotu, rozlišení musí provést zkušený parazitolog.

2.5 Vrtejší

2.5.1 Popis skupiny

Vrtejší (Acanthocephala) jsou paraziti, kteří žijí ve střevech obratlovců a - v rané fázi svého životního cyklu - v bezobratlých. Typickým znakem je trnitý vysunovatelný chobotek/proboscis, pomocí kterého se přichytávají ke stěně střeva hostitele (Yamaguti, 1963). Typická vajíčka, obsahující larvu s již patrnými trny, jsou vylučována v trusu. Jakmile se vajíčka s vyvíjející se larvou dostanou mimo definitivního hostitele, musí být pohlcena členovcem, který je jejich mezipřehostitelem. Mezi známé mezipřehostitele vrtejšů se suchozemským životním cyklem patří hmyz (zejména Coleoptera a Orthoptera), isopodi a mnohonožky (Richardson 2006). Mezipřehostitelé pro vrtejše životním cyklem ve vodním prostředí jsou obvykle desetinožci nebo jiní korýši. Ačkoli není znám žádný životní cyklus vrtejšů, který by zahrnoval více než jednoho mezipřehostitele z řádu členovců, může se někdy kromě definitivního hostitele z řádu obratlovců vyskytovat také paratenický hostitel z řádu obratlovců. V paratenickém hostiteli červ proniká střevní stěnou a lokalizuje se v mezenteriu nebo parenchymatózních orgánech, kde zůstává v infekčním cystakantním stadiu. Ačkoli paratenický hostitel zjevně není nezbytný, může přesto hrát důležitou roli při přesunu parazita na další trofickou úroveň, aby mohl dokončit svůj životní cyklus. Právě tato stadia mají vysokou forenzní hodnotu, neboť se vyskytují pouze u jedinců z volné přírody.

Příklady vrtejšů u importovaných obratlovců:

- *Oligacanthorhynchus*, žáby
- *Centrorhynchus*, larvální stadia v plazech
- *Acanthocephalus Anuracanthorhynchus*, žáby, ještěři
- *Paraprosthenorchis*, luskouni *Manis pentadactyla*
- *Sphaerechinorhynchus*, kočkovité šelmy a varani (*V. salvator*)

2.5.2 Metodologie

2.5.2.1 Materiál a metodika odběru

- živá zvířata: trus
- živá zvířata: larvální stadia vyjmutá z podkoží
- pitva: obsah střeva, tělní dutiny, tkáň orgánů

2.5.2.2 Příprava pro diagnostická vyšetření

- čerstvý trus připravit pro vyšetření sedimentačním postupem (**A1.4**)
- stadia vyjmutá z podkoží - materiál fixovat v 70% etanolu a připravit k identifikaci expertem a/nebo izolaci DNA
- kompletní parazitologická pitva provedená erudovaným parazitologem, v případě nálezu vrtejšů materiál fixovat v 70% etanolu a připravit k identifikaci expertem a/nebo izolaci DNA

2.5.2.3 Vlastní vyšetření a identifikace

Mikroskopie: mikroskopické vyšetření výsledku sedimentačního vyšetření při zvětšení minimálně 200x, v případě nálezu typických vajíček fotodokumentace a příprava materiálu k izolaci DNA (Příloha: Identifikační obrázková tabule T3). Dospělce vrtejšů je možno snadno identifikovat na základě chobotky s háčky, jedince nalezené při pitvě je možno dále zpracovat, obarvit specifickými postupy ve specializované helmintologické laboratoři a následně identifikovat klasickými taxonomickými postupy. Analogicky se zpracují larvální stadia vyjmutá z podkoží.

DNA analýza: DNA izolovaná tradičními postupy s využitím tkáňových izolačních kitů (dospělci nebo larvální stadia), v případě vzorků trusu izolace (obvykle ze sedimentu) odpovídajícím kitem. V izolované DNA amplifikace fragmentu 18SrDNA nebo dalších genů pomocí PCR se skupinově specifickými primery (nutná a priori konzultace s expertem na danou skupinu, fylogenetická odlišnost vrtejšů vyžaduje jiné sety primerů) (Zhao et al., 2024), poté analýza sekvencí s využitím BLAST nebo fylogenetická analýza sekvencí erudovaným molekulárním fylogenetikem.

2.5.2.4 Dokumentace výsledků

- Fotodokumentace výsledku sedimentačního vyšetření – mikrofotografie vajíček při zvětšení 400x
- Fotodokumentace z pitev
- Fotodokumentace nalezených vrtejšů
- Archivované DNA sekvence

2.5.2.5 Archivace materiálu

- Trus do 96% EtOH
- Trus fixovaný v EtOH krátkodobě v mrazicím boxu (-18 °C), dlouhodobý bio-banking při -80 °C
- Kryo-archivovaná DNA
- Archivované DNA sekvence
- Helminti fixovaní v EtOH krátkodobě v mrazicím boxu (-18 C), dlouhodobý bio-banking při -80 °C

2.5.3 Závěr

Negativní výsledky vyšetření trusu nemají v případě vrtejšů žádnou forenzní hodnotu. Pozitivní výsledky (ať už je to nález vajíček v trusu nebo přítomnost larválních stádií v podkoží nebo při pitvě) silně naznačují původ vyšetřovaného jedince z volně žijící populace v místě původního výskytu, protože přenos v zajetí je velmi nepravděpodobný. Ačkoli je přesné určení na základě vajíček v trusu živých zvířat téměř nemožné, pro forenzní účely to není nutné, z vajíček z trusu lze snadno izolovat i DNA a tu využít k fylogenetické analýze. Larvální stadia vrtejšů lze v podkožních zduřeninách nalézt často u hadů dovezených z jihovýchodní Asie. Tato situace má vysokou forenzní hodnotu, protože takové larvy se nemohou vyskytovat u jedinců narozených v zajetí. Vzhledem k rozsahu hostitelů lze výskyt vrtejšů očekávat hlavně u žab, některých hadů, některých druhů varanů, některých ptáků a savců. Nálezy u luskounů jsou velmi zajímavé, protože tato zvířata jsou často předmětem nelegálního obchodu.

2.6 Heteroxenní hlístice

2.6.1 Popis skupiny

Paraziti s povinným heteroxenním (obvykle dixenním) životním cyklem se vyskytují také mezi hlísticemi. Tyto druhy mají velký význam pro forenzní parazitologii, protože jejich životní cyklus se obvykle dokončuje pouze v přírodním prostředí, kde se vyskytují specifické meziphostitelé.

Spiruridní hlístice GIT

Rozmanitá skupina spiruridních hlístic zahrnuje typicky druhy, jejichž životní cyklus obvykle zahrnuje hmyz jako meziphostitele. Hmyz se obvykle nakazí požitím vajíček z prostředí. Životní cyklus se dokončí, když definitivní hostitel (=obratlovec) pozře infikovaný hmyz. Logicky jsou infekce spiruridů běžné u hmyzožravých nebo všežravých hostitelů. Přítomnost vajíček spiruridů ve výkalech vyšetřovaných zvířat vždy naznačuje, že se jedná o zvířata pocházející z volné přírody. Existují však důkazy, že některé heteroxenní hlístice primátů (např. *Gongylonema*) chovaných v zajetí mohou dokončit svůj životní cyklus v švábech, kteří obývají klece (klinické infekce primátů Starého světa hlášené z některých evropských zoologických zahrad). Vajíčka spiruridů jsou morfologicky velmi typická a obsahují stočenou larvu. Podrobné určení parazita není obvykle možné kvůli uniformitě vajíček. Identifikace založená na DNA analýze je obtížná, protože referenčních sekvencí je velmi málo.

Filárie

Specifickou skupinou nematodů, které mají typicky heteroxenní životní cyklus, jsou filárie (obvykle zařazované do podřádu Filarida v rámci řádu Spirurida). Jedná se o parazity přenášené pouze krevsajícími vektory, typicky dvoukřídlými hmyzem (Anderson, 2000). U plazů je kompetentním přenašečem vždy hmyz žijící v oblasti, kde se daný druh plazů vyskytuje. Přenos u plazů chovaných v interiéru je velmi nepravděpodobný, pokud nejsou plazi vystaveni komárům a podobnému hmyzu. Na základě publikovaných údajů i terénního a laboratorního sledování je prediktivní hodnota filárií ve forenzních vyšetřováních velmi vysoká, vždy naznačuje původ v přírodě. Údaje o hostitelské specifitě a diverzitě filárií u tropických ptáků jsou velmi vzácné. Několik dostupných studií odhalilo vysokou diverzitu, a to jak u tropických, tak u palearktických ptáků (Seghal et al., 2005). DNA barcoding umožňuje rozlišit druhy, avšak množství srovnávacích sekvencí je velmi omezené a pokrývá pouze zanedbatelnou část skutečné diverzity. Obecně nelze vyloučit možnost, že filárie jsou přenášeny z volně žijících ptáků původem z Evropy na exotické ptáky chované v zajetí. Proto má pouhý nález mikrofilarie v krvi ptáků pochybného původu relativně nízkou hodnotu, pokud DNA barcoding neprokáže druhy/haplotypy typické pro tropické země. V případě savců jsou filárie relativně dobře prostudovanou skupinou u primátů Nového světa (Ehlers et al., 2023).

2.6.2 Metodologie

2.6.2.1 Materiál a metodika odběru

- živá zvířata: trus
- Živá zvířata: plná žilní nebo kapilární krev odebraná veterinárním lékařem nebo oprávněnou osobou
- živá zvířata - plazi: dospělci filárií vyjmutí z podkoží veterinárním lékařem
- pitva: podkoží, tělní dutiny, tkáň orgánů

2.6.2.2 Příprava pro diagnostická vyšetření

- čerstvý trus připravit pro vyšetření flotačním postupem (A1.3)
- z plné krve bezprostředně po odběru zhotovit dva krevní nátěry
- krevní nátěr obarvit standardními hematologickými metodikami (Giemsa, DiffQuick)
- zbylou část krve, případně odebrané tkáňové vzorky fixovat do 96% EtOH pro pozdější izolaci DNA v indikovaných případech
- hlístice vyjmuté z podkoží - materiál fixovat v 70% EtOH a připravit k identifikaci expertem a/nebo izolaci DNA
- kompletní parazitologická pitva provedená erudovaným parazitologem, v případě nálezu filárií (stěna tělní dutiny, cévy, podkoží) materiál fixovat v 70% EtOH a připravit k identifikaci expertem a/nebo izolaci DNA

2.6.2.3 Vlastní vyšetření a identifikace

Mikroskopie: mikroskopické vyšetření výsledku flotačního vyšetření při zvětšení minimálně 200x, v případě nálezu typických vajíček (vždy se stočenou larvou L1) provedení fotodokumentace, případně archivace materiálu pro izolaci DNA (Příloha: Identifikační obrázková tabule T2). Při intravitálním forenzním vyšetřování má mimořádný význam nález filárií v podkoží plazů (typicky u chameleonů). Samotný nález je velmi charakteristický a vysoce průkazný. Dospělé jedince je možno vyjmout a dále zpracovat, obarvit specifickými postupy ve specializované helmintologické laboratoři a následně identifikovat klasickými taxonomickými postupy. Analogicky se zpracují vyjmutá z podkoží nebo tělních dutin při pitvě. Larvální stadia filárií (tzv. mikrofilátie) lze snadno detekovat v krevních roztěrech (Halla et al., 2014).

Larvální stadia filárií (L1, mikrofilárie) detekujeme pomocí mikroskopie barvených nátěrů, která odhalí typické L1 (Identifikační obrázková tabule T2).

DNA analýza: DNA izolovaná tradičními postupy s využitím tkáňových izolačních kitů (dospělci nebo larvální stadia). V izolované DNA amplifikace fragmentu 18SrDNA nebo dalších genů pomocí PCR se skupinově specifickými primery (nutná a priori konzultace s expertem na danou skupinu, fylogenetická odlišnost filárií plazů a savců vyžaduje jiné sady primerů) (Ehlers et al., 2023; Maia et al., 2014), poté analýza sekvencí s využitím BLAST nebo fylogenetická analýza sekvencí erudovaným molekulárním fylogenetikem.

2.5.2.4 Dokumentace výsledků

- Fotodokumentace výsledku flotačního vyšetření – mikrofotografie vajíček při zvětšení 400x
- Fotodokumentace z pitev
- Fotodokumentace odběru krve
- Nález v krevních nátěrech: mikrofotografie stadií při zvětšení 1000x
- Archivované DNA sekvence

2.5.2.5 Archivace materiálu

- Trus fixovaný v 96% EtOH krátkodobě v mrazicím boxu (-18 °C), dlouhodobý bio-banking při -80 °C

- Krevní nátěry v plastových nebo papírových boxech při pokojové teplotě
- Krev fixovanou v EtOH krátkodobě v mrazicím boxu (-18 C), dlouhodobý bio-banking při -80C
- Kryo-archivovaná DNA
- Archivované DNA sekvence
- Helminți fixovaní v EtOH krátkodobě v mrazicím boxu (-18 C), dlouhodobý bio-banking při -80 °C

2.5.3 Závěr

Negativní výsledky vyšetření trusu nebo krve nemají v případě žádnou forenzní hodnotu. Pozitivní výsledky (ať už je to nález spiruridních vajíček v trusu, přítomnost larválních stádií filárií v krvi nebo dospělé filárie v podkoží nebo při pitvě) silně naznačují původ vyšetřovaného jedince z volně žijící populace v místě původního výskytu, protože přenos v zajetí je velmi nepravděpodobný. Ačkoli je přesné určení na základě vajíček v trusu živých zvířat téměř nemožné, pro forenzní účely to není nutné, z vajíček z trusu lze snadno izolovat i DNA a tu využít k fylogenetické analýze. Dospělci filárií v podkoží plazů (*Foleyella* spp.) typicky hadovitě prominují a jsou patrné i při pouhé prohlídce jedince. Takové situace lze nalézt často u chameleonů dovezených z Afriky nebo Madagaskaru. Tato situace má vysokou forenzní hodnotu, protože tyto filárie se nemohou vyskytovat u jedinců narozených v zajetí.

2.7 Jazyčnatky

2.7.1 Popis skupiny

Jazyčnatky (Pentastomida) představují jedinečnou fylogeneticky dobře definovanou skupinu endoparazitů, kteří ve skutečnosti představují odvozenou skupinu korýšů přizpůsobených endoparazitickému životu v obratlovcích (Lavrov et al., 2004, Montes et al., 2025). Pouze několik taxonů jazyčnatek se vyskytuje u ptáků a savců, většina taxonů parazituje na plazech. Jazyčnatky mohou využívat plazy jako definitivní hostitele, v takovém případě se dospělci lokalizují v plicích (nebo horních dýchacích cestách) a vajíčka se vylučují ve stolici. Většina druhů, které se vyskytují u dravých plazů, je zjevně heteroxenních, plaz, který představuje definitivní hostitele, se nakazí pozřením infikované kořisti. Některé jazyčnatky mohou plazy využívat také jako meziphostitele, jejich stadia se pak lokalizují v tělní dutině nebo v orgánech a u živých zvířat je nelze detekovat. Pečlivá pitva obvykle vede k jejich detekci a identifikaci. Je nutné je řádně odlišit od larválních helmintů (Tappe et al., 2011). Vajíčka jazyčnatek jsou snadno detekovatelná ve výkalech jejich hostitelů pomocí flotačních/sedimentačních technik, i když obvykle nejsou přítomna ve velkém množství. Vajíčka jsou charakteristická přítomností čtyř párů háčků na končetinách larvy uvnitř vajíčka. Jednotlivé druhy nelze rozlišit na základě morfologie vajíček. Některé jazyčnatky mohou infikovat i člověka, přičemž se přenášejí vajíčky z výkalů hadů. Manipulace s takovými vzorky vyžaduje základní bezpečnostní opatření, aby se minimalizovalo riziko infekce osob.

2.7.2 Metodologie

2.7.2.1 Materiál a metodika odběru

- živá zvířata: trus
- mrtvá zvířata: kompletní pitva s důrazem na prohlídku plic, dýchacích cest a orgánů

2.7.2.2 Příprava pro diagnostická vyšetření

- čerstvý trus připravit pro vyšetření flotačním i sedimentačním postupem (A1.3, A1.4)

- stadia vyjmutá z plic, dalších orgánů nebo podkoží - materiál fixovat v 70% EtOH a připravit k identifikaci expertem a/nebo izolaci DNA
- kompletní parazitologická pitva provedená erudovaným parazitologem, v případě nálezu vrtejšů materiál fixovat v 70% EtOH a připravit k identifikaci expertem a/nebo izolaci DNA

2.6.2.3 Vlastní vyšetření a identifikace

Mikroskopie: mikroskopické vyšetření výsledku flotačního a sedimentačního vyšetření při zvětšení minimálně 200x, v případě nálezu typických vajíček (vždy s larvou s patrnými drápky) provedení fotodokumentace, případně archivace materiálu pro izolaci DNA. Při intravitálním forenzním vyšetřování má mimořádný význam jak nález vajíček v trusu (hadi, varani), tak nález dospělců v plicích nebo dýchacích cestách pitvaných zvířat (typicky u hadů a krokodýlů). Samotný nález je velmi charakteristický a vysoce průkazný. Dospělé jedince je možno vyjmout a dále zpracovat, a následně identifikovat klasickými taxonomickými postupy.

DNA analýza: DNA izolovaná tradičními postupy s využitím tkáňových izolačních kitů (jak dospělci, tak larvální stadia). V izolované DNA amplifikace fragmentu 28SrDNA, cox1 nebo dalších genů pomocí PCR se skupinově specifickými primery (nutná a priori konzultace s expertem na danou skupinu) (Montes et al., 2025), poté analýza sekvencí s využitím BLAST nebo fylogenetická analýza sekvencí erudovaným molekulárním fylogenetikem.

