

UNIVERZITA KARLOVA
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmakologie a toxikologie

**HEMONCHÓZA OVCE DOMÁCÍ JAKO
MODELOVÁ PARAZITÓZA – VÝSLEDKY JEJÍ
PARAZITOLOGICKÉ KONTROLY
V EXPERIMENTÁLNÍ STUDII**

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2019

Pavel Zdeněk

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu“.

Chtěl bych poděkovat svému školiteli panu prof. RNDr. Jiřímu Lamkovi, CSc. za profesionální přístup, cenné rady a odborné vedení při vypracování této diplomové práce. Také chci poděkovat své rodině a přítelkyni za jejich trpělivost a morální podporu.

ABSTRAKT

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

Student: Pavel Zdeněk
Školitel: prof. RNDr. Jiří Lamka, CSc.

Název diplomové práce: Hemonchóza ovce domácí jako modelová parazitóza – výsledky její parazitologické kontroly v experimentální studii

Velkým problémem chovů hospodářských zvířat po celém světě je v současné době helmintorezistence, která značně narušuje zdravotní stav chovaných zvířat a tím i jejich produkci. Snahou výzkumných pracovišť je poznat mechanismy vzniku rezistence a najít přístupy, jak jí předcházet. Cílem této diplomové práce bylo popsat experimentální infekci modelovým parazitem *Haemonchus contortus*, která byla založena na ovčích plemene Texel. *H. contortus* je jedním z významných endoparazitů, žije ve slezu přežvýkavců a živí se jejich krví. Vzoroky trusu všech zvířat vstupujících do experimentálních studií byly vyšetřeny kvalitativní ovoskopickou metodou a zvířata byla pečlivě odčervena albendazolem a monepantelem. Následně byla infikována larvami L₃ různých kmenů *H. contortus*. Byly použity tři kmeny - ISE (citlivý ke všem anthelmintikům), IRE (rezistentní k benzimidazolům) a WR (multirezistentní kmen). Kvantitativní ovoskopickou metodou byly v rektálně získaných vzorcích trusu stanovovány počty vajíček. Doba mezi infikováním zvířat larvami L₃ a prvními nálezy vajíček v trusu byla 13 až 36 dní. Parazité multirezistentního kmene WR prokázali ve studiích nejlepší životaschopnost. Každá studie byla ukončena vyřazením zvířat a izolací dospělců *H. contortus* ze slezů. Tito dospělí parazité byli dále použiti ke studiu helmintorezistence ve spolupracujících laboratořích.

ABSTRACT

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmacology and Toxicology

Student: Pavel Zdeněk

Supervisor: prof. RNDr. Jiří Lamka, CSc.

Title of diploma thesis: Haemonchosis as a model parasitosis in sheep - the results of its control during experimental study

One of the current major issues with breeding domestic animals worldwide is anthelmintic resistance, which damages animals' health and reduces their production. Research workplaces want to identify the mechanisms of resistance development and find out the ways how to prevent it. The aim of this diploma thesis was to describe experimental infection by the model parasite *Haemonchus contortus*, which was established on Texel breed sheep. *H. contortus* is one of the important endoparasites; it lives in abomasum of ruminants and feeds with their blood. Faecal samples of all animals entering to the experimental studies were examined by the qualitative ovoscopic method and the animals were thoroughly dewormed by albendazole and monepantel. Then they were infected with larvae L₃ of different *H. contortus* strains. Three strains had been used - ISE (all anthelmintic sensitive), IRE (benzimidazole resistant) and WR (multi-resistant strain). Data of the egg amounts were collected in faecal samples obtained from infected sheep by quantitative ovoscopic method. The interval between infection of animals by L₃ larvae and first findings of eggs in faeces was 13 to 36 days. Multi-resistant WR strain parasites showed the best viability in our studies. Each study was finished by disposing the animals and isolating adult *H. contortus* from the abomasa. These adult parasites were further used to study anthelmintic resistance in cooperating laboratories.

OBSAH

1	SEZNAM ZKRATEK.....	8
2	ÚVOD	9
3	TEORETICKÁ ČÁST	10
3.1	Ovce domácí	10
3.1.1	Systematické zařazení	10
3.1.2	Vývoj chovu ovcí v České republice.....	11
3.1.3	Produkty chovu ovcí	11
3.1.4	Plemena a jejich třídění	11
3.1.5	Trávicí ústrojí ovce	12
3.1.6	Endoparazitózy ovcí.....	13
3.2	<i>Haemonchus contortus</i>.....	15
3.2.1	Systematické zařazení	15
3.2.2	Morfologie	15
3.2.3	Vývojový cyklus	17
3.2.4	Klinické příznaky hemonchózy.....	18
3.2.5	Diagnostika hemonchózy	19
3.2.6	Prevence hemonchózy.....	19
3.2.7	Léčba hemonchózy.....	20
3.2.8	Vakcinace ovcí proti hemonchóze	20
3.2.9	Helmintorezistence.....	21
3.3	Antinematoda.....	22
3.3.1	Makrocyclické laktony.....	22
3.3.2	Benzimidazoly.....	23
3.3.2.1	Albendazol	23
3.3.3	Imidazothiazoly.....	24

3.3.4	Deriváty amino-acetonitrilu	24
3.3.4.1	Monepatnel.....	24
4	CÍLE PRÁCE	26
5	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
5.1	Kmeny <i>Haemonchus contortus</i> použité ve studiích	27
5.2	Zvířata použitá ve studiích	27
5.3	Metodika parazitologického vyšetření.....	27
5.3.1	Použitý materiál, chemické látky, přístroje a pomůcky	27
5.3.2	Sběr a skladování vzorků	28
5.3.3	Kvalitativní ovoskopická metoda.....	28
5.3.4	Kvantitativní ovoskopická metoda.....	28
5.4	Studie 1	30
5.5	Studie 2	31
5.6	Studie 3	32
6	VÝSLEDKY	34
6.1	Studie 1	34
6.2	Studie 2	36
6.3	Studie 3	39
7	DISKUZE	42
8	ZÁVĚR.....	44
9	LITERATURA	45

1 SEZNAM ZKRATEK

ABZ	albendazol
ČSÚ	Český statistický úřad
EPG	eggs per gram-množství vajíček parazitů v jednom gramu trusu
GABA	kyselina gama-aminomáselná
<i>H. contortus</i>	<i>Haemonchus contortus</i>
IRE	inbrední rezistentní-Edinburgh kmen <i>H. contortus</i>
ISE	inbrední citlivý-Edinburgh kmen <i>H. contortus</i>
L ₁	larva 1. stádia
L ₂	larva 2. stádia
L ₃	larva 3. stádia
L ₄	larva 4. stádia
ÚSKVBL	Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv
WR	White River, multirezistentní kmen <i>Haemonchus contortus</i>

2 ÚVOD

Parazitární infekce zažívacího traktu přežvýkavců jsou celosvětovým problémem a hemonchóza, onemocnění způsobené oblym červem rodu *Haemonchus contortus* (vlasovka slezová), patří mezi nejčastější infekce způsobující velké ztráty v chovech hospodářských zvířat po celém světě (Fawzi et al. 2015).

Stále častěji se také vyskytuje další komplikace spojená s těmito onemocněními, tou je helmintorezistence, která znamená existující odolnost parazitů proti některým skupinám původně účinných anthelmintik. Dokonce se vyskytují i multirezistentní kmeny, které jsou odolné až proti všem doposud známým skupinám léčiv. Helmintorezistence je tak globálním problémem, v největší míře se vyskytuje v teplejších oblastech s velkým množstvím chovů (Jihoafrická republika, Austrálie, Nový Zéland nebo Jižní Amerika) (Várady et al. 2011).

V současné době je tedy snahou výzkumných pracovišť, která se věnují vývoji nových anthelmintik a vakcín, objasnit také co nejlépe mechanismy vzniku rezistence a případně najít způsoby, jak ji předcházet.

Na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy se touto problematikou zabývá Výzkumná skupina pro studium rezistence a interakcí léčiv pod vedením prof. Ing. Barbory Szotákové, Ph.D. Hlavní pozornost je věnována úloze biotransformačních enzymů, a to jak hostitele nákazy, tak i jeho parazita při vzniku rezistence; výzkumná skupina využívá několik modelových parazitů včetně hlístice *H. contortus*.

Obsahem diplomové práce bylo založit několik studií na ovcích s různě rezistentními kmeny *H. contortus*, cílem bylo popsat průběh jejich infekce, věnovat se posouzení rozdílů mezi kmeny a na konci izolovat ze zvířat dospělé parazity. Ti byli dále předáni k dalšímu studiu týkajícímu se helmintorezistence.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Ovce domácí

Ovce patří mezi první domestikovaná zvířata, jejich zdomácnění proběhlo asi 10 tisíc let před naším letopočtem v Malé a Střední Asii. U ovcí se nejčastěji mluví o polyfyletickém původu, tzn. na vzniku se podílelo několik volně žijících předků, jde o ovci středoasijskou (argali), kruhorohou zakaspickou (archar) a muflona (Šonka et al. 2006).

Ovce jsou chovány hlavně kvůli jejich odolnosti, nenáročnosti a všestranné užitkovosti (kůže, maso, mléko, vlna). Díky tomu se rozšířily do nejrůznějších zeměpisných pásem, nadmořských výšek a dlouhou dobu byly nejdůležitějším hospodářským zvířetem (Horák et al. 2007).

Ovce jsou celosvětově v počtech chovaných zvířat druhé za skotem, jejich množství ale většinou klesá. Pouze v Asii a Africe počet chovaných zvířat stále roste, jsou to také kontinenty, kde se ovce chovají nejvíce. Nejvíc ovcí v Evropě se chová ve Velké Británii, Španělsku a Rusku (Horák et al. 2007, Šonka et al. 2006).

3.1.1 Systematické zařazení

Říše: *Animalia*

Kmen: *Chordata*

Třída: *Mammalia*

Řád: *Artiodactyla*

Podřád: *Ruminantia*

Čeleď: *Bovidae*

Podčeleď: *Caprinae*

Rod: *Ovis*

Druh: *Ovis ammon*

(Anděra 1999)

3.1.2 Vývoj chovu ovcí v České republice

U nás se chov ovcí rozšířil přibližně v 9. století a je spojován s osídlením Slovy. Nejvíce ovcí se u nás chovalo v 19. století. Nejrůznější příčiny však způsobily úpadek ovčáctví a pokles stavů ovcí na začátku 20. století, z přibližně 2 milionů (rok 1837) až na zhruba 200 tisíc (rok 1910). Další výrazný propad nastal na přelomu tisíciletí, v současné době se u nás chová přes 200 tisíc ovcí. Stáda chovaná na našem území jsou dnes spíše na úrovni drobného chovu, nebo jde o stáda s menším počtem kusů. Tab. 1 zachycuje počty ovcí u nás v minulém století a v současnosti (Horák et al 2007, Ochodnický a Poltárský 2003).

