

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie

**VÝSLEDKY PARAZITOLOGICKÉ KONTROLY JEHŇAT
V GRANTOVÉM EXPERIMENTU I.**

(Diplomová práce)

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Jiří Lamka, CSc.

Vedoucí katedry: Prof. PharmDr. Ing. Milan Lázníček, CSc.

Hradec Králové, březen 2008

Ludmila Prušková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Za rady, připomínky a pomoc při vypracování této diplomové práce upřímně děkuji Prof. RNDr. Jiřímu Lamkovi, CSc.

Za obeznámení s testy helmintorezistence děkuji MVDr. Mariánovi Varadymu, DrSc.

OBSAH:

1. ÚVOD A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1. Endoparazitózy ovcí.....	9
2.1.1. Motoličnatost.....	9
2.1.2. Tasemničnatost.....	10
2.1.3. Plicní červivost.....	10
2.1.4. Slezová a střevní červivost.....	11
2.2. <i>Haemonchus contortus</i>	12
2.2.1. Systematika.....	13
2.2.2. Morfologie.....	13
2.2.3. Vývoj.....	14
2.2.4. Přenos.....	15
2.2.5. Patogenita.....	15
2.2.6. Diagnóza.....	16
2.2.7. Léčba	16
2.2.7.1. Makrocyclické laktony.....	16
2.2.7.2. Benzimidazoly.....	17
2.2.7.3. Imidazothiazoly.....	17
2.2.8. Prevence.....	18
2.3. Helmintorezistence.....	18
2.3.1. Historie.....	18
2.3.2. Prevalence.....	19
2.3.3. Mechanismus rezistence.....	19
2.3.4. Detekce rezistence.....	20
2.3.4.1. <i>In vivo</i> testy.....	21
2.3.4.2. <i>In vitro</i> testy.....	21
2.3.5. Opatření proti rezistenci.....	22

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	23
3.1. Místo a časové rozložení experimentů.....	24
3.2. Plemena ovcí použitých v experimentech.....	24
3.2.1. Plemeno Merinolandschaft.....	24
3.2.2. Plemeno romanovské.....	25
3.3. Sběr vzorků.....	26
3.4. Metodika parazitologického vyšetření.....	26
3.4.1. Kvantitativní ovoskopická metoda.....	26
3.4.2. Kvalitativní ovoskopická metoda.....	27
3.4.3. Metody zjištění helmintorezistence.....	27
3.4.3.1. Test líhnutí larev.....	27
3.4.3.2. Test vývinu larev.....	28
3.5. Experiment číslo 1.....	28
3.6. Experiment číslo 2.....	30
3.7. Experiment číslo 3.....	31
3.8. Experiment číslo 4.....	31
4. VÝSLEDKY.....	32
4.1. Výsledky experimentu číslo 1.....	33
4.2. Výsledky experimentu číslo 2.....	37
4.3. Výsledky experimentu číslo 3.....	39
4.4. Výsledky experimentu číslo 4.....	41
4.4.1. Test líhnutí larev.....	41
4.4.2. Test vývoje larev.....	42
5. DISKUZE.....	43
6. ZÁVĚR.....	47
7. ABSTRAKT.....	48
8. LITERATURA.....	51

1. ÚVOD A CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Chov ovcí má bohatou a slavnou tradici v Čechách i na Moravě. Ovce jsou jedním z druhů zvířat, která trpí nejvíce parazitárními onemocněními. Můžeme počítat, že u nás 30% všech ztrát v ovčích chovech je zaviněno těmito onemocněními (2).

Ekonomika chovu užitkových zvířat a současná efektivnost živočišné výroby v materiální základně jsou přímo závislé i na stavu a dalším rozvoji veterinárně orientované helmintologie. Ukazuje se, že skupina cizopasných červů ohrožující hospodářská zvířata způsobuje zatím největší přímé ztráty hynutím mláďat, i komplex nepřímých škod tím, že zavinuje pokles užitkovosti, biologické hodnoty potravin a snižování jakosti surovin živočišné výroby.

Zábrana infekce cizopasnými červy a ozdravování celého prostředí musí vycházet z přesného druhového určení původce infekční choroby. Dále je nutné znát způsob jeho života, případně mezihostitele, rezervoárové organismy, přenašeče, dynamiku invazního cyklu, jeho rozšíření na daném území, druhovou specifičnost (4).

Cíle mé diplomové práce byly:

- 1) získání dospělců *Haemonchus contortus* pro potřebu *in vitro* kultivací
- 2) kontrola úspěšnosti odčervení jehňat
- 3) infekce jehňat larvami *Haemonchus contortus* z vlastních kultivací a sledování produkce vajíček
- 4) testy helmintorezistence – test líhnutí larev a test vývoje larev

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. ENDOPARAZITÓZY OVCÍ

Podnebí v naší geografické oblasti a přechod od karpatského systému pastvy ovcí k systémům oplůtkovým umožňuje rozvinutí vývojových cyklů mnoha parazitů ovcí. Silné parazitární invaze nezpůsobují pouze ztráty přímé (zvýšený úhyn, nižší kvalita masa), ale i ztráty nepřímé – snížení produkce (výrazně zhoršená užitkovost), mají negativní vliv na reprodukci (výrazně snížená plodnost), způsobují zvýšenou vnímavost k ostatním onemocněním (zvýšený výskyt infekčních i neinfekčních chorob a sekundárně zvýšený úhyn). Nejpodstatnějšími parazitologickými nálezy v našich chovech jsou nálezy plicní, střevní a slézové červivosti, motolic a tasemnic (1).

2.1.1. Motoličnatost

V našich chovech ovcí se vyskytuje méně často než v minulosti. Původcem onemocnění jsou motolice *Fasciola hepatica* (obr.1), *Dicrocoelium dendriticum*, které parazitují ve žlučovodech a v játrech, a *Paramphistomum spp.*, parazitující v předžaludcích ovcí (1).

Patogenní účinek motolic je jednak v mechanickém a toxickém působení, jednak v umožnění sekundárních infekcí. Mladé motolice při svém pohybu v játrech rozrušují stěny žlučovodů. Při větších invazích ucpávají motolice žlučovody a způsobují tak městnání žluči a dilataci žlučovodů. Toxiny vylučované motolicemi působí silně hemolyticky, některé i lipolyticky, proteolyticky a glykolyticky (2).

Obr.1: Vajíčko motolice jaterní (*Fasciola hepatica*)



2.1.2. Tasemničnost

Patří mezi nejčastější a nejzávažnější helmintózy ovcí. Je to ekonomicky nejzávažnější parazitóza zjišťovaná při pastevním odchovu jehňat. Způsobují ji tasemnice rodu *Moniezia* (obr.2), jež cizopasí v tenkém střevě zvířete, dorůstají v něm až 8 cm denně a v dospělosti dosahují celkové délky až 4 m. Zralé články s vajíčky parazita odcházejí trusem a vajíčka se stávají potravou půdních roztočů čeledi *Orobatidae*, ti slouží ve vývojovém cyklu parazita jako mezihostitelé, přežívající v dané lokalitě i několik roků. K nakažení dalších ovcí dochází pozřením pastevního porostu, na který aktivně vycestovali nakažení roztoči (1).

Nemocná zvířata bez ohledu na dobrou výživu ztrácejí na váze a trpí střídavými průjmy a zácpou. Ve výkalech se nacházejí články tasemnice. Průběh onemocnění závisí na množství parazitů ve střevě (3).

Obr.2: Vajíčko tasemnice rodu *Moniezia*



2.1.3. Plicní červivost

Je to souhrnné označení pro parazitózy dýchacího ústrojí. Mají několik původců, nejčastěji z rodů *Muellerius* (Obr.3) a *Protostrongylus*, které patří mezi malé plicnivky. Jsou to malí vláskovití červi o délce až 4 cm, parazitující v průduškách plic. Mají složitý vývoj přes mezihostitele - suchozemské plže (1).

Typickým příznakem je kašel, zpočátku suchý, krátký a záchvatovitý, později vlhký s výhozem. Kašel se obvykle projevuje ve stádě při pohybu, vstávání, při vyhnání na čerstvý vzduch. Dýchání je zrychlené a namáhavé. Poslechem lze zjistit na plicích zejména vlhké šelesty, často bývá i hlenový výtok z nozder.

S postupujícím onemocněním zvířata hubnou, slábnou a během několika týdnů, příp. měsíců může dojít ke kachexii a uhynutí (4).

Obr.3: Původce plicní červivosti – rod *Muellerius*



2.1.4. Slezová a střevní červivost

Jejím původcem jsou druhy oblých červů parazitujících ve slezu (*Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta*), druhy parazitující v tenkém střevě (*Trichostrongylus vitrinus*, *T.rugatus*, *T.culumbriiformis*, *Nematodirus battus* a *N.filicollis*) a druhy parazitující v tlustém a slepém střevě ovcí (*Chabertia ovina*, *Oesophagostomum columbianum*, *Trichuris ovis* (obr.4)). Jejich délka je 1-5 cm, jsou vláskovitého nebo nitkovitého tvaru. Jejich vajíčka odcházejí trusem z těla zvířete, líhnou se z nich larvy schopné pohybu ve vnějším prostředí. Tyto larvy pak spásou další zvířata, vývoj probíhá bez mezihostitelů.

Nematodiróza je nejvýznamnější parazitózou způsobovanou střevními červy. Nejčastěji postihuje jehňata ve věku 6-10 týdnů. Vývoj na infekčním stádium larvy (L3) probíhá ve vajíčku, které je vysoce rezistentní na vysušení a k nízkým teplotám, na pastvinách proto může přežívat až 1 rok. K dalšímu vývoji je zpravidla nutná delší doba nízkých teplot, na kterou naváže období s teplotami nad 10 °C. Teplota stimuluje larvy L3 k opuštění vajíčka a nakazí jehňata, která již ztratila kolostrální imunitu získanou od bahnic. K největší vlně invazí dochází v našich podmínkách v období května a června, jsou ale běžné i u starších jehňat v období pozdního léta a podzimu.