2.5.2.4 Dokumentace výsledků

- fotodokumentace – makrofotografie nálezů při pitvě
- mikrofotografie vajíček při světelné mikroskopii
- Archivované DNA sekvence

2.5.2.5 Archivace materiálu

- stadia jazyčnatky fixovaná v 70/96% EtOH krátkodobě v mrazicím boxu (-18 °C), dlouhodobý bio-banking při -80 °C
- Kryo-archivovaná DNA
- Archivované DNA sekvence

2.5.3 Závěr

Jazyčnatky mají velký význam ve forenzní praxi u obchodovaných plazů. U krokodýlů a želv se vyskytují jen zřídka (čeleď *Sebekidae*, rody *Sebekia*, *Alofia*, *Leiperia* a čeleď *Subtriquetridae* s jediným rodem *Subtriquetra*), u těchto zvířat však zásadně naznačují původ zkoumaných zvířat z volné přírody. Jazyčnatky jsou typické pro menší ještěry (hlavně gekony, scinky, agamy), u nichž je běžným nálezem rod *Raillietiela* (čeleď *Cephalobaenidae*). Ve velké většině případů se druhy *Raillietiela* vyskytují pouze u plazů odchycených ve volné přírodě, existují však určité náznaky jejich příležitostného přenosu u gekonů chovaných v zajetí prostřednictvím hmyzu žijícího v teráriích. Další skupinou hostitelů s typickým výskytem jazyčnatky jsou varani, včetně druhů z Afriky, Asie a Austrálie (čeleď *Sambonidae*, rody *Parasambonia*, *Sambonia/Elenia*, *Waddycephalus*). Životní cyklus většiny druhů není znám, je však pravděpodobně heteroxenní a přítomnost vajíček naznačuje původ ve volné přírodě. S ohledem na kritickou nutnost kontroly mezinárodního obchodu s vrany JV Asie je tato skupina patogenů významnou pomůckou ve forenzní práci. Členové posledních dvou čeledí pentastomidů jsou typickými parazity větších hadů (čeleď *Porocephalidae*, rody *Porocephalus* a *Kiricephalus*, čeleď *Armilliferidae*, rody *Armillifer*, *Cubirea*, *Giglioella*). Pravděpodobně všechny tyto druhy jsou heteroxenní a mohou být použity jako forenzní indikátory, jak je popsáno výše. Nicméně hadi chovaní v zajetí, kteří byli vychováni v přírodním prostředí nebo krmení stravou obsahující divoké krysy nebo jinou divokou kořist, se mohou pravděpodobně nakazit stejnými parazity jako jejich divocí příbuzní. Přítomnost

larválních stadií u pitvaných jedinců je také velmi nápadná, ale opět platí, že infekce může být získána od divokých jedinců chovaných ve stejném zařízení. Takové situace musí být řešeny případ od případu, zásadně může napomoci nálezná kombinace různých heteroxenních parazitů.

2.8 Exotická klíšťata

2.8.1 Popis skupiny

Klíšťata jsou parazitičtí členovci živící se krví savců, ptáků a plazů (zřídka obojživelníků), jejichž celková rozmanitost dosahuje více než 800 druhů. Až na několik výjimek se jedná o členy čeledi Ixodidae (angl. Hard ticks), kteří se vyskytují na obchodovaných zvířatech. Klíšťata mají v zásadě tři typy životního cyklu, některá se živí pouze na jednom hostitelem během všech tří životních fází (tzv. jednohostitelská klíšťata). Tento typ klíštěte zůstává na jednom hostiteli během larvální a nymfální fáze, až do dospělosti, a samice opouští hostitele po nakrmení, aby nakladly vajíčka. Jiná klíšťata parazitují během svého života na dvou různých hostitelích (dvojhositelská klíšťata). A konečně, většina klíšťat vystřídá během života tři hostitele, jednoho v každé životní fázi (trojhositelská klíšťata). Životní cyklus všech druhů klíšťat vyžaduje specifické podmínky vnějšího prostředí, trvá poměrně dlouho a až na několik výjimek jej nelze dokončit v ubikacích zvířat uvnitř budov. Různé druhy klíšťat mají omezený geografický areál, což napomáhá k odhadu geografického původu jejich hostitele. Existují studie o klíšťatech na exportovaných exotických obratlovcích a stěhovavých ptácích, které jasně ukazují jejich hodnotu jako biotagů, využitelných ve forenzní praxi, více viz Mihalca et al., 2015, Pietzsch et al., 2006, González-Acuña et al., 2005, a Burridge a Simmons, 2003.

Příklady klíšťat významných pro forenzní sledování:

- *Aponomma latum*, plazi, Afrika, tropické oblasti
- *Hyalomma aegyptium*, suchozemské želvy, Balkán, Mediterán
- *Aponomma komodoense*, varan komodský, JV Asie
- *Aponomma gervasi*, varan bengálský, *V. bengalensis*, tropická Asie
- *Ambylomma helvolum*, plazi JV Asie až po Austrálii
- *Amblyomma exornatum*, afričtí varani a hadi
- *Amblyomma sparsum* africké suchozemské želvy r. *Stigmochelys*

2.8.2 Metodologie

2.8.2.1 Materiál a metodika odběru

- živá zvířata: důkladná prohlídka povrchu těla, klíšťata přisátá na hostiteli. Při prohlídce se u ještěřů zaměřit na okolí očí a učních otvorů, mezisaničí, záhyby kůže na krku a okolo končetin, okolí kloaky. U hadů, savců a ptáků kdekoli po těle, u obojživelníků spíše výjimečně, typicky u ropuch.
- zásilky živých zvířat: nasátá i nenasátá klíšťata v přepravních obalech
- mrtvá zvířata, zvířecí kůže: přichycená klíšťata

2.8.2.2 Příprava pro diagnostická vyšetření

- přichycená klíšťata jemným tahem vyjmout a umístit do 96% EtOH
- přepravní obaly umístit do odpovídajících plastových sáčků či pytlů, zajistit proti úniku lezoucích členovců
- přepravní obaly prohlížet po krátkém předchozím přemrazení, aby se zabránilo nechtěnému úniku

- veškeré nalezené členovce fixovat v 70% EtOH a připravit k identifikaci expertem a/nebo izolaci DNA

2.8.2.3 Vlastní vyšetření a identifikace

Mikroskopie: vyšetření mikroskopických identifikačních znaků za použití stereomikroskopu, provedení fotodokumentace, případně archivace materiálu pro izolaci DNA (Příloha: Identifikační obrázková tabule T3). Při intravitálním forenzním vyšetřování má mimořádný význam nález klíšťat přichycených na kůži plazů. Samotný nález je velmi charakteristický a vysoce průkazný.

DNA analýza: DNA izolovaná tradičními postupy s využitím tkáňových izolačních kitů (jak dospělci, tak larvální stadia). V izolované DNA amplifikace fragmentu 18SrDNA, 16SrDNA, *cox1* nebo dalších genů pomocí PCR se skupinově specifickými primery (nutná a priori konzultace s expertem na danou skupinu, poté analýza sekvencí s využitím BLAST nebo fylogenetická analýza sekvencí erudovaným molekulárním fylogenetikem.

2.8.2.4 Dokumentace výsledků

- fotodokumentace – makrofotografie přichycených nebo lezoucích klíšťat
- mikrofotografie stadií s využitím stereomikroskopu
- Archivované DNA sekvence

2.8.2.5 Archivace materiálu

- klíšťata fixovaná v 70/96% EtOH krátkodobě v mrazicím boxu (-18 °C), dlouhodobý bio-banking při -80 °C
- Kryo-archivovaná DNA
- Archivované DNA sekvence

2.8.3 Závěr

Negativní výsledky vyšetření na přítomnost klíšťat nemají žádnou hodnotu, protože je relativně snadné klíšťata odstranit mechanicky nebo zvířata ošetřit parazitocidy, klíšťata na importovaných zvířatech nevydrží déle než několik týdnů. Pozitivní výsledky, tj. nalezení přisátých klíšťat, silně naznačují původ vyšetřovaného jedince z přírody, protože přenos a životní cyklus v zajetí jsou velmi nepravděpodobné. Dosud jediným druhem přenosným v podmínkách vnitřního chovu je *Aponomma komodoense*, o kterém je známo, že infikuje skupiny komodských varanů chovaných v zajetí. Běžné palearktické klíště *Ixodes ricinus* může také parazitovat na plazech, pokud mají přístup do vnějšího prostředí. Je běžné u evropských ještěrek, ale u zvířat v zajetí se obvykle nevyskytuje. Na základě zkušeností s klíšťaty na dovezených a volně žijících exotických plazech a předchozích sledování klíšťat na savcích kůžích, mají vysoký praktický význam čtyři situace:

- i) přítomnost *Hyalomma aegyptium* na suchozemských želvách, podobně *Amblyomma sparsum* na afrických želvách
- ii) výskyt *A. latum*/*A. sparsum* na afrických hadech, tato klíšťata jsou často nalézána na importovaných kraitách *Python regius*
- iii) klíšťata r. *Amblyomma* na importovaných/zadržených varanech z JV Asie
- iv) klíšťata se vyskytují s vysokou frekvencí na ochodovaných surových kůžích volně žijících savců

Upozornění: klíšťata plazů mohou přenášet na člověka některé závažné patogeny. V literatuře existuje zpráva o infekci personálu obchodního centra s plazy bakterií *Coxiella burnetti* (patogen způsobující Q-horečku). Na základě dostupných informací se pacienti nakazili při odstraňování klíšťat z dovezených plazů. Vzhledem k tomu je důležité při manipulaci s klíšťaty používat dezinfekční prostředky a vhodné rukavice.

2.9 Vši a všenky

2.9.1 Popis skupiny

Všechny vši z řádu Mallophaga a Anoplura jsou parazity ptáků nebo savců a jako takové jsou zcela závislé na svých hostitelích, pokud jde o potravu i životní prostředí. Většina savců a ptáků reguluje počet všenek a vší, které tolerují (což je obvykle velmi málo), pomocí vlastní péče o srst. Na hostiteli se vyskytují všechna vývojová stadia vší a jednotlivé vši a všenky rychle bez hostitelů hynou. Jedná se o hmyz s proměnou nedokonalou (hemimetabolii). Vši i všenky bývají velmi specifické pro svého hostitele, to znamená, že jeden druh obvykle parazituje pouze na jednom druhu zvířete nebo na malé skupině blízce příbuzných druhů zvířat.

2.9.2 Metodologie

2.9.2.1 Materiál a metodika odběru

- živá zvířata: důkladná prohlídka povrchu těla, všenky a vši mohou být přímo na kůži nebo přichycené na kožních derivátech (chlupy, peří).
- mrtvá zvířata, zvířecí kůže: přichycené všenky příp. vši

2.9.2.2 Příprava pro diagnostická vyšetření

- přichycené ektoparazity jemným tahem vyjmout a umístit do pastových zkumavek (eppendorf), případně odstříhnout i s chlupy nebo peřím
- veškeré nalezené členovce fixovat v 70% EtOH a připravit k identifikaci expertem a/nebo izolaci DNA

2.9.2.3 Vlastní vyšetření a identifikace

Mikroskopie: vyšetření mikroskopických identifikačních znaků za použití stereomikroskopu, zhotovení trvalých preparátů v expertní laboratoři pro posouzení detailních identifikačních znaků, provedení fotodokumentace, případně archivace materiálu pro izolaci DNA. Při intravitálním forenzním vyšetřování má význam nález exotických vší a všenek přichycených na kůži trofejí a dermopreparátů.

DNA analýza: DNA izolovaná tradičními postupy s využitím tkáňových izolačních kitů (jak dospělci, tak larvální stadia). V izolované DNA amplifikace fragmentu 18SrDNA, cox1 nebo dalších genů pomocí PCR se skupinově specifickými primery (nutná a priori konzultace s expertem na danou skupinu, poté analýza sekvencí s využitím BLAST nebo fylogenetická analýza sekvencí erudovaným molekulárním fylogenetikem).

2.9.2.4 Dokumentace výsledků

- fotodokumentace – makrofotografie přichycených nebo lezoucích vší a všenek
- mikrofotografie s využitím stereomikroskopu a světelného mikroskopu
- Archivované DNA sekvence

2.9.2.5 Archivace materiálu

- Vši a všenky fixované v 70/96% EtOH krátkodobě v mrazicím boxu (-18 °C), dlouhodobý bio-banking při -80 °C
- Kryo-archivovaná DNA
- Archivované DNA sekvence

2.9.3 Závěr

Zevní cizopasníci ze skupiny vší a všenek jsou vysoce diverzifikovanou skupinou s úzkou vazbou na hostitele. Jejich forenzní využití může být limitované faktem, že při importu mohou být snadno odstraněny za využití insekticidních preparátů. Ve srovnání s klíšťaty je forenzní hodnota omezená.

2.10 Exotické patogenní houby

2.10.1 Popis skupiny

V éře globálního obchodu, masového cestovního ruchu a klimatických změn se hranice mezi ekosystémy stávají stále propustnějšími. Exotické patogenní houbové patogeny zvířat – mikroskopické organismy s makroskopickými dopady – představují jednu z nejskrytějších, ale zároveň nejzávažnějších hrozeb pro biodiverzitu, hospodářská zvířata i veřejné zdraví. Řada mykotických patogenů má značný zoonotický potenciál a představuje významné riziko, zejména pro imunokomprimované jedince. Fungální patogeny zahrnují dimorfní houby (např. *Blastomyces dermatitidis*), dermatofyta (*Microsporum gallinae*), chytridiomycety (*Batrachochytrium salamandrivorans*), oomycety (*Pythium insidiosum*) a oportunisticky patogenní plísň (*Saprolegnia ferax*). Jejich společným jmenovatelem je vysoká adaptabilita, schopnost přežívat v nepříznivých podmínkách a potenciál vyvolat závažné, často smrtelné infekce u zvířat i lidí.

2.10.2 Metodologie

2.10.2.1 Materiál a metodika odběru

- Musí probíhat za striktních biosafety podmínek (rukavice, maska FFP3, ochranné brýle). Vzorky se odebírají sterilními nástroji do sterilních obalů (např. transportní média s 0,9% NaCl).
- zásilky živých zvířat, mrtvá zvířata, zvířecí kůže
- pro odběr použít sterilní tampón, skalpel, pinzetu, okamžitě uzavřít, zabalit do sekundárního obalu s absorbérem a etiketou (biohazard).
- skladování: 4 °C (<24 h) nebo -80 °C pro dlouhodobé uchování.

2.10.2.2 Příprava pro diagnostická vyšetření

- kultivace na Sabouraudově agaru nebo jiných médiích (např. 25–30 °C, 2–3 týdny) umožňuje izolaci a identifikaci etiologického agens a testování citlivosti na antifungální léčiva. Posuzuje se makroskopický vzhled kultury a mikroskopický preparát obarvený např. fenolovou modří

2.10.2.3 Vlastní vyšetření a identifikace

Mikroskopie: přímá mikroskopie je rychlá a cenově dostupná technika, která umožňuje pozorovat houbové elementy (např. hyfy, spory) v klinických vzorcích (kožní šupiny, peří, stěry) po zpracování 10–20% KOH roztokem. Orientační metoda, která neumožňuje přesnou identifikaci druhu

DNA analýza: PCR cílí na specifické části DNA, jako je ITS, LSU, SSU, β -Tubulin nebo Calmodulin, a umožňuje rychlou a přesnou identifikaci druhu (např. *B. salamandrivorans* nebo *P. insidiosum* pomocí Cox2 genu). Sekvenování ITS a porovnání s databázemi (např. GenBank přes BLASTn) potvrzuje identitu, ale vyžaduje opatrnost kvůli možným chybám v databázích. Alternativou je LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), která je rychlejší a není závislá na složitém vybavení, vhodná pro screening na letišti.

2.10.2.4 Dokumentace výsledků

- fotodokumentace – makrofotografie případných kožních změn na importovaných zvířatech
- fotodokumentace – makrofotografie kolonií na kultivačních půdách
- mikrofotografie stadií hub s využitím světelného mikroskopu
- Archivované DNA sekvence

2.10.2.5 Archivace materiálu

- materiál krátkodobě v mrazicím boxu (-18 °C), dlouhodobý bio-banking při -80 °C
- Kryo-archivovaná DNA
- Archivované DNA sekvence

2.10.3 Závěr

Exotické houby jsou často dováženy spolu se zvířaty, která mohou sloužit jako vektory pro jejich šíření. K tomu dochází především prostřednictvím obchodu se zvířaty, jako jsou plazi a obojživelníci, nebo prostřednictvím neúmyslného zavlečení hub na zvířatech nebo souvisejících materiálech, jako je půda nebo rostliny. Negativní výsledky vyšetření na přítomnost exotických patogenních hub nemají žádnou hodnotu pro ověření původu jedinců. Výskyt exotických mikroskopických hub které dosud nebyly hlášeny z ČR (ideálně identifikované pomocí zmíněných DNA technik) může mít podpůrnou hodnotu pro posouzení původu materiálu nebo jedince. Tyto organismy ale mají vysoký invazní potenciál a důsledná kontrola (např. obchodování obojživelníci) by měla být součástí souboru opatření k ochraně státního území před novými patogenními hrozbami.

2.11. Závěrečná shrnující doporučení pro forenzní postupy a interpretaci jejich výsledků

Jakýkoli obratlovec chovaný ve standardních podmínkách může mít nějaké parazity a přítomnost parazitů jako taková nemá žádnou prediktivní hodnotu. Určení/klasifikace nalezených parazitů je klíčovým krokem ve forenzní diagnostice. Je třeba mít na paměti, že úplná identifikace konkrétních parazitů může být z řady důvodů velmi komplikovaná:

- získané stadia neumožňují konečnou přesnou diagnózu
- neexistují žádné údaje o konkrétních druzích hostitelů (velmi časté)
- nalezený parazit představuje druh nový pro vědu (časté)
- databáze genetického materiálu (např. GenBank, MalAvi) neobsahují konkrétní haplotyp
- náklady na vyšetření jsou příliš vysoké
- nebylo možné získat odborný posudek pro konkrétní parazity

Pro forenzní účely však není vždy nutné identifikovat druh parazita. Navíc kroky, které předcházejí identifikaci, nevyžadují nutně odborníka na konkrétní taxon. Při diagnostice je třeba postupovat podle následujících kroků; kvalita každého z nich má velký vliv na další krok. Jinými slovy, pokud materiál není řádně zdokumentován a konzervován, pozdější zapojení odborníků nemůže pomoci.

- odběr vzorků vyškoleným personálem
- asistence veterinárního lékaře nebo technika v případech, kdy je to žádoucí nebo dané legislativou
- vyšetření vzorků specializovanými laboratořemi pomocí více či méně rutinních technik
- identifikace nalezených parazitů odborníky

Obchodovaná/kontrolovaná zvířata mohou pocházet z různých zařízení a geografických oblastí s různými místními podmínkami. Přítomnost parazitů u obchodovaných zvířat vždy odráží možnost dokončení jejich životního cyklu, který v konečném důsledku závisí na biologii konkrétního taxonu/skupiny taxonů parazitů! Negativní výsledky vyšetření mají minimální hodnotu z následujících důvodů:

- i ve volně žijících populacích se vyskytují jedinci bez zjištěné parazitární infekce
- paraziti mohou být odstraněni léčbou
- paraziti mohou postupně zmizet (obvykle do 3 let po odchytu ve volné přírodě, ale existují výjimky).

Přítomnost parazitů lze využít jako forenzní nástroj pro každou skupinu obchodovaných organismů. Z technického hlediska může výrazně pomoci odpovědět na otázku, zda byl konkrétní jedinec (!) odchycen z volně žijící populace v oblasti přirozeného výskytu daného druhu zvířete. Zvířata mohou být smíšená a každá skupina může obsahovat jedince ulovené ve volné přírodě i chované v zajetí. Navíc v konkrétních případech může přesná identifikace nalezených parazitů (obvykle pomocí DNA barcodingu a podobných nástrojů) naznačit geografický původ parazitů. Databáze DNA barcodů se rychle rozvíjejí, což zvyšuje šanci na přesnou identifikaci.