Tab. 1 Počty chovaných ovcí na našem území za období 1945-2018 (v ks)

Rok	1945	1960	1970	1980	1990	2000	2010	2018
Počet ovcí	28200	228419	271460	290114	429914	84108	196913	218915

Zdroj: ČSÚ (2018)

3.1.3 Produkty chovu ovcí

Ovce mají velmi mnohostrannou užitkovost, mezi hlavní produkty patří maso, vlna, kůže a mléko. Nesmíme zapomenout ani na vedlejší produkty (krev, lanolin, lůj, paznehty, předžaludky, střeva, rohy) a nepřímý užitek, ovce se používají jako experimentální zvířata, produkují mrvu (Štolc et al. 2007).

3.1.4 Plemena a jejich třídění

Ovce můžeme třídit podle různých kritérií. Existuje zoologická klasifikace, která dělí ovce podle tvaru a délky ocasu do čtyř skupin (krátkoocasé, dlouhotenkoocasé, tlustoocasé, tlustožadké). Třídit lze také podle ušlechtilosti (primitivní, zušlechtěná a ušlechtilá), dalším způsobem je dělení podle vlny, které má několik dalších hledisek (délka, jemnost, barva, lesk). Nejčastěji, se však plemen třídí podle užitkového typu. Dělení podle užitkového typu plemen chovaných v České republice je zpracováno v Tab.

2. V současnosti se u nás chovají především plemena s kombinovanou užitkovostí (Horák et al. 2007, Sambraus 2006).

Tab. 2 Plemena ovcí chovaných v ČR a jejich dělení podle užitkového typu

Kombinovaná	Begschaf, Cigája, Leicester, Lein, Merino, Merinolanshaf, Německá dlouhovlnná, Romney, Šumavská, Vlaška, Zušlechtěná vlaška, Žírné plemeno
Masná	Berrichon du Cher, Clun forest, Hampshire, Charollais, Německá černohlavá, Suffolk, Texel
Mléčná	Východofříská
Plodná	Okulská, Romanovská
Zájmová a ostatní	Jacob, Jurská, Kamerunská, Vřesová

Zdroj: Horák et al. (2007)

3.1.5 Trávicí ústrojí ovce

Ovce řadíme mezi *Ruminantia* (přežvýkaví). Trávicí ústrojí se skládá z hlavové části (ústa a hltan) a trávicí trubice, která se skládá z jícnu, předžaludku, žaludku, tenkého střeva, tlustého střeva a řitě. Předžaludek se skládá ze tří propojených dutin. U dospělého zvířete je největší z nich bachor (*rumen*), následuje čepce (*reticulum*) a kniha (*omasus*). Vlastní žaludek se jmenuje slez (*abomasus*). Čerstvě narozená mláďata mají jako největší oddíl slez (Horák et al. 2007, Reece 1998).

Úkolem předžaludku je rozštěpit obtížně stravitelnou vlákninu, to zajišťuje přežvykování, začíná přibližně 30 až 60 minut po přijetí potravy a odehrává se většinou vleže. Ovce může přežvykovat v krátkých intervalech až 9 hodin denně, záleží především na potravě, kterou zvíře přijímá. Je to proces, kdy se již pozřená potrava vrací z bachoru zpět do dutiny ústní, zvířata ji znovu přežvýkají a polknou. Jde o činnost reflexní, jenž se spouští podrážděním mechanoreceptorů, které se nacházejí v bachoru poblíž česla a ve sliznici čepce. Důležitá je přítomnost celulózu štěpících mikroorganismů (bakterií, nálevníků) v bachoru, které z vlákniny v potravě tvoří mastné kyseliny. Když ovce

ukončí přežvykování, putuje potrava přes čepec a knihu až do slezu, kde dochází k trávení potravy i s mikroorganismy (Kühnemann 2013, Reece 1998).

3.1.6 Endoparazitózy ovcí

Endoparaziti žijí uvnitř svého hostitele (Volf a Horák 2007). Podnebí v České republice je velmi vhodné pro parazity ovcí. Parazitární onemocnění mohou vést ke snížení plodnosti, nižší hmotnosti jehňat, poklesu imunity a následnému riziku jiných onemocnění, k úhynu zvířat (Horák et al. 2007, Malík et al. 1985).

Motoličnatost

Onemocnění způsobují motolice *Dicrocoelium dendriticum* (motolice kopinatá), *Fasciola hepatica* (motolice jaterní), které parazitují v játrech a žlučovodech, v předžaludku se vyskytuje *Paramphistomum cervi* (motolice jelení). Pro vývoj motolic jsou nezbytní plži jako mezihostitelé, motolice kopinatá má ještě druhého hostitele, mravence rodu *Formica* a *Tetramorium* (Volf a Horák 2007, Horák et al. 2007).

Zvířata trpí průjmy, může se vyskytnout žloutenka, anémie, dochází k poklesu hmotnosti. K léčbě jsou využívány perorálně podávané benzimidazoly (albendazol, fenbendazol), nebo klorsulon, který se podává v kombinaci s makrocyclickými laktony (ivermektin) (Horák et al. 2007).

Tasemničnatost

Jde o jedno z nejzávažnějších a nejčastějších onemocnění ovcí, které je způsobeno helminty. Parazitózu způsobují tasemnice *Moniezia*, které parazitují v tenkém střevě. Dospělci mohou dosahovat délky až 4 m. Vajíčka v článcích se dostávají ven trusem a jsou pozřena půdními roztoči čeledi *Oribatidae*, kteří mají úlohu mezihostitele. Další ovce, hlavně jehňata, se nakazí spasením rostlin, na kterých se nachází nakažení mezihostitelé (Horák et al. 2007, Volf a Horák 2007).

Nemoc se nejčastěji projeví u mláďat průjmy a nechutenstvím. Kvůli narušení střevní bariéry dochází často k rozvoji bakteriálních sekundárních infekcí, nejčastěji enterotoxémie (Horák et al. 2007, Černošek et al. 1989).

Nematodózy

Podle místa infekce můžeme nematodózy rozdělit na plicní červivost a červivost slezu a střev.

Jako plicní červivost označujeme parazitózy dýchacího ústrojí, jsou způsobeny malými plicnivkami (např. *Protostrongylus rufescens*), jde o vláskovité malé červy, kteří mohou dosahovat délky až 4 cm a k vývoji potřebují mezihostitele (suchozemské plže). Parazitují v průduškách ovcí, způsobují těžké záněty, postižené zvíře trpí silným kašlem. Mohou zapříčinit i vznik sekundárních bakteriálních onemocnění, příkladem je pasteurelóza jehňat. Nakažená zvířata se léčí pomocí ivermektinových nebo benzimidazolových přípravků (Horák et al. 2007, Volf a Horák 2007).

Červivost slezu a střev způsobují různé druhy oblých červů, jde o nitkovité nebo vláskovité parazity, délky 1 až 5 cm, kteří parazitují na různých místech trávicího traktu. *H. contortus*, *Ostertagia circuminata* ve slezu. Rody *Trichostrongylus* a *Nematodirus* v tenkém střevě. *Chabertia ovina*, *Trichuris ovis* v tlustém a slepém střevě. Nemoc postihuje hlavně mláďata, rizikové je období pastvy od května do června. Zvířata se nakazí požitím larev parazitů, celý cyklus probíhá bez mezihostitelů (Horák et al. 2007, Skoupá 2014).

Mezi příznaky patří průjmy, malátnost, chudokrevnost. Léčba probíhá pomocí benzimidazolových nebo ivermektinových přípravků (Horák et al. 2007, Skoupá 2014).

Protozoózy

Jsou onemocnění způsobené prvoky, u ovcí se vyskytuje především rod *Eimeria*, který způsobuje kokcidiózu. Tyto kokcidie jsou v trávicím traktu 80-100 % dospělých ovcí. Dospělé ovce jsou k nákaze odolné, riziko představuje pro jehňata do šesti měsíců věku. Nemoc se projeví při zvýšeném stresu, zvíře trpí průjmy, má vyšší teplotu. K terapii se užívají sulfonamidové přípravky (Skoupá 2014).

3.2 *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus (*H. contortus*), česky vlasovka slezová, patří mezi největší hrozby především v tropických a subtropických oblastech. Díky schopnosti hypobiózy (inhibice larev L₄ v hostiteli) dokáže ale přežít i chladné zimní teploty jiných oblastí (O'Conor et al. 2006, Beiser et al. 2016a).

3.2.1 Systematické zařazení

Říše: *Animalia*

Podříše: *Metazoa*

Kmen: *Scolecida*

Podkmen: *Nemathelminthes*

Třída: *Nematoda*

Podtřída: *Secernentea*

Řád: *Strongylida*

Podřád: *Trichostrongyloidea*

Čeleď: *Trichostrongylidae*

Rod: *Haemonchus*

Druh: *Haemonchus contortus*

(Ryšavý et al. 1989, Ryšavý a Erhardová 1953)

3.2.2 Morfologie

H. contortus má do červena zabarvené tělo. Patří mezi gonochoristy, to znamená, že rozlišujeme samce a samice. Samičku můžeme rozeznat i pouhým okem, protože skrz pokožku u ní prosvítají bílé stužkovité vaječníky, které jsou obtočené okolo tmavého střeva. Samička je větší než sameček, její rozměry jsou 17-28 x 0,378-0,564 mm. Sameček má rozměry 14-22 x 0,287-0,389 mm (Kotrlá et al. 1984).

Tělo je rozdělené na tři části. V hlavové části jsou orgány, kterými přijímá potravu a receptory (chemoreceptory a tangoreceptory), díky této části se dokáže orientovat. V prostřední části jsou zažívací orgány, aparát osmoticko-regulační a rozmnožovací

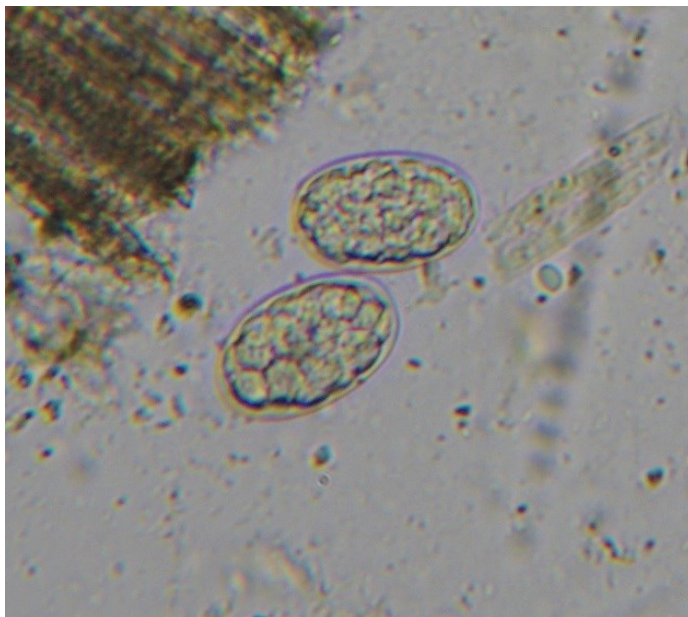
orgány. V poslední zadní části je vyústění střeva a u samečků zde ústí i pohlavní orgány, společný rektální otvor se nazývá kloaka (Ryšavý et al. 1989).