Ke klinickým příznakům patří náhlý vznik akutního zánětu střev s profuzním průjmem, ztrátou chuti a rychlou dehydratací. Pokud se jehňata neléčí, hynou během 2-3 dnů. U jehňat, která invazi přežijí, se vyvine postinvazní imunita (1).

Obr.4: Vajíčko *Trichuris ovis*



2.2. Haemonchus contortus

Mezi nemocemi omezujícími přežití a produktivitu ovcí a koz zaujímají infekce gastrointestinálními nematody nejvyšší pozici, drtivou většinu hlavně *Haemonchus contortus*. Tento krev sající parazit je neblaze proslulý všude po světě. Je pravděpodobně jediným nematodem ovcí, který může být přesně určen bez pomoci složitých laboratorních testů. Příznaky akutní anémie jsou zřejmé, lze je poznat ze sliznic napadených zvířat (obr.5), dokonce z nich lze určovat i míru napadení parazitem. Anamnéza a další okolnosti pak silně naznačují, že se jedná o haemonchózu. *H. contortus* je považován za nejvíce patogenního parazita malých přežvýkavců. Ačkoliv se objevuje ve smíšených infekcích s ostatními nematody, jeho vajíčka vždy převažují ve fekálních znečištěních pastvin (5).

Obr.5: Stupnice zbarvení sliznic napadených sliznic



2.2.1. Systematika

Zařazení parazita *H. contortus* do taxonomie:

Říše: *Animalia*

Podříše: *Polycytotozoa*

Kmen: *Vermes*

Podkmen: *Nemathelminthes*

Třída: *Nematoda*

Podtřída: *Strongylata*

Čeď: *Trichostrongylidae*

Rod: *Haemonchus*

Druh: *H. contortus*

(6,7)

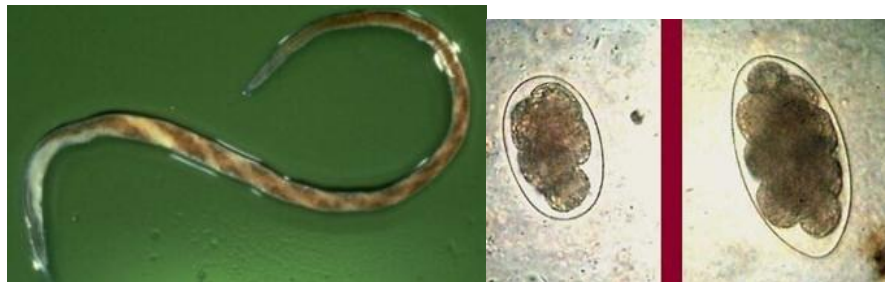
2.2.2. Morfologie

Sameček (obr.5) je 11,4-22 mm dlouhý, na obou koncích těla zúžený. Tělo má barvu červenohnědou. Průměr hlavy 30 μm . Cervikální papily jsou vzdáleny od předního konce těla 300 μm , oesophagus je kyjovitý, 1,5-1,7 mm dlouhý. Bursa copulatrix je tvořena dvěma protáhlými laloky a jedním malým lalokem dorsálním, který je položen asymetricky při levém postranním laloku. Laterální paprsky bursy jsou na své bazi spojeny. Paprsek ventroanterolaterální je od ostatních paprsků izolovaný. Dorsální paprsek je rozvětvený, každá větev na

konci opět rozdělena. Spikuly jsou 300-500 μm dlouhé, gubernaculum měří 200 x 25 μm .

Samička je 16,8-29 mm dlouhá, 487-511 μm široká. Vulva je 3-4 mm vzdálena od zadního konce těla. Anální otvor je od konce těla vzdálen 433-650 μm . Konec těla samičky je zašpičatělý. Vajíčka (obr.6) jsou oválná, někdy asymetrická kladená rozrýhovaná na 16 blastomer, v nichž prosvítají světlejší středy (2).

Obr.5: Sameček *Haemonchus contortus* Obr.6: Vajíčka *Haemonchus contortus*



2.2.3. Vývoj

Vývoj je přímý a byl důkladně prostudován Ransomem (20). Z vajíček se na vzduchu za 14-17 hodin líhne larva 406 μm dlouhá a 23,4 μm široká. Larva se 2x svléká a během 82-90 hodin po vylíhnutí se z nich stává larva invazivní. Délka celého tohoto vývoje závisí na teplotě a vlhkosti, kdy při klesající teplotě se vývoj prodlužuje. Odolnost larev vůči podmínkám vnějšího prostředí je u prvního stádia malá, u druhého roste a konečně třetí invazivní stadium je velice odolné. Podle údajů Šumakovičových vydrží tyto larvy vyschlé 1-1,5 roku. Také vůči chemickým činidlům jsou velmi odolné. Snášejí delší dobu účinky 3% kreolinu a dokonce dosti silné koncentrace lyzolu (2).

Ve slezu dospívají larvy po 18-21 dnech. Jedna samice vyloučí denně 5-6 tisíc vajíček. Ve slezu žijí dospělí červi 3-6 měsíců (4).

Na pastvině se invazivní larvy rozlézají nejen horizontálně, ale vykonávají i migraci vertikální, jak zjistila řada autorů (např. Rogers - (21)). Intenzivnost vertikální migrace larev ovlivňují 3 hlavní faktory: teplota, vlhkost a intenzita

světla. Ve velké většině případů je na vrcholcích stébel a listů trav největší počet larev v časném ránu (za rosy), večer a v noci. Přes den je počet vertikálně migrujících larev nepatrný. Doba ranního maxima počtu larev na vrcholcích listů trav se v době od jara do léta posunuje postupně do časnějších ranních hodin, doba večerního maxima se progresivně zpožďuje. Zvrat opačným směrem nastává v druhé polovině roku. Teplota, tedy její maximum a minimum, ve vlivu na vysokou vlhkost prostředí, inhibují vertikální migraci larev (2) .

2.2.4. Přenos

Hostitelské zvíře se nakazí pozřením larev vylezlých na vrcholky stébel a listů trav. Ve slezu se larvy přichycují na stěně a dospívají během 14-21 dní (2).

Po polknutí se larvy zavrtávají do sliznice slezu, odkud se po několika dnech vracejí na povrch sliznice a dospívají (8).

2.2.5. Patogenita

Parazité způsobují změny na žaludeční sliznici, což vede ke špatné funkci zažívacích orgánů a vyvolávají také četné hemoragie. Zvíře nemá dostatek výživných látek, navíc tím, že parazité vysávají krev, kterou se živí, dochází k progresivní postupující anémii. Pronikání toxinů z parazitů do organismu nemocných zvířat působí pomalou otravu. Toxiny, vylučovanémi červy, je často poškozováno srdce.

Nemocná zvířata ztrácí odolnost vůči všem tělesným zatížením, ubývají na váze a špatně se přebarvují. Sliznice jsou nápadně chudokrevné. Zvířata trpí průjmy, mají značně znečištěnou řitní krajinu, srst bez lesku. Při silném napadení mají otoky v krajině břišní a na hlavě. Straní se ostatních, vždy stojí s vyklenutým hřbetem stranou. Při zimním nedostatku potravy a vysokém stavu sněhu se přidružují další, bakteriální infekce a snižuje se i odolnost proti jiným

parazitům, dochází k úhynu. Trpí zvláště jehňata, u nichž při silnějších invazích dochází až ke 100% uhynutí (2,8)

2.2.6. Diagnóza

Diagnóza se provádí koprologicky, flotačními metodami. Vajíčka *H. contortus* jsou většinou oválného nebo elipčitého tvaru s jedním koncem více zašpičatělým. Rozrýhovaná do 8-16 tmavých blastomer, jejichž střed jasně prosvítá. Velikost vajíček 68-90 x 40-50 μm . Při pitvě čerstvého kadaveru nacházíme dospělé mezi řasami slezu, přisáté na sliznici. U starších kadaverů se velmi brzo rozpadají. Slizniční hlen má obvykle čokoládovou barvu (4).

Přesnější popis diagnostických metod je uveden v experimentální části.

2.2.7. Léčba

Léčiva s účinkem proti původcům nematodóz jsou v současnosti řazena do skupin makrocyclických laktonů, benzimidazolů a imidazothiazolů. Antinematoda jsou zvířatům podávána individuálně i hromadně, léčivé přípravky náleží do kategorií veterinárních přípravků a premixů pro medikovaná krmiva (22).

2.2.7.1. Makrocyclické laktony

Makrocyclické laktony jsou léčiva biosyntetického původu s antinematodní a antiectoparazitární účinností. Původně tradovaný mechanismus účinku, který byl spojován výhradně s ovlivněním GABA neurotransmise na nervových vláknech parazitů, byl novějšími studii opraven v tom smyslu, že nejvýznamnější roli na receptorech ovládajících chloridové kanály hraje glutamát. Funkčnost tohoto neurotransmiteru makrocyclické laktony žádoucím směrem pozměňují.

Ivermektin je historicky prvním léčivem avermektinové skupiny, i v současnosti stále patří mezi nejvýznamnější makrocyclické laktony a zároveň i veterinární léčiva. Působí proti vývojovým i dospělým stádiím hlístic a jednotlivá terapeutická dávka pro injekční a enterální podání je 0,2 – 0,3 mg/kg ž.hm. Mezi veterinární přípravky patří např. Biomectin 1% inj., Ecomectin 1% inj. nebo Ivomec 1% inj. (22, 23).

2.2.7.2. Benzimidazoly

Skupina benzimidazolových anthelmintik je nyní nejrozsáhlejší skupinou antinematod odvozenou od jediné chemické struktury. Část benzimidazolů patří k anthelmintikům s vůbec nejširším spektrem účinku. Mechanismus účinku je založen na inhibici β -tubulinových subjednotek nezbytných pro tvorbu mikrotubulů v buňkách parazitů. Jejich narušená tvorba se návazně projeví žádoucím poškozením funkčnosti celé parazitární buňky.

Albendazol má v druhové indikaci ovce, jeho rozpětí terapeutických dávek je 5,0 – 10,0 mg/kg ž.hm. Mezi používané veterinární přípravky se řadí např. Albex 10% sol.

