

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

Katedra zoologie a rybářství

**Testování účinnosti anthelmintik používaných
v chovech ovčí pomocí metod in vivo**

uplatněná certifikovaná metodika



**Autoři: Ing. Štěpánka Scháňková,
prof. Ing. Iva Langrová, CSc.
Ing. Jaroslav Vadlejch, Ph.D.
doc. Ing. Ivana Jankovská, Ph.D.**

**Dedikace: uplatněná certifikovaná metodika vznikla za podpory MZE ČR,
NAZV č. QI111A199**

© 2013

Autorský kolektiv:

**Ing. Štěpánka Scháňková,
prof. Ing. Iva Langrová, CSc.
Ing. Jaroslav Vadlejch, Ph.D.
doc. Ing. Ivana Jankovská, Ph.D.**

**Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů, Katedra zoologie a rybářství, Kamýcká 129,
165 21 Praha6 Suchdol**

Dedikace výsledků typu „N“ - Uplatněná certifikovaná metodika vznikla za
podpory MZE ČR, NAZV č. QI111A199

Uplatněná certifikovaná metodika byla Ministerstvem zemědělství schválena
dne 27. 11. 2013 pod č. 17210/2013-8

Určení publikace:

Publikace je určena pracovníkům v oblasti chovu ovcí. Mezi cílové skupiny lze zařadit
především chovatele, chovatelské svazy, řídící pracovníky, poradce i veterinární lékaře.

Oponenti:

doc. MVDr. Daniela Lukešová, CSc.
Fakulta tropického zemědělství, ČZU v Praze
Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 Suchdol

ISBN 978-80-213-2411-4

Testování účinnosti anthelmintik používaných v chovech ovcí pomocí metod in vivo

Abstrakt:

Předkládaná metodika se zabývá stále se zvyšující resistencí endoparazitů ovcí na běžně aplikovaná anthelmintika a s jejich negativními ekonomickými dopady na chov ovcí v České republice. V metodice jsou popsány metody zjišťování rezistence hlístic na podávaná anthelmintika in vivo, a to v několika modifikacích. Jsou popsány i zjednodušené verze tak, aby si i drobný chovatel mohl otestovat účinnost aplikovaných anthelmintik. Dále práce obsahuje přehled nejběžněji se vyskytujících endoparazitů včetně obrazových příloh a doporučení pro chovatele v boji s parazity či seznam dostupných anthelmintik zahrnujícího průměrné ceny daných přípravků a jejich dávky potřebné na odčervení jednoho zvířete. Veškeré zde popsané vyšetřovací metody vychází z ověřených zkušeností autorů metodiky a samotné práci předcházely rozsáhlý výzkum.

Klíčová slova: Ovce, Rezistence, Anthelmintika, Metody in vivo, Ekonomika

Testing the efficacy of anthelmintics used in sheep breeding through in vivo methods

Abstract

This methodology deals with the increasing resistance to sheep endoparasites against commonly applied anthelmintics and their negative economic impact on sheep farming in the Czech Republic. The methodology described a several modifications in vivo methods for the detection of resistance to nematodes against anthelmintic. There are described as simplified versions so that even small breeders could to test the effectiveness of applied anthelmintics. The methodology also contains an overview of the most commonly endoparasites including picture attachments and recommendations for breeders in tackling parasites or a list of available anthelmintics including average prices of the products and their doses needed for worming of one animal. All the described assay are based on the verified experience of the methodology authors and the work was preceded by extensive research.

Key words: Sheep, Resistance, Anthelmintics, In vitro methods, Economics

OBSAH

I. Cíl metodiky	1
II. Popis metodiky.....	1
1. Současný stav	1
2. Přehled endoparazitů ovcí a jejich rozšíření v České republice	2
3. Jak vzniká rezistence na léčiva?	8
4. Opatření v boji s gastrointestinálními (GI) hlísticemi	Chyba! Zložka není
definována.	
4.1 Doporučení chovatelům ovcí k zamezení výskytu rezistence na léčiva	Chyba!
Zložka není definována.	
5. Metodická část	Chyba! Zložka není definována.
5.1 Laboratorní postup zjišťování účinnosti anthelmintik in vivo	/FECRT.....Chyba! Zložka není definována.
5.2 Použití zjednodušeného testu pro chovatele ke zjišťování účinnosti	anthelmintik in vivo /FECRT
Chyba! Zložka není definována.	
5.3 Zjednodušená metoda pro chovatele ke zjištění počtu vajíček v gramu výkalů	(EPG – eggs per gram).....Chyba! Zložka není definována.
5.3.1 Varianta A: s využitím McMasterovy počítací komůrky	Chyba! Zložka
není definována.	
5.3.2 Varianta B: bez využití McMasterovy počítací komůrky	Chyba! Zložka
není definována.	
III. Nové postupy a jejich srovnání s tradičními přístupy.....	16
IV. Aplikace metodiky v terénní praxi.....	16
V. Ekonomické aspekty.....	Chyba! Zložka není definována.
VI. Seznam použité související literatury	19

VII. Seznam publikací, která předcházely metodice.....	22
VIII. Dedikace k příslušnému projektu.....	23

I. Cíl metodiky

Endoparazité patří k hlavním problémům chovatelů ovcí a ročně způsobují celosvětově velké finanční ztráty. Zvláště nebezpečné jsou hlístice druhů *Haemonchus contortus*, případně *Oesophagostomum columbianum*. Další druhy endoparazitů mohou způsobovat závažná onemocnění, především u mláďat. Základem preventivních opatření při likvidaci těchto hlísti u ovcí je podávání anthelmintik. V posledních letech se však účinné látky nejběžnějších skupin anthelmintik (benzimidazoly, imidazothiazoly, makrocyclické laktony) stávají neúčinnými, zvláště při časté a nesprávné aplikaci. Bohužel, tento jev byl zaznamenán i mezi ovci chovanými v České republice. Za účelem zjištění rezistence cizopasníků na aplikovaná antiparazitika byla vyvinuta celá řada testů především pro laboratorní využití. Hlavním cílem této metodiky je seznámit chovatele s aplikovanou in vivo metodou, k průkazu nižší účinnosti léčiv, která se může snadno vyskytnout i v jejich stáde ovcí. Metodika je dále doplněna obecnými informacemi o rezistenci a poukazuje na rozšíření gastrointestinálních hlístic ovcí (GI hlístic) v podmínkách ČR.