Tělo hlístic tvoří kožněsvalový vak, povrch je tvořen tegumentem neboli kutikulou. Centrální nervová soustava se skládá z prstence spojujícího nervová ganglia okolo jícnu v přední části hlístice (cirkumesofageální prstenec). Z něj jde směrem k hlavové straně šest nervových stvolů, další tři stvolů míří dozadu (břišní, boční, hřbetní) a jsou pospojovány příčnými spojkami (komisurami) (Ryšavý et al. 1989).

Pohlavním orgánem samečků je varle, které přechází v chámovod, jenž ústí do kloaky. Chámovod se skládá z vývodného kanálku a semenného váčku. Těla samečků obsahují pomocné kopulační orgány (gubernákulum a spikuly), které jsou uloženy u vývodů rozmnožovacích orgánů. Spikuly slouží při kopulaci k přichycení samečka k samičce, vsunou se do jejího pohlavního otvoru a rozšiřují jej. Mají tmavě hnědou barvu, jsou dlouhé 300-500 μm . Jejich délka a tvar jsou důležité pro identifikaci druhu hlístice. Gubernákulum řídí pohyb spikul v daném směru. Zadní část samečkovy těla se rozšiřuje do kopulační burzy, skládá se ze dvou bočních a jednoho hřbetního laloku, je vyztužená kutikulárními žebry (Ryšavý et al. 1989, Kotrlá et al. 1984, Ryšavý a Erhardová 1953).

Pohlavní orgány samiček tvoří dva značně dlouhé vaječníky, jenž přecházejí ve vejcovody a ty v dělohy. Dělohy se spojují v pochvu, která ústí ve střední části těla na břišní straně do vulvy. Tento pohlavní otvor kryje nápadný záhyb pokožky (Ryšavý et al. 1989, Kotrlá et al. 1984).

Vajíčka jsou středně velká, 62-95 μm na délku a 36-50 μm na šířku. Jejich tvar je velmi různorodý, mohou být oválná, pravidelná nebo zcela nesymetrická, protáhlá, s jedním pólem špičatým a vypouklou stěnou. Vajíčka jsou rozrýhována na 4 až 16 velkých blastomer, jenž vyplňují vnitřní prostor. Blastomery jsou šedé, jejich prostředek je ale jasný a světlý, tento charakteristický znak je odlišuje od vajíček jiných parazitů (Obr. 1) (Thienpont et al. 1986, Ryšavý a Erhardová 1953).



Obr. 1 Vajíčka *H. contortus* (foto: I. Vokřál, FaF UK Hradec Králové)

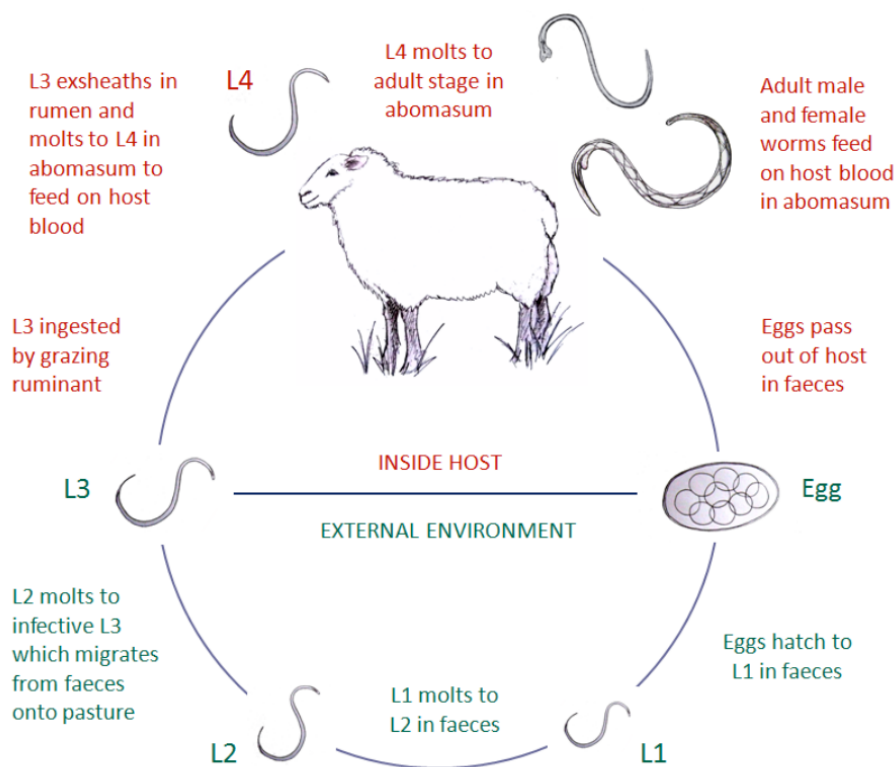
3.2.3 Vývojový cyklus

Dospělí paraziti žijí ve slezu, kde jsou přísáti ke sliznici žaludku. Vajíčka, která samičky kladou odcházejí ven s trusem. Vývoj probíhá bez mezipřehostitele, mluvíme o nich jako o monoxenních parazitech, tento přímý životní cyklus má tedy jen dvě fáze. Endogenní, která probíhá v hostiteli a exogenní, jenž se uskutečňuje v hostitelově životním prostředí (Riou et al. 2005, Ryšavý et al. 1953).

Z vajíček se ve vnějším prostředí za 14-17 hodin vylíhne larva L_1 , která zůstává v trusu. V tuto chvíli larva L_1 ještě není infekční a její pozření by nevyvolalo nákazu. Není také zatím schopna odolávat výkyvům teploty a vlhkosti. Prodělá v trusu ještě dvě svlékání, po prvním je larva L_2 stále neinfekční, ale druhým svlékáním, asi po 6 dnech od vylíhnutí, vzniká infekční larva L_3 . Larva L_3 opouští trus, má schopnost migrovat horizontálně i vertikálně. Za příznivých podmínek se larvy mohou dostat až do vzdálenosti 90 cm od trusu, většina z nich ale zůstává v okruhu přibližně 10 cm (Ryšavý et al. 1953, Zajac 2006).

Larva při svlékání pokožky neodvrhne, ale pod starou kutikulou se vytvoří nová, takže infekční L_3 má celkem kutikuly tři, díky této ochraně dokáže přežít i sucho během léta a zimní mrazy. Zvířata se nakazí při pastvě, především když je vlhko, protože larvy mohou uplatnit svou schopnost vertikální migrace (za rosy nebo po dešti vylézají na vrcholky trav, během dne pak slezou zpět dolů) (Kotrlá et al. 1984, Páv et al. 1981).

Po pozření L_3 ztrácejí v bachoru svou kutikulu a pokračují do žaludku, kde se mění v L_4 . Larvy v tomto stádiu se zavrtají do žaludeční sliznice, odkud se po několika dnech vrátí na povrch sliznice, kde dospívají. Larvy dospívají v hostiteli za 17-21 dní, dospělí paraziti žijí přibližně 70 dní (Obr. 2) (Kotrlá et al. 1984, Taylor et al 2016, Echevarria et al. 1993).



Obr. 2 Vývoj *H. contortus*

Převzato z: <https://bugconsortium.files.wordpress.com/2014/10/lifecycle-e1412846397512.png?w=300&h=267>

3.2.4 Klinické příznaky hemonchózy

Nebezpečí pro zvíře představují dospělí červi i dospívající larvy (L_4), obě stádia sají krev hostitele. Jeden dospělec dokáže vysát denně hostiteli až 0,05 ml krve. Ve větším riziku jsou mladá zvířata do dvou let věku. U akutního onemocnění vzniká hemoragická anémie, otoky, únava, zvířata ztrácí vlnu, dochází k úhynům. Chronické onemocnění se projevuje apatií, ztrátou hmotnosti, slabostí a anémií. Na rozdíl od ostatních oblych červů není *H. contortus* primární příčinou průjmů, spíše se objevuje zácpa (Kassai 1999, Páv et al. 1981).

3.2.5 Diagnostika hemonchózy

Samotné klinické příznaky nám většinou nedokáží spolehlivě určit příčinu onemocnění, provádíme proto diagnostiku parazitóz gastrointestinálního traktu pomocí koprologického vyšetření odebraného trusu. Nejlépe se osvědčila flotační metoda, při tomto způsobu detekce se používají roztoky těžší než specifická hmotnost vajíček, ty pak vyplují na hladinu (Ryšavý a Erhardová 1953).

U uhynulého zvířete lze k určení příčiny onemocnění provést helmintologickou pitvu (Ryšavý a Erhardová 1953).

Hemonchóza je spojená především s výskytem anémie. Podle barvy spojivkového vaku postiženého zvířete lze určit stupeň anémie, k tomu lze použít systém Farmacha, který byl vyvinut v Africe. Využívá se sliznice spodního víčka oka a porovnává se s kartou, na které je standardní sada pěti barev. Od červené, která značí zdravé zvíře, přes světlejší odstíny, které ukazují stupně chudokrevnosti, až po bílou, což je terminální stav anémie. Systém byl vyvinut tak, aby bylo možné individuálně vybrat postižená zvířata, která potřebují léčbu. Vyhnete se tak plošnému podávání anthelmintik, což je jeden z problémových kroků ve vývoji helmintorezistence. Kvůli včasnému záchytu infekce je nutné časté opakování testu, systém Farmacha je tudíž vhodný do menších chovů nebo chovů s dostatečným počtem pracovníků (Besier et al. 2016b).

3.2.6 Prevence hemonchózy

Preventivní opatření mají několik cílů. Za prvé zabránit závažným infekcím, u kterých dochází k vysokým úhynům. Dále se snažíme o to, abychom neměli pastviny kontaminovány vajíčky a larvami parazitů, pastviny proto střídáme a část z nich po celý rok pouze sekáme. Ultrafialové záření, které se dostane až k půdě, dokáže zničit larvální formy helmintů. Dalším cílem je snížení dopadu parazitárních onemocnění na užitkovost. A nezbytné je také provádět koprologická vyšetření, která nám potvrdí účinnost léčby a případný vývoj rezistence parazitů (Horák et al. 2007).

3.2.7 Léčba hemonchózy

Při prevenci i léčbě helmintóz máme na výběr z velké skupiny různorodých anthelmintik. Jejich původ je nejčastěji syntetický. Helmintózy způsobují tři třídy červů, hlístice (oblí červi, *Nematoda*), tasemnice (*Cestoda*) a motolice (*Trematoda*) (Lamka a Ducháček 2008).