Další používanou látkou z této skupiny je fenbendazol, který se podává v dávce 5,0 mg/kg ž.hm. K veterinárním přípravkům podávaným ovčím patří např. Fenbion 2,5% plv., Panacur 2,5% susp. (22, 23).

2.2.7.3. Imidazothiazoly

Imidazothiazoly je dlouhodobě užívaná skupina anthelmintik, která má výhradně antinematodní účinky. Jsou účinné proti dospělým i vývojovým stádiím nematod, ovocidní účinky však nemají.

Levamisol je levotočivá forma původně terapeuticky užívaného racemátu tetramisolu. Používá se v jednotlivé terapeutické dávce 5,0 – 25,0 mg/kg ž.hm. (22, 23).

2.2.8. Prevence

Z hlediska prevence je důležité zamezit zamoření pastvin a odčervovat stáda před pastvou. Přes zimu většina trichostrongylidů hyne. Po 3-5 týdnech pastvy je nutné ovce, především jehňata vyšetřit a případně léčit. Druhá dehelmintizace se provádí koncem pastevního období od září do listopadu. Doporučuje se střídání pastvin a návrat ovcí na pastviny až po 5 měsících. Mladá zvířata by se měla pást na oddělených pastvinách. Dále je doporučeno nepást v ranních hodinách, kdy je rosa. Mezi další preventivní opatření patří meliorace a kvalitní výživa zvířat (9).

2.3. Helmintorezistence

Všeobecně řečeno rezistence je definována jako snížení účinnosti anthelmintika u populace parazitů, která byla původně citlivá na toto léčivo. Rezistence je geneticky podmíněná. Tato definice upozorňuje na dvě úskalí v oblasti helmintorezistence. Zaprvé se předpokládá, že citlivost původní populace k anthelmintiku je známa, ale často tomu tak není. Snížená citlivost k léčivu kvůli rezistenci musí být rozlišována podle různých vnitřních faktorů jako např. různý stupeň vývojového cyklu parazita, odlišné pohlaví, stejný druh parazita v různém hostitelském zvířeti nebo odlišný druh parazita. Za druhé se požaduje, aby rezistence byla výsledkem selekce na genetické úrovni, nicméně genetické základy helmintorezistence jsou stále málo prozkoumány (10).

2.3.1. Historie

Prvním parazitem, u kterého se zjistil výskyt rezistence byl zástupce nematodů *H. contortus* parazitující ve slézu malých přežvýkavců a to na následující skupiny anthelmintik: fenothiazin, benzimidazoly, pro-benzimidazoly, imidazothiazoly, salicylanilidy a makrocyclické laktony. Rezistence na fenothiazin byla poprvé zaznamenána v USA asi po dvaceti letech od začátku aplikace tohoto

anthelmintika. Rezistence k tiabendazolu, jako zástupci skupiny benzimidazolů, byla poprvé zjištěna v roce 1961 v USA (11).

2.3.2. Prevalence

Stupeň naléhavosti studia helmintorezistence vychází z různého geografického původu podle toho, které klima převažuje. Dále záleží na druhu parazitů a režimu léčby schválené v dané oblasti. Ačkoliv se rezistence obecně pomaleji vyvíjí v mírném klimatickém pásu na severní polokouli, přesto prevalence roste i v Evropě a zbytku světa (12).

Rezistence se stala kosmopolitním veterinárním a chovatelským problémem, který se týká hlavně malých přežvýkavců. Problematika je nejaktuálnější v Austrálii, na Novém Zélandě, v JAR, Velké Británii, ale i jiných evropských zemích jako Francie, Holandsko, Dánsko, nebo některých státech Asie a na obou amerických kontinentech. Problém je velmi vážný, podrobné výsledky z různých míst světa ukazují, že v každé zemi, kde byl průzkum uskutečněný, zjistili rezistentní kmeny gastrointestinálních nematodů (13).

Odhaduje se, že v Austrálii se rezistence na benzimidazolová anthelmintika u nematodů ovcí v současnosti vyskytuje až na 90 % farem. Podobně vysoké rozšíření, až 60 %, se uvádí i při rezistenci na další skupinu anthelmintik, imidazothiazoly. Nejnižší úroveň výskytu, okolo 15 % farem, je odhadována při anthelmintikách skupiny makrocyclických laktonů (14).

2.3.3. Mechanismus rezistence

Helmintorezistence může vzniknout díky několika mechanismům, např. změna v cílových buňkách, takže je léčivo už nikdy více nerozpozná a díky tomu je neúčinné; změna v metabolismu tak, že dojde k inaktivaci nebo odstranění léčiva, a tak se předchází jeho aktivaci; změna v distribuci léčiva do cílového organismu,

takže se zabrání přístupu léčiva do místa působení; zesílení cílových genů k překonání účinku léčiva.

Benzimidazoly působí přes inhibici polymerizace tubulinu, který je nutný k budování mikrotubulů. Je tedy jasné, že rezistence souvisí s mutacemi na β -tubulinových genech, které zabraňují navázání léčiva. Avšak několik různých polymorfismů β -tubulinových genů korelují s benzimidazolovou rezistencí. První popsáný polymorfismus byl velmi dobře známý Phe-Tyr polymorfismus na kodonu 200 β -tubulinového izotypu 1.

Levamisol je nejvíce používané cholinergní anthelmintikum působící jako agonista na nikotinových acetylcholinových receptorech na neuromuskulární ploténce parazita a způsobující jeho spastickou paralýzu. Rezistence nematodů na levamisol je také rezistencí na ostatní nikotinové agonisty jako např. morantel a pyrantel.

Makrocyclické laktony působí na iontové kanály, převážně na glutamátové a GABAergní chloridové kanály. Tyto receptory regulují v nematodech lokomoci, příjem potravy a reprodukci. Mezi makrocyclickými laktony existuje zkřížená rezistence, takže parazité rezistentní např. na ivermektin, jsou obecně rezistentní i na ostatní makrocyclické laktony. Některé genetické studie s populací *H. contortus* našly souvislost mezi P-glykoproteiny a rezistencí na makrocyclické laktony (15).

2.3.4. Detekce rezistence

Rostoucí počet případů helmintorezistence si vynutil vytvořit jednoznačné a standardizované detekční metody. Některé metody mají své nevýhody, např. vysoké náklady, použitelnost a interpretaci nebo opakovatelnost výsledků. Nejvíce používaná metoda k detekci a monitorování přítomnosti helmintorezistence u nematodů je test redukce počtu vajíček v trusu (Faecal egg count reduction test = FECRT), který je vhodný pro všechny typy anthelmintik a patří mezi *in vivo* testy. *In vitro* testy, které měří účinek anthelmintika při vývoji, růstu nebo pohybu různých stádií parazita, byly vyvinuty jako alternativní

metody. Tyto testy jsou užitečné pro výzkum, ale nelze je aplikovat v místech, kde jsou populace parazitů nejednotné (12).

Testy detekce helmintorezistence můžeme tedy rozdělit na *in vivo* testy a *in vitro* testy. Obecně jsou *in vivo* testy náročnější finančně, časově a mají nižší prokazatelnost výsledků.

2.3.4.1. *In vivo* testy

Nejpoužívanější *in vivo* metodou je test redukce počtu vajíček v trusu (FECRT). Při této metodě se porovnává EPG (= počet vajíček v 1 gramu trusu) v den aplikace a o 10 - 14 dní později. Testovaná populace nematodů je rezistentní, pokud je redukce EPG při vyšetření nižší než 95 %.

Kritický anthelmintický test je založen na sběru trusu od zvířat nejméně 4 dny po anthelmintické léčbě. Vylučování červi jsou pak objeveni a jejich počet spočítán. Zvířata jsou poražena, zjistí se zbylý počet červů a spočítá se procentuální účinnost odečtením počtu vyloučených červů a vynásobením stem.

Test řízené anthelmintické účinnosti porovnává po léčbě počet parazitů u zvířat, která byla infikována citlivým nebo rezistentním kmenem nematodů. Tato metoda je považována za spolehlivou a používá se k ověření výsledků z FECRT. Avšak je to jeden z nejdražších testů díky laboratornímu vybavení a použití zvířat. Rezistence je prokázána, jestliže je pokles průměru počtu červů nižší než 90% nebo jestliže léčbu přežije více než 1000 červů (12, 16).

2.3.4.1. *In vitro* testy

Z *in vitro* testů je nejrozšířenější metodou test líhnutí larev (Egg hatch test = EHT). Používá se převážně pro zjištění benzimidazolové rezistence. Je založen na ovocidní vlastnosti benzimidazolových anthelmintik a schopnosti vajíček rezistentních populací tvořit embrya a líhnout se ve vyšší koncentraci anthelmintika benzimidazolové řady než je to u citlivých populací nematodů.

Test vývinu larev (Larval development test) je metoda založená na schopnosti larev nematodů přežít a vyvíjet se v prostředí s různou koncentrací

anthelmintika. Tento test se používá pro spolehlivou detekci benzimidazolové a levamisolové rezistence. Vajíčka nematodů nebo L₁ larvy jsou vystaveny různé koncentraci anthelmintika v agaru na mikrotitrační destičce obsahující i výživné medium. Účinek léčiva je pak měřen podle přeměny na L₃ larvy. Výsledky velmi dobře korelují s výsledky *in vivo* testů. Tento test je citlivější než FECRT a EHT.

Test larvální paralýzy (Larval paralysis test) byl prvním testem vyvinutým na detekci levamisolové rezistence. Princip testu spočívá v určení procenta paralyzovaných L₃ larev poté, co jsou larvy nematodů inkubované v různých koncentracích anthelmintika po 24 hodin.

Test založený na motilitě larev je migračně-inhibiční test (Adult migration inhibition test). Při tomto testu infekční larvy, které jsou vystavené účinku anthelmintika, volně migrují přes síta z jedné komůrky do druhé. Tato metoda se využívá pro detekci ivermektin rezistentních kmenů (12,16).

2.3.5. Opatření proti rezistenci

Jednou z možností potlačení vývoje rezistentních kmenů nematodů je požívat kombinace anthelmintik, avšak nyní existují důkazy, že rezistence se vyvinula i vůči těmto kombinacím. Další možností je vývoj nových chemicky odlišných skupin anthelmintik a nových způsobů aplikace, např. pomalé uvolňování účinné látky v místě působení.