II. Popis metodiky

1. Současný stav

Ovce poskytují člověku mnohostrannou užitkovost, která v sobě zahrnuje produkci vlny, mléka, masa či kůže, ale i mrvy, loje, lanolínu, střev, krve, předžaludků, paznehtů i rohů. V posledních letech si chov ovcí v České republice nachází mnoho příznivců, a to hlavně pro jejich relativně velkou odolnost vůči povětrnostním vlivům a díky jejich nenáročnosti v otázce požadavků na chovatelské podmínky. Tato skutečnost se stává hlavním potenciálem ovcí při využití pastvy coby základní technologie jejich chovu. Pastva se v současnosti stále více využívá jako forma šetrného hospodaření obzvláště v oblastech chráněných či hůře dostupných zemědělské technice.

Od poloviny 90. let dvacátého století došlo v rámci chovu ovcí k významnému snížení výrobních dotací na nákup vlny a jehněčího masa, což vedlo k poklesu stavů chovaných zvířat o celých 80 % (!). Tyto poklesy chovaných zvířat byly zapříčiněny kromě jiného snížením spotřeby a nevyužíváním mléčné a masné produkce ovcí či nízkou plodností chovaných plemen a jejich celkově horším zdravotním stavem. Poslední zmíněný bod je jedním z nejdůležitějších mezníků, na němž je třeba pracovat i do

budoucná. A právě vhodný systém kontroly endoparazitů včetně kontroly resistance na léčiva patří mezi nezbytné součásti odpovídajícího managementu dnešních chovů, neboť jen tak lze stáda ovcí udržovat v dobré kondici a dobrém zdravotním stavu.

2. Přehled endoparazitů ovcí a jejich rozšíření v České republice

Parazitární onemocnění způsobené hlísticemi zůstává jedním z nejvíce limitujících faktorů úspěšné, udržitelné světové produkce hospodářských zvířat včetně ovcí (Domke et al., 2011). Z hlediska zoologického systému a taxonomie, u ovcí parazitují hlístice různých taxonomických řádů. Z řádu Enoplida jsou nejčastějšími parazitujícími zástupci kosmopolitně rozšíření tenkohlavci rodu *Trichuris* vyskytující se ve tlustém střevě hostitele. Tělo těchto parazitů je rozděleno na dvě části: přední, úzkou, která je zanořena do slizničního epitelu střeva a zadní, mnohem silnější část, která obsahuje pohlavní orgány. Jejich vývojový cyklus je přímý, bez mezipřehostitele. Původce se ve vnějším prostředí šíří pomocí silnostěnných vajíček s pólovými zátkami, které se uvolňují po požití v tenkém střevě. Vajíčka se stávají infekčními, při obvyklých podmínkách, cca za 1-2 měsíce. Vajíčka jsou na pastvině životaschopná po řadu let. Při silných infekcích dochází k zánětlivým změnám sliznice, krvácení, edémům a dehydrataci. Infekce probíhá nejčastěji bez klinických příznaků, při silných infekcích pak zvířata ztrácejí chuť k jídlu, mají pomalý pulz a nízkou dechovou frekvenci. Diagnostika se provádí na podkladě mikroskopického nálezu charakteristicky zbarvených hnědých vajíček (Griffiths, 1978). U ovcí je nejrozšířenější **tenkohlavec ovčí (*Trichuris ovis*)** viz obr. č.1 a 2.

Z řádu Rhabditida (hád'ata) parazituje u ovcí v tenkém střevě **hádě dobytčí (*Strongyloides papillosus*)** vyskytující se kosmopolitně s různou prevalencí (obr. č. 3). U těchto hlístic se ve vývojovém cyklu střídají volně žijící a parazitické generace. V hostiteli pak parazitují partenogenetické samice, které kladou embryonovaná vajíčka (Boch and Supperer, 1971). Z vajíček se během krátké doby líhnou larvy 1. stadia, které se svlékají a dorůstají v larvy 2. a 3. stadia. Larvy 3. stadia mají charakteristický rhabditoidní hltan a z nich se vyvíjí volně žijící generace. Pokud je jícen rovný, tzv. filariformní, výhradně tyto larvy se stávají infekčními pro hostitele–ovci. Larvy do hostitele pronikají přes kůži či po požití potravy. V hostiteli se dostávají lymfou a krví do srdce, plic, průdušnice, hrtanu a poté do

střeva, kde se svlékají do 4. a 5. (adultního) stádia. Diagnostika se provádí koprologickým vyšetřením, s nálezem typických vajíček (Viney and Lok, 2007).

Do řádu Strongylida jsou zařazeny převážně hlístice vyskytující se u ovcí. Za nejnebezpečnější je považována **vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*)**. Tyto hlístice (obr. č. 4 a 5) sají krev, jsou velmi patogenní. Způsobují poruchy trávení, záněty sliznice, edémy, krvácení a následně i anémii. Na povrchu sliznice slezu se mohou nacházet uzlíky a patrné bílé skvrny. Vylučování tmavých výkalů u zvířat může nastat v důsledku přítomnosti krve. Nejvnímavějšími jedinci jsou jehňata a ovce do 2 let věku, s klinickými příznaky průjmu, třesu a nechutenství. K diagnostice původce se využívají metody koprologické a tzv. koprokultury (Kaufmann and Kaufmann, 1996).

Další, celosvětově rozšířenou hlísticí, je ***Teladorsagia circumcincta*** (obr. č. 6), která je lokalizována také ve slezu, na rozdíl od **vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*)** však nesaje krev. Tato hlístice narušuje fyziologii trávení u ovcí a dochází k růstu z pH=2 na hodnotu pH=7, což má vliv na růst počtu bakterií a následný vznik průjmů. Zvířata následně hubnou, ztrácejí chuť, jsou ve špatné tělesné kondici a jsou apatická. K diagnostice se využívá koprologické vyšetření výkalů a (Clutton metody koprokultury – Brock and Pemberton, 2004).

