

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství

**Testování účinnosti anthelmintik používaných
v chovech ovcí pomocí metod in vitro**

uplatněná certifikovaná metodika



**Autoři: Ing. Štěpánka Scháňková,
prof. Ing. Iva Langrová, CSc.
Ing. Jaroslav Vadlejch, 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.

Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra zoologie a rybářství, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6 – 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. 17210/2013-6

Určení publikace:

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

Oponenti:

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

ISBN 978-80-213-2412-1

Testování účinnosti anthelmintik používaných v chovech ovcí pomocí metod in vitro

Abstrakt:

Hlavním cílem metodiky je seznámit chovatele ovcí s problematikou stále více narůstající rezistence endoparazitů ovcí vůči běžně dostupným a aplikovaným anthelmintikům. Vzhledem ke skutečnosti, že náklady na zdravotní péči tvoří zpravidla největší část výdajů v rámci chovu ovcí v České republice, je více než důležité zvolit taková anthelmintika, která budou účinná a vůči kterým nebudou cizopasníci vykazovat rezistenci, kterou lze potvrdit či vyvrátit prostřednictvím vyšetřovacích metod in vitro. V metodice jsou popsány dvě in vitro metody, které umožní chovateli otestovat si rezistenci hlístic vlastního chovu na podávaná anthelmintika. Dále je metodika doplněna podrobným přehledem anthelmintik s průměrnými cenami i dávkami potřebnými na ošetření jednoho zvířete, doporučeními pro eliminaci výskytu rezistence a obecná opatření v boji se samotnými endoparazity. Veškeré zde popsané vyšetřovací metody vychází z ověřených zkušeností autorů metodiky a samotné práci předcházely rozsáhlé výzkumy.

Klíčová slova:

Ovce, Rezistence, Anthelmintika, Metody in vitro

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

Abstract:

The main aim of this methodology is to provide sheep farmer with the issue more and more rising resistance of sheep endoparasites against commonly available and applied anthelmintics. Due to the fact that health care costs are usually the largest part of the expenditure in the sheep in the Czech Republic is more than important to select an anthelmintic, which are effective and without resistance of sheep endoparasites. The resistance can prove or disprove through investigative in vitro methods. In the methodology, there is described two in vitro methods that will allow to breeders to test the resistance to nematodes of their own breeding against applied anthelmintics. Furthermore, the methodology is complemented by a detailed summary of anthelmintics with average prices and doses needed to treat of one animal, recommendations for the elimination of resistance and general measures in tackling endoparasites. 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

Obsah

I. CÍL METODIKY - 6 -1

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY.....1

1. SOUČASNÝ STAV A VÝZNAM CHOVU OVCÍ 1

2. PŘEHLED ANTIHELMINTIK - 8 -

2.1 BENZIMIDAZOLY (BZs).....	- 8 -
2.2 IMIDAZOTHIAZOLY/HYDROXYPYRIMIDINY	- 9 -
2.3 MAKROCYKlickÉ LAKTONY (MLS).....	- 10 -
2.4 DERIVÁTY AMINOACETONITRILU (AADS)	- 11 -
2.5 SPIRO - INDOLY (SI)	- 11 -
2.6 NEJBĚŽNĚJI APLIKOVANÁ ANTHELMINTIKA V CHOVU OVCÍ V ČESKÉ REPUBLICCE	- 12 -
ALBEX10% susp a.u.v.	- 12 -
ALDIFAL 25 mg/ml perorální suspenze	- 12 -
BIOMECTIN 10 mg/ml injekční roztok.....	- 13 -
CEVAMEC 1 % inj. Ad. Us. Vet	- 14 -
DECTOMAX 10 mg/ml inj. ad us. vet.	- 14 -
FENBION 25 mg/g plv. ad us. vet.....	- 14 -
HELMIGAL 2,5 % plv. a. u.v.....	- 15 -
IVOMEK 1% injekční roztok	- 15 -
IVOMEK SUPER injekční roztok	- 16 -
PANACUR 25 mg/ml perorální suspenze	- 16 -
VIRBAMEC inj. Ad. Us. Vet.	- 17 -
ZEROFEN 10% susp. a.u.v.	- 17 -

3. OPATŘENÍ V BOJI S GI HLÍSTICEMI OVCÍ - 18 -

3.1 DOPORUČENÍ CHOVATELŮM OVCÍ PRO SNÍŽENÍ VÝSKYTU REZISTENCE NA LÉČIVA	- 22 -
---	--------

4. METODICKÁ ČÁST - 22 -

4.1 TEST LÍHNUTÍ VAJÍČEK (EGG HATCH TEST, EHT).....	- 22 -
4.2 TEST VÝVINU LAREV (LARVAL DEVELOPMENT TEST, LDT).....	- 24 -

III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ.....19

IV. POPIS UPLTNĚNÍ METODIKY.....	20
V. EKONOMICKÉ ASPEKTY.....	20
VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY.....	22
VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE.....	27
VIII. DEDIKACE NA PŘÍSLUŠNÝ PROJEKT.....	33

Cíl metodiky

Parazitární infekce způsobují v současné době chovatelům ovcí značné ekonomické ztráty. Největší škody zapříčiňují široce rozšířené gastrointestinální hlístice (GI hlístice), které mohou, zvláště v kombinaci s dalšími faktory, způsobit i uhynutí. Nejohroženějšími skupinami jsou mladá zvířata a zvířata v horší kondici.

Základem úspěchu v boji s parazity je účinný preventivní antiparazitární systém, který ale vždy obsahuje podání vhodného anthelmintika. A v současné době existuje na trhu celá řada dostupných různě účinných léčiv. Stinnou stránkou těchto přípravků však je, zvláště pak při častém a jednostranném užití jedné účinné látky nebo nevhodném dávkování, zvyšující se množství přeživších hlístic, což v důsledku vede k rezistenci celé populace na určité anthelmintikum.

Cílem této metodiky je poskytnout chovatelům ovcí přehled hlavních způsobů vyšetření hlístic in vitro na možnou resistenci vůči aplikovaným preparátům, a tím umožnit přijmout v chovech potřebná opatření. Metodika je dále doplněna přehledem nejběžnějších antiparazitik běžně dostupných na českém trhu.

Po prostudování metodiky již záleží na chovatelích samotných, jak budou získané informace aplikovat ve svých chovech.

II. Vlastní popis metodiky

1. Současný stav a význam chovu ovcí

Chov ovcí je na dnešním území České republiky datován již od počátku 9. století, jelikož se jedná o zvíře s mnohostrannou užitkovostí, ať se jedná o maso, mléko či vlnu, vykazuje mnohdy až obdivuhodnou odolnost vůči klimatickým podmínkám. Celá řada krizí, které potkaly chov ovcí v minulosti, vedly k výraznému poklesu počtu chovaných zvířat, kdy došlo z původně chovaných 2 228 587 ks v roce 1837 k úbytku stavů na 40 302 ks v roce 1935 (!). Vzestup zažil chov těchto malých přežvýkavců okolo roku 1990, následovaný propadem mezi lety 1990 – 2000, což vedlo k rozsáhlé transformaci zaměření chovu z produkce vlny na masnou užitkovost. Vedle hlavních produktů, jako je maso, mléko, vlna, kůže, rohy a paznehty, ovce poskytují i produkty vedlejší, mezi něž se řadí např. lanolín, střeva, krev, lůj a předžaludky. Dále jsou zdrojem kvalitní mrvy, vypásají chráněná území, popř. taková, kam se nedostanou jiná hospodářská zvířata (Staněk, 2009). V současné době je chováno v České republice kolem 200 tis ovcí (Svaz chovatelů ovcí a koz ČR).

Ovčí maso je řazeno mezi jedno z nejkvalitnějších, které je k dostání na trhu, a to zejména díky jeho vysokému obsahu bílkovin, vitamínů skupiny B a zvýšenému obsahu minerálních látek. Spotřeba tohoto velmi dobře stravitelného masa na našem území je relativně nízká, jelikož se pohybuje okolo 0,15 kg na osobu za rok. Mezi faktory ovlivňující kvalitu masa patří zejména plemeno, pohlaví, výživa a věk zvířete, ale zejména jeho zdravotní stav, který je mnohdy ovlivněn v první řadě přítomností parazitů (Staněk, 2009).