Rezistence je problém. Výzvou není jenom porozumět jí a spočítat ji, ale hlavně proti ní bojovat. Prioritou výzkumu stále zůstává zlepšení monitorování rezistence, stanovení a aplikace metod, jak zpomalit rozvoj rezistence. Dále je nutné studovat podstaty rezistence (17).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Místo a časové rozložení experimentů

Celkem byly provedeny 4 samostatné experimenty. V listopadu 2006 byla infikována jehňata s cílem získat dospělce *H. contortus* pro potřebu *in vitro* kultivací. Tento experiment byl ukončen na jaře 2007. Druhý experiment proběhnul v listopadu až prosinci 2006 a byl předpokusem pro velkou studii, která je zpracována v diplomové práci Veroniky Příhodové. Třetí experiment probíhal v období prosinec 2007 - únor 2008. V této době byla jehňata infikována larvami z vlastní kultivace získané ve druhém experimentu. Poslední experiment proběhl na Parazitologickém institutu SAV v Košicích, kde byla zjišťována helmintorezistence na vzorcích přivezených z České republiky.

Experimenty byly prováděny na jehňatech na farmách Skochovice a Lužec nad Cidlinou, patřících firmě ZEM, a.s. Nový Bydžov. Zvířata byla chována ve stájích, v letních obdobích byl pak zajištěn pastevní odchov.

Všechna zvířata byla vedena v centrální evidenci, jejich jednoznačná identifikace byla zajištěna pomocí ušních značek s číselným kódem (centrální evidenční číslo zvířete).

Všechny čtyři experimenty byly součástí grantového projektu 160/53/65301 - Biotransformační enzymy hostitele a parazita - význam pro terapii parazitóz a helmintorezistenci u přežvýkavců (řešitel: Doc. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.)

3.2. Plemena ovcí použitých v experimentu

V experimentu byla použita převážně jehňata plemene Merinolandschaft a v malém rozsahu romanovské plemeno.

3.2.1. Plemeno Merinolandschaft

Plemeno bylo vyšlechtěno v Německu křížením místních jemnovlnných ovcí s plemenem zaupel (do roku 1950 známá jako württemberská). Plemeno

merinolandschaft bylo uznáno v polovině 20. stol., v minulosti se podílelo na vzniku mnoha plemen.

Je rané, velkého tělesného rámce, s kombinovanou užitkovostí, chodivé, vlna bílá, sortiment AB-B (23-27 μm). Rouno je polouzavřené, hlava středně dlouhá a ne příliš široká. Uši jsou dlouhé, široké a mírně svíslé, na čele typická vlněná šesulka. Hrudník je hluboký a přiměřeně široký, hřbet dlouhý, středně široký, přechází v mírně sraženou zád'. Končetiny jsou ve srovnání s merinem delší, spěnkové klouby pevné, paznehty středně tvrdé. Vnější a vnitřní kýta je průměrně osvalená. Obě pohlaví jsou bezrohá.

Zvláštností je asezonnost říje (téměř celoroční plodné období). Jehnice lze při dobrém odchovu zapouštět již v 10 měsících věku. Předností plemene je nízký výskyt tuku v jatečních trupech vykrmovaných jehňat. Bahnice se vyznačují velmi dobrými mateřskými vlastnostmi a mléčnou užitkovostí. Živá hmotnost bahnic je 65-75 kg, beranů 90-120 kg. Ovce jsou vhodné jak pro oplůtkový, tak pro jiné způsoby pastvy (1).

3.2.2. Plemeno romanovské

Vyšlechtěno bylo v 17. stol. v Rusku. Patří do skupiny kožichových krátkoocasých plemen ovcí. Zvířata jsou menšího až středního tělesného rámce, jemné kostry. Hlava je černá, s charakteristickou bílou lysinou, u beranů mírně klabonosá, u obou pohlaví bezrohá. Jehňata se rodí černá. Hříva u beranů je dominantním znakem pohlaví a vyskytuje se na spodní části krku.

Vlna sortimentu C-DE (29-55 μm), smíšená, polohrubovlnná, tvoří na celém povrchu těla prstenčité závitky. Dospělé ovce se zpravidla stříhají 2x ročně. K biologickým přednostem patří ranost, vysoká plodnost, pevná konstituce, asezonnost říje. Jehničky a beránci pohlavně dospívají již v 5-6 měsících věku, jehnice lze poprvé zapouštět v 7-8 měsících věku. Živá hmotnost bahnic v dospělosti je 40-50 kg, beranů 60-80 kg (1).

3.3. Sběr vzorků

V experimentech byly použity vzorky trusu a krve. Trus byl odebírán rektálně, dán do igelitových pytlíků řádně označených číslem ušní známky a datem sběru. Poté byl vzorek dán do chladu a odvezen k vyšetření, popřípadě zamražen. Krev byla odebírána z krční žíly a ve zkumavkách v chladu převezena k dalšímu zpracování.

3.4. Metodika parazitologického vyšetření

3.4.1. Kvantitativní ovoskopická metoda

V experimentech byla použita kvantitativní ovoskopická metoda pro stanovení počtu vajíček gastroenterohelmintů (Gordon-Whilockova) v modifikaci podle Chrousta. Ke kvantitativnímu stanovení vajíček je potřeba ovoskopická počítací komůrka (Gordon-Whilockova). Komůrka se skládá z podložní skleněné desky o rozměrech 7,5 x 2,6 cm. Horní plocha je rozdělena 3 skleněnými destičkami přesně 1,5 mm vysokými na dvě stejně velká políčka. Postranní skleněné destičky jsou 1,5 cm široké, střední 4 mm široká. Přes ně je položena skleněná destička o rozměrech 7,5 x 1,7 cm, na jejíž spodní ploše jsou vyryty dvě počítací sítky o ploše 1 cm², rozdělené příčnými rýhami na 6 stejných dílů.

Byly naváženy 2 g trusu, který se důkladně rozetřel ve třecí misce s 20 ml nasyceného roztoku NaCl. Poté se suspenze přefiltrovala přes silonové síto do odměrného válce o obsahu 100 ml. Obsah se doplnil nasyceným roztokem NaCl na celkový objem 60 ml. Přidaly se 2 kapky amylalkoholu a obsah se důkladně promíchal (pročeřil pipetou). Z promíchaného obsahu (asi z 1/3 až 1/2 výšky válce) se odebrala pipetou část suspenze samovztlakem. Po naplnění se nechala komůrka 2-3 minuty stát. Pod mikroskopem se spočítala zleva doprava všechna vajíčka v prostoru omezeném počítacími mřížkami.

Každé nalezené vajíčko znamenalo 50 vajíček v 1 g trusu. Průměrný počet vajíček v jedné komůrce x 200 udává počet vajíček v 1 g trusu (18).

3.4.2. Kvalitativní ovoskopická metoda

V experimentech byla použita kvalitativní metoda vyšetření trusu na přítomnost vajíček dle Fullerborna využívající flotaci vajíček.

2 g trusu byly rozetřeny v třecí misce s přiměřeným množstvím flotačního roztoku chloridu zinečnatého. Vzniklá suspenze se přefiltrovala přes sítko do 100 ml kádinky a doplnili jsme roztokem chloridu zinečnatého po okraj. Kádinka s obsahem se nechala několik minut ustát a poté se na hladinu za pomoci pinzety položilo krycí sklíčko. Po 20 minutách se krycí sklíčko opatrně vyjmulo, přiložilo na na podložní sklíčko a prohlédli pod mikroskopem (19).

3.4.3. Metody zjištění helmintorezistence

3.4.3.1. Test líhnutí larev

V experimentu byl použit test líhnutí larev (= Egg hatch test), kterým se zjišťovala rezistence na benzimidazolová anthelmintika.

Přibližně 85 g trusu bylo zhomogenizováno s 200 ml vody. Poté byla směs prolita skrz síto (0,15 mm) a filtrát byl sebrán do zkumavek. Zkumavky byly poté dány do centrifugy na 2 min. na 1500 otáček. Opatrně jsme slili supernatant. K sedimentu jsme do zkumavek přidali nasycený roztok chloridu sodného, zavřeli zkumavky víčky a dali opět centrifugovat na 2 min. na 1500 otáček. Sejmuli jsme víčko, na které vyflotovali vajíčka a omyli ho deionizovanou vodou do kádinky. Obsah kádinky jsme kvantitativně přenesli do další zkumavky, kterou jsme doplnili po okraj vodou a dali do centrifugy na 2 min. na 1500 otáček.

Na mikrotitrační destičky jsme nanесли 1,99 ml vody s vajíčky ze zkumavky, přidali 10 μ l tiabendazolu ve finálních koncentracích (0,05; 0,1; 0,2; 0,3 a 0,5 mg/ml) a promíchali. Inkubovali jsme 48 hodin při 25 °C.

Po dvou dnech jsme přidali do každé jamky kapku Lugolova roztoku kvůli usmrcení larev a pod mikroskopem jsme spočítali zbylá vajíčka a vyvinuté larvy ve všech jamkách.

3.4.3.2. Test vývinu larev

Další metodou zjištění helmintorezistence byl test vývinu larev (= Larval development test).

100 g trusu jsme zhomogenizovali s malým množstvím vody. Směs jsme postupně promyli vodou přes 3 síta (250, 100, 25 μm). Vajíčka zůstala zachycena na sítu o velikosti 25 μm . Z tohoto síta jsme je spláchli vodou do kádinky. Filtrát jsme slili do zkumavek a provedli centrifugaci (2 min., 1500 otáček). Opatrně jsme slili supernatant a k sedimentu jsme přidali nasycený roztok chloridu sodného. Zavíčkované zkumavky jsme recentrifugovali 2 min. při 1500 otáčkách. Vajíčka zachycená na víčkách jsme smyli do zkumavky a promyli vodou přes síto (25 μm), abychom odstranili zbytky chloridu sodného. K suspenzi vajíček jsme přidali amfotericin B jako prevenci proti růstu plísní (10 μl na 1 ml suspenze vajíček).

