

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

ZJIŠŤOVÁNÍ ANTHELMINTICKÉ ÚČINNOSTI BIOLOGICKY AKTIVNÍCH LÁTEK ROSTLIN

Metodika

doc. Ing. Jaroslav Vadlejch, Ph.D.

Ing. Eva Burešová

prof. Ing. Iva Langrová, CSc.

Praha © 2018

Oponenti:

prof. MVDr. Daniela Lukešová, CSc.

Fakulta tropického zemědělství
Česká zemědělská univerzita v Praze

Ing. Jan Vodička

Odbor živočišných komodit
Ministerstvo zemědělství ČR

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QJ1510038 s názvem:
„Využití rostlinných extraktů jako bioantiparazitik u hospodářských zvířat“

ISBN 978-80-213-2912-6

Abstrakt

Gastrointestinální hlístice jsou limitujícím faktorem pro prosperující chov přežvýkavců. Parazitární gastroenteritida, kterou tyto paraziti v intenzivních chovech přežvýkavců vyvolávají, způsobuje po celém světě významné ekonomické ztráty v důsledku úhynů zvířat, snížení kvantity i kvality produkce, zvýšení nákladů na diagnostiku a terapii infekcí. Tradičně se k terapii parazitární gastroenteritidy používají anthelmintika. Příliš častá, chybná a dlouhodobá aplikace těchto syntetických léčivých přípravků však vedla ke snižování jejich účinnosti a v řadě zemí s rozvinutým pastevním chovem přežvýkavců je již dokonce zaznamenávána rezistence gastrointestinálních hlístic na anthelmintika. Je proto potřeba změnit přístup k tlumení parazitů a parazitóz. Jednou z možných alternativ je použití rostlin bohatých na biologicky aktivní látky, které vykazují anthelmintické účinky. Před samotným podáním těchto rostlin je však potřeba zjistit jejich skutečné anthelmintické vlastnosti v laboratorních podmínkách, s využitím *in vitro* metod a získané výsledky pak následně ověřit *in vivo* testem na zvířeti. Je potřeba také zvážit možné antinutriční a toxické účinky rostlin, které by mohly negativně ovlivnit produkci či zdravotní stav zvířat. S využitím biologicky aktivních látek lze nejen tlumit dopady parazitární gastroenteritidy v chovech hospodářských zvířat, ale také snížit výskyt xenobiotik, jak v produktech zvířat určených pro lidskou konzumaci, tak v prostředí.

Klíčová slova: přežvýkavec; hlístice; gastrointestinální trakt; infekce; terapie; rezistence; sekundární metabolity rostlin; *in vitro* metody; test na zvířeti

Seznam použitých zkratek

BAL – biologicky aktivní látky

BZ – benzimidazoly

DMSO – dimethylsulfoxid

ED₅₀ (median effective dose) – průměrná efektivní dávka

EHT (Egg hatch test) – test líhnutí vajíček

EPG (eggs per gram) – počet vajíček parazita v gramu výkalu hostitele

FBZ – fenbendazol

FITC – fluorescein isothiokyanát

GI – gastrointestinální

IVM AG – ivermektin aglykon

LD₅₀ (median lethal dose) – průměrná letální dávka

LDT (Larval development test) – test vývoje larev

LF₅₀ (median larval fed dose) – průměrná dávka, při které nedojde k nakrmení 50 % larev

LFIT (Larval feeding inhibition test) – test inhibice krmení larev

MALDT (Microagar larval development test) – test vývoje larev na mikroagaru

PGE – parazitární gastroenteritida

RPM (revolutions per minute) – počet otáček za minutu

TOL – toltrazuril

WAAVP (The World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) – Světová asociace pro rozvoj veterinární parazitologie

Obsah

I. Cíl metodiky	6
II. Vlastní popis metodiky.....	8
1 Současný stav poznání.....	9
1.1 Gastrointestinální hlístice a parazitární gastroenteritida	9
1.2 Terapie PGE a anthelmintická rezistence.....	10
1.3 Alternativní metody tlumení PGE.....	13
1.3.1 Faktory ovlivňující účinnost biologicky aktivních látek	17
2 Metodická část.....	20
2.1 Příprava rostlinných extraktů	21
2.2 <i>In vitro</i> testy.....	22
2.2.1 Test líhnutí vajíček – Egg hatch test (EHT)	22
2.2.2 Test vývoje larev – Larval development test (LDT)	30
2.2.3 Test inhibice krmění larev – Larval feeding inhibition test (LFIT)	35
2.3 <i>In vivo</i> testy.....	41
2.3.1 Test na zvířeti.....	41
III. Srovnání „novosti postupů“	48
IV. Popis uplatnění metodiky.....	50
V. Ekonomické aspekty.....	52
VI. Seznam použité související literatury.....	58
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice.....	72
VIII. Dedikace.....	75

I. Cíl metodiky

Cílem této metodiky je všem zainteresovaným subjektům z řad odborné i chovatelské veřejnosti poskytnout přehled o možnostech zjišťování anthelmintických vlastností rostlin, s využitím *in vitro* a *in vivo* metod. Na základě doporučení uvedených v této metodice by měl být čtenář schopen vyhodnotit vhodnost zařazení rostlin s vysokým obsahem biologicky aktivních látek do systému kontroly zdraví stáda a zároveň zhodnotit ekonomické aspekty tohoto opatření.

II. Vlastní popis metodiky

1 SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

1.1 Gastrointestinální hlístice a parazitární gastroenteritida

Hospodářská zvířata jsou často infikována parazity, kteří u nich mohou vyvolat více či méně závažná onemocnění, s dopadem na zdravotní stav i produkci. Jedním z velkých problémů v intenzivních chovech přežvýkavců jsou tzv. pastevní parazitózy. Jedná se o skupinu infekčních onemocnění, která jsou typická právě pro zvířata chovaná na pastvině.

Nejčastějšími původci těchto onemocnění jsou gastrointestinální (GI) hlístice. U přežvýkavců mohou parazitovat až desítky druhů GI hlístic. Protože infekce vyvolané těmito parazity mají velmi podobnou symptomatologii i epizootologii a terapeutický přístup k nim je shodný, používá se pro jejich souhrnné označení termín parazitární gastroenteritida (PGE) (Zajac, 2006; Charlier et al., 2014; 2016).

Z celosvětového hlediska PGE patří mezi jedno z nejvýznamnějších infekčních onemocnění domácích přežvýkavců (Fitzpatrick, 2013). Závažnost PGE je závislá na řadě faktorů parazita (druhové spektrum GI hlístic, intenzita infekce), hostitele (celkový zdravotní stav, výživa, kondice, imunita, stres) i prostředí (klimatické podmínky, management chovu a pastviny). V rozvinutých zemích světa se v důsledku kvalitní výživy a veterinární péče PGE projevuje většinou jen v subklinické formě. U infikovaných jedinců dochází ke snížené konverzi krmiva,

nechutenství, zažívacím obtížím až průjmům a v důsledku toho k hubnutí a zhoršení kondice (viz obr. 1). Ve většině případů se tedy nejedná o život ohrožující onemocnění, ale může výrazně ovlivnit ekonomiku chovu. Přímé ztráty v důsledku PGE se projevují sníženou produkcí a kvalitou produktů, ty nepřímé jsou pak spojeny s nárůstem nákladů na diagnostiku a terapii (Hoste et al., 2011a; Charlier et al., 2015).



obr. 1. Kůzle trpící těžkou parazitární gastroenteritidou (foto J. Vadlejš)

1.2 Terapie PGE a anthelmintická rezistence

Z výše uvedených skutečností vyplývá, že GI hlístice představují významný limitující faktor pro prosperující chov

přežvýkavců. GI hlístice mají řadu vlastností a disponují řadou adaptačních mechanismů, které jim umožňují přežít i v nepříznivých podmínkách. Z těchto důvodů je úplná eradikace těchto parazitů ze zvířat, i z prostředí, nereálná. Cílem je proto udržet GI hlístice na takové úrovni, aby nezpůsobovaly infekce s dopadem na zdravotní stav zvířat, nebyla výrazně snížena produkce chovu a zároveň, aby finance vynakládané na tlumení PGE, významně neovlivňovaly celkovou ekonomiku chovu (Kenyon et al., 2009; Charlier et al., 2014).

Nejčastěji využívaným principem k zamezení vzniku klinické formy PGE stále zůstává odstranění parazitů z hostitele pomocí syntetických nebo semisyntetických léčiv – anthelmintik. Za anthelmintika jsou obecně považovány chemické látky, která způsobí odstranění parazitických helmintů z hostitele nebo látky, které zabraňují vzniku infekce při pozření infekčních stadií helmintů (Sutherland, et Scott, 2010; Taylor et al., 2016). K terapii PGE bylo dosud vyvinuto pět hlavních skupin anthelmintik (benzimidazoly, imidazothiazoly/tetrahydropyrimidiny, makrocyclické laktony, amino-acetonitrilové deriváty a spiroindoly), které jsou komerčně dostupné v řadě lékových i aplikačních forem (Conder, 2002; Hoste et al., 2011a; Abbott et al., 2012; Taylor et al., 2016).

V minulých dekádách, mnohdy ještě i v současnosti, jsou anthelmintika používána převážně profylakticky, bez informací o aktuální úrovni infekce PGE, účinnosti jednotlivých skupin anthelmintik v daném stádě zvířat, bez znalosti biologie GI hlístic, či epizootologie PGE. Při vlastním podání anthelmintik pak často nejsou dodržována pravidla správné aplikace léčiv. Výše zmíněné

faktory, společně s využíváním chemické léčby jako výhradní metody tlumení PGE, postupně vedly k snižování účinnosti léčiv až ke vzniku rezistence GI hlístic na anthelmintika (Jackson et Coop, 2000; Sangster et Dobson, 2002; Wolstenholme et al., 2004; Sutherland et Scott, 2010). Tato tzv. anthelmintická rezistence, kdy se v populaci parazitů vyskytuje vysoký počet jedinců, kteří tolerují dávku léčiva, která je účinná proti vnímavé části populace parazita (Prichard et al., 1980), se v posledních dekádách stala jedním z největších problémů veterinární parazitologie. Postupem času se léková rezistence v intenzivních chovech značně rozšířila, a to nejen rezistence na jednotlivé účinné látky, ale i na více chemických látek současně (tzv. multirezistence). Došlo tak k výraznému omezení možností terapie PGE a tento problém v určitých oblastech světa přerostl až do roviny socioekonomické. Z důvodu absolutního selhávání všech dosud známých anthelmintik totiž již nadále nebyl chov přežvýkavců rentabilní a musel být ukončen. Takováto situace byla již zaznamenána na některých farmách v Jihoafrické republice a v Austrálii (van Wyk et al., 1989; Sutherland et Scott, 2010). Situace v Evropě zatím není tak vážná, ale rezistence již byla zaznamenána ve většině evropských zemí, ve většině chovů přežvýkavců a na většinu anthelminticky účinných látek (Papadopoulos et al., 2012; Rose et al., 2015; Traversa et von Samson-Himmelstjerna, 2016). V České republice není účinnost léčiv dlouhodobě a podrobně sledována, nicméně z výsledků několika studií, které byly provedeny u ovcí vyplývá, že rezistence na anthelmintika se vyskytuje i v českých chovech přežvýkavců (Chroust, 2000; Vernerová et al., 2009; Vadlejch et al., 2014) a dokonce již byla zaznamenána i multirezistence (Vadlejch et al., 2014).