Skupina organismů	Cílová skupina	Materiál pro diagnostiku	Uklazení před vyšetřením	Metody primární detekce	Navazující analýzy	Forenzní skóre (1-3)	Riziko ovlivnění (1-3)	Riziko zavléčení (1-3)	Riziko infekce člověka (1-3)	Poznámky
<i>Sarcocystis</i>	hadi, masožraví ptáci	trus	5°C max 10 dní	flotační metoda, mikroskopie	izolace DNA/sekvenace z pozitivních vzorků	2	2	3	3	nelze využít u dravých ptáků kteří loví volně žijící zvířata nebo kteří jsou jimi krmeni
Hemogregariny	Ryby, obojživelníci plazi, savci	Krev/krevní roztěr	krevní roztěr: pokojová teplota krev: -18°C	mikroskopie	izolace DNA/sekvenace z pozitivních vzorků	1	3	3	0	nižší forenzní skóre v případě zvířat s deklarovaným původem z farem v oblasti původního výskytu
Hemosporidie	Ryby, obojživelníci plazi, ptáci, savci	Krev/krevní roztěr	krevní roztěr: pokojová teplota krev: -18°C	mikroskopie DNA/sekvenace		1	3	3	0	Nižší forenzní skóre u ptáků s pobytem ve venkovních voliérách, nutnost sekvenace
Trypanosomy	plazi	Krev/krevní roztěr	krevní roztěr: pokojová teplota krev: -18°C	mikroskopie DNA/sekvenace	izolace DNA/sekvenace z pozitivních vzorků	1	3	3	0	nižší forenzní skóre v případě zvířat s deklarovaným původem z farem v oblasti původního výskytu
Heteroxenní helminti - spirury	obojživelníci, plazi, ptáci, savci	Trus	5°C max 10 dní	flotační metoda, mikroskopie	izolace DNA/sekvenace z pozitivních vzorků	1	2	3	0	
Heteroxenní helminti – filárie v krvi	obojživelníci, plazi, ptáci, savci	Krev	5°C max 10 dní	mikroskopie	izolace DNA/sekvenace z pozitivních vzorků	1	2	3	0	
Heteroxenní helminti – filárie v podkoží	chameleoni	Podkoží	5°C max 10 dní	mikroskopie DNA/sekvenace		1	2	3	0	

Heteroxenní helminti – tasemnice ve střevě	Ryby, obojživelníci, plazi, ptáci, savci	Trus	5°C max 10 dní	flotační metoda, mikroskopie	izolace DNA/sekvenace z pozitivních vzorků	2	1	3	3	
Heteroxenní helminti – tasemnice podkoží	plazi	Podkoží	96% etanol	mikroskopie DNA/sekvenace		1	3	0	0	Chirurgické vybavení larv. Stadií z viditelných zduření na povrchu těla
Heteroxenní helminti - motolice	Ryby, obojživelníci, plazi, ptáci, savci	Trus	5°C max 10 dní	Flotační/sedimentační metoda, mikroskopie	izolace DNA/sekvenace z pozitivních vzorků	1	2	3	0	
Heteroxenní helminti – vrtejší v trusu	Ryby, obojživelníci, plazi, ptáci,	Trus	5°C max 10 dní	Sedimentační metoda, mikroskopie	izolace DNA/sekvenace z pozitivních vzorků	1	2	3	0	
Heteroxenní helminti – vrtejší v podkoží	plazi	Podkoží	5°C max 10 dní	mikroskopie DNA/sekvenace	izolace DNA/sekvenace z pozitivních vzorků	1	3	0	0	Chirurgické vybavení larv. Stadií z viditelných zduření na povrchu těla
Jazyčnatky/ Pentastomida	hadi, varani, krokodýli	trus	5°C max 10 dní	flotační metoda, mikroskopie		1	2	3	2	
Vši a všenký	Savci, ptáci	z povrchu těla	96% etanol	mikroskopie		2	1	3	0	
Exotická klíšťata	Obojživelníci, plazi, savci ptáci	z povrchu těla	96% etanol	mikroskopie	izolace DNA/sekvenace	1	1	3	3	mohou být i mimo zvířata v přepravních obalech
Exotické mikroskopické houby	Savci, plazi, obojživelníci	Stěry z povrchu u těla	5°C max 30 dní	kultivace, mikroskopie	izolace DNA/sekvenace z pozitivních vzorků		2	1	1	obvykle jen u zvířat s viditelnými kožními lézemi

Forenzní skóre 1-3, 1= nejsilnější průkaznost pro původ zvířete z volné přírody; **Riziko ovlivnění 1-3**, 1= nejvyšší riziko cíleného (terapeutického) ovlivnění (=eliminace); **Riziko zavlčení 1-3**, 1= nejvyšší riziko možného zavlčení a etablování patogenu na území ČR; **Riziko ovlivnění 1-3**, 1= nejvyšší riziko nechtěné infekce člověka při manipulaci s živým materiálem

3 Metodické přístupy pro využití analýzy virových infekcí v rámci forenzní praxe

3.1 Sběr, skladování a práce se vzorky

Při sběru a práci s jakýmkoli biologickými vzorky, je nutné předpokládat, že se jedná o vzorky, které mohou potencionálně obsahovat různá infekční agens. Proto je nutné ke vzorkům jako takovým přistupovat. Vhodné postupy z hlediska biologické ochrany pracovníků i jejich pracovního prostředí při práci s biologickými vzorky byly popsány v certifikované metodice „Metodologie pro odběry, biologickou bezpečnost a archivaci biologického materiálu ze zvířat zadrženého v rámci ilegálního obchodu pro účely forenzních analýz“, schválené v roce 2024.

Stejně tak je nutné dodržet i vhodné postupy pro skladování vzorků. Ty musí být jednak bezpečné, aby zabránily možné kontaminaci prostředí skladovanými vzorky a dále musí zabránit potencionální nežádoucí degradaci skladovaného materiálu. Vhodné způsoby skladování biologického materiálu pro další analýzy byly opět popsány ve výše zmíněné metodice.

Pro jednoduché shrnutí lze říci, že za účelem virologických analýz je vhodné vzorky k přímé detekci virových nukleových kyselin skladovat v původním stavu (v takovém případě je nutné dbát zvýšené opatrnosti, protože vzorky zůstávají infekční a je nutno s nimi tak pracovat) nebo za přítomnosti vhodných fixačních roztoků, které v ideální případě inaktivují virus, ale zachovávají jeho nukleovou kyselinu intaktní. Takovými činidly je například etanol pro skladování vzorků určených na analýzu virů s DNA genomem nebo různá činidla zabírající degradaci RNA (např. RNAlater (Thermo Fisher Scientific) nebo DNA/RNA shield (Zymo Research)). Při využití těchto činidel je nutné dbát pokynů výrobce a dodržovat doporučené koncentrace. Dále je nutné zkontrolovat, jestli s jejich využitím skutečně dochází i k inaktivaci virů a dalších infekčních agens potencionálně obsažených ve vzorku a na základě těchto informací se vzorky dále pracovat. Vzorky skladované za účelem detekce virové RNA je ideální dlouhodobě skladovat při teplotách pod -70°C, vzorky skladované za účelem detekce virové DNA je pak možné dlouhodobě skladovat při teplotách pod -20°C. Vzorky určené k detekci protilátek (sérum, plazma, tkáňový mok a jiné), je možné skladovat při teplotách pod -20°C.

3.2 Metody detekce virové infekce

Prvním krokem při samotné analýze je prokázat přítomnost virů v organismu. Používají se jak přímé, tak i nepřímé metody.

3.2.1 Přímé metody detekce virové infekce

Přímé metody slouží k prokázání přítomnosti viru ve vzorku. Jedná se například o kultivaci viru, detekci virových nukleových kyselin nebo virových proteinů. Pozitivní výsledek ukazuje, že testovaný vzorek právě nyní obsahuje hledaný virus nebo jeho části. To ale nemusí nutně znamenat (s výjimkou pozitivního kultivačního testu), že virus je infekční. Výhodou těchto metod, zejména detekce a (následné) sekvenace virových nukleových kyselin je to, že se dají využít k velmi detailní fylogeografické analýze vzorku, jak bude ukázáno níže.

3.2.1.1 Kultivace viru

Přítomnost viru ve vzorku lze prokázat kultivací viru na vhodných tkáňových kulturách nebo pokusných zvířatech. Virus se projeví specifickými očekávanými projevy, jako je například omezení schopnosti růstu buněk nebo vznik plaků v tkáňové kultuře. U pokusných zvířat pak například specifickými patologickými projevy nebo dokonce smrtí pokusného zvířete. Při těchto pokusech je vždy nutné vybrat správný pokusný model a uvědomit si, že různé tkáňové kultury stejně jako různá pokusná zvířata jsou permissivní pouze pro určité typy viru.

Při pokusných infekcích je nutné dbát zvýšené opatrnosti, protože dochází k množení virového potomstva a tím pádem i ke zvýšení rizik spojených s infekcí. Proto se takovéto pokusy mohou provádět pouze za bezpečnostních podmínek, které jsou k danému pokusu potřebné. Při pokusech na zvířatech je pak nutné mít i potřebná povolení pro práci se zvířaty. Vzhledem k tomu, že pokusy, při kterých dochází k infikování zvířat infekčním materiálem, nevyhnutelně vedou k jejich utrpení, se od nich v současné době v maximální upouští, pokud je možné najít za ně adekvátní náhradu.

3.2.1.2 PCR

PCR neboli polymerázová řetězová reakce je specifická, rychlá a citlivá metoda pro detekci přítomnosti hledaných nukleových kyselin ve zkoumaném vzorku. Prvním krokem je obecně extrakce nukleových kyselin z odebraného vzorku. Ta se dá provést velkým množstvím postupů s ohledem na to, o jaký typ vzorku se jedná, jestli očekáváme přítomno virů s DNA nebo RNA genomem a podobně. Je nutné zvolit takový postup extrakce nukleových kyselin, který co nejlépe odpovídá našim potřebám. Metodám vhodným pro extrakci nukleových kyselin z různých typů vzorků se věnuje metodika „Forenzně analytické metody pro účely určení živočišného druhu u biologického materiálu získaného ze zvířat (obratlovců) nebo jejich částí“. Při použití jakéhokoliv postupu je nutné sledovat pokyny výrobce nebo autora protokolu a odchylovat se od nich pouze v odůvodněných případech.

Některé forenzní vzorky mohou být již poměrně výrazně degradované a v takovém případě je nutné zjistit, jestli je ve vzorku obsažena alespoň odpovídající hostitelská nukleová kyselina (např. pomocí PCR cílící na specifické hostitelské „house keeping“ geny), pokud ne, povedou další pokusy o detekci virové nukleové kyseliny pravděpodobně také k negativním výsledkům, které ale nebudou mít žádnou forenzní hodnotu.

Pokud byla extrahovaná kyselina RNA, je nutné v prvním kroku provést její zpětný přepis do molekuly DNA. To lze provést buďto ve specifickém kroku a následnou komplementární DNA (cDNA) skládat pro další využití, nebo v rámci následné PCR reakce. Ve druhém případě je nutné použít molekulárně biologické sady, které jsou k tomuto postupu vhodné (většinou označované jako „one tube“, „single tube“ nebo „one-step“ RT-(q)PCR sada).

Na získané DNA lze následně provést PCR reakci. K detekci nukleových kyselin různých virů lze použít širokou škálu různých komerčních nebo autorských reakcí. Tyto reakce lze rozdělit do mnoha typů od klasických PCR až po PCR v reálném čase (real-time PCR). Všechny tyto reakce mají své specifické výhody a nevýhody a před jejich zavedením je nutné zvážit, které se hodí nejlépe. Vhodné je použít reakce, které jsou doporučené Světovou organizací pro zdraví zvířat k detekci nukleových kyselin jimi monitorovaných virů (WOAH 2024). Obecně lze říci, že je nutné vybrat takovou reakci, která je dostatečně citlivá, která je schopná detekovat zkoumaný virus, a to včetně všech jeho genetických variant (existují i PCR reakce navržené tak, aby umožnili odlišení různých virových kmenů pouze na základě výsledku PCR bez nutnosti dalšího sekvenování), a zároveň je dostatečně specifická, aby nedocházelo k produkci falešně pozitivních výsledků. Tyto informace by měli být poskytnuty výrobci používaných reakcí nebo autory studií, podle kterých je daná PCR prováděna.

Výhodou využití PCR reakcí v detekci virů přítomných ve vzorku je jejich poměrně nízká cena a vysoká citlivost a specifita. Nevýhodou naopak je fakt, že se musíme předem rozhodnout, jaký virus nebo alespoň jakou skupinu virů chceme hledat. Ve vzorku samozřejmě mohou být přítomné i jiné viry, které pomocí PCR nedetekujeme, dokud se na ně nezaměříme.

Výsledné produkty PCR reakcí, DNA molekuly o odpovídající délce, je vhodné po reakci přečistit a osekvenovat. Tím se jednak potvrdí výsledek PCR reakce a dále mohou získané sekvence sloužit pro fylogeografické analýzy, které jsou popsány níže.

3.2.1.3 Sekvenování

V současné době se k detekci virových nukleových kyselin stále častěji používají techniky sekvenování nové generace, kdy je přečtena všechna nukleová kyselina přítomná ve zkoumaném vzorku a následně se v ní hledají nukleové kyseliny potencionálně přítomných patogenů. Výhodou oproti PCR je fakt, že se nemusíme zaměřit pouze na určitý virus, ale detekujeme všechny přítomné viry. Nevýhodou bývala nižší citlivost reakce. Ta se ale dá odstranit při použití dostatečné hloubky sekvenování. Další nevýhodou je poměrně vysoká cena oproti PCR. Cena sekvenování vzorků pomocí metod nové generace ale rychle klesá a v případě, že je plánováno ve vzorku hledat větší množství různých virů, a tudíž provádět větší množství PCR reakcí, může být sekvenování dokonce i ekonomicky smyslupnější metodou.

Prvním krokem při sekvenačních analýzách je opět extrakce nukleových kyselin ze vzorku. Znovu je nutné rozhodnout se, jestli budeme provádět extrakci (a následné sekvenování) DNA nebo RNA. Následuje příprava sekvenační knihovny. Zde se postup výrazně liší podle použitých sekvenačních platforem, plánovaných analýz a požadovaných výsledků. Následuje samotné sekvenování. Znovu je zde nutné říci, že existuje velké množství různých sekvenačních platforem, které jsou různě vhodné pro různé sekvenační projekty. Posledním krokem je vyhodnocení získaných výsledků. To je opět poměrně náročné. Používá se množství různých bioinformatických postupů, které odpovídají použité sekvenační strategii. V současné době je ale možné svoje požadavky konzultovat s velkým množstvím specializovaných odborných firem, které jsou schopné celý proces provést a dodat zanalyzované výsledky.

3.2.1.4 Rychlé testy na přítomnost virového antigenu

V současné době je na trhu velké množství rychlých testů schopných detekovat přítomnost virového antigenu. Tyto testy mají obecně o něco nižší senzitivitu a specifitu než ostatní laboratorní testy, ale jejich nespornou výhodou je možnost jejich provedení přímo v terénu a také jejich poměrně malá časová náročnost (nižší desítky minut) i nízká cena. V případě používání těchto testů je potřeba vzít v úvahu možnost falešně negativních, ale i falešně pozitivních výsledků.

3.2.2 Nepřímé metody detekce virové infekce

Nepřímé metody se zaměřují na především důkaz přítomnosti protilátek proti viru v daném vzorku. V praxi se využívá především metoda ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), která je rychlá, efektivní a kvantifikovatelná, nebo metoda western blot, která je oproti metodě ELISA pracnější a pomalejší, ale dává přesnější a spolehlivější výsledky. Nejspolehlivější je obecně takzvaný virus neutralizační test, který ale vyžaduje kultivaci samotného viru a proto je obtížně proveditelný pro viry, s nimiž je nutné pracovat za podmínek vysoké biologické ochrany, kdy často nejsou dostupné laboratoře, ve kterých by takovéto kultivace šlo provádět.

Pozitivní výsledek v případě nepřímých metod neznamena, že vzorek obsahuje virus, ale že zvíře, ze kterého byl vzorek odebrán, se s virem v minulosti setkalo a vytvořilo si proti němu protilátky. Nepřímé metody proto

postihují širší časové okno, ve kterém je možné zkoumat přítomnost viru, a jsou vhodné i k průkazu patogenů jejichž prevalence ve zkoumané populaci je poměrně nízká. Nicméně i koncentrace protilátek v těle ale s postupem času klesá. Rychlost poklesu závisí na různých faktorech, jako například druh patogenu a podobně, a proto ani negativní výsledky neznamenají, že zvíře se se zkoumaným patogenem během svého života nesetkalo. Přesnou kvantifikaci poklesu protilátek v těle hostitele je nutné vždy předem zkoumat experimentálně. Další nevýhodou imunologických nepřímých metod je, že může docházet k takzvané zkřížené reakci, kdy dojde k záměně protilátek proti jednomu patogenu za protilátky proti jinému příbuznému patogenu. Toto je inherentní vlastnost všech testů založených na detekci protilátek, je nutné znát možné zkřížené reakce (výrobce komerčních testů je musí před uvedením testu na trh otestovat a reportovat v instrukcích k provedení testu) a počítat s nimi. Opět je vhodné používat především ověřené postupy doporučené Světovou organizací pro zdraví zvířat (WOAH 2024).

3.3 Fylogenetické analýzy

Jakmile je virus detekován a je osekvenována alespoň část jeho nukleové kyseliny je možné provést fylogenetické analýzy, které porovnají osekvenovaný virus s ostatními viry v databázích a na základě podobnosti sekvencí určí nejbližší příbuzné viry. Vzhledem k tomu, že viry většinou mutují poměrně rychle a mutace jsou náhodný proces, liší se jednotlivé virové kmeny jak podle místa, tak i podle času odebrání vzorku. Díky této odlišnosti může být fylogenetická analýza virů obsažených ve vzorcích použita ke kvantitativnímu odhadu místa původu vzorku a zároveň i k odhadu doby, ze které materiál pochází.

3.3.1 Příprava vstupních dat

3.3.1.1 Sekvenční data a metadata

Před samotnou analýzou je potřeba provést kontrolu kvality sekvencí. V případě, že byly vzorky sekvenovány pomocí klasického Sangerova sekvenování, jde kontrolu kvality provést manuálně pomocí inspekce získaných chromatogramů. V případě, že sekvence byly získány některou z metod nové generace sekvenování, je nutné použít automatizovaný software (např. FastQC), který spočítá kvalitu sekvence a pomůže odstranit pomocné úseky jako například sekvenační primery (Ohta et al., 2017). Pro následné analýzy je nutné použít pouze kvalitní a spolehlivé sekvence. V opačném případě by bylo dosaženo výsledků již od začátku zatížených významnou chybou.