Dvojkovým ředěním jsme si připravili koncentrace tiabendazolu (40 μl), který jsme rozpustili ve 40 μl DMSO. Vzniklo nám tak 12 koncentrací od 0,0006 do 1,28 $\mu\text{g/ml}$.

Na mikrotitrační 96jamkovou destičku jsme nanесли 10 μl anhelmintika v příslušné koncentraci, 110 μl deionizované vody, 20 μl kvasnicového extraktu a 10 μl suspenze vajíček. Takto jsme postupně vytvořili 2 řady pro každé anthelmintikum a jednu řadu kontroly. Nechali jsme inkubovat 7 dní při 26 - 27⁰C.

Za týden jsme přidali do každé jamky 10 μl Lugolova roztoku a pod mikroskopem jsme spočítali vajíčka, L₁, L₂ a L₃ larvy.

3.5. Experiment číslo 1

Dne 14.11.2006 byl zahájen experiment číslo 1. V tomto experimentu byli použiti 3 beránci, kteří byli chováni pastevním odchovem a během experimenti drženi ve stáji. Jednalo se o :

- číslo ušní známky 19103 – datum narození 1.3.2006, plemeno romanovská ovce, živá hmotnost 39,0 kg
- číslo ušní známky 19117 – datum narození 9.7.2006, plemeno merinolandschaft, živá hmotnost 33,0 kg
- číslo ušní známky 19118 – datum narození 9.7.2006, plemeno merinolandschaft, živá hmotnost 30,0 kg

Tato 3 zvířata byla dne 14. 11. 2006 subkutánně odčervena přípravkem Ivomec inj. s.c. (číslo šarže a expirace nebyly evidovány). Zvířeti s číslem ušní známky 19103 byla podána dávka 0,5 ml, zvířatům s čísly ušní známky 10117 a 19118 pak každému 0,4 ml.

Poté byl rektálně odebrán trus ve dnech 14.11., 15.11., 16.11., 17.11., 20.11. a 24.11.2006, který byl vyšetřen kvalitativní i kvantitativní metodou. Přestože cílem kvalitativní metody není zjištění počtu prokázaných infekčních stádií parazitů, jsou ve výsledkové části uváděny přibližné kvantitativní hodnoty, které sloužily jen pro interní potřebu pracoviště, kde byla diplomová práce zpracovávána.

Dne 29.11.2006 byla všem třem zvířatům podána suspenze Vermitan 20% gr., číslo šarže 7610L1, exp. 10/2008. Z 11,25 g Vermitanu bylo připraveno 100 ml suspenze. Aktuální hmotnost zvířat byla u zvířete s ušní známkou č. 19103 40,0 kg, s č.19117 31,0 kg, s č.19118 27,0 kg. Suspenze byla podána perorálně jednotlivým zvířatům v dávkách 26,5 ml (č.19103), 21,3 ml (č.19117) a 19 ml (č.19118). Trus byl odebrán rektálně ve dnech 29.11., 30.11., 1.12., 2.12., 3.12., 5.12., 8.12., 13.12., 15.12., 20.12., 26.12. a 29.12.2006. Poté byla provedena kvalitativní a kvantitativní vyšetření dle popsané metodiky.

Dne 4. 1. 2007 byli všichni tři beránci infikováni přibližně 10 000 L₃ larvami *H. contortus* dovezenými v říjnu 2006 z Parazitologického institutu SAV z Košic. Byly prováděny pravidelné rektální odběry trusu ve dnech 26.1., 1.2., 9.2., 12.2., 16.2., 20.2., 22.2., 27.2., 2.3., 5.3.2007. Zvířata s číslem ušní známky 19117 a 19118 byla vyřazena dne 5.3.2007. Zvíře s číslem ušní známky 19103 byl ještě odebrán trus ve dnech 14.3. a 17.3.2007 a vyřazení bylo provedeno dne 12.4.2007.

3.6. Experiment číslo 2

Tento experiment byl zahájen 29. 11. 2006. Cílem bylo odčervit vybraná zvířata, která byla přivedena z pastvy. Tato zvířata byla později použita jako jedna ze skupin v experimentu popsáném v diplomové práci Veroniky Příhodové.

Bylo vybráno 5 zvířat, samců, plemene Merinolandschaft:

-číslo ušní známky 19121 - datum narození 27.8.2006, živá hmotnost 24,0 kg

-číslo ušní známky 19122 - datum narození 27.8.2006, živá hmotnost 32,0 kg

-číslo ušní známky 19123 - datum narození 28.8.2006, živá hmotnost 32,0 kg

-číslo ušní známky 19125 - datum narození 2.9.2006, živá hmotnost 34,0 kg

-číslo ušní známky 19126 - datum narození 3.9.2006, živá hmotnost 31,0 kg

Na základě vyšetření MVDr. Varadym, DrSc. byla prokázána helmintorezistence a bylo doporučeno odčervit zvířata ivermektinem 1,2 násobkem běžného dávkování. Dne 29.11.2006 byl zvířatům podán subkutánně 1% roztok přípravku Ivomec, v dávkování 0,6 ml/25 kg ž. hm., tedy :

-číslo ušní známky 19121 – 0,58 ml

-číslo ušní známky 19122 – 0,77 ml

-číslo ušní známky 19123 – 0,77 ml

-číslo ušní známky 19125 – 0,82 ml

-číslo ušní známky 19126 – 0,74 ml

Ve dnech 29.11., 8.12. a 13.12.2006 byl zvířatům rektálně odebrán trus, který byl kvalitativně vyšetřen. Protože byla zjištěna přítomnost parazitů, dne 15.12.2006 byla podána perorálně suspenze Vermitan 20% granulát, č.š. 7610L1, exp. 10/2008, suspenze byla vytvořena z 11,25 g Vermitanu ve 100 ml objemu.

-číslo ušní známky 19121 – 16,0 ml

-číslo ušní známky 19122 – 21,3 ml

-číslo ušní známky 19123 – 21,3 ml

-číslo ušní známky 19125 – 22,6 ml

-číslo ušní známky 19126 – 20,5 ml

Poté byl ve dnech 15.12., 18.12., 20.12., 22.12., 26.12., 29.12.2006 odebrán rektálně trus a kvalitativně vyšetřen.

3.7. Experiment číslo 3

Třetí experiment byl zahájen v prosinci 2007. Byla použita dvě jehničky plemene merinolandschaft, číslo ušní známky 28946 (datum narození 7.7.2007) a 28947 (datum narození 10.7.2007). Zvířatům byla dne 19.12.2007 perorálně podána infikující dávka obsahující přibližně 9,5 tisíce L₃ larev *H. contortus*, šarže č.2, získána z vlastní kultivace z května 2007.

Rektálně byl odebrán trus, dále byla odebrána krev z krční žíly ve dnech 21.1., 24.1., 27.1., 30.1., 1.2., 4.2., 7.2., 11.2., 21.2. a 25.2.2008. Trus byl vyšetřen kvantitativně a v krvi byl zjištěn hematokrit.

Experiment byl ukončen 24. 2. 2008 vyřazením zvířat.

3.8. Experiment číslo 4

Poslední experiment proběhl v únoru 2008. Na farmě Lužec nad Cidlinou byl dne 22.2.2008 sebrán směsný vzorek číslo 1 trusu z podestýlky od beránků. Téhož dne se na farmě Skochovice získal směsný vzorek číslo 2 sebraný z podestýlky pod bahnicemi. Zvířata byla odčervena 17.1.2008.

Vzorky byly poté dopraveny do Košic na Parazitologický institut SAV, kde byly provedeny testy helmintorezistence – test líhnutí larev (Egg hatch test) a test vývoje larev (Larval development test).

4. VÝSLEDKY

4.1. Výsledky experimentu číslo 1

Zvířata byla odčervena dne 14.11.2006 ivermektinem (Ivomec 1% inj.). V následujících dnech byl proveden rektální sběr trusu a v návaznosti kvalitativní ovoskopické vyšetření (viz Tab.1). U zvířat byla nalezena vajíčka rodu *Ostertagia*, *Trichuris*, *Nematodirus* a *Moniezia*.

I desátý den po léčbě byla nalezena vajíčka těchto parazitů, proto bylo přistoupeno dne 29.11.2006 k léčbě albendazolem (Vermidan 20% gr.). Den po aplikaci tohoto anthelmintika byly vzorky zvířat s číslem ušní známky 19103 a 19118 bez nálezu, u zvířete s číslem ušní známky 19117 byl nalezen rod *Ostertagia* a *Trichuris*. Při kvalitativní kontrole 1.12.2006, tedy dva dny po léčbě, už ale i toto zvíře bylo bez nálezu.

Dne 4.1.2007 byla zvířata infikována larvami *H. contortus*. Od 26.1.2007 byl prováděn rektální odběr trusu, který byl podroben kvantitativní ovoskopické analýze (viz Tab.2). U zvířat s číslem ušní známky 19117 a 19118 začaly larvy produkovat vajíčka od 28. dne od infekce u zvířete s číslem ušní známky byla vajíčka produkována od 30. dne od infekce. Zpočátku byl nález vajíček ojedinělý, ale postupně rostl. Nejmasivnější výskyt vajíček byl u zvířete s ušním číslem 19118, a to 3083 vajíček v 1 g trusu dne 5.3.2007 (60. den po infestaci).