Rezistence je podmíněná geneticky a geny pro tuto vlastnost v populaci parazitů přetrvávají po mnoho generací. Alarmující je fakt, že dosud nebyl popsán žádný případ návratu rezistentních kmenů GI hlístic k plné citlivosti na dané anthelmintikum (Sangster et Dobson, 2002; Kaplan, 2004). Poměrně znepokojujícím zjištěním je rychlost vzniku anthelmintické rezistence. V laboratorních podmínkách může být rezistentní kmen vyselektován již za tři generace, což při standardním vývojovém cyklu GI hlístic představuje pouhé tři měsíce. Prakticky byla rezistence na danou účinnou látku zaznamenána vždy čtyři až pět let po uvedení konkrétního léčiva na trh (viz tab. 1).

léčivo		rok schválení	výskyt rezistence
skupina	účinná látka		
benzimidazoly	thiabendazol	1961	1964
imidazothiazoly	levamizol	1970	1979
makrocyclické laktony	ivermektin	1981	1988
	moxidektin	1991	1995
AAD deriváty	monepantel	2009	2013

tab. 1. Vznik rezistence u nejvýznamnějších skupin anthelmintik, zpracováno dle různých autorů

1.3 Alternativní metody tlumení PGE

Rezistence na anthelmintika je již v chovech přežvýkavců po celém světě značně rozšířená. Pokud se nezmění tradiční přístup k tlumení PGE, lze očekávat ještě větší prohloubení tohoto

problému. Současný pohled na zdravé potraviny vyžaduje živočišné produkty s minimálními rezidui léčiv a jiných xenobiotik. V důsledku rostoucích požadavků spotřebitelů na biopotraviny neustále roste počet ekologických chovů, kde je využití chemických látek (včetně léčiv) výrazně omezeno (McKellar, 1997; Cabaret et al., 2002; Rochfort et al., 2008). Pokud vezmeme v úvahu všechny výše zmíněné informace, lze snadno vyvodit, že využití anthelmintik jako jediné metody tlumení PGE, není do budoucna trvale udržitelné. Z toho důvodu se intenzivně hledají alternativní metody tlumení PGE. Přestože existuje několik metod, jak potlačit výskyt parazitů, patří využití anthelmintických účinků biologicky aktivních látek (BAL) z rostlin mezi nejčastěji využívané, splňující i požadavky na tzv. zdravé potraviny (Hoste et Torres-Acosta, 2011).

Dosud byla popsána řada BAL, které negativně působí na GI hlístice. Největším zdrojem těchto látek jsou rostliny, které je vytvářejí jako sekundární metabolity, protože tyto látky nejsou nezbytné pro zajištění základních životních funkcí a jejich biosyntéza navazuje na primární metabolismus. Sekundární metabolity slouží k řadě ekologických, regulačních a detoxifikačních funkcí a dodávají rostlinám jejich charakteristické pachové a chuťové vlastnosti (Siddiqui et Prasad, 2017). Mezi rostlinné sekundární metabolity patří široká škála chemicky různorodých látek řazených mezi lipidy, alkaloidy, terpeny a fenolické sloučeniny (Rochfort et al., 2008; Spiegler et al., 2017). Mezi nejvíce prostudované látky s anthelmintickým účinkem patří taniny (trísloviny), což jsou z chemického hlediska polyfenoly. Trísloviny se na základě své chemické struktury dělí na dvě skupiny – hydrolyzovatelné a kondenzované. První skupina je

pro přežvýkavce toxická, což je zřejmě způsobeno jejich absorbcí gastrointestinálním traktem. Výzkum se tedy zaměřuje především na kondenzované třísloviny, které se vstřebávají jen minimálně a z organismu jsou vylučovány výkaly. Jedním z možných vysvětlení jejich anthelmintických účinků je jejich vysoká vazebná schopnost. Kondenzované třísloviny vytvářejí komplexy s proteiny a chrání je tak proti mikrobiální degradaci v trávicím traktu. Zvýšení podílu metabolizovatelného proteinu, který je možné využít pro tvorbu komponentů imunitního systému, tak ve výsledku zvyšuje odolnost hostitele proti parazitóze (Hoste et al., 2006; Mueller-Harvey, 2006). Stále je třeba mít na paměti, že se jedná o sloučeniny, které využívá rostlina pro svoji obranu a je potřeba s nimi zacházet s rozmyslem. V případě, že jsou kondenzované třísloviny přežvýkavcem pozřeny ve vyšší koncentraci (> 7 % sušiny krmiva), začínají se u nich vyskytovat zdravotní problémy, např. snížení příjmu potravy, potlačení tvorby a proteolytické aktivity mikroorganismů v bachoru a s tím související trávicí obtíže (Reed, 1995; Min et al., 2003). Při nižší koncentraci (> 6 % sušiny krmiva) naopak mohou tyto sloučeniny podporovat růst zvířat a jejich produkci mléka a vlny (Douglas et al., 1999; Min et al., 2004).

Skutečný mechanismus anthelmintického účinku sekundárních metabolitů však dosud nebyl zcela objasněn. Podle nepřímé hypotézy (viz výše) sekundární metabolity zvyšují imunitní odezvu organismu vůči parazitovi. Druhá hypotéza vysvětluje anthelmintický účinek přímým působením BAL na parazita, čímž dochází k ovlivnění jeho biologie. Tuto teorii potvrzují výsledky studií, které prokázaly změny ve struktuře kutikuly, trávicího traktu či samičího reprodukčního ústrojí hlístic, které byly vystaveny

účinkům sekundárních metabolitů rostlin. Současně byly u těchto hlístic popsány funkční problémy při svlékání kutikuly předchozího stadia, které značí nemožnost infikování hostitele (Hoste et al., 2006; Hoste et al., 2011b). Pro potvrzení jedné či druhé hypotézy je však potřeba získat mnohem více důkazů.

Využití rostlin a jejich extraktů při potlačování parazitů není žádným novým objevem. Naopak bylo používáno už ve starověku (Waller, 2001) a stále ještě je jednou z hlavních metod tlumení parazitů hospodářských zvířat v rozvojových zemích, kde je dostupnost komerčních léčiv z finančních důvodů značně omezená (Krecek et Waller, 2006). Etnoveterinární medicína se tak stává velkým zdrojem informací pro studium antiparazitárních účinků rostlin. Před úvahami nad využitím rostlin při tlumení parazitárních infekcí je však potřeba si uvědomit několik základních faktů. Sekundární metabolity rostlin spíše ovlivňují biologii parazita, než aby ho z organismu přímo eliminovaly. Takovýto systém potlačování parazitů se uplatňuje po mnoho staletí zejména v rozvojových zemích, kde od zvířat není vyžadována vysoká produkce a hlavním problémem spojeným s parazity je mortalita zvířat. Pro tyto účely a v daných podmínkách představují BAL z rostlin vhodný nástroj pro odstranění vážných příznaků PGE zvířat. Nicméně v rozvinutých zemích, v intenzivních chovech přežvýkavců, je snaha o maximální efektivitu těchto opatření, aby bylo možné docílit co nejvyšší produkce. A to v současnosti dokáže poskytnout pouze konvenční léčba anthelmintiky. Aby jakákoliv látka byla považována za léčivo, musí totiž vykazovat vysoký stupeň efektivity (> 95 %) při eliminaci parazitů z hostitele nebo musí zabraňovat vzniku parazitózy, při požití infekčních larev.

Přesto, že existuje řada přírodních sloučenin s anthelmintickými účinky, nebyla dosud nalezena žádná, která by splňovala kritéria pro širokospektrální léčivo (Sutherland et Scott, 2010). Sekundární metabolity tedy působí spíše preventivně a lze je využít jako doplněk nebo podpoření anthelmintické léčby. Řada BAL má kromě antiparazitárního účinku i pozitivní vliv na celkový zdravotní stav zvířat, na jejich produkční a reprodukční vlastnosti. Na druhou stranu mohou tyto látky vykazovat i antinutriční účinky nebo jsou dokonce toxické a podle toho je potřeba s nimi zacházet (Makkar, 2003; Mueller-Harvey, 2006).

1.3.1 Faktory ovlivňující účinnost biologicky aktivních látek

Pro zjišťování účinnosti BAL rostlin proti GI hlísticím se používá široká škála *in vitro* a *in vivo* testů. Testují se anthelmintické účinky jak jednotlivých látek, tak jejich směsí a ověřování probíhá proti různým druhům GI hlístic, u různých druhů hostitelů. Všechny tyto výše zmíněné faktory mohou být důvodem variabilních výsledků při testování stejné rostliny, či látky.

V řadě případů anthelmintická aktivita zjištěná s využitím *in vitro* testů, nebyla potvrzena u zvířat při *in vivo* experimentech (Rochfort et al., 2008). Tato zjištění lze zdůvodnit rozdílnými podmínkami ve kterých jsou dané testy prováděny. Při laboratorním testování (*in vitro* testy) je možné dosáhnout jasně definovaných podmínek, ve kterých dochází k vystavení parazita testované látce či směsi látek. Je však velmi složité definovat komplexní působení

všech chemických a fyziologických faktorů uvnitř gastrointestinálního traktu zvířete (*in vivo* testy), které mohou výsledný anthelmintický účinek ovlivnit. Z tohoto důvodu nemusejí být pozitivní výsledky *in vitro* testů ověřeny v *in vivo* podmínkách. Byly však již zaznamenány i opačné případy, kdy BAL relativně účinně potlačily PGE u zvířete, ale u následných laboratorních testů tento efekt nebyl prokázán (Niezen et al., 2002).

Anthelmintický účinek závisí i na druhu GI hlístice použité při *in vivo* testech. Vlastní účinek BAL je závislý na chemismu prostředí, ve kterém dochází ke kontaktu s parazitem, zejména na okolním pH (Mueller-Harvey, 2006). Tento fakt vysvětluje vyšší účinnost tríslovin proti slezovým hlísticím rodu *Haemonchus*, než proti druhům hlístic z tenkého střeva, které se vyskytují v odlišném prostředí (Shaik et al., 2006; Terill et al., 2007). Opět však byly zjištěny i opačné případy, kdy testovaná látka byla účinnější proti hlísticím rodu *Trichostrongylus*, které infikují tenké střevo, než proti slezovým hlísticím *Haemonchus* a *Teladorsagia* (Athanasiadou et al., 2001).

Výsledný efekt BAL závisí i na druhu zvířete, respektive jeho potravních preferencí. Zvířata, která převážnou část dne spásají vegetaci, mají poněkud odlišnou fyziologii trávicího traktu než ta, která se kromě spásání vegetace živí i okusováním keřů (Hoste et al., 2010). Dosud k tomuto tématu existuje jen velmi malé množství prací. Z těch již publikovaných ale vyplývá, že u ovcí je anthelmintický efekt výraznější (redukce počtu dospělých hlístic), zatímco u koz jde spíše o nepřímé působení látek na plodnost samic parazita (Athanasiadou et al., 2001; Paolini et al., 2004).

V neposlední řadě variabilita ve výsledcích testování souvisí se samotnou rostlinou. Množství vytvořených sekundárních

metabolitů se liší v jednotlivých částech rostliny, závisí na geografickém původu, respektive na klimatických podmínkách, ve kterých rostlina rostla, a také na fenologické fázi rostliny (Koupai et al., 1993; Azaizeh et al., 2015). Při samotném testování je potřeba vhodně zvolit i formu či technologickou úpravu rostliny, aby nedošlo k degradaci BAL (Hoste et al., 2011b).

2 METODICKÁ ČÁST

Pro testování anthelmintického účinku BAL je využívána řada *in vitro* a *in vivo* metod, z nichž většina byla přejata ze standardizovaných metodik, které vydává asociace WAAVP (The World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) a které jsou zaměřené na ověřování účinnosti léčiv, respektive testování lékové rezistence. Na rozdíl od *in vitro* metod detekce a kvantifikace anthelmintické rezistence nebyly dosud stanoveny limitní hladiny anthelmintické účinnosti BAL. Tento fakt může ovlivnit finální hodnocení konkrétní rostliny, respektive její praktické využití k tlumení PGE. Další komplikací při hodnocení anthelmintické účinnosti BAL je určitá variabilita výsledků vyplývající z rozdílů mezi *in vitro* a *in vivo* metodami, druhy zvířat použitých při *in vivo* testech a zejména pak z použití různých částí rostlin různého geografického původu a fenologické fáze (viz kapitola 1.3.1). Před praktickým využitím konkrétní rostliny k potlačení PGE v podmínkách chovů je proto potřeba obdržet pozitivní výsledky současně z *in vitro* i *in vivo* metod, získat informace o možných negativních účincích rostliny na zdravotní stav či produkci a před vlastní aplikací zvolit vhodnou formu podání rostliny, či extraktu z ní.

