

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

FAKULTA ZEMĚDĚLSKÁ A TECHNOLOGICKÁ

KATEDRA ZOOTECHNICKÝCH VĚD

**Diagnostika parazitárních onemocnění a úspěšnost vybraných  
terapeutických postupů u lichokopytníků a sudokopytníků**

Diagnosis of parasitic diseases and success of selected therapeutic procedures in soliped  
and artiodactyla

**DISERTAČNÍ PRÁCE**

**Ing. Nikola Havrdová**

Školitel: prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.

Školitel specialista: MVDr. Silvie Hlavinková

České Budějovice 2023

## Disertační práce

Havrdová N. 2023: Diagnostika parazitárních onemocnění a úspěšnost vybraných terapeutických postupů u lichokopytníků a sudokopytníků. [Diagnosis of parasitic diseases and success of selected therapeutic procedures in Proboscidea and Artiodactyla]. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta zemědělská a technologická, 120 s.

## **Prohlášení**

Předkládám tímto k posouzení a obhajobě disertační práci zpracovanou na závěr doktorského studia na Fakultě zemědělské a technologické; Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Prohlašuji tímto, že jsem práci vypracovala samostatně, s použitím odborné literatury a dostupných zdrojů uvedených v seznamu, jenž je součástí této práce.

Dále prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své disertační práce s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému mimouniverzitního projektu Thesis.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací a dále s uložením práce v elektronické formě v systému STAG Fakulty zemědělské a technologické Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

### **Prohlášení o vědeckém příspěvku výsledků práce**

Prohlašuji, že jsem disertační práci v rámci studia diagnostiky parazitárních onemocnění a úspěšnosti vybraných terapeutických postupů u lichokopytníků a sudokopytníků zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu. Tato práce je založena na vědeckých výsledcích, jichž jsem hlavní autorkou.

V Českých Budějovicích dne .....

.....  
Ing. Nikola Havrdová

## Seznam impaktovaných publikací

Kváč M., **Havrdová N.**, et al. **2016**. *Cryptosporidium proliferans* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae): molecular and biological evidence of cryptic species within gastric *Cryptosporidium* of mammals. PloS one 11.1: e0147090.

Čondlová Š., Horčíčková M., **Havrdová N.**, et al. **2019**. Diversity of *Cryptosporidium* spp. in *Apodemus* spp. in Europe. European Journal of Protistology 69: 1-13.

Poborská A., Záborský L., Šoch M., **Havrdová N.**, et al. **2021**. Methods of feeding colostrum and their effect on the passive immunity. Acta Veterinaria Brno 90.1: 21-25.

Záborský L., Poborská A., Gálik B., Šoch M., Brož P., Kantor M., Kernerová N., Řezáč I., Rolinec M., Hanušovský O., Strnad L., **Havrdová N.** **2022**. Influence of Probiotic Strains *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, and *Enterococcus* on the Health Status and Weight Gain of Calves, and the Utilization of Nitrogenous Compounds. Antibiotics, 11.9: 1273.

Illek J., Dresler S., Šoch M., Kernerová N., Šimák Líbalová K., Zevlová E., **Havrdová, N.** **2023**. Influence of organic zinc on lactation performance and somatic cell count in dairy cows. Acta Veterinaria Brno, 92.3: 233-241.

Řezáč I., Kernerová N., Komosný M., Kuneš R., **Havrdová N.**, et al. **2023**. Possibilities for dealing with large litters of piglets. Journal of Central European Agriculture, 24.1: 61-71.

**Havrdová N.**, Roztočil D., Petrášková E., Tejml P., Kernerová N., Poborská A., Vráblík P., Novák P., Malá G., Zevlová E., Maurer J., Beran J., Záborský L., Šoch M. **2023**. The effect of the number of feed pushing-ups on animal behavior, dry matter intake and milk yield of dairy cows. Journal of Central European Agriculture, 2023, 24(4). p. 789-801. DOI: 10.5513/JCEA01/24.4.3827.

**Havrdová N.**, Havrda O., Čondlová Š., Pecová L., Kernerová N., Beran J., Šoch M. 2023. *Calicophoron daubneyi* (Digenea: Paramphistomidae): The efficacy of anthelmintics in naturally infected cattl. Journal of Central European Agriculture, 2023, 24(4), p. 817-826. DOI:10.5513/JCEA01/24.4.4053

## **Publikace ve sbornících**

**Havrdová, N., Čondlová, Š., Kváč, M. 2019.** Efficacy of anthelmintic against natural infection in cattle and small ruminant breeds in the Czech Republic. 25<sup>th</sup> Helminthological Days. Faculty of Science, Charles University, Prague. ISBN: 978-80-7444-066-3.

Poborská, A., Šoch, M., Zábranský, L., **Havrdová, N. 2019.** Vliv krmných aditiv na hladinu celkové bílkoviny v krvi telat. Aktuální otázky bioklimatologie zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha, s. 64 – 66. ISBN: 978-80-7403-226-4

Poborská, A., Strnad, L., **Havrdová, N., Zábranský, L., Šoch, M. 2020.** Vliv vnějšího prostředí na růstovou schopnost jehňat u valašské ovce. Aktuální otázky bioklimatologie zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha, s. 79 – 81. ISBN: 978-80-7403-240-0.

**Havrdová, N., Pecová, L., Kučera J., Poborská, A., Zábranský, L., Šoch, M., Novák, P., Malá, G. 2021.** Zoohygiena a vliv prostředí na rezistenci parazitů v chovech malých přežvýkavců. Aktuální otázky bioklimatologie zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha, s. 23 – 25. ISBN: 978-80-7403-263-9.

Kučera, J., **Havrdová, N., Kernerová, N., Zevlová, M. 2021.** Vliv ročního období na znaky spermatu kanců. Aktuální otázky bioklimatologie zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha, s. 34 – 36. ISBN: 978-80-7403-263-9.

Poborská, A., Strnad, L., Zábranský, L., Šoch, M., **Havrdová, N., Novák, P., Malá, G. 2022.** Růstové schopnosti jehňat valašské ovce. Aktuální otázky bioklimatologie zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha, s. 61 – 63. ISBN: 978-80-7403-277-6.

Šoch, M., Sváčková, M., **Havrdová, N., Kernerová, N., Poborská, A., Tejml, P., Šimák Líbalová, K., Zábranský, L. 2023.** Vyhodnocení používání antibiotik ve vybraných chovech dojených krav. Aktuální otázky bioklimatologie zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha, s. 130 – 133. ISBN: 978-80-7403-301-8.

Šoch, M., Ranná, T., **Havrdová, N., Kernerová, N., et al. 2023.** Vyhodnocení vlivu nekonvenčních způsobů léčby využívaných v ekologickém zemědělství na výskyt vybraných endoparazitů koní. Aktuální otázky bioklimatologie zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha, s. 134 – 136. ISBN: 978-80-7403-301-8.

Neumann, J., Konvalina, P., Šimák Líbalová, K., Zábranský, L., Kernerová, N., Poborská, A., Tejml, P., **Havrdová, N., Zevlová Bakulová, E., Šoch, M. 2023.** Aktuální otázky

bioklimatologie zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha, s. 76 – 78. ISBN: 978-80-7403-301-8.

**Havrdová, N., Brabcová, A., Šoch, M., Beran, J., Kernerová, N., Poborská, A., Novák, P., Malá, G. 2023.** Biosekurita a snížení parazitární zátěže u pasoucího se skotu vlivem cílené léčby anthelmintik. Aktuální otázky bioklimatologie zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha, s. 21 – 23. ISBN: 978-80-7403-301-8.

**Havrdová, N., Kantor, M., Šoch, M., Beran, J., Kernerová, N., Malá, G., Novák, P. 2023.** Šlechtitelský význam skotu bez tržní produkce mléka v závislosti na podmínkách plemenné hodnoty a prostředí. Aktuální otázky bioklimatologie zvířat. Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha, s. 24 – 26. ISBN: 978-80-7403-301-8.

### **Příspěvek na konferenci**

**Havrdová, N., Čondlová, Š., Kváč, M. 2019.** Efficacy of anthelmintic against natural infection in cattle and small ruminant breeds in the Czech Republic. 25<sup>th</sup> Helminthological Days. 6-10 May 2019. Czech Society for Parasitology, Helminthological Section, Hotel Kouty, Rejčkov 20, Czechia.



### **Disertační práce vznikla za podpory následujících grantů**

**GAJU 012/2018/Z** – Rezistence parazitů na anthelmintika: detekce, výskyt a cílená léčba u masného skotu a ovcí (2018 – 2019; řešitel: Ing. Nikola Havrdová).

**NAZV QK1910438** – Snížení aplikace antibiotik využitím ekologicky šetrných prebiotických a probiotických krmných aditiv ve výživě telat (2019 – 2023).

**NAZV QK21020304** – Vliv úrovně managementu chovu a prevence chorob hospodářských zvířat, včetně biosecurity na snížení spotřeby antimikrobiálních látek a šíření antimikrobiální rezistence (2021 – 2023).

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu mé disertační práce prof. Ing. Miloslavu Šochovi, CSc., dr. h. c. za odborné vedení, podporu a cenné rady v průběhu doktorského studia a při zpracování této disertační práce. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům Katedry zootechnických věd Fakulty zemědělské a technologické Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, pracovníkům zemědělských podniků a veterinárním pracovníkům, kteří mi umožnili realizaci cílů disertační práce a pomáhali při odběrech vzorků, manipulaci s hospodářskými zvířaty a aplikací léčiv.

## Souhrn

Tato disertační práce se zabývala diagnostikou a terapeutickými postupy při léčbě parazitárních onemocnění u lichokopytníků a sudokopytníků vybranými anthelmintiky. V letech 2020 – 2023 bylo v rámci České republiky mikroskopicky vyšetřeno na přítomnost nematod, trematod nebo cestod ve vzorcích výkalů 5 359 sudokopytníků a 819 lichokopytníků, konkrétně – skotu, ovcí, koz, praturů, muflonů, jelenů, zubrů, bizonů, koní, oslů a poníků. Molekulárně bylo na přítomnost trematod vyšetřeno 76 vzorků skotu, 26 vzorků zubrů a 52 vzorků bizonů, kde byla prokázána přítomnost *C. daubneyi*. Parazitární infekce byly sledovány u přirozeně infikovaných jedinců a během studie nebyly u žádného monitorovaného jedince zpozorovány klinické příznaky prokazující parazitární infekci. Nejvíce parazitárních infekcí bylo vyhodnoceno pro *H. contortus*, *O. ostertagi*, *M. benedeni*, *C. daubneyi* a *A. perfoliata*. V rámci disertační práce bylo zvoleno celkem deset anthelmintik dostupných v České republice se zaměřením na jednotlivé kategorie parazitárních infekcí u různých druhů zvířat. Na základě laboratorních analýz testů LDA byl určen druh nematody dle vývojového stádia larev, který při terapeutické léčbě pomohl zvolit vhodné anthelmintikum. Závěrem lze konstatovat, že u terapeuticky léčených jedinců hospodářských zvířat byla prokázána účinnost téměř u všech anthelmintik.

**Klíčová slova:** prevalence; sudokopytníci; lichokopytníci; parazitární infekce; nematoda; trematoda; cestoda; anthelmintika.

## Summary

This dissertation dealt with the diagnosis and therapeutic procedures for the treatment of parasitic diseases in odd-toed and even-toed ungulates with selected anthelmintics. Between 2020 – 2023, 5.359 artiodactyls and 819 solipeds, namely cattle, sheep, goats, aurochs, mouflon, deer, bison, bison bonasus, horses, donkeys and ponies, were microscopically examined for the presence of nematodes, trematodes or cestodes in faecal samples in the Czech Republic. Molecularly, 76 cattle samples, 26 bison bonasus samples and 52 bison samples were examined for the presence of trematodes and *C. daubneyi* was detected. Parasitic infections were monitored in naturally infected individuals, and during the study no clinical signs suggestive of parasitemia were observed in any of the monitored individuals. The most parasitic infections were evaluated for *H. contortus*, *O. ostertagi*, *M. benedeni*, *C. daubneyi* and *A. perfoliata*. As part of the dissertation, a total of ten anthelmintics available in the Czech Republic were chosen, focusing on individual categories of parasitic infections in various animal species. Based on laboratory analyzes of LDA tests, the species of nematode was determined according to the developmental stage of the larvae, which helped to choose the appropriate anthelmintic during treatment. In conclusion, it can be stated that almost all anthelmintics have been shown to be effective in therapeutically treated farm animals.

**Key words:** prevalence; artiodactyls; solipeds; parasitic infections; nematodes; trematodes; cestodes; anthelmintics.

# OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>LITERÁRNÍ PŘEHLED</b> .....	<b>17</b>
2.1	HOSTITEL A PARAZIT .....	17
2.2	HELMINTI .....	18
2.2.1	Nematoda .....	18
2.2.2	Trematoda .....	23
2.2.3	Cestoda .....	27
2.3	METODY DETEKCE HELMINTŮ U HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT, DIAGNOSTIKA PARAZITÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ .....	29
2.4	TERAPEUTICKÁ LÉČBA A PREVENCE .....	32
2.4.1	Anthelmintika .....	33
2.4.1.1	Benzimidazoly .....	33
2.4.1.2	Makrocyclické laktony .....	34
2.4.1.3	Imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny .....	35
2.4.1.4	Aceto-aminonitrilové deriváty .....	35
2.4.1.5	Pyrazinoisochinoliny .....	36
2.4.1.6	Halogenované salicylanilidy a organofosfáty .....	36
2.5	REZISTENCE .....	37
2.6	ASANACE PASTVIN .....	38
<b>3</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA</b> .....	<b>41</b>
4.1	MATERIÁL .....	41
4.1.1	Charakteristika vybraných chovů hospodářských zvířat .....	41
4.1.2	Aplikace a charakteristika vybraných anthelmintik .....	43
4.1.2.1	Closamectin .....	46
4.1.2.2	Panacur .....	46
4.1.2.3	Ivomec super .....	46
4.1.2.4	Helmigal .....	47
4.1.2.5	Biomec .....	47
4.1.2.6	Verm-x .....	48
4.1.2.7	Noromectin .....	48

4.1.2.8	Aldifal.....	48
4.1.2.9	Albex .....	49
4.1.2.10	Ecomectin.....	49
4.2	METODIKA .....	49
4.2.1	Identifikace a kvantifikace parazitů .....	49
4.2.1.1	Flotace a McMaster .....	49
4.2.1.2	Egg hatch assay test a Larval development assay test.....	50
4.2.1.3	Sedimentace .....	51
4.2.1.4	Fecal egg count reduction test.....	51
4.2.1.5	Molekulární charakteristika.....	51
4.2.2	Statistická analýza .....	52
<b>5</b>	<b>VÝSLEDKY.....</b>	<b>53</b>
5.1	PARAZITÁRNÍ ONEMOCNĚNÍ A PREVALENCE .....	53
5.1.1	Terapeutická léčba vybranými anthelmintiky .....	55
5.2	MOLEKULÁRNÍ DETERMINACE .....	64
<b>6</b>	<b>DISKUZE.....</b>	<b>67</b>
6.1	VÝSKYT A PREVALENCE PARAZITÁRNÍCH INFEKČÍ U SLEDOVANÝCH JEDINCŮ.....	67
6.2	TERAPEUTICKÁ LÉČBA A ÚČINNOST/REZISTENCE ANTHELMINTIK .....	67
6.3	ÚČINNOST TERAPEUTICKÉ LÉČBY SUDOKOPYTNÍKŮ U PARAZITÁRNÍCH INFEKČÍ <i>C. DAUBNEYI</i> .....	70
6.4	BIOSEKURITA A ZOOHYGIENA OVLIVŇUJÍCÍ PARAZITÁRNÍ INFEKCE U HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT.....	71
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>REFERENCE .....</b>	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>107</b>
<b>10</b>	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ.....</b>	<b>108</b>
<b>11</b>	<b>SEZNAM GRAFŮ.....</b>	<b>109</b>
<b>12</b>	<b>PŘÍLOHA I.....</b>	<b>110</b>

# 1 ÚVOD

Hospodářská zvířata (HZ) jsou nezbytná pro živočišnou výrobu a představují tak nepostradatelný zdroj obživy téměř ve všech regionech a zemích světa (Silvestre et al. 2002; Götherström et al., 2005; Cameron et McAllister 2016; Hall et Bunce 2019; Barelli et al., 2021).

Prvním krokem k diagnostikování problému infekcí ve stádě je vždy pochopení účinku, který souvisí s výrobními parametry. Infekce helmintem jsou hlavním omezením efektivní živočišné výroby. Variabilitu mezi dopady produkce lze přisuzovat různým úrovním infekce, vývojovému stadiu parazita, genetickému pozadí hostitele, managementu výživy a dosud neznámým faktorům (Mason et al., 2012; González-Warleta et al., 2013). Dále je nezbytné sledovat druhovou odolnost chovaných plemen. Někteří jedinci mohou představovat významnou parazitární zátěž, i když není ovlivněna jejich produkce a nevykazují klinické příznaky. Parazitární infekce se považují za hlavní překážky až tehdy, je-li ovlivněna produkce HZ (Gunathilaka et al., 2018; Kotze et al., 2020). Pro kontrolu a diagnostiku nematod v praxi jsou nejvíce využívány koprologické metody (Barda et al., 2014), protože rychlá imunologická metoda, která by vedla i k odhalení infekce v rané fázi, zatím není dostupná. Projevy nálezů jsou společné pro řadu parazitárních, bakteriálních a virových infekcí. Vajíčka obsažená ve výkalech během patentní periody mohou být u některých druhů parazitů detekovatelná pouze v určité roční době. Morfologická podobnost vajíček helmintů může mít za následek použití neúčinné léčby. Z tohoto důvodu je nezbytné rozšiřovat molekulární metody k identifikaci druhů. U přežvýkavců lze k detekci hlístic aplikovat systém FAMACHA ("FAfa MAIan CHArt"; van Wyk et Bath, 2002). Nejspolehlivější a nejpřesnější metodou nicméně zůstává detekce parazitárních druhů pomocí PCR (Polymerase Chain Reaction; Roeber et al., 2012; Martínez-Pérez et al., 2012). Bohužel tato metoda vyžaduje specifické vybavení a je časově i finančně náročná, oproti běžným koprologickým testům (Eysker et al., 2000). Aby byly uspokojeny požadavky rostoucí a měnící se světové populace (Herrero et al., 2013), musí být kontrola helmintů integrována do ekonomického kontextu celého zemědělského podniku (Charlier et al., 2012). Klíčovým bodem je zkombinovat informace specifické pro farmu potýkající se s infekcí helmintů a s ekonomickými informacemi individuální pro konkrétní farmu. Vzhledem k tomu, že zemědělec je primárním rozhodovatelem v péči o HZ, je pravděpodobné, že pro úroveň farmy bude nejvhodnější omezit právě parazitární infekce na minimum. Infekce parazitickými hád'átky představují sice dlouhodobou ekonomickou zátěž pro chov přežvýkavců a omezují tak živočišnou produkci

(White et al., 2001; Verschave et al., 2016; Decker et al., 2014; Bader et al. 2017; Pitt et al. 2019; Genes et al., 2019; Vineer et al., 2020), nicméně dynamika šíření je ovlivněna řadou faktorů, kde zůstává faremní management a zejména nastavení léčebných programů hlavní příčinou šíření populací parazitů, které způsobují zátěž v chovech sudokopytníků či lichokopytníků (Ajmone-Marsan et al., 2010; Westers et al., 2016; Bader et al., 2017).

Cílem strategie kontroly parazitárních infekcí by nemělo být jen snížení úrovně infekce, ale i využití dostupných zdrojů a vstupů (krmivo, pastviny, léky) s ohledem na možné ovlivnění infekce a dopadem na ekonomickou výkonnost. Identifikace a kontrola prevalence ve stádě by měla být zohledňována do ekonomického kontextu celého hospodářství a žádné hospodářské zvíře by nemělo být léčeno profylakticky, ale cíleně na základě výsledků laboratorní diagnostiky parazitárních infekcí. Velmi obtížný úkol je posoudit všechny negativní účinky v ekonomickém hledisku pro konkrétní farmu. Většina poznatků je založena na očekávaných dopadech, nikoliv na pozorování, proto tyto data často neposkytují dostatek informací z hlediska účinku infekce hlístic a dopadem na ekonomickou výkonnost celého zemědělského podniku.

Vznikající fenomén anthelmintické rezistence vyžaduje naléhavou úpravu léčebných programů s cílem zachovat účinnost dostupných anthelmintik v dlouhodobém horizontu. Návrat populace parazitů do stavu, kdy je většina jedinců citlivá k účinkům anthelmintik, je teoreticky možná, avšak z praxe prozatím neexistují žádné zprávy o plně úspěšné reverzi. Je třeba zdůraznit, že pro zajištění úspěchu není totální eradikace populací parazitů žádoucí, neboť zvířatům by neměl být zcela odepřen přístup k přirozené infekci, a to nejen pro vývoj získané imunity, ale i z důvodů ředění rezistentní genů v populaci parazitů. Důležitá je včasná diagnostika parazitárního onemocnění a následná léčba, dále pravidelná zoohygiena pastvin a stáje.

Vzhledem k současnému stavu této problematiky je hlavním přínosem této práce zhodnotit úspěšnost terapeutických postupů u vybraných aplikovaných veterinárních léčivých přípravků (VLP) a zhodnotit parazitární prevalenci v chovech HZ v České republice (ČR), dále vyhodnotit účinnost jednotlivých používaných léčiv. Práce přispěje k prohloubení této problematiky.



## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Hostitel a parazit

Sudokopytníci a lichokopytníci jsou parazitováni různými druhy helmintů, včetně gastrointestinálních hlístic (GIH; Martínez-Valladares et al. 2015), plicních červů (Avramenko et al., 2017) a jaterních motolic (Huson et al. 2017). Tyto patogeny mohou způsobovat závažná onemocnění, ovlivňovat produktivitu u všech tříd HZ a patří mezi nejvýznamnější původce chorob omezujících rentabilitu farem a celkovou živočišnou produkci na celém světě (Doyle et Cotton, 2019; Havrdová et al., 2023).

Základním aspektem živočišné výroby je chov. Velmi významně se podílí na celkových tržbách zemědělských podniků. Hlavním úkolem chovu je produkce kvalitních živočišných produktů (Nielsen, 2015; Chen et al., 2022). Maso, mléko a další výstupy jsou nepostradatelné pro výživu lidí i zvířat, ale i jako zdroj surovin pro zpracovatelský průmysl. Při zvyšování produkce živočišných produktů, rostou i nároky na polnohospodářskou výrobu a potřeba primárních zdrojů potravin (Botto et al., 1984; Cameron et McAllister 2016; Hall et Bunce 2019).

Hlodavci představují v mnoha ekosystémech jeden z hlavních zdrojů potravy pro predátory, rychle se množí a mohou fungovat i jako vektor mnoha chorob. Jejich všudypřítomnost ve volné přírodě a synantropní způsob života představuje významný zdroj infekčních agens pro hospodářská zvířata (Čondlová et al., 2019). Primárním cílem chovu HZ je zdravé zvíře, které je ekonomicky rentabilní a schopné reprodukce, nicméně aby tato zvířata byla držena soustavně v dobrém zdravotním stavu a dobré kondici, musí chovatel dodržovat řadu zoohygienických pravidel a zohledňovat kritéria hodnocení zdraví (Hoste et Torres-Acosta 2011; Silvestre et al., 2002; Charlier et al., 2022).

Helmintů existuje na světě mnoha druhů (nematoda (hlístice); trematoda (motolice); cestoda (tasemnice)) a z většiny případů působí negativně na zdraví napadených jedinců (Barelli et al., 2021). Helminti jsou z hlediska ontogenetického vývoje velmi variabilní skupinou. Kromě dospělých jedinců a vajíček mají poměrně velký počet morfologicky odlišných larválních stádií a během ontogenetického vývoje využívají více hostitelů (Volf et al., 2007). Téměř všechna hospodářská zvířata jsou během svého života napadena různými druhy parazitů, kteří poškozují jejich zdraví (Clarke et al., 2019; Charlier et al., 2022), v důsledku může docházet k významným ztrátám jejich produkce. Paraziti provází chov hospodářských zvířat od počátku jejich domestikace a představují vážné riziko zejména u

jedinců chovaných pastevním způsobem (Papadopoulos, 2012; Martínez-Valladares et al., 2015a).

Parazit je menší než jeho hostitel a z hlediska svého vývoje vykazuje určitou míru specializace na svého hostitele, obvykle je s ním v dlouhodobém kontaktu, mohou žít i v symbióze (Su et al., 2007; Rondelaud et al., 2013, 2015). Rozmnožuje se rychleji než hostitel (Hampl, 2010). Hostitel slouží jako médium pro vývoj parazita a bez prosperujícího hostitele nemohou parazité existovat, mohou ale způsobit onemocnění (Nielsen, 2010). Prostředí, ve kterém žijí parazité, se zásadně liší od životního prostředí hostitele (Rose et al., 2015; Benavides et al., 2016; Martínez-Valladares et al., 2015a).

K nejčastějším způsobům infekce dochází požitím infekčních vajíček/larev v kontaminované pitné nebo rekreační vodě, kde jsou vajíčka/larvy schopny za vhodných klimatických podmínek zachovat svoji infekčnost až po několik měsíců (Flores et al., 2003; Martínez-Valladares et al., 2015, 2015a) a odolávají i běžným dezinfekčním přípravkům používaným při úpravě vody včetně chlorování (Dolinská et al., 2014; Playford et al., 2014). Další možností přenosu je kontaminovaná potrava – pastvina (Nath et al., 2011; Geurden et al., 2015; Zhang et al., 2020). K méně častým způsobům infekce může docházet i přenosem ze zvířete na člověka (Čondlová et al., 2019), respektive ze zvířete na zvíře (Lee et Greig 2010; Wheeler, 2018a, 2018b).

## **2.2 Helminti**

Zástupci helmintů jsou z hlediska ontogenetického vývoje velmi variabilní skupinou (Barelli et al., 2021) a zpravidla se dělí na nematody (hlístice; Cooper et al., 2013; Nutman, 2017), trematody (motolice; Cerda et al., 2019) a cestody (tasemnice; Scholz, 2018).

Na základě morfologicky odlišných stádií během ontogenetického vývoje je možné zařadit zástupce do samostatných podkmenů (Pandi, 2021; Scholz et al., 2022).

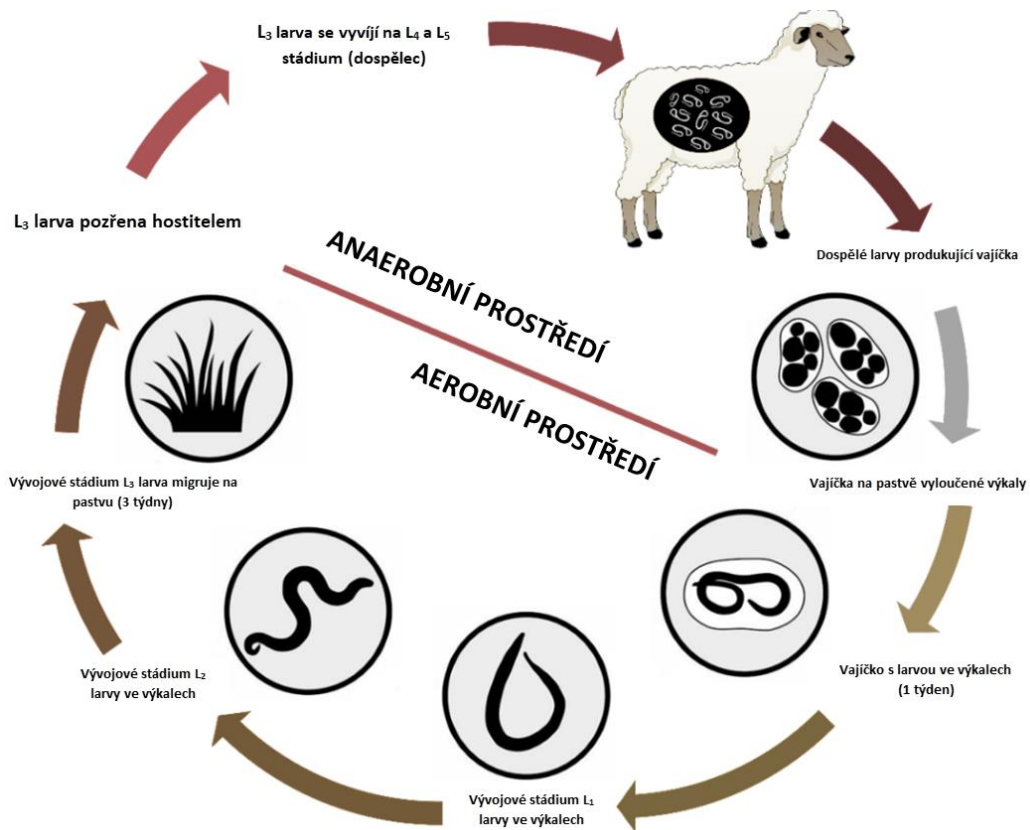
### **2.2.1 Nematoda**

Nematody patří mezi nejrozšířenější skupinu helmintů, vyskytují se v půdě, vodním prostředí, rostlinách nebo HZ a významně tak ovlivňují rovnováhu životního prostředí s dopadem na zdraví lidí a zvířat i rostlinnou produkci (Nicol et al., 2017).

Dospělí jedinci nematod parazitující v HZ jsou lokalizovány nejčastěji v trávicím traktu (Höglund et al., 2013; Benavides et al., 2016), krevním a lymfatickém oběhu (Taylor et al., 2007), nervové a dýchací soustavě (Benavides et al., 2016) a urogenitálním traktu (Swellengrebel et Serman, 1961) nejen sudokopytníků (Qurratul-Saadah et al., 2023), ale i lichokopytníků (Vineer et al., 2020). Abomasální infekce jsou zpravidla vyvolané smíšenou

parazitární infekcí, například *Haemonchus contortus* (Liu et al., 2023), *Ostertagia ostertagi* (Li et al., 2021), *Trichostrongylus* spp. a další (Jíra, 1998). Infekce se mohou dostat do chronické fáze a jsou často spojeny s produkčními ztrátami, jako je snížený přírůstek hmotnosti, doживost a reprodukční výkonnost (Bennema et al., 2010; Charlier et al., 2018). Hostitel se nematody nejčastěji infikuje pozřením vajíčka (kontaminovaná potrava nebo voda) nebo přímo L<sub>3</sub> larvou (obrázek 1), která se za příznivých podmínek, optimální teploty a vlhkosti, vylíhne za 6 – 7 dní z vajíčka (Besier et al., 2016; Mendez et al., 2018). Vývojové cykly nematod jsou velmi rozmanité, lišící se dle druhu a rozlišující se na cykly přímé/nepřímé (Hasegawa et al., 2016; Barelli et al., 2021).

**Obrázek 1. Vývojový cyklus nematod, *H. contortus* (Palevich et al., 2022, upraveno)**



Způsob infekce nematodami lze rozdělit na dvě formy, a to v závislosti na roční době (Mavrot et al., 2015; Fayisa et al., 2019). První typ je častější a parazitární infekce zpravidla nastane již při první pastevní sezóně, kde se HZ infikuje přezimovanými larvami na pastvinách. Jakmile se v hostiteli vyvine dospělec (L<sub>4</sub>), začne produkovat vajíčka a dojde ke kontaminaci pastviny, jedinec se reinfikuje a úroveň kontaminace pastviny se zvýší. Onemocnění je možné pozorovat již po 4 – 6 týdnech (Fayisa et al., 2019; Martins et al.,

2022; Yan et al., 2023). Druhý typ se vyskytuje na konci zimy nebo na jaře a propukne u jedinců s vysokým počtem encystovaných larev pozřených hostitelem z pastviny na podzim. Pozřená larva se v žaludeční mukóze vyvine do stadia L<sub>4</sub>. Po tomto stadiu může dojít k tzv. hypobióze (stav, kdy dojde k zastavení vývoje jedince; Charlier et al., 2018). Hypobióza je dána různými faktory, vnějšími podmínkami, ale i kondicí daného hostitele a nastává zpravidla v zimě. Během zlepšení životních podmínek se vývin larvy obnoví, larva tak opustí žaludeční mukózu, svlékne kutikulu a přemění se na dospělého jedince, který je schopný rozmnožování (Angulo-Cubilán et al., 2005). Po ukončení hypobiózy se vývojový cyklus obnoví a může dojít ke značnému pomnožení parazitů. Důsledkem je poškození abomasální stěny. U takto oslabených jedinců může nastat anafylaktický šok, v krajním případě i smrt (Theford, 2019; Yan et al., 2023). Pro první a druhé stádium vývoje tvoří obživu bakterie, třetí stádium je již infekční a nepřijímají potravu a jsou velmi odolné vůči nepříznivým podmínkám. Vajíčko obsahuje larvu zpravidla ve stádiu vývoje L<sub>2</sub>, po vyloučení z hostitele roste a vyvíjí se na L<sub>3</sub> larvu, kterou pozře jiný hostitel (van Wyk et al., 2004).

*Haemonchus contortus* (vlasovka slezová) je nejčastější nematodou gastrointestinálního traktu (GIT) u HZ (Lu et al., 2020; Liu et al., 2023). Je vysoce patogenní a živí se krví velkých i malých přežvýkavců (Besier et al., 2016). Haemonchóza, onemocnění způsobené *H. contortus*, je významnou hrozbou pro HZ v každém věku a to jak v tropických, subtropických tak i teplých oblastech mírného pásma, kde teplé a vlhké podmínky upřednostňují volně žijící stádia. Parazit ohroží zdravotní stav hostitele napadením slezu, čímž omezí vstřebávání živin a živočišnou produkci (Muchiut et al., 2018). Haemonchóza se vyskytuje ve větší míře během období jara – léta (Ma et al., 2019). Klinická diagnóza hemonchózy je založena především na průkazu anémie ve spojení s charakteristickým epidemiologickým obrazem a potvrzená postmortálně nálezem velkého počtu *H. contortus* ve slezu (Besier et al., 2016). Dospělec *H. contortus* dosahuje velikosti v rozmezí 14 – 16 mm a produkuje vajíčka o velikosti 85 × 45 μm (van Wyk et al., 2004; Muchiut et al., 2018). Vývojový cyklus *H. contortus* je tedy přímý (bez účasti sekundárního hostitele) a trvá bez hypobiozy 21 dní. Dospělá samice *H. contortus* je schopna vyprodukovat 5.000 – 10.000 vajíček v průběhu dne. Hostitel může ztratit až 250 ml krve za den (Khattak et al., 2018; Wang et al., 2021a).