2. Přehled antihelmintik

2.1 Benzimidazoly (BZs)

Benzimidazoly jsou nejpočetnější skupinou anthelmintik. Působí širokospektrálně a jsou dobře tolerovány zvířaty. Od zavedení thiabendazolu v roce 1961 byly na trh postupně

uvedeny další přípravky: fenbendazol, mebendazol, albendazol, oxfendazol, thiabendazol, oxibendazol, parbendazol a kambendazol. Mají široké uplatnění u různých druhů zvířat. Patří mezi nejméně toxické přípravky (pro thiabendazol a fenbendazol nebylo dokonce možné stanovit LD50). Všechny benzimidazoly se vyznačují účinkem proti dospělým i vývojovým stádiím parazitů a některé dokonce účinkem i ovicidním (Jurášek a Dubinský, 1993). Jejich mechanismus účinku spočívá v tom, že se váží v cílovém hostiteli na β - tubulinové podjednotky při tvorbě mikrotubulů buňky parazita s následnou inhibicí tvorby ATP (nedostatek energie pro parazita), čímž ovlivňují i různé další procesy uvnitř organismu – mj. mitózu, motilitu a vnitrobuněčný transport (Churcher et al., 2010). U ovcí jsou tyto přípravky účinné proti nematodám *Teladorsagia* spp., *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Nematodirus* spp., *Chabertia* spp., *Oesophagostomum* spp., *Dictyocaulus filaria*. Dále proti tasemnicím *Moniezia* spp. a motolicím *Fasciola hepatica* (Hansen and Perry, 1994; Smith and Sherman, 1994).

Dávkování: Albendazol - ovce, kozy – 25 –37,5 g/100 kg ž.h. (VERMITAN 20% gran., ALBEX 10% susp., ALDIFAL 2,5% susp.); Fenbendazol - ovce – 5 mg/kg ž.h. (INTERZOL susp.); Oxfendazol - ovce – 5 mg/kg ž.h. (INTERZOL susp.).

2.2 Imidazothiazoly/Hydroxypyrimidiny

V roce 1966 byl objeven jako první tetramizol, z něhož byl následně separován jeho L-izomer neboli levamisol. Preparáty z této skupiny patří mezi tzv. nikotinové agonisty, od čehož je odvozen i mechanismus jejich působení, kdy se naváží na nikotinové acetylcholinové receptory ve svalstvu parazitů, čímž způsobují spastickou paralýzu hlístic. Vyšší dávky vyvolávají mimo jiné interferenci s metabolismem sacharidů parazita (Robertson et al., 2000). Populace parazitů rezistentních na levamisol jsou rovněž rezistentní na další nikotinové agonisty jako je morantel, pyrantel a piperazin (Sangster, 1998).

Nesmí se ovšem opomenout, že levamisol je jedním z nejtoxičtějších anthelmintik a způsobuje nebezpečí především při i.v. podání. Mezi nežádoucí účinky levamisolu patří zejména konvulze, deprese CNS či asfyxie (důsledek paralýzy dýchacích svalů). Dále je třeba se při jeho aplikaci vyvarovat společnému použití s organofosfáty, jelikož by následně působily jako inhibitory acetylcholinesterázy (Jurášek a Dubinský, 1993).

Účinnost levamisolu proti inhibujícím larvám je velmi proměnlivá v závislosti na lokalizaci parazitů v abomasu v čase aplikace preparátu (Ramage et al., 2012).

2.3 Makrocyclické laktony (MLs)

Tato skupina anthelmintik byla uvedena na trh v roce 1981 (Kaminsky et al., 2008). Makrocyclické laktony představují dvě podskupiny – avermektiny (ivermectin) a milbemyctiny (Moxidectin). Rozdíl mezi nimi je v jejich molekulární struktuře – avermektiny mají sacharidové substituenty na pozici C13, milbemyctiny nemají sacharidové substituenty. Avermektiny byly izolovány z kultur aktinomycet druhu *Streptomyces avermitilis*, milbemyctiny z kultur *Streptomyces cyanogrise* nebo *Streptomyces hygroscopicus* (Durden, 2007).

Mechanismus účinku makrocyclických laktonů představuje zvýšení propustnosti membrány pro chloridové ionty (Turner et Schaeffer, 1989), k čemuž dohází na základě několika souvislých procesů, mezi něž patří podpora uvolňování GABA z presynaptického neuronu do synapse, funkce agonistů na GABA receptorech a ovlivnění specifických glutamátových receptorů parazita spojených s chloridovými kanály. Díky těmto pochodům dochází ke zvýšenému vtoku chloridových iontů do neuronu, k jeho následné hyperpolarizaci a sníženému převodu nervových impulsů (tj. k inhibici neurotransmise) s navozením totální svalové paralýzy larválního i dospělého stádia parazita s následným úhynem a vypuzením parazita z hostitelského organismu (Blackhall et al., 2008; Gill et al., 1991).

U ovcí je účinný proti gastrointestinálním hlísticím jako jsou *Haemonchus contortus* (dospělci, L4 a L3, včetně inhibovaného stadia), *Ostertagia circumcincta* (dospělci, L4 a L3, včetně inhibovaného stadia), *T. trifurcata* (dospělci, L4), *Trichostrongylus axei* (dospělci), *T. colubriformis* (dospělci, L4 a L3), *T. vitrinus* (dospělci), *Nematodirus filicollis* (dospělci a L4), *N.spathiger* (L4, L3), *Cooperia curticei* (dospělci a L4), *Oesophagostomum columbianum* (dospělci, L4 a L3), *O. venulosum* (dospělci), *Chabertia ovina* (dospělci, L4 a L3), *Trichuris ovis* (dospělci), *Strongyloides papillosus* (L4 a L3). Účinná látka ivermektin také působí proti kmenům *T. circumcincta* a *H. contortus*, které jsou odolné vůči benzimidazolovým anthelmintikům (Hansen and Perry, 1994; Smith and Sherman, 1994). V menší míře u nich byl prokázán antimikrobiální a antitykotický účinek.

Dávkování: Ivermectinum – ovce – 2 mg/ 10 kg ž.h.

2.4 Deriváty aminoacetonitrilu (AADs)

Vzhledem k tomu, že se rezistence gastrointestinálních hlístic na anthelmintika u hospodářských zvířat stala již globálním jevem, a to včetně vícečetné rezistence na tři hlavní skupiny anthelmintik, existuje naléhavá potřeba vývoje anthelmintik s novým mechanismem účinku. Nedávno byly objevené deriváty aminoacetonitrilu (AADs), které byly poprvé podrobně popsány až v roce 2008, tj. více než 30 let po objevení ivermectinu. Tyto látky představují novou skupinu syntetických chemických látek s vysokou účinností proti všem gastrointestinálním hlísticím, včetně rezistentních izolátů (Kaminsky et al., 2008). Doposud jediným dostupným zástupcem derivátů aminoacetonitrilu (AAD) je látka monepantel, vyráběná v preparátu Zolvix. Mechanismus účinku této látky, tj. monepantelu, je naprosto odlišný než u všech doposud známých anthelmintik, jelikož se váže na specifický receptor na acetylcholinu označovaném jako Hco-MPTL-1, jež je přítomen výhradně u nematod, čímž způsobuje paralýzu parazitických střečních hlístic (Kaminsky et al., 2008).

U ovcí jsou účinné proti *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Teladorsagia trifurcata*, *Teladorsagia davtiani*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Trichostrongylus rugatus*, *Trichostrongylus axei*, *Nematodirus filicollis*, *Cooperia curticei*, *Cooperia oncophora*, *Chabertia ovina*, *Nematodirus spathiger* (pouze dospělci) a *Oesophagostomum venulosum* (pouze L4 stádia).

2.5 Spiro - indoly (SI)

Skupina tvořena heterocyklickými sloučeninami tzv. spiro – indoly je nejnovější skupinou anthelmintik. Ze široké škály sloučenin se upřednostňují v boji s těmito parazity syntetizované ligandy metal komplexy, jejichž účinek mechanismu spočívá v paralýze hlístic (Bhrigu et al., 2010).

U ovcí a koz jsou indikovány k léčbě a prevenci infekcí gastrointestinálními hlísticemi: *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta* (dospělci, L4), *Haemonchus contortus* (dospělci, L4), *Trichostrongylus axei* (dospělci, L4), *Trichostrongylus colubriformis* (dospělci, L4), *Trichostrongylus vitrinus* (dospělci, L4), *Cooperia curticei* (jen L4), *C. oncophora* (dospělci,

L4), *Oesophagostomum venulosum* (jen dospělci), *Nematodirus* spp. (dospělci, L4),
Inhibovaná larvální stádia (L4) včetně druhů rezistentních k benzimidazolu.