2.1 Příprava rostlinných extraktů

Prvním krokem před provedením *in vitro* testů je příprava extraktů z testované rostliny. Aby se předešlo falešně negativním výsledkům, je vhodné na základě studia literatury vždy zvolit tu část rostliny, která obsahuje nejvyšší koncentrace sekundárních metabolitů. Ideální formou pro přípravu extraktu je vysušený rostlinný materiál získaný z komerčních zdrojů, které se pěstováním rostlin a jejich využitím k léčebným účelům dlouhodobě zabývají. Předchází se tak variabilitě ve výsledcích při opakovaném získávání materiálu ze stejného druhu rostliny pro ověření výsledků.

Pro vytvoření rostlinného extraktu lze využít různé chemické látky (voda, methanol, ethanol, aceton), která mají odlišnou schopnost extrakce BAL. Na základě vlastních zkušeností můžeme jako nejoptimálnější extrakční činidlo pro získání BAL je ethanol.

Příprava ethanolového extraktu probíhá následovně (viz obr. 2):

- 10 g sušeného rostlinného materiálu je pomocí laboratorního nožového mlýnku nasekáno na co nejjemnější drť
- rozdrčený materiál je macerován ve 200 ml 96% ethanolu, proces probíhá 24 hodin při laboratorní teplotě (20 ± 2 °C) na orbitální třepačce
- vzniklý macerát je přefiltrován a na vakuové odparce při 40 °C je zbaven ethanolu

- vysušený materiál je pak rozpuštěn v 1% dimethylsulfoxidu (DMSO) a je připraven zásobní roztok pro testování. Zásobní roztok je možné při teplotě -20 °C skladovat až několik měsíců bez ztráty účinnosti BAL



obr. 2. Schematické znázornění přípravy rostlinného extraktu (originál J. Vadlejš)

2.2 *In vitro* testy

2.2.1 Test líhnutí vajíček – Egg hatch test (EHT)

Tento *in vitro* test byl původně vyvinut pro detekci rezistence hlístic na benzimidazolová anthelmintika. Při EHT se vyhodnocuje líhnutí larev GI hlístic z vajíček, která jsou vystavena působení různých koncentrací léčiva. Tuto metodu poprvé popsal Le Jambre (1976) a od té doby byla publikována řada modifikací EHT (Dobson et al., 1986; Hunt et Taylor, 1989; Johansen et Waller, 1989). Pod záštitou WAAVP, která vydává mezinárodně platné metodiky a postupy pro veterinární parazitologii, publikoval kolektiv autorů Coles et al. (1992; 2006) doporučený postup pro EHT. Nejnověji pak byl EHT standardizován mezinárodním kolektivem autorů von Samson-Himmelstjerna et al. v roce 2009. Tato metodika se s určitými modifikacemi (zařazení pozitivní

i negativní kontroly a využití pouze jednoho druhu GI hlístice) využívá i pro testování ovicidních vlastností BAL.

Jedním z nejkritičtějších bodů metodiky je získání dostatečného množství vajíček, ve kterých se ještě nevinuly larvy. Vývoj larvy ve vajíčku probíhá kontinuálně od vyloučení vajíček výkaly hostitele do vnějšího prostředí. Pro pozastavení tohoto vývoje je potřeba zamezit přístupu kyslíku, který je pro vývoj nezbytný.

Získání fekálního materiálu pro separaci vajíček hlístic:

- pro získání většího množství výkalů se nám osvědčil vlastnoručně vyrobený fekální vak (viz obr. 3), který je upevněný na zvíře; s využitím tohoto systému je možné kontinuálně získávat výkaly po dobu několika hodin



obr. 3. Vak pro získávání výkalů (výroba a foto M. Kudrnáčová)

- rektálně odebrané nebo čerstvě vyloučené výkaly zvířete (donora) experimentálně infikovaného monoinfekcí GI hlístice (viz kapitola 2.3.1) lze buď ihned zpracovat a pokud to není možné, zajistit jejich uložení v anaerobním prostředí

Skladování výkalů pro EHT:

- výkaly umístit do plastové uzavíratelné nádoby, přidat několik skleněných kuliček o velikosti 8 – 10 mm a nádobu až po okraj hrdla naplnit kohoutkovou vodou
- po důkladném uzavření nádobu důkladně protřepat, čímž dojde k vytvoření anaerobních podmínek
- upravené fekální vzorky se umístí do laboratorní teploty (20 ± 2 °C), nikdy ne do ledničkové teploty (4 °C), která negativně ovlivní výsledky testu tím, že snižuje líhivost vajíček
- na základě vlastního pozorování lze použít i patentovaný systém sáčků GasPak, který na základě chemické reakce vytváří anaerobní prostředí
- pro EHT lze použít čerstvé fekální vzorky nebo takové, které byly anaerobně skladované po dobu jednoho týdne

Separace vajíček (modifikace metodiky Coles et al., 2006):

- čerstvě získané nebo anaerobně skladované fekální vzorky (cca 10 g) se umístí do třecí misky, zalijí se kohoutkovou vodou a pomocí tloučku se vzniklá směs homogenizuje do pastovité konzistence

- vzniklá fekální hmota se přes kuchyňské sítko převede do nádoby a vzniklou tekutinou zbavenou přebytečného balastu se naplní centrifugační zkumavky
- po 5 minutové centrifugaci při 1 200 RPM se opatrně slije supernatant a k sedimentu se přidá flotační roztok tak, aby zkumavka byla zaplněna do poloviny svého objemu
- obsah zkumavky se pomocí Pasteurovy pipety zhomogenizuje a přidá se flotační roztok tak, aby hladina vytvořila pozitivní meniskus
- na zkumavku se položí mikroskopovací krycí sklo a zkumavka se centrifuguje (3 minuty při 1 100 RPM)
- krycí sklo se sejme a zachycená tekutina s vajíčky se destilovanou vodou spláchne do kónické nádoby
- zkontroluje se čistota získaných vajíček a vyjádří se jejich počet v daném objemu (ideálně v 1 ml)
- při výskytu nadměrného množství balastu v tekutině, či při nedostatečném počtu vajíček se proces získání vajíček z výkalů opakuje
- na základě vlastního pozorování lze pro EHT použít vajíčka maximálně 2 hodiny po jejich separaci, potom jsou již výsledky testu zkreslené vývojem larev (viz obr. 4)



obr. 4. Vajíčka *Haemonchus contortus* v různém stadiu vývoje, A – embryonované vajíčko vhodné pro EHT, B – vajíčko s vyvinutou larvou, které je pro EHT nevhodné, zvětšení 400× (foto J. Vadlejch)

Pro vlastní testování je vhodné použít 24 jamkovou kultivační destičku pro tkáňové kultury. Jako pozitivní kontrola slouží anthelmintikum – 1% thiabendazol (kvalita farmaceutického standardu), negativní kontrolou je dimethylsulfoxid (DMSO) v kvalitě analytického standardu. Na základě vlastního pozorování lze doporučit koncentraci 0,5 – 1 % DMSO. Při koncentraci vyšší než 3 % pak dochází k negativnímu ovlivnění líhivosti vajíček (viz tab. 2). Ethanolvý extrakt z testované rostliny je aplikován do jamek kultivační destičky ve vzrůstající řadě koncentrací. Na základě vlastní zkušenosti můžeme doporučit 4× ředění k dosažení nejvyšší koncentrace 1 024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Testování vyšších koncentrací

nepovažujeme za vhodné. Jednak jsou tyto koncentrace pro tlumení PGE již nepoužitelné (takováto koncentrace se v rostlinách v přírodě nevyskytuje) a prakticky je velmi složité se orientovat v hustém extraktu, který je velmi tmavý a může snadno docházet ke zkreslení výsledku testu. Před založením EHT je vždy potřeba mikroskopicky zkontrolovat, zda jsou vajíčka hlístice pro EHT vhodná (nevytváří se v nich larva – viz obr. 4). Dále je třeba připravit jejich dostatečnou zásobu tak, aby v každé jamce kultivační destičky bylo přibližně 100 vajíček (podle počtu opakování a testovaných koncentrací zhruba 3 000 vajíček na 1 test).

DMSO (%)	opakování	počet parazitárních útvarů				líhivost (%)
		larvy	vajíčka s larvou	morulovaná vajíčka	vajíčka celkem	
0,5	1	61	0	0	0	100,0
	2	47	0	1	1	97,9
	3	66	0	0	0	100,0
1	1	30	0	1	1	96,7
	2	50	0	2	2	96,0
	3	68	0	0	0	100,0
2	1	64	0	2	2	96,9
	2	53	0	2	2	96,2
	3	51	0	2	2	96,1
3	1	52	0	5	5	90,4
	2	66	0	4	4	93,9
	3	40	0	1	1	97,5
5	1	32	14	12	26	18,8
	2	38	7	8	15	60,5

	3	28	25	9	34	n
10	1	2	17	35	52	n
	2	0	24	27	51	n
	3	1	21	21	42	n
30	1	0	0	53	53	n
	2	0	0	45	45	n
	3	0	0	45	45	n
50	1	0	0	20	20	n
	2	0	0	68	68	n
	3	0	0	80	80	n
70	1	0	0	38	38	n
	2	0	0	25	25	n
	3	0	0	51	51	n
100	1	0	0	26	26	n
	2	0	0	51	51	n
	3	0	0	25	25	n

tab. 2. Vliv koncentrace dimethylsulfoxidu na líhivost vajíček *Haemonchus contortus*,
n – negativní výsledek (vlastní pozorování)

Postup EHT:

- do jednotlivých jamek destičky napipetovat 3× pozitivní kontrolu (1% thiabendazol), 3× negativní kontrolu (0,5% DMSO) a 6 koncentrací (1, 4, 16, 64, 256, 1 024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) rostlinných extraktů ve trojím opakování
- do všech testovaných jamek přidat odpovídající množství vajíček (přibližně 100 vajíček na jamku)
- destička nezakrytá víčkem se nechá 48 hod kultivovat v inkubátoru při 27 °C a poté se vývoj vajíček ukončí kapkou

Lugolova roztoku, který všechny přítomné parazitární útvary devitalizuje

- vyhodnocení je možné ihned nebo maximálně jeden týden po ukončení testu, po delší době již dochází ke kontaminaci bakteriemi a plísněmi, které zhoršují orientaci ve vzorcích – výsledky vlastního pozorování
- mikroskopicky se prohlédne obsah všech jamek destičky a zaznamená se počet vajíček a larev (viz obr. 5)
- s využitím probit modelu s logaritmicko-normálním rozdělením se vyjádří hodnota průměrné efektivní dávky extraktu ED₅₀ (effective dose) – koncentrace látky, při které dojde k zamezení vývoje u 50 % vajíček
- pro podrobnější vyhodnocení ovicidní aktivity lze vyjádřit i procento vajíček obsahujících larvu, která se však nevylíhla

EHT dosud nebyl pro testování anthelmintické aktivity BAL standardizován a v literatuře se lze setkat s různými modifikacemi tohoto testu, použitím různých koncentrací testovaných extraktů, různých látek užitých jako negativní kontrola a především nebyla stanovena hladina ED₅₀, při které by měl být extrakt považován za účinný. Doporučujeme pro tyto účely metodiku EHT standardizovat, což povede k porovnatelnosti výsledků mezi jednotlivými laboratořemi a ke správnému vyhodnocení anthelmintické aktivity testovaných látek.



obr. 5. Výsledek testu líhnutí vajíček (EHT), vajíčka v různých fázích vývoje (e) a larvy 1. vývojového stadia (l) *Haemonchus contortus*, zvětšení 100× (foto J. Vadlejch)

2.2.2 Test vývoje larev – Larval development test (LDT)

Z důvodu univerzálnosti (možnost vyhodnocení účinnosti více skupin anthelmintik najednou) patří LDT mezi jeden z nejvíce využívaných *in vitro* testů pro detekci anthelmintické rezistence. Princip tohoto testu, kdy je sledována schopnost vývoje GI hlístice od vajíčka po infekční larvu L₃ v prostředí testované látky, je proto hojně využíván i při testování anthelmintických vlastností BAL, respektive při ověřování jejich larvicidních účinků. LDT byl popsán Colesem et al. (1988) v osmdesátých letech minulého století a od té

doby bylo publikováno několik modifikací (Hubert et Kerboeuf, 1992; Gill et al., 1995; Taylor, 1990) původního LDT, včetně varianty prováděné na agaru MALDT (Microagar larval development test) (Lacey et al., 1991). Asociace WAAVP pak v roce 2006 vydala mezinárodně platné doporučení pro provedení LDT při testování anthelmintické rezistence (Coles et al., 2006). Stejně jako v případě EHT, ani LDT dosud nebyl standardizován pro *in vitro* testování anthelmintických účinků BAL.