Podle toho, na kterou třídu působí, dělíme anthelmintika na antinematoda, anticestoda, antitrematoda. Často léčiva působí současně na více tříd, nebo dokonce i na ektoparazity (Lamka a Ducháček 2008).

Před každým odčervením by mělo být provedeno koprologické vyšetření trusu. Léčba je nutná, pokud jsou nálezy vyšší než tisíc vajíček v jednom gramu trusu. Kvůli zabránění vzniku rezistence je důležité dodržovat předepsané dávkování, zvířata nesmí být poddávkovávána. Při určování dávky je nutné přihlídnout ke hmotnosti léčeného zvířete (Horák et al. 2007).

Anthelmintika užívaná k léčbě hemonchózy budou probrána v další části diplomové práce.

3.2.8 Vakcinace ovcí proti hemonchóze

Vakcína proti helmintům by byla velmi důležitá v boji s anthelmintickou rezistencí, proto se tomuto výzkumu věnuje mnoho úsilí. Přirozené nebo experimentální opakované infekce *H. contortus* vyvolaly u mnoha ovcí starších 6-8 měsíců ochrannou odpověď. Očkování se proto jeví jako možná varianta předcházení hemonchóze (Fawzi et al. 2015).

Studie, které testovaly vakcínu s obsahem kombinace antigenů (H11 a H-gal-GP) dospělého *H. contortus*, prokázaly významnou redukci vajíček parazitů, příznaků anémie i ztrát úhynem. Výsledky se však nepodařilo zopakovat s rekombinantními variantami. Vakcína Babervax s touto kombinací nativních antigenů se i přes některé nevýhody (musí se často opakovat, potřeba infikovaných zvířat k získávání antigenu) používá v Austrálii (Beiser et al. 2016b, González-Sánchez et al. 2018).

Další pokusy probíhají se somatickým antigenem (Hc23) z dospělého *H. contortus*. Vakcína s rekombinantní formou (rHc23) spolu s hydroxidem hlinitým (jako adjuvans),

vyvolala u jehňat významnou obranu proti infekci *H. contortus* (González-Sánchez et al. 2018).

3.2.9 Helmintorezistence

Hemonchóza je jedno z celosvětově nejrozšířenějších parazitárních onemocnění nejenom ovcí, působí tak velké ztráty v živočišné výrobě. Léčba je založena především na použití anthelmintik, a právě anthelmintická rezistence je čím dál větším problémem (Ploeger a Everts 2018).

Anthelmintická rezistence je definována jako genetická změna, která umožní parazitům přežít léčbu doporučenými dávkami anthelmintik. Populace hlístic, která dříve reagovala na léčbu anthelmintiky, dědí schopnosti, jenž jí umožní vyhnout se účinku léčiv po znovupodání a přežít (Várady et al. 2011).

Rezistence je problémem nejen u *H. contortus*, ale i u *Cooperia* spp., *Ostertagia* spp., *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* (Várady et al. 2011).

Dříve se týkala především benzimidazolů a imidazothiazolů, kolem roku 2010 následoval výrazný nárůst kmenů rezistentních vůči makrocyclickým laktonům. V poslední letech se již objevují i paraziti odolní proti monepantelu (Várady et al. 2011, Ploeger a Everts 2018).

Musíme si uvědomit, že problém rezistence se liší stát od státu. Například ve státech jako Švédsko, Řecko, Španělsko, Itálie či Slovensko je rezistence na benzimidazoly problémem asi 10 % farem. Ve Velké Británii, Holandsku nebo Švýcarsku mluvíme o 80 až 90 % (Várady et al. 2011).

Rezistentní paraziti se v chovu mohou vyskytnout více způsoby. Infikovaná mohou být nově přichozí zvířata. Další možností je, že budeme zvířata léčit příliš nízkými dávkami léčiva, což u parazitů povede ke vzniku rezistence na dané léčivo. Můžeme také podpořit existující rezistentní hlístice oproti citlivým kmenům tím, že jim poskytneme konkurenční výhodu, například když podáváme stále stejné léčivo, na které už si část parazitů vytvořila rezistenci (Sargison 2012).

Mechanismy vzniku lékové rezistence lze rozdělit na farmakodynamické a farmakokinetické. Mezi farmakodynamické patří snížení počtu makromolekul cílových pro léčivo nebo změna jejich struktury, anthelmintikum pak postrádá vazebná místa a na

parazita nepůsobí. Příkladem jsou jednonuklidové polymorfismy na genu pro tvorbu β -tubulinu, tato změna brání navázání benzimidazolů (Raisová Stuchlíková et al. 2018).

Farmakokinetické mechanismy mohou zahrnovat snížení absorpce léčiva, jeho urychlené odstranění z buňky parazita, případně zvýšenou inaktivaci. Těmito způsoby dojde ke snížení množství aktivního léčiva v buňce, menší počet molekul léčiva je schopen vázat se na cílové makromolekuly a celkově se snižuje účinnost léčby (Raisová Stuchlíková et al. 2018).

Dalším farmakokinetickým mechanismem je zvýšení exprese a aktivity enzymů, které metabolizují xenobiotika, tedy i léčiva. Existují studie, které popsaly přímý vztah mezi těmito enzymy a rezistencí u helmintů (Raisová Stuchlíková et al. 2018).

3.3 Antinematoda

Antinematoda jsou anthelmintika účinná proti oblým červům. Nematodózy patří k nejčastějším helmintózám, postihují téměř všechny hospodářsky i zájmově chované druhy zvířat. Většinou jde o monoxenní parazitózy a jen výjimečně probíhá vývojový cyklus za pomoci mezipřijímatelů (Lamka a Ducháček 2006).

Některá léčiva mají kromě antinematodní aktivity ještě účinek antitrepatodní, případně anticestodní. Lze je podávat individuálně i hromadně. Můžeme je rozdělit do skupin (Lamka a Ducháček 2006).

3.3.1 Makrocyclické laktony

Jde o léčiva s biosyntetickým původem. Mají účinek proti nematodózám a ektoparazitům. Dělíme je na avermektiny a milbemyctiny. Makrocyclické laktony působí přes glutamát-chloridové kanály, narušují v nervových vláknech přenos vzruchů. V CNS savců jsou tyto chloridové kanály pro velké molekuly léčiva těžko přístupné kvůli hematoencefalické bariéře, léčiva proto působí jen na parazity. Mají také účinek na GABA neurotransmisi, kterému už v současné době není přikládán takový význam. Výhodou je i sklon k reziduálnímu účinku, dochází tak nejen k eliminaci infekce, ale i ochraně před opětovným výskytem onemocnění (Lamka a Ducháček 2006, Ducháček a Lamka 2006).

Z léčiv určených pro ovce musíme zmínit především ivermektin, který je historicky prvním zástupcem skupiny avermektinů a stále patří mezi nejdůležitější

makrocyclické laktony. Doramektin a eprinomektin jsou další léčiva z této skupiny podávaná ovcím (Lamka a Ducháček 2006, ÚSKVBL 2017).

3.3.2 Benzimidazoly

Jsou odvozeny z jedné chemické struktury, část z nich má absolutní spektrum anthelmintických účinků (Lamka a Ducháček 2006).

Benzimidazoly inhibují subjednotky β -tubulinu, jenž jsou nutné k tvorbě mikrotubulů v parazitických buňkách. Dojde tak narušení transportu a metabolismu glukózy, což vede k vyčerpání energie a parazit ztrácí pohyblivost. Mají mnohonásobně vyšší afinitu k β -tubulinu parazitů než β -tubulinu v buňkách léčených zvířat. Lze tak účinně dávkovat léčivo bez obav z vedlejších účinků (Lamka a Ducháček 2006, Ducháček a Lamka 2006).

Většina těchto léčiv působí proti dospělým i vývojovým stádiím, některá dokonce i ovocidně (proti vajíčkům parazitů). Účinnost závisí na tom, jak dlouho se podaří udržet terapeutickou koncentraci léčiva v tělních tkáních a tekutinách. Polygastrickým zvířatům stačí i jednorázové podání léčiva (Lamka a Ducháček 2006).

Mezi zástupce benzimidazolů podávaných ovcím patří především ABZ (albendazol), který působí proti nematodám, cestodám i trematodám. U nás jsou k léčbě ovcí registrované také přípravky s fenbendazolem (Lamka a Ducháček 2006, ÚSKVBL 2017).

3.3.2.1 Albendazol

ABZ účinkuje na plicní červy (*Dictyocaulus filaria*) i na helminty gastrointestinálního traktu, konkrétně *Ostertagia* spp., *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Nematodirus* spp., *Chabertia* spp., *Oesophagostomum* spp., *Moniezia* spp., *Fasciola hepatica*. Působí proti dospělcům, vývojovým stádiím a také proti vajíčkům parazitů. Používá se především k léčbě skotu a ovcí (ÚSKVBL 2014).

ABZ se nesmí používat u ovcí v prvním měsíci březosti. Kontraindikován je také u ovcí, jejichž mléko je určeno pro konzumaci lidmi. Ochranná lhůta pro maso je 3 až 10 dní. Dávkování se pohybuje od 5 do 10 mg na kg ž. hm. (ÚSKVBL 2014, Lamka a Ducháček 2006).

V ČR jsou v současné době registrované tyto čtyři veterinární léčivé přípravky: Albex 10 %, Aldifal 25 mg/ml, Aldiverm 100 mg/ml, Alphasol 100 mg/ml (ÚSKVBL 2017).

3.3.3 Imidazothiazoly

Jde o anthelmintickou skupinu, která se již užívá dlouhou dobu. Mají pouze antinematodní účinnost. Léčivo zastavuje syntetickou aktivitu enzymů mitochondrií. Tyto enzymy řídí anaerobní metabolismus karbohydrátů hlístic. Kromě toho také inhibování těchto enzymů vede ke svalovým kontrakcím, protože dojde ke snížení aktivity neuromuskulárního aparátu. Zástupcem je levamisol, účinkuje proti hlísticím ve vývojovém i dospělém stádiu, na vajíčka nepůsobí (Lamka a Ducháček 2006).

3.3.4 Deriváty amino-acetonitrilu

Jediným zástupcem je monepantel, který byl uveden v roce 2010 a je to první nový typ anthelmintika za posledních 30 let. Působí proti nikotin-acetylcholinovému receptoru a má široké spektrum účinku. Bohužel už i na monepantel existují rezistentní kmeny parazitů (Beiser et al. 2016b, Sargison 2012).

3.3.4.1 Monepatnel

Se používá k léčbě ovcí. Jde o anthelmintikum, které působí proti dospělcům a L₄ těchto druhů parazitů: *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Teladorsagia trifurcata*, *Teladorsagia davtiani*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Cooperia curticei*, *Cooperia oncophora*, *Nematodirus battus*, *Nematodirus filicollis*, *Nematodirus spathiger*, *Chabertia ovina*, *Oesophagostomum venulosum* (ÚSKVBL 2014).