*Ostertagia ostertagi* je spolu s vlasovkou slezovou (Liu et al., 2023) druhou nejčastější nematodou vyskytující se v chovu skotu v oblasti mírného pásma (Verschave et al., 2012), ovcí a koz (Yan et al., 2023) a v některých případech i lichokopytníků (Lichtenfels et al., 2008). *Ostertagia ostertagi* je považována za značnou ekonomickou zátěž živočišné výroby. Infekce se běžně vyskytuje v prvním a druhém roce pastevní sezóny u mladých zvířat (Fox,

1993; Li et al., 2021). Ostertagióza může způsobit vážné patologické stavy v gastrointestinálním traktu hostitele, snížit tak přírůstek nebo úbytek hmotnosti a konverzi živin. Snížení přírůstků nebo dokonce úbytek hmotnosti způsobí zhoršení celkové živočišné produkce (Martins et al., 2022). Je známo, že *O. ostertagi* konkrétně L<sub>4</sub> stádium, v hostiteli potlačuje imunitní reakce uvolňováním vlastních sekrečních produktů, které napodobují hostitelské imunitní modulátory rozpoznávající komplementární buněčný receptor (Sharma et al., 2017; Yan et al., 2023). Vzniknout extracelulární pasti pro neutrofilů v rané fázi infekčního procesu, čímž se naruší obranné reakce hostitele. *Ostertagia ostertagi* si tak zajistí vlastní přežití (Mihi et al., 2014; Mendez et al., 2018). *Ostertagia ostertagi* má přímý vývojový cyklus shodný s *H. contortus* (viz obrázek 1), bez mezihostitelů a může ovlivnit produkční parametry u HZ. Vajíčko *O. ostertagi* je elipsovitého tvaru o velikosti 90 – 120 × 30 – 42 μm, dospělci mají červenohnědou barvu a je zde znatelný pohlavní dimorfismus (samci dorůstají velikosti 6 – 8 mm a samice 8 – 9 mm; Ritchie, 1966; Mendez et al., 2018). Léčba ostertagiózy by měla být zaměřena na mladší jedince během první a druhé pastevní sezóny (Theford, 2019). V minulosti bylo vyvinuto několik mechanistických modelů založených na životním cyklu *O. ostertagi* (Gettinby et al., 1979; Gettinby et Paton, 1981; Smith, 1994), nicméně i když jsou tyto přístupy účelné, jsou citlivé na měnící se podmínky, takže vztahy, které byly základem inference za konkrétních podmínek, již zpravidla nemohou platit v jiné lokaci (Bakshi et al., 2021). Produkce vajíček *O. ostertagi* během parazitární fáze je ovlivněna funkcemi čtyř hlavních rysů životní historie i) usazením larev, ii) hypobiózou, iii) úmrtností dospělých jedinců a iv) plodností samic (Verschave et al., 2014).

Další parazitární infekce u HZ mohou způsobit zástupci *Trichostrongylus* spp. (Cable, 1943). U dospělých jedinců tohoto parazita je pohlavní dimorfismus též patrný. Vajíčka dosahují velikosti 86 × 39 μm a parazitují zejména u přežvýkavců, bizonů, lam, koní a oslů (Jíra, 1998). Dospělý samec dosahuje velikosti 3 – 5 mm a samice 5 – 8 mm, obě pohlaví jsou hnědočerveně zbarveni (Marchiondo et al., 2019a). Zástupci rodu *Cooperia* spp. mají vajíčka oválná a tenkostěnná o velikosti 70 – 80 × 25 – 35 μm stejného zbarvení jako zástupci *Trichostrongylus* spp. (Dunn, 1969). U sudokopytníků bývá infekce vyvolána společně s nematodou *Chabertia ovina*, která napadá povrch střeva hostitele. Samec parazita dorůstá délky 13 – 14 mm × 330 μm a samička 17 – 20 mm × 500 μm na šířku s 200 – 230 μm dlouhým ocasem (Marchiondo et al., 2013).

Pro lichokopytníky je hrozbou *Parascaris equorum* (škrkavka koňská). Jedná se o největšího vnitřního parazita koní, který je kosmopolitně rozšířen (Flota-Burgos et al., 2023). Patogenita dospělců spočívá hlavně v možnosti obstrukce tenkého střeva s následnou rupturou

vedoucí k terapeuticky nezvládnutelné peritonitidě (Lyons et al., 2000; Clayton, 1986). Samičky *P. equorum* dosahují délky až 40 cm, samci 18 – 25 cm. Vývojový cyklus škrkavek je též přímý (Flota-Burgos et al., 2023). Ve vajíčku se v průběhu 10 dní (v závislosti na podmínkách venkovního prostředí), vyvine infekční stádium L<sub>3</sub>. Pozřením tohoto infekčního stádia dojde v tenkém střevě k aktivaci a poté k enterohepatopulmonální migraci při které larvy dozrávají do dalšího stádia (Baranova et al., 2022; Flota-Burgos et al., 2023; Zhou et al., 2023). Krevním řečištěm se dostávají z jater do plic. Následující tracheální migrací jsou larvy vykašlávány a znovu spolknuty. Přibližně po měsíci extraintestinální migrace se dostávají opět do tenkého střeva, kde v průběhu 75 – 80 dní od infekce plně dozrají. Ve střevě se škrkavky rozmnožují a samička vylučuje desetitisíce vajíček denně. Dospělé škrkavky žijí ve střevě až několik měsíců (Baranova et al., 2022). Velcí strongylidé jsou nejvíce patogenní parazité lichokopytníků z důvodu dlouhého vývojového cyklu a migrace larev mimo trávící soustavu. Například larvy *Strongylus vulgaris* poškozují endotel cév, přičemž dochází k rozvoji arteritid, vzniku trombů a verminózních aneuryzmat, což je spojováno s nárůstem rizika vzniku ischemických kolik (Abbas et al., 2023; Osterman-Lind et al., 2023). Může dojít k ruptuře cév poškozených aneuryzmaty, silnému krvácení až úhynu jedince. Příznaky u kolikových stavů se pohybují od slabých intermitentních kolikových bolestí až k silným kolikám končících úhynem (Osterman-Lind et al., 2023). Larvy *Strongylus equinus* mohou být příčinou zánětu slepého střeva, peritonitidy, zánětu jater a pankreatu. Larvy *Strongylus edentatus* mohou tvořit hematomy až hnisavé uzlíky v peritoneu. Téměř vždy se jedná o smíšenou infekci několika rodů a parazitární infekcí spojenou s malými strongylidy (Abbas et al., 2023; Martins et al., 2023). Velikost dospělců malých strongylidů se pohybuje v rozmezí 0,5 – 2 cm (Abbas et al., 2023). Prepatentní perioda, která představuje období od infekce do začátku vylučování vajíček, trvá 6 až 12 týdnů a patentní perioda je zastoupena dospělci, kteří ve střevě přežívají až 2,5 roku. Jednotlivé druhy malých strongylidů preferují určité úseky tlustého střeva. Životní cyklus jedné generace malých strongylidů trvá 14 až 48 týdnů v závislosti na klimatu, v optimálních podmínkách se v průběhu roku mohou vyvinout až 3 generace (Lichtenfels et al., 2008). V tlustém střevě v místě Lieberkūnových krypt provrtávají larvy sliznici, vazivo a opouzdřují se (Lichtenfels et al., 2008; Abbas et al., 2021, 2023). Po 6 až 12 dnech se svlékají na larvy L<sub>4</sub> a dále se vyvíjejí ve sliznici tlustého střeva v průběhu 1 – 2 měsíců (období histiotropní fáze) a následně migrují do lumenu slepého střeva, dorzálního a ventrálního kolonu, kde dospívají. Samičky po kopulaci začnou produkovat vajíčka (Abbas et al., 2023).

Znalost taxonomie a biologie je klíčová pro řešení onemocnění způsobených těmito organismy. V současné době zůstává většina taxonomie hlístic neznámá nebo nejasná (Bardou-Valette et al., 2016; Seesao et al., 2017). Pro identifikaci parazitů je ale k dispozici řada postupů, od tradičních technik založených na morfologii až po sofistikované vysoce výkonné sekvenační technologie (González-Garduño et al., 2014). Všechny tyto techniky mají své výhody nebo nevýhody v závislosti na původu vzorku a počtu zpracovávaných hlístic (Hasegawa et al., 2016; Marchiondo et al., 2019b). Obtížnost identifikace nematod je ovlivněna přesností metody a dále parametry, které mohou ovlivnit výslednou identifikaci – vývojová stádia, velikost, diverzita nematod ve vzorku a/nebo nepřítomnost specifických morfologických znaků (Roeber et Kahn, 2014; Seesao et al., 2017). Přesto, že je možné zařadit nematody do příslušného rodu (Gasser et al., 2008; Wymann et al. 2008), vyžadují metody identifikace podrobnou znalost morfologie vývojových stádií a taxonomie (Roeber et al., 2013). Morfologie vajíček (velikost, barva, vzhled) separovaných z výkalů spolu s klinickými příznaky jedince obvykle postačuje k diagnostice parazitárních infekcí a zahájení následné léčby, nicméně k identifikaci larev prvního stádia ( $L_1$ ) nebo infekčních larev třetího stádia ( $L_3$ ), je nezbytná fekální kultivace po dobu alespoň 1 týdne, aby bylo možné odlišně diagnostikovat parazitární hlístice infikující HZ a zvolit tak vhodnější terapeutickou léčbu závislou na vývojových stádiích (Marchiondo et al., 2019a, 2019b).

### 2.2.2 Trematoda

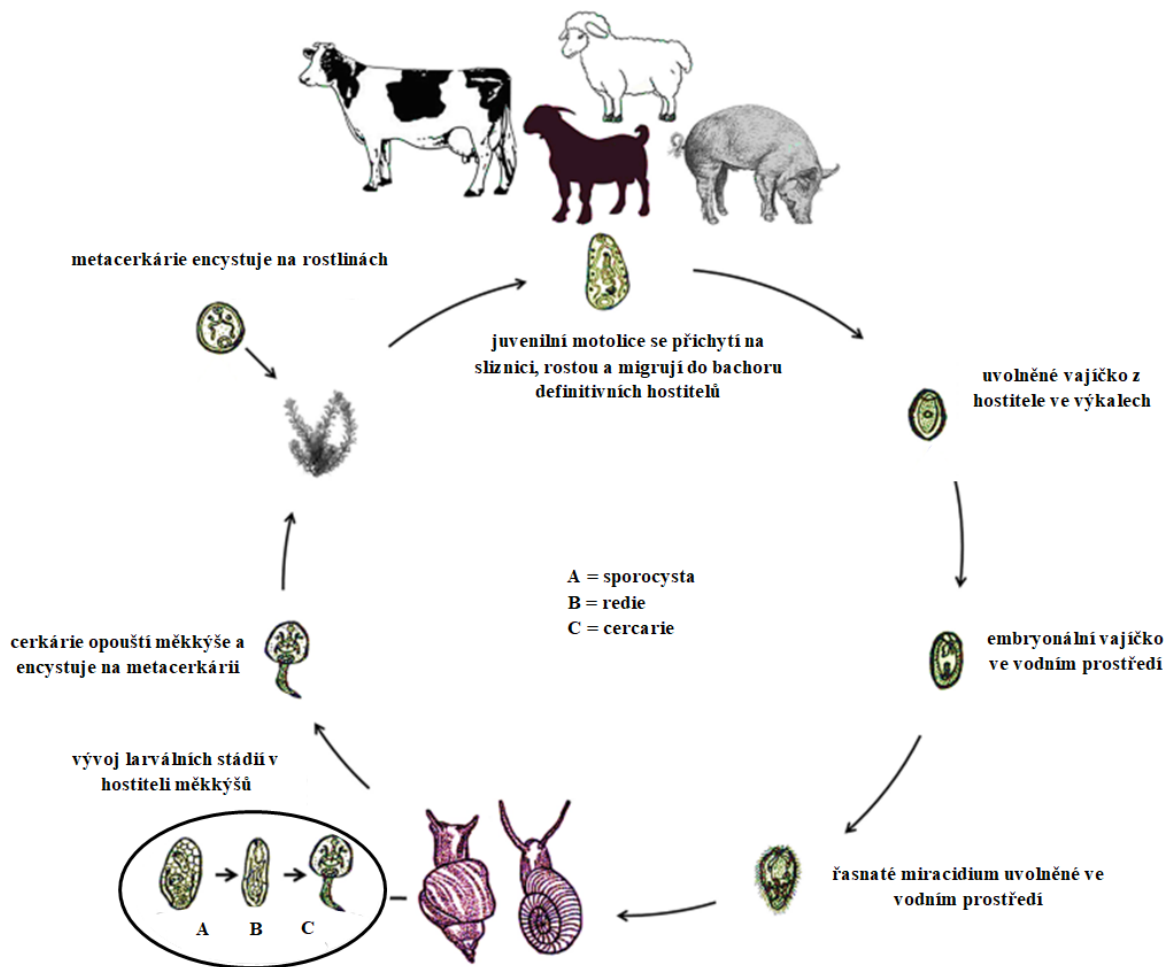
Třída trematoda (motolice) jsou kosmopolitně rozšířeny (Horák a Scholz, 1998), infikují přežvýkavce a zahrnují řadu různých druhů z čeledi *Paramphistomidae* (Gunathilaka et al., 2018; Havrdová et al., 2023).

Do čeledi *Paramphistomidae* patří například rod *Paramphistomum*, *Calicophoron*, *Cotylophoron*, *Ceylonocotyle*, *Gastrothylax*, *Fischoederius*, *Carmyerius*, *Gastrodiscus* a *Pseudodiscus* (Zhao et al., 2017; Kotze et al., 2020), nicméně nejčastějšími zástupci jsou *Fasciola hepatica* a *Calicophoron daubneyi* (Volf et al., 2007; Torres-Acosta et al., 2012; Havrdová et al., 2023).

Trematody mají složitý, často nepřímý vývojový cyklus a u většiny jsou mezihostiteli vodní plži (obrázek 2; Volf et al., 2007). Trematody infikují žlučovody, gastrointestinální trakt či játra hostitele (Swellengrebel et Serman, 1961). Zájem o paramfistomy byl v minulosti omezen na tropy a subtropy, protože tato skupina byla považována za relativně nepatogenní a v mírných oblastech nedůležitá, nicméně trematody mají obrovský dopad na produktivitu HZ tím, že ovlivňují rychlost růstu, plodnost, kvalitu masa, produkci vlny nebo

mléka a v některých případech jsou zodpovědné i za smrt jedince (Spence et al., 1992, 1996). V subtropických a tropických oblastech vede infekce k ekonomickým ztrátám souvisejícím s úmrtností a nízkou produktivitou (Rieu et al., 2007; Gunathilaka et al., 2018). Obecně jsou trematody považovány za klinicky významné pouze tehdy, když jsou přežvýkavci při pastvě vystaveni masivní zátěži infekčních stádií (de Waal et al., 2010; Mason et al., 2012).

**Obrázek 2. Vývojový cyklus trematod, *C. daubneyi* (Tandon et al., 2019, upraveno)**



Pohyblivé řasnaté miracidie, které se líhnou z vajíček pocházejících z výkalů infikovaného hostitele, dále infikují obojživelníky nebo vodní plže (Mason et al., 2012). Zde se rozmnožují nepohlavně a vyvinou se v cercárie. Ty jsou vylučovány nepřetržitě až jeden rok a ve vegetaci se vyvinou do encystovaných metacerkárií. Encystované metacerkárie vstupují do definitivního hostitele požitím infikované potravy (de Waal, 2010). V juvenilním stádiu se paraziti nejprve dostanou do tenkého střeva a živí se střevní sliznicí. Jak rostou, migrují vzhůru do retikula a bachoru, kde žijí v dospělosti a vylučují vajíčka do prostředí spolu s výkaly hostitele (González-Warleta et al., 2013). V hostiteli dochází k pohlavnímu



rozmnožování jedinců (Charlier et al., 2014). Trematody mají dobře vyvinutou trávicí soustavou s přísavnými orgány a jejich potravou je střevní obsah hostitele, krev nebo tkáňová tekutina (Charlier et al., 2014; Staňková, 2011). Vajíčka trematod dosahují různých velikostí v rozmezí 130 - 150 × 60 - 90 μm, jsou oválného tvaru a vyplněny granulovaným žlutohnědým (*F. hepatica*; Taylor et al., 2007) průhledným (*C. daubneyi*; Rieu et al., 2007) až zlatavým obsahem (*S. mansoni*; Attwood et al., 2002). Dospělci mají zploštělé listovité tělo o velikosti 20 – 30 mm na délku a 13 mm na šířku (Morgan et Hawkins, 1951). Na těle trematod lze rozeznat viditelné rozvětvení střeva a dělohy. Na kutikule motolic se nacházejí trny, které při parazitické infekci hostiteli způsobují poškození orgánů (Taylor et al., 2007; Staňková, 2011).

Ve většině evropských zemí jsou významné letní nákazy a nárůst metacerkárií je zaznamenáván každoročně od srpna do října (Kotrlá et al. 1984; Taylor et al., 2005). Nárůst je pak nejvyšší v letech, kdy jsou vysoké letní srážky. Zimní infekce jsou méně významné, ale občas mohou vést k výskytu velkého počtu metacerkárií koncem jara a počátkem léta, zejména pokud předchozí měsíce byly deštivé. V teplejších oblastech, jako je například jih USA nebo Austrálie, má průběh životního cyklu odlišnou sezónnost, ale epidemiologické principy zůstávají stejné (Taylor et al., 2005; Phiri et al., 2007).

Patogenita trematod má dvě fáze. V první fázi dochází k migraci jedinců do jaterního parenchymu, to je spojeno s poškozením jater a krvácením. V druhé fázi se parazit nachází ve žlučovodech, které následně poškozuje. Díky trnům dokáže rozkládat hemoglobin hostitele (Taylor et al., 2005). Patogenita je do značné míry ovlivněna počtem metacerkárií, stádiem vývoje parazita, věkem a stavem imunitního systému hostitele (Taylor et al., 2005; de Waal, 2010). Je prokázáno, že ovce jsou velice citlivé na infekci způsobenou motolicí *F. hepatica*, a to i když je infekční dávka velmi nízká (Chauvin et al., 2001).

*Fasciola hepatica* může infikovat celou řadu savců, včetně koní, oslů, jelenů, prasat a králíků a zubrů (Samuel et al., 2001). Přestože fasciolóza je relativně dobře prostudována, chybí studie o interakcích mezi hostiteli na molekulární úrovni (Phiri et al., 2007). Fasciolózu lze rozdělit na akutní, subakutní a chronickou. Akutní fáze tohoto onemocnění je typická pro ovce, zatímco chronická fasciolóza je běžnější u skotu (Alvarez-Rojas et al., 2015). Akutní infekce je méně častá a nastane, pokud dojde k požití velkého množství (alespoň 2000) metacerkárií. Celkový průběh infekce trvá 1 – 6 týdnů (Dow et al., 1968) a vede k těžkému poškození jaterního parenchymu a masivnímu krvácení, v důsledku migrace nezralých motolic v játrech a rupturou cév (Taylor et al., 2005). Morfologicky lze v průběhu prvních dvou týdnů po infekci na játrech pozorovat krvavé stopy v parenchymu, a to zejména v

levém laloku. Ve čtvrtém až pátém týdnu po infekci dochází ke krvácení (Behm et Sangster, 1999; Bowman, 2009). V případě subakutní infekce jsou metacerkárie hostitelem přijímány kontinuálně, některé dospějí a proniknou do žlučovodu a dojde k zánětu, další migrují v játrech, kde poškozují parenchym, ale ne tak závažně jako při akutní infekci (Dargie et Berry, 1979). Játra jsou zvětšená a na povrchu i uvnitř jsou znatelné četné nekrotické a hemoragické plochy. Krvácení je ve tkáni viditelné, nicméně k ruptuře tkáně většinou nedochází (Samuel et al., 2001; Phiri et al., 2007). Subakutní infekce probíhá 6 až 10 týdnů po pozření 500 – 1500 ks metacerkárií a většinou se vyskytuje na podzim a v zimním období. Pokud není infekce léčena, může vést i k úhynu jedince a je doprovázena příznaky – úbytek hmotnosti, bledost sliznic, zvětšená játra a často je viditelný podčelistní otok (známý jako „bottle jaw“) a ascites (hromadění tekutiny v dutině břišní; Taylor et al., 2005; Kotrlá et al., 1984). Chronická fasciolóza je nejčastější a většinou se vyskytuje na přelomu zimy a jara (Kozat et Denizhan, 2010). Průběh infekce trvá 4 – 5 měsíců po pozření mírného počtu metacerkárií (200 – 500). Hlavním patologickým projevem je anémie a hypoalbuminémie. Zvíře může ztratit více než 0,5 ml krve na jednoho dospělého *F. hepatica* ve žlučovodu za den. Dochází tak k úniku plazmatických proteinů skrz poničenou stěnu žlučovodu (Taylor et al., 2005). Po zranění ve žlučovodu zde dospělci mohou přetrvávat i několik let. Rozvine se fibróza a skleróza tkáně (opět výraznější u skotu než u ovcí; Roberts, 1986). U infikovaného jedince se snižuje produktivita, zhoršuje kondice (Behm a Sangster, 1999), jedinec je anemický (Galtier et Alvinerie, 1996; Roberts 1986), a může trpět také hypoalbuminemií nebo hypoglykemií (Chauvin et al., 2001; Phiri et al. 2007).

Rostoucí prevalence *C. daubneyi* a sporadické klinické případy paramfistomózy jsou hlášené po celém světě, Českou republiku nevyjímaje (Mage et al., 2002; Foster et al., 2007; Havrdová et al., 2023). Lze předpokládat, že *C. daubneyi* je nyní dominantním druhem motolice bachorové v celé Evropě (Murphy et al., 2008; Gordon et al., 2013; Zintl et al., 2014; O’Shaughnessy et al., 2017) s významným klinickým významem u přežvýkavců (Szmidt-Adjidé et al., 2000). Nárůst výskytu tohoto parazitárního onemocnění může být podpořen několika faktory, jako jsou například klimatické změny, zvýšená informovanost o diagnóze tohoto onemocnění a další (Iglesias-Piñeiro et al., 2016). Vývojový cyklus *C. daubneyi* je nepřímý a velmi podobný životnímu cyklu *F. hepatica*, ale s výjimkou napadeného orgánu (Havrdová et al., 2023). Juvenilní formy *C. daubneyi* kolonizují duodenum po dobu několika týdnů nebo měsíců a vývojová stádia se nacházejí přichycené na sliznici pomocí svých zadních přísavek (Gonzalez-Warleta et al., 2013; Iglesias-Piñeiro et al., 2016). Po dosažení velikosti 1 – 3 mm migrují do bachoru, kde se dospívají (Deplazes et al.,

2016). Morfologický rozdíl mezi vajíčky *C. daubneyi* a *F. hepatica* spočívá v tom, že *C. daubneyi* má vajíčka bezbarvá a dozrávají ve vnějším prostředí za teploty 25 – 27 °C (Jones et al., 2017). Z tohoto důvodu dochází mezi těmito dvěma parazity ke konkurenci, jakmile vstoupí do těla meziphostitele (Sindičić et al., 2017; Wenzel et al., 2019). Dospělci *C. daubneyi* jsou hruškovitého tvaru, bílé (popřípadě růžové) barvy a dosahují velikosti 0,5 – 1,0 cm na délku. V bachorové stěně hostitele jsou přichycené zadním svalovým acetabulem, jejich střevo je rozdvojené a mají ústní otvor, který vyčnívá do bachoru. Nezralé formy jsou jasně červené o velikosti 2 – 3 mm dlouhé (Jones et al., 2017; Sirbu et al., 2020; Morariu et al., 2023).

### 2.2.3 Cestoda

Cestody (tasemnice) jsou známé svým kosmopolitním rozšířením a napadají střevní trakt sudokopytníků (Jyoti et Juyal, 2014; Ribeiro et al., 2023) i lichokopytníků (Burčáková et al., 2023; Mesafint et al., 2023).

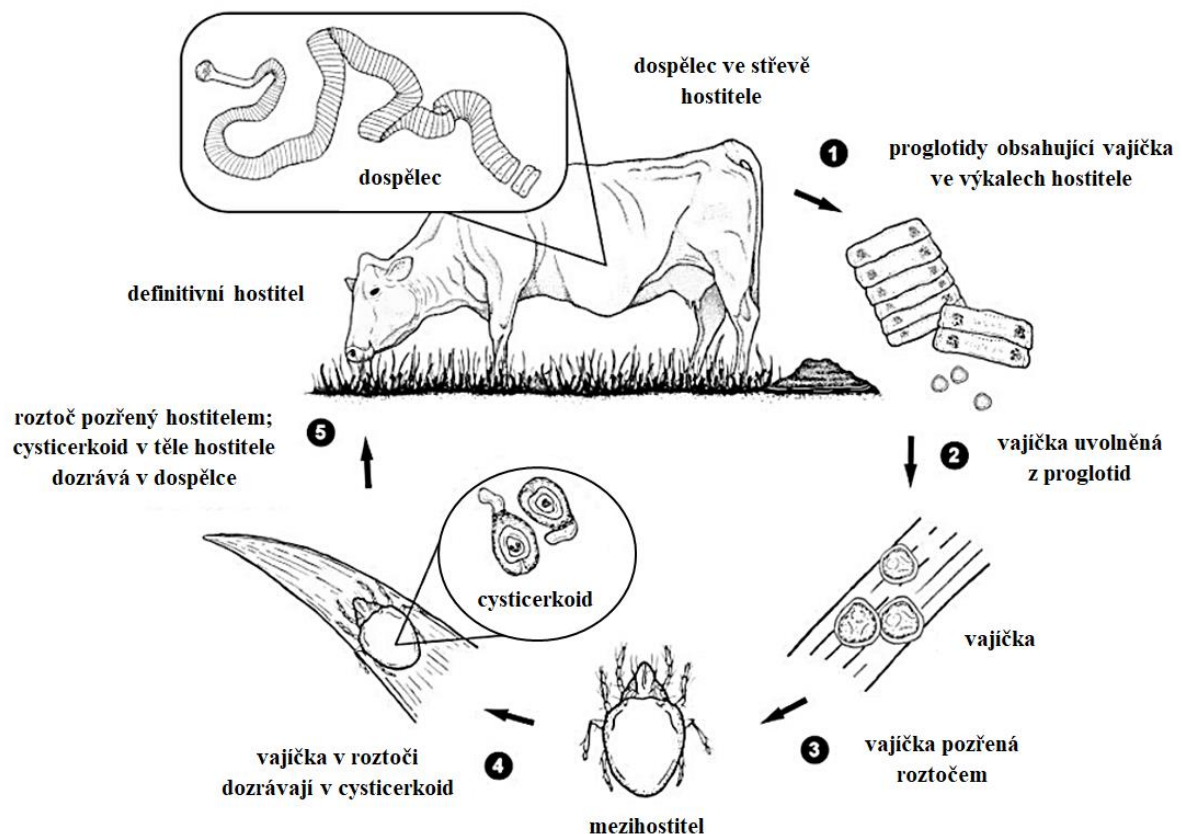
Moniezióza je onemocnění způsobené cestody z rodu *Moniezia* sp. a pro přežvýkavce v rámci rodu je nejvýznamnější druh *M. expansa* (Iacob et al., 2020; Kelly et al., 2021; Mohamed et al., 2023) a *M. benedeni* (Iacob et al., 2020; Ribeiro et al., 2023). Infekce mohou způsobit vážné poškození tenkého střeva, zácpu, střevní neprůchodnost a smrt jedinců (Ribeiro et al., 2023). U lichokopytníků je parazit přichycen ve slepém nebo tlusém střevě (Mesafint et al., 2023) a nejčastější cestodou je *Anoplocephala perfoliata* (tasemnice koňská) nebo *A. magna* (Burčáková et al., 2023; Ilić et al., 2023). Cestody v těle hostitele nemigrují, jsou přichyceny na povrchu sliznice střeva a při silnější infekci se mohou shlukovat do trsů (Adeba et al., 2022). Oproti rodu *Taenia* sp., kde v gastrointestinálním traktu hostitele je přichycen jen jeden jedinec (Arrabal et al., 2023), u rodu *Moniezia* sp. (Mohamed et al., 2023) může být ve střevní sliznici neomezený počet jedinců. Predilekční místo je ileocékální chlopně, kde vznikají ložisková poškození, která mohou vést k perforaci střevní stěny a až k úhynu hostitele. V některých případech dochází k poškození stěny a následnému ovlivnění motoriky střeva v oblasti ileocékální chlopně (Diop et al., 2015; Nagarajan et al., 2022). Výsledkem jsou střevní intususcepce, intramurální hematomy, intestinální obturace a jiné střevní komplikace. U koní často dochází k progresivnímu hubnutí a většina jedinců trpí anémií (Engell-Sørensen et al., 2018; Kelly et al., 2021).

Morfologicky lze dospělé cestody rozdělit na článkovité tělo s hlavou (skolex). Články (proglotidy/segmenty) vyrůstají těsně za skolexem a mohou obsahovat až 30 000 vajíček a vytvářejí řetězec zvaný strobila, který roste po celý život jedince (David et Ap, 2006). U

Cestod je patrný pohlavní dimorfismus (Scholz et al., 2018, 2022; Mohamed et al., 2023). Pohlavní ústrojí mají podobné trematodám, nicméně velikosti vitálních žláz jsou u cestod výrazně menší a děloha končí ve společné genitální síni (Kassai, 1999). Každý dozrálý segment poté obsahuje jednu nebo dvě sady samčích i samičích pohlavních orgánů. Na skolexu lze detekovat přísavky/přísavné štěrby nebo rostellum (chobotek, válcovitého či kuželovitého tvaru) vybavené háčky (Jíra, 1998). Ve vajíčku se vyvíjí larva (onkosféra, koracidium, lycophora), která i) opouští vajíčko ve vodě a je schopna pohybu nebo ii) opouští vajíčko až v trávicí soustavě mezihostitele (Ryšavý et al., 1988).

Zástupci třídy cestoda mají velmi složité a nepřímé vývojové cykly (Ribeiro et al., 2023) a dle potravního řetězce se liší i mezihostitelé (obrázek 3; Scholz et al., 2018, 2022).

**Obrázek 3. Vývojový cyklus *M. benedeni* (Iacob et al., 2020; upraveno)**



Definitivní hostitel se nejčastěji infikuje kontaminovanou potravou (Scholz et al., 2022; Nagarajan et al., 2022). V případě infekce *A. perfoliata* jsou častými mezihostiteli roztoči tzv. pancířníci, kteří jsou důležitou součástí pastevního ekosystému a půdního potravního řetězce. K infekci lichokopytníka dojde zpravidla spolknutím pancířníka spolu s cysticerkoidem nebo pozřením kontaminované potravy (seno, tráva) obsahující vajíčka *A. perfoliata* (Morgan et al., 2005). Vajíčka *A. perfoliata* ve výkalech dosahují velikosti 65 – 80  $\mu\text{m}$ . V mezihostiteli se z

vajíčka uvolní onkosféra, která se v tělní dutině vyvíjí 1 – 4 měsíce do infekčního stadia – cysticerkoid. V rozmezí 6 – 8 týdnů se v těle lichokopytníka z vajíčka vyvine dospělý jedinec (Nielsen et al., 2022). Dospělá *A. perfoliata* má na délku 3 – 8 cm a 1,5 – 2 cm na šířku, kulovitý skolex je vybaven čtyřmi kruhovými přísavkami, za kterými jsou kaudální lalůčky, označované jako lapety, které představují charakteristický morfologický znak (Nielsen et al., 2022; Ribeiro et al., 2023).

*Moniezia expansa* dosahuje délky až 6 m (Ryšavý et al., 1988; Hurisa et al., 2021) a infikuje střeva přežvýkavců (Hurisa et al., 2021). Mezihostitelé jsou zemní roztoči. Vajíčka jsou o velikosti 50 – 60 µm (Morgan et Hawkins, 1951). Moniezióza u HZ může být způsobena podobným druhem, konkrétně *M. benedeni*, lišící se morfologií vajíček, která u tohoto druhu mají čtyřúhelníkový tvar o velikosti 80 – 90 µm a skolex není opatřen háčky, ale přísavkou (Nagarajan et al., 2022).

### **2.3 Metody detekce helmintů u hospodářských zvířat, diagnostika parazitárních onemocnění**

Sledování zdravotního stavu HZ v oblasti parazitárních infekcí přispívá ke zdravému chovu, který by měl prosperovat hlavně z hlediska zdraví a welfare zvířat ve všech chovech (Kuemmerle et al., 2010; Sueur et al., 2011; Benecke, 2015; Hall, 2018).

Pro kontrolu a diagnostiku helmintů je nezbytná znalost vývojových cyklů u sledovaných jedinců a v praxi stále zůstávají nejvíce využívané koprologické metody (Barda et al., 2014), jako je flotace (Barda et al., 2014) nebo sedimentace (Zintl et al., 2014). Vajíčka jsou vylučována dospělými jedinci z organismu hostitele společně s výkaly (Barda et al., 2014).