2.6 Nejběžněji aplikovaná anthelmintika v chovu ovcí v České republice

(Zdroj: Ustav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv; www.uskvbl.cz)

ALBEX 10% susp a.u.v.

Účinné látky: Albendazolum 100 g / 1 l

Albendazol je širokospektrální anthelmintikum určené k léčbě infekcí způsobených dospělými a vývojovými stádii gastrointestinálních a plicních nematod, cestod a dospělých nematod u skotu a ovcí. Albex 10 % má ovicidní účinek na hlístice a motolice.

Benzimidazoly se váží na tubulin, protein potřebný k tvorbě mikrotubulů, primárně v absorpčních buňkách parazitů. Výsledkem je neschopnost absorpce živin s následnou redukcí glykogenu a vyhladověním parazita. Mezi tubulinem savců a helmintů existuje strukturální rozdíl, proto nedochází k toxickému působení albendazolu na hostitele.

U ovcí byl prokázán jeho účinek na následující hlístice: *Ostertagia* spp., *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Nematodirus* spp., *Chabertia* spp., *Oesophagostomum* spp. či *Dictyocaulus filaria*; dále na Cestody z rodu *Moniezia* spp.; a v neposlední řadě na Trematody: *Fasciola hepatica*.

V rámci možných kontraindikací tohoto přípravku se nedoporučuje jeho používání u ovcí během připouštění a 1 měsíc po připouštění. A dále by se neměl používat u ovcí, jejichž mléko je určeno pro lidský konzum. Doposud nejsou známy žádné nežádoucí účinky tohoto preparátu, avšak nesmí být ředěn, příp. míchán s jinými produkty.

Dávkování by mělo být při výskytu plicních a gastrointestinálních hlístic, tasemnic a dále pak vajíček motolic, hlístic 5 mg albendazolu/kg ž. hm., tj. 1 ml/20 kg.ž.hm.a způsob podání: pouze perorální.

ALDIFAL 25 mg/ml perorální suspenze

Účinné látky: Albendazolum 25 mg/ 1 ml

Aldifal bývá indikován jako prevence a léčba motolichnatosti (dospělci *Fasciola hepatica*),

gastrointestinálních a plicních nematodóz a také monieziózy u ovcí.

V rámci možností kontraindikací se nedoporučuje jej používat v období gravidity a laktace, jinak žádné nežádoucí účinky nebyly doposud prokázány a zaznamenány.

Při perorální aplikaci Aldifalu se rozlišuje podávána dávka v závislosti na parazitech, na něž je aplikován. Při nematodózách a moniezióze se aplikuje jednorázově v množství 2 ml přípravku/10 kg ž.hm. (t.j. 5 mg úč.l./kg ž.hm.), zatímco při fasciolóze se podává rovněž jednorázově, avšak v množství 4 ml přípravku na 10 kg ž.hm. (t.j. 10 mg úč.l./kg ž.hm.).

BIOMECTIN 10 mg/ml injekční roztok

Účinné látky: Ivermectinum 10 mg/ 1 ml

Biomectin je indikován na endo- a ektoparazitózy nejen ovcí, ale skotu a prasat. U ovcí byl jeho účinek potvrzen v případech: žaludečních a střevních nematod: *Haemonchus contortus* (dospělci a larvy L4), *Haemonchus placei* (dospělci), *Ostertagia trifurcata* (dospělci a larvy L4), *Trichostrongylus vitrinus* (dospělci a larvy L4), *Trichostrongylus axei* (dospělci a larvy L4), *Trichostrongylus colubriformis* (dospělci a larvy L4), *Nematodirus filicollis* (dospělci a larvy L4), *Cooperia curticei* (dospělci a larvy L4), *Oesophagostomum venulosum* (dospělci), *Chabertia ovina* (dospělci), *Trichuris ovis* (dospělci); dále pak u plicních nematod: *Dictyocaulus filaria* (dospělci a larvy L4), *Protostrongylus rufescens* (dospělci a larvy L4), ale i u střečků *Oestrus ovis* (všechna larvální stádia) či zákožek *Sarcoptes scabiei* (var. *Ovis*), *Psoroptes communis* (var. *ovis*).

V rámci možné kontraindikace se nepožívá u dojníc a bahnic, pokud je mléko určeno pro lidskou spotřebu. V zapařlosti je poté aplikován nejpozději 28 dní před porodem. Přípravek se nesmí aplikovat intravenózně nebo intramuskulárně.

U některých zvířat může být pozorován přechodný neklid a v místě injekčního podání se někdy objevují reversibilní svědivé otoky, které samovolně odezní v důsledku nežádoucích účinků.

U ovcí stejně jako u skotu jsou aplikované dávky tvořeny 0,2mg ivermektinu/ kg živé hmotnosti, tj. 0,2 ml přípravku/10 kg ž.hm.

CEVAMEC 1 % inj. Ad. Us. Vet

Účinné látky: Ivermectinum 10 mg/ 1 ml

Cevamec 1 % injekční roztok je účinný prostředek indikován pro prevenci a léčbu následujících ekto- a endoparazitů: plicní hlístice (dospělci, třetí a čtvrté stadium larev), malé plicní hlístice (dospělci a čtvrté stadium larev), střečci a zákožky.

Možné kontraindikace mohou nastat, pakliže by se přípravek podával intramamárně či intravenózně.

Příležitostně se mohou vyskytnout i nežádoucí účinky v podobě malé zánětlivé reakce v místě vpichu, která spontánně ustoupí. Nedoporučuje se Cevamec aplikovat zvířatům během 28 dní před porodem.

Přípravek se aplikuje subakutně v dávce určené pro ovce 1 ml/ 50 kg ž. hm., tj. 0,2 mg ivermectinu/kg ž. hm.

DECTOMAX 10 mg/ml inj. ad us. vet.

Účinné látky: Doramectinum 10 mg/ 1 ml. Butylhydroxyanisol (E320) 0,1 mg.

Dectomax se indikuje jako léčba a prevence infekcí gastrointestinálními nematody, plicními nematody a svrabem. Účinky byly potvrzeny v případech žaludečních a střevních nematodóz (*Ostertagia*, *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Oesophagostomum* a *Nematodirus*), plicních nematodóz (*Dictyocaulus*) či ektoparazitóz (*Psoroptes*). V otázce kontraindikace se přípravek nesmí používat u zvířat, jejichž mléko je určeno pro lidský konzum. Doposud nebyly zjištěny žádné nežádoucí účinky.

Dectomax se aplikuje intramuskulárně a v případě léčby či prevence nematodóz a střečků nosových představuje dávka 1 ml/50 kg ž.hm, přičemž při léčbě klinických příznaků svrabu ovčí (*Psoroptes ovis*) a eliminace živých zákožek dávka 1 ml/33 kg ž.hm.

FENBION 25 mg/g plv. ad us. vet.

Účinné látky: Fenbendazolum 25 mg

Přípravek je účinný vůči dospělci a vývojovým stádiím obličných červů gastrointestinálního traktu a plic skotu, prasat a ovčí. Je indikován při infekci následujícími parazity: *Haemonchus* ssp., *Ostertagia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp., *Nematodirus* spp., *Neoascaris vitulorum*, *Oesophagostomum* spp. *Bunostomum* spp., *Trichuris* spp., *Strongyloides* spp.,

Hydrostrongylus rubidus, *Ascaris suum*, *Dictyocaulus filaria*, *Dictyocaulus viviparus* a *Metastrongylus* spp.

Nežádoucí účinky tohoto přípravku nejsou známy.

HELMIGAL 2,5 % plv. a. u.v

Účinné látky: Fenbendazol 2,5 g / 1 l

Helmigal působí na celou škálu hlístic GI, přičemž nejsou známy žádné kontraindikace. Obdobně tak pro tento přípravek a druhy zvířat, pro které je určený, se nebyly zaznamenány žádné nežádoucí účinky i při zvýšené dávce. Jeho používání v období gravidity a laktace není nijak omezeno.

Obecná dávka Helmigalu je 5-7,5 mg fenbendazolu / kg ž. hm. jednorázově, účinnější je nižší dávkování 2-3 mg fenbendazolu / kg ž. hm. v intervalech 24 hodin po dobu 3-5 dní.