Nevýhodami tohoto testu je jeho vyšší pracnost (příprava roztoků a kultivačních medií) a vyšší požadavky na technickou zručnost laboranta. Výsledek LDT může být navíc ovlivněn nepředvídatelnými faktory, které mohou nastat při relativně dlouhé kultivaci larev.

Před zahájením testu je potřeba získat dostatečné množství vajíček GI hlístice (viz kapitola 2.2.1). Pro LDT je vhodné použít 96 jamkovou, průhlednou mikrotitrační destičku s plochým dnem. Z důvodu standardizace LDT se jako pozitivní kontrola používá ivermektin aglykon (IVM AG). V současnosti je komerčně dostupná škála ivermektinových látek, které se však liší svojí čistotou. Pro účely tohoto testu je proto komerčně vyráběný IVM AG o vysoké čistotě (> 99% stanovená HPLC). Protože se jedná o finančně nákladnou chemikálii, je vhodné z ní připravit zásobní roztok a ten v definovaných objemech pro jednotlivé testy uchovávat v mikrozkrumkách při -20 °C. Negativní kontrolou je 1% dimethylsulfoxid (DMSO) v kvalitě analytického standardu – viz kapitola 2.2.1. Ethanolový extrakt z testované rostliny je aplikován do jamek mikrotitrační destičky ve vzrůstající řadě koncentrací. Na základě vlastní zkušenosti doporučujeme 4× ředění k dosažení nejvyšší koncentrace 1 024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Před začátkem

testování je vhodné mikroskopicky zkontrolovat, zda se ve vajíčkách nevytváří larva a připravit jejich dostatečnou zásobu tak, aby v každé jamce kultivační destičky bylo cca 100 vajíček (podle počtu opakování a testovaných koncentrací zhruba 5 000 vajíček na 1 test).

Příprava roztoků a medií:

I) kvasničný extrakt:

- 1 g sušeného kvasničného extraktu rozpustit v 90 ml 0,85% NaCl
- autoklávovat 20 minut při 121 °C
- 3 ml koncentrovaného Earlesova media smíchat s 27 ml sterilního kvasničného extraktu
- připravit si určité podíly (přibližně 600 µl) do mikrozkumavek a zamrazit, dle vlastní zkušenosti při -20 °C vydrží bez kvalitativních ztrát několik měsíců

II) fekální filtrát dle Váradyho, pers. commun.:

- rozetřít cca 4 g výkalů s 56 ml kohoutkové vody a přefiltrovat přes síto s velikostí ok 20 – 23 µm

III) suspenze vajíček dle Váradyho, pers. commun.:

- smíchat vajíčka v destilované vodě s amfotericinem B (300 µg/ml) v poměru 1:1
- přidat fekální filtrát v definovaném poměru 2:2:1
- příklad provedení: 400 µl vajíček + 400 µl amfotericinu B (300 µg/ml) + 200 µl fekálního filtrátu

Dle vlastní zkušenosti doporučujeme roztoky i media připravit vždy čerstvé. Pokud to není možné, tak připravené chemikálie skladovat maximálně jeden týden v ledničce při 4 °C a před použitím je z ledničky vyndat a nechat temperovat při laboratorní teplotě (20 ± 2 °C), aby v době použití jejich teplota byla shodná s teplotou okolního prostředí.

Postup LDT:

- před pipetováním jednotlivých chemikálií je potřeba počítat s celkovým objemem jamek mikrotitrační destičky, který je většinou 150 μl
- do všech jamek destičky postupně napipetovat: 110 μl destilované vody, 20 μl kvasničného extraktu, 10 μl suspenze vajíček (vajíčka + fekální filtrát a antimykotikum) a 10 μl rostlinného extraktu v šesti koncentracích (1, 4, 16, 64, 256, 1 024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) nebo 10 μl pozitivní kontroly (IVM AG) nebo 10 μl negativní kontroly (DMSO)
- všechny koncentrace testovaného extraktu, pozitivní i negativní kontrolu je vhodné napipetovat v trojím opakování
- mikrotitrační destička se kultivuje v inkubátoru 7 dní při teplotě 27 °C a poté se vývoj larev ukončí kapkou Lugolova roztoku, který všechny přítomné parazitární útvary devitalizuje
- vyhodnocení je možné ihned nebo maximálně jeden týden po ukončení testu, po delší době již dochází ke kontaminaci bakteriemi a plísněmi, které zhoršují orientaci ve vzorcích – výsledky vlastního pozorování

- mikroskopicky se prohlédne obsah všech jamek destičky a zaznamená se počet vajíček a larev v jednotlivých fázích vývoje (viz obr. 6)
- s využitím probit modelu s logaritmicko-normálním rozdělením se vyjádří hodnota průměrné letální dávky extraktu LD₅₀ (lethal dose), tj. koncentrace látky, která devitalizuje 50 % larev



obr. 6. Výsledek testu vývoje larev (LDT), nevyvinuté vajíčko (e), vajíčko s vyvinutou larvou (el), larva 1. vývojového stadia (I1) a larva 2. vývojového stadia (I2) *Haemonchus contortus*, zvětšení 100× (foto J. Vadlejch)

Stejně jako EHT, ani LDT není pro testování anthelmintické aktivity BAL standardizovaný a nebyla dosud ani stanovena limitní hladina LD₅₀, což poněkud komplikuje porovnání výsledků testů mezi jednotlivými laboratořemi.

2.2.3 Test inhibice krmení larev – Larval feeding inhibition test (LFIT)

Tento test patří mezi novější metody a opět byl původně vytvořen pro testování anthelmintické rezistence (Geary et al., 1993). Principem LFIT je sledování schopnosti larev 1. vývojového stadia (L₁) se v prostředí testované látky nakrmit fluorescenčně značenými bakteriemi (Alvarez-Sánchez et al., 2005; Jackson et Hoste, 2010). Jedná se tedy o test vyhodnocující výhradně larvicidní účinky zkoumané chemické látky. LFIT je však, na rozdíl od EHT a LDT, pro testování anthelmintické rezistence používán jen sporadicky. Mnohem častěji se s ním lze setkat právě při ověřování anthelmintických vlastností biologicky aktivních látek (Katiki et al., 2011; Ríos-de Álvarez et al., 2012; Novobilský et al., 2013). Výhodou tohoto testu je jeho snadnost, rychlost přípravy a jednoduchost při vyhodnocování.

Příprava biologického materiálu

Pro tento test je potřeba získat L₁ larvy GI hlístice. Z výkalů experimentálně infikovaného zvířete (donora) se nejdříve

získá dostatečné množství vajíček (viz kapitola 2.2.1), která se v Petriho misce naplněné destilovanou vodou vloží do inkubátoru. Za 20 hodin se z nich při teplotě 26 °C vyvinou L₁ larvy. Výsledky vlastního pozorování ukazují, že líhnivost vajíček není 100%. Z důvodu minimalizace zkreslujících faktorů je potřeba do testování zařadit pouze životaschopné larvy. Osvědčilo se nám ještě před samotným založením experimentu přecezení směsi larev přes jednu vrstvu papírového kapesníku, která zachytí uhynulé L₁. Nakonec se mikroskopicky ověří počet larev a jejich motilita.

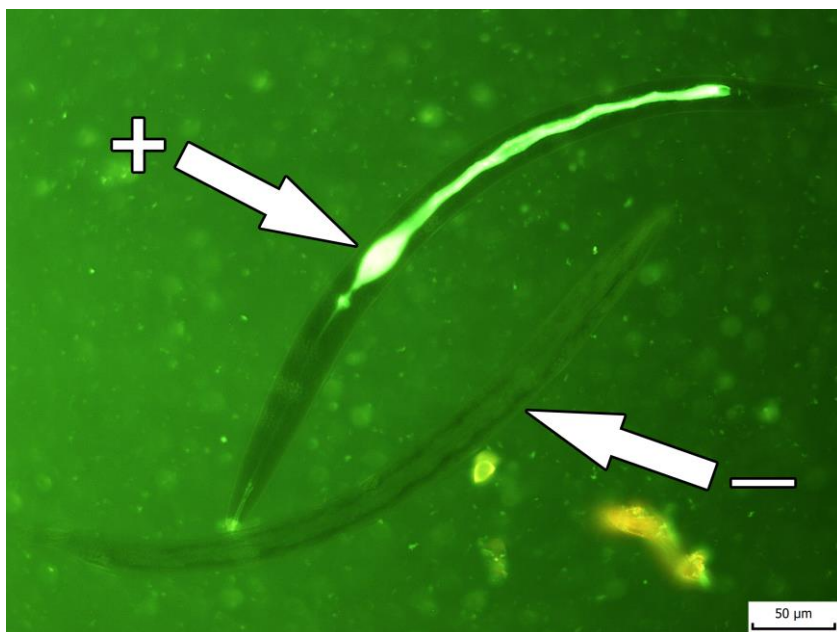
Pro samotné testování se používají mikrozkušavky, do nichž se napipetuje požadovaný počet životaschopných larev (ideálně 50 L₁). Jako kontrola slouží ivermektin aglykon (IVM AG), negativní kontrolou je 1% dimethylsulfoxid (DMSO) v kvalitě analytického standardu – viz kapitola 2.2.1. Nejkritičtější bodem tohoto testu je práce s fluorescenčně značenými (fluorescein isothiokyanát – FITC) bakteriemi *Escherichia coli*, které slouží jako potrava pro čerstvě vylíhlé L₁ larvy. Životaschopné larvy jsou hladové, krmí se bakteriemi a pod fluorescenčním mikroskopem dojde ke zvýraznění jejich hltnu a střeva. Látkou zasažené a mrtvé larvy mají trávicí trakt prázdný a tudíž nejsou proti tmavému pozadí výrazné. FITC *E. coli* si lze připravit v laboratoři nebo je lze získat komerčně. Aby nedošlo k ovlivnění fluorescenčního efektu, nesmí se FITC bakterie dostat do přímého kontaktu se světelným zdrojem. Osvědčila se nám manipulace se vzorky v tmavé místnosti a po přidání FITC *E. coli* celou mikrozkušavku ihned obalit hliníkovou fólií, která nepropouští světlo.