Flotace je metoda založená na detekci lehkých vajíček hlístic a prvoků (Modrý et al., 2015). Sedimentací je možné detekovat těžká vajíčka trematod, protože metoda je založena na gravitaci a hustotě roztoku (Zintl et al., 2014). Nicméně v praxi lze pro detekci nematod účinně aplikovat systém FAMACHA ("FAfa MAlan CHArt"; Malan et al. 2001; van Wyk et Bath, 2002). Systém FAMACHA vychází z barevné tabulky, která se používá k posouzení anémie zvířete ve srovnání s barvou spojivky jedince a poskytuje tak hodnocení relativní anémie jakékoli příčiny. Každý chovatel si takto může diagnostikovat parazitární napadení jedinců ve stádě samostatně (Olah et al., 2015). Metodika tedy v základu nevyžaduje žádné specifikované odběry vzorků a byla speciálně vyvinuta pro individuální identifikaci zvířat vyžadujících léčbu, aby snížila selekční tlak na antihelmintickou rezistenci způsobenou obvyklou, častou profylaktickou léčbou všech zvířat ve skupině (van Wyk et Bath, 2002; Tandon et Kaplan, 2004; Walker et al., 2013). Tato metoda ale vyžaduje časté hodnocení s

doporučeným rozvrhem kontrol v 7 – 10 denních intervalech. Jakmile je anémie zjištěna v malé monitorovací skupině, měla by být neprodleně zahájena léčba (van Wyk et Bath, 2002). Pro pravidelnou kontrolu a aplikaci této metodiky v praxi, je ale vyžadován významný vstup pracovní síly, systém funguje efektivně, pokud je počet zvířat malý nebo je k dispozici dostatek pracovních sil. FAMACHA je využívána v chovu skotu, ovcí a koz za situace, kdy lze tyto podmínky splnit. Kromě dramatického snížení podílu podávaných anthelmintických ošetření lze identifikovat a utratit zvířata "recidivisty", protože existuje vysoká dědičnost skóre FAMACHA (Riley et van Wyk, 2009; Mahieu et al., 2020).

Pro přesnější diagnózu jsou nicméně doplňující koprologické metody nezbytné a chovatel je v této fázi často odkázán na odbornou pomoc a laboratorní metody, kde je například možno využít i kvantitativní metodu dle McMaster (Wymann et al., 2008), LDA (Larval Development Assay; Carnea et al., 2007), EHA (Egg Hatch Assay; Coles et al., 2006), anebo metodu FECRT (Fecal Egg Count Reduction test; Torgerson et al., 2005). Pomocí metody FECRT lze vyjádřit redukci počtu parazitických vývojových stádií po použití VLP (Mooney et al. 2009; Zintl et al. 2014; de Souza Rodrigues et al. 2017).

Laboratorně, lze kultivovat larvy již zmíněnou metodou pomocí LDA testu (Carnea et al. 2007), ale četné rody a druhy těchto hlístic postrádají výrazné morfologické znaky a v některých případech není možné smíšené populace udržovat společně v kultuře kvůli různým požadavkům na podmínky kultivace (Roeber et Kahn, 2014, Roeber et al., 2013). Metoda LDA je bez předchozích zkušeností komplikovaná a časově náročná (Lind et al., 2005).

Pro laboratorní kultivace larev je často využívána metoda EHA nebo také EHT (Egg Hatch Test; Coles et al., 2006). Tato metoda patří do skupiny *in vitro* a má největší využití právě při sledování rezistence na konkrétní VLP (Kotze et al., 2004). Jedná se o test, který zjišťuje účinnost anthelmintik na vajíčka. Vajíčka by měla být zpracována do 3 hodin po odběru nebo anaerobně konzervována, jelikož s narůstajícím časem se jejich citlivost k léčivu snižuje. Vajíčka se inkubují v roztoku anthelmintika. Po uplynutí 48 h se přidává Lugolův roztok, který zastaví další líhnutí, a test se hodnotí pod mikroskopem. Sleduje se, jaké množství vajíček se vyvinulo v larvu a kolik vajíček zůstalo nevylihnutých (Coles et al., 2006, Kotze et al., 2004).

Milk *Ostertagia ostertagi* (MOO ELISA; Weller et al., 1996; Mavrot et al., 2015; Baptista, 2015) je užitečným testem k diagnostice *O. ostertagi* u stád mléčných zvířat. Tento test stáda hodnotí úroveň vystavení jedince *O. ostertagi* kvantifikací množství protilátek v hromadném vzorku mléka. Pokud je úroveň expozice stanovena jako vysoká, *O. ostertagi* bude mít

pravděpodobně významný dopad na produktivitu celého stáda (Verschave et al., 2014; Charlier et al., 2018).

Na konci 90. let několik studií poukázalo na to, že morfologická identifikace nebyla dostatečně účinná při určování druhu nematod (Blaxter, 1998; Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1985), trematod (O'Shaughnessy et al., 2017) a cestod (Mohamed et al., 2023) a jako nejspolehlivější metodu pro detekci parazitárních helmintů byla vyhodnocena molekulární metoda – Polymerase Chain Reaction (PCR). Studie Gasser et al., (2008) apeluje na fakt, že pro přesnou identifikaci nematody je nezbytný výběr vhodné oblasti DNA (genetického markeru nebo lokusu). Pro identifikaci nematod tak bylo vyvinuto několik specifických genů - mitochondriální lokus cytochromu b (mtDNA<sub>cytb</sub>; Mattiucci et al., 2003), gen kódující mitochondriální cytochromoxidázu 2 (COX2; Valentini et al., 2006) a mitochondriální cytochromoxidázu 1 (COXI; Blouin, 2002), ribozomální RNA malé (ssrRNA) a velké podjednotky (lrrRNA; Hu et al., 2001). Dále byly vybrány další geny, jako je interní transkribovaný spacer 1 (ITS1) rDNA k identifikaci *Strongilidae* a *Anisakidae* (Roeber et al., 2013), ITS2 rDNA (Chen et al., 2008, Nadler et al., 2000, Zhu et al., 1998). Všechny tyto metody založené na PCR se běžně používají i přesto, že je k dispozici jen málo automatizovaných procesů. Studie Ahmed et al., (2011) zaměřená na identifikaci parazitů GIH takový proces popsala a porovnála několik postupů PCR. Navíc techniky založené na PCR umožňují pouze nízkou propustnost identifikace a jsou tedy časově náročné (Seesao et al., 2017). S rozvojem molekulárních postupů byly zveřejněny studie, které sdílely databáze nematod online (Elsworth et al., 2011; Parkinson et al., 2004). Webové databáze pro analýzu transkriptomu nematod lze také využít jako zdroj informací či výzkumný nástroj pro biologii hlístic, objevování léků a návrh vakcín, například „WormBase“ (www.wormbase.org; Seesao et al., 2017; Marchiondo et al., 2019) je mezinárodní konsorcium biologů a vědců, kteří se věnují výzkumné komunitě a poskytují přesné, aktuální a dostupné informace týkající se genetiky, genomiky a biologie. Vedle těchto hlavních webových stránek databáze nematod je k dispozici i mnoho menších databází věnovaných specifitějšímu použití, nebo spíše jako průvodce výkladem taxonomické literatury, jako je například databáze WoRMS (World Register of Marine Species, www.marinespecies.org; Seesao et al., 2017; Marchiondo et al., 2019). V budoucnu budou data vydávána výkonnými nově vznikajícími technologiemi vyžadovat další a další vývoj databází. Proto by měl být stále více podporován sdílený přístup k databázím a bioinformativním kanálům analýzy (Marchiondo et al., 2019). Pro trematody a cestody tvoří PCR identifikace též podstatnou část laboratorních výzkumů (Nagarajan et al., 2022; Havrdová et al., 2023).

## 2.4 Terapeutická léčba a prevence

V rámci terapeutické léčby je ovlivněna patogenita jednotlivým onemocněním, které je závislé na druhu a počtu parazitů, dále na jejich virulenci a lokalizaci v hostiteli a v neposlední řadě na celkovém zdravotním stavu hostitele (Novák et Malá, 2019).

Výskyt helmintů je ovlivněn lokalitou a dynamikou vývojových cyklů v průběhu ročního období, nicméně nejvíce vnímavá jsou mláďata HZ (Tittl et al Novák, 2009; Davies et Wales, 2019). Dospělý jedinec je odolnější a parazitární infekce má zpravidla subklinický průběh a jedinec se tak stane infekčním pro ostatní členy stáda (Jori et al., 2021), tím jsou často způsobeny velké ekonomické škody na chovech HZ (Huber et al., 2022). Aby bylo sníženo riziko nákazy, měla by být dodržována zoohygienická pravidla (Skládanka et al., 2010; Maruta et al., 2023). Jedním z řešení je odstraňování výkalů z pastvin, popřípadě rotace pastevní plochy (Hu et al., 2016). Rotace pastvin je nejvhodnější u stád HZ, která nejsou vnímavá na stejné druhy parazitů a je zde možnost na pastvině v průběhu roku střídat sudokopytníky a lichokopytníky (Hennessy et Rault 2023; Westers et al., 2016; Bader et al., 2017). Nejvíce kontaminovaná je pastvina v prvním týdnu pasení, nicméně v každém chovu není možné z hlediska geografických, sociálních či ekonomických podmínek metodu rotace využít (Skládanka et al., 2010; Jori et al., 2021; Hennessy et Rault 2023). Významnou roli zde hraje i výživa HZ. Jedinci, kteří nejsou správně krmeni, nemají dostatečné schopnosti se parazitární infekci ubránit (Jori et al., 2021). Anthelmintika se nepoužívají jen pro léčbu již infikovaných kusů, ale také jako profylaxe před možnou parazitární infekcí HZ, nicméně z hlediska vývoje imunity HZ a vzniku možné rezistence na VLP (viz kapitola 2.5), je možné profylaxi rozdělit na dva typy. První forma profylaxe je řešena převážně VLP, druhou možností jsou zoohygienická opatření (Tittl et Novák, 2009; Hennessy et Rault 2023).

Účinné preventivní programy se liší v závislosti na prostředí a typu konkrétního podniku a dále na epidemiologii infekcí (Jori et al., 2021). Vhodná strategie zahrnuje programy řízení HZ a monitoring zdravotního stavu jedinců ve stádě. Alternativní metody z hlediska cílené léčby anthelmintiky mohou být účinné za dodržení kontrolního programu – koprologické vyšetření, FAMACHA, kontrola výkalů a zdravotního stavu či kondice jedince (Riley et al., 2009; Olah et al., 2015) a vzhledem k možnosti významných ekonomických ztrát, způsobených úmrtností jedinců ve stádě je primární vhodná a včasná léčba anthelmintiky (Novák et Malá 2019). Léčba helmintózy doposud závisí především na použití anthelmintik, která jsou specifická pro konkrétní druhy parazitárních infekcí (Huber et al., 2022; Hennessy et Rault 2023).



## 2.4.1 Anthelmintika

Anthelmintika jsou syntetického či biosyntetického původu a tvoří skupinu léčiv určených pro léčbu helmintóz (Lamka et Ducháček, 2008; Clarke et al., 2019).

I když je význam anthelmintik v humánní i veterinární medicíně zřejmý, představují nové kontaminanty životního prostředí (Nixon et al., 2020; Martin et al., 2021). V prostředí jsou anthelmintika distribuována ve vodě a půdě v závislosti na jejich struktuře a vlastnostech (Epe et Kaminsky, 2013; Arnold et al., 2013). Anthelmintika mohou působit toxicky na necílové druhy, nicméně mají stále nezastupitelnou roli v humánní a veterinární medicíně (Bártíková et al., 2016; Lindrose et al., 2022; Vokřál et al., 2023).

Z hlediska účinnosti se anthelmintika dělí na antinematoda, antitrepatoda a anicestoda. V závislosti na mechanismu účinku, lze anthelmintika rozdělit dle chemické struktury (Abbott et al., 2004; Clarke et al., 2019) na benzimidazoly, makrocyclické laktony, imidazothiazoly, tetrahydropyrimidiny, aceto-aminonitrilové deriváty a několik dalších tříd (Vokřál et al., 2023). V posledních deseti letech byly vyvinuty nové tři třídy anthelmintik, a to cyklické oktadepsipeptidy, deriváty aminoacetonitrilu a spiroindoly (Epe a Kaminsky, 2013; Prchal et al., 2016; Nixon et al., 2020). Je důležité poznamenat, že anthelmintika z různých tříd jsou často kombinována, především ve veterinární medicíně, pro zvýšení účinnosti a rozšíření cílového anthelmintického spektra (Nixon et al., 2020; de Souza et Guimarães, 2022).

### 2.4.1.1 Benzimidazoly

Benzimidazoly (BZ) patří mezi nejvíce zastoupenou skupinu cílenou na nematody, nicméně mohou být aplikovány i proti trematodám či cestodám (Babić et al., 2018; Porto et al., 2019).

Z hlediska účinnosti lze BZ aplikovat na všechna vývojová stádia včetně vajíček i dospělých jedinců nematod (Pavlović et al., 2018; Venancio et al., 2021). Benzimidazoly nezatěžují organismus jedince a jsou hostitelem málo metabolizovány, nicméně některé formy není možné aplikovat lakujícím/jatečným jedincům určeným pro lidskou spotřebu (Babić et al., 2018; Pavlović et al., 2018).

Mechanismus účinku je založen na schopnosti zabránit polymeraci a prodlužování mikrotubulů navázáním na  $\beta$ -tubulin nematody. Tím je narušena tvorba mitotického vřeténka (nelze dokončit buněčné dělení) a funkce cytoplazmatických mikrotubulů, sloužících pro příjem potravy parazita (Wagil et al., 2015). Odčerpáním energetické zásoby parazita (glykogenu) a nedostatku glukózy, dojde k úhynu organismu, a protože BZ se vážou převážně na mikrotubuly parazita, nejsou často přítomny nežádoucí účinky způsobené aplikací léčiv

(Navrátilová et al., 2021; Vokřál et al., 2023). Nejvíce využívané v rámci terapeutické léčby jsou BZ s účinnou složkou albendazol (Albex®, Pharmed s.r.o., Česká republika), flubendazol (Flumixan®, Ceva phylaxia, Maďarsko), mebendazol (Wermox®, Janssen-Cilag s.r.o., Česká republika), fenbendazol (Helmigal®, Pharmagal spol. s r.o., Slovensko; Abbott et al., 2004; Wagil et al., 2015; Babić et al., 2018; Lindrose et al., 2022).

#### **2.4.1.2 Makrocyclické laktony**

Druhou základní třídou anthelmintik jsou makrocyclické laktony, zástupci jsou účinné proti nematodům a některým ektoparazitům, ale nejsou účinné v terapii na trematody a cestody (Crump et Omura, 2011; Martin et al., 2021).

Makrocyclické laktony patří mezi biosyntetické látky, které vznikají kvašením aktinomycety rodu *Streptomyces avermitilis* a lze je rozdělit do dvou podskupin – avermektiny a milbemyciny (Prichard et al., 2012; Martin et al., 2021). Makrocyclické laktony mohou přejít do mléka a metabolizují se v játrech (Lifschitz et al., 2017). Makrocyclické laktony díky své vysoké lipofilně přetrvávají v hostitelské tkáni déle než benzimidazoly (Cobb et Boeckh, 2009; Vokřál et al., 2019).

Mechanismus účinku je spojován se zvýšeným průnikem chloridových iontů do neuronu a to má za následek hyperpolarizaci membrán a tím je snížena transmise nervových impulzů. Inhibicí neurotransmise dojde k paralýze parazita a jeho následnému úhynu (Vokřál et al., 2019). Makrocyclické laktony působí jako alosterické modulátory glutamátových chloridových kanálů, z nichž každý otevírá tyto kanály v různých tkáních parazita. Nematodům jsou zasaženy faryngální svaly, motorické nervy, reprodukční trakt a vylučovací/sekreční póry. U hmyzu a korýšů jsou postiženy svaly a nervy (Martin et al., 2021). Protože se u savců nevyskytují glutamátové receptory, bývá často mechanismus účinku připisován právě glutamátovým receptorům (Lifschitz et al., 2017; de Souza et Guimarães, 2022). Nejznámějším zástupcem makrocyclických laktonů je Ivermectin (IVM; Ivomec®, Merial, Francie) z řady avermektinů, který byl poprvé uveden na trh v roce 1981 a stále představuje základní anthelmintickou terapii u HZ po celém světě (Crump et Omura, 2011). Dále se do této skupiny řadí z hlediska anthelmintik pro HZ doramektin (Dectomax®, Eli Lilly Benelux S.A., Belgie) a eprinomektin (Eprizero®, Norbrook Laboratories Limited, Irsko; de Souza et Guimarães, 2022). Mezi milbemyciny se řadí moxidetin využívaný při léčbě parazitóz například psů a koček (Prichard et al., 2012). Milbemyciny jsou oproti avermektinům lipofilnější a přetrvávají tak delší dobu v organismu (Vokřál et al., 2019; Babić et al., 2022).

### 2.4.1.3 Imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny

Imidazothiazoly, tetrahydropyrimidiny jsou účinné pouze proti nematodům u HZ a jsou dostupné v různých aplikačních formách s účinností na vývojová stadia larev a dospělce (McKellar, 1997; Harder, 2002; Clarke et al., 2019; Vokřál et al., 2023).

Imidazothiazoly se rychle vstřebávají (do 72 hod; Lumaret et Errouissi, 2002) a jsou vylučovány močí ve formě metabolitů (Adams, 1978; Paulson et Feil, 1996;), nicméně metabolismus probíhá v játrech (Fernández et al., 1998; Myers et al., 2021).

Principem mechanismu účinku je navázání na nikotinové receptory parazita. Imidazothiazoly jsou agonisty nikotinových receptorů, zvyšují vodivost membrány a tím pronikají do kationtových kanálů a způsobují tak paralýzu parazita, který je následně z hostitele vyloučen (Myers et al., 2021). Levamisol (Codiverm®, Kela NV, Belgie), představený v roce 1965 a je v současné době na trhu, je zástupcem řady imidazothiazolů. Selektivně se zaměřuje na nikotinový acetylcholinový receptor ve svalech nematoda, což vede ke kontrakci a spastické paralýze (Martin, 1997; Vokřál et al., 2023).

Tetrahydropyrimidiny jsou blízké příbuzné imidazothiazolům a jejich aplikace je nejběžnější u psů a koček. Skupiny zahrnují tři zástupce, pro tetrahydropyrimidiny – pyrantel, morantel, oxantel (Nixon et al., 2020). Tito zástupci mají princip mechanismus účinku shodný s levamisolem (Martin, 1997), způsobují depolarizaci nervové ploténky a následnou paralýzu parazita. Tetrahydropyrimidiny jsou dostupné v perorální aplikaci jako embonátová, pamoátová a tartrátová sůl používaná k léčbě helmintóz u psů, koček, HZ anebo lidí (Clarke et al., 2019; Nixon et al., 2020; Qian et al., 2022). V neposlední řadě sem patří tribendimidin, který má stejný mechanismus účinku jako imidazothiazoly a tetrahydropyrimidiny, nicméně tribendimidin se v Číně používá i k léčbě nematod a trematod u lidí (Hu et al., 2009; Qian et al., 2022).

### 2.4.1.4 Aceto-aminonitrilové deriváty

Aceto-aminonitrilových deriváty byly poprvé použity v roce 2010 ve Velké Británii a jsou určeny na léčbu nematodóz (Clarke et al., 2019).

Tyto deriváty působí jako specifický alosterický modulátor acetylcholinového receptoru MPTL-1 a způsobují tak depolarizaci a paralýzu svalových buněk parazita (Epe et Kaminsky, 2013) a mechanismus účinku je tedy podobný jako v případě imidazothiazolů. Menepantel je komerčně dostupný zástupce této třídy anthelmintik, který byl poprvé distribuován v roce 2010 ve Velké Británii a v současnosti ho lze aplikovat pouze k léčbě nematod u ovcí (Epe et

Kaminsky, 2013; Lifschitz et al., 2017). Během 3 – 4 dnů je vyloučen spolu s výkaly hostitele ve formě metabolitů (Karadzovska et al., 2009).

V současné době je vyvíjen lék Derquantel jako kompetitivní antagonist na nikotinové acetylcholinové receptory B-subtypu, který též způsobuje paralýzu, nicméně stejně jako žádná jiná nejnovější anthelmintika z této kategorie, není prozatím schálen pro humánní medicínu a dostupnost je omezená pouze pro testační/laboratorní účely (Vokřál et al., 2023).

#### **2.4.1.5 Pyrazinoisochinoliny**

Kromě již zmíněných tříd anthelmintik bylo před rokem 2000 využito v praxi několik dalších skupin, konkrétně – pyrazinoisochinoliny, salicylanilidy, sulfonamidy, organofosfáty a hexahydropyraziny (Nixon et al., 2020; Waechtler et al., 2023), nicméně nejdůležitější z těchto skupin jsou pyrazinoisochinoliny, které byly poprvé dostupné v roce 1975 (Waechtler et al., 2023).

V praxi HZ lze aplikovat dva zástupce praziquantel a epsiprantel s účinností na cestody a trematody, nicméně nejsou účinné proti nematodům. Aplikace epsiprantelu je omezena převážně na psy a kočky, ale praziquantel je možné aplikovat i HZ. Principem mechanismu účinku je navázání se na kanál TRPMPZQ  $Ca_{2+}$  a jeho homology tak způsobí zvýšení vstupu  $Ca_{2+}$  a narušení homeostázy  $Ca_{2+}$ . V konečné fázi tedy dojde ke svalové kontrakci a narušení tegumentálních částí (Waechtler et al., 2023). Pyrazinoisochinoliny jsou v hostiteli rychle metabolizovány na hydroxyderiváty a následně vylučovány močí (Andrews et al., 1983).

#### **2.4.1.6 Halogenované salicylanilidy a organofosfáty**

Halogenové salicylanilidy jsou účinné při léčbě helmintóz (v různém rozsahu působnosti) a ektoparazitům (Martin, 1997).

Zástupci mají proměnlivou aktivitu proti helmintům a ektoparazitům převážně u HZ, u kterých selektivně působí na parazita tak, že rozpojují oxidativní fosforylaci (Martin, 1997; Vokřál et al., 2019). Největší využití má closantel, rafoxanid, oxyklozanid a niklosamid. Halogenované salicylanilidy mají nejvyšší účinnost u přežvýkavců a closantel nebo rafoxanid jsou účinné hlavně proti nematodům a trematodám, popřípadě ektoparazitům, zatímco oxyklozanid je účinný pouze proti trematodám (Vokřál et al., 2023). Niclosamid se aplikuje během parazitárních infekcí cestod, ale byla zaznamenána účinnost i proti trematodám (Swan, 1999). S výjimkou niklosamidu, se salicylanilidy rozsáhle vážou na plazmatické proteiny (Mohammed-Ali et Bogan, 1987; Swan, 1999). Salicylanilidy klosantel, rafoxanid a

oxyklozanid jsou jen málo metabolizovány a vylučovány převážně nezměněné, a to především výkaly hostitele (Swan, 1999).

Organofosfáty nejsou z toxikologického hlediska pro chovatele HZ dostupné. Účinek je omezený (Vokřál et al., 2023). Působí na helminty a ektoparazity blokováním enzymu acetylcholinesterázy, což vede ke zvýšení koncentrace acetylcholinu (Mehlhorn, 2008). Tyto látky z tříd anthelmintik mají úzké bezpečnostní rozpětí ve srovnání s ostatními anthelmintiky. Vzhledem k nízké selektivitě k parazitickému enzymu mohou tyto léky ovlivnit i hostitele, a proto byly nahrazeny bezpečnějšími alternativami (Martin, 1997; Mehlhorn, 2007, 2008; Vokřál et al., 2023).

## 2.5 Rezistence

Nadměrná aplikace anthelmintických léků vede k rezistenci. Tato skutečnost spolu s klimatickými a environmentálními změnami je důvodem zvýšení výskytu parazitárních onemocnění (Kotze et al., 2020; Zhao et al., 2023; Havrdová et al., 2023).

Rezistence GIH na anthelmintika dnes představuje celosvětový a do budoucna závažný problém týkající se nejen vyspělých států (Nelson, 1962; Preston et Webbe, 1974; Christie et al., 1978; Sutherland et al., 2008; Sutherland et Scott, 2010; Sutherland et Leathwick, 2011; Martinez-Ibeas et al., 2016; Leathwick et al., 2017; Lifschitz et al., 2017). V důsledku aktuálních rozsáhlých problémů s anthelmintickou rezistencí po celém světě, byla uskutečněna řada výzkumů (Playford et al., 2014; Rose et al., 2015; Benavides et al., 2016; Martínez-Valladares et al., 2015). Ve srovnání s jinými zeměmi se v České republice (ČR) věnuje rezistenci pouze omezené množství studií, nicméně za posledních 5 let (Havrdová et al., 2023) zájem o problematiku z hlediska výskytu populací GIH rezistentních na benzimidazolové preparáty vzrostl. Na rezistenci upozornil již Chroust, (1996, 2000) před více než 20 lety a jako další Várady et al., (2007). Vadlejch et al., v roce 2014, sepsal podrobnou studii zabývající se účinností tří různých antiparazitik na bázi benzimidazolu, ivermektinu a moxidektinu na vybraných ovčích farmách na území ČR. Výsledky těchto a dalších pozorování prováděných v poslední dekádě ukazují na alarmující každoroční zvyšování výskytu populací parazitů rezistentních na jednu i více účinných látek používaných anthelmintik (Sutherland et Scott, 2010; Falzon et al., 2014; Vadlejch, 2015; Novobilský et al., 2016; de Souza Rodrigues et al., 2017). Za jednu ze zásadních příčin nezájmu o tuto problematiku zejména ze strany chovatelů lze spařovat v tom, že klinické příznaky infekcí se ve většině chovů díky plošné aplikaci léčiv zatím téměř nevyskytují, přestože GIH patří mezi nejvíce rozšířené parazity u pasených zvířat (Coles et al., 2006; Kumar et Selvakkumar,

2020). Metoda profylaxe se užívá často a anthelmintika se v konvenčních chovech HZ aplikují minimálně jedenkrát za rok (Muchiut et al., 2018). K preventivnímu ošetření se používají převážně benzimidazoly (Porto et al., 2019). Problém profylaktické léčby často nastane i díky dlouhodobému užívání stejného anthelmintika nebo nedodržením aplikačního postupu například neplnohodnotnou dávkou léčiva (Bundy et al., 2020) a z tohoto důvodu je snahou od preventivního podávání anthelmintik odstoupit a hledat nové způsoby ochrany před nákazou (Ilić et al., 2023; Zhao et al., 2023).

Vzhledem k tomu, že parazitární infekce a výrobní ztráty často přímo nemusejí souviset se zátěží parazitů, je vhodné stanovit přímou korelaci mezi prevalencí helmintů a celkovou produktivitou stáda (Kaplan, 2004; Mahieu et al., 2020).

Specifické strategie pro řízení antihelmintické rezistence se soustředí na vhodné použití účinných anthelmintik a léčebné režimy založené na refugiích. Například, aby se zabránilo nadměrnému rozmnožování rezistentních jedinců *H. contortus* v populaci, je infekce monitorována na individuálním stádě/jedinci (Niciura et al., 2019; Mahieu et al., 2020; Kumar et Selvakkumar, 2020; Kaplan et al., 2020; Charlier et al., 2022). Bez ohledu na parazitární infekci je důležité zhodnotit celkovou prevalenci stáda (pokud existuje podezření na infekci), protože některé klinické příznaky nemusí být specifické, zejména náhlé úhyny HZ v endemických zónách mohou být mylně připisovány parazitárním infekcím, zatímco skutečná primární příčina obvykle souvisí s jinými problémy (bakteriální a virové onemocnění; Martínez-Ibeas et al. 2016; Muchiut et al., 2018). Za těchto okolností může být některá léčba nepřiměřená skutečnému stavu a riskují se tak další ztráty HZ ve stádě, dokud nebude stanovena přesná diagnóza. Pokud se neléčí, úmrtí obvykle pokračují a míra ztrát se během několika dní zvyšuje (Silvestre et al., 2002). Mezi jednotlivci je však obvyklá výrazná odchylka ve vnímavosti k parazitární infekci, která se odráží na celkové rezistenci (Papadopoulos et al., 2012; Martínez-Valladares et al., 2015a). Není tedy obvyklé ani nevyhnutelné, aby všichni jedinci ve stádě vykazovali stejný rozsah klinických příznaků, pokud by nebyli léčeni (Zhao et al., 2023; Mesafint et al., 2023).

## 2.6 Asanace pastvin

U většiny HZ tvoří primární zdroj potravy pastvina. Využití pastvin a jejich údržba je z hlediska zdravotního stavu HZ jedním ze základních cílů biosekurity (Hennessy et Rault, 2023).

Hygiena pastvin má dopad na výskyt choroboplodných zárodků nejen z pohledu výskytu parazitů (Tittl et Novák, 2009). Významnou roli pro rozvoj parazitárních infekcí je důležitá i

úroveň prostředí, která je ovlivněna abiotickými i biotickými faktory, jako jsou například tepelné a vlhkostní podmínky nebo přítomnost kyslíku v půdě (Novák et al., 2001; Hu et al., 2016). U většiny vajíček a larev se při teplotách mezi 10 – 30 °C setkáme s vysokou odolností, nicméně jejich aktivita se významně sníží s poklesem teplot prostředí pod 0 °C (Skládanka et al., 2010). Těto skutečnosti lze využít při hygienizaci hnoje a výkalů z infikovaných jedinců (Novák et al., 2001; Davies et Wales, 2019). Při hygienizaci pastvin dochází často k samovolné asanační činnosti vlivem účinku ultrafialového záření na bílkoviny buněčné protoplazmy. Vlivem absorpce UV paprsků dochází k denaturaci a koagulaci bílkovin (Danilova et al., 2019; Clauss, 2020). Významný je i destrukční vliv UV záření na DNA, případně jeho mutagenního účinku. Popsané mechanismy jsou možné pouze při povrchovém působení UV paprsků, proto je důležité v případě asanace pastvin umožnit jejich přístup k jednotlivým organismům především smykáním, urovnáním pastviny, či pokosením tzv. nedopasků (Novák et al., 2011; Jori et al., 2021).

### 3 CÍLE PRÁCE

Cílem práce je studium, detekce a diagnostika parazitárních populací jednotlivých druhů helmintů u HZ v ČR.

Následující dílčí postupuy představují jednotlivé kroky výzkumu nezbytné pro dosažení hlavního cíle:

1. Zdokumentovat prevalenci a výskyt parazitů, dále diagnostikovat parazitární onemocnění ve vybraných chovech HZ v ČR.
2. Charakterizovat vývoj a průběh infekce před a během podání VLP a vyhodnotit tak jeho účinnost v závislosti na diagnostice parazitárního onemocnění.
3. Zhodnotit zdravotní a ekonomické dopady ve vybraných chovech HZ před a po podání VLP.
4. Porovnat aplikovaná anthelmintika mezi sebou a jejich účinnost na sledované druhy helmintů.
5. Navrhnout opatření popřípadě řešení pro zpomalení rezistence z hlediska snižujících se účinností VLP registrovaných v ČR.
6. V případě vysoké prevalence charakterizovat průběhy infekcí detekovaných helmintů.
7. Získané výsledky porovnat se zahraničními zdroji a navrhnout možná řešení.



## **4 MATERIÁL A METODIKA**

### **4.1 Materiál**

V průběhu studie byly v ČR v konvenčních i ekologických chovech HZ odebrány výkaly od zástupců sudokopytníků – skot, ovce, koza, pratur, muflon, jelen, zubr a bizon a od lichokopytníků – kůň, osel, pony.

Vzorky výkalů (20 g) byly individuálně odebírány z rekta nebo bezprostředně po vykání jedince a laboratorně zpracovány nejpozději do 24 hodin. Výkaly byly opakovaně odebrány před zahájením léčby od každého jedince ve stádě a laboratorně vyšetřeny na přítomnost nematod, cestod nebo trematod. Následně byla dle výsledků laboratorních testů, historie aplikace léčiv ve stádě a managementu podniku, navržena léčebná terapie jedinců. Cíleně zvolená anthelmintika byla aplikována dle doporučeného dávkování výrobce (viz kapitola 4.1.2).

#### **4.1.1 Charakteristika vybraných chovů hospodářských zvířat**

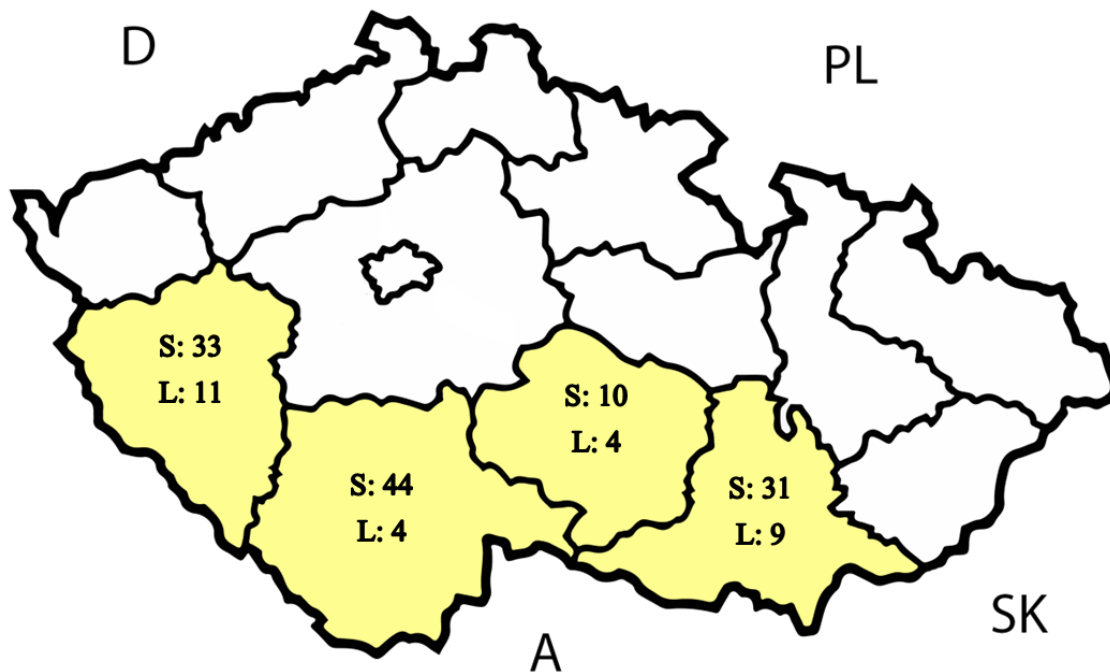
Disertační práce byla zaměřená na jedince bez tržní produkce mléka. Hospodářská zvířata ve sledovaných chovech byla chována dvěma způsoby. S výjimkou lichokopytníků byli jedinci chováni celoročně na pastvině s možností přístřešku. V případě lichokopytníků byl každý jedinec ustájen na noc v individuálním boxu a přes den měl volný pohyb na společné pastvině s ostatními jedinci v rámci jedné farmy.