IVOMEC 1% injekční roztok

Účinné látky: Ivermectinum 10 mg / 1 ml

Ivomec je indikován pro účinnou léčbu a zamezení šíření následujících parazitárních onemocnění: GI hlístice - *Haemonchus contortus* (dospělci, L4 a L3), *Ostertagia circumcincta* (dospělci, L4 a L3), *Trichostrongylus axei* (dospělci), *Trichostrongylus colubriformis* (dospělci, L4 a L3), *Trichostrongylus vitrinus* (dospělci), *Nematodirus filicollis* (dospělci a L4), *Nematodirus spathiger* (L4 a L3.), *Cooperia curticei* (dospělci, L4), *Oesophagostomum columbianum* (dospělci, L4 a L3), *Oesophagostomum venulosum* (dospělci), *Chabertia ovina* (dospělci, L4 a L3), *Trichuris ovis* (dospělci), *Strongyloides papillosus* (L4 a L3.), *Gaigeria pachyscelis* (dospělci, L4 a L3.); plicnivky: *Dictylocaulus filaria* (dospělci, L4 a L3.), *Protostrongylus rufescens* (dospělci); nosní střečci (všechna larvální stadia): *Oestrus ovis*; svrab: *Psoroptes communis* var. *ovis*. *Sarcoptes scabiei*, *Psorergates ovis*.

Po subkutánní podání může být u některých zvířat pozorován přechodný nepokoj a občasný výskyt otoků měkkých tkání v místě vpichu. Tyto reakce samovolně vymizí.

Prováděné studie prokázaly široké rozpětí bezpečnosti bez vedlejších účinků na plodnost zvířete. Ivomec se smí aplikovat pouze subkutánně v dávce 0,2 mg ivermektinu na kg živé hmotnosti (odpovídá 0,5 ml/25 kg živé hmotnosti). Aplikace se provádí subkutánně do volné kůže mezi plecemi. U ovcí před stříháním je před vlastní aplikací dávky třeba se ujistit

zda jehla pronikla vlnou a kůží a při ošetření proti psoroptovému ovčímu svrabu je nutno léčbu zopakovat po 7 dnech.

IVOMEK SUPER injekční roztok

Účinné látky: Ivermectinum 10 mg/ 1 ml a Clorsulonum 100 mg/ 1 ml

Přípravek se indikuje při léčbě a zamezení šíření obdobných parazitárních onemocnění jako u výše uváděného přípravku Ivomec: tj. u GI hlístice - *Haemonchus contortus* (dospělci, L4 a L3), *Ostertagia circumcincta* (dospělci, L4 a L3), *Trichostrongylus axei* (dospělci), *Trichostrongylus colubriformis* (dospělci, L4 a L3.), *Trichostrongylus vitrinus* (dospělci), *Nematodirus filicollis* (dospělci a L4), *Nematodirus spathiger* (L4 a L3), *Cooperia curticei* (dospělci, L4), *Oesophagostomum columbianum* (dospělci, L4 a L3), *Oesophagostomum venulosum* (dospělci), *Chabertia ovina* (dospělci, L4 a L3), *Trichuris ovis* (dospělci), *Strongyloides papillosus* (L4 a L3), *Gaigeria pachyscelis* (dospělci, L4 a L3); plicnivky: *Dictylocaulus filaria* (dospělci, L4 a L3.), *Protostrongylus rufescens* (dospělci); nosní střečci (všechna larvální stadia): *Oestrus ovis*; svrab: *Psoroptes communis* var. *Sarcoptes scabiei*, *Psorergates ovis ovis*,

Tento přípravek není určený pro intravenózní nebo intramuskulární použití a nedoporučuje se jej používat během laktace nebo 28 dnů před porodem, pokud je mléko určeno pro lidskou spotřebu. Po subkutánní podání může být rovněž u některých zvířat pozorován přechodný nepokoj a občasný výskyt otoků měkkých tkání v místě vpichu. Tyto reakce samovolně vymizí

Ivomec Super injekční roztok se podává subkutánně do kožní řasy na krku nebo za lopatkou v dávce 1ml přípravku na 50 kg živé hmotnosti. Tato dávka odpovídá hladině 0,2 mg ivermektinu a 2,0 mg klorsulonu na kg živé hmotnosti. Dávky vyšší než 10 ml se aplikují na dvě různá místa.

PANACUR 25 mg/ml perorální suspenze

Účinné látky: Fenbendazolium 25 mg/ 1 ml

Panacur se indikuje k léčbě napadení dospělci a nevyzrálými stádii nematou gastrointestinálního a respiračního traktu a plochými červy u ovcí a koz jako jsou: *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp., *Nematodirus* spp.,

Oesophagostomum spp., *Boostomum* spp., *Capillaria* spp., *Trichuris* spp., *Strongyloides* spp., *Dictyocaulus* spp., *Moniezia* spp.

U tohoto přípravku nebyly doposud zaznamenány žádné kontraindikace ani nežádoucí účinky.

Obecná dávka pro ovce a kozy je 5 mg fenbendazolu/ kg ž. hm. (1,0 ml přípravku/ 5 kg ž. hm.), jednorázově. Při napadení plochými červy se přípravek aplikuje v dávce 10 mg fenbendazolu/ kg ž. hm. (2,0 ml přípravku/ 5 kg ž. hm.), jednorázově. Pouze pro perorální podání, při aplikaci je třeba použít kalibrované dávkovací zařízení. K zajištění správného dávkování je třeba co nejpřesněji určit živou hmotnost

VIRBAMEC inj. Ad. Us. Vet.

Účinné látky: Ivermectinum 1 g/ 100 ml

Virbamec injekční roztok je indikován pro léčbu a tlumení parazitóz u skotu, ovcí a prasat: nematody v zažívacím traktu (včetně inhibovaných larev), plicní červivost, vši, svrab, klíšťata, střečkovitost. U ovcí se jedná konkrétně o žaludeční a střevní nematody (dospělci i vývojová stádia): *Haemonchus contortus*, *Ostartagia circumcincta*, *O. trifurcata*, *Trichostrongylus axei* (dospělci), *T. colubriformis*, *T. vitrinus*, *Nematodarius filicollis*, *N. spathiger* (dospělci), *Cooperia curticei*, *Oesophagostomum columbianum* (dospělci), *O. venulosum*, *Chabertia ovina*, *Trichuris ovis* (dospělci), *Strongyloides papillolus* (larvy), *Gaigeria pachyscelis*; plicní červi (dospělci i vývojová stádia): *Dictyocaulus filaria*, *Protostrongylus nufescens* (dospělci).

Zatímco u tohoto přípravku nebyly zjištěny žádné kontraindikace, tak se příležitostně může objevit coby nežádoucí účinek bolestivost a přechodný otok v místě vpichu (doporučená aplikace maximálně 10 ml do jednoho místa kvůli minimalizaci tohoto jevu) Tato reakce zmizí bez léčby.

Virbamec se podává výhradně v dávce subakutně.1 ml na 50 kg ž. hm. (odpovídá 200G ivermectinu na 1 kg ž. hm.

ZEROFEN 10% susp. a.u.v.

Účinné látky: Fenbendazolium 100 g/ 1l

Zerofen 10% je širokospektrální antihelmintikum určené k léčbě parazitóz způsobených dospělými a vývojovými stadii těchto parazitů: *Ostertagia* spp., *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp.,

Nematodirus spp., *Cooperia* spp., *Oesophagostomum* spp., *Chabertia* spp., *Bunostomum* spp., *Trichuris* spp. a *Strongyloides* spp.; *Dictyocaulus filaria*; a dále o cestoda: *Moniezia* spp.

V rámci kontraindikace se nedoporučuje jej používat u ovcí produkující mléko pro lidskou spotřebu.

Dávka pro perorální podání je 5 mg fenbendazolu/kg ž.hm. (přibližně 1 ml / 20 kg ž.hm.)

3. Opatření v boji s GI hlísticemi ovcí

Širokospektrální anthelmintika, která byla vyvinuta a postupně široce využita chovateli ovcí, problém GI hlístic nevyřešila. Důvodem je především velká odolnost infekčních larev těchto hlístic, které přežívají ve velkých počtech v okolním prostředí a zvířata jsou tak neustále vystavena reinfekci. Z tohoto důvodu však mají jednorázové dávky výše zmíněných medikamentů jen krátkodobý účinek a tak řada autorů zpočátku doporučovala časté podávání léčiv během roku.

Od tohoto způsobu odčervování se však brzy ustoupilo, jelikož je zřejmé, že aplikace léčiv v této intenzitě je finančně nákladné, a dále se prudce rozvíjí rezistence hlístic na podaná anthelmintika. Z tohoto důvodu byla snaha najít systém, který omezuje četnost podávání léčiva a přitom snižuje infikovanost zvířat na minimální hranici.