Mechanismus účinku spočívá v působení na nikotin-acetylcholinový receptor, který je specifický právě pro hlístice, konkrétně na podjednotku Hco-MPTL-1.

Vylučuje se hlavně trusem, ale také močí. Monepantel lze podávat i březím a laktujícím ovcím. Bezpečnost nebyla určena pro ovce mladší než 2 týdny nebo s hmotností pod 10 kg. Dávkování monepantelu je 2,5 mg na kilogram živé hmotnosti.

Podává se v jedné dávce. Léčivo by se nemělo podávat zvířatům, jejichž mléko je určeno pro lidskou spotřebu. Ochranná lhůta u masa je 7 dní (ÚSKVBL 2017).

V České republice je momentálně registrován pouze jeden veterinární léčivý přípravek, konkrétně je to Zolvix 25 mg/ml (ÚSKVBL 2017).

4 CÍLE PRÁCE

1. Vytvořit rešerši se zaměřením na hemonchózu ovce domácí a její léčbu.
2. Podílet se na přípravě podmínek pro experimentální studie, pomáhat při odběru vzorků nutných k monitoringu infekce.
3. Laboratorně vyšetřovat v terénu získané vzorky.
4. Pomáhat při izolaci dospělých jedinců *H. contortus*
5. Vypracovat diplomovou práci.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Kmeny *Haemonchus contortus* použité ve studiích

Ve studiích byly použité kmeny *H. contortus* s různou anthelmintickou rezistencí. Kmen ISE (inbrední citlivý-Edinburgh kmen), který není rezistentní a má citlivost ke všem anthelmintikům. Druhým byl kmen IRE (inbrední rezistentní-Edinburgh kmen), jenž je rezistentní k benzimidazolům (Matoušková et al. 2018). Posledním kmenem byl WR (White River), jde o multirezistentní kmen, který je odolný vůči benzimidazolům, ivermektinu, rafoxanidu a klosantelu (Vokřál et al. 2012).

Zvířatům byly infekční L₃ larvy podány individuálně v perorální suspenzi.

5.2 Zvířata použita ve studiích

Ve studiích byly použity ovce plemena Texel. Jde o bezrohé bílé plemeno s tmavým mulcem (okolí nozder), má střední až větší tělesný rámec. Plemeno Texel je výborně přizpůsobené k oplůtkovému systému pastvy. Jde o masné plemeno, plodnost je 140-160 %, dospělé bahnice mají živou hmotnost 70 až 80 kg, berani 90 až 120 kg. Denní přírůstek při výkrmu může dosáhnout až 350 g (Sambraus 2006, Štolc et al. 2007).

Plemeno bylo vyšlechtěno na nizozemském ostrově Texel křížením ovcí dovezených z Anglie a severního pobřeží Afriky (Sambraus 2006).

5.3 Metodika parazitologického vyšetření

5.3.1 Použitý materiál, chemické látky, přístroje a pomůcky

Materiál: vzorky trusu odebrané rektálně, vzorky trusu ze střeva vyřazených zvířat.

Chemické látky: roztok chloridu zinečnatého, roztok chloridu sodného, voda z vodovodu

Přístroje: světelný mikroskop, digitální váhy, mrazák

Pomůcky: laboratorní sklo (odměrný válec, pipety, kádinky, krystalizační miska), podložní a krycí sklička, McMasterova komůrka, pinzeta, fix, igelitové rukavice, igelitové sáčky, sítko, třecí miska a tlouček

5.3.2 Sběr a skladování vzorků

K parazitární kontrole byly použity vzorky trusu, které byly zvířatům odebírány z rekta do igelitových rukavic. Dalším způsobem, který probíhal až po vyřazení zvířete, byl odběr vzorků přímo ze střeva. Všechny vzorky byly označeny posledním trojčíslím z čísla ušní známky a datem odebrání. Uchovávány byly v mrazáku při teplotě -18 °C. Jejich vyšetření probíhalo podle možností, někdy s časovým odstupem.

V rámci studie byl prováděn ještě jeden způsob odběru trusu. K odběru většího množství koprologického materiálu s obsahem vajíček jednotlivých kmenů *H. contortus* byl pomocí kovových sponek připevněn ovcím k srsti v okolí řitního otvoru igelitový sáček a byl tak ponechán do druhého dne.

5.3.3 Kvalitativní ovoskopická metoda

Kádinka s objemem 100 ml byla naplněna do výšky asi centimetr pod okraj flotačním roztokem, jako flotační roztok byl použit roztok chloridu zinečnatého. Přibližně 2 g trusu byly rozetřeny v třecí misce s trochou flotačního roztoku, poté byla suspenze přefiltrována přes sítko do krystalizační misky, propláchnuta zbytkem flotačního roztoku a přelita zpět do kádinky. Kádinka byla ponechána chvíli v klidu, aby mohly uniknout vzduchové bubliny. S pomocí pinzety bylo poté na hladinu opatrně položeno krycí sklíčko. Po zhruba dvaceti minutách bylo sklíčko pinzetou přeneseno na podložní sklíčko a vloženo pod mikroskop. Důkladně bylo celé prohlédnuto a nalezená vajíčka identifikována (Thienpont et al. 1986).

5.3.4 Kvantitativní ovoskopická metoda

Na stanovení množství vajíček byla použita McMasterova metoda, výsledkem bylo EPG (eggs per gram-množství vajíček v jednom gramu trusu). Pro tento postup je nezbytná počítací McMasterova komůrka. Ta se skládá z podložní desky o rozměrech 7,5 x 2,6 cm. Na ní jsou tři skleněné destičky, vysoké 1,5 mm, které horní plochu dělí na dvě stejná políčka. Destičky na stranách jsou široké 15 mm, prostřední 4 mm. Na nich je další skleněná destička s rozměry 7,5 x 1,7 cm. Ta má na své spodní ploše dvě počítací mřížky

s plochou 1 cm², rozdělené na 6 stejných dílků příčnými rýhami (Komise pro laboratornu a klinickou diagnostiku 1989, Thienpont et al. 1986).

Byly naváženy 2 g trusu a důkladně rozetřeny ve třecí misce s 20 ml flotačního roztoku, použitý byl nasycený chlorid sodný. Suspenze byla přefiltrována přes sítko do odměrného válce s obsahem 100 ml a doplněna flotačním roztokem na objem 60 ml. Obsah byl promíchán a z jedné třetiny až jedné poloviny výšky sloupce byla odebrána část suspenze. Na odebírání byla použita pipeta plněná samovztlakem. Naplněny byly obě políčka počítací komůrky (Komise pro laboratornu a klinickou diagnostiku 1989).

Naplňená komůrka byla ponechána dvě až tři minuty v klidu. Následně byla spočítána vajíčka v prostoru počítacích mřížek. Každý vzorek byl vyšetřen pomocí čtyř políček, to znamená přepočítáním dvou komůrek. Počítáno bylo zleva doprava a vajíčka, která ležela na rysce byla započítána k vajíčkům uvnitř mřížky (Komise pro laboratornu a klinickou diagnostiku 1989).

Vypočtený průměr z počtu vajíček ve čtyřech mřížkách, byl vynásoben 200 (protože jeden oddíl počítací mřížky má objem 0,15 ml, tedy $30 / 0,15 = 200$), tím bylo stanoveno množství vajíček v 1 g trusu (EPG) (Komise pro laboratornu a klinickou diagnostiku 1989, Thienpont et al. 1986).

U hemonchózy dospělých ovcí mohou být hodnoty EPG až 30 000 (Beiser et al. 2016b).

5.4 Studie 1

K této studii bylo přivezeno 9 zvířat, beránků. Čísla ušních známek a jim odpovídající data narození zvířat jsou uvedeny v Tab. 3. Zvířata byla přivezena a zvážena 13. 9. 2017, ustájena byla v Býšti.

Tab. 3 Čísla ušních známek a data narození beránků využitých ve studii č. 1

CZ69819/053	23. 2. 2017
CZ69830/053	26. 2. 2017
CZ74388/053	6. 3. 2017
CZ69810/053	15. 2. 2017
CZ69817/053	16. 2. 2017
CZ74378/053	27. 2. 2017
CZ74395/053	12. 3. 2017
CZ74385/053	6. 3. 2017
CZ69836/053	1. 3. 2017

První odběr vzorků trusu byl proveden 14. 9. 2017, trus byl vyšetřen kvalitativní metodou, zvířata byla také odčervena. Odčervení bylo provedeno ABZ (přípravek Vermitan 20 % granulát), zvířatům byl podán individuálně ve formě perorální suspenze. Dávka ABZ byla 30 mg/kg živé váhy. Vzorky trusu byly odebrány 15. 9. 2017. Další dávky ABZ byly podány 18. 9. 2017 a 19. 9. 2017, 18. 9. 2017 byl také odebrán trus na vyšetření. 21. 9. 2017 byla každému zvířeti podána dávka monepantelu (přípravek Zolvix 25 mg/ml perorální roztok). Dne 22. 9. 2017 uhynulo zvíře 388 a 25. 9. 2017 zvíře s číslem 378, veterinář určil jako možnou příčinu úhynu klostridiózu. Ve vzorcích odebraných 9. 10. 2017 nebyla nalezena žádná vajíčka, vzorky z 12. 10. 2017 byly taky bez nálezu s výjimkou zvířete 395. V trusu z 16. 10. 2017 byla zjištěna přítomnost *Moniezia* u zvířete s číslem 817, proto byl zvířatům 18. 10. 2017 opět podán ABZ. Dne 24. 10. 2017 byly odebrány vzorky ke kontrole, nálezy byly negativní kromě zvířete 817, kde byla prokázána přítomnost *Moniezia*.

Dne 27. 10. 2017 byla všechna zvířata infikována larvami L₃ *H. contortus* dle Tab. 4, zvíře č. 817 dostalo menší dávku kvůli postižení tasemnicemi rodu *Moniezia*. Zvířatům byly odebrány vzorky trusu. Kvůli zhoršujícímu se zdravotnímu stavu muselo být 10. 11. 2017 vyraženo zvíře č. 817. Dne 13. 11. 2017 a 23. 11. 2017 byl proveden další odběr trusu. Z důvodu nejasností v nálezech byly některé nafoceny za pomoci doktora Vokřála

a odeslány ke konzultaci doc. Váradymu. Ve dnech 9. až 10. 12. 2017 byl uskutečněn sběr trusu pomocí sáčků připevněných ke zvířatům.

Vyřazení zvířat proběhlo 11. 12. 2017, byly odebrány vzorky trusu ze střev a ze slezů izolování dospělci *H. contortus*.