Paraziti rodu ***Nematodirus***, s druhy ***Nematodirus filicolis***, ***N. battus*** a ***N. spathiger***, se nacházejí v tenkém střevě a jsou rozšířeni celosvětově. Mají zredukovanou ústní kapsulu. Hlístice pronikají do hlubších vrstev sliznice a způsobují v tenkém střevě, atrofii klků a zánět sliznice, která produkuje velké množství hlenu. Zvířata mají často vodnaté průjmy. K diagnostice se využívají rovněž koprologické metody (Cox et al., 2005; Georgi, 1974).

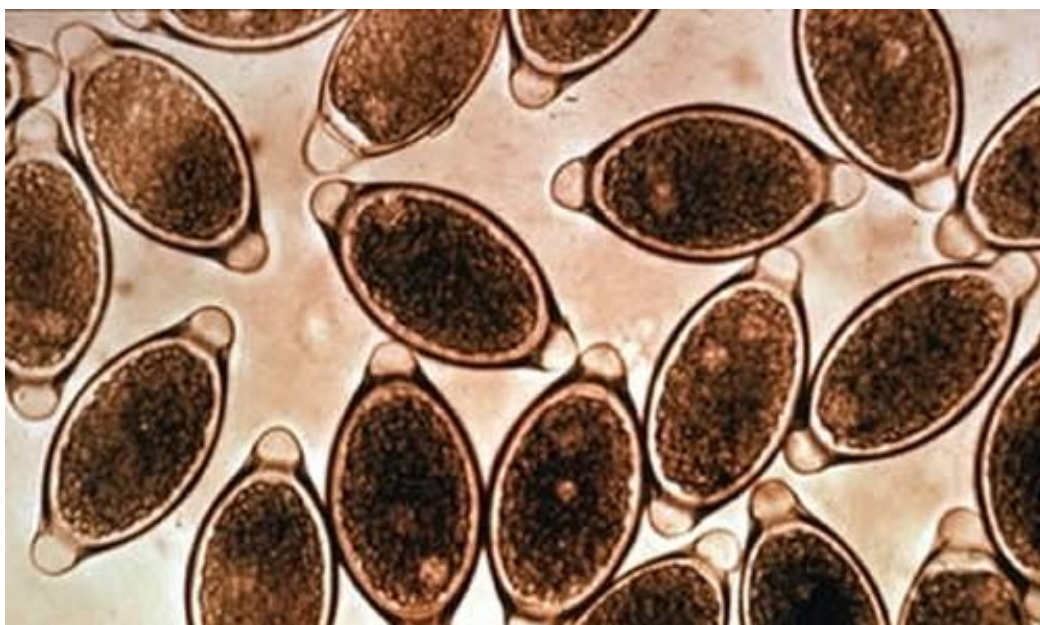
Zubovka ovčí (*Chabertia ovina*) vytváří změny na sliznici tlustého střeva, kdy velkou ústní kapsulou (obr. č. 7) a příslušnými žlázami narušuje sliznici, která je stává edematózní, překrvenou a ztlustělou. Silné infekce jsou provázeny průjmy. Identifikace se provádí na základě infekčních larev kultivovaných z výkalů (Blagburn and Dryden, 1999).

Neméně významnou hlísticí je ***Oesophagostomum venulosum***, z řádu Strongylida vyskytující se také v tlustém střevě. Živí se krví hostitele a parazituje u ovcí, koz, srnčí zvěře a velbloudů a je rozšířena v mírném pásu a středozemní oblasti (Cox et al., 2005).

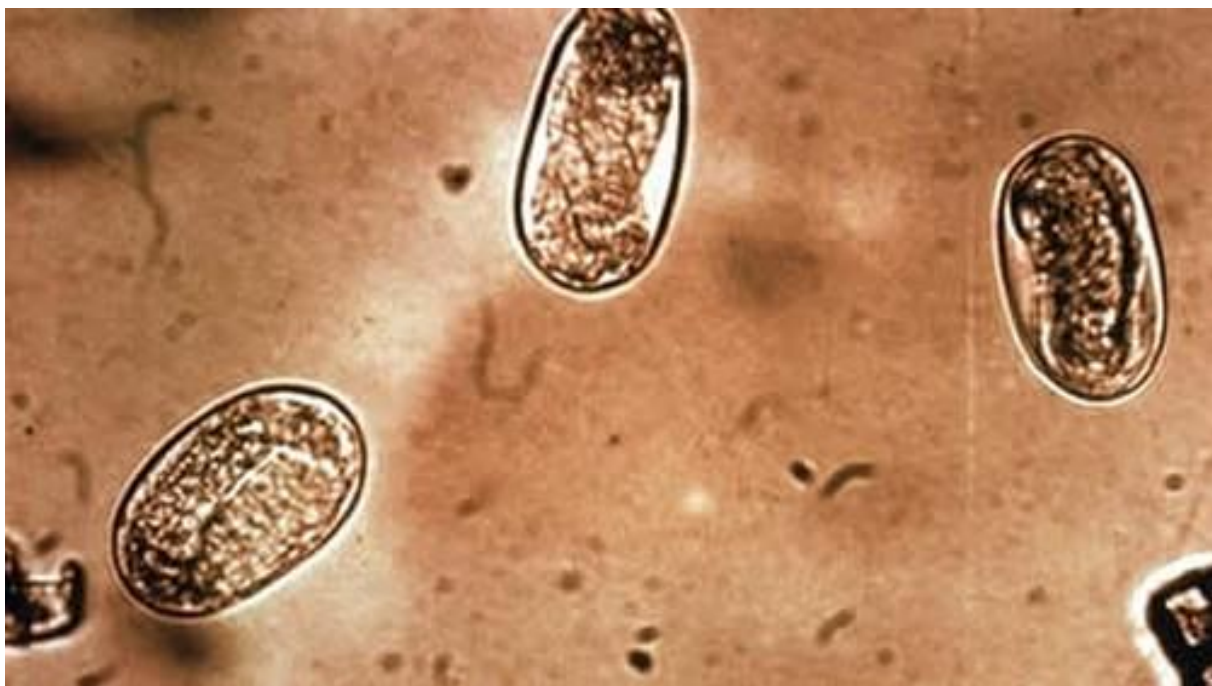
Mezi nejrozšířenější gastrointestinální hlístice ovcí patří drobné hlístice rodu ***Trichostrongylus***, s druhy ***Trichostrongylus axei*** (obr. č. 8), ***T. colubriformis***, ***T. vitrinus***. Tyto hlístice jsou lokalizovány dle druhu ve slezu nebo v tenkém střevě. Při silných infekcích je pozorována ztráta chuti, průjem, anémie, hubnutí až úhyn. Slabé infekce probíhají bezpříznakově (Georgi, 1974; Boch and Supperer, 1971).