V průběhu let 2021 – 2023 byly vzorky výkalů odebrány ve čtyřech krajích v rámci ČR. Celkem bylo sledováno 118 stád sudokopytníků a 28 stád lichokopytníků (obrázek 4). Detailní přehled stád HZ v jednotlivých krajích je znázorněn v tabulce 1.

V této disertační práci nebyla sledována druhová odolnost sudokopytníků, ani lichokopytníků vůči parazitárním infekcím ani nebyl hodnocen vliv způsobu chovu jedinců v rámci farmy (konvenční/ekologický chov).

V průběhu každého roku byly výkaly od každého jedince vyšetřeny minimálně 8 × (2 × před zahájením terapie, 2 × po aplikaci anthelmintika a 4 × kontrolně v průběhu roku).

**Obrázek 4. Schéma odběrů vzorků dle jednotlivých krajů v rámci ČR (D = Německo; PL = Polsko; A = Rakousko; SK = Slovensko; S = sudokopytníci; L = lichokopytníci)**



Zdroj: Havrdová, N.

**Tabulka 1. Detailní přehled chovů jednotlivých zvířat v rámci krajů v ČR**

(PK = plzeňský kraj; JK = jihočeský kraj; KV = kraj vysočina; JHK = jihomoravský; kraj; n = počet chovů u jednotlivého zástupce HZ celkem; × = nehodnoceno)

	PK	JK	KV	JHK	n=
<b>SUDOKOPYTNÍCI</b>					
Skot	19	25	3	2	<b>49</b>
Ovce	3	8	4	14	<b>29</b>
Koza	9	5	3	13	<b>30</b>
Pratur	×	1	×	×	<b>1</b>
Muflon	1	1	×	1	<b>3</b>
Jelen	1	1	×	1	<b>3</b>
Zubr	×	1	×	×	<b>1</b>
Bizon	×	2	×	×	<b>2</b>
<b>LICHOKOPYTNÍCI</b>					
Kůň	6	2	2	3	<b>13</b>
Osel	2	1	1	2	<b>6</b>
Pony	3	1	1	4	<b>9</b>

### 4.1.2 Aplikace a charakteristika vybraných anthelmintik

V každém chovu byla podrobně před terapeutickou léčbou zjištěna aplikace léčiv v minulých letech a při volbě anthelmintika byl zohledněn management a ekonomická úroveň chovu, zdravotní stav, kondice a věk jedince. Z hlediska ochranné lhůty každého anthelmintika bylo přihlédnuto k celkové produkci jedinců ve stádě. U jedinců, kteří byly na základě laboratorních metod vyhodnoceny jako negativní na přítomnost parazitárních infekcí, nebylo anthelmintikum aplikováno a tito jedinci sloužili jako kontrola.

Aplikace anthelmintika byla v každém chovu diskutována s veterinárním pracovníkem a zvolena na základě laboratorních testů a dostupnosti léčiva. Aplikaci anthelmintik vždy provedl veterinární pracovník, popřípadě chovatel.

Odběr vzorků výkalů pro detekci parazitárních stádií, proběhl vždy v den aplikace léčiva a následně pro hodnocení účinnosti byl následný odběr stanoven na 14. den po aplikaci léčiva. Odběrový den po aplikaci vycházel ze studie Kochapakdee et al., (1995) a Mooney et al., (2009), podle níž byla zohledněna délka účinnosti jednotlivého anthelmintika.

V případě aplikace léčiva byly vždy terapeuticky léčení jedinci chováni odděleně od neléčených. U přežvýkavců chovaných celoročně na pastvinách byla pro účely terapeutické léčby pastvina rozdělena na tzv. „infekční plochu,“ kde se jedinci mohli volně pohybovat ve vyhrazeném prostoru. Na základě dehelmintizace a vylučování vajíček byly odstraňovány výkaly v častějších intervalech i několikrát za den po dobu 14 dnů, tedy do odběru pro vyhodnocení účinnosti metodou FECRT. Po 14 dnech byl jedincům umožněn pohyb po celé pastvině mimo tuto infekční plochu, kde proběhlo odstranění výkalů, převápnění nebo byla plocha upravena bránováním. Lichokopytníci byli ustájeni v individuálních boxech. Společnou pastvinu v průběhu léčby vždy sdíleli pouze ti jedinci, kteří byli léčení stejným anthelmintikem.

Zvoleny byly dvě aplikace stejného léku za rok (jaro – podzim) pro sudokopytníky. Pro lichokopytníky byla aplikace provedena v průběhu roku dle výskytu parazitárních stádií nematod nebo cestod nezávisle na ročním období. Tento postup terapeutické léčby byl navržen z důvodu pastevních podmínek jednotlivých zástupců HZ. Přežvýkavci byly po celou dobu studie chovány na pastvině s možností přístřešku a rotace pastvin s odklizem výkalů v pravidelných intervalech. V případě lichokopytníků se jednalo o individuální ustájení a z hlediska zoohygieny a přenosu parazitárních infekcí mezi jedinci byla terapeutická léčba anthelmintiky veterinárním pracovníkem navržena v podobě nepravidelných aplikací

anthelmintik, nicméně u všech jedinců bylo stejné anthelmintikum aplikováno maximálně dvakrát za sledovaný rok.

Zvoleného anthelmintikum bylo aplikováno vždy na základě hmotnosti jedince (tabulka 2). Doporučené dávkování bylo striktně dodrženo na základě příbalového letáku od distributora a vzhledem k tomu, že u každého jedince byla známa individuální hmotnost, žádná dávka nebyla podhodnocená.

**Tabulka 2. Design aplikace anthelmintik ve sledovaných chovech HZ v jednotlivých letech za období 2021 – 2023**

NEMATODA																																		
JEDINEC	SKOT			OVCE			KOZA			PRATUR			MUFLON			JELEN			ZUBR			BIZON			KŮŇ			OSEL			PONY			
VLP / ROK	2021	2022	2023	2021	2022	2023	2021	2022	2023	2021	2022	2023	2021	2022	2023	2021	2022	2023	2021	2022	2023	2021	2022	2023	2021	2022	2023	2021	2022	2023	2021	2022	2023	
<b>Closamectin</b>	180	175	103	14	27	28	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
<b>Ivomec super</b>	437	406	307	84	73	56	92	85	77	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
<b>Helmigal</b>	×	116	259	×	×	×	×	×	×	×	×	×	48	80	78	119	134	113	84	70	70	64	64	64	×	×	×	×	×	×	×	×		
<b>Biomec</b>	×	85	36	36	×	13	23	7	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×		
<b>Verm-x</b>	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	16	28	12	61	61	61	39	13	27
<b>Noromectin</b>	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	38	19	47	×	×	×	14	37	16
<b>Aldifal</b>	218	99	114	40	56	22	16	46	86	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	15	21	28	×	×	×	×	×	×	
<b>Albex</b>	89	62	125	20	×	30	5	22	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
<b>Ecomectin</b>	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	36	24	31	×	×	×	×	×	×
CESTODA																																		
<b>Panacur</b>	×	×	×	24	32	39	10	30	31	×	×	×	10	8	×	17	×	21	×	×	×	×	×	×	26	22	28	×	×	×	×	×	×	
<b>Verm-x</b>	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	24	37	13	10	10	10	25	8	23	
TREMATODA																																		
<b>Closamectin</b>	48	16	9	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	
<b>Aldifal</b>	46	20	5	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	14	14	13	7	×	×	×	×	×	×	×	×	×	

VLP = Veterinární léčivý přípravek (aplikované anthelmintikum); × nehodnoceno

#### **4.1.2.1 Closamectin**

Closamectin je injekční roztok určený pro skot/ovce a obsahuje 5 mg/ml Ivermectinum a 125 mg/ml Closantelum (Norbrook Laboratories Limited, Severní Irsko).

Closamectin se aplikuje při léčbě smíšených invazí trematody, nematody nebo členovci u skotu a ovcí vyvolaných gastrointestinálními hlísticemi, plicními červy, očními červy, střechky, zákožkami a vešmi.

Aplikace probíhá subkutánně do střední části krku za aseptických podmínek v dávce 200 µg ivermectinu a 5 mg closantelu na 1 kg živé hmotnosti. Maximální objem na jedno místo injekčního podání je výrobcem stanoven na 10 ml (zbývající množství je třeba aplikovat do jiného místa na krku léčeného jedince). První dávka by měla být podána do pravé strany krku a zbývající objem aplikován na oddělená místa na levé a pravé straně krku.

Nežádoucí účinky byly pozorovány pouze při subkutánní aplikaci. Jednalo se o svědění v místě injekčního podání a zatvrdnutí při palpaci do 7 dnů po aplikaci.

Ochranná lhůta činí 49 dnů a léčivo se nesmí aplikovat jedincům, u nichž je mléko určeno pro lidskou spotřebu a u jedinců v době zaprahnutí včetně březích jalovic nebo bahnic, jejichž mléko bude určeno pro lidský konzum během 60 dnů před předpokládaným porodem.

#### **4.1.2.2 Panacur**

Panacur je určen pro cílová zvířata – kůň, skot a ovce ve formě tablet, pasty nebo emulze obsahující účinnou složkou Fenbendazolum 0,22 g/g. (Intervet International B.V., Nizozemsko).

Aplikuje se perorálně v dávce 7,5 mg fenbendazolu na 1 kg živé hmotnosti v případě napadení dospělci i nezralými stádii nematodů gastrointestinálního a respiračního traktu koní, skotu a ovcí a působí i ovicidně s účinkem na vajíčka obličejových červů, cestod.

Nežádoucí účinky nejsou známy a anthelmintikum je velmi dobře snášeno. Ochranná lhůta je výrobcem stanovena pro skotu 9 dnů, maso koní 5 dnů a mléko 4 dny.

#### **4.1.2.3 Ivomec super**

Anthelmintikum Ivomec super je určeno pro skot a ovce s účinnou látkou Ivermectinum 10,0 mg a Clorsulonum 100,0 mg (Merial SAS, Francie).

Indikace je zaměřena na léčbu gastrointestinálních nematod, očních helmintů, plicnívek, mikrofilárií, střechků, vší, původce kožních myáz, zákožek, klíšat a trematod.

Ivomec Super je dostupný ve formě injekčního roztoku aplikovaného v doporučené dávce 1 ml/50 kg živé hmotnosti. Injekční roztok je aplikován subkutánně do kožní řasy na krku jedince a tato dávka odpovídá hladině 0,2 mg ivermektinu a 2,0 mg clorsulonů na kg živé hmotnosti. Dávky vyšší než 10 ml je doporučeno aplikovat na dvě různá místa.

Ochranná lhůta je výrobcem stanovena na 66 dnů pro maso. Anthelmintikum se nedoporučuje aplikovat jedincům během laktace nebo 28 dní před porodem, pokud je mléko určeno pro lidskou spotřebu. Nežádoucí účinky nejsou známy.

#### **4.1.2.4 Helmigal**

Helmigal je dostupný ve formě perorálního prášku s účinnou složkou Fenbendazolum 25 mg. Je určen pro skot, koně a spárkatou zvěř (Pharmagal spol. s r.o., Nitra).

Anthelmintikum je doporučeno aplikovat v případě parazitárních onemocnění vyvolaných vývojovými stádii a dospělci parazitů nematod a trematod. Při aplikaci je vhodné anthelmintikum zamíchat do krmiva. Léčivo je možné aplikovat i během březosti a laktace. Pro úspěšnou léčbu je dále distributorem doporučeno sledovat stav vývojových stádií a léčbu opakovat dle vývojových cyklů daných druhů parazitů. Obecná dávka je 5 mg fenbendazolu na jeden kg živé hmotnosti tj. 0,2 g přípravku/kg ž. hm. Dále je pro zvýšenou účinnost možná aplikace podáním nižší dávky 3 mg fenbendazolu na jeden kg ž. hm., (0,12 g přípravku / kg ž. hm.) v intervalech 24 hodin po dobu 3–5 dní.

Nežádoucí účinky nejsou hlášeny. Ochranné lhůty jsou stanoveny na 14 dní pro maso a 120 dní pro mléko. Dále je zakázáno aplikovat anthelmintikum u koní, jejichž maso je určeno pro lidskou spotřebu.

#### **4.1.2.5 Biomec**

Biomec je doporučen pro cílovou skupinu ovcí a skotu pro subkutánní aplikaci s účinnou složkou Ivermectinum 10,0 mg v 1 ml (Bioveta, a.s., Česká republika).

Veterinární léčivý přípravek je indikován pro účinnou léčbu a zamezení šíření následujících parazitárních onemocnění – gastrointestinální oblé červy (dospělci i vývojová stádia), plicnivky, oční helminté, střechci, zákožky, vši, gastrointestinální hlístice a svrab.

Je stanovena doporučená inokulační dávka 0,2 mg ivermektinu na kg živé hmotnosti (odpovídá 1 ml přípravku/50 kg živé hmotnosti). Aplikace se provádí subkutánně do volné kůže před nebo za lopatkou.

Ochranná lhůta je stanovena pro maso 28 dnů (ovce) a 49 dnů (skot). V případě mléka se nedoporučuje u zvířat produkujících mléko pro lidský konzum aplikovat anthelmintikum v laktaci a 28 dní před porodem.

Nežádoucí účinky se mohou objevit po subkutánním podání, kde může být u některých jedinců pozorován přechodný nepokoj a občasný výskyt otoků měkkých tkání v místě injekčního podání. Nicméně tyto reakce samovolně odezní.

#### **4.1.2.6 Verm-x**

Verm-x je určen pro koně a poníky s infekcí střevních parazitů, kde účinná složka je složena ze směsi bylinných přísad, které obsahují komplex aktivních částic. Přípravek je dostupný ve formě granulí (Johnson & Johnson, s.r.o., Slovensko).

Doporučené dávkování je 50 g denně po dobu pěti po sobě následujících dnů a léčbu opakovat pravidelně po 12ti týdnech.

#### **4.1.2.7 Noromectin**

Noromectin je perorální pasta určená pro koně s účinnou složkou Ivermectinum 140 mg (Norbrook Laboratories Limited, Severní Irsko).

Anthelmintikum je určené pro léčbu a prevenci parazitárních onemocnění způsobených dospělci a vývojovými stádii malých strongilidů. Nežádoucí účinky jsou známy pouze v případech masivních infekcí, kdy může dojít po aplikaci přípravku k reakci (svědění, otoky) zapříčiněné velkým množstvím odumřelých parazitů. Příznaky mizí spontánně v několika dnech, případně se doporučuje symptomatická léčba.

Aplikace celé dávky pasty přípravku Noromectin je možná i během gravidity a laktace u klisen.

#### **4.1.2.8 Aldifal**

Veterinární léčivý přípravek Aldifal je určený pro léčbu smíšených helmintóz u skotu a ovcí s účinnou složkou Albendazolum 100 mg (Mikrochem spol. s r.o., Slovensko).

Aldifal je aplikován perorálně a je doporučené jednorázové dávkování při parazitární infekci nematody a cestody 7,5 ml přípravku na 100 kg živé hmotnosti (7,5 mg na jeden kg živé hmotnosti) a při infekci trematody jednorázově 10 ml přípravku na 100 kg živé hmotnosti (10 mg na jeden kg živé hmotnosti).

Ochranné lhůty jsou u hospodářských zvířat stanoveny na 14 dnů pro maso a pro mléko 72 hodin. Nežádoucí účinky nejsou známé.



#### 4.1.2.9 Albex

Albex je anthelmintikum určené pro skot a ovce při léčbě helmintóz, dostupný je ve formě pasty s účinnou složkou Albendazolum 10 mg (ECO Animal Health Ltd., Velká Británie).

Indikačně je určen pro léčbu parazitárních infekcí vyvolaných dospělci a vývojovými stádii gastrointestinálních a plicních nematod, cestod a dospělců *F. hepatica* u skotu a ovcí.

Doporučené dávkování lze stanovit na 0,5 ml léčiva na 10 kg živé hmotnosti pro léčbu trematod a 0,75 ml na 10 kg živé hmotnosti pro léčbu cestod/nematod.

Ochranná lhůta je stanovena na 14 dnů pro maso a 60 hodin pro mléko.

#### 4.1.2.10 Ecomectin

Ecomectin je perorální pasta určená pro koně. Obsahuje účinnou složkou Ivermectinum 18,7 mg (ECO Animal Health Ltd., Velká Británie).

Indikace anthelmintika je doporučena pro léčbu velkých a malých strongilidů, roupů, škrkavek a střechků.

Dávkování je výrobcem stanovené pro jedince o 600 – 700 kg živé hmotnosti (jedno balení). Ochranná lhůta je pro maso stanovena na 34 dnů a anthelmintikum by se nemělo používat u klisen, jejichž mléko je určeno pro lidský konzum. Nežádoucí účinky nejsou u tohoto anthelmintika hlášeny.

### 4.2 Metodika

#### 4.2.1 Identifikace a kvantifikace parazitů

Identifikace parazitů byla provedena mikroskopicky dle morfometrie a morfologie vajíček (flotace, McMaster; Wymann et al., 2008), nebo *in vitro* tesů EHA (Demeler et al., 2012), LDA (Coles et al., 2006) a na základě identifikace vývojových stádií larev (L<sub>3-5</sub>) dle studie van Wyk et al., (2004).

##### 4.2.1.1 Flotace a McMaster

Pro detekci vajíček nematod byla zvolena laboratorní metoda flotace pomocí cukerného roztoku a následně byla kvantifikace vajíček nematod vyhodnocena upravenou metodou McMaster dle původní metodiky Wymann et al., (2008).

Pro přípravu cukerného roztoku o hustotě 1,158 g/cm<sup>3</sup> bylo smícháno 518 ml destilované vody s 810 g krystalového cukru. Roztok byl 2 hodiny homogenizován při teplotě 37 °C a v konečné fázi bylo přidáno 14,58 g fenolu a roztok byl znovu promíchán. Výsledný cukerný roztok byl před laboratorním zpracováním uchován při 4 °C.

Při zpracování vzorků byly naváženy a zhomogenizovány tři gramy výkalů s 15 ml destilované vody a pomocí sítka byla suspenze přefiltrována do zkumavky o objemu 10 ml. Vzorek byl centrifugován při 2500 rpm po dobu 5 min. Supernatant byl odstraněn a k sedimentu byl přidán po okraj zkumavky cukerný roztok, zkumavka byla zakryta podložním sklíčkem a vzorek byl centrifugován o 500 rpm po dobu 30 sec a následně mikroskopicky hodnocen při zvětšení  $100 - 400 \times$  na přítomnost vajíček nematod a cestod.

Metoda McMaster k vyhodnocení EPG, byla upravena dle původní metodiky Wymann et al., (2008). V uzavíratelné zkumavce byly smíchány a zhomogenizovány 4 gramy výkalů s 3 ml flotačního roztoku. Po 5 min bylo pipetou přeneseno 1,5 ml supernatantu do počítací komůrky na McMasterově sklíčku a počet vajíček nematod byl vynásoben koeficientem 50 dle původní metodiky ((EPG/OPG) =  $y \times 50$ ; Wymann et al., 2008).

#### **4.2.1.2 Egg hatch assay test a Larval development assay test**

Pro identifikaci larev v různých fázích vývojového stádia ( $L_{3-5}$ ) byla vajíčka nematod izolována z čerstvých vzorků výkalů dle upravených původních metodik Demeler et al., (2012) a Coles et al., (2006). Metodiky byly z důvodu získání pouze dospělých jedinců upraveny. V testu nebyla hodnocena rezistence larev na jednotlivá anthelmintika.

Pro kultivaci larev byly vzorky výkalů zpracovány do 12 hodin po odběru a identifikace vajíček ve vzorku byla provedena dle metody McMaster.

Vajíčka nematod byla separována pomocí flotace v cukerném roztoku a dále po dobu 7 min centrifugována na sacharózovém gradientu 40% nasyceného roztoku. Dále byla vajíčka promyta v destilované vodě a mikroskopicky zhodnocena, aby byla vyloučena embryonace larev. Vajíčka nematod byla zředěna v 500  $\mu$ l destilované vody, sečtena, rozdělena a přesunuta do mikrotitrační destičky v rovnoměrném zastoupení vajíček v objemu 10  $\mu$ l na jamku. Do každé jamky bylo následně přidáno 150  $\mu$ l 2% Bacto Agar (Merck Life Science spol. s r.o., Praha) o teplotě 45 °C a 10  $\mu$ l kvasnicového extraktu (P-LAB a.s., Praha; 1 g kvasnicového extraktu byl smíchán s 90 ml 0,85% NaCl). Vnější řady jamek byly naplněny destilovanou vodou, aby bylo zastaveno vysychání testovacích jamek.

Následovala inkubace vajíček po dobu 48 hodin o teplotě 33 °C. Po této době byly již vylíhlé larvy morfologicky hodnoceny a bylo možné určit druh nematoda dle metodiky van Wyk et al., (2004)

### 4.2.1.3 Sedimentace

Metodika sedimentace (pouze pro detekci vajíček trematod) dle Thienpont et al., (1986), byla v této studii též upravena.

Metoda sedimentace je založena na gravitaci těžkých vajíček trematod a hustotě roztoku. Ve skleněné kádince o objemu 150 ml byly zhomogenizovány 4 g výkalů a intenzivně promíchány s destilovanou vodou. Suspenze byla přefiltrována přes jemné síto (100 µm). Výsledný filtrát byl na 20 minut odstaven, aby byl supernatant dekantován. Sedimentace a dekantace se opakovaly 4x (v první fázi byla odsáta 1/3 horní poloviny roztoku, ve druhé a třetí fázi byla odsáta 1/2 roztoku a ve čtvrté fázi byl roztok odebrán až na sediment). Sediment byl následně hodnocen mikroskopicky při zvětšení od 10× do 40×.

### 4.2.1.4 Fecal egg count reduction test

Účinnost veterinárních léčivých přípravků byla hodnocena pomocí testu snížení počtu vajíček dle metodiky Kochapakdee et al., (1995) a Mooney et al., (2009).

Individuální vzorky výkalů byly během transportu a zpracování (do 24 hodin) uchovávány v odběrových zkumavkách při 4°C. Stanovení testu poskytlo odhad anthelmintické účinnosti. To bylo provedeno porovnáním počtu vajíček u ošetřených a neošetřených hostitelů. Principem testu bylo vyhodnotit snížení/nárůst parazitů ve výkalech před a po léčbě veterinárními léčivými přípravky. Pro účinnost anthelmintik byl vybrán matematický vzorec:

$$\text{FECRT} = 100 \times \left( 1 - \left( \frac{E_2}{E_1} \right) \right)$$

$E_1$  = EPG před léčbou (den 0),  $E_2$  = EPG po léčbě (den 14)

### 4.2.1.5 Molekulární charakteristika

V této disertační práci byly metodou PCR ověřeny pouze pozitivní vzorky trematod. Nematody zde nebyly molekulárně vyhodnoceny.

Pozitivní vzorky trematod (*C. daubneyi*) v této studii byly použity pro extrakci genomové DNA z 300 mg fekálií pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Německo) a dále zpracovány podle doporučení výrobce s výjimkou použití 0,5 mm skleněných kuliček.

Purifikovaná DNA byla před PCR amplifikací skladována při -20 °C. K amplifikaci parciální oblasti genů kódujících gen pro malou ribozomální podjednotku rRNA 5.8S byl použit přístup PCR podle původní metodiky Rinaldiho et al., (2005). U poražených pozitivních zvířat byly provedeny pitvy.

### **4.2.2 Statistická analýza**

Sumarizace dat byla připravena v programu Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

Analýzy byly vyhodnoceny na základě výsledků FECRT. Vždy byly hodnoceny dvě skupiny, a to v den podání léku (den 0) a po podání léku (den 14). Účinnost veterinárních léčivých přípravků byla hodnocena podle metodiky Kochapakdee et al., (1995) a Mooney et al., (2009). Všechny analýzy byly provedeny v softwaru Statistica 6.0 (StatSoft ČR, Praha, Česká republika). Účinnost byla stanovena výpočtem snížení počtu vajíček ve stolici a byla považována za účinnou, když hodnota FECRT dosáhla hranice  $\geq 95$  % a 95 % spodní hranice spolehlivosti. Procentuální snížení FECRT bylo vypočteno pro každé léčivo individuálně.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Parazitární onemocnění a prevalence

V průběhu studie bylo v ČR odebráno 5 359 vzorků výkalů od sudokopytníků a 819 vzorků výkalů od lichokopytníků (tabulka 3).

**Tabulka 3. Přehled odebraných vzorků výkalů za období 2021 – 2023 v rámci ČR dle jednotlivých krajů a zástupců sudokopytníků a lichokopytníků**

KRAJ	PLZEŇSKÝ			JIHOČESKÝ			VYSOČINA			JIHOMORAVSKÝ			POČET VZORKŮ CELKEM
	ROK	2021	2022	2023	2021	2022	2023	2021	2022	2023	2021	2022	
Skot	382	340	320	456	460	458	112	113	120	68	66	60	2955
Ovce	28	32	36	76	64	56	36	22	24	78	70	72	594
Koza	32	48	46	22	36	32	16	28	36	76	78	80	530
Pratur	0	0	0	42	42	42	0	0	0	0	0	0	126
Muflon	0	16	18	0	8	6	0	0	0	58	62	54	222
Jelen	16	32	30	38	26	36	0	0	0	82	76	68	404
Zubr	0	0	0	84	84	84	0	0	0	0	0	0	252
Bizon	0	0	0	92	92	92	0	0	0	0	0	0	276
<b>Počet vzorků</b>	<b>458</b>	<b>468</b>	<b>450</b>	<b>810</b>	<b>812</b>	<b>806</b>	<b>164</b>	<b>163</b>	<b>180</b>	<b>362</b>	<b>352</b>	<b>334</b>	<b>5359</b>
Kůň	84	71	77	14	23	16	14	9	12	28	27	26	401
Osel	24	16	0	18	0	32	16	26	18	13	27	26	216
Pony	46	37	34	7	4	6	8	4	0	17	13	26	202
<b>počet vzorků</b>	<b>154</b>	<b>124</b>	<b>111</b>	<b>39</b>	<b>27</b>	<b>54</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>30</b>	<b>58</b>	<b>67</b>	<b>78</b>	<b>819</b>

Z celkového počtu odebraných vzorků výkalů v jednotlivých letech dle lokality kraje, byla pro přehlednost prevalence parazitárních infekcí pro jednotlivé roky v rámci krajů shrnuta v tabulce 4.

**Tabulka 4. Prevalence parazitárních infekcí za sledované období 2021 – 2023**

KRAJ	PREVALENCE V % (PŘED/PO TERAPII)											
	PLZEŇSKÝ			JIHOČESKÝ			VYSOČINA			JIHOMORAVSKÝ		
	2021	2022	2023	2021	2022	2023	2021	2022	2023	2021	2022	2023
<b>Parazitární infekce</b>	<b>SUDOKOPYTNÍCI</b>											
Nematoda	92/13	86/11	65/9	98/26	86/22	84/18	79/36	75/35	82/25	89/32	92/26	94/14
Trematoda	75/5	15/0	0/0	89/18	75/14	65/7	48/15	36/16	39/15	74/6	0/0	0/0
Cestoda	46/18	75/5	0/0	48/6	0/0	75/18	90/45	36/19	0/0	0/0	14/0	0/0
<b>Parazitární infekce</b>	<b>LICHOKOPYTNÍCI</b>											
Nematoda	37/15	0/0	0/0	69/13	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0
Cestoda	85/16	76/23	85/25	95/40	96/31	48/6	0/0	0/0	0/0	46/13	56/16	75/23

Z výsledků vyplývajících z tabulky 4 lze konstatovat, že nejvyšší prevalence u sudokopytníků z hlediska výskytu nematod byla v roce 2021 zaznamenána v jihočeském kraji, a to 98 % před cílenou aplikací anthelmintika, zatímco nejnižší prevalence před terapeutickou léčbou ve stejném roce byla pro nematody detekována v plzeňském kraji (13 %). U lichokopytníků byla zaznamenána prevalence u parazitárních infekcí způsobených nematody v jihočeském kraji 69 % před terapeutickou léčbou a po léčbě anthelmintiky byl zjištěn pokles prevalence na 13 % rovněž v jihočeském kraji.

Nejvyšší prevalence byla zaznamenána v případě parazitárních infekcí způsobených nematody, kde bylo prokázáno, že nejvíce zastoupeným druhem byl *H. contortus* a *O. ostertagi* pro sudokopytníky. Pro lichokopytníky byly nejvíce zastoupeným druhem nematod malé strongylidy z podčeledi *Cyathostominae*. U lichokopytníků byla detekce druhu nematody specifikována dle jednotlivých larválních stádií z vylíhlých larev dle metodiky (Coles et al., 2006).

U trematod byl zaznamenán nejvyšší nárůst v jarním období ve všech třech letech u skotu a bizonů. Dle PCR byl detekován druh *C. daubneyi*.

U malých přežvýkavců byla dle morfologie laboratorních testů ve vzorcích výkalů detekována tasemnice *M. benedeni*. V případě lichokopytníků byla nejvíce v chovech zastoupena tasemnice *A. perfoliata*.

U všech sledovaných jedinců byla prokázána smíšená infekce helmintóz. V rámci této studie byla proto stanovena orientační hodnota EPG (před vynásobením koeficientem 50×) pro každého parazita na základě ohrožení zdravotního stavu jedince (s výjimkou parazitární infekce cestodami), která sloužila jako orientační míra infekce a dle níž byla stanovena celková prevalence v jednotlivých chovech sudokopytníků i lichokopytníků (tabulka 5). U cestod byla intenzita infekce hodnocena pouze jako pozitivní/negativní a to z důvodu vysoké produkce vajíček od jediného jedince přítomného v gastrointestinálním traktu hostitele.

**Tabulka 5. Intenzita infekce EPG = y (před vynásobením koeficientem 50×)**

Parazitární infekce	Slabá	Střední	Vysoká
<i>O. ostertagi</i>	< 20	50	> 51
<i>H. contortus</i>	< 10	30	> 31
<b>Malí strongilidi</b>	< 30	60	> 61
<i>C. daubneyi</i>	< 15	30	> 46
<i>M. benedeni</i>		> 1	
<i>A. perfoliata</i>			

### 5.1.1 Terapeutická léčba vybranými anthelmintiky

Na základě výsledků laboratorních testů a hodnoty EPG, stanovené pro výsledky této práce, byl z hlediska celkové prevalence navržen terapeutický postup pro každý chov zvlášť a během léčby byl každý jedinec individuálně vyšetřován na přítomnost parazitárních infekcí obsažených ve vzorcích výkalů.

V tabulce 6 jsou shrnuta anthelmintika aplikovaná jednotlivým zástupcům zvířat s účinností na jednotlivé parazitární infekce – nematoda, trematoda, cestoda.

**Tabulka 6. Terapeutická léčba vybranými anthelmintiky**

PARAZITÁRNÍ INDIKACE DLE ÚČINNOSTI ANTHELMINTIKA				
VLP	NEMATODA	TREMATODA	CESTODA	CÍLOVÝ DRUH ZVÍŘAT
<b>Closamectin</b>	×	×	×	skot, ovce
<b>Panacur</b>	×	–	×	kůň, ovce, koza, muflon, jelen
<b>Ivomec super</b>	×	×	–	skot, ovce, koza
<b>Helmigal</b>	×	–	–	skot, muflon, jelen, zubr, bizon
<b>Biomec</b>	×	–	–	skot, ovce, koza
<b>Verm-x</b>	×	–	–	kůň, osel, pony
<b>Noromectin</b>	×	–	–	Kůň, pony
<b>Aldifal</b>	×	×	×	skot, ovce, koza, bizon
<b>Albex</b>	×	×	×	skot, ovce, koza
<b>Ecomectin</b>	×	×	×	kůň

„VLP“ veterinární léčivý přípravek; „×“ anthelmintikum je určeno k léčbě parazitárních infekcí; „–“ anthelmintikum není určeno pro léčbu parazitárních infekcí

U všech jedinců byla terapeutická léčba stanovena až po odběru kontrolních vzorků. Aplikace léčiva byla pro všechny jedince vždy stanovena na základě hodnoty EPG a dle sezónnosti výskytu parazitárních infekcí byl terapeutický postup konzultován s veterinárním pracovníkem.

V chovu praturů nebylo aplikováno žádné anthelminikum. U jedinců ve stádě nebyla během let 2021 – 2023 pozorována žádná parazitární infekce.

Účinnost anthelmintik nebyla sledována samostatně pro jednotlivé kraje, ale pouze pro jednotlivé zástupce HZ zvířat, a to vzhledem k individualitě každého chovu. Přehled účinností pro jednotlivá anthelmintika je znázorněn v tabulce 7.

Celková účinnost vybraných terapeutických postupů pro léčbu nematod, trematod a cestod byla statisticky dle výsledků FECRT vyhodnocena a znázorněna za celé období 2021 – 2023 jako celek pro jednotlivá anthelmintika (viz grafy 1 – 10).