Spolu se sekvenčními daty studovaných vzorků je potřeba zaznamenávat i takzvaná metadata, která ukazují i) místo odebrání vzorku (ideálně pomocí GPS souřadnic, alternativně pomocí co nejpřesnějšího popisu lokality, např. město nebo administrativní okrsek, kde byl vzorek odebrán, minimálně stát) a pokud vzorek cestoval, tak ideálně i místo původu vzorku, ii) dobu odebrání vzorku (ideálně na úrovni dnů, což je důležité pro rychle mutující viry a vzorky odebrané v rámci velkých podrobně sledovaných outbreaků, pokud to není možné, tak alespoň na úrovni měsíce nebo roku) a iii) informace o hostiteli, ze kterého byl vzorek odebrán (ideálně na úrovni typu tkáně, věku, pohlaví, a druhu, pokud toto není dostupné, je vhodné zaznamenat alespoň jakoukoliv další vhodnou informaci). Zaznamenání dalších metadat (např. o zdravotním stavu hostitele, způsobu přepravy a skladování vzorku, metodách použitých k detekci patogenu a ke získání sekvence atd.) je rovněž vhodné a může být dále využito během následných (meta)analýz, není ale stěžejní pro fylogenetické a fylogeografické analýzy.

3.3.1.2 Srovnávací data

Srovnávací data lze získat z veřejně dostupných databází jako je například GenBank, GISAID a jiné. Většina těchto databází umožňuje prohledávat sekvence v nich obsažené pomocí různých metod. Nejčastěji používanou metodou je BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), který umožní vyhledat příbuzné sekvence i v rámci velkého množství zcela odlišných sekvencí, předběžně určit, z jakého biologického druhu (někdy i poddruhu a v ideálním případě i lokality a času) může sekvence získaná analýzou daného vzorku pocházet a zároveň poskytnout základní odhad o tom, jaká je pravděpodobnost, že v databázi dané velikosti by stejně nebo více podobná sekvence byla nalezena pouze náhodou (e-value) (Altschul et al. 1990).

Pro následnou analýzu je vhodné použít desítky nebo nižší stovky srovnávacích sekvencí, které jsou vzájemně odlišné a ideálně pokrývají celou genetickou, geografickou a časovou variabilitu zkoumaného patogenu. Spolu se sekvenčními daty je nutné získat i potřebná metadata, která znovu popisují čas a místo získání vzorku a ideálně i informace o hostiteli, ze kterého byl virus izolován. Srovnávací sekvence je proto vhodné shromažďovat v souborech ve formátu „genbank“ (koncovka .gb), který obsahuje veškerá k nim dostupná metadata a ze kterého lze tato metadata snadno vyexportovat. Většina programů pak umožňuje i číst sekvence uložené v tomto formátu a převádět je na pouze sekvenční formáty jako například „fasta“ (většinou koncovka .fasta, .fas, .fst nebo jiná podobná). Při převodu dat z formátu genbank na formát fasta dochází ke ztrátě metadat a zachovává se pouze sekvence, výsledný soubor je sice menší, ale proces je nevratný.

3.3.1.3 Zarovnání sekvencí (alignment)

Zarovnání sekvencí je možné při malém množství krátkých a podobných sekvencí udělat ručně, vhodnější je ale použít některý z volně dostupných algoritmů jako je například MUSCLE (Edgar, 2004), MAFFT (Katoh et al., 2002), Clustal (Chenna et al., 2003) a jiné. Po automatickém zarovnání sekvencí je nutné provést kontrolu zarovnaných sekvencí a odstranit špatně zarovnané úseky jako jsou například konce alignmentu, rozsáhlé mezery a jiné. Po této manuální kontrole je nutné ujistit se, že všechny sekvence v alignmentu (včetně mezer) mají stejnou délku a že alignment neobsahuje nepovolené symboly (například písmena pro nestandardní nebo degenerované nukleotidy). Pokud ano, je nutné takovéto úseky odstranit.

Samotný alignment je pak možné uložit ve formátu, který je požadován následným fylogenetickým softwarem. Vhodné jsou formáty fasta (většinou koncovka .fasta, .fas, .fst nebo jiná podobná), clustal (.seq), phylip (.phy), nexus (.nex) nebo jiné. Tyto formáty jsou vzájemně převoditelné.

3.3.2 Úvodní fylogenetické analýzy a kontrola časového signálu

Na vyprodukovaném alignmentu je možné za využití rychlých fylogenetických metod spočítat první verze fylogenetických stromů. Před jejich vytvořením je nutné zjistit, jaký substituční model může být s daným alignmentem aplikován. Toho lze dosáhnout za využití softwaru jako jModelTest (Darriba et al., 2012) nebo například v jednoduchém programu Mega. Následně lze přikročit k samotnému vytvoření orientačních fylogenetických stromů. Vhodné jsou rychlé a jednoduché metody jako například RAXML (Stamatakis et al., 2005), IQ-TREE (Trifinopoulos et al., 2016), PhyML (Guindon et al., 2010). Výsledky těchto analýz lze již opatrně interpretovat. Pokud je například zřejmé, že náš vzorek náleží do skupiny virových izolátů, které byly s velkou mírou podpory sebrány na jednom místě v krátkém časovém úseku, můžeme odůvodněně předpokládat, že podobně tomu je i s naším vzorkem. Nejedná se ale zatím o kvantitativní analýzu.

Výsledný fylogenetický strom je možné dále využít k analýze časového signálu v našich datech. Toho lze dosáhnout pomocí „root-to-tip“ regresní analýzy v softwaru TempEst (součást balíčku BEAST) (Rambaut et al., 2016). Tato analýza zjišťuje, zda existuje lineární vztah mezi počtem mutací v sekvenci a vzdáleností vzorku od kořene stromu a jeho pozicí v rámci stromu. Kladný výsledek naznačuje, že se mutace akumulují v

čase (což do budoucna umožní použít data k časové analýze). Pokud signál není dostatečný je nutné projít jednotlivé vzorky, zkontrolovat, jestli nemohou v sekvencích nebo metadatach obsahovat nějaké chyby, které by analýzu mohli zproblematizovat, popřípadě, jestli do analýzy nebyly zahrnuty vzorky z různých vývojových linií. Pokud takovéto problémy najdeme je nutné problematické vzorky z analýzy odstranit.

Analýza pomocí programu TempEst určit, zda zaznamenaný odběr vzorku skutečně odpovídá deklarované době odběru. Pokud bylo například zvíře, ze kterého byl vzorek odebrán, usmrceno výrazně později, než je deklarováno (a platí na něj například regulace vyplývající z CITES) a zároveň je infikováno virem, který se v daném časovém okně rychle vyvíjel, lze očekávat, že takovýto virus za danou dobu nasbíral určité množství mutací. TempEst takovéto nesrovnalosti odhalí a je schopný přibližně určit dobu, v jaké cirkuloval virus s odpovídajícím množstvím mutací, a tedy i dobu, kdy ještě dané zvíře muselo žít a kdy bylo patrně usmrceno. Tímto způsobem například možné datovat dobu úmrtí kočkovitých šelem infikovaných FIV na základě mutací v sekvencích proviru získaných z tkání daného zvířete.

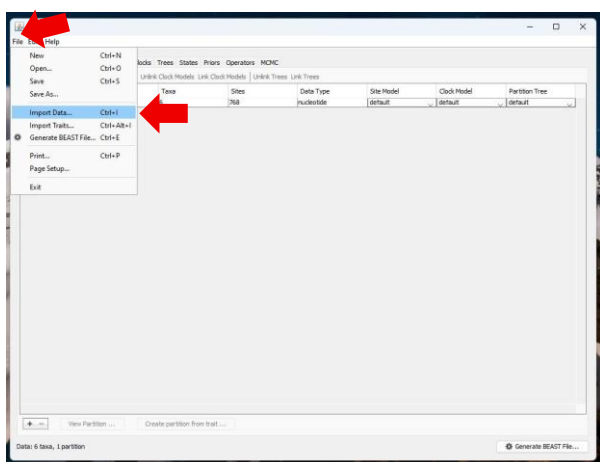
Podrobnosti pro nastavení programu TempEst a vyhodnocení výsledků jsou dohledatelné v manuálu (BEAST Developers, 2025).

3.3.3 Podrobné fylogenetické a fylogeografické analýzy v programech BEAUti a BEAST

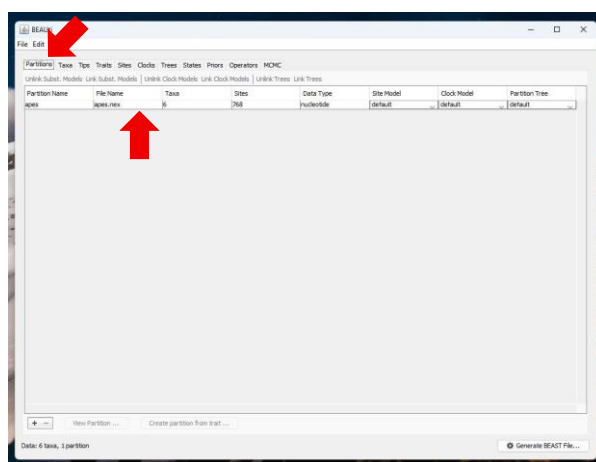
3.3.3.1 Příprava XML souboru pomocí BEAUti

Program BEAUti (Bayesian Evolutionary Analysis Utility) je grafické uživatelské rozhraní pro sestavení .xml vstupního souboru pro program BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) (Suchard et al., 2018). Oba tyto programy jsou volně dostupné a jsou k dispozici verze pro různé operační systémy. Obecně je vhodné pracovat vždy s nejaktuálnější stabilní verzí programu. Tou je v době tvorby této metodiky (září 2025) Baest X v10.5 a odpovídající verze dalšího softwaru.

Po instalaci je možné jej otevřít program BEAUti a nahrát do něj dříve připravený alignment ve formátu nexus. Prvním krokem analýzy je import alignmentu (File → Import data) (Obrázek 1). Nahraná data je nutné zkontrolovat a ujistit se, že byla nahrána v pořádku (záložka „Partitions“) (Obrázek 2).



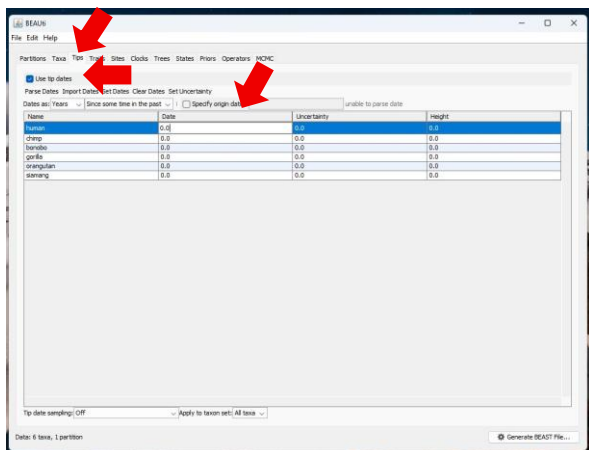
Obrázek 1: Způsob vložení zarovnaných sekvenčních dat do programu BEAUti



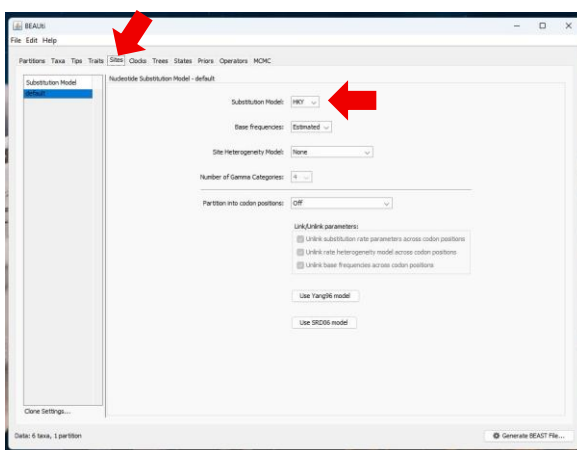
Obrázek 2: Kontrola vložených dat v záložce „Partitions“.

V nahraných datech je potřeba definovat datum odběru jednotlivých vzorků (záložka „Tips“). Pokud jsou data odběru známá, dá se instruovat program, aby je zahrnul do analýzy, to se dá udělat označením okénka „Use tip dates“. Data jde vložit manuálně nebo vložit ze souboru, ve kterém jsou obsažena, nebo je program umí odečíst ze jmen sekvencí. Formát dat může být v letech, měsících nebo dnech. Pokud není přesný datum znám, dá se doplnit i nejistota (Obrázek 3).

Následuje volba substitučního modelu (záložka „Sites“). Vhodný substituční model byl již dříve vybrán a použit pro vytvoření prvních orientačních fylogenetických stromů (Obrázek 4). Je možné otestovat i několik substitučních modelů a podívat se, jestli výsledná topografie zůstává stejná, což ukazuje na silný signál obsažený v datech a na vysokou spolehlivost výsledků.



Obrázek 3: Způsob vložení časových informací do programu BEAUti

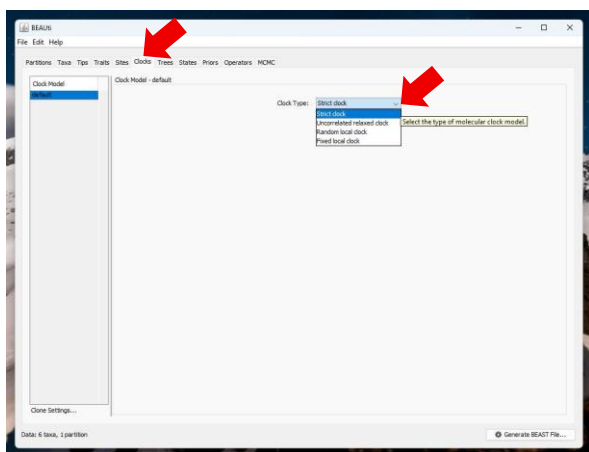


Obrázek 4: Volba substitučního modelu v záložce „Partitions“.

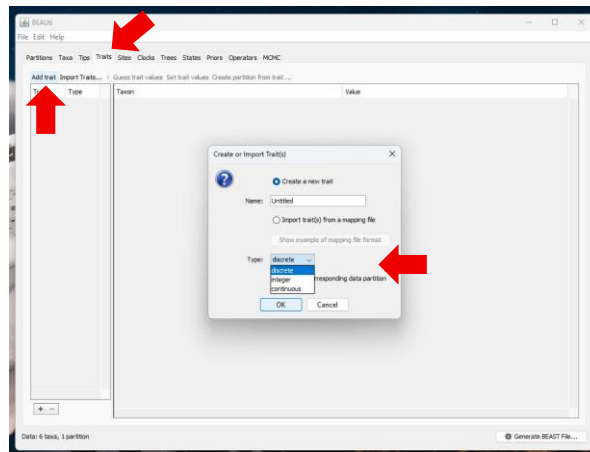
Dalším krokem je volba „hodinových modelů“. Podle výsledků z programu TempEst může být vybrán striktní nebo relaxovaný model popř. některý z lokálně se měnících modelů. Výběr komplikovanějších modelů vede ke zvýšení komplexnosti celé procedury a je vhodný pouze, pokud k němu jsou závažné důvody (Obrázek 5).

Pátým a šestým krokem je nastavení demografického modelu a dalších předpokladů (priors) (záložky „Trees“ a „Priors“), ty lze většinou ponechat v základním nastavení. Měnit je je vhodné pouze, pokud k tomu jsou opodstatněné důvody.

Pokud chceme do analýzy zahrnout i fylogeografickou analýzu, musíme se v předposledním kroku vrátit k záložce „Traits“ a importovat geografická data. Ta mohou být buď diskrétní (lokality) nebo spojitá (geografické souřadnice) (Obrázek 6).

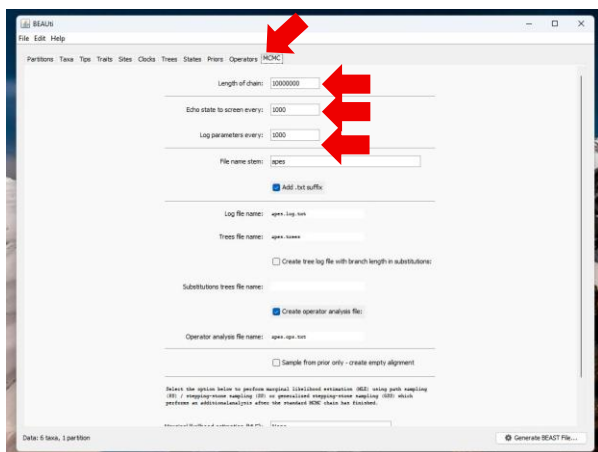


Obrázek 5: Volba hodinové modelu v programu BEAUti v záložce „Clocks“.



Obrázek 6: Vložení geografických informací v záložce „Traits“.

Posledním krokem je nastavení MCMC modelu (v záložce „MCMC“). Zde je nutné nastavit model tak, aby došlo ke konvergenci. Délku řetězce je vhodné nastavit v milionech až stamilionech opakování a ukládat zhruba každý 1000 až 10 000 vygenerovaný výsledek. Tím je zajištěno, že po doběhnutí analýzy dojde ke konvergenci. Příliš krátké analýzy ke konvergenci nevedou a neposkytnou tedy spolehlivý výsledek. Příliš dlouhé analýzy vedou jen k zbytečnému nadužívání výpočetního času, ale výsledek už nezlepší. Jak je vidět, i přes to, že tento krok je poměrně zásadní, velmi těžko se odhaduje optimální nastavení. Proto se konvergence po dokončení analýzy testuje a pokud jí nebylo dosaženo, je nutné délku řetězce a intenzitu vzorkování upravit a analýzu spustit znovu.



Obrázek 7: Volba MCMC modelu v programu BEAUti v záložce „MCMC“.

Po nastavení všech parametrů je možné vygenerovat výsledný .xml soubor, který bude sloužit jako vstupní data pro analýzu pomocí programu BEAST.