Tab. 4 Infekce L₃, kmen a množství podaných larev ve studii č. 1

385	WR	8000
395	IRE	8000
810	WR	8000
817	ISE	5000
818	ISE	7500
830	ISE	7500
836	IRE	8000

5.5 Studie 2

V této studii bylo použito 9 zvířat, beránků. Byli přivezeni 5. 1. 2018 a ustájeni v Býšti. V Tab. 5 jsou zpracována čísla ušních známek a data narození. Všechna zvířata byla po přivezení zvážena.

Tab. 5 Čísla ušních známek a data narození beránků použitých ve studii č. 2

CZ74387/053	7. 3. 2017
CZ69828/053	23. 2. 2017
CZ74383/053	7. 3. 2017
CZ74394/053	10. 3. 2017
CZ74376/053	3. 3. 2017
CZ69840/053	4. 3. 2017
CZ69814/053	18. 2. 2017
CZ69813/053	18. 2. 2017
CZ69841/053	28. 2. 2017

Studie byla zahájena odběrem vzorků ve dnech 8. a 9. 1. 2018, vzorky byly vyšetřeny kvalitativní ovoskopickou metodou, 9. 1. 2018 byl také zvířatům podán ABZ (Vermitanu 20 % granulát, dávkování podle hmotnosti zvířat), dávkování ABZ bylo 30 mg/kg živé váhy. Druhá dávka byla podaná 11. 1. 2018. Další odběr trusu byl proveden

15. 1. 2018 a zvířatům byl současně podán monepantel (Zolvix 25 mg/ml perorální roztok). Ve dnech 23. a 24. 1. 2018 byly odebrány a vyšetřeny další vzorky, protože u některých zvířat byly stále pozitivní nálezy, byla 26. 1. 2018 podána další dávka ABZ. Výsledky vyšetření trusu z 1. a 2. 2. 2018 již byly uspokojivé a bylo přistoupeno k experimentální infekci.

Zvířata byla 6. 2. 2018 infikována larvami L₃ *H. contortus*, dávka pro jedno zvíře byla 8000 larev, byly použity tři různě rezistentní kmeny. Vzorky trusu byly odebírány ve dnech 26. 2., 5. 3., 12. 3. 2018 a následně hodnoceny. Nejdříve byla použita kvalitativní metoda, jakmile byl potvrzen výskyt infekce, byly vzorky hodnoceny kvantitativně. Beránci č. 383, 840, 841 byli vyřazeni 20. 3. 2018, od všech zvířat byl také odebrán vzorek trusu. Zbytek zvířat byl vyřazen 27. 3. 2018, byl jim odebrán vzorek trusu ze střev a ze slezů byli izolováni dospělci *H. contortus*.

5.6 Studie 3

K tomuto pokusu bylo použito 14 beránků. Ustájení a zvážení proběhlo 4. 12. 2018 v Býšti. Čísla ušních známek jednotlivých zvířat a jejich data narození jsou zpracované v Tab. 6.

Tab. 6 Čísla ušních známek a data narození beránků použitých ve studii č. 3

CZ78000/053	7. 3. 2018
CZ78013/053	19. 3. 2018
CZ78002/053	11. 3. 2018
CZ78009/053	10. 3. 2018
CZ74408/053	23. 2. 2018
CZ77997/053	5. 3. 2018
CZ77992/053	6. 3. 2018
CZ74417/053	25. 2. 2018
CZ74411/053	27. 2. 2018
CZ77993/053	5. 3. 2018
CZ78004/053	6. 3. 2018
CZ78012/053	23. 3. 2018
CZ77995/053	6. 3. 2018
CZ74416/053	25. 3. 2018

První vzorky byly zvířatům odebrány 10. 12. 2018 a byla provedena léčba monepantelem (přípravek Zolvix 25 mg/ml perorální roztok). Další dávka monepantelu byla podána 12. 12. 2018, také byly odebrány další vzorky trusu. Na základě kvalitativního ovoskopického vyšetření, které odhalilo výskyt vajíček *Trichuris*, byl v následujících třech dnech zvířatům podáván ABZ (přípravek Vermitan 20 % granulát). Vzorky z 19. a 20. 12. 2018 byly negativní, tudíž prokázaly účinnost léčby. Dne 22. 12. 2018 uhynulo zvíře č. 416.

Larvy L₃ *H. contortus* byly podány 23. 12. 2018. Zvířata byla infikována třemi různě rezistentními kmeny, každému bylo podáno 8000 larev. Kontrolní vzorky byly odebírány 21. a 28. 1. 2019, 28. 1. 2019 také došlo k úhynu zvířete č. 004. 30. 1. 2019 byli vyřazeni beránci č. 002, 411 a 417. Ze střev byly odebrány vzorky trusu a ze slezů izolováni dospělí červi *H. contortus*. Další vyřazení zvířat bylo provedeno 4. 2. 2019, konkrétně šlo o zvířata č. 000, 993, 997. Byl odebrán trus ze střev a izolováni dospělci *H. contortus*. Na zvířata č. 009, 013, 995 byly upevněny sáčky pro sběr trusu. Od zbývajících zvířat byly rektálně odebrány vzorky.

U beránců č. 012, 408, 992 byl prokázán velmi slabý nebo žádný nález, bylo tedy rozhodnuto o reinfekci. Ta byla provedena 6. 2. 2019, každému zvířeti bylo podáno 10000 larev kmenu ISE nebo WR. Ve stejný den byla vyřazena zvířata č. 009, 013, 995. Byly odebrány vzorky trusu ze střev a izolováni dospělci *H. contortus*. Trus reinfikovaných zvířat z 6. 3. 2019 byl vyhodnocen kvalitativní ovoskopickou metodou. Zvíře č. 408 bylo vyřazeno 26. 3. 2019, beránci č. 012 a 992 byli vyřazeni 1. 4. 2019, z jejich střev byly odebrány vzorky trusu a ze slezů izolováni dospělci *H. contortus*.

6 VÝSLEDKY

6.1 Studie 1

Zvřátům byl 14. 9. 2017 odebrán trus, který byl kvalitativně vyšetřen, také byl podán granulát ABZ. Další podání ABZ proběhlo 18. a 19. 9. 2017. Dne 21. 9. 2017 byl podán monepantel. Ve dnech 22. a 25. 9. 2017 došlo k úhynům zvířat č. 388 a 378, důvodem byla klostridióza. Kvalitativní ovoskopické hodnocení těchto zvířat nebylo do experimentu zařazeno. Kvůli opakovaným pozitivním nálezům ve vzorcích, byl 18. 10. 2017 opět podán ABZ. Výsledky kvalitativních vyšetření jsou v Tab. 7.

27. 10. 2017 byla zvířata infikována různými kmeny *H. contortus*. Následně byl pravidelně odebírán trus, který byl nejprve kontrolován kvalitativně, po prokázání infekce se dělalo i kvantitativní vyhodnocení (Tab. 8). První vajíčka byla prokázána 13 dní po infekci u zvířat 810 a 817, u ostatních později tj. 27 dní po infekci.

V průběhu kontroly nákazy jsme narazili na vajíčka, která jsme nebyli schopni s jistotou identifikovat. S pomocí doktora Vokřála jsme je tedy nafotili a zaslali docentu M. Váradyemu, který pracuje v Parazitologickém ústavu Slovenskej akademie vied v Košicích. Ten je identifikoval jako neoplozená vajíčka *H. contortus*, ve studii jsme je počítali dohromady s oplozenými.

Tab. 7 Kvalitativní parazitologické hodnocení trusu a výsledky podání léčiv (studie 1)

	čísla zvířat						
	385	395	810	817	818	830	836
14.9.	podán albendazol						
	<i>Chabertia,</i> <i>Nematodirus,</i> <i>Ostertagia,</i> <i>Trichuris</i>	<i>Chabertia,</i> <i>Trichuris</i> (málo vzorku)	<i>Chabertia,</i> <i>Nematodirus,</i> <i>Ostertagia</i>	bez vzorku	<i>Chabertia,</i> <i>Nematodirus,</i> <i>Ostertagia</i>	<i>Chabertia,</i> <i>Nematodirus,</i> <i>Ostertagia,</i> <i>Trichostrongylus</i>	<i>Chabertia,</i> <i>Nematodirus,</i> <i>Ostertagia,</i> <i>Trichuris</i>
15.9.	<i>Chabertia,</i> <i>Nematodirus,</i> <i>Ostertagia</i>	bez vzorku	<i>Chabertia,</i> <i>Ostertagia</i>	<i>Chabertia,</i> <i>Ostertagia,</i> <i>Trichostrongylus</i>	<i>Chabertia,</i> <i>Nematodirus,</i> <i>Ostertagia</i>	bez vzorku	<i>Ostertagia</i> (málo trusu)
18.9.	podán albendazol						
	-	<i>Ostertagia</i>	-	-	<i>Ostertagia</i>	-	-
19.9.	podán albendazol						
21.9.	podán monepantel						
9.10.	-	-	-	-	-	-	-
12.10.	-	<i>Ostertagia</i>	-	-	-	-	-
16.10.	-	-	<i>Moniezia</i>	-	-	-	-
18.10.	podán albendazol						
	<i>Trichuris</i>	<i>Ostertagia</i>	<i>Moniezia</i>	<i>Moniezia</i>	-	-	-
24.10.	-	-	-	<i>Moniezia</i>	-	-	-
27.10.	zvířata infikována larvami <i>Haemonchus contortus</i>						
	-	-	-	-	-	-	-
2.11.	-	-	-	-	-	-	-
9.11.	-	-	<i>Haemonchus</i>	<i>Haemonchus,</i> <i>Moniezia</i>	-	-	-
10.11.	Utracen						
13.11.	-	-	<i>Haemonchus</i>	X	-	-	-

Tab. 8 Hodnoty EPG nalezené v termínech jednotlivých vyšetření (studie 1)

datum sběru	číslo zvířete a kmen <i>H. contortus</i>					
	385 (WR)	395 (IRE)	810 (WR)	818 (ISE)	830 (ISE)	836 (IRE)
23. 11.	583	117	2513	2287	1333	217
30. 11.	1517	450	1950	3267	1700	300
7. 12.	1480	1100	9667	633	3233	600

6.2 Studie 2

Po odběru předléčebných vzorků trusu 8. a 9. 1. 2018, byl zvířatům podán ABZ ve dvou dávkách 9. a 11. 1. 2018. Také byl 15. 1. 2018 podán monepantel. Pravidelně byly odebírány a kvalitativně hodnoceny vzorky kvůli ověření účinnosti léčby. Z důvodu výskytu vajíček *Trichuris* byla 26. 1. 2018 podána další dávka ABZ. Další kontroly již neprokázaly žádnou parazitózu, a tak mohla být zvířata 6. 2. 2018 nakažena larvami *H. contortus*.

Poté byl sledován průběh infekce. Nejprve byly vzorky hodnoceny kvalitativní ovoskopickou metodou, po prokázání přítomnosti vajíček byly hodnoceny kvantitativně.