Postup LFIT:

- připraví se příslušný počet mikrozkušavek tak, aby tři představovaly pozitivní kontrolu (IVM AG), další tři sloužily jako pozitivní kontrola (DMSO) a zbytek reprezentoval tři opakování vzrůstající řady koncentrací (1, 4, 16, 64, 256, 1 024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) testovaného rostlinného extraktu
- do všech mikrozkušavek se nejdříve, dle výše uvedeného schématu, napipetují chemikálie a přidá se požadovaný počet L_1 larev, směs se v horizontální poloze kultivuje 2 hodiny při 25 °C
- po uplynutí inkubační doby se v tmavé místnosti do všech mikrozkušavek přidá 10 μl FITC *E. coli* a ihned se zabalí do hliníkové fólie, aby k nim nepronikalo světlo
- připravené mikrozkušavky se v horizontální poloze 18 hodin kultivují v inkubátoru při 25 °C
- po uplynutí kultivační doby se všechny mikrozkušavky zcentrifugují (1 min, 6 000g) a odsaje se supernatant
- sediment (cca 50 μl) se přenesse na mikroskopické podložní sklo a prohlíží se pod mikroskopem opatřeným filtrem propouštějícím ultrafialové záření o vlnové délce 450 – 490 nm
- vyhodnocení je z důvodu postupné ztráty fluorescence bakterií optimální provádět co nejdříve po inkubaci; na základě vlastního pozorování lze bez ztráty fluorescence vzorky prohlížet až jeden týden po finální inkubaci vzorků, v mezidobí je však potřeba mít vždy mikrozkušavky obalené hliníkovou fólií a skladovat je při teplotě 4 °C

- při vyhodnocení se sleduje počet nakrmených a nenakrmených larev (viz obr. 7)
- s využitím probit modelu s logaritmicko-normálním rozdělením se vyjádří hodnota průměrné letální dávky extraktu LF₅₀ – koncentrace látky, která zamezí nakrmení 50 % larev

Stejně jako u žádného předešlého *in vitro* testu, ani u LFIT, nebyla dosud stanovena limitní hladina LF₅₀.



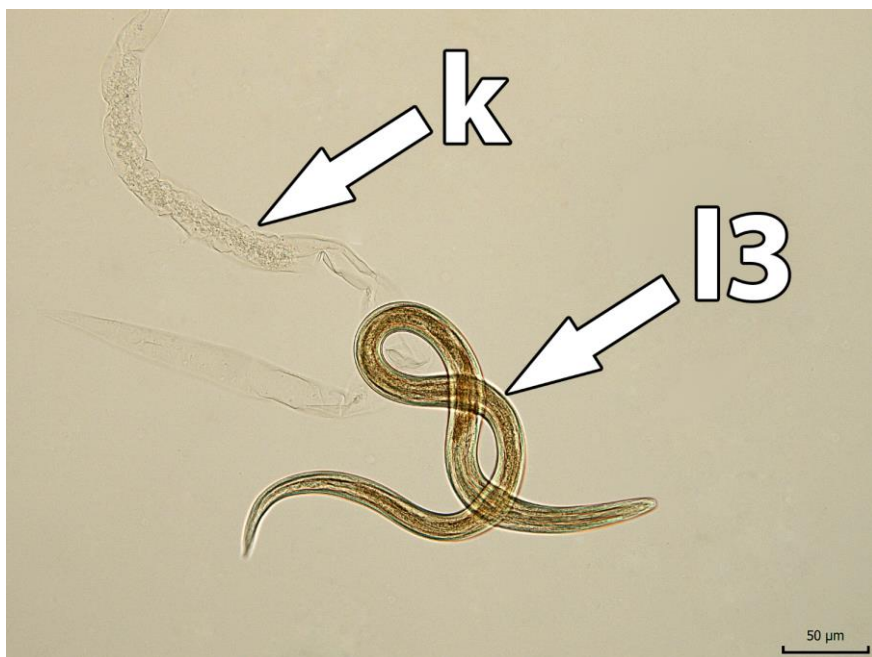
obr. 7. Výsledek testu inhibice krmení larev (LFIT), + larva nakrmená fluorescenčně značenými bakteriemi, mrtvá larva (—) *Haemonchus contortus*, zvětšení 400× (foto J. Vadlejch)

Pro zjišťování larvicidní aktivity BAL je možné využít i další testy. Test odhození kutikuly (LET – Larval exsheathment test) sleduje schopnost infekčních (L₃) larev GI hlístic v prostředí testované látky odhodit ochrannou kutikulu předchozího stadia (viz obr. 8) (Bahuaud et al., 2006; Jackson et Hoste, 2010). Tento proces je nezbytný pro pokračování vývoje parazita, neboť se uskutečňuje za pomoci proteolytických enzymů produkovaných larvami a probíhá pouze u živých larev. Larvy L₃ zasažené testovanou látkou se tedy nemohou dále vyvíjet. Jedná se relativně jednoduchý test, který poskytuje praktické informace o schopnosti vývoje parazita vystaveného účinkům xenobiotika. Na základě vlastních zkušeností však LEA doporučujeme používat pouze jako orientační test nebo k doplnění jiných *in vitro* testů (LDT či LFIA). Jeho výsledek totiž může být ovlivněn řadou faktorů (citlivost jednotlivých druhů a kmenů GI hlístic, jejich stářím, respektive dobou skladování, zručností a zkušeností laboranta apod.) a nelze tedy jeho výsledky srovnávat mezi laboratořemi.

Pro testování účinků xenobiotik na larvy GI hlístic byl vytvořen i další test, který hodnotí migrační aktivitu larev (LMIT – Larval migration inhibition test). Tento test je však jak pro sledování účinku anthelmintik, tak pro larvicidní účinky BAL, používám velmi zřídka. Jedná se totiž o poměrně pracný test, pro který je potřeba vytvořit speciální zařízení obsahující laboratorní síto o velikosti ok 20 µm, přes které migrují pouze živé larvy GI hlístic. Přesto, že již byla snaha o jeho standardizaci (Demeler et al., 2010), LMIT nenašel mezi ostatními *in vitro* testy širší uplatnění.

V neposlední řadě lze pro *in vitro* testování BAL použít i test pohyblivosti dospělců (AMT – Adult motility test), který však probíhá na dospělých GI hlísticích a tato stadia lze získat pouze

pitevně (O'Grady et Kotze, 2004; Paolini et al., 2004). Vzhledem k tomu, že se jedná o velmi náročný test vyžadující experimentální infekci zvířat (viz kapitola 2.3.1) a zajištění řady podmínek, aby nedošlo k ovlivnění výsledku testu, je praktické použití AMT velmi omezené.



obr. 8. Výsledek testu odhození kutikuly (LET), I3 – infekční larva *Haemonchus contortus* zbavená ochranné kutikuly, k – odvržená kutikula, zvětšení 400× (foto J. Vadlejch)

2.3 *In vivo* testy

2.3.1 Test na zvířeti

V případě prokázání anthelmintické aktivity (ideálně kombinace ovicidního a larvicidního efektu, s využitím několika *in vitro* testů současně) konkrétního rostlinného extraktu, lze přistoupit k experimentům na zvířatech. Přesto, že dosud nebyly stanoveny koncentrace průměrných toxických dávek (ED_{50} , LD_{50} , LF_{50}) rostlinných extraktů, které jsou pro tlumení PGE považovány za účinné, doporučujeme k *in vivo* testu přistoupit pouze v případech, kdy průměrné toxická dávka rostlinného extraktu zjištěná pomocí *in vitro* testů dosahuje hodnoty řádově desítky $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Naopak rostliny a jejich produkty, které při *in vitro* testování dosahují koncentrace průměrných toxických dávek vyšších, než $1\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, by z praktických důvodů testovány být neměly. Takto vysoké koncentrace BAL se v rostlinách běžně nevyskytují a k dosažení požadovaného anthelmintického účinku by zvíře muselo zkonzumovat nereálně velké množství rostliny nebo by muselo přijmout koncentraci extraktu, která by u něj mohla vyvolat zdravotní komplikace.

Provedení *in vivo* testů je finančně, časově i prostorově náročné, a proto se k nim vždy přistupuje až po ověření anthelmintické aktivity rostlinných extraktů v laboratorních podmínkách. Před samotným provedením *in vivo* testů je potřeba zajistit prostor ve stáji, kde budou pokusná zvířata po dobu experimentu ustájena a zajistit podmínky zamezující vznik sekundárních infekcí vyvolaných jinými druhy GI hlístic, či jiných

onemocnění a zranění zvířat. Experimentálně infikovaná zvířata by měla být chována odděleně od ostatních zvířat a vyžadují zvláštní péči, včetně časté veterinární kontroly. Nedílnou součástí plánování pokusu na zvířeti je vypracování projektu pokusu, který musí být schválen příslušnou etickou komisí. V projektu pokusu je přesně definován účel a význam pokusu, zdůvodněna nezbytnost pokusu, popsány naplánované činnosti s pokusnými zvířaty, i osud zvířat po ukončení pokusu. Podle platné legislativy ČR může pokusy na zvířatech vykonávat pouze osoba, která má platné osvědčení o odborné způsobilosti k navrhování pokusů a projektů pokusů, podle § 15d odst. 3 zákona č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů.

Pro ověření anthelmintického účinku BAL, s cílem využití poznatků u přežvýkavců, nejsou pokusy s laboratorními hlodavci, či králíky vhodné. Z důvodu odlišné fyziologie těchto zvířat nemusejí být účinky dosažené na hlodavcích totožné jako u přežvýkavců. Je proto vhodnější použít přímo malé přežvýkavce. Na základě vlastní zkušenosti můžeme doporučit jehňata, či kůzlata, samčího pohlaví, ve věku 4 – 6 měsíců, ideálně pokud se ještě nesetkala s GI hlísticemi a nemají tudíž vůči těmto parazitům vytvořenou imunitu. Pro snadnější manipulovatelnost jsou vhodnější menší plemena s mírnějším temperamentem. Z praktických důvodů (sekundární infekce, poranění zvířat, úhyn) je do pokusu potřeba vždy zařadit alespoň tři jedince.

Pro *in vivo* testy anthelmintické účinnosti BAL musejí být zvířata v patentní fázi infekce. Nejvhodnější je pokusné zvíře infikovat jedním druhem GI hlístice a udržovat u něj subklinickou PGE. Naprostá většina činností prováděných při experimentální

infekci vychází ze standardizovaných metodik vydaných asociací WAAVP pro ověřování účinnosti anthelmintik (Wood et al., 1995).

Postup experimentální infekce (modifikace metodiky Wood et al., 1995) :

Před samotným vyvoláním infekce je potřeba použítá zvířata vyšetřit na přítomnost parazitů a vyloučit u nich i jiná onemocnění, či zdravotní komplikace, které by mohly výsledek *in vivo* testu negativně ovlivnit. Jako nejvhodnější k průkazu původců PGE se nám osvědčila Koncentrovaná McMasterova metoda (Roepstorff et Nansen, 1998), která je dostatečně citlivá i k prokázání nízkého stupně infekce (Vadlejch et al., 2011). Pokud je u pokusných zvířat parazit detekován, je potřeba zvířatům aplikovat antiparazitikum s odpovídajícím spektrem účinku. Při volbě účinné látky je vždy potřeba zvážit i perzistenci daného léčiva, aby nebyla ovlivněna následná experimentální infekce. Z vlastní zkušenosti doporučujeme při výskytu helmintů zvířeti, dle jeho aktuální hmotnosti aplikovat benzimidazolové (BZ) léčivo ve dvojitě dávce (0,4 ml BZ na kg ž.h.), než je doporučeno výrobcem a tuto dávku opakovat ještě následující den. Zvíře je před terapií vhodné alespoň 12 hodin lačnit. Při prokázání oocyst kokcidií doporučujeme jednorázově aplikovat toltrazuril v dávce doporučené výrobcem (0,8 ml TOL na kg ž.h.). Sedm dní po aplikaci antiparazitik se provede kontrolní koprologické vyšetření k prokázání účinku léčiva. Zatímco v podmínkách chovu je za úspěšnou léčbu považována situace, kdy po aplikaci léčiva dojde k $\geq 95\%$ poklesu počtu parazitárních útvarů (oocysty kokcidií, vajíček helmintů), u jedinců použitých pro experimentální infekci nesmí být

koprologicky prokázán žádný parazitární útvar. Z důvodu perzistence léčivé látky je možné zvíře GI hlísticemi infikovat až tři týdny po aplikaci BZ.