Tab.1: Výsledky kvalitativních parazitologických vyšetření – experiment č.1

Centrální evidenční číslo zvířete	Léčivo	Datum ošetření zvířete	Den vyšetření (počet dní po aplikaci léčiva) /parazitologický nález											
			14.11.	15.11.	16.11.	17.11.	20.11.	24.11.						
19103	IVM	14.11.06	14.11. (0.) / Os,Tr.	15.11. (1.) / Os	16.11. (2.) / b.n.	17.11. (3.) / Os.	20.11. (6.) / Os.	24.11. (10.) / Os.						
	ABZ	29.11.06	29.11. (0.) / Os, Tr.	30.11. (1.) / b.n.	1.12. (2.) / b.n.	2.12. (3.) / b.n.	3.12. (4.) / b.n.	5.12. (6.) / b.n.	8.12. (9.) / b.n.	13.12.(1 4.) / b.n.	15.12. (16.) / b.n.	20.12. (21.) / b.n.	26.12. (27.) / b.n.	29.12. (30.) / b.n.
19117	IVM	14.11.06	14.11. (0.) / Os.,Mo.	15.11. (1.) /Os,Tr.M.	16.11. (2.) / Os.Mo.	17.11. (3.) /Os.,M.	20.11. (6.) Os.,Mo	24.11. (10.) /Os.,Mo						
	ABZ	29.11.06	29.11. (0.) / Os.	30.11. (1.) / Os.,Tr.	1.12. (2.) / b.n.	2.12. (3.) / b.n.	3.12. (4.) / b.n.	5.12. (6.) / b.n.	8.12. (9.) / b.n.	13.12. (14.) / b.n.	15.12. (16.) / b.n.	20.12. (21.) / b.n.	26.12. (27.) / b.n.	29.12. (30.) / b.n.
19118	IVM	14.11.06	14.11. (0.) /Os,Tr.,Ne	15.11. (1.) / Os.	16.11. (2.) / Os.	17.11. (3.) / Os.	20.11. (6.) / Mo.	24.11. (10.) /Os.Mo.						
	ABZ	29.11.06	29.11. (0.) / b.n.	30.11. (1.) / b.n.	1.12. (2.) / b.n.	2.12. (3.) / b.n.	3.12. (4.) / b.n.	5.12. (6.) / b.n.	8.12. (9.) / b.n.	13.12. (14.) / b.n.	15.12. (16.) / b.n.	20.12. (21.) / b.n.	26.12. (27.) / b.n.	29.12. (30.) / b.n.

Os. – rod *Ostertagia*, Tr.- rod *Trichuris*, Mo.- rod *Moniezia*, Ne.- rod *Nematodirus*

b.n. – bez nálezu

IVM – ivermektin (Ivomec 1% inj.)

ABZ – albendazol (Vermidan 20% gr.)

Tab.2: Výsledky kvantitativních a kvalitativních parazitologických vyšetření (počet vajíček v 1 g trusu, EPG) – experiment č.1

Den vyšetření (počet dní po aplikaci léčiva)	Centrální evidenční známka zvířete	Typ vyšetření				
		Kvalitativní vyšetření	Kvantitativní vyšetření			
			průměr			
26.1.2007	19103	b.n.				
	19117	b.n.				
	19118	b.n.				
1.2.2007	19103	b.n.				
	19117	<i>Haemonchus</i> (ojediněle)	400	600	1000	667
	19118	<i>Haemonchus</i> (ojediněle)	200	0	0	67
9.2.2007	19103	b.n.				
	19117	<i>Haemonchus</i> (ojediněle)	600	400	400	467
	19118	<i>Haemonchus</i> (ojediněle)	400	0	200	200
12.2.2007	19103	<i>Haemonchus</i> (2)	400	200	200	267
	19117	<i>Haemonchus</i> (silnější nález)	2400	2000	2200	2200
	19118	<i>Haemonchus</i> (ojediněle),	400	600	400	467
16.2.2007	19103	<i>Trichuris</i> (1)	600	400	600	533
	19117	<i>Haemonchus</i> (ojediněle)	1000	1600	1200	1267
	19118	<i>Haemonchus</i> (silnější nález),	400	600	600	533
20.2.2007	19103	<i>Ostertaga</i> (slabý n.)	800	600	400	600
	19117	<i>Haemonchus</i> (ojediněle)	1400	1800	1600	1600
	19118	<i>Haemonchus</i> (ojediněle)	600	1200	1600	1133
22.2.2007	19103	<i>Haemonchus</i> ,	1000	800	800	867
	19117	<i>Ostertaga</i> (2)	2000	2200	2000	2067
	19118	<i>Haemonchus</i> (silnější nález)	1200	1400	1600	1400
27.2.2007	19103	<i>Haemonchus</i>	750	1000	750	833
	19117	<i>Haemonchus</i> (silnější nález),	2000	2750	2750	2750
	19118	<i>Ostertaga</i> (silnější n.)	1500	1750	2000	1750
2.3.2007	19103	<i>Haemonchus</i> (silnější nález),	1500	1000	1250	1250
	19117	<i>Ostertaga</i> (ojediněle)	2750	3250	3000	3000
	19118	<i>Haemonchus</i> (ojediněle)	2000	1750	2250	2000

Pokračování Tab.2: Výsledky kvantitativních a kvalitativních parazitologických vyšetření (počet vajíček v 1 g trusu, EPG) – experiment č.1

Den vyšetření (počet dní po aplikaci léčiva)	Centrální evidenční známka zvířete	Kvalitativní vyšetření	Typ vyšetření			
			Kvantitativní vyšetření			
5.3.2007	19103	<i>Haemonchus</i> (slabý nález)	1250	800	800	950
	19117	<i>Haemonchus</i> (silnější nález)	3250	3250	2750	3083
	19118	<i>Haemonchus</i> (slabý nález)	2250	2250	1750	2083
14.3.2007	19103	<i>Haemonchus</i> (silnější nález)	200	400	400	333
17.3.2007	19103	<i>Haemonchus</i> (silnější nález)	400	400	200	333
20.3.2007	19103	<i>Haemonchus</i> (silnější nález)	200	200	400	267

b.n. – bez nálezu

4.2. Výsledky experimentu číslo 2

Zvířata byla odčervena ivermektinovým přípravkem Ivomec inj., s.c., dne 29. 11. 2006. Poté byl zvířatům odebrán trus a provedena kvalitativní ovoskopická metoda (viz Tab.3). Ve vzorcích byly nalezena vajíčka rodů *Ostertagia*, *Moniezia*, *Trichuris* a oocysty kokcidie rodu *Eimeria* a to i 14. den po podání anthelmintika.

Vzorky rektálního trusu byly odeslány do Parazitologického ústavu SAV v Košicích, kde byly provedeny testy helmintorezistence. Bylo zjištěno přibližně 2000 – 2500 vajíček v jednom gramu trusu. Test larválního vývoje byl proveden pro benzimidazoly, byla nalezena hodnota $ED_{50} = 0,5 \mu\text{g/ml}$ tiabendazolu a $ED_{99} = 3 \mu\text{g/ml}$ tiabendazolu. Hodnoty ED_{50} a ED_{99} získané pro levamizol/pyrantel se pohybovaly v pásmu citlivosti. Podle identifikace infekčních larev bylo určeno, že se jedná o rezistentní nematoda *H. contortus*.

Dne 15. 12. 2006 byl zvířatům podán albendazol (Vermitan 20% gr.). Po odebrání rektálního trusu byla provedena kvalitativní ovoskopická metoda. U čtyřech zvířat (číslo ušní známky 19121, 19122, 19125 a 19126) nebyl třetí den po podání léčiva zjištěn nález vajíček. Negativní nález vajíček byl u posledního zvířete zjištěn sedmý den po léčbě.

Tab.3: Výsledky kvalitativních parazitologických ovoskopických vyšetření – experiment č.2

Centrální evidenční známka zvířete	Použité léčivo	Datum ošetření zvířete	Den vyšetření (počet dní po aplikaci léčiva) /parazitologický nález					
19121	IVM	29.11.06	29.11. (0.) /Os.,Mo	8.12. (9.) / Mo,Ei	13.12. (14.) / Mo.			
	ABZ	15.12.06	15.12. (0.) / Mo.	18.12. (3.) / b.n.	20.12. (5.) / b.n.	22.12. (7.) / b.n.	26.12. (11.) / b.n.	29.12. (14.) / b.n.
19122	IVM	29.11.06	29.11. (0.) / Mo,Ei	8.12. (9.) / Mo.	13.12. (14.) / Mo,Ei			
	ABZ	15.12.06	15.12. (0.) / Mo.	18.12. (3.) / b.n.	20.12. (5.) / b.n.	22.12. (7.) / b.n.	26.12. (11.) / b.n.	29.12. (14.) / b.n.
19123	IVM	29.11.06	29.11. (0.) Os,Tr, Mo	8.12. (9.) / Tr,Mo	13.12. (14.) / Mo.			
	ABZ	15.12.06	15.12. (0.) / b.n.	18.12. (3.) / Os.	20.12. (5.) / Os.	22.12. (7.) / b.n.	26.12. (11.) / b.n.	29.12. (14.) / b.n.
19125	IVM	29.11.06	29.11. (0.) / Mo.	8.12. (9.) / Mo.	13.12. (14.) / Mo.			
	ABZ	15.12.06	15.12. (0.) / Mo.	18.12. (3.) / b.n.	20.12. (5.) / Os	22.12. (7.) / b.n.	26.12. (11.) / b.n.	29.12. (14.) / b.n.
19126	IVM	29.11.06	29.11. (0.) / Mo.	8.12. (9.) / Mo.	13.12. (14.) / Mo.			
	ABZ	15.12.06	15.12. (0.) / Mo.	18.12. (3.) / b.n.	20.12. (5.) / b.n.	22.12. (7.) / b.n.	26.12. (11.) / b.n.	29.12. (14.) / b.n.

Os. – rod *Ostertagia*, Tr.- rod *Trichuris*, Ei. - rod *Eimeria*

b.n. – bez nálezu

IVM – ivermektin (Ivomec 1% inj.)

ABZ – albendazol (Vermidan 20% gr.)

4.3. Výsledky experimentu číslo 3

Zvířata byla infikována larvami L₃ kmene *H. contortus* dne 19.12.2007. Následně byl zvířatům odebírán rektální trus a vyšetřován kvantitativní ovoskopickou metodou (viz Tab.5). První vajíčka se objevila 35. den po infekci. Dospělci poté produkovaly vajíčka v průměru 300 vajíček v 1 g trusu. Počty vyprodukovaných vajíček značně kolísaly, nejvyšší počet vajíček byl přibližně 533 vajíček v 1 g trusu.

Dále byla zvířatům odebírána krev a zjišťován hematokrit. Výsledný hematokrit se pohyboval v rozmezí od 39 % - 45 % (viz Tab.4).