Proto se pozvolna přešlo k tzv. "strategickým kontrolním systémům", kdy je léčivo podáváno pouze v určitou dobu, obvykle na počátku pastevní sezóny, a léčba se pak obvykle opakuje 1 - 2 krát v 4 týdenních intervalech (Mage et al., 1995). Nejčastěji je doporučováno ošetření zvířat v létě a na podzim. Účinnost tohoto systému je však také závislá na četnosti opakování, neboť pastviny i podestýlky stájí jsou obvykle již značně kontaminované a opakované odčervení eliminuje populaci získanou reinfekcí. Pakliže zůstane u jednorázové aplikace léčiva, ať už na počátku či v průběhu pastevní sezóny, EPG i procentuální promořenost stáda je do 2 měsíců na výchozí hodnotě a celková promořenost stáda se nezmění. V současné době se však vzhledem k šíření rezistence tento způsob prevence GI hlístic již nedoporučuje.

Další možností je "Famacha systém" - kdy se léčí jen zvířata s klinickými příznaky. Jedná se o selektivní léčení, které je spojeno s měsíčním sledováním EPG a aplikací léčiva pouze zvířatům s určitou hladinou infekce. Tento přístup šetří léčiva, omezuje vznik

rezistence hlístic na léčiva, avšak je spojen se složitější organizací a pracností i vyššími náklady na laboratorní vyšetření a ne vždy je efektivní (Duncan et Love, 1991). Dalším přístupem je kontinuální dávkování při příjmu potravy, kdy je denně podáváno léčivo, obvykle pyrantel pamoate či pyrantel tartrate (1,2-2,6 mg.kg⁻¹ ž.hm.), které eliminuje přijaté infekční larvy (Murphy et Love, 1995). Doporučováno je také tzv. taktické léčení, kdy je léčivo aplikováno v určitých případech, např. po silném dešti, kdy může dojít ke kumulaci infekčních larev na pastvinách (Wyk, 1990).

Účinná profylaxe GI hlístic by vždy měla být spojena s organizací pastvy. Velmi doporučovaný systém je založený na přeléčení zvířat a přehnutí na nekontaminovanou pastvinu, známý jako "Weybridge systém" ("dose and move") (Eysker et Vercruyse, 1990). O střídání pastvy psali už Skrjabin et al. (1956). V programu biologické autodehelmintizace pastvy doporučuje z hlediska prevence pravidelně každých 5 - 6 dní střídat pastvinu a přehnat zvířata na pastvinu zdravou. Pokud není dostatečná plocha pastvin, připouští možnost opakovaného pasení na 1 dílu, ne však dříve, než za 3 měsíce. Širší rozšíření těchto metod v praxi je však omezeno nutností chovů disponovat poměrně značnou rozlohou pastvin.

Navrhována je také kombinovaná pastva koní a přežvýkavců (Eysker et al., 1983). Problémem může však být nespecifická žaludeční hlístice *Trichostrongylus axei*. Tato hlístice může cizopasit u obou těchto skupin hostitelů a v případě přehnutí koní na místo, kde se do té doby pásly ovce nebo skot, dochází k promoření koní touto hlísticí. Nezanedbatelná je také vysoká vypásanost pastvy po přežvýkavcích (Duncan, 1985).

K dalším doporučením patří kosení zvláště silně zamořených ploch a silážování mokré trávy s larvami. Seno získané sušením na zemi je prosté larev v seně sušeném na sušácích zůstávají larvy GI hlístic životaschopné více týdnů, až 8 měsíců. Duncan (1985) doporučuje sbírání faeces na pastvinách, naopak nedoporučuje vláčet faeces po pastvině, doporučuje přisévat, orat a kosit travu na seno.

V komplexním programu prevence GI hlístic je nezbytné brát zřetel na šíření rezistentních kmenů těchto hlístic na anthelmintika, především benzimidazoly. Obecně platí, že anthelmintika je nutné střídat, benzimidazoly makrocyclickými laktony či pyrantelem nebo trichlorfonem. Změna je doporučována především formou tzv. pomalé rotace, kdy je typ léčiva měněn v intervalech delších jednoho roku, méně pak rychlé rotace, tedy každého půl roku či jedenkrát za rok. Experimenty však prokázaly, že nejpomaleji vznikají rezistentní kmeny hlístic při podávání přípravků s různým mechanismem účinku souběžně. Je nutné však vždy měnit či kombinovat benzimidazolový preparát s lékem založeným na jiné bázi, protože

byla prokázána křížová rezistence např. mezi thiabendazolem a ostatními benzimidazoly. Z hlediska prevence šíření rezistence je také důležité dodržovat správné dávkování léčiva a odčervovat nově přichozí zvířata nebenzimidazolovým přípravkem (Vadlejch et al., posláno do tisku).

Optimální systémy prevence GI hlístic musí být založené jak na podání léčiva ve vhodnou dobu, tak na zoohygienicko-organizačních opatřeních. Jedním z důležitých předpokladů je pak důkladná zoohygiena, ať stájí tak pastvin, a ta závisí především na lidském faktoru, tedy na organizaci práce a motivaci ošetřovatelů. Zvláště u nás oblíbené podzimní odčervení, pakliže není spojeno s důkladnou asanací stájového prostředí, odstraní dospělé hlístice z hostitele, ale vzhledem ke skutečnosti, že mikroklima na pastvinách ale i v podestýlkách stájí je během pozdního léta a podzimu ideální pro rychlý vývin larev, ovce se rychle znovu infikují.

GI hlístice se šíří infekčními larvami, které zvíře přijme s potravou. Je tedy zřejmé, že pastviny hrají v přenosu infekce důležitou roli. Bohužel je obtížné, ba nemožné, odstranit infekční larvy těchto hlístic z pastvin, optimální je však např. sběr faeces z pastvin, v létě každý 3. den, v jarním a podzimním období je možné tyto intervaly prodloužit na 7-10 dní. Nedoporučuje se vláčení, vysušení výkalů obsahující již infekční larvy nemá žádný profylaktický účinek, pouze tyto larvy rozšíří po celé pastvině. V budoucnu snad bude možné využít některých nematofágních hub, např. *Arthrobotrys oligospora*, *Monocrosporium bembicoides*, *Verticillium chlamydosporium*, *Nematophora gynophila* aj., se kterými se dosahuje dobrých výsledků (redukce larev na pastvině činí v některých případech 50-60 %). Redukovat infekčnost pastvin lze však také pomocí vhodného managementu – především vyvarovat se, pokud to jde, pasení zvířat za rosy či deště, neboť pouze vlhká tráva je infekce schopná (Langrová et al., 2008).

Je nutné si uvědomit, že ne vše je vhodné pro každý chov, je potřeba zvolit jednotlivý přístup v každém chovu. Neexistuje také univerzální metoda, žádný odčervovací program není všeobecný, je nutné ho upravit podle určitého chovu, jeho struktury, managementu apod. Je však nutné neustále hledat nové systémy, neboť GI hlístice se vyskytují v každém chovu a u každého jednotlivého zvířete a mohou odpovídat za vážná zdravotní poškození zvířat. Na druhou stranu je však nutné, aby zvláště mladá zvířata byla vystavena malému množství infekce, neboť jen tak je umožněn vývoj přirozené imunity, která v opačném případě může vést ke klinickému onemocnění s vážným poškozením zdraví hostitele.

A jaká je budoucnost v léčbě a prevenci GI hlístic ovcí? Zavedení širokospektrálních anthelmintik v 60. letech poskytl vysoce efektivní, bezpečné, snadno použitelné a relativně laciné prostředky pro tlumení parazitóz. To však mělo za následek omezení výzkumu alternativních možností kontrol parazitů. Pro srovnatelný úspěch na trhu však musí poskytnout stejné, ne-li větší výhody než širokospektrální anthelmintika. Avšak rozšíření rezistence a vážnost tohoto problému vedla k větší podpoře výzkumu právě v nechemických možnostech léčby onemocnění způsobenými parazity. Aktivita jsou hlavně směřovány k získání vakcín a selekci zvířat na odolnost vůči parazitózám (Waller, 1987).

Vzhledem k postupující rezistenci na tradiční anthelmintika je nutné vyvíjet stále nové látky. Jedná se však o záležitost dlouhodobou a finančně náročnou. Doba od objevení nové účinné látky do uvedení na trh je minimálně 6 – 8 let, a cena se pohybuje okolo 30 milionů dolarů (Hotson, 1985).