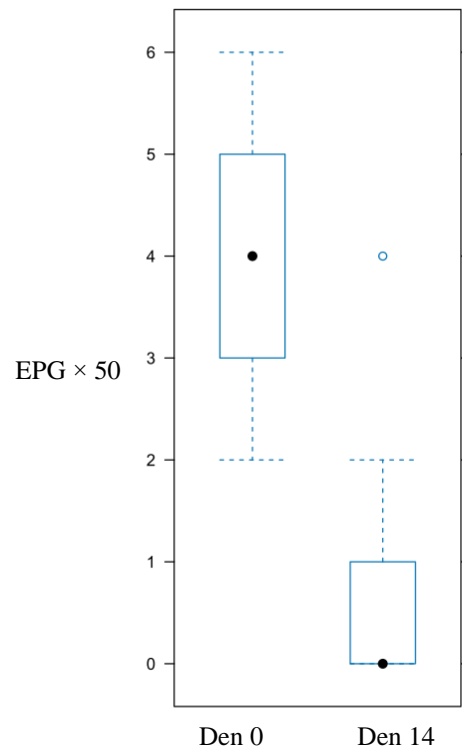
**Tabulka 7. Přehled průměrných účinností jednotlivých anthelmintik ve sledovaných chovech HZ v průběhu let 2021 – 2023**

<b>NEMATODA</b>											
<b>VLP / JEDINEC</b>	<b>SKOT</b>	<b>OVCE</b>	<b>KOZA</b>	<b>PRATUR</b>	<b>MUFLON</b>	<b>JELEN</b>	<b>ZUBR</b>	<b>BIZON</b>	<b>KŮŇ</b>	<b>OSEL</b>	<b>PONY</b>
<b>Closamectin</b>	95	95	×	×	×	×	×	×	×	×	×
<b>Ivomec super</b>	100	100	98	×	×	×	×	×	×	×	×
<b>Helmigal</b>	99	×	×	×	84	85	92	81	×	×	×
<b>Biomec</b>	100	100	100	×	×	×	×	×	×	×	×
<b>Verm-x</b>	×	×	×	×	×	×	×	×	98	95	99
<b>Noromectin</b>	×	×	×	×	×	×	×	×	100	×	100
<b>Aldifal</b>	96	98	99	×	×	×	×	99	×	×	×
<b>Albex</b>	100	100	100	×	×	×	×	×	×	×	×
<b>Ecomectin</b>	×	×	×	×	×	×	×	×	100	×	×
<b>CESTODA</b>											
<b>Panacur</b>	×	100	×	×	100	100	×	×	100	×	×
<b>Verm-x</b>	×	×	×	×	×	×	×	×	99	99	99
<b>TREMATODA</b>											
<b>Closamectin</b>	80	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
<b>Aldifal</b>	41	×	×	×	×	×	53	49	×	×	×

VLP = Veterinární léčivý přípravek (aplikované anthelmintikum); × nehodnoceno



**Graf 1. Účinnost anthelmintika Closamectin za období 2021 – 2023**

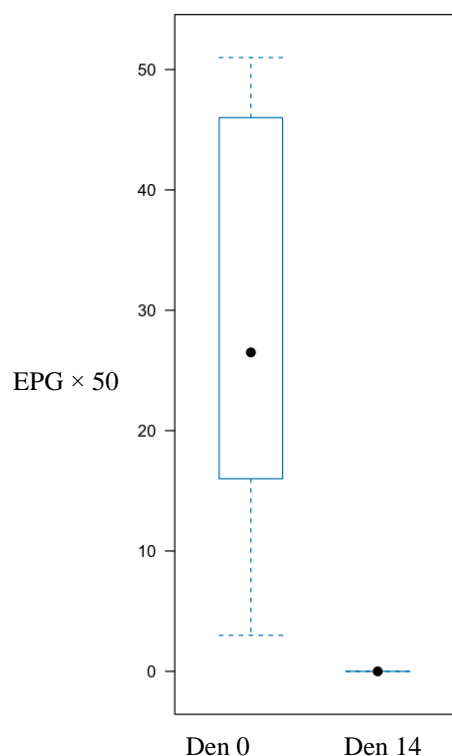


Terapeutická léčba Closamectinu byla u sudokopytníků aplikována v pěti chovech skotu a tří stád ovcí v rámci jednoho chovu.

Účinnost anthelmintika byla vyhodnocena na 95 % (nematody) a 80 % (trematody) v chovech skotu a v chovu ovcí byla účinnost anthelmintika na nematody 95 %.

Teoreticky lze předpokládat, že je zde možné riziko vzniklé rezistence. Léčivo mělo prokazatelně sníženou účinnost převážně u starších jedinců, kterým bylo stejné anthelmintikum aplikováno již v minulosti. U mladých jedinců, kteří v předchozích letech nebyli Closamectinem léčeni profylakticky, ale cíleně, byla léčba účinná v 95 % jak v chovu skotu, tak i v chovu ovcí.

**Graf 2. Účinnost anthelmintika Panacur za období 2021 – 2023**



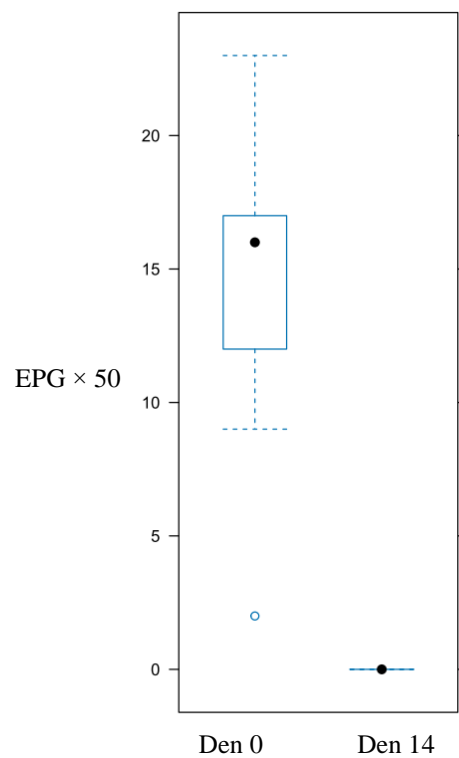
V případě parazitárních infekcí u ovcí a koz způsobených *M. benedeni* bylo aplikované anthelmintikum Panacur testováno v osmi chovech ovcí, deseti chovech koz a třech chovech muflonů a jelenů. Pro parazitární infekci *A. perfoliata* u koní bylo anthelmintikum testováno v šesti chovech koní.

Z grafu 2 je patrné, že terapeutická léčba byla z hlediska eradikace *M. benedeni* úspěšná ve všech chovech přežvýkavců a v případě *A. perfoliata* též u koní. Potencionální riziko rezistence v tomto případě nebylo potvrzeno.

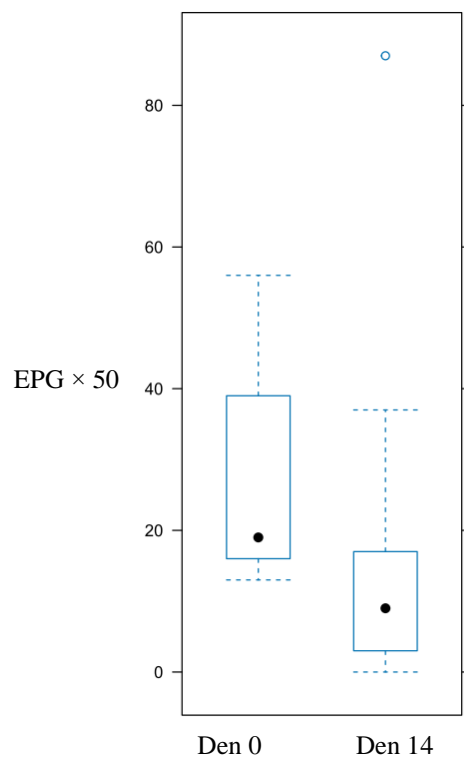
Účinnost při terapeutické léčbě anthelmintikem Ivomec super (graf 3), byla v závislosti na parazitárních infekcích způsobených nematody u dvaceti chovů skotu, pěti chovů ovcí a sedmi chovů koz vyhodnocena veterinárním léčivým přípravkem jako účinná. Lze tedy shodně jako v případě léčby Panacurem vyloučit vznik rezistence u sledovaných jedinců HZ.

V nejvyšším zastoupení byly detekovány zástupci nematod *H. contortus* a *O. ostertagi* u skotu, jelenů, muflonů, ovcí i koz.

**Graf 3. Účinnost anthelmintika Ivomec super za období 2021 - 2023**



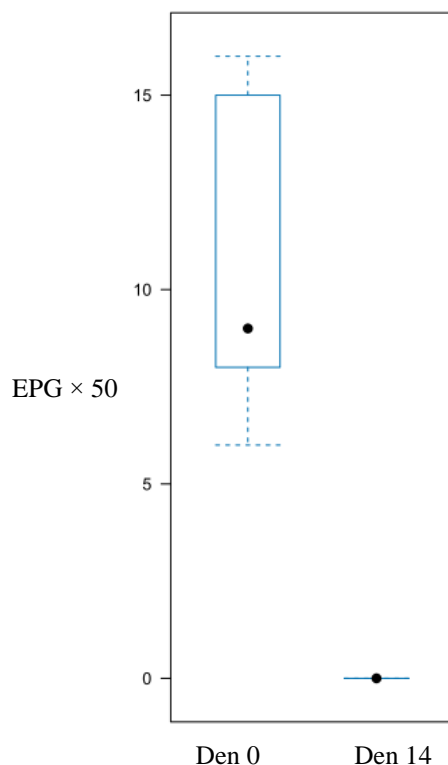
**Graf 4. Účinnost anthelmintika Helmigal za období 2021 - 2023**



Terapeutická léčba Helmigalem proběhla u jelenů, bizonů, zubrů, muflonů a skotu celkem v 19 chovech v rámci České republiky.

Z hlediska indikace tohoto anthelmintika jsou výsledky uvedené v grafu 4 pouze pro nematody, neboť ze vzorků výkalů a výše zmíněných jedinců nebyla molekulárně ani mikroskopicky prokázána ze vzorků výkalů přítomnost trematod. Přestože, u některých jedinců nedošlo k úplnému vyléčení, lze Helmigal považovat za relativně účinný. Intenzita infekce se v kontrolních vzorcích vyšetřených 14 dní po aplikaci anthelmintika pohybovala v rozmezí EPG 10 – 18. Ve sledovaných chovech s výjimkou chovu skotu byla zaznamenána přítomnost volně žijící zvěře, která byla v kontaktu s monitorovanými zvířaty v rámci jedné pastviny. Lze tedy předpokládat, že zde účinnost Helmigalu byla ovlivněna kontaminací pastviny neošetřených jedinců spárkaté zvěře mimo sledovaná stáda.

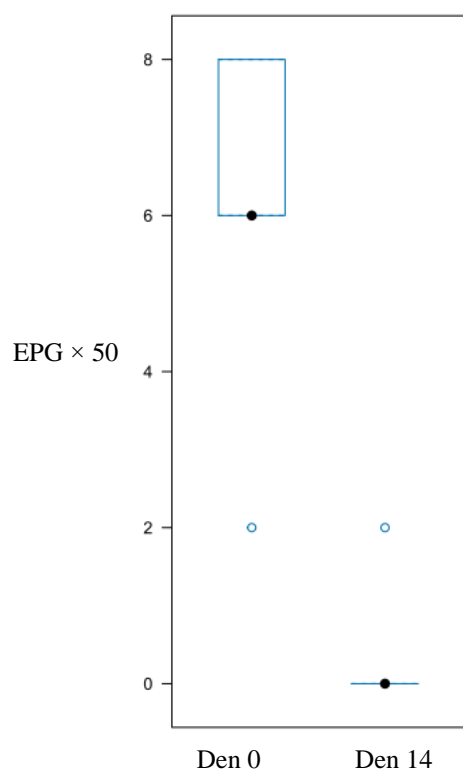
**Graf 5. Účinnost anthelmintika Biomec za období 2021 – 2023**



Účinnost terapeutické léčby anthelmintikem Biomec byla sledována v chovech skotu, ovcí a koz u 22 stád v rámci 3 farem. Výsledky jsou zobrazeny v grafu 5.

Přestože ve všech chovech v minulých letech proběhala profylaktická léčba různými anthelmintiky se stejnou účinnou složkou jako v případě veterinárního léčivého přípravku Biomec, byla zvolena terapeutická léčba pro parazitární infekce nematod, konkrétně *H. contortus* vyhodnocena jako účinná (graf 5). Hodnota EPG byla po cílené aplikaci nulová.

**Graf 6. Účinnost anthelmintika Verm-x za období 2021 - 2023**

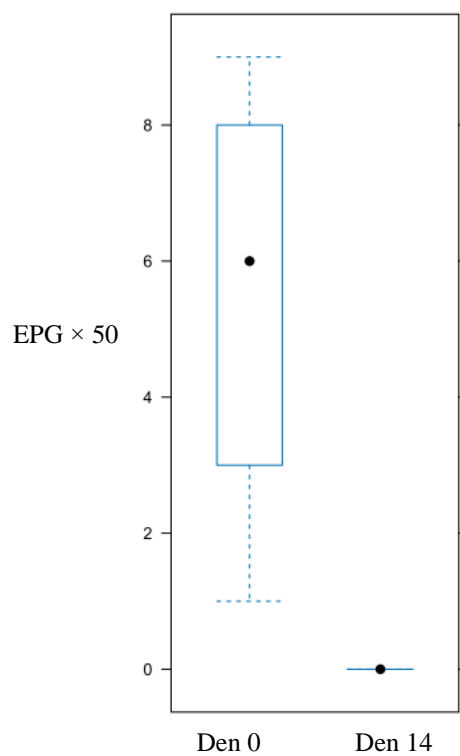


Parazitární infekce malými strongylidy u koní, oslů a poníků byly terapeuticky léčeny anthelmintikem Verm-x celkem na 6 farmách (graf 6).

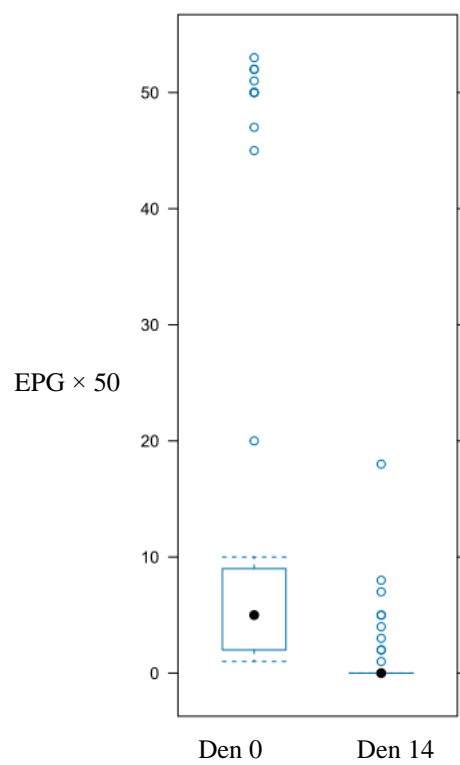
Výsledky prokázaly účinnost v 98%, nicméně v jednom chovu oslů byl tento veterinární léčivý přípravek z hlediska hodnoty EPG vyhodnocen jako neúčinný – konkrétní jedinci měli hodnotu EPG před a po aplikaci přípravku Verm-x beze změny. Vzhledem ale k pozitivním výsledkům v ostatních chovech koní, oslů a poníků lze tento lék považovat za účinný proti nematodám.

U veterinárního léčivého přípravku Noromectin v léčbě malých strongilidů u koní a poníků byla pozorována 100% účinnost, a to ve všech sledovaných chovech koní (6 farem) a poníků (3 farmy; graf 7).

**Graf 7. Účinnost anthelmintika Noromectin za období 2021 – 2023**



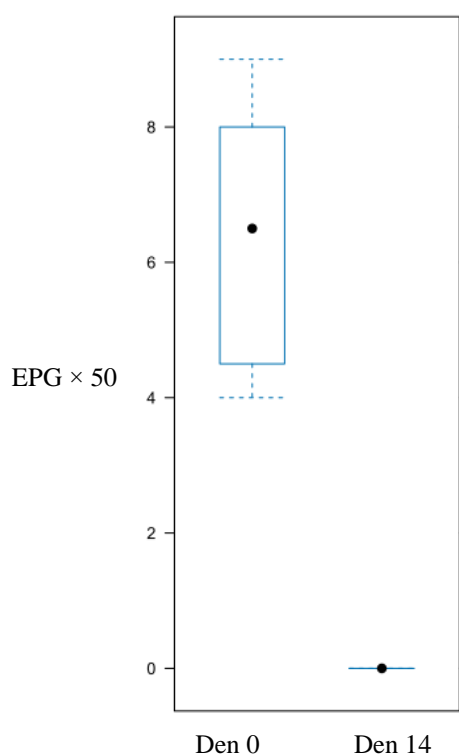
**Graf 8. Účinnost anthelmintika Aldifal za období 2021 – 2023**



Terapeutická léčba anthelmintikem Aldifal byla hodnocena pro parazitární infekce nematod a trematod u skotu, bizonů a zubrů a pro parazitárních infekcí nematod u ovcí a koz (graf 8).

Aldifal byl sice dle výsledků FECRT vyobrazených v grafu 8, vyhodnocen jako účinný, nicméně u některých jedinců došlo pouze k částečné eradikaci nematod, lze tedy předpokládat rezistenci parazitů na tento veterinární léčivý přípravek. Snížená účinnost byla pozorována i v případě infekce trematody, vzhledem k tomu, že tento veterinární léčivý přípravek není určen k léčbě *C. daubneyi*, ale k léčbě *F. hepatica*, je neúčinnost v případě *C. daubneyi* očekávaná. *Fasciola hepatica* nebyla ve sledovaných chovech detekována.

**Graf 9. Účinnost anthelmintika Albex za období 2021 – 2023**

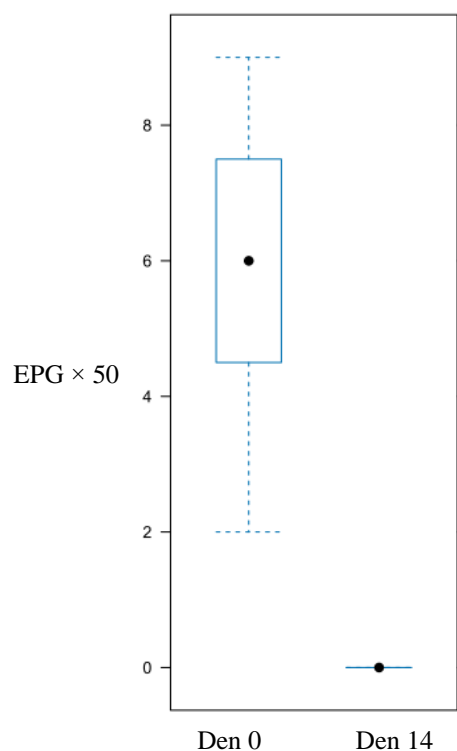


Veterinární léčivý přípravek Albex (graf 9) byl testován na osmi chovech skotu a pěti chovech ovcí a koz z hlediska parazitárních infekcí nematod, konkrétně *H. contortus*. Účinnost anthelmintika Albex proti této parazitární infekci byla vyhodnocena ve 100 % chovů HZ.

Terapeutická léčba parazitárních infekcí malých strongylidů u koní anthelmintikem Ecomectin byla vyhodnocena v 7 chovech koní jako účinná (graf 10).

Vznik anthelmintické rezistence u anthelmintik Albex a Ecomectin byl tedy v těchto případech vyloučen.

**Graf 10. Účinnost anthelmintika Ecomectin za období 2021 - 2023**

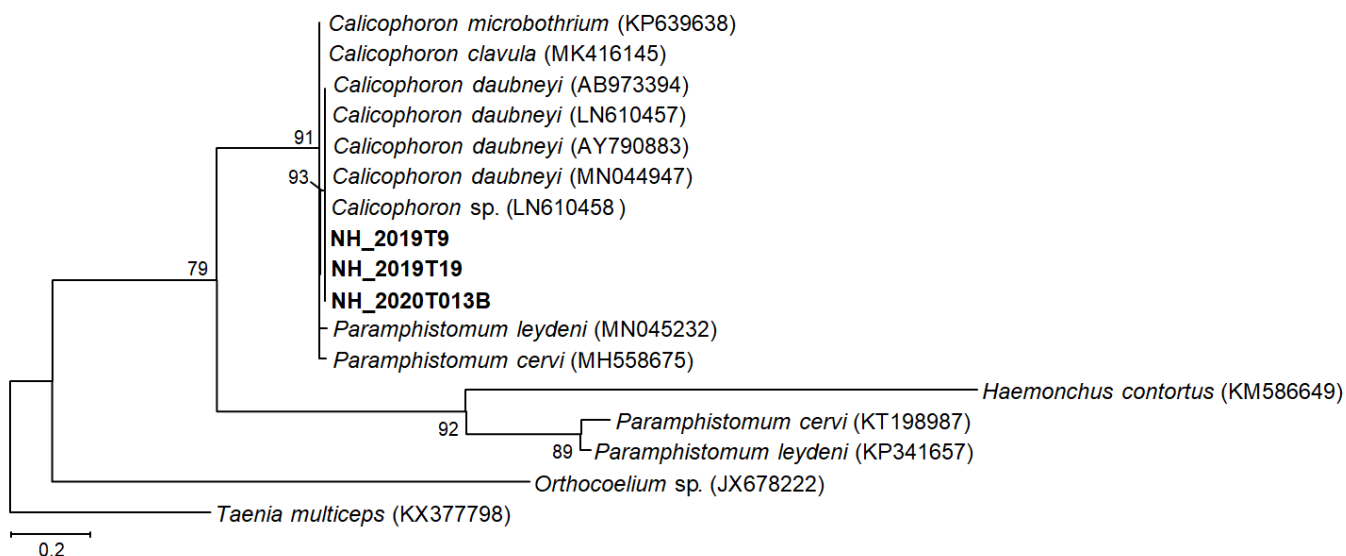


## 5.2 Molekulární determinace

Pro molekulární analýzu detekce *C. daubneyi* byly primery modifikovány podle původní metodiky Rinaldi et al., (2005). Byla použita oblast amplifikace genu 5.8S se sekvencí primeru (5'-3') F: TAGGCAATGTGGTGGTGT a R: TTGCACGTCAGAATCGCT, teplota nasedání 55,2 °C, délka 1 156 bp. Data byla použita spolu s několika dalšími helminty z GenBank ke genetické identifikaci. Nukleotidové sekvence byly porovnány pomocí vícenásobného zarovnání sekvencí nukleotidů pomocí Clustal X2 a jejich vztahu. Na obrázku 5 je zobrazen kladogram fylogenetických vztahů izolátů trematod porovnaných s jinými druhy a genotypy trematod na základě sekvencí genu 5.8S vytvořených metodou Maximum věrohodnosti model Hasegawa – Kishino – Yano G + I. Číselné hodnoty představují procentuální hodnoty bootstrapů s podporou pro více než 50 %, bootstrap 1000×.



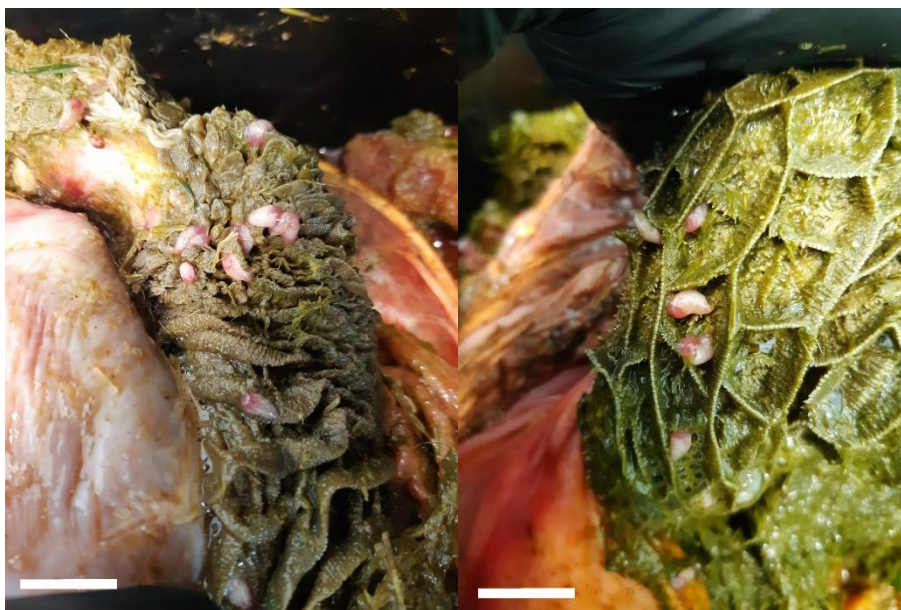
**Obrázek 5. Kladogram fylogenetických vztahů izolátů *C. daubneyi***



Na základě fylogenetických analýz byly všechny sekvenované vzorky identické, proto byla v kladogramu použita pouze sada 3 náhodných reprezentativních vzorků (NH\_2019T9; NH\_2019T19; NH\_2020T013B), které na kladogramu ukázaly, že DNA vzorků byla shodná s DNA *Calicophoronu* sp. uloženo v GenBank (KP639638; MK416145; AB973394; LN610457; AY790883; MN044947; LN610458; MN045232; MH558675; KM5869249; JX4KP7152849; JX4KT7152849; JX4KT7152838; KX377798). Celkem bylo provedeno molekulární vyšetření ze vzorků výkalů 76 různých vzorků skotu, 26 vzorků zubrů a 52 vzorků bizonů pozitivních na *Paramphistomatidae*.

U poražených jedinců byla provedena pitva (obrázek 6). Vzorky trematod byly molekulárně zpracovány a poté byly použity jako pozitivní kontroly při detekci *C. daubneyi* při zpracování PCR.

**Obrázek 6. Pitevnický nález *C. daubneyi* ve slezu u poraženého bizona (vzorky NH\_202013F a NH\_202013A; měřítko = 200  $\mu$ m; zdroj Havrdová)**



## 6 DISKUZE

### 6.1 Výskyt a prevalence parazitárních infekcí u sledovaných jedinců

Parazitární infekce byly koprologicky nebo molekulárně detekovány ve všech sledovaných chovech/stádech HZ a často se jednalo o smíšené infekce nematod/cestod/trematod, jak potvrzují studie (Dolinská et al., 2014; Davies et Wales, 2019; Sauermann et al., 2023).

Před zahájením studie byli všichni jedinci léčeni profylakticky bez předchozích laboratorních testů. Prevalence ve stádě se u sudokopytníků i lichokopytníků pohybovala v roce 2020 v rozmezí 78 – 99 %.

Parazitární infekce způsobené trematody, konkrétně *C. daubneyi* byly zaznamenány pouze u sudokopytníků, konkrétně v chovech skotu, zubrů a bizonů. Prevalence po terapeutické léčbě signifikantně klesla, což je v rozporu se studiemi Kaplan (2004, 2020). Zajímavostí je, že v ČR neexistuje žádné anthelmintikum určené k cílené léčbě *C. daubneyi* a přesto bylo ve studii Havrdová et al., (2023) prokázáno, že anthelmintika, která nejsou určená pro cílenou léčbu tohoto parazita, byla z části účinná. Prevalence u sledovaných parazitárních infekcí způsobených cestody u lichokopytníků ve studii Ilić et al., (2020) byly výrazně vyšší ve srovnání s výsledky této disertační práce. U sudokopytníků byly infekce tasemnicemi v chovech detekovány rovněž v minimálním zastoupení a to ve srovnání s infekcí nematody. Nejvyšší prevalence byla pro *M. benedeni* vyhodnocena v roce 2021 před terapeutickou léčbou v jihočeském kraji na 90 %, ale po terapeutické léčbě došlo k poklesu prevalence na 45 %. Vzhledem k vývojovému cyklu u cestod je velmi komplikované stanovit prevalenci z hlediska počtu jedinců v zažívacím traktu hostitele (Ilić et al., 2020). U lichokopytníků byla detekována *A. perfoliata* v nejvyšším zastoupení v chovech v jihočeském kraji. Stejně jako v případě sudokopytníků je velmi obtížné určit u parazitárních infekcí způsobených tasemnicemi skutečnou intenzitu infekce (Iacob et al., 2020). Protože vysoká prevalence může být způsobena jediným jedincem v hostiteli a to díky vysoké produkci vajíček do prostředí.

### 6.2 Terapeutická léčba a účinnost/rezistence anthelmintik

Anthelmintika jsou navržena tak, aby byla toxická pro parazitární zástupce, nicméně lze konstatovat, že vykazují toxicitu i vůči jiným bezobratlým. To je vážný problém, zejména pro druhy, které tráví část svého životního cyklu ve výkalech. Mouchy a brouci jsou v úzké interakci s mikroorganismy, podílejí se na rozkladu trusu, protože hmyz se živí organickým materiálem a pomáhá uvolňovat živiny do půdy. Z hlediska snížení degradace výkalů a omezením kvality a druhové bohatosti půdy v ČR, jak bylo prokázáno studií Ambrožová et al., (2021) nebo Brazílii (Correa et al., 2022), může být ovlivněna rezistentní skupina parazitů

kontaminující pastvinu z důvodu profylaktické léčby. Vzhledem k tomu, že hranice mezi účinností anthelmintik a rezistencí je velmi tenká a z hlediska vhodně zvolené anthelmintické léčby je procento úspěšnosti vyšší (Coles et al., 2006; Mavrot et al., 2015). Nedílnou součástí zvýšené prevalence ve stádě často bývá mj. nedostatečná identifikace a kontrola parazitárních infekcí, které jsou léčeny převážně profylakticky bez předchozích laboratorních testů potvrzujících přítomnost parazitárních druhů. Z tohoto důvodu je celková účinnost anthelmintika snížena a rezistence se tak zvyšuje. Výsledky této studie potvrdily, že v případech kdy byli jedinci léčeni profylakticky, byla prevalence ve stádě/chovu vyšší, ale po cílené léčbě konkrétním anthelmintikem prevalence klesla.

Pro sudokopytníky byla v této studii navržena terapeutická léčba následujícími anthelmintiky – Albex, Aldifal, Biomec, Closamectin, Helmigal, Ivomec super a Panacur. U lichokopytníků byly během terapeutické léčby aplikovány anthelmintika – Ecomectin, Noromectin a Verm-x.

Vzhledem k tomu, že účinnosti anthelmintik u HZ v ČR se věnuje omezené množství studií, lze sledovanou úspěšnost/neúspěšnost terapeutické léčby porovnat pouze s výsledky zahraničních studií. Mimo ČR jsou dostupná i anthelmintika s účinnou složkou, která v ČR není povolena/registrována (Keyyu et al., 2006; Huson et al., 2017; Vokřál et al., 2023).

Nejvíce využívanou skupinou anthelmintik jsou benzimidazoly. Benzimidazoly mají širší spektrum účinku a nízkou toxicitu pro hostitele a poškozují pouze buňky parazita, nikoli hostitele (Muchiut et al., 2018; Li et al., 2021). Metabolismus savců dokáže benzimidazoly odbourat lépe než metabolismus parazitů. U aplikovaných anthelmintik této kategorie byla v této disertační práci prokázána 60 – 86 % účinnost. Nejvíce zastoupeným parazitárním druhem z kmene nematoda byl *H. contortus*, popřípadě *O. ostertagi*. Mimo laboratorní vyšetření lze *H. contortus* detekovat sledováním anémie, například pomocí indexu barvy spojivek FAMACHA (Olah et al., 2015), běžně využívaného v chovech ovcí. Nespolehlivější a účinnou metodou je však určení počtu vajíček/larev ve výkalech stanovených pomocí laboratorních metod (koprologie, PCR; Devaney et al., 2019; Hodgkinson et al., 2019). V parazitologických studiích se proto většina analýz zaměřuje právě na biologické vlastnosti vajíček nebo dospělců (Wang et al., 2020; Li et al., 2021; Wang et al., 2021; Di Maggio et al., 2022). K léčbě *H. contortus* je k dispozici v rámci ČR i Evropy řada anthelmintik a účinné preventivní programy se liší v závislosti na prostředí a typech podniků a podle rozsahu rizika hemonchózy a místní epidemiologie infekcí, jak potvrzují výsledky této studie. Přestože nejčastější možností léčby nematodóz jsou právě benzimidazoly (Floyd et al., 2002; Muchiut et al., 2018; Kaplan et al., 2020), je trendem posledních desítek let léčbu přesto omezit z

hlediska endemické situace rezistence na konkrétní anthelmintika (Niciura et al., 2019; Kaplan et al., 2020; Charlier et al., 2022). Výsledky v této studii potvrdily, že účinnost benzimidazolů u HZ není vždy 100% a riziko rezistence se zvyšuje.

Dalším řešením je z hlediska anthelmintik možná aplikace Clorsulonu, nicméně v ČR není dostupný. V Evropě se používá v kombinované terapii s ivermectiny pro skot v doporučené dávce 2,0 mg/kg. Clorsulon je také účinný proti trematodám (Vokřál et al., 2023).

Studie Ilić et al., (2023) potvrzuje rezistentní kmeny parazitů na ivermektiny benzimidazoly, nicméně v ČR se studii touto problematikou zabývají velmi zřídka a informace nejsou aktuální (Vadlejch et al., 2014, 2015). V této práci nebyla pomocí LDA testů rezistence sledována, nicméně z hlediska snížených účinností anthelmintik lze tuto variantu do budoucna zvažovat.

Parazitární infekce způsobené *M. benedeni* v chovech ovcí, koz, jelenů a muflonů uvedené v této studii byli způsobeny kromě potencionálního přenosu mezi volně žijící zvěří, nedostatečnou hygienou pastvin, kdy výkaly obsahující vajíčka tasemnic nebyla v minulých letech při profylaktické léčbě z pastviny odstraněna a došlo tak ke kontaminaci potravy. Tím byla snížena účinnost anthelmintik a mohla tak být vyvinuta rezistence parazitů. Protože na základě cílené léčby a dodržení zoohygienických postupů, došlo u jedinců infikovaných *M. benedeni* k vyléčení a následná opakovaná infekce byla detekována v kontrolních vzorcích výkalů až po pěti měsících, lze konstatovat, že infekce byla způsobena volně žijící zvěří. Bohužel v rámci chovu pasených HZ není možné zcela omezit přístup těchto jedinců ke stádu.

Výsledky evropských studií (Davies et Wales, 2019; Devaney et al., 2019) jsou srovnatelné s výsledky uvedenými v této práci, nicméně identifikace a kontrola prevalence ve stádě by měla být zohledňována do ekonomického kontextu celého hospodářství a žádný jedinec by neměl být léčen profylakticky, ale cíleně na základě laboratorní diagnostiky parazitárních infekcí. Zároveň bylo v této studii prokázáno, že cílená léčba je z hlediska zdravotního stavu jedince, welfare, ekonomiky a managementu chovu nejefektivnější volbou, jak je ověřeno u zahraničních studií s obdobným zaměřením (Benavides et al., 2016; Vokřál et al., 2019, 2023).