Tab.4: Stanovené hodnoty hematokritu (%) - experiment č.3

Centrální evidenční číslo zvířete	3.1.2008	18.1.2008	4.2.2008	11.2.2008	18.2.2008	25.2.2008
28946	41	41	40	39	40	40
28947	42	45	41	39	40	40

Tab.5: Výsledky kvantitativních ovoskopických metod (počet vajíček v 1 g trusu, EPG) – experiment č. 3

Den vyšetření (počet dní po infestaci)	Centrální evidenční známka zvířete	Kvantitativní vyšetření			Průměr
21.1.2008 (32.)	28946	0	0	0	0
	28947	0	0	0	0
24.1.2008 (35.)	28946	200	200	0	133
	28947	200	0	0	67
27.1.2008 (38.)	28946	0	0	0	0
	28947	0	0	0	0
30.1.2008 (41.)	28946	200	200	200	200
	28947	200	200	200	200
1.2.2008 (43.)	28946	400	200	400	333
	28947	400	400	200	333
4.2.2008 (46.)	28946	400	200	0	200
	28947	400	400	400	400
7.2.2008 (49.)	28946	600	400	0	333
	28947	600	400	600	533
11.2.2008 (53.)	28946	400	400	200	333
	28947	600	400	400	467
15.2.2008 (57.)	28946	400	0	0	133
	28947	0	200	0	67
18.2.2008 (60.)	28946	0	0	200	67
	28947	0	0	0	0
21.2.2008 (63.)	28946	600	600	400	533
	28947	200	400	600	400
25.2.2008 (67.)	28946	800	600	200	533
	28947	200	600	400	400

4.4. Výsledky experimentu číslo 4

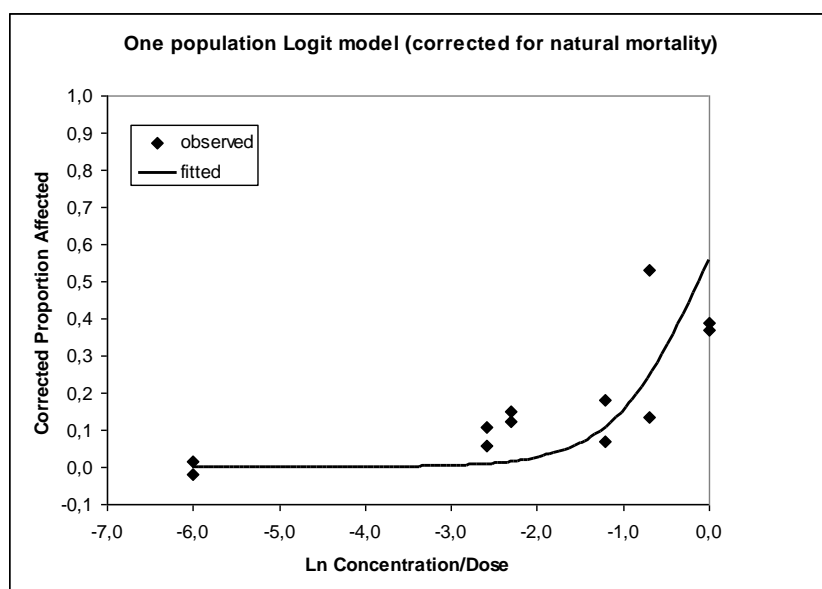
4.4.1. Test líhnutí larev

Test líhnutí larev byl proveden na směsném vzorku trusu z farmy Skochovice. Výsledky byly zaznamenány do tabulky (viz Tab. 5) a v programu Microsoft Excel upraveným R. Dobsonem byl vytvořen graf závislosti míry infekce na koncentraci léčiva (viz Graf č.1). Dále byla odečtena hodnota $LD_{50} = 0,89$ mg/l.

Tab.5: Výsledky zjištěné v experimentu č. 4 - počty vajíček a larev v testu líhnutí larev

Koncentrace µg/ml tiabendazolu	První stanovení		Druhé stanovení	
	vajíčka	larvy	vajíčka	larvy
Kontrola	8	33	9	45
0,75	15	41	13	44
0,1	22	50	17	43
0,3	22	45	16	51
1	30	32	25	25
0,5	32	50	23	56

Graf č.1 : Grafické vyjádření nálezů v testu líhnutí larev – závislost míry infekce na koncentraci tiabendazolu (podklady viz Tab.5)



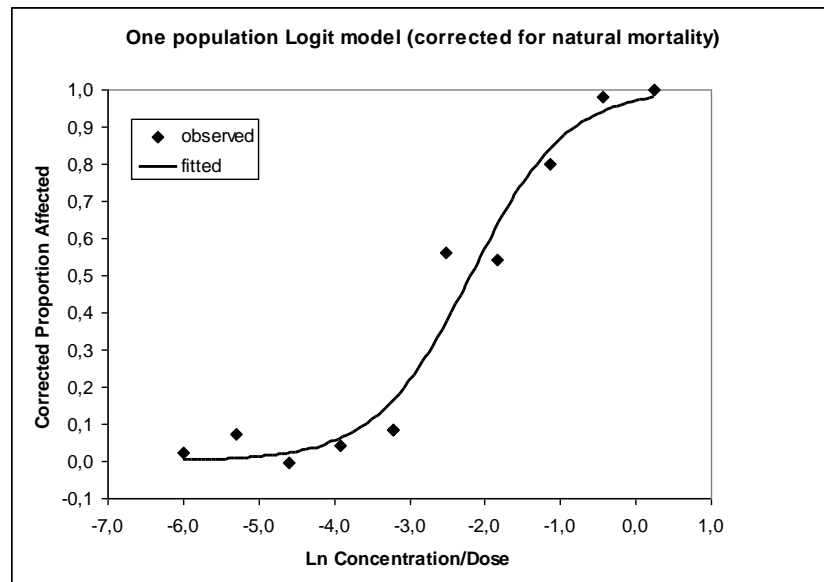
4.4.2. Test vývoje larev

Test vývoje larev byl proveden na smíšeném vzorku trusu z farmy Lužec nad Cidlinou. Počty vajíček a všech typů larev jsme zanesli do tabulky (viz Tab.6) a v programu Microsoft Excel upraveným R. Dobsonem jsme vytvořili graf závislosti míry infekce na koncentraci léčiva (viz Graf č.2). Dle získaných údajů hodnota LD_{50} byla $0,11 \mu\text{g/l}$.

Tab.6: Výsledky zjištěné v experimentu č. 4 - počty vajíček a larev v testu vývoje larev

číslo jamky	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3
Konc. $\mu\text{g/ml}$ tiabendazolu	1,28	0,64	0,32	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	0,005	0,0025
Vajíčka	9	5	3	6	7	2	3	3	5	4
L1+L2	0	5	3	5	5	8	5	3	5	3
L3	0	1	11	25	34	51	56	67	55	60
dohromady	9	11	17	36	46	61	64	73	65	67

Graf č. 2 : Grafické vyjádření nálezů v testu vývoje larev – závislost míry infekce na koncentraci tiabendazolu (podklady viz Tab.6)



7. DISKUZE

Cílem experimentu číslo 1 bylo úspěšné odčervení jehňat a poté infekce zvířat larvami *H. contortus*. Odčervení ivermektinovým anthelmintikem Ivomec nebylo úspěšné, přestože byla použita 1,2násobná dávka než je doporučena, i desátý den po léčbě byla nalezena vajíčka nematod rodů *Ostertagia*, *Trichuris*, *Nematodirus* a vajíčko rodu *Moniezia*. Tento nálezn lze vysvětlit přítomností helmintorezistence parazitů na použité léčivo a jeho dávku. Proto byla zvířata následně odčervena benzimidazolovým anthelmintikem Vermitan na bázi albendazolu. Zde již byla léčba úspěšná, dva dny po léčbě nebyla již nalezena ve vzorcích žádná vajíčka. Zvířata již byla bez parazitologických nálezů, proto mohla být infikována larvami L₃ *H. contortus*. Dospělci začali produkovat vajíčka 28. den po infekci, počet vajíček rostl s přibývajícím počtem dospělých larev. U všech tří zvířat byl nálezn velmi silný, u dvou okolo 2 - 3 tisíc vajíček v 1 g trusu a u jednoho zvířete okolo tisíce vajíček v 1 g trusu.

Zásadním zjištěním tohoto vstupního experimentu jsou první průkazy helmintorezistence parazitů v chovu ZEM a.s., dále i úspěšná infestace a produkce jak vajíček, tak i dospělců experimentálně užitých hlístic.

Ve druhém experimentu bylo cílem odčervit pět jehňat, která byla později využita v navazující studii. Ve spolupráci s Parazitologickým ústavem SAV v Košicích byla opět zjištěna helmintorezistence na ivermektinové anthelmintikum. Bylo nalezeno okolo 2000-2500 vajíček v 1 gramu trusu, odčervení je doporučeno už při hodnotách okolo 500 vajíček v 1g trusu. Po provedení testu líhnutí larev a testu vývoje larev byla zjištěna hodnota LD₅₀ pro benzimidazoly 0,5 µg/ml tiabendazolu a hodnota LD₉₉ asi 3 µg/ml tiabendazolu. Pro citlivou populaci je hodnota LD₅₀ asi 0,005 µg/ml tiabendazolu a hodnota LD₉₉ asi 0,01 µg/ml tiabendazolu. Takže šlo jednoznačně o helmintorezistenci. Hodnoty LD₅₀ a LD₉₉ pro levamizol/pyrantel se pohybovaly v pásmu citlivosti.

Zvířatům byl proto podán ivermektinový přípravek Ivomec v dvojnásobné dávce než je doporučena terapeutická dávka, ale i 14 dní po léčbě byl pozitivní výsledek nálezů vajíček rodu *Ostertagia*, *Moniezia*, *Trichuris* a oocysty rodu *Eimeria*. Proto byla zvířata znovu odčervena tentokrát benzimidazolovým

přípravkem Vermitan, týden po podání léčiva již nebyla prokázána žádná vajíčka parazitů.