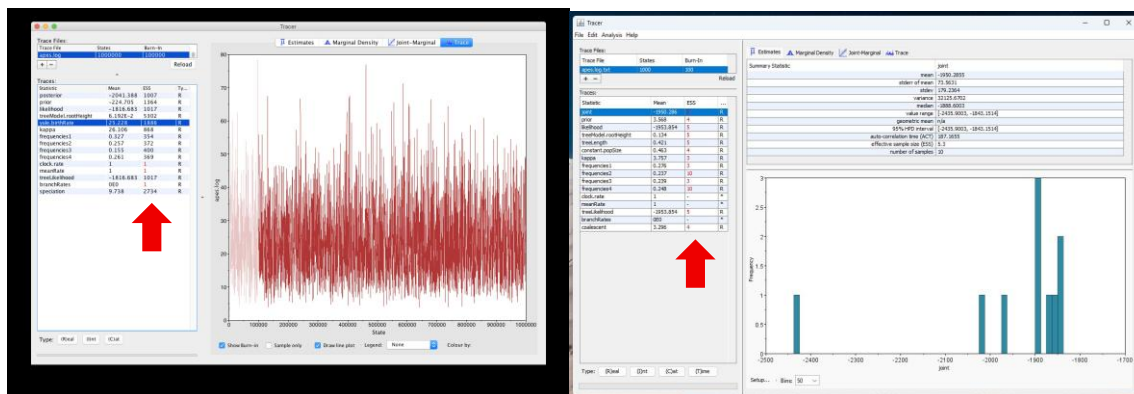
3.3.3.2 Spuštění MCMC analýzy a kontrola konvergence

Po vygenerování .xml souboru je nutné nahrát tento soubor do programu BEAST a spustit analýzu. Průběh analýzy je možné sledovat v příkazovém řádku. Délka analýzy se může výrazně lišit podle nastavení a výkonu počítače, ale lze očekávat, že u komplikovanějších analýz může dosáhnout až několika dní. Délku analýzy je

možné odhadnout tím, že nejdříve je spuštěn testovací soubor s krátkým řetězcem a na základě délky analýzy tohoto souboru je odhadnuto množství času potřebné a analýze finálního souboru.

Tyto analýzy je možné provádět jak na vlastním počítači, tak i online a to i na bezplatně dostupných platformách jako je například CIPRES (<https://www.phylo.org/>) (Miller et al., 2010). Před jejich využitím je ale nutné znát podmínky jejich využití a zvážit, zda je vhodné je používat například z důvod skladování citlivých dat na veřejných serverech a podobně.

Po dokončení MCMC analýzy v programu BEAST je nutné ověřit její výsledky. Prvním krokem je otevření výsledků (soubor s označením .log) v programu Tracer. V něm je nutné zkontrolovat sloupec označený jako ESS („effective sample size“), je vhodné, aby všechny hodnoty byly vyšší než 200, minimálně 100 (Obrázek 8).



Obrázek 8: Vizualizace výsledků programu Tracer: Levý panel ukazuje správně proběhlou analýzu, u které došlo ke konvergenci dat (zdroj, pravý panel ukazuje analýzu s nedostatečným počtem opakování, která musí být spuštěna znovu s delším MCMC

3.3.4 Vizualizace a interpretace fylogenetického stromu

Dalším krokem je vytvoření souhrnného fylogenetického stromu. Toho lze dosáhnout v programu TreeAnnotator. Vstupním souborem, ze kterého se souhrnný strom skládá je soubor s koncovkou .trees. Dále je nutné nastavit množství stromů generovaných na začátku analýzy než došlo ke konvergenci („burn-in“), tyto stromy jsou z dalších analýz odstraněny. Burn-in se obecně nastavuje na hodnotu 10% (výjimečně i na 50%) vzorků. Po nastavení parametrů vygeneruje TreeAnnotator během několika minut výsledný fylogenetický strom, který uloží do zadaného souboru.

Tento fylogenetický strom je možný vizualizovat v různých programech. Obecně se doporučuje například program FigTree, který není součástí balíčku BEAST, ale který je rovněž dostupný volně ke stažení ve verzích pro různé operační systémy. Tento program umožňuje zobrazit i délku mezi jednotlivými uzly fylogenetického stromu v jednotkách času a ukázat nejistotu v rámci doby s jakou ten který uzel vznikl. To umožní diskutovat nejbližší příbuzné námi zkoumaného viru a kdy se zhruba vyskytoval jejich společný předek. Pokud je k dispozici dostatek srovnávacího materiálu a pokud se nejbližší společný předek našeho vzorku a několika dalších blízkých příbuzných vzorků vyskytl nedávno v nějaké přesně geograficky identifikované lokalitě, dá se odůvodněně předpokládat, že i náš vzorek pochází z dané lokality.

3.3.5 Výsledky fylogeografické analýzy

Na základě výsledků MCMC analýzy a s porovnáním s geografickými daty lze spočítat model šíření patogenů v prostoru. Ten, jak již bylo zmíněno výše, může být buď diskrétní se zobrazením jednotlivých přechodových

kroků (při zadání lokalit), nebo spojitý (při zadání geografických souřadnic). K vizualizaci šíření jde využít software SPRED4, který umožňuje načíst soubory typu .trees a .log a přemapovat je na migrační toky mezi jednotlivými body. Výsledkem je pak mapa se směrovými šipkami či, tepnami propojujícími lokality, která se dá spustit i jako animace. Toho jde dosáhnout exportem dat do souboru typu .kml a následnou vizualizací časového šíření v Google Earth.

3.4 Limity analýzy

Stejně jako všechny další analýzy má i analýza fylogeografického šíření patogenů své limity. Tím prvním je nedostatek srovnávací dat nebo bias v nich. Analýzy totiž spoléhá na data produkovaná pravidelným epidemiologickým dohledem, jehož kvalita se v různých částech světa a s ohledem na různé patogeny výrazně liší. Některé patogeny jsou monitorované efektivně a existuje o nich velké množství genetických dat, zatímco jiné jsou významně opomíjené a dostupná data nemusí stačit na spolehlivou analýzu. Podobně to je i s dostupností dat z různých regionů, kdy především země globálního jihu nemají dostatek prostředků, které by jim umožňovaly epidemiologický dohled provádět. Další země pak mohou údaje vědomě neposkytovat (nebo dokonce poskytovat nepravdivé údaje), aby se vyhnuli ekonomickým. Tato fakta je třeba brát v úvahu především při analýze výsledků studie.

4 Literatura

- Afshinnekoo, E, Meydan, C, Chowdhury, S, Jaroudi, D, Boyer, C, Bernstein, N, ... & Mason, CE (2015) Geospatial resolution of human and bacterial diversity with city-scale metagenomics. *Cell systems*, 1(1), 72-87.A.
- Altschul, SF, Gish, W, Miller, W, Myers, EW, & Lipman, DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- Anderson, RC (2000) Nematode Parasites of Vertebrates. CABI Publishing, New York, 650pp.
- Assis GM, Alvarenga DA, Costa DC, Souza JC, Hirano ZM, Kano FS, Sousa TN, Brito CF (2016) Detection of Plasmodium in faeces of the New World primate Alouatta clamitans. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(9):570-6.
- Aust PW, Webb GJW, DeNardo DF, Natusch DJD (2019) Welfare Principles for Snakes and Monitor Lizards in the Southeast Asian Skin Trade – a guide for stakeholders. Swiss Federal Veterinary Office, Switzerland; Southeast Asian Reptile Conservation Alliance, France.
- Barnard, SM, Upton SJ (1994) Veterinary Guide to the Parasites of Reptiles: Protozoa. Krieger, Malabar, Florida, 154 pp.
- Barta JR, Ogedengbe JD, Martin DS, Smith TG (2012) Phylogenetic position of the adeleorinid coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) inferred using 18S rDNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59, 171–180.
- BEAST Developers. (n.d.). *Using TempEst for data exploration*. Retrieved November 11, 2025, from https://beast.community/tempest_tutorial.
- Bezerra-Santos MA, Mendoza-Roldan JA, Thompson RA, Dantas-Torres F, Otranto D (2021) Illegal wildlife trade: a gateway to zoonotic infectious diseases. *Trends in Parasitology*, 37(3):181-4.
- Brito, BP, Rodriguez, LL, Hammond, JM, Pinto, J, & Perez, AM (2017) Review of the global distribution of foot-and-mouth disease virus from 2007 to 2014. *Transboundary and emerging diseases*, 64(2), 316-332.
- Burridge MJ, Simmons LA (2003) Exotic ticks introduced into the United States on imported reptiles from 1962 to 2001 and their potential roles in international dissemination of diseases. *Veterinary Parasitology*, 113(3-4):289-320.
- Caicedo, EY, Charniga, K, Rueda, A, Dorigatti, I, Mendez, Y, Hamlet, A, ... & Cucunuba, ZM (2021) The epidemiology of Mayaro virus in the Americas: A systematic review and key parameter estimates for outbreak modelling. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(6), e0009418.
- Caira JN, Jensen K, Barbeau E, (eds) (2012) Global Cestode Database. World Wide Web. electronic publication. www.tapewormdb.uconn.edu.
- Čapek et al., (2014) Ticks of the *Hyalomma marginatum* complex transported by migratory birds into Central Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5: 489–493.
- Chenna, R, Sugawara, H, Koike, T, Lopez, R, Gibson, TJ, Higgins, DG, & Thompson, JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic acids research*, 31(13), 3497-3500.
- Cho, HW, & Eom, YB (2021) Forensic analysis of human microbiome in skin and body fluids based on

geographic location. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 695191.

- Cook CA, Lawton SP, Davies AJ, Smith NJ (2014) Reassignment of the land tortoise haemogregarine *Haemogregarina fitzsimonsi* Dias 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) to the genus *Hepatozoon* Miller 1908 (Adeleorina: Hepatozoidae) based on parasite morphology, life cycle and phylogenetic analysis of 18S rDNA sequence fragments. *Parasitology*, 141, 1611–1620.
- Cook CA, Netherlands EC, Smit NJ (2015) First Hemolivia from southern Africa: reassigning chelonian *Haemogregarina parvula* Dias, 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) to Hemolivia (Adeleorina: Karyolysidae). *African Zoology*, 50(2):165-73.
- Criscione CD, Cooper B, Blouin MS (2006) Parasite genotypes identify source populations of migratory fish more accurately than fish genotypes. *Ecology*, 87(4):823-8.
- Darriba, D, Taboada, GL, Doallo, R, & Posada, D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772-772.
- Davies AJ and Johnston MRL (2000) The biology of some intraerythrocytic parasites of fishes, amphibia and reptiles. *Advances in Parasitology*, 45, 1–107.
- de Chambrier A (2006) Redescription of *Kapsulotaenia sandgroundi* (Carter, 1943) (Eucestoda: Proteocephalidea: Acanthotaeniinae), a parasite of *Varanus komodoensis* (Varanoidea: Varanidae) from Indonesia. *Syst Parasitol.*, 63:83-93.
- de Oliveira JP, André MR, Júnior JR, Lustosa AP, Werther K (2018) Molecular detection of hemogregarines and haemosporidians in Brazilian free-living testudines. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 7(1):75-84.
- Desser SS (1993) The Haemogregarinidae and Lankesterellidae. In: J.P. Kreier and J.R. Baker (Eds.), *Parasitic Protozoa*, Second Edition, Vol. 4. Academic Press, New York, New York, 247-272.
- Dvořáková N, Kvičerová J, Hostovský M, Šíroky P (2015) Haemogregarines of freshwater turtles from Southeast Asia with a description of *Haemogregarina sacaliae* sp. n. and a redescription of *Haemogregarina pellegrini* Laveran and Pettit, 1910. *Parasitology*, 142(6), 816–826.
- Dvořáková N, Kvičerová J, Papoušek I, Javanbakht H, Tiar G, Kami H, Šíroky P (2014) Haemogregarines from western Palaearctic freshwater turtles (genera *Emys*, *Mauremys*) are conspecific with *Haemogregarina stepanowi* Danilewsky, 1885. *Parasitology*, 141(4):522-30.
- Edgar, RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.
- Ehlers LP, Slaviero M, De Lorenzo C, Fagundes-Moreira R, de Souza VK, Perles L, Baggio-Souza V, Bezerra-Santos MA, Modrý D, Benovics M, Panziera W (2023) Pathological findings associated with *Dipetalonema* spp. (Spirurida, Onchocercidae) infection in two species of Neotropical monkeys from Brazil. *Parasitology Research*, 122(9):1973-82.
- Faria, NR, Kraemer, MU, Hill, SC, Góes de Jesus, J, Aguiar, RD, Iani, FC, ... & Pybus, OG (2018) Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science*, 361(6405), 894-899.
- Franzosa, EA, Huang, K, Meadow, JF, Gevers, D, Lemon, KP, Bohannan, BJ, & Huttenhower, C (2015) Identifying personal microbiomes using metagenomic codes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(22), E2930-E2938.
- González-Acuña D, Beldomenico PM, Venzal JM, Fabry M, Keirans JE, Guglielmone AA. (2005) Reptile trade

- and the risk of exotic tick introductions into southern South American countries. *Experimental & applied acarology*, 35(4):335-9.
- Gu TT, Zhang H, He YX, Hu JY, Yu L (2024) Approaches to tracing the geographic origin of wildlife trade. *National Science Review*, 11(9):nwae286.
- Guindon, S, Dufayard, JF, Lefort, V, Anisimova, M, Hordijk, W, & Gascuel, O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*, 59(3), 307-321.
- Halla U, Korbel R, Mutschmann F, Rinder M (2014) Blood parasites in reptiles imported to Germany. *Parasitology Research*, 113(12):4587-99.
- Hawman, D. W., & Feldmann, H (2023) Crimean–Congo haemorrhagic fever virus. *Nature Reviews Microbiology*, 21(7), 463-477.
- He, Q., Niu, X., Qi, R. Q., & Liu, M (2022) Advances in microbial metagenomics and artificial intelligence analysis in forensic identification. *Frontiers in microbiology*, 13, 1046733.
- Javanbakht H, Kvičerová J, Dvořáková N, Mikulíček P, Kautman M, Maršíková A, Šíroký P (2015) Phylogeny, diversity, distribution and host specificity of *Haemoproteus* spp. (Apicomplexa: Haemosporida: Haemoproteidae) of Palaearctic tortoises. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(5), 670-678.
- Jones, KE, Patel, NG, Levy, MA, Storeygard, A, Balk, D, Gittleman, JL, & Daszak, P (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990-993.
- Juan F. Espínola-Novelo, Carlos González-Salas, Sergio Guillén-Hernández, Ken MacKenzie (2015) Metazoan parasite infracommunities of *Mycteroperca bonaci* (Poey, 1960) (Pisces: Epinephelidae) in reef and coastal environments off the coast of Yucatán, México. *Acta Parasitologica*, 60: 476–484.
- Kanthaswamy, S (2024) Wildlife forensic genetics—Biological evidence, DNA markers, analytical approaches, and challenges. *Animal Genetics*, 55(2):177-92.
- Katoh, K, Misawa, K, Kuma, KI, & Miyata, T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, 30(14), 3059-3066.
- Kumari, P., Prakash, P., Yadav, S., & Saran, V (2022) Microbiome analysis: An emerging forensic investigative tool. *Forensic science international*, 340, 111462.
- Kvičerová J, Hypša V, Dvořáková N, Mikulíček P, Jandzik D, Gardner MG, Javanbakht H, Tiar G, Šíroký P (2014) *Hemolivia* and *Hepatozoon*: haemogregarines with tangled evolutionary relationships. *Protist*, 165, 688–700.
- Kwak ML, Wallman JF, Yeo D, Archer MS, Nakao R (2024) Forensic parasitology: a new frontier in criminalistics. *Forensic Sciences Research*, 9(2):owae005.
- Lainson R and Naiff RD (1998) *Haemoproteus* (Apicomplexa: Haemoproteidae) of tortoises and turtles. *Proceedings of the Royal Society, London* 265, 941–949.
- Landau I, Michel JC, Chabaud AG, Brygoo ER (1972) Cycle biologique d'*Hepatozoon domerguei*; discussion sur les caracteres fondamentaux d'un cycle de coccidie. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 38, 250–270.
- Lathakumari RH, Vajravelu LK, Gopinathan A, Vimala PB, Panneerselvam V, Ravi SS, Thulukanam J. (2025) The gut virome and human health: From diversity to personalized medicine. *Engineering Microbiology*, 7:100191.

- Lavrov et al. (2004) Phylogenetic position of Pentastomida and (pan) crustacean relationships *Proc. Biol. Sci.*, 271:537-544.
- Lee FC, Muthu V (2021) From 18S to 28S rRNA gene: An improved targeted Sarcocystidae PCR amplification, species identification with long DNA sequences. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 104(4):1388.
- Lester, R.J.G. MacKenzie, K (2009) The use and abuse of parasites as stock markers for fish. *Fisheris Research*, 97:1-2.
- Levin, I.I. et al., (2013) Multiple Lineages of Avian Malaria Parasites (*Plasmodium*) in the Galapagos Islands and Evidence for Arrival via Migratory Birds. *Conservation Biology*, 27, No. 6, 1366–1377.
- Liu W, Li Y, Learn GH, Rudicell RS, Robertson JD, Keele BF, Ndjango JB, Sanz CM, Morgan DB, Locatelli S, Gonder MK, Kranzusch PJ, Walsh PD, Delaporte E, Mpound-Ngole E, Georgiev AV, Muller MN, Shaw GM, Peeters M, Sharp PM, Rayner JC, and Hahn BH (2010) Origin of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in gorillas. *Nature*, 467, 420-425.
- Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C (2016) The healthy human microbiome. *Genome medicine*, 8(1):51.
- Lowichik A, Yaeger RG (1987) Ecological aspects of snake hemogregarine infections from two habitats in southeastern Louisiana. *Journal of Parasitology*, 73, 1109–1115.
- MacKenzie, K. (2002) Parasites as biological tags in population studies of marine organisms: an update. *Parasitology*, 124(07), 153-163.
- Maia JP, Crottini A, Harris DJ (2014) Microscopic and molecular characterization of Hepatozoon domerguei (Apicomplexa) and Foleyella furcata (Nematoda) in wild endemic reptiles from Madagascar. *Parasite*, 21:47.
- Mapua MI, Qablan MA, Pomajbíková K, Petrželková KJ, Huzová Z, Rádrová J, Votýpka J, Todd A, Jirku M, Leendertz FH, Lukeš J, Neel C and Modrý D (2015) Ecology of malaria infections in western lowland gorillas inhabiting Dzanga Sangha Protected Areas, Central African Republic. *Parasitology*, 142, 890-900.
- Maričić M, Danon G, Faria JF, Harris DJ (2023) Molecular screening of haemogregarine hemoparasites (Apicomplexa: Adeleorina: Haemogregarinidae) in populations of native and introduced Pond Turtles in Eastern Europe. *Microorganisms*, 11(4):1063.
- Mencattelli, G., Ndione, M. H. D., Silverj, A., Diagne, M. M., Curini, V., Teodori, L., ... & Savini, G (2023) Spatial and temporal dynamics of West Nile virus between Africa and Europe. *Nature Communications*, 14(1), 6440.
- Mihalca A.D. (2015) Ticks imported to Europe with exotic reptiles. *Veterinary Parasitology*, 213: 67–71.
- Miller, MA, Pfeiffer, W, & Schwartz, T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *2010 gateway computing environments workshop (GCE)* (pp. 1-8). IEEE.
- Montes MM, Furlan EO, Barneche JA, Vercellini C, Acuña Gonzalez T, Ibañez Shimabukuro M, Arzamendia V (2025) New information on adults pentastomids (Crustacea: Pentastomida) found in ophidians from Argentina: Insights from 28S rDNA and COI mtDNA. *Systematic Parasitology*, 102(2):1-1.
- More G, Pantchev N, Herrmann DC, Vrhovec MG, Öfner S, Conraths FJ & Schares G (2014) Molecular identification of *Sarcocystis* spp. helped to define the origin of green pythons (*Morelia viridis*) confiscated in Germany', *Parasitology* vol. 141, no. 5, pp. 646-51.