Před inokulací parazitárních stadií je potřeba experimentální zvířata opět koprologicky vyšetřit. Pro zvýšení úspěšnosti vyvolání infekce je vhodné pokusná zvířata lékově imunosuprimovat. Osvědčila se nám účinná látka dexametazon, v dávce 0,15 ml na kg ž.h. podaná tři dny s denním rozestupem, v průběhu jednoho týdne před inokulací a opakování imunosuprese jednou týdně v průběhu celé prepatentní periody. Pokud jsou zvířata prosta parazitů a nevykazují žádné známky zdravotních obtíží či poranění, je možné přistoupit k inokulaci infekčních (L_3) larev GI hlístice. Tyto L_3 larvy konkrétního druhu GI hlístice je vhodné, na základě vlastních zkušeností, minimálně tři dny před inokulací do hostitele skladovat při laboratorní teplotě (20 ± 2 °C), ve standardních světelných podmínkách. Zamezí se tak nechtěnému vyvolání hypobiózy, kdy larvy v GI traktu hostitele pozastaví vývoj a nedojde tak k patentní infekci (Gibbs, 1986; Vadlejš et al., 2006). Zároveň doporučujeme mikroskopicky zkontrolovat motilitu larev. Samotná inokulace se provádí perorálně, podáním doporučeného počtu L_3 larev ve vodě (Wood et al., 1995) a to zvířeti přímo do dutiny ústní, ideálně injekční stříkačkou na kořen jazyka. V případě úspěšné infekce se vajíčka GI hlístice začínají objevovat ve výkalech zvířete, dle druhu hlístice, tři týdny po inokulaci larev (Abbott et al., 2012; Bowman, 2014). Na základě vlastního pozorování víme, že dle druhu GI hlístice, úrovně zoohygieny stáje a druhu zvířete trvá patentní infekce až šest měsíců. Po celou tuto dobu lze z experimentálně infikovaného donora získávat vajíčka parazita.

Ověření anthelmintické účinnosti BAL lze uskutečnit podáním jedné z níže uvedených forem rostliny experimentálně infikovanému přežvýkavci s ověřenou patentní PGE. Před aplikací jakéhokoliv rostlinného materiálu je potřeba na základě literárních zdrojů předem zjistit antinutriční a toxikologické údaje o testované rostlině. Do pokusu je třeba zařadit vždy minimálně tři pokusná zvířata stejného druhu a pohlaví a přibližně shodného věku. K testované skupině zvířat je vždy potřeba zařadit i kontrolní skupinu, které nebyla vystavena účinkům BAL.

Příklady možných konzervačních a aplikačních forem testovaného rostlinného materiálu:

1. rostlinný extrakt (přečištěný a koncentrovaný nebo hrubý) aplikovaný *per os* ve formě roztoku
2. čerstvý rostlinný materiál, ze kterého BAL pochází, podaný přímo zvířeti ke zkrmení
3. konzervovaný či technologicky upravený rostlinný materiál (seno, senáž, siláž, pelety apod.) podaný zvířeti ke zkrmení
4. přísev rostliny do spásaného porostu

Stanovení výše aplikační dávky extraktu, či množství a formy podaného rostlinného materiálu je vždy velmi složité. Konkrétní dávka by měla být vyjádřena na základě výsledků *in vitro* testů a toxikologických vlastností rostliny, s přihlédnutím k aktuální živé hmotnosti zvířete. Účinnost BAL u experimentálně infikovaných zvířat lze ověřovat intravitálním sledováním poklesu intenzity PGE, nebo pitevně, po usmrcení zvířete průkazem počtu přítomných hlístic.

Při sledování poklesu intenzity infekce lze vycházet ze standardizovaných *in vivo* testů účinnosti anthelmintik. Principem těchto testů je vyhodnocení procentuálního rozdílu v počtu uvolňovaných vajíček parazita (EPG – eggs per gram) parazita před a po aplikaci léčiva (FECRT – Faecal egg count reduction test) (Coles et al., 1992; Taylor et al., 2002; Coles et al., 2006). U konvenčních léčiv se za účinná považují ta, která způsobí pokles EPG parazita o ≥ 95 %. Limitní hladina účinnosti BAL stanovena nebyla, obecně však lze za účinnou považovat takovou látku, která vyvolá statisticky významný pokles EPG oproti původní stavu. Z důvodu pomalejšího nástupu účinku BAL lze doporučit sledování hladin EPG alespoň po dobu dvou měsíců (Váradyová et al., 2017).

Vzorec pro individuální vyhodnocení účinnosti BAL při *in vivo* testu:

$$\text{pokles EPG (\%)} = \frac{\text{EPG před aplikací} - \text{EPG po aplikaci}}{\text{EPG před aplikací}} \times 100$$

BAL mohou na parazita negativně působit tím, že snižují plodnost jeho samiček (pokles EPG), ale mohou mít i přímý anthelmintický efekt způsobující vypuzení parazita z těla hostitele. Přímé anthelmintické účinky BAL lze vyhodnotit s využitím helmintologické pitvy (viz Lanková et al., 2018). Všechna stadia parazita pitevně získaná z experimentálně infikovaných zvířat dotovaných BAL i kontrolní skupiny zvířat bez aplikace BAL, se spočítají, mikroskopicky prohlédnou a vyhodnotí se případné morfologické změny u parazitů.

Lze také provést některé modifikace testů jako např. vyhodnocení úspěšnosti zabránění vzniku parazitózy po pozření infekčních larev GI hlístice u zvířat dotovaných rostlinami s vysokým obsahem BAL. Nejpřísnějším ověřením anthelmintických účinků BAL je pak v provozních podmínkách chovů, u produkčních zvířat, která jsou přirozeně infikována několika druhy parazitů a působí na ně řada faktorů (Kyriánová et al., 2018)

Teprve na základě potvrzení anthelmintické aktivity BAL s využitím *in vitro* i *in vivo* testů je možné doporučit danou rostlinu pro tlumení PGE v praktických podmínkách chovů. Před samotným podáním rostlin, či jejich produktů, je kromě jejich anthelmintického účinku potřeba také ověřit jejich možné negativní dopady na zdraví a produkční vlastnosti zvířat. V neposlední řadě je třeba uvažovat i o koncentraci metabolitů rostlin v živočišných produktech určených pro lidský konzum. Některé z BAL totiž mohou negativně ovlivnit senzorické vlastnosti masa a mléka zvířat (Kalač, 2017).

III. Srovnání „novosti postupů“

V předložené metodice jsou uvedeny postupy, výsledky vlastního sledování i praktické připomínky a doporučení, které současně vycházejí ze studia literatury a z výzkumné činnosti autorů zaměřené na zjišťování anthelmintických účinků biologicky aktivních látek rostlin. Metodika obsahuje i zcela nové, dosud nepublikované výsledky vlastního výzkumu a modifikace metod, které dosud nebyly nikde zveřejněny. Tyto informace umožní standardizovat testování ovicidních, larvicidních i adultocidních účinků rostlin a jejich produktů a sjednotit tak výsledky získané různými laboratořemi. S využitím zde publikovaných poznatků bude možné lépe vyhodnotit skutečnou anthelmintickou účinnost, respektive předejít ekonomickým ztrátám při podání rostlin a jejich produktů, které nevykazují dostatečnou anthelmintickou aktivitu, či mají antinutriční nebo dokonce toxické účinky na zvířecí organismus.

IV. Popis uplatnění metodiky

Publikace je určena pracovníkům v oblasti chovu domácích přežvýkavců. Cílovými skupinami jsou zejména pracovníci v zemědělství, chovatelé, řídicí pracovníci, poradní orgány, veterinární lékaři, laboratorní pracovníci a studenti zemědělsky, veterinárně a přírodovědně zaměřených středních škol a univerzit.

V. Ekonomické aspekty

Gastrointestinální hlístice, respektive infekce (PGE), které tyto paraziti vyvolávají, jsou v intenzivních chovech přežvýkavců celosvětově příčinou značných ekonomických ztrát. GI helminti zaujímají první místo v žebříčku deseti nejvýznamnějších původců onemocnění hospodářsky využívaných zvířat (Fitzpatrick, 2013). Např. ve Velké Británii byly roční ztráty spojené s GI helminty a PGE vyčísleny na 80 milionů £, což představuje zhruba 10% ztrátu produkce (Nieuwhof et Bishop, 2005; Miller et al., 2012).

Tradičně jsou dopady PGE tlumeny pomocí synteticky vyráběných anthelmintik. Z důvodu značného rozšíření rezistence na tato léčiva však konvenční terapie selhává a pro dosažení očekávaného léčebného efektu je potřeba aplikovat 5 – 10× vyšší dávku léku, než je terapeutická dávka doporučená výrobcem (Lanusse et al., 2014). To se výrazně promítne do nákladů na zdravotní péči o zvířata, což lze jednoduše demonstrovat na následujícím příkladu.

Panacur je běžné anthelmintikum, na jehož účinnou látku fenbendazol (FBZ) je již rezistence značně rozšířená. Jednolitrové balení tohoto léku (Panacur[®] 2,5% susp.) stojí v ČR přibližně 1 600 Kč. Pokud jsou GI hlístice k FBZ vnímavé, tak při použití dávky doporučené výrobcem (0,2 ml FBZ na 1 kg ž. hm. zvířete) stojí terapeutický zásah jehněte o váze 15 kg zhruba 5 Kč, u dospělé ovce o váze 60 kg se pak jedná o částku 19,20 Kč. Pokud však budou léčeni jedinci infikovaní rezistentním kmenem GI hlístice, je potřeba aplikovat alespoň 5× vyšší dávku léku (tj. 1 ml FBZ na 1 kg ž. hm.), což ve finále prodraží „odčervení“ jednoho zvířete o 19 Kč, respektive o 76,80 Kč. Pokud bude v chovu potřeba léčit např. 30 dospělých ovcí s klinickými příznaky PGE, tak se jedná o finanční rozdíl téměř 2 300 Kč na jeden terapeutický zásah.

V případě zjištění rezistence parazita k jedné účinné látce lze využít jinou látku a tímto způsobem pokračovat dále. Je však potřeba si uvědomit, že spektrum konvenčních anthelmintik je značně omezené a v řadě zemí, včetně ČR, již byla zaznamenána i multirezistence na více účinných látek současně nebo dokonce odolnost GI hlístic vůči dosud všem známým skupinám anthelmintik. V tom případě již chemickou léčbu nelze použít a je potřeba přistoupit k jinému způsobu tlumení PGE.

Jako určitá alternativa se nabízejí rostliny či jejich produkty, které jsou bohaté na BAL. Rostliny s anthelmintickými účinky jsou komerčně dostupné a jejich pořizovací cena je relativně nízká (viz tabulka 3). Rostlinný materiál použitý pro přípravu směsi třinácti bylin (tzv. Herbmix), který dle studie Váradyové et al. (2017) při zkrmování ovcím způsobil statisticky významný pokles EPG, by stál 517 Kč. Za 100 g Herbmixu, která byla vyjádřena jako optimální dávka pro jedno zvíře by chovatel zaplatil 0,40 Kč. Rozdílem oproti konvenčním léčivům, které se většinou aplikují jednorázově, BAL je pro dosažení anthelmintického efektu potřeba podávat opakovaně. Ve výše zmíněné studii byl pokles EPG sledován až od 50. dne po začátku zkrmování Herbmixu. V tom případě finanční náklady na potlačení PGE vzrostou na téměř 2 000 Kč na zvíře. Z krátkodobého hlediska se jedná o velmi nákladnou záležitost, protože pro 30 ovcí ve stádě by se tato alternativní metoda finančně nevyplatila a chovatel by ji nevyužil. Popsaná kalkulace však počítala se získáním rostlinného materiálu z komerčních zdrojů. Pokud si bude chovatel pěstovat rostliny sám, může náklady spojené s jejich produkcí hradit z dotačních zdrojů na pěstování zeleniny a speciálních bylin.

rostlina		cena s DPH
druh	část	za 100 g sušiny
proskurník	kořen	52,90
devětsil	kořen	39,10
oman	kořen	44,90
sléz	květ	66,70
heřmánek	květ	43,70
jitrocel	list	35,70
rozmarýn	list	32,20
fenykl	plod	41,40
zlatobýl	nať	29,90
zemědým	nať	38,00
yzop	nať	28,80
meduňka	nať	40,30
pelyněk	nať	24,20

tab. 3. Orientační ceny rostlinného materiálu získaného z komerčních zdrojů

V tom případě je cena rostlinného materiálu zanedbatelná. Z dlouhodobého hlediska je tak tato alternativní metoda tlumení parazitóz ekonomicky výhodnější, než chemická léčba.