U třetího experimentu byla zvířata infikována larvami *H. contortus* získaných z vlastních kultivací. První vajíčka začala být produkována až 35.den po infikaci, což bylo později než u předchozího experimentu. Počty produkováných vajíček značně kolísaly a v absolutních hodnotách nedosahovaly takových počtů, jakých jsme si představovali. Mezi příčinami neúspěchu mohl být nedostatečně dlouhý pobyt larev na světle a v teple před vlastním podání jehňatům. Larvy byly dlouhodobě uchovávány v chladu, před podáním by měly být na světle a v teple (aktivace alespoň 1 hod.). To však nebylo ideálně dodrženo, larvy byly podány zhruba třičtvrtě hodiny po vyndání z chladu. Další příčinou ale mohl být podavač, který i když byl řádně vymytý, tak byl dříve používán i k podávání suspenzí anthelmintik a mohl, byť v malých koncentracích, larvy usmrtit. Mezi zvažovanými nepříznivými okolnostmi figuruje i odčervení zvířat majitelem chovu, které proběhlo 17.1.2008 suspenzí fenbendazolu, kdy byla použita dvojnásobná než doporučená dávka (Panacur 2,5% suspenze, dávkování 4 ml/10 kg. ž.hm.)

Experiment číslo 4 byl prováděn v Parazitologickém ústavu SAV v Košicích. Cílem bylo znovu prokázat či vyvrátit helmintorezistenci u zvířat na farmách Skochovice a Lužec nad Cidlinou. Byly provedeny dva testy – test líhnutí larev a test vývoje larev.

Hodnota zjištěná u testu líhnutí larev byla $LD_{50} = 0,89$ mg/l pro benzimidazoly. Pro kmeny citlivé na benzimidazoly mají hodnotu $LD_{50} < 0,1$ mg/l, našli jsme tedy jasný průkaz benzimidazolové helmintorezistence na farmě Skochovice, nepřímým důkazem a podporující skutečností je i to, že zvířata byla 17. 1.2008 odčervena přípravkem Panacur 2,5% suspenze, dávkování 4 ml/10 kg. ž.hm. (dvojnásobek doporučeného dávkování výrobcem) současně s Baycox bovis 3 ml/10 kg. ž.hm. Právě červi, kteří přežili toto odčervení byli později v *in vitro* testu identifikováni jako helmintorezistentní.

V testu vývoje larev byla získána hodnota $LD_{50} = 0,11 \mu\text{g/l}$. Hodnoty LD_{50} pro populace citlivé na benzimidazoly se pohybují mezi $0,002 - 0,008 \mu\text{g/l}$. Naměřená hodnota byla řádově vyšší, a proto i zde byla jednoznačně prokázána helmintorezistence.

6. ZÁVĚR

Z výsledků této diplomové práce mohou být vyvozeny tyto závěry:

- 1) V experimentu číslo 1 bylo neúspěšné odčervení ivermektinovým anthelmintikem i v 1,2násobné dávce než je terapeutická. Po aplikaci benzimidazolového přípravku byl již parazitologický nález negativní. Infikace larvami *H. contortus* proběhla úspěšně, vajíčka byla produkována v předpokládaných počtech.
- 2) U zvířat v experimentu číslo 2 byla v Parazitologickém ústavu SAV v Košicích prokázána helmintorezistence na benzimidazolová anthelmintika, proto byl aplikován ivermektinový přípravek v dvojnásobné dávce než je doporučena. I přesto byla po léčbě nalezena vajíčka nematodů, a proto byla zvířata ještě odčervena albendazolem. Tato léčba již byla úspěšná a zvířata mohla být použita v jiném experimentu.
- 3) Třetí experiment nebyl příliš úspěšný. Zvířata byla infikována larvami *H. contortus* z vlastních kultivací. Vajíčka začala být produkována poměrně pozdě a v malých počtech. Příčinou neúspěchu byl nedostatečný pobyt larev v teple a na světle před podáním, použití stejného podavače jako při podání anthelmintik a stáří zvířat.
- 4) V experimentu číslo 4 byla jasně prokázána helmintorezistence na benzimidazolová anthelmintika u zvířat na farmách Skochovice a Lužec nad Cidlinou. K průkazu byly použity testy líhnutí larev a testy vývoje larev.

7. ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na přirozeně se vyskytující i experimentálně navozenou parazitofaunu u ovce domácí. Experimenty byly prováděny na farmách Skochovice a Lužec nad Cidlinou v České republice na mladých ovčích převážně plemene Merinolandschaft a v menším rozsahu romanovské plemeno. Byla zjišťována účinnost anthelmintických přípravků ze skupiny makrocyclických laktonů a benzimidazolů. Na obou farmách byla opakovaně prokázána helmintorezistence na benzimidazolová anthelmintika, a to kontrolou vylučování vajíček larvami, a dále pomocí testů líhnutí larev a testů vývoje larev. Dále pak byla zvířata infikována larvami *H. contortus* a následně prováděn rektálně odběr trusu. Ze vzorků potom byl odečítán počet vajíček kvantitativními ovoskopickými metodami a byli identifikovány rody dalších endoparazitů pomocí kvalitativních ovoskopických metod. Závěr experimentů prokázal kmeny *H. contortus* rezistentní na benzimidazolová anthelmintika. Byl také splněn cíl vyprodukovat dospělé *H. contortus*.

In this graduation theses we targeted the incidence of *H. contortus*, the nematode parasite of small ruminants. The studies were carried out on the farms „Skochovice“ and „Lužec nad Cidlinou“ in the Czech Republic with young sheep of breed of mainly Merinolandschaft and less of „romanovské“ breed . It was detected an effectivity of anthelmintics from a group of macrocycle lactons and benzimidazole. On the both farm benzimidazole resistance was detected by the help of Larval development tests and Egg hatch tests. Further the sheep were infected by larvae of *H. contortus* and takings of rectal faeces were carried out. From samples a number of eggs was abated by quantitative ovoscopical methods and other tribes of nematode parasites were identificated by the help of qualitative ovoscopical methods. The conclusion of studies demonstrated a nematode parasite *H. contortus* resistant of benzimidazole anthelmintics. A target of turning out of larvae *H. contortus* was realized too.

8. LITERATURA

1. HORÁK F. A KOLEKTIV: Ovce a jejich chov. Nakladatelství Brázda, Praha 2007, 232 - 233 s.
2. RYŠAVÝ B., ERHARDOVÁ B.: Parasiti ovčí. Nakladatelství československé akademie věd, Praha 1953, 46 s.
3. SPITZER G., ŠVESTKA Z.: Parazitologie. Státní zemědělské nakladatelství, Praha 1964, 113 s.
4. DYK V., ZAVADIL R.: Veterinární helmintologie. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1976, 123 s.
5. WALLER P.J., CHANDRAWATHANI P.: Haemonchus contortus: Parasite problem No.1 from Tropics-Polar Circle. Problems and aspects for control based on epidemiology. Tropical biomedicine 22 (2005), 131 - 137 s.
6. RYŠAVÝ B. A KOLEKTIV: Základy parazitologie. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1989, 133 - 134 s.
7. KROUTILÍKOVÁ D., SOKOLOVÁ J.: Mikrobiologie a Parazitologie. Státní zemědělské nakladatelství, Praha 1985, 61 s.
8. KOTRLÁ B. A KOLEKTIV: Parazitózy zvířete. Nakladatelství československé akademie věd, Praha 1984, 95 s.
9. VYSLOUŽIL L.: Veterinární péče v chovech ovčí-Parazitózy ovčí. Ústav veterinární osvěty, Pardubice 1985, 38 s.
10. SANGSTER N.C., GILL J.: Pharmacology of Anthelmintic Resistance, Parasitology Today, vol.15, no.4, 1999, 141 s.
11. DRUDGE J.H. A KOLEKTIV: Field studies on parasite control of sheep: Comparison of thiabendazol, ruelene and phenothiazine. American Journal of Veterinary Research, 25, 1964, 1512 s.
12. ABDUL JABBAR A KOLEKTIV: Anthelmintic resistance: The state of play revisited, Life Sciences 79, 2006, 2413 - 2431 s.
13. COLES G.C.: Anthelmintic resistance and the control of worms. Journal of Medical Microbiology, 48, 1999, 323 - 325 s.
14. WALLER P.J.: The development of anthelmintic resistance in ruminant livestock. Acta Tropica, 56, 1994, 233 s.
15. WOLSTENHOLME A.J., FAIRWEATHER I., PRICHARD R.: Drug resistance in veterinary heminths. Trends in Parasitology, Vol.20 No.10, October 2004, 470 - 472 s.

16. VARADY M., ČUDEKOVÁ P., ČORBA J.: *In vitro* detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: Egg hatch test versus larval development test. *Parasitology* Volume 149, Issues 1 - 2, 21 October 2007, 104 - 110 s.
17. SANGSTER N.C.: Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal for Parasitology* 29, 1999, 115 - 124 s.
18. HALADEJ Š., KŘEČEK J.: Veterinárne laboratórne metodiky – Parazitológia. Štátna veterinárna správa, Bratislava 1989, 100 - 101 s.
19. THIENPONT D., ROCHETTE F., VANPARIJS O. F. J.: Diagnosing helminthiasis by coprological examination. Janssen Research Foundation, Beerse 1986, 205 s.
20. RANSOM B.H.: The life history the Twisted Wireworm (*Haemonchus contortus*) of Sheeps and other Nematodes. U.S. Bur. Anim. Indus. Cir., 93, 1906, in 6. RYŠAVÝ B. A KOLEKTIV: *Základy parazitologie*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1989, 133 - 134 s.
21. ROGERS W.P.: The Effect of Enviromental Conditions on Accessibility of Third Stage Trichostrongyle Larve to Grazing Animals. *Parasitology*, 32, 1940, 208 – 225 s. in 6. RYŠAVÝ B. A KOLEKTIV: *Základy parazitologie*. Státní pedagogické nakladatelství, Praha 1989, 133 -134 s.
22. LAMKA J., DUCHÁČEK L.: Veterinární léčiva pro posluchače farmacie. Nakladatelství Karolinum, Praha 2006, 62 – 68 s.
23. Mikro – verze AISLP ČR, verze 2008.2 platná k 01.04.2008, SÚKL