Obr. č. 1: *Trichuris ovis* – dospělci



Obr. č. 2: *Trichuris ovis* – vajíčka



Obr. č. 3: *Strongyloides papillosus* – vajíčka



Obr. č. 4: *Haemonchus contortus* – dospělci



Obr. č. 5: *Haemonchus contortus* – koncová část těla samce, zvětšeno 200 x



Obr. č. 6: *Teladorsagia circumcincta* – vajíčka



Obr. č. 7: *Chabertia ovina* – hlavová část, zvětšeno 100 x



Obr. č. 8: *Trichostrongylus axei* – vajíčka

3. Jak vzniká rezistence na léčiva?

Obecně lze rezistenci charakterizovat jako schopnost jedinců určitého kmene parazitů (ve smyslu biologicky rozdílných kmenů určitého druhu) tolerovat dávku určité látky, která je pro většinu individuí normálně vnímavé populace letální. Tato rezistence se projevuje sníženou účinností terapeutické dávky, přičemž k docílení normální účinnosti je potřeba buď zvýšeného dávkování, nebo častějšího opakování léčby, což neúměrně zvyšuje náklady na léčbu a v konečné fázi je nutná změna antiparazitika (Chroust, 2000).

Důležitým faktorem, který je nutno brát v úvahu, je **dědičnost rezistence**. Současná znalost genetických principů rezistence je nedostatečná. Je zřejmé, že čím častěji jsou aplikována antiparazitika, tím rychleji a ve větším rozsahu se rezistence vyvíjí. Důvodem je intenzivnější selekce genů rezistence, které jsou přenášeny do dalších generací. Geny citlivosti hlístic na léčivo se každou další generací zředují, zároveň se zvyšováním frekvence genů rezistence. Přenos genů rezistence se řídí principy J.G. Mendela (Sangster, 1999).

Zkušenosti ukazují, že zpočátku je vývoj rezistence pomalejší. Po výskytu rezistence dochází k relativně rychlému stupňování až do maxima. To je předurčeno počátečním objevením genů rezistence a následně jejich akumulací do stadia, kdy dochází k selhání léčby. Důvodem je partnerství přítomnost genů rezistence ve většině populací hlístic, nebo determinace vzniku rezistence jednoduchými genovými mutacemi. Protože geny rezistence jsou ochotně selektovány každým ošetřením a frekvence těchto genů se přímo zvyšuje s množstvím ošetření, je nutné v procesu snižování genů rezistence v populaci klást důraz na celkový management léčby parazitóz. Ačkoliv to může znít příliš zjednodušeně, rezistence vůči benzimidazolům u *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* a *Teladorsagia circumcincta* je zdůvodňována bodovou mutací u β -tubulinového isotypu. Tyto kroky mohou nastat po několika generacích a poskytují tak potenciál pro rychlý rozvoj rezistence (Permin and Hansen, 1998). Mechanismus rezistence hlístic vůči ivermectinu je podstatně méně jasná, kdy se pravděpodobně jedná o zvýšenou produkci P-glykoproteinu (Ardelli and Prichard, 2013).

4. Opatření v boji s gastrointestinálními (GI) hlísticemi

Základním předpokladem v boji s endoparazity, jež mohou kontaminovat pastviny a následně i pasoucí se ovce, je podrobit všechna zvířata před první pastvou řádné veterinární prohlídce a zvířata nemocná, či podezřelá z infekčního onemocnění, na pastviny nepouštět. Veškeré prostory, kde se ovce zdržují, zejména ovčiny a jejich vnitřní zařízení, je třeba

pravidelně dvakrát ročně čistit, účinně dezinfikovat a dekontaminovat. Pokud je to možné, použít horkou páru. Kromě toho by se celé stáje měly každý rok vybělit a je nutné brát zřetel i na skutečnost, že pokud má být dezinfekce stájí vsutku účinná, tak je takřka nezbytná nejprve mechanická očista.

Vyjma vhodné péče o stáje nesmí být opomíjena asanace pastviny, která spočívá zejména v pravidelném odstraňování výkalů, aby došlo ke zničení patogenních mikroorganismů a vývojových stádií parazitů. Nejvhodnější pro ovce jsou pastviny, které jsou suché, nezamokřené, nezarostlé křovím, slunečné, s možností napájení zdravotně nezávadnou vodou, nezamořené vývojovými stadii parazitů. Použití správných agrotechnických postupů k ošetření pastvin významně omezuje jejich kontaminaci infekčními stadii endoparazitů.

Rozhodujícím faktorem k zabránění přežívání endoparazitů zůstává aplikace vhodných anthelmintik. Po podání anthelmintik by ovce měly zůstat tři dny v ovčíně, aby nedošlo k zamoření pastvin vývojovými stadii endoparazitů z výkalů nakažených ovcí. Infekcemi endoparazitů trpí zejména mladá zvířata a jehňata a tudíž by měla vždy přijít na tzv. čistou pastvinu, za níž se považuje plocha, na které se optimálně po dobu dvanácti uplynulých měsíců nepasla jehňata či mladé ovce.

Anthelmintika jsou sloučeniny, které působí na helminty v gastrointestinálním traktu a dalších tkáních a orgánech hostitele. V současné době je dostupný rozsáhlý výběr bezpečných anthelmintik, se širokospektrálním účinkem, či se specifickou účinností proti parazitární infekci. Mnoho látek je účinných jak proti dospělým jedincům, tak i jejich larvám, a to ve všech stádiích jejich vývojového cyklu, včetně stádií tzv. hypobiotických, které dočasně pozastavují svůj vývoj (Hansen and Perry, 1994; Novák et al., 2008).