Využití rostlin s vysokým obsahem BAL má i řadu dalších výhod. Na BAL nevzniká léková rezistence. Pokud rostliny ve formě přísevu pastevního porostu budou k dispozici zvířatům hned na začátku pastevní sezóny, budou chráněna před vznikem PGE nebo nedojde k rozvinutí PGE do klinické formy, kdy je potřeba léčebně zasáhnout. Ekonomický přínos tohoto preventivního zásahu lze vyčíslit následovně. Stádo ovcí čítající 100

dospělých bahnic, při průměrné úspěšnosti zabřeznutí 85 % a předpokladu výskytu dvojčat, porodí 170 jehňat. Z důvodu 10% mortality mláďat jich přežije přibližně 150. Celé stádo ovcí, včetně beranů, v jarním období může tedy čítat 255 jedinců. Podle tradičního scénáře tlumení parazitóz v ČR jsou jehňata jako nejcitlivější věková kategorie většinou „odčervována“ všechna a stejně tak jsou anthelmintika aplikována všem bahnicím. Na základě dlouholetých epizootologických studií lze však předpokládat, že pouze 20 % bahnic bude na jaře vykazovat klinické příznaky PGE a bude je tedy potřeba léčit. Pokud však budou mít zmíněná zvířata k dispozici rostliny s vysokým obsahem BAL včas, dojde k posílení jejich obranyschopnosti a nepředpokládá se vznik PGE v klinické formě, která by měla dopad na zdravotní stav, či následnou produkci. Nebude tak potřeba anthelmintický zásah a chovatel jen v jarním období může ušetřit 864 – 2 400 Kč. Při teoretickém terapeutickém zásahu 2× ročně tak může dojít ke snížení nákladů na léčiva až o 4 800 Kč.

Neopomenutelnou výhodou podání rostlin s vysokým obsahem BAL je jejich pozitivní vliv na trávení, respektive lepší konverzi krmiva. Díky tomu mají zvířata s přísunem BAL vyšší denní přírůstky. Ze studie Váradyové et al. (2017) vyplývá, že jehňata experimentálně infikovaná GI hlísticemi, která byla krmena směsí s přídatkem rostlin s BAL (Herbmix), měla oproti kontrolní skupině s PGE průměrně o 70 g vyšší denní přírůstek hmotnosti. Protože v chovem přežvýkavců je běžně prevalence PGE značně vysoká (většinou dosahuje téměř 100 %), odpovídá výše popsaná situace reálným podmínkám více, než když je kalkulováno se zvířaty bez parazitární zátěže. Pokud u jehněte s dotací BAL

uvažujeme o zvýšení denního přírůstku o 70 g, období výkrmu (do porážkové hmotnosti přibližně 40 kg) se zkrátí až o dva měsíce. Výkrm jehňat s přísunem BAL, při nákladech 17 Kč na krmný den, pak stojí přibližně 2 000 Kč. Chovatel by tak na jednom zvířeti, oproti standardního výkrmu, bez dotace BAL, mohl ušetřit až 1 600 Kč.

V případě, že do managementu chovu přežvýkavců jsou zařazeny rostliny s vysokým obsahem BAL, je anthelmintická léčba potřeba pouze v individuálních případech, což značně sníží náklady na hromadnou léčbu. Zároveň dojde ke zkrácení doby výkrmu. Finanční zisk, který v zvyše uvedených důvodů, vznikne na jednom jehněti, lze po započtení nepředvídatelných negativních vlivů odhadnout na částku 1 200 Kč, což po přepočtu na celé stádo představuje výrazný ekonomický přínos.

VI. Seznam použité související literatury

- Abbott, K.A., Taylor, M.A., Stubbings, L.A., 2012. Sustainable Worm Control Strategies for Sheep: A Technical Manual for Veterinary Surgeons and Advisors, 4th ed. SCOPS. Context Publishing, 58 pp.
- Alvárez-Sánchez, M.A., Pérez García, J., Bartley, D., Jackson, F., Rojo-Vázquez, F.A. 2005. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. *Experimental Parasitology*, 110:56 – 61.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L. 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology*, 99:205 – 219.
- Azaizeh, H., Mreny, R., Markovics, A., Muklada, H., Glazer, I., Landaud, S.Y. 2015 Seasonal variation in the effects of Mediterranean plant extracts on the exsheathment kinetics of goat gastrointestinal nematode larvae. *Small Ruminant Research*, 131:130 – 135.
- Bahuaud, D., Martinez-Ortiz de Montellano, C., Chauveau, S., Prevot, F., Torres-Acosta, F., Fouraste, I., Hoste, H. 2006. Effects of four tanniferous plant extracts on the *in vitro* exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology*, 132:545 – 554.
- Bowman, D.D. 2014. Georgis' Parasitology for Veterinarians. 10th ed. Saunders, 496 pp.
- Cabaret, J., Bouilhol, M., Mage, C. 2002. Managing helminths of ruminants in organic farming. *Veterinary Research*, 33:625 – 640.

- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J. 1992. 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., Vercruyse, J. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136:167 – 185.
- Coles, G.C., Tritschler, J.P. 2nd, Laste, N.J., Schmidt, A.L. 1988. Larval development test for detection of anthelmintic resistant nematodes. *Research in Veterinary Science*, 45:50 – 53.
- Conder, G.A. 2002. Chemical Control of Animal-Parasitic Nematodes. In: Lee, D.L. (ed.), *The Biology of Nematodes*. 1st ed. CRC Press, pp. 521–529.
- Demeler, J., Küttler, U., El-Abdellati, A., Stafford, K., Rydzik, A., Várady, M., Kenyon, F., Coles, G., Höglund, J., Jackson, F., Vercruyse, J., von Samson-Himmelstjerna, G. 2010. Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastrointestinal nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology*, 174:58 – 64.
- Dobson, R.J., Donald, A.D., Waller, P.J., Snowdon, K.L. 1986. An egg hatch assay for resistance to levamisole in trichostrongyloid nematode parasites. *Veterinary Parasitology*, 19:77 – 84.

- Douglas, G.B., Stienezen, M., Waghorn, G.C., Foote, A.G., Purchas, R.W. 1999. Effect of condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and sulla (*Hedysarum coronarium*) on body weight, carcass fat depth, and wool growth of lambs in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 42:55 – 64.
- Fitzpatrick, J.L. 2013. Global food security: the impact of veterinary parasites and parasitologists. *Veterinary Parasitology*, 195:233 – 248.
- Geary, T.G., Sims, S.M., Thomas, E.M., Vanover, T.L., Davis, J.P., Winterrowd, C.A., Klein, R.D., Norman, F.H., Ho, N.F., Thompson, D.P. 1993. *Haemonchus contortus*: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. *Experimental Parasitology*, 77:88 – 96.
- Gibbs, H.C. 1986. Hypobiosos in parasitic nematodes – an update. *Advances in Parasitology*, 25:129 – 174.
- Gill, J.H., Redwin, J.M., Van Wyk, J.A., Lacey, E. 1995. Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus* – effects of ivermectin resistance. *International Journal for Parasitology*, 25:463 – 470.
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O. 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*, 22:253 – 261.
- Hoste, H., Sotiraki, S., de Jesús Torres-Acosta, J.F. 2011a. Control of endoparasitic nematode infections in goats. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 27:163 – 173.

Hoste, H., Manolaraki, F., Brunet, S., Arroyo López, C., Martínez-Ortiz de Montellano, C., Sotiraki, S., Torres Acosta, F. 2011b. The anthelmintic properties of tannin-rich legume forages: from knowledge to exploitation in farm conditions. *Options Méditerranéennes*, 99:295 – 304.

Hoste, H., Sotiraki, S., Landau, S.Y., Jackson, F., Beveridge, I. 2010. Goat-nematode interactions: think differently. *Trends in Parasitology*, 26:376 – 381.

Hoste, H., Torres-Acosta, J.F. 2011. Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary Parasitology*, 180:144 – 154.

Hubert, J., Kerbouef, D. 1992. A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record*, 130:442 – 446.

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

Charlier, J., De Waele, V., Ducheyne, E., van der Voort, M., Velde, F.V., Claerebout, E. 2016. Decision making on helminths in cattle: diagnostics, economics and human behaviour. *Irish Veterinary Journal*, 69:14.

Charlier, J., van der Voort, M., Kenyon, F., Skuce, P., Vercruyssen, J. 2014. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends in Parasitology*, 30:361 – 367.

- Charlier, J., Velde, F.V., van der Voort, M., Van Meensel, J., Lauwers, L., Cauberghe, V., Vercruysse, J., Claerebout, E. 2015. ECONOHEALTH: Placing helminth infections of livestock in an economic and social context. *Veterinary Parasitology*, 212:62 – 67.
- Chroust, K. 2000. Occurrence of anthelmintic resistance in strongylid nematodes of sheep and horses in the Czech Republic. *Veterinární medicína (Vet. Med. Czech)*, 45:233 – 239.
- Jackson, F., Coop, R.L. 2000. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology*, 120:S95 – 107.
- Jackson, F., Hoste, H. 2010. *In vitro* methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In: Vercoe, P.E., Makkar, H.P.S., Schlink, A.C. (Eds.), *In Vitro Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies*. Springer Science + Business Media B.V., Dordrecht, Germany, pp. 25 – 45.
- Johansen, M.V., Waller, P.J. 1989. Comparison of three *in vitro* techniques to estimate benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* of sheep. *Veterinary Parasitology*, 34:213 – 221.
- Kalač, P. 2017. Effects of Forage Feeding on Milk: Bioactive Compounds and Flavor. 1st ed. Academic Press, 248 pp.
- Kaplan, R.M. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*, 20:477 – 481.

- Katiki, L.M., Chagas, A.C., Bizzo, H.R., Ferreira, J.F., Amarante, A.F. 2011. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different *in vitro* tests. *Veterinary Parasitology*, 183:103 – 108.
- Kenyon, F., Greer, A.W., Coles, G.C., Cringoli, G., Papadopoulos, E., Cabaret, J., Berrag, B., Várady, M., Van Wyk, J.A., Thomas, E., Vercruyse, J., Jackson, F. 2009. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Parasitology*, 164:3 – 11.
- Koupai Abyazani, M.R., McCallum J. Muir, A.D., Bohm, B.A., Towers, G.H.N., Gruber, M.Y. 1993. Developmental changes in the composition of proanthocyanidins from leaves of sainfoin (*Onobrychis vicifolia* Scop.) as determined by HPLC analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41:1066 – 1070.
- Krecek, R.C., Waller, P.J. 2006. Towards the implementation of the “basket of options” approach to helminth parasite control of livestock: Emphasis on the tropics/subtropics. *Veterinary Parasitology*, 139:270 – 282.
- Kyriánová, I.A., Nápravníková, J., Váradyová, Z., Várady, M., Vadlejch, J. 2018. The field efficacy of herbal plant mixture aqueous extracts against parasitic gastroenteritis in dairy goats. In: 10th Workshop on biodiversity, Jevany, Česká zemědělská univerzita v Praze. v tisku
- Lacey, E., Redwin, J.M., Gill, G.H., Demargheriti, V.M., Waller, P.J. 1991. A larval development assay for the simultaneous detection of broad spectrum anthelmintic resistance. In: Boray, J.C., Martin, P.J.,

- Roush, R.T. (Eds.), Resistance of Parasites to Antiparasitic Drugs. MSD AGVET, Rahway, pp. 177 – 184.
- Lanusse, C., Alvarez, L., Lifschitz, A. 2014. Pharmacological knowledge and sustainable anthelmintic therapy in ruminants. *Veterinary Parasitology*, 204:18 – 33.
- Le Jambre, L.F. 1976. Egg hatch as an *in vitro* assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology*, 2:385 – 391.
- Makkar, H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminants Research*, 49:241 – 256.
- McKellar, Q.A. 1997. Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. *Veterinary Parasitology*, 72:413 – 435.
- Miller, C.M., Waghorn, T.S., Leathwick, D.M., Candy, P.M., Oliver, A.M., Watson, T.G. 2012. The production cost of anthelmintic resistance in lambs. *Veterinary Parasitology*, 186:376 – 381.
- Min, B.R., Barry, T.N., Attwood, G.T., McNabb, W.C. 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 106:3 – 19.
- Min, B.R., Pomroy, W.E., Hart, S.P., Sahlou, T. 2004. The effect of short-term consumption of a forage containing condensed tannins on gastro-intestinal nematode parasite infections in grazing wether goats. *Small Ruminant Research*, 51:279 – 283.