- Natusch DJD, Fitzgerald L, Lyons JA, Toudonou C, Miccuci P, Waller T (2019) Harvest monitoring of snakes in trade – a guide for wildlife managers. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission Number 65.
- Noll, M, Wall, R, Makepeace, BL, Newbury, H, Adaszek, L, Bødker, R, ... & Rose Vineer, H (2023) Predicting the distribution of *Ixodes ricinus* and *Dermacentor reticulatus* in Europe: a comparison of climate niche modelling approaches. *Parasites & vectors*, 16(1), 384.
- Böckeller W (1990) Pentastomida: wurförmige Arthropoden als Scharotzer im Respiratiostrakt ihrer (meist) reptiliengartigen Wirten. *Mitt. Österr. Tropenmed. Parasitol.*, 12: 103-110.
- Ohta, T, Nakazato, T, & Bono, H (2017) Calculating the quality of public high-throughput sequencing data to obtain a suitable subset for reanalysis from the Sequence Read Archive. *GigaScience*, 6(6), gix029.
- Olias P, Wegelin M, Zenker W, Freter S, Gruber AD, Klopffleisch R (2011) Avian malaria deaths in parrots, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 17(5):950.
- Özvegy, József, Darko Marinković, Miloš Vučićević, Bojan Gajić, Jevrosima Stevanović, Dejan Krnjaić, and Sanja Aleksić-Kovačević (2015) "Cytological and molecular identification of *Haemogregarina stepanowi* in blood samples of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) from quarantine at Belgrade Zoo." 443-453.
- Perkins SL and Keller AK (2001) Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. *Journal of Parasitology* 87, 870–876.
- Pietzsch M, Quest R, Hillyard PD, Medlock JM, Leach S (2006) Importation of exotic ticks into the United Kingdom via the international trade in reptiles. *Experimental & applied acarology*, 38(1):59-65.
- Rambaut, A, Lam, TT, Max Carvalho, L, & Pybus, OG (2016) Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus evolution*, 2(1), vew007.
- Rayner JC, Liu W, Peeters M, Sharp PM and Hahn BH (2011) A plethora of *Plasmodium* species in wild apes: a source of human infection? *Trends in Parasitology*, 27, 222-229.
- Richardson, DJ (2006) Life cycle of *Oligacanthorhynchus tortuosa* (Oligacanthorhynchidae), an acanthocephalan of the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*). *Comparative Parasitology*, 73(1), 1-6.
- Robinson, JM, Pasternak, Z, Mason, CE, & Elhaik, E. (2021). Forensic applications of microbiomics: a review. *Frontiers in Microbiology*, 11, 608101.
- Rosen GE, Smith KF (2010) Summarizing the evidence on the international trade in illegal wildlife. *EcoHealth*, 7(1):24-32.
- Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I (2018) The hologenome concept of evolution after 10 years. *Microbiome*, 6(1):78.
- Sehgal RNM, Jones HI and Smith TB (2005) Molecular evidence for host specificity of parasitic nematode microfilariae in some African rainforest birds. *Molecular Ecology*, 14: 3977–3988. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02555.x
- Shapira M (2016) Gut microbiotas and host evolution: scaling up symbiosis. *Trends in Ecology & Evolution*, 31(7):539-49.
- Široký P, Jandžík D, Mikulíček P, Moravec J, Országh I (2007) *Leptoconops bezzii* (Diptera: Ceratopogonidae) parasitizing tortoises *Testudo graeca* (Testudines: Testudinidae) in mountain ranges of Lebanon

and western Syria. *Parasitology Research*, 101, 485–489.

- Široký P, Kamler M, Frye FL, Fictum P, Modrý D (2007) Endogenous development of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in marginated tortoise *Testudo marginata* (Reptilia: Testudinidae): evidence from experimental infection. *Folia Parasitologica*, 54, 13–18.
- Široký P, Kamler M, Modrý D (2004) Long-term occurrence of *Hemolivia cf. mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in captive *Testudo marginata* (Reptilia: Testudinidae): evidence for cyclic merogony? *Journal of Parasitology*, 90, 1391–1393.
- Široký P, Kamler M, Modrý D (2005) Prevalence of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in natural populations of tortoises of the genus *Testudo* in the east Mediterranean region. *Folia Parasitologica*, 52, 359–361.
- Široký P, Petrželková KJ, Kamler M, Mihalca AD, Modrý D (2006) *Hyalomma aegyptium* as dominant tick in tortoises of the genus *Testudo* in Balkan countries, with notes on its host preferences. *Experimental and Applied Acarology*, 40, 279–290.
- Sehgal, RN, Jones, HI, Smith, TB (2005) Blood parasites of some West African rainforest birds. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(3), 295–301.
- Sloboda M, Kamler M, Bulantová J, Votýpka J, Modrý D (2008) Rodents as intermediate hosts of *Hepatozoon ayorgbor* (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) from the African ball python, *Python regius*. *Folia Parasitologica*, 55, 13–16.
- Sloboda M, Kamler M, Bulantová J, Votýpka J, Modrý D (2009) A new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Python regius* (Serpentes: Pythonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector. *Journal of Parasitology*, 93, 1189–98.
- Smith TG (1996) The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *Journal of Parasitology*, 82, 565–585.
- Smith TG, Desser SS, Martin DS (1994) The development of *Hepatozoon sipedon* sp. nov. (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in its natural host, the Northern water snake (*Nerodia sipedon sipedon*), in the culicine vectors *Culex pipiens* and *C. territans*, and in an intermediate host, the Northern leopard frog (*Rana pipiens*). *Parasitology Research*, 80, 559–568.
- Smith TG, Kim B, Desser SS (1999) Phylogenetic relationships among *Hepatozoon* species from snakes, frogs and mosquitoes of Ontario, Canada, determined by ITS-1 nucleotide sequences and life-cycle, morphological and developmental characteristics. *International Journal for Parasitology*, 29, 293–304.
- Srihi, H, Chatti, N, Ben Mhadheb, M, Gharbi, J, & Abid, N (2021) Phylodynamic and phylogeographic analysis of the complete genome of the West Nile virus lineage 2 (WNV-2) in the Mediterranean basin. *BMC ecology and evolution*, 21(1), 183.
- Stamatakis, A, Ludwig, T, & Meier, H (2005) RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 21(4), 456–463.
- Suchard, MA, Lemey, P, Baele, G, Ayres, DL, Drummond, AJ, & Rambaut, A (2018) Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus evolution*, 4(1), vey016.
- Swift L, Hunter PR, Lees AC, Bell DJ (2007) Wildlife trade and the emergence of infectious diseases. *EcoHealth*, 4(1):25–30.
- Tamayo-Quintero J, Martínez-de la Puente J, Matta NE, Pacheco MA, Rivera-Gutierrez HF (2025) Imprudent use of MalAvi names biases the estimation of parasite diversity of avian haemosporidians. *PLoS*

- Tappe D, Meyer M, Oesterlein A, Jaye A, Frosch M, Schoen C, Pantchev N (2011) Transmission of *Armillifer armillatus* ova at snake farm, The Gambia, West Africa. *Emerging infectious diseases*, 17(2):251.
- Telford SR (2009) Hemoparasites of the Reptilia: Color Atlas and Text. CRC Press, Boca Raton, Florida, 376 pp.
- Telford SR, Jr. (1984) Haemoparasites of reptiles. In: G. L. Huff, F. Frye, and E. R. Jacobson (Eds.), *Diseases of Amphibians and Reptiles*, Plenum Press, New York, 385–517.
- Tomé B, Maia JP, Salvi D, Brito JC, Carretero MA, Perera A, Meimberg H, Harris DJ (2014) Patterns of genetic diversity in *Hepatozoon* spp. infecting snakes from North Africa and the Mediterranean Basin. *Systematic Parasitology*, 87, 249–258.
- Trifinopoulos, J, Nguyen, LT, von Haeseler, A, & Minh, BQ (2016) W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic acids research*, 44(W1), W232-W235.
- Valkiūnas G (2005) Avian malaria parasites and other haemosporidia. CRC Press, Boca Raton, Florida, 946 pp.
- Valkiūnas G, Santiago-Alarcon D, Levin II, Iezhova TA, Parker PG (2010) A new *Haemoproteus* species (Haemosporida: Haemoproteidae) from the endemic Galapagos dove *Zenaida galapagoensis*, with remarks on the parasite distribution, vectors, and molecular diagnostics. *Journal of Parasitology*, 96, 783–792.
- Verhulst NO, Smallegange RC and Takken W (2012). Mosquitoes as potential bridge vectors of malaria parasites from non-human primates to humans. *Frontiers in Physiology*, 3, 197.
- Virgin HW (2014) The virome in mammalian physiology and disease. *Cell*, 157(1):142-50.
- Williams HH, K. MacKenzie, K, McCarthy AM (1992) Parasites as biological indicators of the population biology, migrations, diet, and phylogenetics of fish *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2: 144-176.
- World Organisation for Animal Health (2024) *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (13th ed.)* [Summary]. Retrieved November 11, 2025, from https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/A_summry.htm.
- Yamaguti S (1963) *Systema Helminthum* vol. 5. Acanthocephala. Interscience Publishers, New York.
- Zhao CH, Yang RJ, Ru SS, Chen HX, Li DX, Li L (2024) Integrative taxonomy of the genus *Pseudoacanthocephalus* (Acanthocephala: Echinorhynchida) in China, with the description of two new species and the characterization of the mitochondrial genomes of *Pseudoacanthocephalus sichuanensis* sp. n. and *Pseudoacanthocephalus nguyenthileae*. *Parasites & Vectors*, 17(1):541.
- Živčicová Ž, Kvičerová J, Široký P (2024) Hemolivia species infecting Central American wood turtles (*Rhinoclemmys pulcherrima manni*) and problems with differential diagnosis within the genus Hemolivia. *Parasite*, 31:1.

5 Přílohy

Příloha 1: Základní metodologické postupy parazitologické diagnostiky

A.1.1 Příprava krevního nátěru

A1.1.1 Základní informace

K detekci stadií intracelulárních a extracelulárních parazitů přítomných v periferní krvi hostitelů se používají trvale obarvené tenké krevní nátěry. Jedná se o rychlou a snadnou techniku, která se provádí ihned po odběru krve. Krevní nátěry se připravují na podložních mikroskopických sklíčkách. Po zaschnutí se sklíčka fixují, obarví a vyšetří pomocí světelného mikroskopu.

A1.1.2 Vybavení

- mikroskopická skla
- podložka
- krabička na skla
- metanol P.A.

A1.1.3 Postup

- k provedení krevního nátěru jsou potřeba dvě sklíčka. Na podložní sklo se umístí vzorek – kapka krve. Druhé sklo se použije k rozetření kapky krve, zde lze použít jak běžné mikroskopické podložní sklo, krycí sklíčko nebo speciální tenké sklíčko určené pro tyto účely.
- pokud sklíčko se vzorkem není dokonale čisté, otřete alkoholem. Sklíčka držte pouze za okraje.
- umístěte malou (!) kapku krve blízko konce sklíčka.
- druhým sklem pod úhlem asi 45 stupňů se dotkněte krve jedním okrajem, tak aby krev kapilární silou roztekla podél okraje sklíčka. Opatrně posuňte šikmé sklíčko po celé délce podložního skla, aby vznikl tenký nátěr krve. Upozorňujeme, že krev je sklem tažena (ne tlačena!).
hHotový nátěr musí být rovnoměrný, homogenní a středně tenký. Nátěr musí mít rovné dlouhé hrany, měl by končit před koncem sklíčka a musí přecházet na konci do rozvlněné hrany – tj. oblasti, kde jsou krevní buňky dobře oddělené.
- vzorek nechte zaschnout na vzduchu a zafixujte ho ponořením do absolutního metanolu na 5-10 vteřin.
- vždy je vhodné vytvořit minim. 2 nátěry; nátěry jasně označit vhodným popisovačem rezistentním k alkoholu. Po zaschnutí vložte do přepravních nádob na sklíčka pro další použití (např. barvení).

A1.2. Barvení krevních nátěrů, základní

A1.2.1 Základní informace

Giemsovo barvení je klasické barvení krevního nátěru pro periferní krevní nátěry. Červené krvinky se barví růžově, krevní destičky světle růžově, cytoplazma lymfocytů se barví nebesky modře, cytoplazma monocytů se barví světle modře a chromatin jader leukocytů má tmavě fialovou barvu. Tato barvicí technika je považována za zlatý standard pro detekci intracelulárních a extracelulárních parazitů v krvi a je dobře využitelné pro základní forenzní použití a pro dokumentaci nálezu před analýzou DNA.

A2.2 Typické využití

detekce hemogregarin, trypanosom, hemospodidií, larválních stádií filárií v periferní krvi

A1.2.3. Vybavení

- podložka na barvicí se skla
- barvicí kádinka na barvivo
- barvicí kádinka na metanol
- voda na oplach
- Giemsovo barvivo
- metanol P.A.

A1.2.4 Postup

vysušený krevní roztěr zafixujte v absolutním methanolu tak, že jej krátce (dvakrát) ponoříte do nádoby obsahující absolutní methanol. Tento krok se vynechá, je-li nátěr fixovaný bezprostředně po odběru.

- vyjměte a nechte uschnout na vzduchu.
- barvěte zředěným barvivem Giemsa (1:20, 5 %) po dobu 20 minut. Pro ředění 1:20 přidejte 2 ml zásobního roztoku Giemsa do 40 ml pufrované vody v barvicí kádince.
oOmyjte zbytek barviva krátkým oplachem sklíčka pod mírným proudem vody z vodovodu nebo stříčkou
- nechte uschnout na vzduchu ve svislé poloze

A1.3. Příprava materiálu flotačním vyšetřením

A1.3.1 Základní informace

Flotační vyšetření je základní proces přípravy vzorku trusu pro forenzní parazitologické vyšetření a dokumentaci nálezu. První centrifugací vzorku s vodou se odstraní ve vodě rozpustné pigmenty, volné lipidy a jiné nečistoty. Následující odstředění (=flotace) koncentruje cysty/oocysty/vajíčka ze vzorku do horní vrstvy flotačního roztoku. Metoda s využitím odstředění je citlivější než pasivní flotace. Specifická hmotnost (hustota) flotačních roztoků pro parazitologii se obvykle pohybuje v rozmezí od 1,15-1,33, popisovaná metody využívá modifikovaný Sheatherův roztok sacharózy.

A1.3.2 Typické využití

detekce sporocyst heteroxenních kokcií (*Sarcocystis*), detekce stadií helmintů, jazyčnatek

A1.3.3. Vybavení

- třecí miska s tloučkem
- stříčka s vodou
- sítko
- nálevka
- flotační zkumavka 10 ml
- stojánek na zkumavky
- modifikovaný Sheatherův roztok (hustota 1,3)
- přenosová klička
- podložní a krycí skla

A1.3.4 Postup

- vložte ~3 g trusu (objem o velikosti ořechu) do třecí misky, přidejte ~30 ml vody z vodovodu a obsah důkladně promíchejte.
- suspenzi přecedte přes sítko a trychtýř do 10ml zkumavky.
- zkumavku odstředte po dobu 2 minut při 2000 otáčkách za minutu, aby došlo k sedimentaci.
- odstraňte/slijte supernatant a sediment resuspendujte s Sheatherovým cukrovým roztokem
- zkumavku odstředte po dobu 2 minut při 2000 otáčkách za minutu, aby došlo k flotaci.
- přeneste horní vrstvu na mikroskopické sklíčko pomocí přenosové kličky, po zakrytí krycím sklem je vzorek připraven k vyšetření mikroskopem, obvykle při zvětšení 100–400x

Poznámka: Vhodnější je se odstředivka s rotorem s výkyvnými koši.

A 1.4. MIF (Merthiolate-Iodine-Formaldehyd) sedimentace

A1.4.1 Základní informace

Sedimentační vyšetření je základní proces přípravy vzorku trusu pro forenzní parazitologické vyšetření a dokumentaci nálezu. Tato technika je určena pro velké a těžké vajíčka parazitů, zatímco éter, který je součástí roztoku MIF, pomáhá odstranit tuk a hlen ze vzorku trusu. Lugolův roztok je možno přidat pro zvýšení kontrastu stadií parazitů a jejich vnitřních struktur.

A1.4.2 Typické využití

detekce vajíček helmintů (hlístice, motolice, tasemnice, vrtejši) a jazyčnatek

A1.4.3. Vybavení

- třecí miska s tloučkem
- stříčka s vodou, sítko a nálevka
- flotační zkumavka 15 ml s kónickým dne, typ falcon
- stojánek na zkumavky
- plastová pipeta 0,5 ml (Pasteurova)
- podložní a krycí skla
- éter
- glycerin
- merthiolát (Thiomersal)
- destilovaná voda, vodovodní voda
- 38% formaldehyd
- Lugolův roztok

A1.4.4 Postup

- připravte si MIF roztok, tzn. smíchejte roztok 500 ml destilované vody, 400 ml 1% roztoku merthiolátu, 50 ml 38% formaldehydu a 10 ml glycerinu
- vložte vzorek trusu do třecí misky, přidejte vodu z vodovodu a obsah důkladně promíchejte
- suspenzi přecedte přes sítko a trychtýř do zkumavky 15 ml s kónickým dnem
- odstředte 3 min při 1500 otáčkách/min., odstraňte supernatant
- sediment smíchejte s 5 ml roztoku MIF a 6 ml etheru v 15 ml zkumavce.
- odstředte 3 minuty při 1500 otáčkách za minutu.
- slitím opatrně odstraňte supernatant
- Pasteurovou pipetou přeneste sediment na sklíčko mikroskopu, přidejte kapku Lugolova jodu a zakryjte krycím sklíčkem
- vzorek je připraven k mikroskopickému vyšetření; obvykle postupně vyšetřujeme celý sediment

Příloha 2: Příkladové modelové situace

K dokreslení výše uvedených metodických pokynů pro forenzní využití parazitů při odhalování trestné činnosti spojené s ilegálním obchodem s volně žijícími druhy obratlovců připojujeme modelové situace, demonstrující praktické situace využití navržených postupů.