Výsledky kvalitativního vyhodnocení vzorků z doby před infekcí jsou zpracovány v Tab. 9, údaje ze vzorků infikovaných zvířat jsou v Tab. 10. Kvantitativní hodnocení výskytu vajíček *H. contortus* ve vzorcích obsahuje Tab. 11. První vajíčka byla ve vzorcích trusu prokázána 27 dní po infekci.

Tab. 9 Kvalitativní parazitologické hodnocení trusu před infikováním (studie 2)

číslo zvířat	datum sběru						
	8.1.	9.1.	15.1.	23.1.	24.1.	1.2.	2.2.
376	<i>Chabertia, Ostertagia, Trichuris</i>	<i>Ostertagia, Trichuris</i>	<i>Chabertia</i>	-	-	-	-
383	<i>Chabertia, Nematodirus, Ostertagia, Trichuris</i>	<i>Chabertia, Ostertagia, Trichuris</i>	<i>Ostertagia</i>	-	-	-	-
387	<i>Chabertia, Ostertagia, Trichostrongylus</i>	<i>Ostertagia, Trichostrongylus</i>	<i>Ostertagia</i>	-	-	-	-
394	<i>Chabertia, Ostertagia, Trichostrongylus, Trichuris</i>	<i>Chabertia, Ostertagia, Trichuris</i>	-	-	<i>Trichuris</i>	-	-
813	bez vzorku	<i>Ostertagia, Trichuris</i>	-	-	-	-	-
814	<i>Chabertia, Nematodirus, Ostertagia, Trichuris</i>	<i>Nematodirus, Ostertagia, Trichuris</i>	<i>Ostertagia</i>	<i>Trichuris</i>	<i>Trichuris</i>	-	-
828	<i>Chabertia, Nematodirus, Ostertagia, Trichuris</i>	<i>Nematodirus, Ostertagia, Trichuris</i>	<i>Chabertia, Ostertagia</i>	-	-	-	-
840	<i>Chabertia, Nematodirus, Ostertagia, Trichuris</i>	<i>Nematodirus, Ostertagia, Trichuris</i>	-	-	-	-	-
841	<i>Chabertia, Nematodirus, Ostertagia, Trichuris</i>	<i>Chabertia, Nematodirus, Ostertagia, Trichuris</i>	-	-	-	-	-

Tab. 10 Kvalitativní parazitologické hodnocení trusu po infikování larvami *H. contortus* 6. 2. 2018 (studie 2)

čísla zvířat	datum sběru		
	26. 2.	5. 3.	12. 3.
376	-	<i>Haemonchus</i>	<i>Haemonchus</i>
383	-	-	<i>Haemonchus</i>
387	-	<i>Haemonchus</i>	<i>Haemonchus</i>
394	-	<i>Haemonchus</i>	<i>Haemonchus</i>
813	-	-	<i>Haemonchus</i>
814	-	-	<i>Haemonchus</i>
828	-	-	<i>Haemonchus</i>
840	-	<i>Haemonchus</i>	<i>Haemonchus</i>
841	-	<i>Haemonchus</i>	<i>Haemonchus</i>

Tab. 11 Hodnoty EPG nalezené v jednotlivých termínech vyšetření (studie 2)

datum sběru	číslo zvířete a kmen <i>H. contortus</i>								
	376	383	387	394	813	814	828	840	841
	WR	ISE	ISE	IRE	WR	IRE	ISE	ISE	IRE
12. 3.	700	100	0	67	267	133	33	633	267
20. 3.	433	367	150	100	367	233	367	600	367
27. 3.	667	x	133	67	433	167	817	x	x

x... zvířata vyřazena 20.3.2018

6.3 Studie 3

Zvřátům byl 10. a 12. 12. 2018 podán monepantel a současně byly odebírány vzorky trusu. Vzorky trusu po léčení byly pozitivní na nálezy vajíček *Trichuris*, proto byl ve dnech 13., 14. a 15. 12. 2018 podán ještě ABZ. 22. 12. 2018 došlo k úhynu zvířete č. 416. Výsledky z kvalitativního ovoskopického hodnocení vzorků byly bez nálezu a zvířata byla 23. 12. 2018 infikována larvami *H. contortus*. Další vzorky již byly hodnoceny kvantitativní metodou. Výsledky předinfekčního kvalitativního hodnocení jsou zpracované v Tab. 12. V Tab. 13 jsou zaznamenána následná kvantitativní vyšetření. První vajíčka byla prokázána 29 dní po infekci.

Protože infikování larvami L₃ u zvířat č. 012, 408 a 992 nebylo úspěšné, byla u nich provedena reinfekce. Ta byla úspěšná, což potvrdilo kvalitativní koprologické vyšetření provedené 28 dní po reinfekci. U všech zvířat byl pozitivní nález vajíček *H. contortus*. Hodnoty EPG u reinfikovaných zvířat jsou v Tab. 14.

Tab. 12 Kvalitativní parazitologické hodnocení trusu (studie 3)

číslo zvířat	datum sběru			
	10. 12.	12. 12.	19. 12.	20. 12.
000	<i>Haemonchus, Nematodirus, Trichuris</i>	<i>Haemonchus, Trichuris</i>	-	-
002	<i>Chabertia, Haemonchus, Trichuris</i>	<i>Trichuris</i>	-	-
004	<i>Chabertia, Haemonchus, Nematodirus, Trichuris</i>	<i>Trichuris</i>	-	-
009	<i>Chabertia, Haemonchus, Nematodirus, Trichuris</i>	<i>Trichuris</i>	-	-
012	<i>Chabertia, Haemonchus, Nematodirus, Ostertagia, Trichuris</i>	<i>Trichuris</i>	-	-
013	<i>Chabertia, Haemonchus, Ostertagia, Trichuris</i>	<i>Trichuris</i>	-	-
408	<i>Chabertia, Haemonchus, Nematodirus, Trichuris</i>	<i>Nematodirus, Trichuris</i>	-	-
411	<i>Chabertia, Haemonchus, Nematodirus, Trichuris</i>	<i>Trichuris</i>	-	-
416	<i>Haemonchus, Trichuris</i>	<i>Trichuris</i>	-	-
417	<i>Chabertia, Haemonchus, Nematodirus, Ostertagia, Trichuris</i>	<i>Haemonchus, Ostertagia, Trichuris</i>	-	-
992	<i>Haemonchus, Trichuris</i>	<i>Haemonchus, Trichuris</i>	-	-
993	<i>Haemonchus, Nematodirus, Trichuris</i>	<i>Trichuris</i>	-	-
995	<i>Haemonchus, Nematodirus, Trichuris</i>	<i>Haemonchus, Trichuris</i>	-	-
997	<i>Chabertia, Haemonchus, Trichuris</i>	<i>Trichuris</i>	-	-

Tab. 13 Hodnoty EPG nalezené v jednotlivých termínech vyšetření (studie 3)

číslo zvířete a kmen	datum odebrání vzorku			
	21. 1. ¹	28. 1.	30. 1. ²	4. 2.
000 (ISE)	-	100		50
002 (IRE)	<i>Haemonchus</i>	2100	1233	X
004 (WR)	4200	Úhyn		
009 (ISE)	400	1000		2100
012 (ISE)	-	50		-
013 (WR)	13100	18100		18600
408 (IRE)	-	100		-
411 (ISE)	-	1450	100	X
417 (IRE)	<i>Haemonchus</i>	600	250	X
992 (ISE)	-	-		-
993 (ISE)	-	50		100
995 (IRE)	1700	1400		1700
997 (ISE)	<i>Haemonchus</i>	250		600

¹ 21.1.2018 byla kvantitativně hodnocena jen zvířata s nejlepším nálezem, u zbytku bylo provedeno pouze kvalitativní hodnocení

² 30.1.2018 se odebíral a hodnotil trus pouze z odebraných zvířat
x... zvířata která již byla vyřazena

Tab. 14 Hodnoty EPG reinfikovaných zvířat (studie 3)

datum vyřazení	číslo zvířete a kmen <i>H. contortus</i>		
	012 ISE	408 WR	992 ISE
26. 3.		9067	
1. 4.	5267		3600

7 DISKUZE

Koprologická vyšetření vzorků trusu ovcí, která byla prováděna na začátku každé studie kvalitativní ovoskopickou metodou, prokázala u všech zvířat slezovou a střevní červivost, nalézány byly rody *Haemonchus*, *Chabertia*, *Nematodirus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Trichuris*, nalezena byla i vajíčka tasemnic rodu *Moniezia*. Zvířata byla většinou postižena několika parazitózami současně, v případě ovcí se ale jedná o běžný jev popisovaný i v literatuře (Malík et al. 1985).

Zvířata byla odčervována ABZ v dávce 30 mg/ kg živé váhy a monepantelem v dávce 6 mg/ kg živé váhy. U studie 1 jsme léčbu zahájili jednou dávkou ABZ, to se ukázalo jako nedostatečné. ABZ musel být podán opakovaně, přestože dávka byla vyšší než doporučené dávkování, ale je možné, že důvodem neúčinnosti byla rezistence parazitů. V dalších studiích už jsme rovnou přistoupili k opakovanému podání ABZ, v kombinaci s podáním monepantelu byla tato léčba účinná. Ve studii 3 jsme se léčbu rozhodli zahájit monepantelem, tento způsob byl účinný jen částečně a ve vzorcích trusu byla po léčení nalézána vajíčka parazitů, především rodu *Trichuris*. Bylo tak prokázáno, že spektrum účinku monepantelu nezahrnuje rod *Trichuris* a zvířatům byl proto opakovaně podán ABZ. Opakované vyšší dávky ABZ působily na parazity rodu *Trichuris*, i když je ABZ nemá v indikaci. Stejně léčebné schéma použila i Škávová (2013), naopak Lochmanová (2010) uvádí ve své práci podání jedné dávky ABZ jako dostatečné. Kombinace ABZ a monepantelu byla účinná u všech zvířat ve studiích.

Jedinou výjimkou s pozitivním kvalitativním nálezem byl beránek č. 817 ze studie 1, po odčervení sice v trusu nebyly žádné nálezy vajíček, ovšem poté co byly zvířeti podány L₃ *H. contortus*, byla ve vzorcích nalezena vajíčka *Moniezie*. Beránek musel být kvůli zhoršujícímu se stavu předčasně utracen. Je možné, že za znovu výskyt *Moniezie* mohla právě experimentální infekce, která oslabil imunitní systém zvířete, anebo ABZ nebyl schopen účinně zapůsobit na vývojové stádium tasemnice v době podání ABZ.

K infikování zvířat byly použity tři různě rezistentní kmeny *H. contortus*. Multirezistentní kmen WR prokazoval pravidelně největší životaschopnost, vajíčka tohoto kmenu se objevovala mezi prvními, jejich nálezy byly vysoké a po izolaci dospělců ze slezu na konci studie byly jejich počty vždy nejvyšší. Mezi kmeny IRE a ISE nebyly

prokázány výrazné rozdíly co se týče životaschopnosti. To odpovídá výsledkům Lochmanové (2010).