4.1. Doporučení chovatelům ovcí k zamezení výskytu rezistence na léčiva

1. Dodržování karantény nových i čerstvě odčervěných zvířat
2. Správná aplikace léčiv a dodržování správné aplikační dávky podle hmotnosti a věku a zamezit podávání nižší dávky!
3. Optimálně léčit pouze zvířata s vysokým počtem vajíček zjištěných ve výkalech či s patrnými klinickými příznaky onemocnění
5. Neaplikovat léčiva příliš často a v pravidelných intervalech střídat účinné látky

5. Metodická část

Za účelem zjištění resistance cizopasníků na aplikovaná antiparazitika byla vyvinuta celá řada různých testů. Každý z nich se vyznačuje charakteristickými klady i zápory, zejména v souvislosti se spolehlivostí či možností interpretace výsledků. Ze skupiny tzv. in vivo metod je nejvyužívanější a nejvyhledávanější metodou tzv. test redukce počtu vajíček ve výkalech, neboli Faecal Egg Count Reduction Test (FECRT).

FECRT je nejvíce rozšířenou metodou k ověření účinnosti všech skupin anthelmintik proti gastrointestinálním hlísticím u hospodářských zvířat, bez ohledu na účinek jejich mechanismu. Provedení testu spočívá v kvantitativním hodnocení vajíček hlístic z výkalů zvířete, v momentě ošetření anthelmintikem a následně v přesně určeném čase po ošetření.

5.1 Laboratorní postup zjišťování účinnosti anthelmintik in vivo /FECRT

V chovu ovcí odebereme vzorek výkalů od několika jedinců (optimálně 10 kusů), a pomocí koprologických flotačních metod a McMasterových počítacích komůrek zjistíme počet vajíček parazitů v 1 gramu výkalů (Eggs Per gram = počet vajíček/1g výkalů). Jestliže výsledek převyšuje hodnotu 200, přistupujeme k vlastnímu testu.

V chovu vytvoříme 4 náhodné skupiny zvířat (optimální počet zvířat $n = 15$). Každou skupinu odčervíme anthelmintikem, s rozdílnou účinnou látkou. Použijeme: 1. benzimidazoly (BZ), 2. levamisol (LEV), 3. kombinaci BZ/LEV, 4. ivermectin (IVM).

Vyšetřované ovce by měly být mladá zvířata po odstavu, nejlépe ve věku 3-6 měsíců, kterým nebyla dosud anthelmintika podávána. Pokud to není možné, podáváme léčivé přípravky zvířatům, která nebyla ošetřena 6 týdnů před touto aplikací, případně 12 týdnů po posledním ošetření, aby byl eliminován vliv podaných anthelmintik.

Jednotlivé skupiny zvířat by měly být vzájemně rozlišeny (např. barevně) a číslo ušní známky příslušného zvířete zaznamenáno do zdravotní evidence.

Anthelmintika musí být aplikována zvířatům dle návodu, nejlépe pomocí kalibrovaného aplikátoru (např. injekční stříkačka) či kalibrované pistole, aby podaná dávka odpovídala hmotnosti zvířete. Obecně platí: nikdy neaplikujeme zvířatům nižší dávkou, než je předepsaná hmotnost! Jednou z možností, jak určit aplikační dávku, je její stanovení podle

hmotnosti nejtěžšího kusu zvířete ve skupině.

Za 10 až 14 dnů po ošetření testovaných zvířat anthelmintiky (u levamisolu 3-7 dnů, u benzimidazolů 8-10 dnů, u makrocyclických laktonů 14–17 dnů, u některých i 28 dnů) se odebírají vzorky výkalů o hmotnosti 2-5 g (velikost ořechu), dle předepsané doby účinnosti, která je uváděna v příbalovém letáku léčivého přípravku.

Odebrané vzorky výkalů se následně umísťují do uzavřených označených nádob (PVC sáčků) a musí být dopraveny do laboratoře během 12 hodin. Během přepravy by měly být uchovávány v chladu.

V laboratoři jsou koprologicky vyšetřeny pomocí flotačních roztoků a McMasterových počítacích komůrek a u každého zvíře je zjištěna hodnota EPG a spočítána průměrná hodnota pro danou skupinu zvířat. K interpretaci výsledků pro ovce je doporučována metoda FAO (Roepstorff and Nansen, (1998). Podle francouzských autorů (Cabaret and Berrag, 2004) je za rezistenci na anthelmintikum považována hodnota FECRT rovna či menší než 95 %.

5.2 Použití zjednodušeného testu pro chovatele ke zjišťování účinnosti anthelmintik in vivo /FECRT

Nejprve je nutno odebrat vzorky výkalů od jednotlivých ovcí (5–10 % kusů ze stáda). Je nutné jednotlivé kusy viditelně označit (např. barevně) a zaznamenat číslo ušní známky do protokolu. Výkaly vyšetříme jednou z variant zjednodušené metody pro zjištění počtu vajíček na gram výkalu (kapitola 4.3).

Vybraným ovcím aplikujeme dle návodu přesnou dávku anthelmintika. Velmi důležité je nepodhodnotit hmotnost zvířete.

Po uplynutí 14 dnů zopakujeme u jednotlivých skupin zvířat odběr výkalů a provedeme vyšetření. Výpočet účinnosti anthelmintika viz tabulka 1.

Tab. č. 1: Příklad postupu vyhodnocení kompletního vyšetření FECRT

Označení zvířete	Počet vajíček /1g výkalů (vzorek před odčerváním)	Počet vajíček /1g výkalů (vzorek po odčervení)	Rozdíl	Výpočet
Ovce 1	1600	360	1240	$(360 - 1600) : 1600 \times 100 = 77,5 \%$

Anthelmintikum je účinné, když hodnota FECRT je rovna či menší 5 %.

5.3 Zjednodušená metoda pro chovatele ke zjištění počtu vajíček v gramu výkalů (EPG – eggs per gram)

Výše uvedený test lze provádět i mimo laboratoř, stačí mít příslušné vybavení, které je běžně dostupné i v domácnosti:

5.3.1 Varianta A: s využitím McMasterovy počítací komůrky

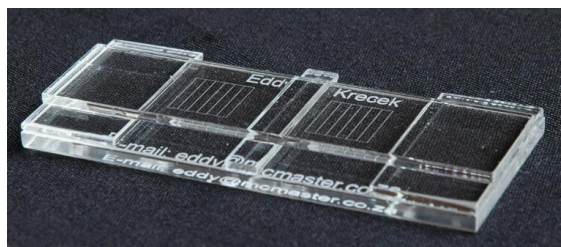
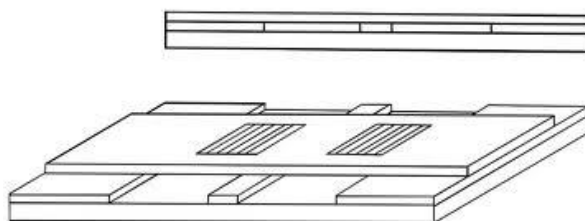
sáčky na odběr výkalů
malé jednorázové kelímky, nádobky
barevný značkovač
malá miska
menší sítko
tlouček od hmoždíře
cukr
džbánek
odměrka pro objem 30 ml (polévková lžice)
váha (pro hmotnost v gramech)
jednorázové rukavice
lubrikant, gel, olej
oční kapátko
McMasterova počítací komůrka
mikroskop

Připravíme si cukerný roztok (smísením zhruba $\frac{1}{4}$ šálku cukru a 1 šálku vody). Pro urychlení procesu rozpuštění cukru je možné směs zahřát.