A2.1 Zadržená zásilka krajt zelených

A2.1.1. Modelový případ

Mimo celní prostor (teraristická burza v centru Prahy) zadržena zásilka živých krajt zelených *Morelia viridis*, sestávající z 10 dospělých kusů. Prodávající udává původ zvířat z vlastního dochovu, hadi nejsou označeni mikročipem a prodávající nemá k dispozici CITES doklady. Hadi zadrženi a deponováni v záchytném centru, kde byli umístěni jednotlivě do karanténních nádrží.

A2.1.2 Možný postup odběru materiálu

Zevní prohlídkou posoudit přítomnost ektoparazitů, případně parazity v podkoží. Ošetřující veterinář odebere vzorky krve ventrální ocasní žíly. Během prvního týdne po zadržení ošetřujícím personálem odebrat trus od jednotlivě držných hadů do sterilních plastových nádobek 20 ml a umístit do chladničky (4 C), do 3-5 dnů provést analýzy. V laboratoři alikvot o velikosti 2,0 g z každého vzorku zamrazit (-18 C), zbytek vzorku parazitologicky vyšetřit.

A2.1.3 Základní parazitologické vyšetření

Provést flotační a MIF sedimentační vyšetření vzorků, výsledek vyšetřovat světelnými mikroskopem, s běžnou digitální fotokamerou. Časová nálož na 5-10 vzorků 1,5-2 hodiny práce erudovaného parazitologa ve vybavené laboratoři.

A2.1.4 Výsledek mikroskopického vyšetření

Odebrán a doručen trus od 5 jedinců, krev se nepodařilo odebrat z důvodu agresivity zvířat

	Had1	Had2	Had3	Had4	Had5
Flotační vyšetření					
<i>Sarcocystis</i> sp., sporocysty	+++	+	+	-	-
<i>Caryospora</i> sp., oocysty	+	+	++	+	+
Nematoda, vajíčka	+	++	-	-	+
Tasemnice, vajíčka	+	+	-	-	++
MIF sedimentace					
<i>Sarcocystis</i> sp., sporocysty	+	+	-	-	-
Nematoda, vajíčka	+	+	-	-	+
Tasemnice, vajíčka	+	++	-	-	+

A2.1.5 Dokumentace

- Fotodokumentace výsledku flotačního a sedimentačního vyšetření – mikrofotografie stadií parazitů
- Trus, bio-banking při -80 °C

A2.1.6 Interpretace

Nález sporocysts kokcií r. *Sarcocystis* a vajíček tasemnic r. *Kapsulotaenia* (viz obrázky) u 4 jedinců významně naznačuje původ hadů z volné přírody. Technicky je vyloučeno, že by se těmito parazity nakazila zvířata odchovaná v zajetí v ČR (jak deklaroval prodávající). Nálezy oocyst r. *Caryospora* a vajíček strongylidních nematodů nemají forenzní hodnotu, tyto parazity se přenášejí i v teráriích. U jednoho z pěti vyšetřovaných jedinců nebyl nález forenzně významný (had č. 4).

A2.1.7 Možná další vyšetření

Základní vyšetření má vysokou indikativní hodnotu. Podpořit by jej bylo možné DNA analýzou detekovaných stadií r. *Sarcocystis* (18SrDNA) a srovnáním se sekvencemi v genové bance GenBank. V praxi by to znamenalo izolaci DNA ze sedimentu zamražených vzorků komerčním izolačním kitem, PCR a sekvenování v komerční firmě. U všech jedinců by bylo vhodné odebrat krev (rutinní odběr z ventrální ocasní žíly), připravit levní nátěry a ty obarvit a vyšetřit. Odebranou krev kryo-archivovat, možná využitelnost i pro genetická vyšetření hadů.

A2.1.8 Ilustrační fotodokumentace k případu



Ilustrační dokumentace k interpretaci případu A2.1: stadia parazitů v trusu, krajta zelená. 1. Vajíčko tasemnice *Kapsulotaenia* sp. s vysokou indikativní hodnotou; 2. Vajíčka strongylidních/rhabditidních hlístic a oocysty *Caryospora* sp., v tomto případě bez indikativní hodnoty; 3. Sporocysta *Sarcocystis* sp., indikující původ z přírody.

A2.2 Zadržený sokol stěhovavý

A2.2.1. Modelový případ

Namátková kontrola vozidla na hraničním přechodu do Německa odhalila jednoho jedince sokola stěhovavého v přepravním boxu. Pták nebyl označen ani kroužkem, ani mikročipem a údajný majitel nemá k dispozici CITES doklady. Sokol zadržen a deponován v záchytném centru.

A2.2.2 Možný postup odběru materiálu

Veterinární lékař provede zevní prohlídku na přítomnost ektoparazitů, odebere krev z křídelní žíly do zkumavky s EDTA. Trus sokola ošetřujícím personálem odebrát do sterilních plastových nádobek 20 ml a umístit do chladničky (4 °C). V laboratoři alikvot o velikosti 2,0 g ze vzorku zamrazit (-18 °C), zbytek vzorku parazitologicky vyšetřit (flotační a MIF sedimentační vyšetření). Z krve zhotovit 2-3 krevní nátěry, zbytek krve kryoarchivovat (-18 °C).

A2.2.3 Základní parazitologické vyšetření

(a) Trus

Flotační a MIF sedimentační vyšetření dvou po sobě následujících vzorků trusu ze dvou dnů, výsledek vyšetřit světelným mikroskopem s běžnou digitální fotokamerou. Časová nálož 1 hodina času erudovaného parazitologa ve vybavené laboratoři.

(b) Krev

Vybraný jeden krevní nátěr fixovat metanolem, obarvit dle Giemsy, výsledek vyšetřit světelným mikroskopem s běžnou digitální fotokamerou. Časová nálož 1 hodina času erudovaného parazitologa ve vybavené laboratoři.

A2.2.4 Výsledek zevní prohlídky na přítomnost ektoparazitů: bez nálezu

A2.2.5 Výsledek mikroskopického vyšetření trusu

	Vzorek 1	Vzorek 2
Flotační vyšetření		
<i>Sarcocystis</i> sp., sporocysty	+++	+
<i>Caryospora</i> sp., oocysty	+	+
Spiruridní hlístice, <i>Seratostrongylus</i>	+	+
Tasemnice, vajíčka	+	+

MIF sedimentace		
<i>Sarcocystis</i> sp., sporocysty	+	+
Nematoda, vajíčka	+	+
Tasemnice, vajíčka	+	+

A2.2.6 Výsledek mikroskopického vyšetření krevního nátěru

V krevním nátěru larvální stadia nematodů, identifikována jako mikrofilárie

A2.2.7 Dokumentace

- Fotodokumentace výsledku flotačního a sedimentačního vyšetření – mikrofotografie stadií parazitů
- Fotodokumentace stadií v krevním nátěru – mikrofotografie stadií parazitů
- Trus a krev bio-banking při -80 °C

A2.2.8 Interpretace:

Výsledek vyšetření trusu i krve odhalil relativně široké spektrum parazitů, včetně parazitů typických pro volně žijící sokolovité (sporocysty kokcií r. *Sarcocystis*, vajíček tasemnic, *Seratothecium*, mikrofilárie), což vše významně naznačuje původ dravce z volné přírody. V tomto případě ovšem nelze vyloučit, že by se těmito parazity nemohl nakazit sokol využívaný k sokolnictví a držený např. ve venkovní voliérě s přístupem přenašečů filárií. Nalezení parazitů tak sice podporují ilegální původ zvířete, přesvědčivou důkazní hodnotu ale nemají.

A2.2.9 Možná další vyšetření

Pravděpodobně nejsou potřebná, DNA analýzy parazitů by zřejmě neposunuly výpovědní hodnotu výsledku.

A2.3 Zadržená zásilka suchozemských želv

A2.3.1. Modelový případ

Namátková kontrola vozidla na hraničním přechodu ze Slovenska odhalila 15 jedinců želv žlutohnědých *Testudo graeca* různého věku. Údajný majitel deklaroval želvy jako odchovy z vlastního chovu v Čechách, se kterými se navrací z dovolené na Slovensku, CITES doklady nemá k dispozici. Želvy nebyly označeny mikročipem. Jedinci zadrženi a deponováni v záchytném centru.

A2.3.2 Možný postup odběru materiálu

Veterinární lékař nebo ošetřovatel v záchytném centru do 24 hodiny po převzetí provede zevní prohlídku na přítomnost ektoparazitů, nalezené parazity fixovat jednotlivě v plastových epruvetách v 96% EtOH. Veterinární lékař odebere krev z ocasní žíly do zkumavky s EDTA. Želvy umístit přechodně jednotlivě, trus želv nechat ošetřujícím personálem odebrat do sterilních plastových nádobek 20 ml a umístit do chladničky (4 °C). V laboratoři alikvot o velikosti 2,0 g ze vzorků zamrazit (-18 °C), zbytek každého vzorku parazitologicky vyšetřit (flotační a MIF sedimentační vyšetření). Z krve zhotovit 2-3 krevní nátěry, zbytek krve kryoarchivovat (-18 °C).

A2.3.3 Základní parazitologické vyšetření

(c) Trus

Flotační a MIF sedimentační vyšetření trusu z několika dnů od alespoň 5 jedinců, výsledek vyšetřit světelným mikroskopem s běžnou digitální fotokamerou. Časová nálož 2 hodiny času erudovaného parazitologa ve vybavené laboratoři.

(d) Krev

Vybraný krevní nátěr od každého zvířete fixovat metanolem, obarvit dle Giemsy, výsledek vyšetřit světelným mikroskopem s běžnou digitální fotokamerou. Časová nálož 2-3 hodiny času erudovaného parazitologa ve vybavené laboratoři.

A2.3.4 Výsledek zevní prohlídky na přítomnost ektoparazitů

Na 6 jedincích nalezena dospělá klíšťata, identifikace erudovaným expertem jako *Hyalomma aegyptium*.

A2.3.5 Výsledek mikroskopického vyšetření trusu

	Želva 1	Želva 2	Želva 3	Želva 4	Želva 5
Flotační vyšetření					
Roupi, Oxyurida, vajíčka	+++	++	++	++	++++
Škrkavky <i>Angusticaecum holopterus</i>	+	++			+
MIF sedimentace					
Roupi, Oxyurida, vajíčka	++	++	++	++	++
Škrkavky <i>Angusticaecum holopterus</i>	+	+	-	-	+

A2.3.6 Výsledek mikroskopického vyšetření trusu

V krevním roztěru 9 dospělých želv stadia prvoků uvnitř erytrocytů, identifikovaná jako hemogregariny. Po vyšetření expertem uzavřeno jako gametocyty *Hemolivia mauritanica*.

A2.3.7 Dokumentace

- Fotodokumentace výsledku flotačního a sedimentačního vyšetření – mikrofotografie stadií parazitů
- Fotodokumentace stadií v krevním nátěru – mikrofotografie stadií parazitů při zvětšení 1000x
- Trus a krev bio-banking při -80 °C

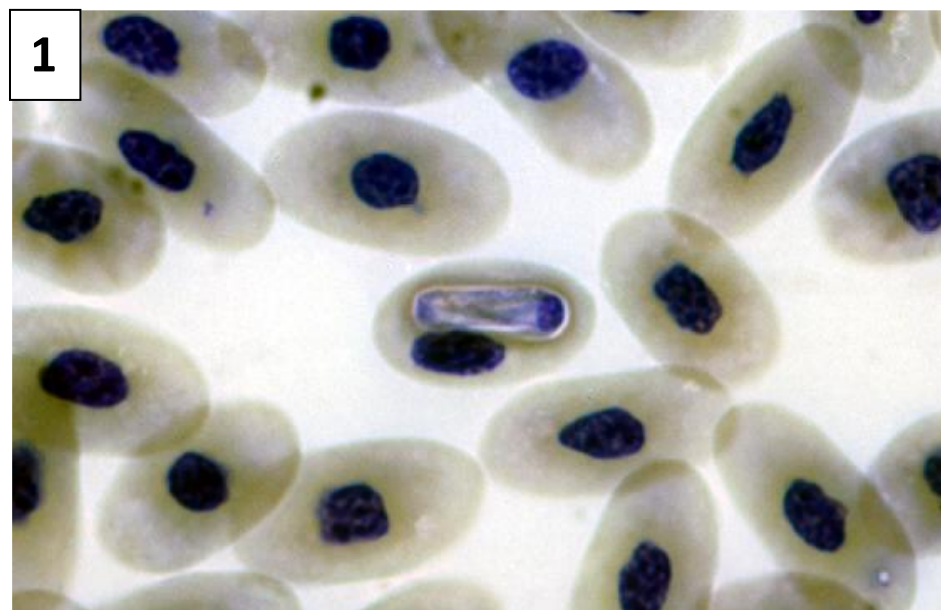
A2.3.8 Interpretace

Výsledek vyšetření trusu spektrum parazitů běžných pro tuto skupinu plazů. Ve všech případech se jedná o parazity s přímým vývojovým cyklem, relativně běžné v chovech suchozemských želv i v ČR, tyto nálezy jsou s ohledem na původ zvířat bez významu. Nález klíšťat *H. mauritanica* u 6 jedinců dokládá původ želv z volné přírody. Technicky je vyloučeno, že by se těmito klíšťaty nakazila zvířata odchovaná v zajetí v ČR a držené přechodně na Slovensku (jak deklaroval majitel). Nález stadií prvoků r. *Hemolivia* u 9 dospělých želv analogicky dokládá původ zvířat z volně žijící populace. V kombinaci výsledky dokazují, že minimálně část transportovaných želv pochází z ilegálního odchytu na Balkáně, a to v uplynulých 2-3 týdnech (na základě nálezu přisátých samic klíšťat).

A2.3.9 Možná další vyšetření

Pravděpodobně nejsou potřebná, DNA analýza parazitů by mohla zvýšit výpovědní hodnotu výsledku o vědecká data, není ale nezbytná.

A2.2.10 Ilustrační fotodokumentace k případu



Ilustrační dokumentace k interpretaci případu A2.3: krevní prvci - hemogregariny a klíšťata s vysokým forezním významem, želva žlutohnědá. 1. Stadia *Hemolivia mauritanica* v krevních buňkách; 2. Klíšťata *Hyalomma aegyptium*, nalevo nasátá samice.

A2.4 Zadržená zásilka krajt královských nejasného původu

A2.4.1. Modelový případ

Mimo celní prostor (prodejna v centru Prahy) kontrolována ČIŽP skupina 3 dospělých krajt královských *Python regius*. Prodávající udává původ zvířat z vlastního dochovu, hadi nejsou označeni mikročipem a prodávající nemá k dispozici CITES doklady. Hadi zadrženi a deponováni v záchytném centru, kde byli umístěni jednotlivě do karanténních nádrží.

A2.4.2 Možný postup odběru materiálu

Zevní prohlídkou posoudit přítomnost ektoparazitů, případně parazity v podkoží. Ošetřující veterinář odebere vzorky krve ventrální ocasní žíly. Během prvního týdne po zadržení ošetřujícím personálem odebrat trus od jednotlivě držných hadů do sterilních plastových nádobek 20 ml a umístit do chladničky (4 °C), do 3-5 dnů provést analýzy. V laboratoři alikvot o velikosti 2,0 g z každého vzorku zamrazit (-18 °C), zbytek vzorku parazitologicky vyšetřit.

A2.4.3 Základní parazitologické vyšetření

Na povrchu těla všech tří jedinců nalezena klíšťata, identifikovaná expertem jako *Aponoma latum* a *Hyalomma* sp.. Vyšetření trusu nebylo provedeno, během 3 týdnů po zadržení hadi nedefekovali.

A2.4.4 Výsledek mikroskopického vyšetření krve

V krevních roztěrech v červených krvinkách identifikována stadia hemogregarin, určená expertem jako *Hepatozoon ayorghbor*, typický parazit krajt královských.

A2.4.5 Dokumentace

- Fotodokumentace - makrofotografie klíšťat na povrchu těla
- Fotodokumentace - makrofotografie klíšťat s využitím stereomikroskopu
- Fotodokumentace - mikrofotografie stadií parazitů v krvi
- Trus, bio-banking při -80 °C

A2.4.6 Interpretace

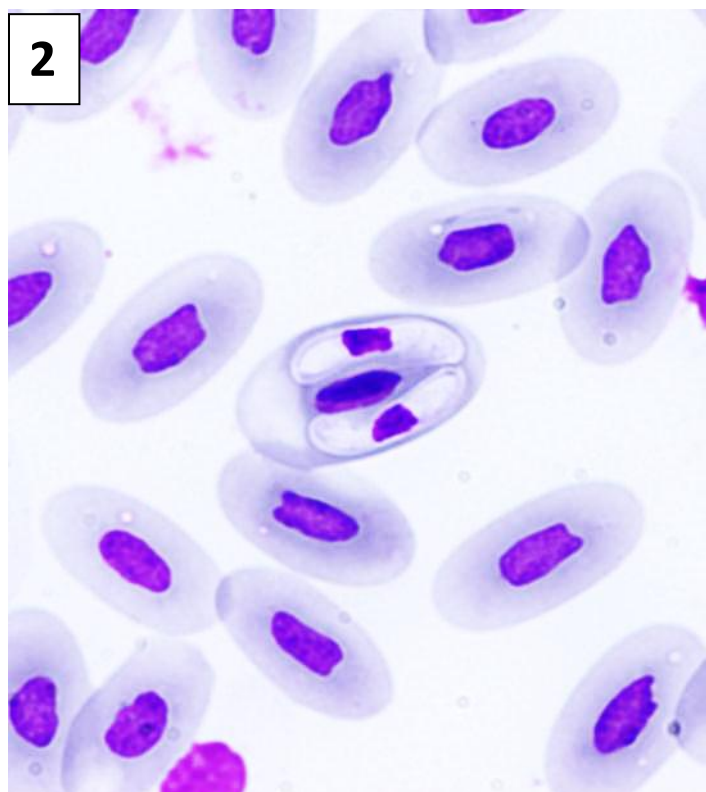
Nález klíšťat na všech jedincích dokládá původ krajt z volné přírody nebo z polovolného chovu v tropické Africe. Technicky je vyloučeno, že by se těmito klíšťaty krajty nakazily v ČR (jak deklaroval majitel). Nález stadií prvoků r. *Hepatozoon* analogicky dokládá původ zvířat z volně žijící populace. V kombinaci výsledky dokazují, že hadi pochází z ilegálního importu, a to v uplynulých 2-5 týdnech (na základě nálezu přisátých klíšťat).

A2.4.7 Možná další vyšetření

Základní vyšetření má vysokou indikativní hodnotu. Podpořit by jej bylo možné DNA analýzou detekovaných stadií *Hepatozoon* sp. (18SrDNA) a srovnáním se sekvencemi v genové bance GenBank. V praxi by to znamenalo izolaci DNA ze zamražených vzorků krve komerčním izolačním kitem, PCR a

sekvenování v komerční firmě. Krev kryo-archivovat, možná využitelnost i pro genetická vyšetření hadů.