Krátkodobější alternativou pro hledání nového anthelmintika je možnost prodloužit účinnost stávajících pomocí manipulace s jejich farmakokinetickým chováním. Například chemická změna benzimidazolové molekuly zlepšila rozpustnost a umožnila injekční podávání, a také způsobila změny v metabolismu a eliminaci účinné látky z těla. Oboje způsobilo prodloužení použitelnosti a efektivnosti (Hennessy et al., 1983).

Navzdory rychlému vývoji v oblasti nechemické kontroly, anthelmintika budou v blízké budoucnosti nadále dominantním způsobem léčby a prevence parazitárních infekcí. Vzhledem k omezenému rozsahu dostupných anthelmintik a pomalému vývoji nových látek, je důležité uchovat účinnost stávajících léků. Tím je míněno šetrné, ale ne jednoduché používání. Úspěch při potlačování anthelmintické rezistence závisí na přesvědčení chovatelů ke změně jejich kontrolních systémů parazitů. Bohužel úspěchy v této oblasti nejsou působivé. Průzkumy provedené na farmách v Anglii, Walesu, Nového Zélandu i Austrálie dokládají, že ve většině chovů malých přežvýkavců dochází k používání anthelmintik bez znalostí nových poznatků v oblasti rezistence. Zdá se, že farmáři mohou být jen těžko donuceni ke změně svých tradičních praktik. Avšak je pravděpodobné, že to není způsobeno pouze odporem farmářů přijímat nové poznatky, ale i faktem nedostatečné prezentace nových objevů a následně sníženou možností jejich okamžité použitelnosti v praxi (Sangster, 1999).

3.1 Doporučení chovatelům ovcí pro snížení výskytu rezistence na léčiva

1. Dodržování karantény nových i čerstvě odčervěných zvířat
2. Správná aplikace léčiv – především dodržování správné dávky a NIKDY nedávat méně
3. Optimálně léčit pouze zvířata s vysokým počtem vajíček ve výkalech či s klinickými příznaky
5. Neaplikovat léčiva příliš často
6. Střídat účinné látky

4. Metodická část

Problém rezistence endoparasitů vyskytujících se v chovech ovcí, vůči běžně dostupným anthelmintikům, je známá již na čtyři desetiletí. Během této doby se anthelmintická rezistence stále rozvíjí a sílí a v současné době je mnohdy velkým problémem zvolit vhodná léčiva, jež rozvoj parazitů z větší či menší části potlačí. Za účelem odhalení populací parazitů, resp. jejich případné rezistence na aplikovaná antiparazitika, byla vyvinuta celá řada testů, avšak nutno podotknout, že každý z nich má své klady i zápory, zejména ve spojení se spolehlivostí či možností interpretace výsledků.

4.1 Test líhnutí vajíček (Egg Hatch Test, EHT)

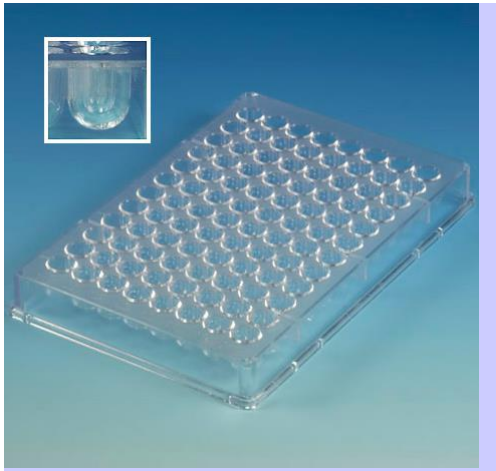
Test líhnutí vajíček neboli EHT je test určen pro detekci rezistence hlístic na benzimidazoly (BZ), které se v chovech ovcí v rámci České republiky využívají nejčastěji. Jako první na tuto problematiku poukázal v roce 1976 Le Jambre, jenž je označován za původce prvního testu EHT. V současné době se celosvětově používají různé variace tohoto testu (Boersema et al 1987, Dobson et al 1986, Ghisi et al. 2006, Hoekstra et al. 1997, Hunt and Taylor 1989; Johansen and Waller 1989, Martin et al. 1989; Várady et al. 2006).

Vlastní postup:

K testaci rezistence na benzimidazoly doporučujeme používat thiabendazol (zejména pro svoji relativně vysokou rozpustnost ve vodě). Rezistence na thiabendazol znamená rezistenci na všechny benzimidazoly (albendazol, fenbendazol).

Doporučený postup:

- Čerstvé výkaly obsahující vajíčka GI hlístic zalijeme kohoutkovou vodou (poměr 1 : 2). Vzorky pečlivě rozmícháme a přelijeme přes sítko do větší nádoby (cca 200 ml).
- Přecezenou tekutinou naplníme centrifugační zkumavky a centrifugujeme po dobu 2 minut při 2000 RPM.
- Supernatan opatrně slijeme a sediment smícháme s flotačním roztokem NaCl (nasyčený roztok připravíme, když rozpustíme 27 g NaCl ve 100 ml vody - což jsou přibližně 2 rovné polévkové lžíce kuchyňské soli).
- Opět centrifugujeme (2 minuty při 1000 RPM).
- Odsajeme horní polovinu tekutiny z centrifugační zkumavky a tuto rozpustíme v kónické „šampusce“ v desetinásobném množství destilované (deionizované, ale i kohoutkové) vody.
- Necháme sedimentovat v lednici cca 3 – 5 hod.
- Sedimentovaná vajíčka následně zkontrolujeme, v jakém vývojovém stupni jsou (optimální je, když vývoj doposud nezapočal).
- Každý vzorek je zpravidla testován v mikrotitrační destičce (Obr. 1) s využitím různých koncentrací thiabendazolu (optimálně, TBZ - 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 a 0,5 μg TBZ/ml) a pro kontrolu rovněž v roztoku, jež thiabendazol neobsahuje.
- Inkubace vajíček probíhá při pokojové teplotě (optimálně při 25°C), po dobu 48 hodin.
- Po ukončení inkubačního procesu se spočítají u jednotlivých daných koncentrací přítomná nevylihnutá vajíčka a vylíhlé larvy a následně se určí jejich procentuální poměr.
- Z hodnot se posléze vypočte hodnota ED_{50} , což je koncentrace thiabendazolu, při které se vylíhne 50% vajíček do stádia L1. Hlístice lze považovat a označit za rezistentní na benzimidazoly, pokud hodnota ED_{50} převyšuje koncentraci 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ thiabendazolu (Coles et al. 2003; Taylor et al., 2003).



Obr.1. Mikrotitrační destička.

4.2 Test vývinu larev (Larval development test, LDT)

Zásadní pro tento test je sledování vývoje vajíček do třetího larválního stádia (L3). Test je vhodný pro určení rezistence nejen na benzimidazoly, ale také na další anthelmintika (Coles et al., 2006). Jedná se o nejvíce používanou in vitro metodu pro detekci rezistence hlístic na anthelmintika u ovcí (Várady et al., 2007).

Vlastní inovovaný postup:

- Při tomto testu se získávají vzorky výkalů a následně případných vajíček obdobným způsobem jako tomu bylo výše u testu líhnutí vajíček, avšak s tím rozdílem, že stáří odebraných a získaných vajíček není nijak důležité.
- Do veškerých vnějších řad jamek na ploché paletě je třeba dolít buď deionizovanou, popř. destilovanou vodu, čímž se zabrání vysychání daných testovacích jamek.
- Do jamek mikrotitračních destiček přidáme 10 μ l kvasnicového extraktu, tvořeného přesně 1 gramem kvasnicového extraktu smíchaného s 90 ml 0,85 % NaCl (Hubert and Kerbouf, 1984).
- Abychom předešly zaplísnění vzorku, přidáme Amphotericin B (0,3 mg/ml).
- Optimálně vajíčka testujeme v různých koncentracích účinných látek (např. pro TBZ - 0,01; 0,025; 0,05; 0,1 a 0,5 μ g TBZ/ml).
- Takto vzniklá směs se uzavře ve stabilních podmínkách a inkubuje se při teplotě 25 $^{\circ}$ C po dobu 7 dnů.

- Po uplynutí tohoto časového úseku se na závěr v každé jamce spočítá počet přítomných larev a dále hodnota LC₅₀ (hodnota, při které se vylihne 50% vajíček do stádia L3). Hlístice lze považovat a označit za rezistentní na benzimidazoly, pokud hodnota LC₅₀ převyšuje koncentraci 0,02 µg/ml thiabendazolu, v případě levamisolu 0,5 µg/ml a u ivermectinu 5,4 ng/ml (Coles et al. 2003; Coles et al., 2006; Dolinská et al., 2012).