- Mueller-Harvey, I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86:2010 – 2037.
- Nieuwhof, G.J., Bishop, S.C. 2005. Costs of the major endemic diseases of sheep in Great Britain and the potential benefits of reduction in disease impact. *Animal Science*, 81:23 – 29.
- Niezen, J.H., Waghorn, G.C., Graham, T., Carter, J.L., Leathwick, D.M. 2002. The effect of diet fed to lambs on subsequent development of *Trichostrongylus colubriformis* larvae *in vitro* and on pasture. *Veterinary Parasitology*, 105:269 – 283.
- Novobilský, A., Stringano, E., Hayot Carbonero, C., Smith, L.M., Enemark, H.L., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M. 2013. *In vitro* effects of extracts and purified tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against two cattle nematodes. *Veterinary Parasitology*, 196:532 – 537.
- O'Grady, J., Kotze, A.C. 2004. *Haemonchus contortus*: *in vitro* drug screening assays with the adult life stage. *Experimental Parasitology*, 106:164 – 172.
- Paolini, V., Fouraste, I., Hoste, H. 2004. *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin extracts on 3rd stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology*, 129:69 – 77.
- Papadopoulos, E., Gallidis, E., Ptochos, S. 2012. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: a selected review. *Veterinary Parasitology*, 189:85 – 88.

- Prichard, R.K., Hall, C.A., Kelly, J.D., Martin, I.C., Donald, A.D. 1980. The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Australian Veterinary Journal*, 56:239 – 251.
- Reed, J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *Journal of Animal Science*, 73:1516 – 1528.
- Ríos-de Álvarez, L., Jackson, F., Greer, A., Bartley, Y., Bartley, D.J., Grant, G., Huntley, J.F. 2012. *In vitro* screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. *Veterinary Parasitology*, 186:390 – 398.
- Roepstorff, A., Nansen, P. 1998. Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine. *FAO Animal Health Manual*, 161 pp.
- Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*, 69:299 – 322.
- Rose, H., Rinaldi, L., Bosco, A., Mavrot, F., de Waal, T., Skuce, P., Charlier, J., Torgerson, P.R., Hertzberg, H., Hendrickx, G., Vercruyse, J., Morgan, E.R. 2015. Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. *Veterinary Record*, 176:546.
- Sangster, N.C., Dobson, R.J. 2002. Anthelmintic resistance. In: Lee, D.L. (ed.), *The Biology of Nematodes*, 1st ed. CRC Press, pp. 531–567.
- Shaik, S.A., Terrill, T.H., Miller, J.E., Kouakou, B., Kannan, G., Kaplan, R.M., Burke, J.M., Mosjidis, J.A. 2006. *Sericea lespedeza* hay as a

- natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Veterinary Parasitology*, 139:150 – 157.
- Siddiqui, M.W., Prasad, K. 2017. *Plant Secondary Metabolites, Volume One: Biological and Therapeutic Significance*. 1st ed. CRC Press, 318 pp.
- Spiegler, V., Liebau, E., Hensel, A. 2017. Medicinal plant extracts and plant-derived polyphenols with anthelmintic activity against intestinal nematodes. *Natural Product Reports*, 34:627 – 643.
- Sutherland, I., Scott, I., 2010. *Gastrointestinal Nematodes of Sheep and Cattle: Biology and Control*, 1st ed. Wiley-Blackwell, 256 pp.
- Taylor, M.A. 1990. A larval development test for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of sheep. *Research in Veterinary Science*, 49:198 – 202.
- Taylor, M.A., Coop, R.L., Wall, R.L. 2016. *Veterinary Parasitology*, 4th ed. Blackwell Publishing, 1032 pp.
- Taylor, M.A., Hunt, K.R., Goodyear, K.L. 2002. Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*, 103:183 – 194.
- Terrill, T.H., Mosjidis, J.A., Moore, D.A., Shaik, S.A., Miller, J.E, Burke, J.M., Muir, J.P. Wolfe, R., 2007. Effect of pelleting on efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats. *Veterinary Parasitology*, 146:117 – 122.

- Traversa, D., von Samson-Himmelstjerna, G. 2016. Anthelmintic resistance in sheep gastro-intestinal strongyles in Europe. *Small Ruminant Research*, 135:75 – 80.
- Vadlejch, J., Kopecký, O., Kudrnáčová, M., Čadková, Z., Jankovská, I., Langrová, I. 2014. The effect of risk factors of sheep flock management practices on the development of anthelmintic resistance in the Czech Republic. *Small Ruminant Research*, 117:183 – 190.
- Vadlejch, J., Langrová, I., Borovský, M., Sedmíková, M., Jankovská, I., Fechtner, J., Lytvynets, A. 2006. Enzymatic and protein differences between infective larvae of *Trichostrongylus colubriformis* conditioned or not conditioned to hypobiosis. *Helminthologia*, 43:64 – 68.
- Vadlejch, J., Petrtýl, M., Zaichenko, I., Čadková, Z., Jankovská, I., Langrová, I., Moravec, M. 2011. Which McMaster egg counting technique is the most reliable? *Parasitology Research*, 109:1387 – 1394.
- Van Wyk, J.A., Malan, F.S., Gerber, H.M., Alves, R.M. 1989. The problem of escalating resistance of *Haemonchus contortus* to the modern anthelmintics in South Africa. *The Onderstepoort journal of veterinary research*, 56:41–49.
- Váradyová, Z., Kišidayová, S., Čobanová, K., Grešáková, L., Babják, M., Königová, A., Urda Dolinská, M., Várady, M. 2017. The impact of a mixture of medicinal herbs on ruminal fermentation, parasitological status and hematological parameters of the lambs

- experimentally infected with *Haemonchus contortus*. Small Ruminant Research, 151:124 – 132.
- Vernerová, E., Vondrová, R., Kisová, H., Svobodová, V., Hera, A. 2009. Detection of benzimidazole resistance in gastrointestinal nematode parasites of sheep in the Czech Republic. Veterinární medicína (Vet. Med. Czech), 54:467 – 472.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Coles, G.C., Jackson, F., Bauer, C., Borgsteede, F., Cirak, V.Y., Demeler, J., Donnan, A., Dorny, P., Epe, C., 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., Bernes, G., Thamsborg, S.M., Sukura, A., Richter, S.H., Ingebrigtsen, K., Höglund, J. 2001. Plants as De-Worming Agents of Livestock in the Nordic Countries: Historical Perspective, Popular Beliefs and Prospects for the Future. Acta Veterinaria Scandinavica, 42:31 – 44.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N.S. 2004. Drug resistance in veterinary helminths. Trends in Parasitology, 20:469–476.
- Wood, I.B., Amaral, N.K., Bairden, K., Duncan, J.L., Kassai, T., Malone, Jr. J.B., Pankavich, J.A., Reinecke, R.K., Slocombe, O., Taylari, S.M., Vercruyse, J. 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second

edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*, 58:181 – 213.

Zajac, A.M. 2006. Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants: Life Cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, 22:529 – 541.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Burešová, E., Vadlejch, J., Langrová, I. 2016. Anthelmintic activity of the methanol extracts of selected Czech plants using Egg hatch test. Proceedings Paper In: Kubík Š. & Barták M. (eds) 8th Workshop on biodiversity, Jevany, Česká zemědělská univerzita v Praze, pp 20 – 28.
- Burešová, E., Vadlejch, J., Langrová, I. 2017. Experimental infection of lambs with *Haemonchus contortus*. In: Kubík Š. & Barták M. (eds) 9th Workshop on biodiversity, Jevany, Česká zemědělská univerzita v Praze, pp 27 – 33.
- Kyriánová, I.A., Nápravníková, J., Váradyová, Z., Várady, M., Vadlejch, J. 2018. The field efficacy of herbal plant mixture aqueous extracts against parasitic gastroenteritis in dairy goats. In: Kubík Š. & Barták M. (eds) 10th Workshop on biodiversity, Jevany, Česká zemědělská univerzita v Praze, v tisku.
- Lanková, S., Langrová, I., Jankovská, I., Knížková, I., Kunc, P., Vadlejch, J. 2018. Postup helmintologické pitvy a postmortální detekce helmintů vyskytujících se u domácích přežvýkavců v České republice. Metodika, ČZU v Praze: 25 s.
- Polesná, L., Vadlejch, J., Langrová, I., Burešová, E., Kokoška, L. 2015. Czech medical plants with anthelmintic properties. 7th Workshop on biodiversity, Jevany, Česká zemědělská univerzita v Praze. pp 103 – 108.
- Šrámková, M., Langrová, I. 2017. Gastrointestinální hlístice v chovu ovcí na farmě Smolná. In: Kubík Š. & Barták M. (eds) 9th Workshop on biodiversity, Jevany, Česká zemědělská univerzita v Praze. pp 113 – 125.

- Vadlejch, J., Burešová, E., Várady, M., Váradyová, Z. 2018. To feed or to develop? Evaluation of anthelmintic properties of six plant extracts using two in vitro tests. 2nd COMBAR Working Groups Meeting – Anthelmintic Resistance: Past, Present and Future, 26. – 27. 9., León, Spain
- Vadlejch, J., Gardiánová, I. 2015. Vyhodnocení účinnosti moxidektinu při léčbě muelleriózy koz – případová studie. In: Kubík Š. & Barták M. (eds) 7th Workshop on biodiversity, Jevany, Česká zemědělská univerzita v Praze. pp 103 – 108.
- Vadlejch, J., Knížková, I., Kunc, P., Langrová, I. 2017. Médium pro prosvětlování hlístic. Česká zemědělská univerzita v Praze, Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Česká republika. Užiténý vzor CZ 31456 U1. 2018-02-13.
- Váradyová, Z., Pisarčíková, J., Babják, M., Hodges, A., Mravčáková, D., Kišidayová, S., Königová, A., Vadlejch, J., Várady, M. 2018. Ovicidal and larvicidal activity of extracts from medicinal-plants against *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology*, 195:71 – 77.

VIII. Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QJ1510038 s názvem: „Využití rostlinných extraktů jako bioantiparazitik u hospodářských zvířat“.

vydavatel: powerprint, Praha

vydání: první 2018

tisk: powerprint s.r.o.

Brandejsovo nám. 1219/1

165 00 Praha – Suchdol

www.publikace24.cz

Název: Zjišťování anthelmintické účinnosti biologicky aktivních látek rostlin

Autoři publikace s vyjádřením podílu práce:

doc. Ing. Jaroslav Vadlejch, Ph.D. (60 %)

Ing. Eva Burešová (30 %)

prof. Ing. Iva Langrová, CSc. (10 %)

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

katedra zoologie a rybářství

Kamýcká 129

165 00 Praha – Suchdol

© 2018

ISBN 978-80-213-2912-6