Vznik rezistence na anthelmintika, ale i jiná léčiva, je možný na základě farmakokinetického a farmakodynamického působení. Farmakokinetický mechanismus snižuje koncentraci aktivní formy léčiva v buňce, čímž nemůže dojít k zamýšlenému účinku. Toto může být způsobeno snížením absorpce látky, jejím zrychleným vylučováním nebo aktivací enzymů metabolizujících léčiva (Hodgkinson et al., 2019). Farmakodynamika se týká strukturálních změn cílových makromolekul pro léčiva. Jestliže je látka neschopna se navázat,

nemá možnost přenést svůj účinek dále. Nežádka se rezistence vyvíjí jak na základě farmakodynamického, tak i farmakokinetického mechanismu. Tím se řešení rezistence stává ještě více složitým. Dále k šíření rezistentních populací helmintů vede neznalost jejich biologie a neodborná a nevhodná aplikace léčiv vytvářející pozitivní selekční tlak na jedince nesoucí geny rezistence (Chroust, 2000; Vadlejch 2015). O neodborném používání léčiv svědčí i první záchyty rezistencí krátce po uvedení přípravku na trh, například thiabendazol byl uveden na trh v roce 1961 a první rezistentní populace byly popsány v roce 1964, obdobně tomu bylo i u ivermektinu (uveden - 1981, rezistence - 1988) nebo menopentelu (uveden - 2006, rezistence - 2009). Taktéž běžné výsledky laboratorní metody určené k detekci endoparazitů (flotace a sedimentace), jsou bez hlubších analýz a návaznosti na moderní vědecké metody jako je molekulární biologie a sofistikované laboratorní vyšetření výkalů z hlediska vývoje rezistencí je téměř nevýznamné (Hoste et Torres-Acosta 2011; Charlier et al., 2014; Rondelaud et al., 2015; Lifschitz et al., 2017).

Studie zabývající se LDA testy (Lind et al., 2005) sledují rezistenci dle vývojových stádií larev, nicméně v této práci byla metoda LDA využita pouze pro získání dospělých jedinců pro následnou specifikaci a určení druhu nematody. Laboratorní detekce vývojových stádií a dospělců parazitů byla detekována převážně na základě – flotace a sedimentace jako ve studiích (Cernea et al., 2007; Mooney et al., 2009; Falzon et al., 2014).

### **6.3 Účinnost terapeutické léčby sudokopytníků u parazitárních infekcí *C. daubneyi***

Vzhledem k faktu, že v ČR neexistují žádné studie zabývající se účinnosti léčby benzimidazolem proti *C. daubneyi* a v ČR není registrované žádné anthelmintikum, které by bylo cílené na tuto trematodu, lze účinnost anthelmintik srovnávat pouze na úrovni zahraničních zdrojů, a proto nebyla neregistrovaná anthelmintika zařazena do přehledu výše. Účinná látka oxyklozanid se ve veterinárních léčivých přípravcích dostupných v ČR nenachází a je aplikována především mimo ČR (Keyyu et al., 2006; Mavyenyengwa et al., 2010; Huson et al., 2017) Anthelmintikum Closamectin není primárně určené pro parazitární infekci *C. daubneyi* a účinnost Closamectinu prokázaná v studii však nepotvrzuje výsledky ve srovnání se studií Nzalawahe et al., (2018), kde byla zjištěna neúčinnost Closamectinu z důvodu neúčinnosti anthelmintika na cílovou skupinu *Paramphistomatidae*. Po druhé aplikaci anthelmintik byla hodnota EPG vyšší (EPG 11,7 - 26,1) než hodnota EPG po první aplikaci (EPG 8,1 - 12,4).

V této studii byla sledována účinnost anthelmintik 14 dní po podání léku v souladu se studií Flanagana et al., (2011) který doporučuje stanovit účinnost léku pomocí FECRT 14. den po ošetření u domácích přežvýkavců infikovaných motolicemi, protože tato doba odběru umožňuje úplné odstranění vajíček vývojových stádií z hostitele. Vývojový cyklus trematod je však mnohem delší, excystování trematody trvá déle než měsíc, než se dostane do bachoru (Moazeni et Ahmadi, 2016). Přesto byly vzorky výkalů odebrány 14. den podle metodiky Flanagana et al., (2011). K podobným závěrům dospěli Brockwell et al., (2014), kteří uvedli, že podle výsledků FECRT je účinnost anthelmintika prokazatelná již 7. den po léčbě u skotu infikovaného trematodou.

Studie Cabaret et Berrag (2004) a Holm et al., (2014) potvrdily, že výsledky FECRT mohou být ovlivněny různými faktory, jako jsou podmínky prostředí, úroveň infekce ve stádě a anthelmintická účinnost. Účinnost léčby dále potvrzují studie Vadlejcha et al., (2015) a Martínez-Valladares et al., (2015). Studie Vadlejcha et al., (2015), Gunathilaka et al., (2018) a Vineer et al., (2020) upozorňují, že na každé farmě je nutné dodržovat podmínky biologické bezpečnosti, aby se zabránilo šíření infekčních chorob mimo farmu.

Podrobnější přiblížení tohoto výzkumu zabývajícího se infekcí a účinností anthelmintik *C. daubneyi* je shrnuto v publikaci I.

#### **6.4 Biosekurita a zoohygienu ovlivňující parazitární infekce u hospodářských zvířat**

Parazitární infekce způsobené helminty jsou hlavním omezením efektivní živočišné výroby ve všech chovech HZ. V souvislosti s rostoucím problémem anthelmintické rezistence (Doyle et Cotton, 2019) v posledních desetiletích byl kladen větší důraz na identifikaci stád nebo zvířat s produkčními ztrátami vyvolanými helmintem a zacílením anthelmintické léčby na tyto podskupiny, aby se zachovala anthelmintická účinnost a zároveň se zabránilo ztrátám produkce.

Cílem strategie kontroly parazitárních infekcí v chovech HZ by nemělo být primárním cílem jen snížení úroveň infekce, ale hlavně využití dostupných zdrojů a vstupů (krmivo, pastviny, léky). Tuto domněnku potvrzují zahraniční studie zabývající se managementem chovu HZ s využitím dostupných a soběstačných zdrojů v rámci konkrétní farmy (Skládanka et al., 2010; Jori et al., 2021; Hennessy et Rault 2023). V rámci studie u žádného jedince nebyly zpozorovány klinické příznaky parazitárních infekcí a nebyl ohrožen zdravotní stav jedinců ve stádě stejně jako ve studii Havrdová et al., (2023, 2023a). Právě klinické příznaky jsou jednou ze zásadních příčin nezájmu o tuto problematiku ze strany chovatelů a snížený

zájem o laboratorní metody lze spařovat v tom, že klinické příznaky infekcí se ve většině chovů díky plošné aplikaci léčiv zatím téměř nevyskytují, přestože jak bylo potvrzeno v této studii, GIH patří mezi nejvíce rozšířené parazity u pasených zvířat.

Vznikající fenomén anthelmintické rezistence za poslední roky ale vyžaduje naléhavou úpravu léčebných programů, které při omezení ztrát při výrobě zachovávají účinnosti dostupných anthelmintických účinných látek v dlouhodobém horizontu. Návrat populace parazitů do stavu, kdy je většina jedinců citlivá k účinkům anthelmintik, je teoreticky možný, avšak z praxe prozatím neexistují žádné zprávy o plně úspěšné reverzi. V této studii byla teoretická rezistence na vybraná anthelmintika zpozorována pouze v případě snížené účinnosti, nicméně samotná rezistence zde nebyla hodnocena. Oproti studii Kaplan (2020) nebo Correa et al., (2022) představuje rezistence závažný problém.



## 7 ZÁVĚR

V první řadě je nutné si uvědomit, že ne všechny léčebné postupy jsou vhodné pro jednotlivá zvířata. V každém chovu je nutné volit individuální přístup (dle typu chovu, jeho struktury, managementu, zvířat). Lze konstatovat, že v podstatě neexistuje žádná univerzální metoda ani obecný program terapeutické léčby a je nutné se do problematiky každého chovu/stáda ponořit podrobně. Prevalence ve stádě je tedy kromě intenzity parazitární infekce ovlivněna hlavně zoohygienu a celkovým zdravotním stavem jedinců závislým převážně na výživě.

Většina současných diagnostických testů specifikovaných na parazitární infekce helmintů neinformuje o dopadu výroby. Se současnými výzvami k další udržitelné intenzifikaci živočišné výroby, aby byly uspokojeny požadavky rostoucí a měnící se světové populace, musí být kontrola nematod integrována do ekonomického kontextu celého zemědělského podniku a samozřejmě by každá parazitární infekce měla být řešena individuálně v rámci každého chovu či stáda HZ. Vzhledem k tomu, že nelze posoudit všechny negativní účinky v ekonomickém hledisku pro konkrétní farmu, je většina poznatků založena spíše na očekávaných dopadech, nikoliv na pozorování.

Je třeba zdůraznit, že pro úspěšný reverzní proces není totální eradikace populací parazitů žádoucí, neboť zvířatům by neměl být zcela odepřen přístup k přirozené infekci, a to nejen pro vývoj získané imunity, ale i z důvodů ředění rezistentní genů v populaci parazitů. Z výsledků uvedených v této práci je možné vyvodit následující dílčí výzkumné poznatky, které představují nezbytné primární kroky k dosažení pozitivního efektu ve stádě s relevantní hladinou parazitárních infekcí:

a) zdokumentovat prevalenci a druhovou rezistenci parazitů u sledovaných HZ a následně posoudit potenciální míru přenosu parazitárního onemocnění mezi jednotlivými stády zvířat.

b) porovnat účinnost lokální aplikace veterinárních léčivých anthelmintických přípravků a vyhodnotit účinnost v závislosti na druhové rezistenci zvířat a na jednotlivých druzích/rodech parazitů vyskytujících se v gastrointestinálním traktu zvířat.

c) snížit/omezit spotřebu anthelmintik volbou vhodného individuálního léčebného postupu založeného na laboratorním vyšetření.

Kam by měl výzkum dále směřovat? V současnosti již bylo vynaloženo značné úsilí a vědecký výzkum se stále posouvá vpřed, a to zejména u nových technologií založených na DNA nebo multiplexních technologiích je zapotřebí více poznatků. V posledním kroku se kombinuje specifická diagnostika stáda a dopad produkce se situací transformace vstupů a

výstupů specifickou pro stádo. To povede k optimalizovaným rozhodnutím o zdraví zvířat s ohledem na dostupné zdroje na každé farmy.

Biosekurita tak tvoří nedílnou součást každého podniku/chovu. Striktní dodržování základních zoohygienických pravidel povede k prosperitě podniku.

Dalším cílem by z hlediska farmakologie mělo být kromě vývoje anthelmintik na již rezistentní kmeny, věnováno více pozornosti antiparazitikům určeným cíleně pro kozy, neboť pro tyto zástupce HZ v podstatě neexistuje žádné registrované anthelmintikum.

Dále by se výzkum měl též zabývat druhovou odolností sudokopytníků z hlediska výskytu parazitárních infekcí u jednotlivých plemen.

## 8 REFERENCE

- Abbas, G., Ghafar, A., Bauquier, J., Beasley, A., Ling, E., Gauci, C. G., ... & Jabbar, A. (2023). Prevalence and diversity of ascarid and strongylid nematodes in Australian Thoroughbred horses using next-generation sequencing and bioinformatic tools. *Veterinary parasitology*, 323, 110048.
- Abbas, G., Ghafar, A., Hurley, J., Bauquier, J., Beasley, A., Wilkes, E. J., ... & Jabbar, A. (2021). Cyathostomin resistance to moxidectin and combinations of anthelmintics in Australian horses. *Parasites & Vectors*, 14, 1-10.
- Abbott, K. A., Taylor, M., & Stubbings, L. A. (2004). *Sustainable worm control strategies for sheep*. Scops.
- Adams, J. G. (1978). Pharmacokinetics of levamisole. *The Journal of rheumatology. Supplement*, 4, 137-142.
- Adeba, A., Kassa, T., & Teshale, A. (2022). The occurrence of gastro intestinal parasites of donkeys in and Around Holeta Town, Oromia Regional State, Ethiopia.
- Ahmed, M., Singh, M. N., Bera, A. K., Bandyopadhyay, S., & Bhattacharya, D. (2011). Molecular basis for identification of species/isolates of gastrointestinal nematode parasites. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(8), 589-593.
- Ajmone-Marsan, P., Garcia, J. F., & Lenstra, J. A. (2010). On the origin of cattle: how aurochs became cattle and colonized the world. *Evolutionary Anthropology: Issues, News, and Reviews*, 19(4), 148-157.
- Alvarez-Rojas, C. A., Ansell, B. R., Hall, R. S., Gasser, R. B., Young, N. D., Jex, A. R., & Scheerlinck, J. P. Y. (2015). Transcriptional analysis identifies key genes involved in metabolism, fibrosis/tissue repair and the immune response against *Fasciola hepatica* in sheep liver. *Parasites & vectors*, 8(1), 1-14.
- Ambrožová, L., Sládeček, F. X. J., Zitek, T., Perlík, M., Kozel, P., Jirků, M., & Čížek, L. (2021). Lasting decrease in functionality and richness: Effects of ivermectin use on dung beetle communities. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 321, 107634.

Andrews, P., Thomas, H., Pohlke, R., & Seubert, J. (1983). Praziquantel. *Medicinal research reviews*, 3(2), 147-200.

Angulo-Cubillán, F. J., García-Coiradas, L., Cuquerella, M., De la Fuente, C., & Alunda, J. M. (2007). *Haemonchus contortus* sheep relationship: a review. *Revista Científica*, 17(6), 577-587.

Arnold, K. E., Boxall, A. B., Brown, A. R., Cuthbert, R. J., Gaw, S., Hutchinson, T. H., ... & Thompson, H. M. (2013). Assessing the exposure risk and impacts of pharmaceuticals in the environment on individuals and ecosystems.

Arrabal, J. P., Arce, L. F., Macchiaroli, N., & Kamenetzky, L. (2023). Ecological and molecular associations between neotropical wild felids and *Taenia* (Cestoda: Taeniidae) in the Atlantic Forest: a new report for *Taenia omissa*. *Parasitology Research*, 1-14.

Attwood, S. W., Panasoponkul, C., Upatham, E. S., Meng, X. H., & Southgate, V. R. (2002). *Schistosoma ovuncatum* n. sp. (Digenea: Schistosomatidae) from northwest Thailand and the historical biogeography of Southeast Asian *Schistosoma* Weinland, 1858. *Systematic Parasitology*, 51, 1-19.

Avramenko, R. W., Redman, E. M., Lewis, R., Bichuette, M. A., Palmeira, B. M., Yazwinski, T. A., & Gilleard, J. S. (2017). The use of nemabiome metabarcoding to explore gastro-intestinal nematode species diversity and anthelmintic treatment effectiveness in beef calves. *International journal for parasitology*, 47(13), 893-902.

Babić, S., Pavlović, D. M., Biošić, M., Ašperger, D., Škorić, I., & Runje, M. (2018). Fate of febantel in the aquatic environment—the role of abiotic elimination processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 28917-28927.

Bader, C., Chelladurai, J. J., Starling, D. E., Jones, D. E., & Brewer, M. T. (2017). Assessment of in vitro killing assays for detecting praziquantel induced death in *Posthodiplostomum minimum* metacercariae. *Experimental parasitology*, 181, 70-74.

Bakshi, M., Hebert, D., Gulbranson, C., Bauchan, G., Tuo, W., & Zarlenga, D. (2021). *Ostertagia ostertagi* Mediates Early Host Immune Responses via Macrophage and Toll-Like Receptor Pathways. *Infection and Immunity*, 89(6).

Baptista, A. (2015). Gastrointestinal nematode control in adult dairy cattle. *Veterinary Times*, 45(39), 30-32.

Baranova, M. V., Panova, O. A., Polukhina, D. N., & Panova, D. S. (2022). Reduction of the nematode egg reappearance period in horses after anthelmintic therapy. *Veterinary World*, 15(6), 1530.

Barda, B., Cajal, P., Villagran, E., Cimino, R., Juarez, M., Krolewiecki, A., ... & Albonico, M. (2014). Mini-FLOTAC, Kato-Katz and McMaster: three methods, one goal; highlights from north Argentina. *Parasites & vectors*, 7(1), 1-7.

Bardou-Valette, S., Grenier, E., & Montarry, J. (2016). Occurrence of the tobacco cyst nematode subspecies *Globodera tabacum* subsp. *virginiae* in France. *European Journal of Plant Pathology*, 144, 199-203.

Barelli, C., Donati, C., Albanese, D., Pafčo, B., Modrý, D., Rovero, F., & Hauffe, H. C. (2021). Interactions between parasitic helminths and gut microbiota in wild tropical primates from intact and fragmented habitats. *Scientific Reports*, 11(1), 21569.

Bártíková, H., Podlipná, R., & Skálová, L. (2016). Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere*, 144, 2290-2301.

Behm, C. A., & Sangster, N. C. (1999). Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects,[in:] Dalton JP (ed): Fasciolosis. *CAB International*, Wallingford, UK, 1999, pp.185–224.

Benavides, M. V., Sonstegard, T. S., & Van Tassel, C. (2016). Genomic regions associated with sheep resistance to gastrointestinal nematodes. *Trends in parasitology*, 32(6), 470-480.

Benecke, N. (2005). The Holocene distribution of European bison-the archaeozoological record. *Munibe Antropologia-Arkeologia*, (57), 421-428.

Bennema, S. C., Vercruysse, J., Morgan, E., Stafford, K., Höglund, J., Demeler, J., ... & Charlier, J. (2010). Epidemiology and risk factors for exposure to gastrointestinal nematodes in dairy herds in northwestern Europe. *Veterinary Parasitology*, 173(3-4), 247-254.

Besier, R. B., Kahn, L. P., Sargison, N. D., & Van Wyk, J. A. (2016). Diagnosis, treatment and management of *Haemonchus contortus* in small ruminants. *Advances in parasitology*, 93, 181-238.

Blaxter, M. (1998). *Caenorhabditis elegans* is a nematode. *Science*, 282(5396), 2041-2046.

Blouin, M. S. (2002). Molecular prospecting for cryptic species of nematodes: mitochondrial DNA versus internal transcribed spacer. *International journal for parasitology*, 32(5), 527-531.

Botto, V. et al. (1984). Chov hovädzieho dobytku. První vydání. Příroda, Bratislava. ISBN 64-006-84.

Bowman, D. D. Georgis' parasitology for veterinarians. 9. vyd. St. Louis: Saunders Elsevier, 2009, 451 s. ISBN 978-1-4160-4412-3.

Brockwell, Y. M., Elliott, T. P., Anderson, G. R., Stanton, R., Spithill, T. W., & Sangster, N. C. (2014). Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 4(1), 48-54.

Bundy, D. A., Appleby, L. J., & Brooker, S. J. (2020). Nematodes Limited to the Intestinal Tract (*Enterobius vermicularis*, *Trichuris trichiura*, *Capillaria philippinensis*, and *Trichostrongylus* spp.). In *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* (pp. 834-839). Elsevier.

Burčáková, L., Königová, A., Kuzmina, T. A., Austin, C. J., Matthews, J. B., Lightbody, K. L., ... & Várady, M. (2023). Equine tapeworm (*Anoplocephala* spp.) infection: evaluation of saliva- and serum-based antibody detection methods and risk factor analysis in Slovak horse populations. *Parasitology Research*, 1-16.

Cabaret, J., & Berrag, B. (2004). Faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy: average versus individually based estimations. *Veterinary parasitology*, 121(1-2), 105-113.

Cable, R. M. (1943). An illustrated laboratory manual of parasitology. *An illustrated laboratory manual of parasitology.*, (Revised edn).

Cameron, A., & McAllister, T. A. (2016). Antimicrobial usage and resistance in beef production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7, 1-22.

Cerda, C., Veloso-Frías, J., Lobos-Chávez, F., Oyarzún-Ruiz, P., Henríquez, A., Loyola, M., ... & Landaeta-Aqueveque, C. (2019). Morphological and molecular identification with frequency analysis of *Calicophoron microbothrioides* in central Chile. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28, 582-591.

Cernea, M., Cernea, C., Diana, M. O. O., Raileanu, S., & Cozma, V. (2007). Eggs hatching and larval development assay of strongyls resistance at benzimidazoles in zoo equines. *Lucrari Stiintifice-Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara*, 40, 140-146.

Clarke, N. E., Doi, S. A., Wangdi, K., Chen, Y., Clements, A. C., & Nery, S. V. (2019). Efficacy of anthelmintic drugs and drug combinations against soil-transmitted helminths: a systematic review and network meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases*, 68(1), 96-105.

Clauss, M. (2020). Emission of bioaerosols from livestock facilities: Methods and results from available bioaerosol investigations in and around agricultural livestock farming.

Clayton, H. M. (1986). Ascarids: recent advances. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 2(2), 313-328.

Cobb, R., & Boeckh, A. (2009). Moxidectin: a review of chemistry, pharmacokinetics and use in horses. *Parasites & vectors*, 2(2), 1-8.

Coles, G. C., Jackson, F., Pomroy, W. E., Prichard, R. K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., ... & Vercruyse, J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary parasitology*, 136(3-4), 167-185.

Cooper, P., Walker, A. W., Reyes, J., Chico, M., Salter, S. J., Vaca, M., & Parkhill, J. (2013). Patent human infections with the whipworm, *Trichuris trichiura*, are not associated with alterations in the faecal microbiota. *PLoS one*, 8(10), e76573.

Correa, C. M., Ferreira, K. R., Abot, A. R., Louzada, J., & Vaz-de-Mello, F. Z. (2022). Ivermectin impacts on dung beetle diversity and their ecological functions in two distinct Brazilian ecosystems. *Ecological Entomology*, 47(5), 736-748.

Crump, A., & Omura, S. (2011). Ivermectin, 'wonder drug' from Japan: the human use perspective. *Proceedings of the Japan academy, Series B*, 87(2), 13-28.

Čondlová, Š., Horčíčková, M., Havrdová, N., Sak, B., Hlásková, L., Perek-Matysiak, A., ... & Kváč, M. (2019). Diversity of *Cryptosporidium* spp. in *Apodemus* spp. in Europe. *European Journal of Protistology*, 69, 1-13.

Danilova, N. V., Kuryntseva, P. A., Tagirov, M. S., Galitskaya, P. Y., & Selivanovskaya, S. Y. (2019). Spreading of antibiotic resistance as a result of soil fertilization by manure composts containing oxytetracycline and antibiotic-resistant genes. *Proceedings of Kazan University. Natural Sciences/Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 161(3).

Dargie, J. D., & Berry, C. I. (1979). The hypoalbuminaemia of ovine fascioliasis: the influence of protein intake on the albumin metabolism of infected and of pair-fed control sheep. *International Journal for parasitology*, 9(1), 17-25.

David, T. J., & AP, W. M. (2006). *Vogel's Medical Parasitology*; Saunders Elsevier: St. Louis, MO, USA, 210AD.

Davies, R., & Wales, A. (2019). Antimicrobial resistance on farms: a review including biosecurity and the potential role of disinfectants in resistance selection. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 18(3), 753-774.

de Souza Rodrigues, F., Cezar, A. S., de Menezes, F. R., Sangioni, L. A., Vogel, F. S. F., & de Avila Botton, S. (2017). Efficacy and economic analysis of two treatment regimens using toltrazuril in lambs naturally infected with *Eimeria* spp. on pasture. *Parasitology research*, 116, 2911-2919.

de Souza, R. B., & Guimarães, J. R. (2022). Effects of avermectins on the environment based on its toxicity to plants and soil invertebrates—A review. *Water, Air, & Soil Pollution*, 233(7), 259.

de Waal, T. D. (2010). Paramphistomum—a brief review. *Irish Veterinary Journal*, 63(5), 313-315.



Decker, J. E., McKay, S. D., Rolf, M. M., Kim, J., Molina Alcalá, A., Sonstegard, T. S., ... & Taylor, J. F. (2014). Worldwide patterns of ancestry, divergence, and admixture in domesticated cattle. *PLoS genetics*, *10*(3), e1004254.

Demeler, J., Kleinschmidt, N., Küttler, U., Koopmann, R., & von Samson-Himmelstjerna, G. (2012). Evaluation of the egg hatch assay and the larval migration inhibition assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. *Parasitology International*, *61*(4), 614-618.

Deplazes, P., Eckert, J., Mathis, A., von Samson-Himmelstjerna, G., & Zahner, H. (2016). Parasitology in veterinary medicine. In *Parasitology in Veterinary Medicine*. Wageningen Academic.

Devaney, E., Matthews, L., Milne, C., Howell, S., McIntyre, J., Ezenwa, V., ... & Park, A. W. (2019). Refugia and anthelmintic resistance: concepts and challenges. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*.

Di Maggio, L. S., Curtis, K. C., Erdmann-Gilmore, P., Sprung, R. S., Townsend, R. R., Weil, G. J., & Fischer, P. U. (2022). Comparative proteomics of adult *Paragonimus kellicotti* excretion/secretion products released *in vitro* or present in the lung cyst nodule. *PLoS neglected tropical diseases*, *16*(8), e0010679.

Diop, G., Yanagida, T., Hailemariam, Z., Menkir, S., Nakao, M., Sako, Y., ... & Ito, A. (2015). Genetic characterization of *Moniezia* species in Senegal and Ethiopia. *Parasitology international*, *64*(5), 256-260.

Dolinská, M., Ivanišínová, O., Königová, A., & Várady, M. (2014). Anthelmintic resistance in sheep gastrointestinal nematodes in Slovakia detected by *in vitro* methods. *BMC Veterinary Research*, *10*, 1-5.

Dow, C., Ross, J. G., & Todd, J. R. (1968). The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Parasitology*, *58*(1), 129-135.

Doyle, S. R., & Cotton, J. A. (2019). Genome-wide approaches to investigate anthelmintic resistance. *Trends in parasitology*, *35*(4), 289-301.

Dunn, A. M. (1978). *Veterinary helminthology* (No. 2nd Ed.). William Heinemann Medical Books Ltd..

Elsworth, B., Wasmuth, J., & Blaxter, M. (2011). NEMBASE4: the nematode transcriptome resource. *International journal for parasitology*, *41*(8), 881-894.

Engell-Sørensen, K., Pall, A., Damgaard, C., & Holmstrup, M. (2018). Seasonal variation in the prevalence of equine tapeworms using coprological diagnosis during a seven-year period in Denmark. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, *12*, 22-25.

Epe, C., & Kaminsky, R. (2013). New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine. *TRENDS in Parasitology*, *29*(3), 129-134.

Eysker, M., & Ploeger, H. W. (2000). Value of present diagnostic methods for gastrointestinal nematode infections in ruminants. *Parasitology*, *120*(7), 109-119.

Falzon, L. C., O'Neill, T. J., Menzies, P. I., Peregrine, A. S., Jones-Bitton, A., & Mederos, A. (2014). A systematic review and meta-analysis of factors associated with anthelmintic resistance in sheep. *Preventive veterinary medicine*, *117*(2), 388-402.

Fayisa, O., Duguma, A., Temesgen, M., & Lemma, F. (2020). Gastrointestinal parasites of sheep and goat in and around Gondar town, Northwest, Ethiopia. *Biotechnology in Animal Husbandry*, *36*(3), 371-380.

Fernandez, M., Garcia, J. J., Sierra, M., Diez, M. J., & Teran, M. T. (1998). Bioavailability of levamisole after intramuscular and oral administration in sheep. *New Zealand veterinary journal*, *46*(5), 173-176.

Flanagan, A., Edgar, H. W. J., Gordon, A., Hanna, R. E. B., Brennan, G. P., & Fairweather, I. (2011). Comparison of two assays, a faecal egg count reduction test (FECRT) and a coproantigen reduction test (CRT), for the diagnosis of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary parasitology*, *176*(2-3), 170-176.

Flores-Crespo, J., Herrera-Rodríguez, D., de Gives, P. M., Liébano-Hernández, E., Vázquez-Prats, V. M., & López-Arellano, M. E. (2003). The predatory capability of three nematophagous fungi in the control of *Haemonchus contortus* infective larvae in ovine faeces. *Journal of helminthology*, *77*(4), 297-303.

Flota-Burgos, G. J., Rosado-Aguilar, J. A., Rojas-Becerril, R., Rodríguez-Vivas, R. I., & Trinidad-Martínez, I. (2023). Evidence of resistance to ivermectin in the gastrointestinal

nematodes of horses from Mexican southeast. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 44, 100907.

Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., & Blaxter, M. (2002). Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular ecology*, 11(4), 839-850.

Foster, A. P., Otter, A., O'sullivan, T., Cranwell, M. P., Twomey, D. F., Millar, M. F., & Taylor, M. A. (2008). Rumen fluke (paramphistomosis) in British cattle. *The Veterinary record*, 162(16), 528.

Fox, M. T. (1993). Pathophysiology of infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Veterinary parasitology*, 46(1-4), 143-158.

Galtier, P., & Alvinerie, M. (1996). Pharmacological basis for hepatic drug metabolism in sheep. *Veterinary research*, 27(4-5), 363-372.

Gasser, R. B., Bott, N. J., Chilton, N. B., Hunt, P., & Beveridge, I. (2008). Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock—bionomic and biotechnological implications. *Biotechnology Advances*, 26(4), 325-334.

Genes, L., Svenning, J. C., Pires, A. S., & Fernandez, F. A. (2019). Why we should let rewilding be wild and biodiverse. *Biodiversity and Conservation*, 28, 1285-1289.

Gettinby, G., & Paton, G. (1981). The role of temperature and other factors in predicting the pattern of bovine *Ostertagia* spp. infective larvae on pasture. *Journal of Thermal Biology*, 6(4), 395-402.

Gettinby, G., Bairden, K., Armour, J., & Benitez-Usher, C. (1979). A prediction model for bovine ostertagiasis. *The Veterinary Record*, 105(3), 57-59.

Geurden, T., Chartier, C., Fanke, J., Di Regalbono, A. F., Traversa, D., von Samson-Himmelstjerna, G., ... & Denwood, M. J. (2015). Anthelmintic resistance to ivermectin and moxidectin in gastrointestinal nematodes of cattle in Europe. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 5(3), 163-171.

González-Garduño, R., Navarro Martínez, F., & Arece-García, J. (2014). Presencia de *Cooperia curticei*, *Cooperia punctata* y *Trichostrongylus colubriformis*, (Strongylida: Trichostrongylidae) en Tabasco, México. *Revista de Salud Animal*, 36(3), 159-163.

González-Warleta, M., Lladosa, S., Castro-Hermida, J. A., Martínez-Ibeas, A. M., Conesa, D., Muñoz, F., ... & Mezo, M. (2013). Bovine paramphistomosis in Galicia (Spain): prevalence, intensity, aetiology and geospatial distribution of the infection. *Veterinary Parasitology*, 191(3-4), 252-263.

Gordon, D. K., Roberts, L. C. P., Lean, N., Zadoks, R. N., Sargison, N. D., & Skuce, P. J. (2013). Identification of the rumen fluke, *Calicophoron daubneyi*, in GB livestock: possible implications for liver fluke diagnosis. *Veterinary parasitology*, 195(1-2), 65-71.

Götherström A., Anderung C., Hellborg L., Elburg R., Smith C., Bradley D. G., Ellegren H. 2005. Cattle domestication in the Near East was followed by hybridization with aurochs bulls in Europe. *Proceedings of the Royal Society*

Gunathilaka, N., Niroshana, D., Amarasinghe, D., & Udayanga, L. (2018). Prevalence of gastrointestinal parasitic infections and assessment of deworming program among cattle and buffaloes in Gampaha District, Sri Lanka. *BioMed research international*, 2018.

Hall, S. J. (2018). A novel agroecosystem: beef production in abandoned farmland as a multifunctional alternative to rewilding. *Agricultural Systems*, 167, 10-16.

Hall, S. J., & Bunce, R. G. (2019). The use of cattle *Bos taurus* for restoring and maintaining holarctic landscapes: Conclusions from a long-term study (1946–2017) in northern England. *Ecology and Evolution*, 9(10), 5859-5869.

Hampl, V. 2010. Diverzita parazitů. *Živa: Rozhled v oboru veškeré přírody* redakce. 1-2.

Harder, A. (2002). Chemotherapeutic approaches to nematodes: current knowledge and outlook. *Parasitology Research*, 88(3), 272-277.

Havrdová N., Roztočil D., Petrášková E., Tejml P., Kernerová N., Poborská A., Vráblík P., Novák P., Malá G., Zevlová E., Maurer J., Beran J., Zábranský L., Šoch M. 2023. The effect of the number of feed pushing-ups on animal behavior, dry matter intake and milk yield of dairy cows. *Journal of Central European Agriculture*, 2023, 24(4). p. 789-801. DOI: 10.5513/JCEA01/24.4.3827.

Havrdová N., Havrda O., Čondlová Š., Pecová L., Kernerová N., Beran J., Šoch M. 2023. *Calicophoron daubneyi* (Digenea: Paramphistomidae): The efficacy of anthelmintics in naturally infected cattl. *Journal of Central European Agriculture*, 2023, 24(4), p. 817-826. DOI:10.5513/JCEA01/24.4.4053

Hasegawa, H., Kalousova, B., McLennan, M. R., Modry, D., Profousova-Psenkova, I., Shutt-Phillips, K. A., ... & Petrzalkova, K. J. (2016). Strongyloides infections of humans and great apes in Dzanga-Sangha Protected Areas, Central African Republic and in degraded forest fragments in Bulindi, Uganda. *Parasitology international*, 65(5), 367-370.

Hennessy, D. A., & Rault, A. (2023). On systematically insufficient biosecurity actions and policies to manage infectious animal disease. *Ecological Economics*, 206, 107740.

Herrero, M., & Thornton, P. K. (2013). Livestock and global change: Emerging issues for sustainable food systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(52), 20878-20881.