III. Srovnání „novosti postupů“

V metodice jsou uvedeny nové metodické postupy a výsledky in vitro testace rezistence gastrointestinálních hlístic ovcí na používaná anthelmintika. Uváděné informace jsou výsledkem výzkumné činnosti autorů a výsledkem systematického studia vědecké parazitologické literatury na dané téma, umožňují zpřesnění postupů s cílem zajištění vyšší přesnosti na straně jedné a použitelnosti mezi chovateli na straně druhé.

IV. Popis uplatnění metodiky

Metodika bude vhodnou pomůckou pro zemědělské podnikatele, konkrétně chovatele ovcí, pro pracovníky ve šlechtění skotu a pro uplatnění progresivních technologických postupů v reprodukci skotu s cílem jejího zefektivnění. Předložená publikace poskytne informace pracovníkům šlechtitelských organizací, poradcům, chovatelům, pracovníkům v živočišné výrobě. Výsledky jsou také využitelné v procesu průběžného vzdělávání a v pedagogické činnosti.

V. Ekonomické aspekty

Gastrointestinální hlístice jsou příčinou mnoha ztrát na užitkovosti hospodářských zvířat. U ovcí způsobují celkové zhoršení kondice (Sweeny et al., 2011), nízkou produkci, což znamená nízké či žádné přírůstky, horší příjem krmiva až nechutenství, problémy s reprodukcí i laktací (Corwin, 1997). Ekonomické vyčíslení těchto ztrát je obrovské – např. v Austrálii se tyto ztráty odhadují na 222 mil. dolarů (Hennessy 2000), ve Francii a USA pak je počítáno se ztrátou 1 – 200 dolarů na 1 zvíře a rok (Fourichon et al.,

2001; Gasbarre et al., 2001). Je zřejmé, že obdobné to je i v České republice. Navíc jestliže aplikujeme neúčinné léčivo, tyto ztráty jsou mnohem větší – nejen, že zbytečně chovatel vydá finanční prostředky na léčivo (pro jednu ovci počítáme dle přípravku a účinné látky 5 – 30 Kč), navíc se okamžitě zvyšuje nebezpečí úhynů mladých kusů a samozřejmě se snižuje užitkovost produkčních kusů. Jestliže plodnost ovcí dle plemene je 120 – 500 %, a v průměrném stádě s parazitární kontrolou u přežije přibližně 70 – 90 % jehňat (v těch nejlepších 90 – 95 %), tam, kde anthelmintika selhávají se úmrtnost zvyšuje až na 50 – 70 %. Při průměrné ceně 2000 Kč za jehně se jedná o ztrátu 10 000 – 40 000 Kč na 10 bahnic.

Vzhledem ke skutečnosti, že rezistence na anthelmintika se šíří Českou republikou (viz Vadlejš et al., v tisku a periodická zpráva tohoto projektu za rok 2012) se autoři metodiky domnívají, že testování rezistence na anthelmintika je v současné době pro rentabilní chov ovcí v České republice naprosto nezbytné.

Tab. č. 3. Přehled nejčastěji aplikovaných anthelmintik v chovech ovcí v České republice (Zdroj: Ustav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv; www.uskvbl.cz)

Komerční název	Aplikace	Cena balení	Dávkování
Albex	susp.	917,- / 1000ml	1 ml / 20 kg ž. h.
Aldifal	susp.	10 % 873,- / 1000 ml 2,5 % 436,- / 1000ml	0,4 ml /kg ž.h.
Biomectin	inj.	1% 3162,- / 500 ml	0,2 ml / 10 kg ž. h.
Cevamec	inj.	1% 2290,- / 500 ml 1224,- / 250 ml	1 ml/ 50 kg ž. h.
Dectomax	inj.	11864,- / 500 ml	1 ml / 50 kg ž. h.
Ecomectin	inj.	1% 2390,- / 500 ml 451,- / 50 ml	1 díl stříčky
Fenbion	plv	122,- / 20 tablet = 1 balení (1tableta = 250 mg)	1/2 tablety / 2,5 kg ž. h. 50 mg / kg ž.h.
Helmigal	plv	2,5% 33,- / 20g	0,2 - 0,3 g /kg ž. h.,

			20g /100 kg ž. h.
Ivomec	inj.	9254,- / 500 ml	1 ml / 10 kg ž. h. na kůži
Ivemoc super	inj.	9770,- / 500 ml	0,5 ml / 25 kg ž. h.
Panacur	susp.	3443,- / 1000 ml	7,5 ml / 100 kg ž. h.
Virbamec	inj.	2603,- / 500 ml	1 ml / 50 kg ž. h.
Zerofen	susp.	10% 2513,- / 1000ml	3 g /25 kg ž. h.

VI. Seznam použité související literatury

Bhriгу, B., Pathaka, N. S., Alamb, M. S., Ahsamb, W. 2010. Search for Biological Active Isatins: A Short Review. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research 2(4), 229-235.

Blackhall, W. J., Prichard, R. K., Beech, R. N. 2008. P – glykoprotein selectionin strains Haemonchus contortus resistant to benzimidazoles. Veterinary Parasitology 152, 101 – 107.

Boersema et al. 1987 In: Samson-Himmelstjerna, G., Coles, G. C., Jackson, F., Bauer, Ch., Borgsteede, F., Cirak, V. Y., Demeler, J., Donnan A., Dorny P., Epe, Ch., Harder, A., Höglund, J., Kaminsky R., Kerboeuf, D., Küttler, U., Papadopoulos, E., Posedi, J., Small, J., Várady, M., Vercruysse, J., Wirtherle, N., 2009. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes- Parasitology Research 105, 825–834.

Cobon, G., Willetts, N. S. 1984 The application of recombinant DNA techniques to the production of antihelminth vaccines. In: J. K. Dineen and P. M. Outteridge (Editors), Immunogenetic Approaches to the Control of Endoparasites with Particular Reference to Parasites of Sheep. CSIRO, Australia, 55 – 63.

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, 35-44.

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, 167-185.

Corwin, R. M. 1997. Economics of gastrointestinal parasitism of Cattle. *Veterinary Parasitology* 72, 451-460.

Dobson et al 1986 In: Samson-Himmelstjerna, G., Coles, G. C., Jackson, F., Bauer, Ch., Borgsteede, F., Cirak, V. Y., Demeler, J., Donnan A., Dorny P., Epe, Ch., Harder, A., Höglund, J., Kaminsky R., Kerboeuf, D., Küttler, U., Papadopoulos, E., Posedi, J., Small, J., Várady, M., Vercruysse, J., Wirtherle, N., 2009. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes- *Parasitology Research* 105, 825–834.

Dolinská, M., Königová, A., Várada, M. 2012. Is the micro-agar larval development test reliable enough to detect ivermectin resistance? *Parasitology Research* 111, 2201 - 2204

Duncan, J. L. 1985. Internal parasites of the horse and their control. *Equine. Veterinary. Journal* 17, 79 – 82.

Duncan, J. L. Love, S. 1991. Preliminary observations on an alternative strategy for the control of horse strongyles. *Equine. Veterinary. Journal* 23, 226 – 228.

Durden, D. A. 2007. Positive and negative electrospray LC–MS–MS methods for quantitation of the antiparasitic endectocide drugs, abamectin, doramectin, emamectin, eprinomectin, ivermectin, moxidectin and selamectin in milk. *Journal of Chromatography B*. 850, 134-146.

Eysker, M., Jansen, J. 1983. Wemmenhove, R.: Alternative grazing of horses and sheep as control for gastro-intestinal helminthiasis in horses. *Veterinary Parasitology* 13, 273-280.

Eysker, M., Vercruysse, J. 1990. Epidemiologie, chemotherapie, anthelmintika-resistentie en preventie van strongylidae infecties bij het paard. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr*, 59, 118-127.

Fourichon, C., Seegers, H., Beaudeau, F., Verfaille, L., Bareille, N. 2001. Health-control costs in dairy farming systems in western France. *Livestock Production Science* 68, 141–156.

Gasbarre, L. C., Stoutb, W. L., Leightonc, E. A. 2001. Gastrointestinal nematodes of cattle in the northeastern US: results of a producer survey. *Veterinary Parasitology* 101, 29–44.