První vajíčka se ve studii 1 byla prokázána 13 dní po infekci, ve studii 2 ale až 27. den a ve studii 3 obdobně po 29 dnech od infikování zvířat larvami L₃. Doba od podání L₃ a výskytu prvních vajíček v trusu byla 13-36 dní, tento údaj je podobný s výsledky předešlých diplomových prací (Prušková 2008, Lochmanová 2010, Škávová 2013). Vezme-li ale v potaz, že ve studii 2 a 3 byly vzorky odebírány v týdenních intervalech, paraziti mohli vajíčka produkovat už o několik dní dříve, než se je podařilo prokázat. Literatura udává, že z larev se stávají dospělci schopní produkce vajíček za 14-21 dní (Ryšavý a Erhardová 1953) a tak naše nálezy odpovídají dříve publikovaným údajům.

Součástí studie bylo i kvantitativní hodnocení infekce. Při interpretaci nálezů EPG hodnot je třeba respektovat některé vlastnosti modelového parazita, díky kterým je obtížné i jen odhadovat množství dospělých červů ve slezu zvířat. Důvodem je nepravidelnost v kladení vajíček samicemi, které je proměnlivé během delšího období (týden či měsíc), ale také během dne. Navíc takto nelze spočítat samečky a nedospělé samičky, které sice vajíčka neprodukují, ale krev sají (Ryšavý a Erhardová 1953).

Ve studii 3 se u tří zvířat nepodařilo podáním L₃ vyvolat infekci. Vzhledem k tomu, že šlo o dva různé kmeny parazitů a u ostatních zvířat s těmito kmeny infekce proběhla, můžeme vyloučit, že by příčinou byla špatná manipulace s larvami před podáním. Rozhodli jsme se tedy vyzkoušet reinfekci. Protože zvířata již byla starší, chtěli jsme mít jistotu, že se reinfekce podaří, podali jsme tedy každému 10000 larev. Zvířata č. 012 a 992 byla infikována kmenem ISE jako při první infekci, č. 408 byl podán kmen WR. Reinfekce byla u všech zvířat úspěšná.

V první studii jsme také narazili na vajíčka, která jsme nebyli schopni identifikovat, po konzultaci s doc. M. Váradym, jsme je určili jako neoplozená vajíčka *H. contortus*. Šlo o vajíčka, která nebyla schopna pokračovat ve vývojovém cyklu parazita. Tato vajíčka se objevila ve všech studiích, největší podíl byl vždy u prvních vzorků a s postupem času klesal.

8 ZÁVĚR

Koprologická vyšetření trusu prokázala, že k účinnému odčervení ovcí bylo nutné podat opakovaně ABZ v kombinaci s monepantelem. Zvířata byla následně infikována larvami L₃ *H. contortus*, použity byly tři kmeny (ISE, IRE, WR), které se liší odolností vůči anthelmintikům. Kvůli monitorování průběhu infekce byla následně prováděna kvalitativní i kvantitativní koprologická kontrola vzorků trusu. Doba mezi infikováním zvířat a prvními nálezy vajíček v trusu byla 13-36 dní v závislosti na využitém schématu kontrolních vyšetření trusu. U většiny zvířat se množství vajíček v trusu časem zvyšovalo, kromě životaschopných vajíček byla ve vzorcích i vajíčka neoplozená. U kmene WR výsledky ukázaly nejvyšší životaschopnost. Po vyřazení zvířat na konci každého studie byli z jejich slezů izolováni dospělí jedinci *H. contortus* a předáni k dalšímu využití na Katedře biochemických věd Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové.

9 LITERATURA

Seznam literárních zdrojů

Anděra M. České názvy živočichů II. Savci (Mammalia). 1. vyd. Praha: Národní muzeum, 1999: 147 s.

Beiser R.B, Kahn L.P, Sargison N.D, Van Wyk J.A. Chapter Four- The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. *Advances in Parasitology*. 2016a, Volume 93: 95-143 s.

Beiser R. B, Kahn L. P, Sargison N. D, Van Wyk J. A. Chapter Six- Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Advances in Parasitology*. 2016b, Volume 93: 181-238 s

Černošek A, et al. Zdraví zvířat v drobných chovech. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1989: 360 s.

Ducháček L, Lamka J. Veterinární vademecum pro farmaceuty. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2006: 127 s.

Echevarria F. A. M, Gettinby G, Hazelwood S. Model predictions for anthelmintik resistance amongst *Haemonchus contortus* populations in southern Brazil. *Veterinary Parasitology*. 1993, 47(3-4): 315-325 s.

Fawzi, E.M., et al., Vaccination of lambs with the recombinant protein rHc23 elicits significant protection against *Haemonchus contortus* challenge. *Vet. Parasitol.* (2015)

González-Sánchez M. E, Cuquerella M, Alunda, J. M. Vaccination of lambs against *Haemonchus contortus* with the recombinant rHc23. Effect of adjuvant and antigen dose. *PLOS ONE*. 2018, 13(3)

Horák F, et al. Ovce a jejich chov. 1. vyd. Praha: Brázda, 2007: 304 s.

Kassai T. Veterinary helminthology. Boston: Butterworth-Heinemann, 1999: 260 s.

Komise pro laboratornu a klinicku diagnostiku. Veterinarne laboratorne metodiky, Parazitologia. 1. vyd. Bratislava: Štátna veterinárna správa SSR, 1989: 167 s.

Kotrlá B, et al. Parazitózy zvěře. 1. vyd. Praha: Academia, 1984: 192 s.

Kühnemann Helmut. Chováme ovce. Víkend, 2013: 95 s.

Lamka J, Ducháček L. Veterinární léčiva pro posluchače farmacie. 3.vyd. Praha: Karolinum, 2006: 151 s.

Lochmanová Eva. Hemonchóza ovce domácí- výsledky laboratorní kontroly v průběhu experimentální infekce. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2010: 47 s.

Malík V, et al. 1000 rad drobnochovatelům. 1. vyd. Ostrava: Profil, 1985: 496 s.

Matoušková P, et al. UDP-glycosyltransferase family in *Haemonchus contortus*: Phylogenetic analysis, constitutive expression, sex-differences and resistance-related differences. IJP: Drug and Drug Resistance. 2018, 8: 420-429 s.

O'Connor Lauren J, Walkden-Brown Stephen W, Kahn Lewis P. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. Veterinary Parasitology. 2006, 142: 1-15 s.

Ochodnický D, Poltárský J. Ovce, kozy a prasata. 1. vyd. Bratislava: Příroda, 2003: 104 s.

Páv J, et al. Choroby lovné zvěře. 1. vyd. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1981: 272 s.

Ploeger H.W, Everts R.R. Alarming levels of anthelmintic resistance against gastrointestinal nematodes in sheep in the Netherlands. *Veterinary Parasitology*. 2018, 262: 11-15 s.

Prušková Ludmila. Výsledky parazitologické kontroly jehňat v grantovém experimentu I. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2008: 53 s.

Raisová Stuchlíková Lucie, et al. Metabolism of albendazole, ricobendazole and flubendazole in *Haemonchus contortus* adults: Sex differences, resistance-related differences and the identification of new metabolites. *IJP: Drugs and Drug Resistance*. 2018, 8: 50-58 s.

Reece O. W. Fyziologie domácích zvířat. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 1998: 449 s.

Riou M, Koch C, Delau B, Berthon P, Kerboeuf D. Immunolocalisation of an ABC transporter, P-glycoprotein, in the eggshells and cuticles of free-living and parasitic stages of *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*. 2005, 96(3): 142-148 s.

Ryšavý B, Černá Ž, Chalupský J, Országh I, Vojtek J. Základy parazitologie. 1.vyd. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989: 216 s.

Ryšavý B, Erhardová B. Parasiti ovcí. 1.vyd. Praha: Nakladatelství Československé akademie věd, 1953: 192 s.

Sambraus H. H. Atlas plemen hospodářských zvířat. 1. vyd. Praha: Brázda, 2006: 296 s.

Sargison N. D. Pharmaceutical treatments of gastrointestinal nematode infections of sheep-Future of anthelmintic drugs. *Veterinary Parasitology*. 2012, 189(1): 79–84 s.

Skoupá L. Začínáme s chovem ovcí a koz. 1. vyd. Praha: Brázda, 2014: 104 s.

Škávová Karolína. Výsledky koprologických vyšetření ovcí (*Ovis ammon* f. *aries*) infikovaných modelovým parazitem a ošetřených vybraným anthelmintikem. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta, Hradec Králové, 2013: 69 s.

Šonka F, Petržílka S, Zadina J, Horák F, Duben J. Drobnochovy hospodářských zvířat. 1. vyd. Praha: Profi Press, 2006: 216 s.

Štolc L, Nohejlová L, Štolcová J. Základy chovu ovcí. 3. vyd. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací, 2007: 79 s.

Taylor M. A, Coop R. L, Wall R. L. Veterinary parasitology. 4. vyd. Oxford, UK:Wiley Blackwell, 2016: 1006 s.

Thienpont D, Rochette F, Vanparijs O. F. J. Diagnosing Helminthiasis by Coprological Examination. 2.vyd. Beerse, Belgium: Janssen Research Foundation, 1986: 205 s.

Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv. Registrované veterinární léčivé přípravky 2014. 1. vyd. Hradec Králové: Prion, 2014: 1200 s.

Várady M, Papadopoulos E, Dolinska M, Königová A. Anthelmintic resistance in parasites of small ruminants: sheep versus goats. *Helmintologia*. 2011, 48(3): 137-144 s.

Vokřál I, et al. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology*. 2012, 139(10): 1309–1316 s.

Volf P, Horák P. Paraziti a jejich biologie. 1. vyd. Praha: TRITON, 2007: 318 s.

Zajac A. M. Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants: Life cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. *Vetrinary Clinics: Food Animal Practice*. 2006, 22(3): 521-541 s.

Seznam webových stránek:

ČSÚ. Stavby hospodářských zvířat-Česká republika 31.05.2018. In: *Český statistický úřad*.

Dostupné na URL:

https://www.czso.cz/documents/10180/61508116/zemcr053118_5.xlsx/286fb886-3551-4cc0-9aa9-9e0da134bbca?version=1.1

Přístup 15. 3. 2019

ÚSKBVL. Aktuálně registrované VLP. In: *Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv*. 2. 3. 2017. Dostupné na URL: <http://www.uskvbl.cz/cs/registrace-a-schvalovani/registrace-vlp/seznam-vlp/aktualne-registrovane-vlp>

Přístup 1. 4. 2019

Anonym. Parasitic worms. In: *BUG Consortium*. Dostupné na URL:

<https://bugconsortium.files.wordpress.com/2014/10/lifecycle-e1412846397512.png?w=300&h=267>

Přístup 1. 4. 2019