Hodgkinson, Jane E.; Kaplan, Ray M.; Kenyon, Fiona; Morgan, Eric R.; Park, Andrew W.; Paterson, Steve; Babayan, Simon A.; Beesley, Nicola J.; Britton, Collette; Chaudhry, Umer; Doyle, Stephen R.; Ezenwa, Vanessa O.; Fenton, Andy; Howell, Sue B.; Laing, Roz; Mable, Barbara K.; Matthews, Louise; McIntyre, Jennifer; Milne, Catherine E.; Morrison, Thomas A.; Prentice, Jamie C.; Sargison, Neil D.; Williams, Diana J.L.; Wolstenholme, Adrian J.; Devaney, Eileen (2019). Refugia and anthelmintic resistance: Concepts and challenges. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 10(), 51–57. doi:10.1016/j.ijpddr.2019.05.001

Höglund, J., Engström, A., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., & Tydén, E. (2013). Real-time PCR detection for quantification of infection levels with *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in cattle faeces. *Veterinary parasitology*, 197(1-2), 251-257.

Holm, S. A., Sörensen, C. R., Thamsborg, S. M., & Enemark, H. L. (2014). Gastrointestinal nematodes and anthelmintic resistance in Danish goat herds. *Parasi*

Horák, P., & Scholz, T. (1998). *Biologie helmintů*. Karolinum.

Hoste, H., & Torres-Acosta, J. F. J. (2011). Non chemical control of helminths in ruminants: adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary parasitology*, 180(1-2), 144-154.

Hu, H. W., Han, X. M., Shi, X. Z., Wang, J. T., Han, L. L., Chen, D., & He, J. Z. (2016). Temporal changes of antibiotic-resistance genes and bacterial communities in two contrasting soils treated with cattle manure. *FEMS microbiology ecology*, 92(2), fiv169.

Hu, M., D'Amelio, S., Zhu, X., Paggi, L., & Gasser, R. (2001). Mutation scanning for sequence variation in three mitochondrial DNA regions for members of the *Contraecum osculatum* (Nematoda: Ascaridoidea) complex. *Electrophoresis*, 22(6), 1069-1075.

Hu, Y., Xiao, S. H., & Aroian, R. V. (2009). The new anthelmintic tribendimidine is an L-type (levamisole and pyrantel) nicotinic acetylcholine receptor agonist. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(8), e499.

Huber, N., Andraud, M., Sassu, E. L., Prigge, C., Zoche-Golob, V., Käsbohrer, A., ... & Burow, E. (2022). What is a biosecurity measure? A definition proposal for animal production and linked processing operations. *One Health*, 100433.

Hurisa, G., Yimer, L., & Amante, M. (2021). Species Composition and Burden of Small Intestinal Parasitic Helminth in Goats and Sheep Slaughtered at Bishoftu Elfora Export Abattoir (Ethiopia). *Veterinary Medicine: Research and Reports*, 235-239.

Huson, K. M., Oliver, N. A., & Robinson, M. W. (2017). Paramphistomosis of ruminants: an emerging parasitic disease in Europe. *Trends in parasitology*, 33(11), 836-844.

Charlier, J., Bartley, D. J., Sotiraki, S., Martinez-Valladares, M., Claerebout, E., von Samson-Himmelstjerna, G., ... & Rinaldi, L. (2022). Anthelmintic resistance in ruminants: Challenges and solutions. *Advances in parasitology*, 115, 171-227.

Charlier, J., Levecke, B., Devleeschauwer, B., Vercruyse, J., & Hogeveen, H. (2012). The economic effects of whole-herd versus selective anthelmintic treatment strategies in dairy cows. *Journal of dairy science*, 95(6), 2977-2987.

Charlier, J., Thamsborg, S. M., Bartley, D. J., Skuce, P. J., Kenyon, F., Geurden, T., ... & Claerebout, E. (2018). Mind the gaps in research on the control of gastrointestinal nematodes of farmed ruminants and pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65, 217-234.

Charlier, J., van der Voort, M., Kenyon, F., Skuce, P., & Vercruyse, J. (2014). Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends in parasitology*, 30(7), 361-367.

Chauvin, A., Moreau, E., & Boulard, C. (2001). Responses of *Fasciola hepatica* infected sheep to various infection levels. *Veterinary Research*, 32(1), 87-92.

Chen, Q., Yu, H. Q., Lun, Z. R., Chen, X. G., Song, H. Q., Lin, R. Q., & Zhu, X. Q. (2008). Specific PCR assays for the identification of common anisakid nematodes with zoonotic potential. *Parasitology Research*, 104, 79-84.

Chen, Y., Zhang, T., Xian, M., Zhang, R., Yang, W., Su, B., ... & Li, J. (2022). A draft genome of Drung cattle reveals clues to its chromosomal fusion and environmental adaptation. *Communications Biology*, 5(1), 353.

Christie, M. G., Hart, R., Angus, K. W., Devoy, J., & Patterson, J. E. (1978). Resistance to *Haemonchus contortus* in sheep given repeated daily doses of 10 000 infective larvae. *Journal of Comparative Pathology*, 88(2), 157-165.

Chroust K. 1996. Parazitózy prasat. *Náš chov*. 2:36-38.

Chroust, K. (2000). Occurrence of anthelmintic resistance in strongylid nematodes of sheep and horses in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina*, 45(8), 233-239.

Iacob, O. C., El-Deeb, W. M., Pasca, S. A., & Turtoi, A. I. (2020). Uncommon co-infection due to *Moniezia expansa* and *Moniezia benedeni* in young goats from Romania: Morphological and histopathological analysis. *Annals of parasitology*, 66(4).

Iglesias-Piñeiro, J., González-Warleta, M., Castro-Hermida, J. A., Córdoba, M., González-Lanza, C., Manga-González, Y., & Mezo, M. (2016). Transmission of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in Galicia (Spain): Temporal follow-up in the intermediate and definitive hosts. *Parasites & Vectors*, 9(1), 1-14.

Ilić, T., Bogunović, D., Nenadović, K., Gajić, B., Dimitrijević, S., Popović, G., ... & Milosavljević, P. (2023). Gastrointestinal helminths in horses in Serbia and various factors affecting the prevalence. *Acta Parasitologica*, 68(1), 56-69.

Jíra, J. (1998). *Lékařská helmintologie: helmintoparazitární nemoci*. První vydání. Galén, Praha. ISBN 80-85824-82-5.

Jones, R. A., Brophy, P. M., Mitchell, E. S., & Williams, H. W. (2017). Rumen fluke (*Calicophoron daubneyi*) on Welsh farms: prevalence, risk factors and observations on co-infection with *Fasciola hepatica*. *Parasitology*, *144*(2), 237-247.

Jori, F., Hernandez-Jover, M., Magouras, I., Dürr, S., & Brookes, V. J. (2021). Wildlife–livestock interactions in animal production systems: what are the biosecurity and health implications?. *Animal frontiers*, *11*(5), 8-19.

Jyoti, Singh, N. K., & Juyal, P. D. (2014). Prevalence of gastro-intestinal parasites in buffalo calves from different agro-climatic zones of Punjab. *Journal of Parasitic Diseases*, *38*, 367-370.

Kaplan, R. M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in parasitology*, *20*(10), 477-481.

Kaplan, R. M. (2020). Biology, epidemiology, diagnosis, and management of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of livestock. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, *36*(1), 17-30.

Karadzovska, D., Seewald, W., Browning, A., Smal, M., Bouvier, J., & Giraudel, J. M. (2009). Pharmacokinetics of monepantel and its sulfone metabolite, monepantel sulfone, after intravenous and oral administration in sheep. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, *32*(4), 359-367.

Kassai, T. (1999). *Veterinary helminthology*. Třetí vydání. Butterworth-Heinemann, Boston. ISBN 0-7506-3563-0.

Kelly, R. F., Evans, M., & Sargison, N. D. (2021). Identifying knowledge gaps in *Moniezia expansa* epidemiology: a report of a small intestinal torsion in a 5-week-old lamb. *New Zealand Veterinary Journal*, *69*(3), 186-189.

Keyyu, J. D., Kassuku, A. A., Msalilwa, L. P., Monrad, J., & Kyvsgaard, N. C. (2006). Cross-sectional prevalence of helminth infections in cattle on traditional, small-scale and large-scale dairy farms in Iringa district, Tanzania. *Veterinary research communications*, *30*, 45-55.



Khattak, B., Safi, A. U. R., Sindhu, Z. U. D., Attaullah, M., Jamal, Q., Khan, T. A., ... & Khan, I. A. (2018). Biological control of *Haemonchus contortus* by fungal antagonists in small ruminants. *Applied Ecology & Environmental Research*, 16(5).

Kochapakdee, S., Pandey, V. S.; Pralomkarn, W.; Chondumrongkul, S.; Ngampongsai, W.; Lawpetchara, A. Anthelmintic resistance in goats from Southern Thailand. *Vet Rec* 1995, 137, 124–125. doi: 10.1136/vr.137.5.124

Kotrlá, B., Černý, V., Kotrlý, A., Minář, J., & Ryšavý, B. a Šebek, Z.(1984) *Parazitózy zvířete. 1. vyd. Praha: Academia, 192 s.* ISBN 21-055-84.

Kotze, A. C., Gilleard, J. S., Doyle, S. R., & Prichard, R. K. (2020). Challenges and opportunities for the adoption of molecular diagnostics for anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14, 264-273.

Kozat, S., & Denizhan, V. (2010). Glucose, lipid, and lipoprotein levels in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Journal of Parasitology*, 96(3), 657-659.

Kuemmerle, T., Perzanowski, K., Chaskovskyy, O., Ostapowicz, K., Halada, L., Bashta, A. T., ... & Radeloff, V. C. (2010). European bison habitat in the Carpathian Mountains. *Biological conservation*, 143(4), 908-916.

Kumar, G., Selvakkumar, R., & Edwin, S. C. (2020). Fenbendazole and praziquantel resistance in *Moniezia expansa* in Jamunapari goat kids. *J. Entomol. Zool. Stud*, 8, 1124-1125.

Lamka, J., & Ducháček, L. (2014). *Veterinární léčiva pro posluchače farmacie*. Karolinum Press.

Leathwick, D. M., Sauermann, C. W., Geurden, T., & Nielsen, M. K. (2017). Managing anthelmintic resistance in *Parascaris* spp.: A modelling exercise. *Veterinary parasitology*, 240, 75-81.

Lee, M. B., & Greig, J. D. (2010). A review of gastrointestinal outbreaks in schools: effective infection control interventions. *Journal of School Health*, 80(12), 588-598.

Li, X., Jiang, S., Wang, X., Hui, W., & Jia, B. (2021). iTRAQ-based comparative proteomic analysis in different developmental stages of *Echinococcus granulosus*. *Parasite*, 28.

Lifschitz, A., Lanusse, C., & Alvarez, L. (2017). Host pharmacokinetics and drug accumulation of anthelmintics within target helminth parasites of ruminants. *New Zealand Veterinary Journal*, 65(4), 176-184.

Lichtenfels, J. R., Kharchenko, V. A., & Dvojnos, G. M. (2008). Illustrated identification keys to strongylid parasites (Strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). *Veterinary parasitology*, 156(1-2), 4-161.

Lind, E. O., Uggla, A., Waller, P., & Höglund, J. (2005). Larval development assay for detection of anthelmintic resistance in cyathostomins of Swedish horses. *Veterinary parasitology*, 128(3-4), 261-269.

Lindrose, A. R., Fraser, J. A., Hickey, P. W., & Mitre, E. (2022). Costs and prescribing patterns of anthelmintics in the United States military: a retrospective analysis. In *Open Forum Infectious Diseases* (Vol. 9, No. 3, p. ofac040). US: Oxford University Press.

Liu, G., Liu, Q., Han, Z., Wang, P., & Li, Y. (2023). Comparative proteomics analysis of adult *Haemonchus contortus* isolates from *Ovis ammon*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1087210.

Lu, M., Tian, X., Yang, Z., Wang, W., Tian, A. L., Li, C., ... & Li, X. (2020). Proteomic analysis revealed T cell hyporesponsiveness induced by *Haemonchus contortus* excretory and secretory proteins. *Veterinary Research*, 51(1), 1-14.

Lumaret, J. P., & Errouissi, F. (2002). Use of anthelmintics in herbivores and evaluation of risks for the non target fauna of pastures. *Vet. Res*, 33(5), 547-562.

Lyons, E. T., Drudge, J. H., & Tolliver, S. C. (2000). Larval cyathostomiasis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 16(3), 501-513.

Ma, G., Wang, T., Korhonen, P. K., Stroehlein, A. J., Young, N. D., & Gasser, R. B. (2019). Dauer signalling pathway model for *Haemonchus contortus*. *Parasites & vectors*, 12, 1-11.

Mage, C., Bourgne, H., Toullieu, J. M., Rondelaud, D., & Dreyfuss, G. (2002). *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in

cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Veterinary research*, 33(5), 439-447.

Mahieu, M., Arquet, R., Fleury, J., Bonneau, M., & Mandonnet, N. (2020). Mixed grazing of adult goats and cattle: Lessons from long-term monitoring. *Veterinary parasitology*, 280, 109087.

Malan, F. S., Wessels, C. D., & Van Wyk, J. A. (2001). Clinical evaluation of anaemia in sheep: early trials.

Marchiondo, A. A. et al. (2019a). Nematoda. In Marchiondo, A. A., Cruthers, L. R., & Reinemeyer C. R. (Eds.), *Screening*, Volume 2. První vydání, Elsevier Science Publishing Co Inc, Spojené státy, pp. 135-335 ISBN 978-01-281-6577-5.

Marchiondo, A. A., Cruthers, L. R., & Fourie, J. J. (Eds.). (2019). *Parasiticide Screening: Volume 1: In Vitro and In Vivo Tests with Relevant Parasite Rearing and Host Infection/Infestation Methods*. Academic Press.

Marchiondo, A. A., Holdsworth, P. A., Fourie, L. J., Rugg, D., Hellmann, K., Snyder, D. E., & Dryden, M. W. (2013). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP): guidelines for evaluating the efficacy of parasiticides for the treatment, prevention and control of flea and tick infestations on dogs and cats. *Vet parasitol*, 194(1), 84-97.

Martin, R. J. (1997). Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal*, 154(1), 11-34.

Martin, R. J., Robertson, A. P., & Choudhary, S. (2021). Ivermectin: an anthelmintic, an insecticide, and much more. *Trends in parasitology*, 37(1), 48-64.

Martinez-Ibeas, A. M., Munita, M. P., Lawlor, K., Sekiya, M., Mulcahy, G., & Sayers, R. (2016). Rumen fluke in Irish sheep: prevalence, risk factors and molecular identification of two paramphistome species. *BMC Veterinary Research*, 12(1), 1-11.

Martínez-Pérez, J. M., Robles-Pérez, D., Rojo-Vázquez, F. A., & Martínez-Valladares, M. (2012). Comparison of three different techniques to diagnose *Fasciola hepatica* infection in experimentally and naturally infected sheep. *Veterinary parasitology*, 190(1-2), 80-86.

Martínez-Valladares, M., Geurden, T., Bartram, D. J., Martínez-Pérez, J. M., Robles-Pérez, D., Bohórquez, A., ... & Rojo-Vázquez, F. A. (2015a). Resistance of gastrointestinal nematodes to the most commonly used anthelmintics in sheep, cattle and horses in Spain. *Veterinary Parasitology*, 211(3-4), 228-233.

Martínez-Valladares, M., Geurden, T., Bartram, D. J., Martínez-Pérez, J. M., Robles-Pérez, D., Bohórquez, A., ... & Rojo-Vázquez, F. A. (2015). Resistance of gastrointestinal nematodes to the most commonly used anthelmintics in sheep, cattle and horses in Spain. *Veterinary Parasitology*, 211(3-4), 228-233. *te*, 21.

Martins, A. V., Coelho, A. D. L., Corrêa, L. L., Ribeiro, M. S., Lobão, L. F., Palmer, J. P. S., ... & Barbosa, A. D. S. (2023). First microscopic and molecular parasitological survey of *Strongylus vulgaris* in Brazilian ponies. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 32, e006323.

Martins, N. S., Dos Santos, C. C., da Motta, S. P., da Silva Moreira, A., da Rosa Farias, N. A., & Ruas, J. L. (2022). Gastrointestinal Parasites in sheep from the Brazilian Pampa Biome: prevalence and associated factors. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 44.

Maruta, T., Kenfack, J. A. N., Tebeje, Y. K., Bangure, D., & Ouma, A. E. O. (2023). Regional approach to strengthening biosafety and biosecurity systems in Africa. *Global Security: Health, Science and Policy*, 8(1), 2257766.

Mason, C., Stevenson, H., Cox, A., & Dick, I. (2012). Disease associated with immature paramphistome infection in sheep. *The Veterinary record*, 170(13), 343.

Mattiucci, S., Cianchi, R., Nascetti, G., Paggi, L., Sardella, N., Timi, J., ... & Bullini, L. (2003). Genetic evidence for two sibling species within *Contraecum ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941 (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of boreal and austral regions. *Systematic Parasitology*, 54, 13-23.

Mavenyengwa, M., Mukaratirwa, S., & Monrad, J. (2010). Influence of *Calicophoron microbothrium* amphistomosis on the biochemical and blood cell counts of cattle. *Journal of helminthology*, 84(4), 355-361.

Mavrot, F., Hertzberg, H., & Torgerson, P. (2015). Effect of gastro-intestinal nematode infection on sheep performance: a systematic review and meta-analysis. *Parasites & vectors*, 8, 1-11.

McKellar, Q. A. (1997). Ecotoxicology and residues of anthelmintic compounds. *Veterinary parasitology*, 72(3-4), 413-435.

Mehlhorn, H. (2007). Encyclopedia of parasitology: Volume 2, NZ. *Encyclopedia of parasitology: Volume 2, NZ.*, (Edn. 3).

Mehlhorn, H. (2008). Encyclopedia of parasitology: Volume 1, AM. *Encyclopedia of parasitology: Volume 1, AM.*, (Edn. 3).

Mendez, J., Sun, D., Tuo, W., & Xiao, Z. (2018). Bovine neutrophils form extracellular traps in response to the gastrointestinal parasite *Ostertagia ostertagi*. *Scientific reports*, 8(1), 17598.

Mesafint, E., Dejene, H., Maru, M., & Tarekegn, Z. S. (2023). A systematic review and meta-analysis of the prevalence of parasitic infections in equids in Ethiopia. *Journal of Parasitic Diseases*, 1-14.

Mihi, B., Van Meulder, F., Vancoppenolle, S., Rinaldi, M., Chiers, K., Van Den Broeck, W., ... & Geldhof, P. (2014). Analysis of the mucosal immune responses induced by single and trickle infections with the bovine abomasal nematode *Ostertagia ostertagi*. *Parasite immunology*, 36(4), 150-156.

Moazeni, M., & Ahmadi, A. (2016). Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*. *Experimental parasitology*, 169, 81-89.

Modrý, D., Petrželková, K. J., & Kalousová, B. (2015). *Parasites of African great apes: atlas of coproscopic diagnostics*. HPI-Lab, Department of Pathology and Parasitology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences.

Mohamed, H. I., Arafa, W. M., & El-Dakhly, K. M. (2023). Prevalence and associated risk factors of gastrointestinal helminths and coccidian infections in domestic goats, *Capra hircus*, in Minya, Egypt. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 12(1), 29.

Mohammed-Ali, N. A. K., & Bogan, J. A. (1987). The pharmacodynamics of the flukicidal salicylanilides, rafoxanide, closantel and oxcyclosanide. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10(2), 127-133.

Mooney, L., Good, B., Hanrahan, J. P., Mulcahy, G., & De Waal, T. (2009). The comparative efficacy of four anthelmintics against a natural acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in the west of Ireland. *Veterinary Parasitology*, 164(2-4), 201-205.

Morariu, S., Sîrbu, C. B., Tóth, A. G., Dărăbuș, G., Oprescu, I., Mederle, N., ... & Imre, K. (2023). First Molecular Identification of *Calicophoron daubneyi* (Dinnik, 1962) and *Paramphistomum leydeni* (Nasmark, 1937) in Wild Ruminants from Romania. *Veterinary Sciences*, 10(10), 603.

Morgan, B. B., Hawkins, P. A. (1951). *Veterinary helminthology*. Druhé vydání. Burgess publishing company, Minneapolis.

Morgan, E. R., Hetzel, N., Povah, C., & Coles, G. C. (2005). Prevalence and diagnosis of parasites of the stomach and small intestine in horses in south-west England. *Veterinary record*, 156(19), 597-600.

Muchiut, S. M., Fernández, A. S., Steffan, P. E., Riva, E., & Fiel, C. A. (2018). Anthelmintic resistance: Management of parasite refugia for *Haemonchus contortus* through the replacement of resistant with susceptible populations. *Veterinary parasitology*, 254, 43-48.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1992). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology Series*, 17-17.

Murphy, T. M., Power, E. P., Sanchez-Miguel, C., Casey, M. J., Toolan, D. P., & Fagan, J. G. (2008). Paramphistomosis in Irish cattle. *The Veterinary Record*, 162(25), 831.

Myers, M. J., Howard, K. D., & Kawalek, J. C. (2021). Pharmacokinetic comparison of six anthelmintics in sheep, goats, and cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 44(1), 58-67.

Nadler, S. A., D'amelio, S., Fagerholm, H. P., Berland, B., & Paggi, L. (2000). Phylogenetic relationships among species of *Contraecaecum* Railliet & Henry, 1912 and *Phocascaris* Høst, 1932 (Nematoda [ratio] Ascaridoidea) based on nuclear rDNA sequence data. *Parasitology*, *121*(4), 455-463.

Nagarajan, G., Thirumaran, S. M. K., Pachaiyappan, K., Thirumurugan, P., Rajapandai, S., Rajendiran, A. S., ... & Kanagarajadurai, K. (2022). First Report on Molecular Identification of *Moniezia expansa* in Sheep from Mannavanur, Palani Hills, Tamil Nadu, India. *Acta Parasitologica*, *67*(4), 1626-1633.

Nath, B. K., Roy, K., Shaikat, A. H., Shil, S. K., & Islam, M. Z. (2011). A study on prevalence and pathological effects of intestinal helminths in Black Bengal goat in Chittagong. *Vet Scan/ Online Veterinary Medical Journal*, *6*(2), 99-99.

Navrátilová, M., Stuchlíková, L. R., Matoušková, P., Ambrož, M., Lamka, J., Vokřál, I., ... & Skálová, L. (2021). Proof of the environmental circulation of veterinary drug albendazole in real farm conditions. *Environmental Pollution*, *286*, 117590.

Nelson, W. A. (1962). Development in sheep of resistance to the ked *Melophagus ovinus* (L.). I. Effects of seasonal manipulation of infestations. *Experimental Parasitology*, *12*(1), 41-44.

Niciura, S. C. M., Cruvinel, G. G., Moraes, C. V., Chagas, A. C. S., Esteves, S. N., Benavides, M. V., & Amarante, A. F. T. (2020). In vivo selection for *Haemonchus contortus* resistance to monepantel. *Journal of helminthology*, *94*, e46.

Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., Nijs, L. D., Hockland, S., & Maafi, Z. T. (2011). Current nematode threats to world agriculture. *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions*, 21-43.

Nielsen, M. K., von Samson-Himmelstjerna, G., Kuzmina, T. A., van Doorn, D. C., Meana, A., Rehbein, S., ... & Reinemeyer, C. R. (2022). World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP): of guideline for evaluating the efficacy of equine anthelmintics. *Veterinary Parasitology*, *303*, 109676.

Nielsen, Martin, 2010. The horse: Horse parasite control programs [online]. [cit. 2023-01-20]. Dostupné z: <https://thehorse.com/150619/horse-parasite-controlprograms/>

Nielsen, Martin, 2015. Parasite Control in Young Horses. The horse [online]. [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: <https://thehorse.com/111437/parasite-control-in-young-horses>

Nixon, S. A., Welz, C., Woods, D. J., Costa-Junior, L., Zamanian, M., & Martin, R. J. (2020). Where are all the anthelmintics? Challenges and opportunities on the path to new anthelmintics. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14, 8-16.

Novák P., Malá G., Prášek J. 2019. Existuje vztah mezi úrovní welfare a hospodářských zvířat a antimikrobiální rezistencí? *Veterinářství*. 69(11): 736-767.

Novák, P., Kubicek, K., Zabloudil, F., Odehnal, J., & Tofant, A. (2001). Disinfection-an integral part of farm animal biosecurity. *Stočarstvo: Časopis za unapređenje stočarstva*, 55(5), 345-350.

Novák, P., Malá, G., Tittl, K., & Kamarádová, J. (2011). Principles of biosecurity in sheep farms. In *Animal hygiene and sustainable livestock production. Proceedings of the XVth International Congress of the International Society for Animal Hygiene, Vienna, Austria, 3-7 July 2011, Volume 2* (pp. 677-679). Tribun EU.

Novobilský, A., Solis, N. A., Skarin, M., & Höglund, J. (2016). Assessment of flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* in sheep in Sweden in the absence of a standardised test. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6(3), 141-147.

Nutman, T. B. (2017). Human infection with *Strongyloides stercoralis* and other related *Strongyloides* species. *Parasitology*, 144(3), 263-273.

Nzalawahe, J., Hannah, R., Kassuku, A. A., Stothard, J. R., Coles, G., & Eisler, M. C. (2018). Evaluating the effectiveness of trematocides against *Fasciola gigantica* and amphistomes infections in cattle, using faecal egg count reduction tests in Iringa Rural and Arumeru Districts, Tanzania. *Parasites & vectors*, 11, 1-9.

Olah, S., van Wyk, J. A., Wall, R., & Morgan, E. R. (2015). FAMACHA©: A potential tool for targeted selective treatment of chronic fasciolosis in sheep. *Veterinary parasitology*, 212(3-4), 188-192.



O'Shaughnessy, J., Garcia-Campos, A., McAloon, C. G., Fagan, S., de Waal, T., McElroy, M., ... & Zintl, A. (2018). Epidemiological investigation of a severe rumen fluke outbreak on an Irish dairy farm. *Parasitology*, *145*(7), 948-952.

Osterman-Lind, E., Holmberg, M., & Grandi, G. (2023). Selective Anthelmintic Treatment in Horses in Sweden Based on Coprological Analyses: Ten-Year Results. *Animals*, *13*(17), 2741.

Palevich, N., Maclean, P. H., Candy, P. M., Taylor, W., Mladineo, I., & Cao, M. (2022). Untargeted multimodal metabolomics investigation of the *Haemonchus contortus* exsheathment secretome. *Cells*, *11*(16), 2525.

Pandi, M., Sharifdini, M., Ashrafi, K., Atrkar Roushan, Z., Rahmati, B., & Hajipour, N. (2021). Comparison of molecular and parasitological methods for diagnosis of human trichostrongylosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*, 759396.

Papadopoulos, E., Gallidis, E., & Ptochos, S. (2012). Anthelmintic resistance in sheep in Europe: a selected review. *Veterinary parasitology*, *189*(1), 85-88.

Parkinson, J., Whitton, C., Schmid, R., Thomson, M., & Blaxter, M. (2004). NEMBASE: a resource for parasitic nematode ESTs. *Nucleic acids research*, *32*(suppl\_1), D427-D430.

Paulson, G. D., & Feil, V. J. (1996). The disposition of <sup>14</sup>C-levamisole in the lactating cow. *Xenobiotica*, *26*(8), 863-875.

Pavlović, D. M., Glavač, A., Gluhak, M., & Runje, M. (2018). Sorption of albendazole in sediments and soils: Isotherms and kinetics. *Chemosphere*, *193*, 635-644.

Phiri, I. K., Phiri, A. M., & Harrison, L. J. S. (2007). The serum glucose and  $\beta$ -hydroxybutyrate levels in sheep with experimental *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* infection. *Veterinary parasitology*, *143*(3-4), 287-293.

Pitt, D., Sevane, N., Nicolazzi, E. L., MacHugh, D. E., Park, S. D., Colli, L., ... & Orozco-terWengel, P. (2019). Domestication of cattle: Two or three events?. *Evolutionary applications*, *12*(1), 123-136.

Playford, M. C., Smith, A. N., Love, S., Besier, R. B., Kluver, P., & Bailey, J. N. (2014). Prevalence and severity of anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in Australia (2009–2012). *Australian veterinary journal*, 92(12), 464-471.

Porto, R. S., Rodrigues-Silva, C., Schneider, J., & Rath, S. (2019). Benzimidazoles in wastewater: Analytical method development, monitoring and degradation by photolysis and ozonation. *Journal of environmental management*, 232, 729-737.

Preston, J. M., & Webbe, G. (1974). Studies on immunity to reinfection with *Schistosoma mattheei* in sheep and cattle. *Bulletin of the World Health Organization*, 50(6), 566.

Prchal, L., Podlipná, R., Lamka, J., Dědková, T., Skálová, L., Vokřál, I., ... & Szotáková, B. (2016). Albendazole in environment: faecal concentrations in lambs and impact on lower development stages of helminths and seed germination. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 13015-13022.

Prichard, R., Ménez, C., & Lespine, A. (2012). Moxidectin and the avermectins: consanguinity but not identity. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2, 134-153.

Qian, M. B., Patel, C., Palmeirim, M. S., Wang, X., Schindler, C., Utzinger, J., ... & Keiser, J. (2022). Efficacy of drugs against clonorchiasis and opisthorchiasis: A systematic review and network meta-analysis. *The Lancet Microbe*.

Qurratul-Saadah, Z., Che-Amat, A., Syed-Hussain, S. S., Kamaludden, J., Ariffin, S. M. Z., Basripuzi, N. H., & Nor-Azlina, A. A. (2023). Gastrointestinal Parasites in Asian and African Elephants: A Systematic Review. *Tropical biomedicine*.

Ribeiro, G. B., de Almeida Moura, I., e Silva, A. R., de Araújo, J. V., de Oliveira Monteiro, C. M., dos Santos Fonseca, J., ... & de Souza Perinotto, W. M. (2023). Efficiency of Experimental Formulation Containing *Duddingtonia flagrans* and *Pochonia chlamydosporia* against *Moniezia expansa* Eggs. *Pathogens*, 12(8), 1028.

Rieu, E., Recca, A., Bénét, J. J., Saana, M., Dorchies, P., & Guillot, J. (2007). Reliability of coprological diagnosis of *Paramphistomum* sp. infection in cows. *Veterinary parasitology*, 146(3-4), 249-253.

Riley, D. G., & Van Wyk, J. A. (2009). Genetic parameters for FAMACHA© score and related traits for host resistance/resilience and production at differing severities of worm challenge in a Merino flock in South Africa. *Veterinary parasitology*, 164(1), 44-52.

Rinaldi, L., Perugini, A. G., Capuano, F., Fenizia, D., Musella, V., Veneziano, V., & Cringoli, G. (2005). Characterization of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Calicophoron daubneyi* from various hosts and locations in southern Italy. *Veterinary Parasitology*, 131(3-4), 247-253.

Ritchie, J. D. S. (1966). Experimental *Ostertagia ostertagi* infections in calves: parasitology and pathogenesis of a single infection. *American journal of veterinary research*, 27(118), 659-667.

Roberts, H. E. (1968). Observations on experimental acute fascioliasis in sheep. *British Veterinary Journal*, 124(10), 433-450.

Roeber, F., & Kahn, L. (2014). The specific diagnosis of gastrointestinal nematode infections in livestock: larval culture technique, its limitations and alternative DNA-based approaches. *Veterinary Parasitology*, 205(3-4), 619-628.

Roeber, F., Jex, A. R., & Gasser, R. B. (2013). Next-generation molecular-diagnostic tools for gastrointestinal nematodes of livestock, with an emphasis on small ruminants: a turning point?. *Advances in Parasitology*, 83, 267-333.

Roeber, Florian, et al. "Establishment of a robotic, high-throughput platform for the specific diagnosis of gastrointestinal nematode infections in sheep." *International journal for parasitology* 42.13-14 (2012): 1151-1158.

Rondelaud, D., Teukeng, F. D., Vignoles, P., & Dreyfuss, G. (2015). *Lymnaea glabra*: progressive increase in susceptibility to *Fasciola hepatica* through successive generations of experimentally infected snails. *Journal of helminthology*, 89(4), 398-403.

Rondelaud, D., Titi, A., Vignoles, P., Mekroud, A., & Dreyfuss, G. (2013). Consequence of temperature changes on cercarial shedding from *Galba truncatula* infected with *Fasciola hepatica* or *Paramphistomum daubneyi*. *Parasite*, 20.

Rose, H., Rinaldi, L., Bosco, A., Mavrot, F., De Waal, T., Skuce, P., ... & Morgan, E. R. (2015). Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. *Veterinary Record*, 176(21), 546-546.

Ryšavý, B. (1989). *Základy parazitologie*. Státní pedagogické nakladatelství.

Samuel, W. M., Pybus, M. J., Kocan, A. A., Parasitic diseases in wild mammals. 2. vyd. Iowa City: Iowa State Press, 2001, 559 s. ISBN 1-84076-009-5.

Sauermann, C., Waghorn, T., Miller, C., & Leathwick, D. (2023). Simultaneous resistance to multiple anthelmintic classes in nematode parasites of cattle in New Zealand. *Veterinary Parasitology*, 110079.

Seesao, Y., Gay, M., Merlin, S., Viscogliosi, E., Aliouat-Denis, C. M., & Audebert, C. (2017). A review of methods for nematode identification. *Journal of Microbiological Methods*, 138, 37-49.

Sharma, P., Jenkins, M., Zarlenga, D., Fetterer, R., Xiao, Z., & Tuo, W. (2017). Characterization of *Ostertagia ostertagi* annexin-like proteins at different developmental stages. *Parasitology research*, 116, 1515-1522.

Scholz, T., Biswas, R., Patra, B. K., & Ash, A. (2022). A new genus of caryophyllidean tapeworms (Cestoda) from *Mystus* catfishes (Bagridae) in India: cleaning up taxonomic chaos. *Journal of Helminthology*, 96, e25.