Ghisi et al. 2006 In: Samson-Himmelstjerna, G., Coles, G. C., Jackson, F., Bauer, Ch., Borgsteede, F., Cirak, V. Y., Demeler, J., Donnan A., Dorny P., Epe, Ch., Harder, A., Höglund, J., Kaminsky R., Kerboeuf, D., Küttler, U., Papadopoulos, E., Posedi, J., Small, J., Várady, M., Vercruysse, J., Wirtherle, N., 2009. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes- *Parasitology Research* 105:825–834.

Gill, J. H., Redwin, J. M., Van Wyk, J. A., Lacey, E. 1991. Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. 21, 771-776.

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

Hennessy 2000, In: Sweeny, J. P. A., Gardner, G. E., Dobson, R. J., Jacobson, C., Bell, K., 2011. Associations between trichostrongylid worm egg count and productivity measures in Dorper lambs. *Veterinary Parasitology* 180, 307–314.

Hennessy, D. R., Lacey, E., Prichard, R. K. 1983. Pharmacokinetic behaviour and anthelmintic efficacy of 1-n-butyl carbamoyl oxfendazole given by intramuscular injection. *Veterinary Record* 6, 177 – 187.

Hoekstra et al. 1997 In: Samson-Himmelstjerna, G., Coles, G. C., Jackson, F., Bauer, Ch., Borgsteede, F., Cirak, V. Y., Demeler, J., Donnan A., Dorny P., Epe, Ch., Harder, A., Höglund, J., Kaminsky R., Kerboeuf, D., Küttler, U., Papadopoulos, E., Posedi, J., Small, J., Várady, M., Vercruysse, J., Wirtherle, N., 2009. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes- *Parasitology Research* 105, 825–834.

Hotson, I. K. 1985. New developments in nematode control: the role of the animal health products industry. In: N. Anderson and P.J. Waller (Editors), *Resistance in Nematodes to Anthelmintic Drugs*. CSIRO, Melbourne, 117-125.

Hunt, K. R., Taylor, M. A. 1989. Use of the egg hatch assay on sheep faecal samples for the detection of benzimidazole resistant worms. *Veterinary Record*. 125, 153-154.

Churcher, T. S., Kaplan, R. M., Ardelli, B. F., Schwenkenbecher, J. M., Basáñez, M. G., Lammie, P. J. 2010. Antimicrobial Resistance – Beyond the Breakpoint. 6, 120-137.

Johansen and Waller 1989 In: Samson-Himmelstjerna, G., Coles, G. C., Jackson, F., Bauer, Ch., Borgsteede, F., Cirak, V. Y., Demeler, J., Donnan A., Dorny P., Epe, Ch., Harder, A., Höglund, J., Kaminsky R., Kerboeuf, D., Küttler, U., Papadopoulos, E., Posedi, J., Small, J., Várady, M., Vercruysse, J., Wirtherle, N., 2009. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes- Parasitology Research 105, 825–834.

Jurášek, V., Dubinský, P. 1993. Veterinárna parazitológia. Príroda a.s. Bratislava. 382.

Kaminsky, R., Gauvry, N., Schorderet Weber, S., Skripsky, T., Bouvier, J., Wenger, A., Schroeder, F., Desaulles, Y., Hotz, R., Goebel, T., Hosking, B. C., Pautrat, F., Wieland-Berghausen, S., Ducray, P. 2008. Identification of the amino-acetonitrile derivative monepantel (AAD 1566) as a new anthelmintic drug development candidate. Parasitology Research. 103, 931-939.

Langrová, I., Vadlejch, J., Makovcová, K., Jankovská, I., Petrtýl, M., Keil, P., Lytvinecs, A. 2008. Arrested development of sheep strongyles: onset and resumption under field conditions of Central Europe. Parasitology Research, 103, 387 – 392.

Le Jambre, L. F. 1984. Genetic control of *Haemonchus*. In: J. K. Dineen and P. M. Outteridge (Editors), Immunogenetic Approaches to the Control of Endoparasites with Particular Reference to Parasites of Sheep. CSIRO, Australia, 78 – 88.

Lloyd, S. 1981. Progress in immunization against parasitic helminths. Parasitology 83, 225 – 242.

Mage, C., Trillaud-Geyl, C., Arnaud, G. 1995. Epidémiologie de l'infestation des jeunes chevaux au pâturage par les strongles gastro-intestinaux. Revue de médecine vétérinaire 146, 41- 44.

Martin et al. 1989 In: Samson-Himmelstjerna, G., Coles, G. C., Jackson, F., Bauer, Ch., Borgsteede, F., Cirak, V. Y., Demeler, J., Donnan A., Dorny P., Epe, Ch., Harder, A., Höglund, J., Kaminsky R., Kerboeuf, D., Küttler, U., Papadopoulos, E., Posedi, J., Small, J., Várady, M., Vercruysse, J., Wirtherle, N., 2009. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes- Parasitology Research 105:825–834.

Murphy, D., Love, S. 1997. The pathogenic effects of experimental cyathostome infections in ponies, *Veterinary Parasitology* 70, 99 – 100.

Peacock, R, Poynter, D. 1980 Field experience with a bovine lungworm vaccine. In: A.E.R. Taylor, and R. Muller (Editors), *Vaccines against Parasites*. Symposium British Society For Parasitology 18, 141-148.

Ramage, C., Bartley, D. J., Jackson, F., Cody, R., Hosking, B. C. 2012. The efficacy of monepantel against naturally acquired inhibited and developing fourth-stage larvae of *Teladorsagia circumcincta* in sheep in the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*. 186, 528-531.

Robertson, A. P., Bjørn, H. E., Martin, R. J. 2000. Pyrantel resistance alters nematode nicotinic acetylcholine receptor single-channel properties. *European Journal of Pharmacology*. 394, 1-8.

Samson-Himmelstjerna, G., Coles, G. C., Jackson, F., Bauer, Ch., Borgsteede, F., Cirak, V. Y., Demeler, J., Donnan A., Dorny P., Epe, Ch., Harder, A., Höglund, J., Kaminsky R., Kerboeuf, D., Küttler, U., Papadopoulos, E., Posedi, J., Small, J., Várady, M., Vercruysse, J., Wirtherle, N., 2009. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes- *Parasitology Research* 105, 825–834.

Sangster, N. C. 1998. Binding of [H-3]m-aminolevamisole to receptors in levamisole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. 28, 707-717.

Sangster, N. C. 1999. Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal. For Parasitology* 29, 115-124.

Skrjabin, A. M., Petrov, A. M., Orlov, I. V., Markov, A. A., Caprun, A. A. Saljajev, V. A. 1956. *Parasitologie domácích zvířat*. ČSAV, SZN, Praha, 281 s.

Smith, M.C., Sherman, D.M. 1994. *Goat Medicine* . Wiley-Blackwell. 620 s.

Sweeny, J. P. A., Gardner, G. E., Dobson, R. J., Jacobson, C., Bell, K., 2011. Associations between trichostrongylid worm egg count and productivity measures in Dorper lambs. *Veterinary Parasitology* 180, 307–314.

Taylor, M. A., Hunt, K. R., Goodyear, K. L. 2003. Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*. 103, 183-194.

Turner, M. J., Schaeffer, J. M. 1989. Mode of action of ivermectin. In: Campbell, W. E. (Ed.), Ivermectin and Abamectin. Springer, New York, 73 - 88.

Vadlejch, J., Kopecký, O., Kudrnáčová, M., Čadková, Z., Jankovská, I., Langrová, I. 2013. The Effect of Risk Factors of Sheep Flock Management Practices on Development of Anthelmintic Resistance in the Czech Republic. (v tisku).

Várady et al. 2006 In: Samson-Himmelstjerna, G., Coles, G. C., Jackson, F., Bauer, Ch., Borgsteede, F., Cirak, V. Y., Demeler, J., Donnan A., Dorny P., Epe, Ch., Harder, A., Höglund, J., Kaminsky R., Kerboeuf, D., Küttler, U., Papadopoulos, E., Posedi, J., Small, J., Várady, M., Vercruyse, J., Wirtherle, N., 2009. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes- Parasitology Research 105:825–834.

Waller, P. J. 1987 Anthelmintic resistance and the future for roundworm control. Veterinary Parasitology 25, 177-191.

Wyk, J. A. 1990. A review of chemical methods available for the control of gastrointestinal nematodes of sheep and cattle. Journal of the South African Veterinary Association 61, 136 – 140.

Internetové odkazy

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

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, Petrtýl 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 na příslušný projekt

Zpracováno v rámci řešení výzkumného projektu NAZV č. QI111A199.