A2.4.8 Ilustrační fotodokumentace k případu



Ilustrační dokumentace k interpretaci případu A2.4: Krevní prvoci - hemogregariny s vysokým forenzním významem, krajta královská. 1. Dokumentace odběru krve z ventrální ocasní žíly; 2. Stadia *Hepatozoon* sp. v krevních buňkách.



Ilustrační dokumentace k interpretaci případu: Klíšťata s vysokým forenzním významem, krajta královská. 1. Klíšťata přichycená na těle kontrolovaného jedince; 2. *Aponomma latum*, 3. *Amblyomma* sp.

A2.5 Zadržená zásilka madagaskarských chameleonů

A2.5.1. Modelový případ

Mimo celní prostor (teraburza v centru Prahy) kontrolován ČIŽP prodejce skupiny 10 dospělých jedinců madagaskarských chameleonů r. *Furcifer* v plastových boxech 500 ml. Prodávající udává původ zvířat z vlastního odchovu, zvířata nejsou označeni mikročipem a prodávající nemá k dispozici CITES doklady. Jeden jedinec byl čerstvě uhynulý. Chameleoni zadrženi a deponováni v záchranném centru, kde byli umístěni jednotlivě do karanténních nádrží. Předán podnět SVS o podezření z porušení zákona na ochranu zvířat proti týrání cestou nevhodné manipulace a držení zvířat.

A2.5.2 Možný postup odběru materiálu

Zevní prohlídkou posoudit přítomnost ektoparazitů, případně parazity v podkoží. Ošetřující veterinář odebere vzorky krve ventrální ocasní žíly. Během prvního týdne po zadržení ošetřujícím personálem odebrat trus od jednotlivě držných jedinců do sterilních plastových nádobek 20 ml a umístit do chladničky (4 °C), do 3-5 dnů provést analýzy. V laboratoři alikvot o velikosti 2,0 g z každého vzorku zamrazit (-18 °C), zbytek vzorku parazitologicky vyšetřit. Mrtvého jedince podrobit parazitologické pitvě. Zvířata nechat identifikovat expertem do druhu.

A2.5.3 Základní parazitologické vyšetření

Na povrchu těla 5 jedinců patrná přítomnost hadovitě tvarovaných parazitů v podkoží, veterinární lékař jednoho parazita vyjmul po krátké incizi skrz kůži. Vyšetření trusu nebylo provedeno, krev odebrána jen od 3 jedinců. Mrtvý exemplář podroben pitvě.

A2.5.4 Výsledek mikroskopického vyšetření krve

V krevních roztěrech larvální stádia parazitických hlístic identifikovaná jako mikrofilárie *Foleyella* sp.

A2.5.5 Výsledek pitvy

Pokročilá autolýza, v podkoží žlutavé hlístice o velikosti 55-75 mm, identifikovány jako filárie.

A2.5.6 Dokumentace

- Fotodokumentace - makrofotografie nematodů nalezených při pitvě
- Fotodokumentace - makrofotografie filárií působících zduření na kůži
- Fotodokumentace - mikrofotografie stadií parazitů v krvi
- Trus, bio-banking při -80 °C
- Krev, bio-banking při -80 °C
- Barvený krevní roztěr
- Nalezené hlístice, bio-banking při -80 °C

A2.5.7 Interpretace

Nález heteroxenních hlístic – filárií ve formě podkožních stádií a mikrofilárií v krevních nátěrech dokládá původ vyšetřených jedinců zvířat z volné přírody nebo z polovolného chovu na Madagarkaru. Technicky je vyloučeno, že by se těmito parazity chameleóni nakazili v ČR (jak deklaroval majitel). V kombinaci se stavem zvířat a absencí dokladů výsledky dokazují, že zvířata v seznamu CITES II pochází z ilegálního importu.

A2.5.8 Možná další vyšetření

Základní vyšetření má vysokou indikativní hodnotu. Podpořit by jej bylo možné DNA analýzou detekovaných stádií filárií (18SrDNA, cox1) a srovnáním se sekvencemi v genové bance GenBank. V praxi by to znamenalo izolaci DNA ze zamražených vzorků krve a z izolovaných hlístic komerčním izolačním kitem, PCR a sekvenování v komerční firmě. Krev kryo-archivovat, možná využitelnost i pro genetická vyšetření hadů. Dovyšetřit zbývající jedince.

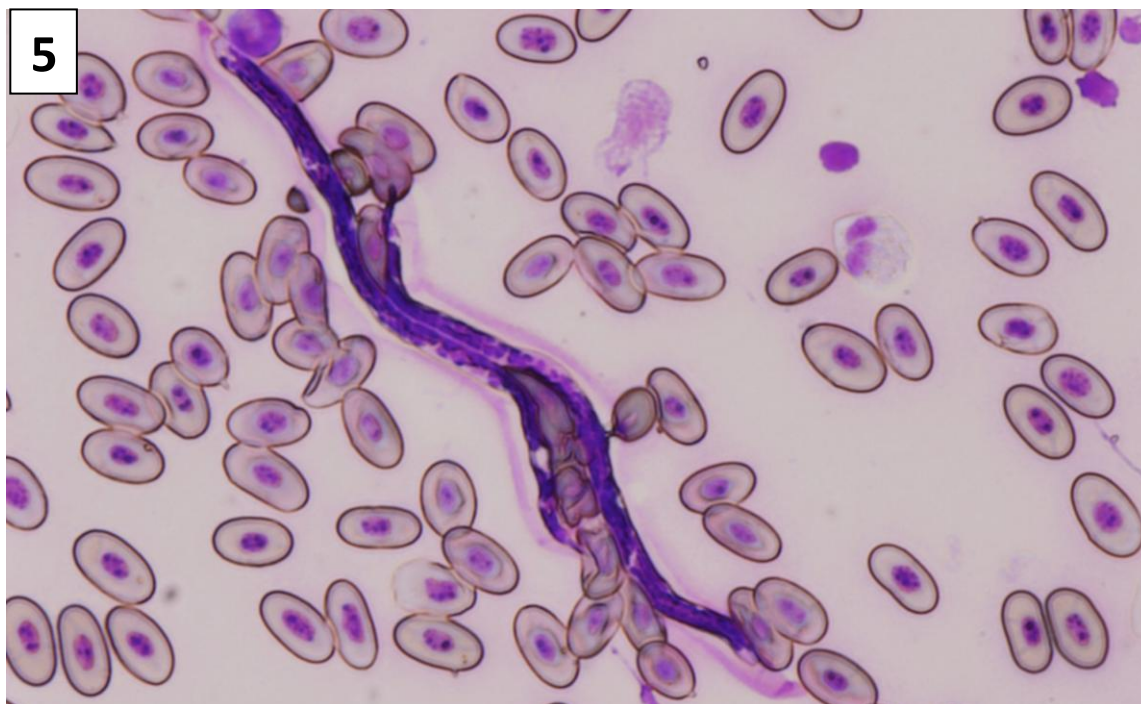
A2.1.8 Ilustrační fotodokumentace k případu



4

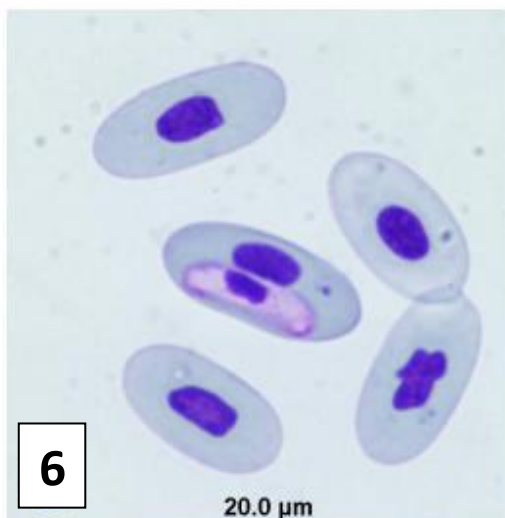
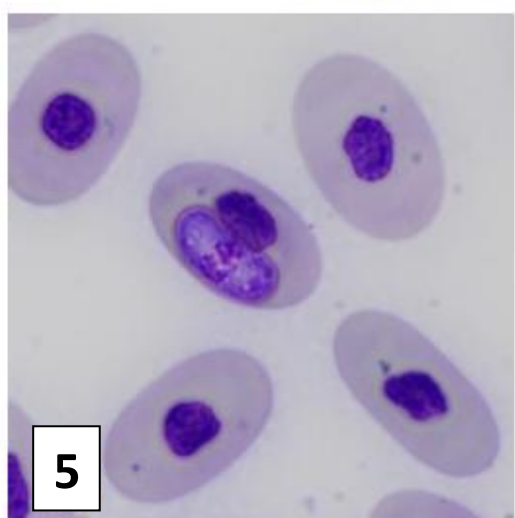
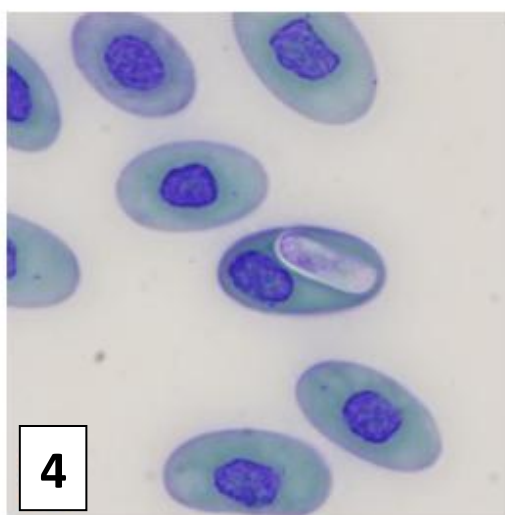
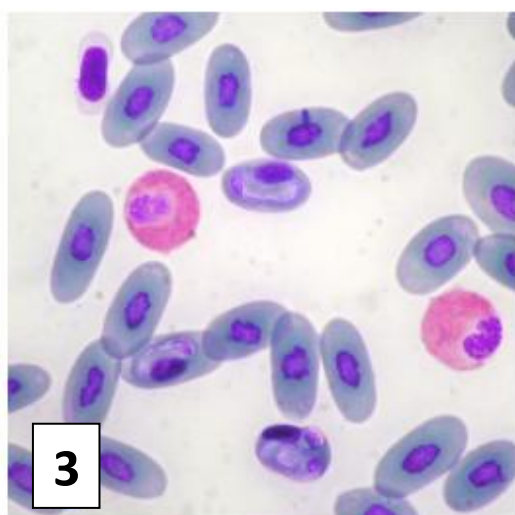


5

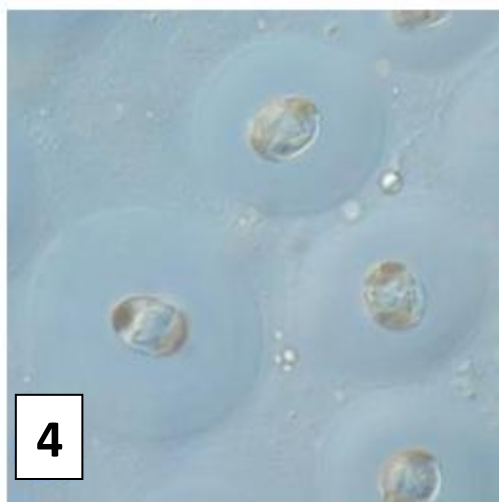


Ilustrační dokumentace k interpretaci případu A2.5: Nález filárií s vysokým forezním významem, chameleon. 1-2. Mikrifulárie fotografované in situ při pitvě; **3.** Izolovaná hlístice z tělní dutiny připravená k fixaci v EtOH akryoarchivaci; **4.** Filárie patrné pod kůží zabaveného živého exempláře, **5.** Mikrofilárie v obarveném krevním nátěru připraveném z živého jedince.

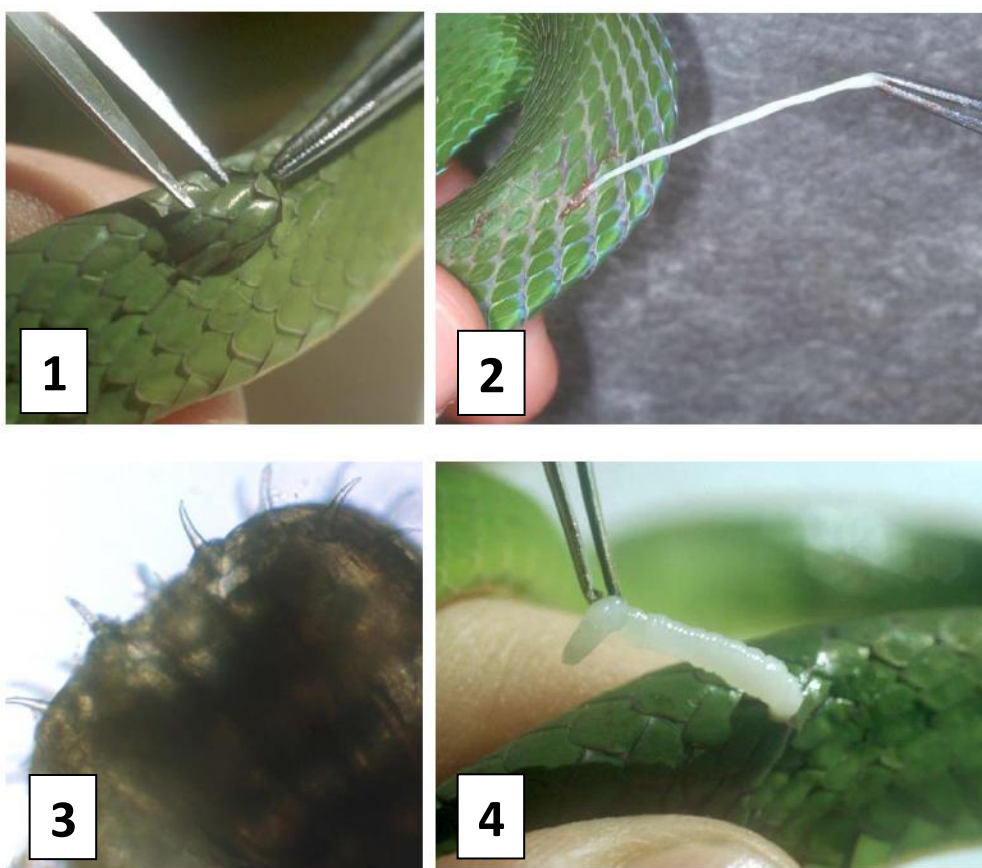
Příloha 3: Identifikační tabule, další příklady forenzně významných nálezů



Identifikační tabule T1. Příklady prvoků s forenzním významem. 1-2. Sporocysty *Sarcocystis* sp. v trusu krajt; 3-4. *Hemolivia mauritanica* v krvi želvy žlutohnědé *Testudo graeca*; 5. *Haemogregraina stepanowi* v krvi želvy bahenní *Emys orbicularis*; 5. *Hepatozon ayorborg* v krvi krajty královské *Python regius*.



Identifikační tabule T2. Vajíčka helmintů v trusu. 1. *Kapsulotaenia* sp., proteocephladiní tasemnice v trusu krajt r. *Morelia*; 2. *Bothridium pythonis*, *Morelia viridis*, foto Jana Bulantová; 3. *Duthiersia varani*, *V. exanthematicus*, foto Jana Bulantová; 4. *Oochoristica* sp, *I. iguana*; 5. Spiruridní vajíčka z varana, 6. *Abbreviata*, *Morelia viridis*, foto Jana Bulantová.



Identifikační tabule T3. Podkožní parasite s vysokým forezním významem. 1. typická zduřenina s larvou tasemnice uvnitř - plerocercoid, bičovka *Ahaetulla prasina*; **2.** chirurgické vyjmutí plerocercoidu prostřednictvím malého řezu, materiál následně fixovat do 70 nebo 96% EtOH; **3.** mikroskopie: kraniální část larvy vrtejše s typickými trny; **4.** chirurgické vyjmutí larvy acanthocephalan z importovaného chřestýšovce r. *Trimeresurus*.



Identifikační tabule T4. Klíšťata na dovezených plazech. 1. *Amblyomma* sp., dovezený *Varanus exanthematicus*, foto Jana Bulantová; 2. *Amblyomma* cf. *sparsum*, volně žijící *S. pardalis*, Keňa; 3. *A. komodoense*, *V. komodoensis*, chov v lidské péči, zoo; 4. *Hyalomma marginatum*, *Testudo graeca*; 5. *A. latum* za okem krajty *Python regius* dovezené z Ghany.



Pomáhat a chránit

POLICEJNÍ PREZIDIUM ČESKÉ REPUBLIKY

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:	Detekce a analýzy exotických patogenů a využití výsledků při forenzních analýzách s cílem dokladování trestné činnosti spojené s obchodem se zvířaty
Autor/autorský kolektiv:	David Modrý, Jiří Černý, Petr Matějů, Seyma S. Celina, Allan O. Tekkara, Jignesh Italiya, Petr Cibulka, Sára Lukšíková, Ondřej Daněk, Barbora Černá Bolfíková, Ivana Jankovská, Richard Sehnal, Iva Langrová
Žadatel (příjemce podpory):	Česká zemědělská univerzita v Praze
Projekt/program:	Metodologie identifikace a dalších forenzních analýz biologického materiálu a patogenů z volně žijících a exotických živočichů v rámci programu 1.VS OPSEC, bezpečnosti výzkum Ministerstva vnitra číslo VK01010103

Schváleno pod č. j.:
PPR-57764-6/ČJ-2025-990540

Evidenční číslo osvědčení: 21/2025

V Praze

genpor. Mgr. Martin VONDRÁŠEK
policejní prezident



Autorský kolektiv souhlasí s bezplatným využitím předložené metodiky u Policie ČR, Celní správy a ostatních orgánů státní správy a samosprávy.



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: Detekce a analýzy exotických patogenů a využití výsledků při forenzních analýzách s cílem dokladování trestné činnosti spojené s obchodem se zvířaty.

Certifikovaná metodika

Autor: David Modrý, Jiří Černý, Petr Matějů, Seyma S. Celina, Allan O. Tekkara, Jignesh Italiya, Petr Cibulka, Sára Lukšíková, Ondřej Daněk, Barbora Černá Bolfíková, Ivana Jankovská, Richard Sehnal, Iva Langrová

Vydavatel: Česká zemědělská univerzita v Praze

Adresa vydavatele: Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, Praha–Suchbát, 16500

Pořadí vydání: 1.

Rok vydání: 2025

ISBN 978-80-213-3524-0

Náklad: on line

Určeno: pro odbornou veřejnost

Povoleno: děkanátem FAPPZ ČZU v Praze

Počet stran: 74

Vydala Česká zemědělská univerzita ve svém nakladatelství