Odebereme vzorky čerstvých výkalů ovci do označených sáčků (kelímků, nádob), cca 2-5 g. Nemáme-li váhu k navážení hmotnosti v gramech, lze odebrat cca 2 čerstvé bobky trusu o průměru 1 cm.

Takto odebrané a případně navážené vzorky výkalů se umístí do sítka (případně menšího cedníku), které položíme do malé misky. Vzorky jsou následně smíchány s 28 ml cukerného roztoku z 30 ml injekční stříkačky či malé odměrky (objem 30 ml=2 polévkové lžíce).

Vzorky výkalů v cedníku se následně rozmělní tloučkem z hmoždíře či jinou pomůckou až do úplného smísení a rozpuštění v cukerném roztoku. Sítko či malý cedník zachytí velké částice z podestýlky nebo nestráveného krmiva, tento zbytek zachycených hrubých nečistot k dalšímu vyšetření již nepoužíváme. Cukerný roztok s obsahem vajíček (tekutina z malé misky) pomocí očního kapátka nabere a opatrně aplikujeme do obou částí McMasterovy počítací komůrky (obr. č. 9 a 10).



Obr. č. 9 a 10: McMasterova počítací komůrka (Zdroj: <http://www.mcmaster.co.za>).

Směs cukerného roztoku a vzorku trusu se v naplněné McMasterově počítací komůrce ponechá v klidu cca 5 min. Tento čas lze využít k přípravě dalších vzorků.

Pro mikroskopické vyšetření lze použít mikroskop, který je vybaven objektivem se zvětšením 4x (případně 10x). Na pracovní stůl mikroskopu položíme McMasterovu počítací komůrku a zaostříme mřížku se zachycenými vajíčky. Pro zjištění hodnoty EPG je nutné brát v úvahu ta vajíčka, která jsou nalezena uvnitř mřížky!

Počet vajíček nalezených v obou komůrkách se sečte a vynásobí číslem 50, abychom získali celkový počet vajíček parazitů v 1 gramu výkalů zvířete (tab. 2).

Tab. č. 2: Příklad postupu vyhodnocení výkalů na parazity – počet vajíček na gram výkalů (EPG).

Označení zvířete	Počet vajíček v komůrce 1 (levá komůrka)	Počet vajíček v komůrce 2 [*] (pravá komůrka)	Výpočet	Počet vajíček parasitů na 1 gram výkalů zvířete
Ovce 1	16	14	$(16 + 14) \times 50$	1000
Ovce 2	22	12	$(22 + 12) \times 50$	1700

5.3.2 Varianta B: bez využití McMasterovy počítací komůrky

sáčky na odběr výkalů
malé jednorázové kelímky, nádobky
barevný značkovač
malá miska
menší sítko
tlouček od hmoždíře
sůl
džbánec
odměrka pro objem 30 ml (polévková lžice)
váha (pro hmotnost v gramech)
jednorázové rukavice
lubrikant, gel, olej
oční kapátko
zkumavka (případně stojan)
podložní a krycí sklička
mikroskop

Postup je obdobný jako v případě varianty A, je však nutné připravit nasycený roztok kuchyňské soli (NaCl) rozpuštěním 27 g NaCl ve 100 ml vody (cca 2 zarovnané polévkové lžice). Směs zahřejeme a necháme vychladnout.

Výkaly zvážíme, rozetřeme s nasyceným roztokem kuchyňské soli a přecedíme přes sítko do připraveného kelímku (nádoby) a naplníme připravenou zkumavku tak, aby hladina na okraji zkumavky vytvořila “čepičku“, na kterou opatrně položíme krycí skličko. Označené zkumavky uložíme přes noc do chladničky.

Následující den zkumavky vyjmeme z lednice, krycí skličko opatrně sejmem a položíme vlhkou stranou na podložní skličko. Po umístění na pracovní stůl mikroskopu počítáme vajíčka parazitů a výpočtem zjistíme jejich počet v 1 gramu výkalů.

III. Nové postupy a jejich srovnání s tradičními přístupy

V metodice jsou uvedeny dosažené výsledky, které byly výzkumně ověřeny v helmintologické laboratoři FAPPZ, obdobně jako při in vivo testování na rezistenci gastrointestinálních hlístic ovcí na používaná anthelmintika. Uváděné informace jsou výsledkem dlouhodobé výzkumné činnosti autorů našeho pracoviště. Mnohaletou odbornou praxí a systematickým studiem vědecké parazitologické literatury na dané téma byly postupy zpřesněny a výstupy jsou pro chovatele malých přežvýkavců snadno aplikovatelné do každodenní praxe.

IV. Aplikace metodiky v terénní praxi

Metodika bude vhodnou pomůckou pro zemědělské podnikatele, konkrétně chovatele ovcí, kteří chtějí mít rentabilní a zdravý chov zvířat. Předložená publikace poskytne těmto chovatelům důležité informace o jednotlivých rodech parazitů a významu sledování rezistence hlístic na anthelmintika. Chovatelům nabídne ověřené postupy k testování účinnosti léčiv ve vlastním stádě ovcí. Výsledky lze využít k průběžnému vzdělávání a v pedagogické činnosti.

V. Ekonomické aspekty

V současné době spočívá význam chovu ovcí zejména v jejich mnohostranné užitkovosti. Ovce kromě hlavních produktů - jakými jsou maso, mléko, vlna, kůže, rohy a paznehty, poskytují i produkty vedlejší, mj. lanolin, střeva, krev, lůj a předžaludky. Nepřímý užitek vzniká i např. coby produkce mrvy, vypásání chráněných území či míst hůře dostupných pro jiná zvířata, popř. techniku (Staněk, 2009).

Od začátku 20. století ztrácel chov ovcí postupně na významu. Zatímco v roce 1910 bylo v Čechách zaznamenáno celkem 153 188 kusů ovcí, o 23 let později, tj. v roce 1933, to bylo pouze 45 568 jedinců. Toto číslo je v porovnání s dochovanými záznamy z roku 1837 hovořících o 2 228 587 kusů vskutku zanedbatelné (Beranová a Kubáček, 2010). Podrobnější přehled o vývoji chovu ovcí na našem území je nastíněn v tabulce 3. Prudký pokles v chovu ovcí byl zapříčiněn zpočátku nezájmem o produkci domácí ovčí vlny, v důsledku dovozu

levnější australské, následně i poklesem spotřeby jehněčího a skopového masa. Výkrm skotu a prasat je v současné době, v porovnání s výkrmem ovcí, finančně mnohem příznivější a od toho se odvíjí i prodejní cena jatečných zvířat (Pindák, 2002). Zejména z tohoto důvodu patří Česká republika ve spotřebě ovčího a jehněčího masa na osobu k zemím s velmi nízkou spotřebou. Ta se v současné době pohybuje zhruba na úrovni 0,15 kg (Staněk, 2009). Cena jatečných zvířat - jehňat se pohybuje v průměru cca 37-42 Kč/kg a u ovcí cca 15-18 Kč/kg (Staněk, 2009).

Tab. 3. Vývoj chovu ovcí na území České republiky (Zdroj: Svaz chovatelů ovcí a koz ČR)

Rok	1945	1960	1990	2000	2007	2009	2011	2012
Ovce celkem (ks)	274 691	228 419	429 714	84 108	168 084	183 084	209 052	221 100

Pořizovací cena jehněte se zpravidla odvíjí od plemene, věku a pohlaví zvířete a běžně se na našem trhu pohybuje od 1800-2200,-Kč za kus. Roční náklady na jednu ovci, do nichž se započítávají náklady na seno ke krmení a na podestýlku, minerální liz, veterinární péči a další základní potřeby, se pohybují zpravidla cca 2000,- Kč, přičemž nejvyšší výdaje tvoří veterinární péče, především za aplikaci anthelmintik. Přehled nejčastěji využívaných a dostupných anthelmintik na českém trhu, společně s jejich cenou a dávkováním je uveden v tabulce 4.

Tab. č. 4. Přehled nejčastěji aplikovaných anthelmintik v chovech ovcí v České republice
(Zdroj: Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv; www.uskvbl.cz)

Komerční název	Účinná látka/ Skupina léčiv	Způsob aplikace	Cena balení (v Kč)	Dávkování
Albex	albendazol/ benzimidazoly	susp.	917,- / 1000ml	1 ml / 20 kg ž. h.
Aldifal	ivermectin/ benzimidazoly	susp.	10 % 873,- / 1000 ml 2,5 % 436,- / 1000ml	0,4 ml /kg ž.h.

Biomectin	ivermectin/ makrocyklické laktony	inj.	1% 3162,- / 500 ml	0,2 ml / 10 kg ž. h.
Cevamec	ivermectin/ makrocyklické laktony	inj.	1% 2290,- / 500 ml 1224,- / 250 ml	1 ml / 50 kg ž. h.
Dectomax	doramectin	inj.	11864,- / 500 ml	1 ml / 50 kg ž. h.
Ecomectin	fenbendazol /benzimidazoly	inj.	1% 2390,- / 500 ml 451,- / 50 ml	1 díl stříčky
Fenbion	fenbendazol /benzimidazoly	plv	122,- / 20 tablet = 1 balení (1 tableta = 250 mg)	1/2 tablety / 2,5 kg ž. h. 50 mg / kg ž.h.
Helmigal	fenbendazol/benzimidazoly	plv	2,5% 33,- / 20g	0,2 - 0,3 g /kg ž. h., 20g /100 kg ž. h.
Ivomec	ivermectin/ makrocyklické laktony	inj.	9254,- / 500 ml	1 ml / 10 kg ž. h. na kůži
Ivomec super	ivermectin, klorsulon/ makrocyklické laktony	inj.	9770,- / 500 ml	0,5 ml / 25 kg ž. h.
Panacur	fenbendazol /benzimidazoly	susp.	3443,- / 1000 ml	7,5 ml / 100 kg ž. h.
Virbamec	ivermectin/ makrocyklické laktony	inj.	2603,- / 500 ml	1 ml / 50 kg ž. h.
Zerofen	fenbendazol /benzimidazoly	susp.	10% 2513,- / 1000ml	3 g /25 kg ž. h.

Je tedy zřejmé, pokud používáme léčiva ztrácející účinnost, že v chovech ovcí dochází ke značným finančním ztrátám a prostředky určené k nákupu takového anthelmintika jsou vynaloženy zbytečně. V chovu dochází i nadále k šíření cizopasníků a kontaminaci prostředí infekčními larvami a postupně se zhoršuje zdravotní kondice celého stáda. Především mladé kusy hubnou, mají průjem a dochází často k úhynům. Pokud plodnost ovcí (dle plemene) dosahuje hodnoty 120–500%, tak v průměrném stádě se zavedenou parazitární kontrolou přežívá cca 70–90 % jehňat (v těch nejlepších až 90–95%). V chovech, kde anthelmintika jsou neúčinná, úhyny zvířat rostou až na 50–70%. Při průměrné ceně 2000 Kč za jehně se jedná o ztrátu 10.000–40.000 Kč na 10 bahnic.

Závěrem lze jen doporučit chovatelům, aby věnovali dostatečnou pozornost účinnosti používaných anthelmintik, neboť výhradně účinné anthelmintikum může být přínosem jak z hlediska ochrany zdraví stáda, tak z hlediska ekonomického.

VI. Seznam použité související literatury

- Beranová, M., Kubáček, A. 2010. Dějiny zemědělství v Čechách a na Moravě. Praha: Lybri, 430 s. ISBN 978-80-7277-113-4.
- Blagburn, B. L., Dryden, M. W. 1999. Pfizer Atlas of Veterinary Clinical Parasitology. Pfizer Animal Health, 45 s. 0967800536, ISBN 9780967800530
- Boch, B. J., Supperer, R. 1971. Veterinärmedizinische Parasitologie. Cornell universite. 408 s. ISBN 3-8304-4135-5. ISBN 978-3-8304-4135-9.
- Cabaret, J., Berrag, B. B. 2004. Faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy: average versus individually based estimations. Veterinary Parasitology 121 (1-2): 105-113
- Clutton – Brock T. H., Pemberton J. M. 2004. Soay Sheep: Dynamics and Selection in an Island Population. Cambridge University Press. Cambridge. 396 s. ISBN: 9780521529907.
- Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., Waller, P. J. 2003. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Veterinary Parasitology. 44. 35-44s.
- Coles, G. C., Jackson, F. Pomroy, W. E., Prichard, R. K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M. A., Vercruysse, J. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Veterinary Parasitology. 136. 167-185s.
- Cox, F. E. G.; Topley, W. W. C.; Wilson, G. S. 2005. Parasitology. Hodder Arnold, 889 s.
- Demeler, J., Schein, E., von Samson-Himmelstjerna, G. 2012. Advances in laboratory diagnosis of parasitic infections of sheep. Veterinary Parasitology. 189 (1), 52 – 64.
- Domke A.V. M., Chartier Ch., Gjerde B., Leine N., Vatn S., Osteras O., Stuen S. 2011. Worm control practice against gastro-intestinal parasites in Norwegian sheep and goat flaks. Acta Veterinaria Scandinavica. 53: 1 - 29
- Georgi, J. R. 1974. Parasitology for veterinarians. Michigan universite. 386 s.

Griffiths, H. J. 1978. A Handbook of Veterinary Parasitology – Domestic Animals of North America. University of Minnesota Press Minneapolis. 248 s.

Fernandez, D. 2012. Fecal Egg Counting for Sheep and Goat Producers. Animal Science. University of Arkansas at Pine Bluff. FSA9608-PD-7-12N.

Hansen, J., Perry, B. 1994. The Epidemiology, Diagnosis and Control of Helminth Parasites of Ruminants. International laboratory for research on animal diseases, Kenya. 171 s.

Chroust, K. 2000. Occurrence of anthelmintic resistance in strongylid nematodes of sheep and horses in the Czech republic. Vet. Med, 45, 233 – 239.

Kaufmann, J., Kaufmann, H. 1996. Diagnostic Manual: Parasitic Infections of Domestic Animals. Birkhäuser Basel. 423 s.

Levecke, B., Dobson, R.J., Speybroeck, N., Vercruysse, J., Charlier, J. 2012. Novel insights in the faecal egg count reduction test for monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes of veterinary importance. Veterinary Parasitology, 188 (3- 4): 391 – 396.

Novák, P., Kočišová, A., Malá, G., Kamarádová, J., Kellerová, E. 2008. Zásady asanace v chovech ovcí. Zemědělec, 44, 80.

Permin, A., Hansen, J. W. 1998: Epidemiology, diagnosis and control of swine parasites. FAO Animal Health Manual, 4, 90 – 99.

Pindřák, A., Horák, F. Mareš, V. 2002. Atlas plemen ovcí a koz chovaných v ČR. Brno: SCHOK, 73 s.

Roepstorff, A., Nansen, P. 1998. Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine, FAO Animal Health Manual, Rome

Sangster, N. C. 1999. Anthelmintic resistance: past, present and future. Intern. J. Parasitol., 29, 115 – 124.

Viney, M. E., Lok J. B. 2011. *Strongyloides* spp. WormBook. May 23. 1 – 15.

Internetové zdroje:

Anonym, 1. Anthelmintic resistance. (Dostupné z: http://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/vetmanual/specimens-by-disease-syndrome/diseases_of_livestock/anthelmintic_resistance)

Staněk, S. 2009. Chov ovcí obecně. Dostupné z: <http://www.zootechnika.cz/clanky/chov-ovci/chov-ovci-obecne/zaklady-vyzivy-ovci.html>

SCHOK. Svaz chovatelů ovcí a koz ČR. Dostupné z: <http://www.schok.cz/>

USKVBL. Ustav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv. Dostupné z: <http://www.uskvbl.cz/>

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Vadlejch J., Kopecký, O., Kudrnáčová, M., Čadková, Z., Jankovská, I., Langrová, I. The Effect of Risk Factors of Sheep Flock Management Practices on Development of Anthelmintic Resistance in the Czech Republic – v tisku

Vadlejch, J., Lukešová, D., Vašek, J., Vejl, P., Sedlák, P., Čadková, Z., Langrová, I., Jankovská, I., Salaba, O. Comparative morphological and molecular identification of *Haemonchus* species in sheep – v tisku

Kudrnáčová, M., Langrová, I. 2012. Occurrence and seasonality of domestic sheep gastro – intestinal parasites. Scientia Agriculturae Bohemica, 43 (3), 104-108. ISSN: 1211-3174.

Vadlejch J, Petrtyl M, Zaichenko I, Čadková Z, Jankovská I, Langrová. 2011. Which McMaster egg counting technique is the most reliable? Parasitology Research, 109 (5):1387-94.

Makovcová, K., Jankovská, I., Vadlejch, J., Langrová, I., Lytvynets, A. 2008. The contributions to the epidemiology of gastrointestinal nematodes of sheep with special focus on the survival of infective larvae in winter conditions. Parasitology Research, 104(4):795-9.

Makovcová, K., Langrová, I., Vadlejch, J., Jankovská, I., Lytvynets, A., Borkovcová, M. 2008. Linear distribution of nematodes in the gastrointestinal tract of tracer lambs. *Parasitology Research*, 104(1):123-6.

Langrová, I. Jankovská, J. Navrátil, M. Borovský, V. Slavík (2002): The benzimidazole resistance of cyathostomes on five horse farms in the Czech republic. *Helminthologia*, 39, 4: 211 - 216.

Langrová, I., Jankovská, I., Fejt, R. 1998. The occurrence of anthelmintic resistance in nematodes of Cyathostominae in the studfarm Xaverov. *Helminthologia*, 35: 159-171

VIII. Dedikace k příslušnému projektu

Zpracováno v rámci řešení výzkumného projektu NAZV č. QI111A199.