Scholz, T., Tavakol, S., Uhrová, L., Brabec, J., Přikrylová, I., Mašová, Š., ... & Luus-Powell, W. J. (2018). An annotated list and molecular data on larvae of gryporhynchid tapeworms (Cestoda: Cyclophyllidea) from freshwater fishes in Africa. *Systematic Parasitology*, 95, 567-590.

Silvestre, A., Leignel, V., Berrag, B., Gasnier, N., Humbert, J. F., Chartier, C., & Cabaret, J. (2002). Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. *Vet Res*, 33(5), 465-80.

Sindičić, M., Martinković, F., Strišković, T., Špehar, M., Štimac, I., Bujanić, M., & Konjević, D. (2017). Molecular identification of the rumen flukes *Paramphistomum leydeni*

and *Paramphistomum cervi* in a concurrent infection of the red deer *Cervus elaphus*. *Journal of helminthology*, 91(5), 637-641.

Sirbu, C. B., Imre, K., Darabus, G., Suici, T., Mates, B., & Morariu, S. (2020). Prevalence of gastrointestinal parasitic infections in cattle and sheep in two regions of Romania. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 44(3), 581-587.

Skládanka, J., Adam, V., Ryant, P., Doležal, P., & Havlíček, Z. (2010). Can *Festulolium*, *Dactylis glomerata* and *Arrhenatherum elatius* be used for extension of the autumn grazing season in Central Europe?. *Plant, Soil and Environment*, 56(10), 488-498.

Smith, G. (1994). Population biology of the parasitic phase of trichostrongylid nematode parasites of cattle and sheep. *International journal for parasitology*, 24(2), 167-178.

Spence, S. A., Fraser, G. C., & Chang, S. (1996). Responses in milk production to the control of gastrointestinal nematode and paramphistome parasites in dairy cattle. *Australian Veterinary Journal*, 74(6), 456-459.

Spence, S. A., Fraser, G. C., Dettmann, E. B., & Battese, D. F. (1992). Production responses to internal parasite control in dairy cattle. *Australian veterinary journal*, 69(9), 217-220.

Staňková, K. (2011). Infekční choroby kamzíci zvěře, jejich výskyt a výsledky kontroly v oblasti Jeseníků.

Su, H., Mo, M., & Zhang, K. (2007). The ecology of nematode-trapping hyphomycetes in cattle dung from three plateau pastures. *Veterinary parasitology*, 144(3-4), 293-298.

Sueur, C., King, A. J., Conradt, L., Kerth, G., Lusseau, D., Mettke-Hofmann, C., ... & Aureli, F. (2011). Collective decision-making and fission–fusion dynamics: a conceptual framework. *Oikos*, 120(11), 1608-1617.

Sutherland, I. A., & Leathwick, D. M. (2011). Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue?. *Trends in parasitology*, 27(4), 176-181.

Sutherland, I. A., Damsteegt, A., Miller, C. M., & Leathwick, D. M. (2008). Multiple species of nematodes resistant to ivermectin and a benzimidazole-levamisole combination on a sheep farm in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 56(2), 67-70.

Sutherland, I., & Scott, I. (2010). Gastrointestinal nematodes of sheep and cattle: biology and control. Wiley-Blackwell.

Swan, G. E. (1999). The pharmacology of halogenated salicylanilides and their anthelmintic use in animals. *Journal of the South African Veterinary Association*, 70(2), 61-70.

Swellengrebel, N. H., & Sternens, M. M. (1961). Animal parasites in man. *Animal parasites in man*.

Szmidt-Adjidé, V., Abrous, M., Adjidé, C. C., Dreyfuss, G., Lecompte, A., Cabaret, J., & Rondelaud, D. (2000). Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France. *Veterinary Parasitology*, 87(2-3), 133-138.

Tandon, R., & Kaplan, R. M. (2004). Evaluation of a larval development assay (DrenchRite®) for the detection of anthelmintic resistance in cyathostomin nematodes of horses. *Veterinary parasitology*, 121(1-2), 125-142.

Tandon, V., Roy, B., Shylla, J. A., & Ghatani, S. (2019). Amphistomes. *Digenetic Trematodes*, 255-277.

Taylor, M. A. et al. (2007). *Veterinary parasitology*. Třetí vydání. Oxford: Blackwell. ISBN 978-1-4051-1964-1.

Theford, T. R. (2019). Prevention of internal parasites of sheep and goats. *Sheep And Goat Handbook, Vol. 3*, 461.

Thienpont, D., Rochette, F., & Vanparijs, O. F. J. (1986). Diagnosing helminthiasis by coprological examination. *Diagnosing helminthiasis by coprological examination.*, (Ed. 2).

Tittl, K., & Novak, P. (2009). Disinfection, an integral part of animal biosecurity on farm. In *Sustainable animal husbandry: prevention is better than cure, Volume 2. Proceedings of the 14th International Congress of the International Society for Animal Hygiene (ISAH), Vechta, Germany, 19th to 23rd July 2009* (pp. 925-928). Tribun EU.

Torgerson, P. R., Schnyder, M., & Hertzberg, H. (2005). Detection of anthelmintic resistance: a comparison of mathematical techniques. *Veterinary Parasitology*, 128(3-4), 291-298.

Torres-Acosta, J. F. J., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Caballero, A. J., & Cuéllar-Ordaz, J. A. (2012). Anthelmintic resistance in sheep farms: update of the situation in the American continent. *Veterinary parasitology*, *189*(1), 89-96.

Vadlejch, J. (2015). Gastrointestinal helminthoses in sheep-a review. *Veterinářství*, *65*(5), 361-366.

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*(2-3), 183-190.

Valentini, A., Mattiucci, S., Bondanelli, P., Webb, S. C., Mignucci-Giannone, A. A., Colom-Llavina, M. M., & Nascetti, G. (2006). Genetic relationships among *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) inferred from mitochondrial *cox2* sequences, and comparison with allozyme data. *Journal of Parasitology*, *92*(1), 156-166.

Van Wyk, J. A., & Bath, G. F. (2002). The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary research*, *33*(5), 509-529.

Van Wyk, J. A., Cabaret, J., & Michael, L. M. (2004). Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Veterinary parasitology*, *119*(4), 277-306.

Várady, M., Čudeková, P., & Čorba, J. (2007). In vitro detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: egg hatch test versus larval development test. *Veterinary parasitology*, *149*(1-2), 104-110.

Venancio, W. A. L., Rodrigues-Silva, C., Spina, M., Diniz, V., & Guimarães, J. R. (2021). Degradation of benzimidazoles by photoperoxidation: metabolites detection and ecotoxicity assessment using *Raphidocelis subcapitata* microalgae and *Vibrio fischeri*. *Environmental science and pollution research*, *28*, 23742-23752.

Verschave, S. H., Charlier, J., Rose, H., Claerebout, E., & Morgan, E. R. (2016). Cattle and nematodes under global change: transmission models as an ally. *Trends in parasitology*, *32*(9), 724-738.

Verschave, S. H., Vercruyssen, J., Forbes, A., Opsomer, G., Hostens, M., Duchateau, L., & Charlier, J. (2014). Non-invasive indicators associated with the milk yield response after anthelmintic treatment at calving in dairy cows. *BMC veterinary research*, *10*(1), 1-10.

Verschave, S., Vercruyssen, J., Claerebout, E., Geldhof, P., & Charlier, J. (2012). The parasitic phase of *Ostertagia ostertagi*: quantification of the establishment rate using systematic review and meta-analysis techniques. In *Joint NVP/BSP scientific meeting 2012: Challenges for the control of parasites*.

Vineer, H. R., Morgan, E. R., Hertzberg, H., Bartley, D. J., Bosco, A., Charlier, J., ... & Rinaldi, L. (2020). Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: creation and meta-analysis of an open database. *Parasite*, *27*.

Vokřál, I., Michaela, Š., Radka, P., Jiří, L., Lukáš, P., Dominika, S., ... & Lenka, S. (2019). Ivermectin environmental impact: Excretion profile in sheep and phytotoxic effect in *Sinapis alba*. *Ecotoxicology and environmental safety*, *169*, 944-949.

Vokřál, I., Podlipná, R., Matoušková, P., & Skálová, L. (2023). Anthelmintics in the environment: Their occurrence, fate, and toxicity to non-target organisms. *Chemosphere*, 140446.

VOLF, P. et al. (2007). *Paraziti a jejich biologie*. Triton, Praha. ISBN 978-80-7387-008-9.

Waechter, A., Cezanne, B., Maillard, D., Sun, R., Wang, S., Wang, J., & Harder, A. (2023). Praziquantel—50 years of research. *ChemMedChem*, e202300154.

Wagil, M., Białk-Bielińska, A., Puckowski, A., Wychodnik, K., Maszkowska, J., Mulkiewicz, E., ... & Stolte, S. (2015). Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research*, *22*, 2566-2573.

Walker, R. S., Miller, J. E., Monlezun, C. J., LaMay, D., Navarre, C., & Ensley, D. (2013). Gastrointestinal nematode infection and performance of weaned stocker calves in response to anthelmintic control strategies. *Veterinary parasitology*, *197*(1-2), 152-159.

Wang, T., & Gasser, R. B. (2020). Prospects of using high-throughput proteomics to underpin the discovery of animal host–nematode interactions. *Pathogens*, *10*(7), 825.



Wang, X., Ren, S., Yang, X., Masoudi, A., Xue, X., Li, M., ... & Liu, J. (2021). Exploration of serum marker proteins in mice induced by *Babesia microti* infection using a quantitative proteomic approach. *The Protein Journal*, 40, 119-130.

Wang, Y., Bai, X., Tang, B., Zhang, Y., Zhang, L., Cai, X., ... & Liu, X. (2021a). Comparative analysis of excretory–secretory products of muscle larvae of three isolates of *Trichinella pseudospiralis* by the iTRAQ method. *Veterinary parasitology*, 297, 109119.

Weller, P. F., & BETH ISRAEL HOSPITAL BOSTON MA. (1996). *Program and Abstracts of the 44th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. Volume 53, Number 2.*

Wenzel, C., K uchler, A., Strube, C., & Knubben-Schweizer, G. (2019). Paramphistomidosis-an overview on epidemiology and clinical signs. *Tierarztliche Praxis. Ausgabe G, Grosstiere/nutztiere*, 47(3), 184-191.

Westers, T., Jones-Bitton, A., Menzies, P., Van Leeuwen, J., Poljak, Z., & Peregrine, A. S. (2016). Efficacy of closantel against ivermectin-and fenbendazole-resistant *Haemonchus* sp. in sheep in Ontario, Canada. *Veterinary parasitology*, 228, 30-41.

Wheeler, L. (2018a). *Haemonchus* sp. [online] Veterinary Parasitology [cit. 08. 03. 2023]. Dostupn  z: <https://www.veterinaryparasitology.com/haemonchus.html>

Wheeler, L. (2018b). *Chabertia* sp. [online] Veterinary Parasitology [cit. 08. 03. 2023]. Dostupn  z: <https://www.veterinaryparasitology.com/chabertia.html>

White, C. A., Langemann, E. G., Gates, C. C., Kay, C. E., Shury, T., & Hurd, T. E. (2001, April). Plains bison restoration in the Canadian Rocky Mountains? Ecological and management considerations. In *Crossing Boundaries in Park Management. Proceedings of the 11th Conference on Research and Resource Management in Parks and on Public Lands* (pp. 16-20).

Wymann, M. N., Traore, K., Bonfoh, B., Tembely, S., Tembely, S., & Zinsstag, J. (2008). Gastrointestinal parasite egg excretion in young calves in periurban livestock production in Mali. *Research in Veterinary Science*, 84(2), 225-231.

Yan, X., He, S., Liu, Y., Han, B., Zhang, N., Deng, H., ... & Liu, M. (2023). Molecular identification and phylogenetic analysis of gastrointestinal nematodes in different populations of Kazakh sheep. *Experimental Parasitology*, 254, 108625.

Zhang, K., Lenstra, J. A., Zhang, S., Liu, W., & Liu, J. (2020). Evolution and domestication of the *Bovini species*. *Animal Genetics*, 51(5), 637-657.

Zhao, L., Li, Y., Gan, Z., Sun, W., Su, S., Li, Z., & Shi, L. (2023). Distribution, fate and removal efficiency of anthelmintic drugs in wastewater treatment plants. *Science of The Total Environment*, 168240.

Zhao, Y. Y., Yang, X., Chen, H. M., Wang, L. X., Feng, H. L., Zhao, P. F., ... & Fang, R. (2017). The complete mitochondrial genome of *Orthocoelium streptocoelium* (Digenea: Paramphistomidae) for comparison with other digeneans. *Journal of helminthology*, 91(2), 255-261.

Zhou, M., Lu, Y., Han, L., Lu, M., Guan, C., Yu, J., ... & Hou, Z. (2023). Exploration of *Parascaris* species in three different Equus populations in China. *Parasites & Vectors*, 16(1), 1-7.

Zhu, X., Gasser, R. B., Podolska, M., & Chilton, N. B. (1998). Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. *International Journal for Parasitology*, 28(12), 1911-1921.

Zintl, A., Garcia-Campos, A., Trudgett, A., Chryssafidis, A. L., Talavera-Arce, S., Fu, Y., ... & Mulcahy, G. (2014). Bovine paramphistomes in Ireland. *Veterinary parasitology*, 204(3-4), 199-208.

## 9 SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1.</b> Detailní přehled chovů jednotlivých zvířat v rámci krajů v ČR (PK = plzeňský kraj; JK = jihočeský kraj; KV = kraj vysočina; JHK = jihomoravský; kraj; n = počet chovů u jednotlivého zástupce HZ celkem; × = nehodnoceno) .....	42
<b>Tabulka 2.</b> Design aplikace anthelmintik ve sledovaných chovech HZ v jednotlivých letech za období 2021 – 2023 .....	45
<b>Tabulka 3.</b> Přehled odebraných vzorků výkalů za období 2021 – 2023 v rámci ČR dle jednotlivých krajů a zástupců sudokopytníků a lichokopytníků .....	53
<b>Tabulka 4.</b> Prevalence parazitárních infekcí za sledované období 2021 – 2023.....	53
<b>Tabulka 5.</b> Intenzita infekce EPG = y (před vynásobením koeficientem 50×).....	54
<b>Tabulka 6.</b> Terapeutická léčba vybranými anthelmintiky .....	55
<b>Tabulka 7.</b> Přehled průměrných účinností jednotlivých anthelmintik ve sledovaných chovech HZ v průběhu let 2021 – 2023 .....	56

## 10 SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1.</b> Vývojový cyklus nematod, <i>H. contortus</i> (Palevich et al., 2022, upraveno) ....	19
<b>Obrázek 2.</b> Vývojový cyklus trematod, <i>C. daubneyi</i> (Tandon et al., 2019, upraveno).....	24
<b>Obrázek 3.</b> Vývojový cyklus <i>M. benedeni</i> (Jacob et al., 2020; upraveno).....	28
<b>Obrázek 4.</b> Schéma odběrů vzorků dle jednotlivých krajů v rámci ČR (D = Německo; PL = Polsko; A = Rakousko; SK = Slovensko; S = sudokopytníci; L = lichokopytníci).....	42
<b>Obrázek 5.</b> Kladogram fylogenetických vztahů izolátů <i>C. daubneyi</i> .....	65
<b>Obrázek 6.</b> Pitevnický nálezn <i>C. daubneyi</i> ve slezu u poraženého bizona (vzorky NH_202013F a NH_202013A; měřítko = 200 $\mu\text{m}$ ; zdroj Havrdová).....	66

## 11 SEZNAM GRAFŮ

<b>Graf 1.</b> Účinnost anthelmintika Closamectin za období 2021 – 2023 .....	57
<b>Graf 2.</b> Účinnost anthelmintika Panacur za období 2021 – 2023 .....	58
<b>Graf 3.</b> Účinnost anthelmintika Ivomec super za období 2021 - 2023 .....	59
<b>Graf 4.</b> Účinnost anthelmintika Helmigal za období 2021 - 2023.....	59
<b>Graf 5.</b> Účinnost anthelmintika Biomec za období 2021 – 2023 .....	60
<b>Graf 6.</b> Účinnost anthelmintika Verm-x za období 2021 - 2023 .....	61
<b>Graf 7.</b> Účinnost anthelmintika Noromectin za období 2021 – 2023.....	62
<b>Graf 8.</b> Účinnost anthelmintika Aldifal za období 2021 – 2023.....	62
<b>Graf 9.</b> Účinnost anthelmintika Albex za období 2021 – 2023 .....	63
<b>Graf 10.</b> Účinnost anthelmintika Ecomectin za období 2021 - 2023 .....	64

## 12 PŘÍLOHA I

### *Calicophoron daubneyi* (Digenea: Paramphistomidae): The efficacy of anthelmintics in naturally infected cattle

Nikola Havrdová; Ondřej Havrda; Šárka Čondlová; Lenka Pecová; Naděžda Kernerová; Jan Beran; Miloslav Šoch. Journal of Central European Agriculture, **2023**, 24(4), p. 817-826.

## *Calicophoron daubneyi* (Digenea: Paramphistomidae): The efficacy of anthelmintics in naturally infected cattle

## *Calicophoron daubneyi* (Digenea: Paramphistomidae): Účinnost anthelmintik u přirozeně infikovaného skotu

Nikola HAVRDOVÁ<sup>1</sup> (✉), Ondřej HAVRDA<sup>1</sup>, Šárka ČONDLOVÁ<sup>2,3,4</sup>, Lenka PECOVÁ<sup>5</sup>, Naděžda KERNEROVÁ<sup>1</sup>, Jan BERAN<sup>1</sup>, Miloslav ŠOCH<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Agriculture and Technology, University of South Bohemia in České Budějovice, Czech Republic

<sup>2</sup> Medirex a.s., Holubyho 35, Pezinok, 902 01, Slovensko, Slovakia

<sup>3</sup> TrisomyTest, s. r. o., mestská časť Karlova Ves, Ilkovičova 8, 841 04 Bratislava, Slovakia

<sup>4</sup> Medirex Group Academy n.o., Novozamocka 1/67, 949 05 Nitra, Slovakia

<sup>5</sup> Kozírna, s.r.o., Příkop 843/4, 602 00 Brno, Czech Republic

✉ Corresponding author: [havrdn@fzt.jcu.cz](mailto:havrdn@fzt.jcu.cz)

Received: July 31, 2023; accepted: October 16, 2023

### ABSTRACT

The effectiveness of anthelmintics in the treatment of paramphistomosis in farm animals in the Czech Republic has not been sufficiently investigated. This study was focused on selected breeds of beef cattle. Identification of *Calicophoron daubneyi* was performed by sedimentation and verified by PCR using the 5.8S rRNA gene. Animals were treated specifically for *C. daubneyi* infection only. Totally 400 positive animals were included in the study. The anthelmintic Closamectin (Closantel/Ivermectin) was evaluated as the most effective veterinary medicinal product with an efficiency of 80%, followed by Distocur (Oxyclozanid) with an efficiency of 78%, Aldifal (Albendazol) with an efficiency of 71% and Levatum Plus (Ivermectin/Clorsulon) with an efficiency of 62%.

**Keywords:** anthelmintics, *Calicophoron daubneyi*, coprology, parasite, cattle

### ABSTRAKT

Účinnost anthelmintik při léčbě paramfistózy u hospodářských zvířat v České republice není dostatečně prozkoumána. Tato studie byla zaměřena na vybraná plemena masného skotu. Identifikace *Calicophoron daubneyi* byla provedena sedimentací a ověřena pomocí PCR s využitím genu 5,8S rRNA. Zvířata byla léčena specificky pouze na infekci *C. daubneyi*. Do studie bylo zařazeno celkem 400 pozitivních zvířat. Jako nejúčinnější veterinární léčivý přípravek bylo vyhodnoceno anthelmintikum Closamectin (Closantel/Ivermectin) s účinností 80 %, následované Distocurem (Oxyclozanid) s účinností 78 %, Aldifalem (Albendazol) s účinností 71 % a Levatum Plus (Ivermectin/Clorsulon) s účinností 62 %.

**Klíčová slova:** Anthelmintika, *Calicophoron daubneyi*, koprologie, parazit, farmová zvířata

## INTRODUCTION

Paramphistomosis is a gastrointestinal parasitic disease caused by digenetic trematodes of the Paramphistomidae family. Rumen flukes infect ruminants and consist of a number of different species of the Paramphistomidae family (Gunathilaka et al., 2018). This family includes, for example, the genus *Paramphistomum*, *Calicophoron*, *Cotylophoron*, *Ceylonocotyle*, *Gastrothylax*, *Fischoederius*, *Carmyerius*, *Gastrodiscus* and *Pseudodiscus* (Torres-Acosta et al., 2012; Zhao et al., 2017; Kotze et al., 2020). Rumen fluke parasites impact hugely on livestock productivity by affecting growth rates, fertility, meat quality, wool or milk production, and they sometimes cause mortality. In subtropical and tropical areas, the infection leads to economic losses related to mortality and low productivity (Spence et al., 1992; Spence et al., 1996; Rieu et al., 2007). In general, rumen fluke is only considered to be of clinical relevance when ruminants are exposed to massive burdens of infective stages while grazing. Immature stages that migrate in the duodenum can cause clinical symptoms like weakness, diarrhoea and mortality (Spence et al., 1996; Rieu et al., 2007; Mason et al., 2012).

The developmental cycle of Paramphistomidae is indirect and includes mollusks. The life cycle is very similar to the life cycle of liver fluke *Fasciola hepatica*. Movable ciliated miracidia, which hatch from eggs coming from the faeces of an infected host, next infect amphibians or aquatic snails (Moazeni and Ahmadi, 2016; Hotessa and Kanko, 2020). In this environment, they reproduce asexually and develop into cercariae. These are excreted continuously for up to one year and develop into encysted metacercariae in the vegetation. Encysted metacercariae enter to definitive host by ingestion of infected grass or hay (Moazeni and Ahmadi, 2016; Hotessa and Kanko, 2020). At the juvenile stage, parasites excystation in the small intestine and feed on the intestinal mucosa. As they grow, they migrate upward into the reticulum and rumen, where they live at the adult stage excretion eggs into the environment together with the faeces of the host (Mavenyengwa et al., 2010; González-Warleta et al., 2013).

Paramphistomatidae are the best-known trematodes of the rumen and reticulum in ruminants (Horak, 1971; Rolfe and Boray, 1987). For many years, interest in paramphistomes was limited to the tropics and subtropics, as the group was considered relatively non-pathogenic and unimportant in temperate regions (González-Warleta et al., 2013). Currently, sharp increases in rumen fluke infections have been recorded throughout Europe (Sangster et al., 1991; Arias et al., 2011; Malrait et al., 2015; Červená et al., 2022).

Despite their ubiquitous presence, our current knowledge of the fundamental molecular and developmental biology of rumen flukes is limited, particularly in comparison to other trematodes of veterinary significance such as the liver fluke, *Fasciola hepatica*. Immunological methods and detection of serum antibodies have not been sufficiently studied. As a result, the diagnosis of paramphistomosis in live animals still depends on the detection of eggs in the faeces (Spence et al., 1996; Torres-Acosta and Hoste, 2008; Liu et al., 2014). Since the infection caused by trematodes leads to economic losses, it is necessary to apply anthelmintics to the animals. Anthelmintics are drugs of synthetic or biosynthetic origin and their effectiveness is affected by the mechanism of their action (Torres-Acosta et al., 2012). Benzimidazoles are the broadest group of drugs used in trematode therapy. Substances of this chemical group act not only against adult forms, but also against all developmental stages. The mechanism of action first leads to disruption of the formation of the mitotic spindle, without which cell division cannot be completed. After that, also the function of cytoplasmic microtubules is broken. These are responsible for the parasite's food intake. If parasite does not get glucose, its energy reserve (in the form of glycogen) is slowly depleted and it dies. Benzimidazoles have the ability to bind better to microtubules of parasites than hosts. This chemical group includes, for example, oxiclozanide, albendazole, closantel and others (Sangster et al., 1991; Elard et al., 1999; Humbert et al., 2001; Coles and Stafford, 2001; Dorny et al., 2011).



Perhaps due to their lack of recognition and poorly understood pathogenicity, no anthelmintic drugs (asides from a single formulation of oxclozanide licensed only in France: Douvistome) are currently available with a label claim for rumen fluke control in Europe. Numerous studies, both *in vitro* and *in vivo*, have attempted to verify the efficacy of existing anthelmintics against a range of rumen fluke species (Rolfe and Boray, 1987; Paraud et al., 2009; Arias et al., 2011). Currently, oxclozanide (normally marketed as a treatment for liver fluke) is the drug of choice to control both immature and mature paramphistome infections, although this drug does not appear to have been tested against immature *C. daubneyi* specifically (Selemetas et al., 2015). Additionally, research into diagnostic tools for paramphistomosis has been very limited (Anuracpreeda et al., 2013; Huson et al. 2017) and currently no diagnostic test has been developed for the identification of prepatent infections Huson et al. 2017).

The aim of this article was (1) to improve awareness of the effectiveness of drugs against *C. daubneyi* in cattle and (2) to compare the effectiveness of the most commonly used anthelmintics based on the results of the faecal egg count reduction test (FECRT) against *C. daubneyi* in cattle.

## MATERIALS AND METHODS

All study procedures were approved in accordance with the "Act on the protection of animals used for scientific purposes" of the Czech Republic. This act is in accordance with the EU Directive (No. 2010/63 / EU) on the protection of animals used for scientific purposes and with the decision of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic No. 22036/2019-MZE-18134. Permission to collect study samples was granted by participating farms.

The study took place in 2022. Four hundred heifers at the age of 13-16 months, naturally infected and positive for *Calicophoron daubneyi* were included in the study. In all heifers, the presence of *C. daubneyi* in the faeces was verified molecularly already before the start of treatment. Genomic DNA extraction was performed from 300 mg of feces using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN,

Hilden, Germany) and further processed according to the manufacturer's recommendations except for the use of 0.5 mm glass beads. For molecular analysis, primers were modified according to the original methodology of Rinaldi et al. (2005) and Itagaki et al. (2003). The amplification region of the 5.8S gene was used with the primer sequence (5' - 3') F: TAGGCAATGTGGTGGTGT and R: TTGCACGTCAGAATCGCT, annealing temperature 55.2 °C, length 1,156 bp. Before starting the treatment, the feces of all animals in the study were examined molecularly and by sedimentation for the presence *C. daubneyi*. After the start of the treatment, the effectiveness of individual anthelmintics was monitored and animal feces were examined only by sedimentation (Cabaret and Berrag, 2004).

The following breeds of beef cattle were observed in this study: Charolaise, Aberdeen Angus (red and black variants), Hereford and Salers. The cattle sampled in this study had never received anthelmintic treatment before. The pasture on which the individuals were stabled at the time of the study was previously used as a temporary paddock for horses, and thus the transmission of *C. daubneyi* infection from the pasture environment is minimized. During the entire study period, the animals were on pasture with the possibility of a shelter, drinking water and ad libitum access to hay and haylage.

Cattle were divided into four experimental groups of 100 individuals, stratified according to the number of faecal eggs, to ensure that each group included animals with the same range of egg numbers (eggs per gram (EPG) < 50.4) and the same representation of breeds. The control group of animals consisted of 40 untreated individuals that were kept out of contact with the treated animals throughout the study. The intensity of infection in the control group was in the range of EPG 49.1 - 83.7 throughout the study period (summer 2022 EPG 49.1 – 76.2; autumn 2022 EPG 53.1 – 83.7). These animals were not treated with any anthelmintics during the entire study period. There was no movement of animals between these experimental groups during the course of the study, or contact of individuals from other groups.

Each group was given the same anthelmintic with an effect on flukes twice a year (spring/autumn), according to the veterinarian's recommendation. The first group was administered the anthelmintic Aldifal (Albendazol; Mikrochem s.r.o., Slovakia), the second group was administered Closamectin (Ivermectin/Closantel; Norbrook Ltd., Czech Republic), the third group was administered Distocur (Oxyclozanid; Merial SAS, Belgium), and the fourth group of cattle was administered Levatum Plus (Ivermectin/Clorsulon; Zoetis Italia Srl., Roma; Table 1). The assignment of anthelmintics to the experimental groups was completely random. All experimental groups were balanced (breed, EPG). Individual anthelmintic application was performed by a veterinarian. The samples of faeces were collected from the anus of each individual always on the day of treatment and 14 days after anthelmintic application in accordance with the methodology of Nzalawah et al. (2018) and Rinaldi et al. (2005). They were examined by sedimentation for the presence of *C. daubneyi*.

In this study, the species variability of the selected cattle breeds for natural infection was not monitored. The efficacy of veterinary medicinal products has been studied for the benefit of cattle. The study evaluated the overall effectiveness of individual drugs against natural *C. daubneyi* infection in cattle. The effectiveness of the drug depending on the method of application (inject or oral) was not evaluated either, this is a topic for another study, as well as the susceptibility of cattle to reinfection with *C. daubneyi*, which was also not monitored in this study.

### **Sedimentation**

In a 150 ml glass beaker, 4 g of fresh faeces was intensively mixed with distilled water using a spatula. The suspension was filtered through a fine sieve (100 µm). The resulting filtrate was allowed to stand for 20 minutes in order to decant the supernatant. Sedimentation and decantation were repeated 4 times (in the first phase 1/3 of the upper half of the solution was aspirated, in the second and third phase 1/2 of the solution was aspirated and in the fourth phase the solution was removed up to the sediment). The sediment was evaluated microscopically on a slide at a low magnification from 10× to 40× (Thienpont et al., 1986, modified).

### **FECRT**

Individually collected faecal samples were stored in collection tubes at 4 °C during transport and processing (within 24 hours). The efficacy of the veterinary medicinal products was assessed using the faecal egg count reduction test according to the methodology of Kochapakdee et al. (1995) and Mooney et al. (2009). The test determination provided an estimate of anthelmintic efficacy. This was done by comparing the number of eggs in treated and untreated hosts. The principle of the test was to evaluate the reduction/increase of parasites in the faeces before and after the treatment with veterinary medicinal products. The efficacy of the drug was calculated by using a mathematical formula and was further expressed as the percentage of reduction of parasites in the faeces. The methodology was adopted

**Table 1.** Design of drug application

Drug (active substance)	Application	Dosage (ml/50 kg)
Aldifal (Albendazol)	Oral	3.7
Closamectin (Ivermectin and Closantel)	Injected	2.0
Distocur (Oxyclozanid)	Oral	1.0
Levatum Plus (Ivermectin and Clorsulon)	Injected	1.5

according to the studies of Kochapakdee et al. (1995) and Mejía et al. (2003).

FECRT before and after individual treatment evaluation

E1 is the pre-treatment EPG (day 0), and E2 is the post-treatment EPG (day 14). Each host serves as its own control.

$$\text{FECRT} = 100 \times (1 - (E_2/E_1))$$

Arithmetic means EPG (Kochapakdee et al., 1995).

Veterinary medicinal products have been administered as recommended by the manufacturer (Table 1). It was always done separately for each individual drug.

### Statistical methods

Analyzes were evaluated based on FECRT results. Each time, two groups were evaluated, namely on the day of drug administration (day 0) and after drug administration (day 14). The effectiveness of veterinary medicinal products was evaluated according to the methodology of Kochapakdee et al. (1995) and Mooney et al. (2009). All analyzes were performed in Statistica 6.0 software (StatSoft ČR, Prague, Czech Republic). Efficacy was determined by calculating the faecal egg count reduction (FECRT) and was considered effective when the calculated FECRT was  $\geq 95\%$  and the 95% lower confidence limit (Humbert et al., 2001; Kochapakdee et al., 1995; Keyyu et al., 2008; Sanabria et al., 2013; Keyyu et al., 2006). The percentage reduction in FECRT was calculated for each drug individually.

## RESULTS

In the course of this study, a decrease of *C. daubneyi* eggs in the feces was recorded in all animals already after the first application by 43.7% (spring 2022), during the second application (autumn 2022) the number of eggs in the feces and the number of infected animals decreased by only 36.7%. There were no significant differences in the number of eggs in feces (EPG < 50.4) between the experimental treatment groups at day 0 (spring 2022

and autumn 2022). All animals in the group excreted *C. daubneyi* eggs in their feces throughout the study period. However, the frequency of faecal excretion decreased slightly after treatment (EPG < 26.1 there was no significant decrease or increase in infection in the control group, which was not treated with any drugs. At the second anthelmintic application, the intensity of infection was without a significant difference in the number of eggs in the feces (EPG < 50.3). Individuals in whom the presence of *C. daubneyi* in the feces was proven by sedimentation (with  $\geq 1$  egg/g) were considered positive. During the whole study, no cattle were sold, moved or died. The occurrence of intermediate hosts in the pasture was not recorded during the study. The pasture was not waterlogged in any part in the monitored year. Individuals in the control group were positive for the presence of *C. daubneyi* eggs in their feces throughout the study.

Closamectin (Closantel/Ivermectin) was evaluated as a highly effective anthelmintic against *C. daubneyi* according to the results of FECRT at the first application with an efficiency of 84%, followed by Distocur (Oxyclozanid) with an efficiency of 81%, then Aldifal (Albendazol) 76% and Levatum Plus (Ivermectin/Clorsulon) 75%. After the second application, Closamectin (Closantel/Ivermectin) was 77% effective, followed by Distocur (Oxyclozanid) with 75% effectiveness, then Aldifal (Albendazol; 65%) and Levatum Plus (Ivermectin/Clorsulon; 48%). The resulting values are shown in Table 2. After the second application of anthelmintics, the efficacy decreased slightly, but no statistically significant difference was proven ( $P > 0.05$ ). Further studies to verify the resistance of parasites to anthelmintics will be required.

None of the monitored individuals was treated prophylactically in the past, so the risk of resistance is less likely. Cattle were grazed during the study on pasture primarily used for horses. When applying the drugs, the application dose was strictly observed according to the manufacturer's recommendations (Table 1).

**Table 2.** Efficacy of tested drugs (%) according to test results of the faecal egg count re-duction test

	The commercial name of the drug				Control group	Therapy
	Closamectin (Closantel/ Ivermectin)	Distocur (Oxyclozanid)	Aldifal (Albendazol)	Levatum Plus (Ivermectin/ Clorsulon)		
Day 0 (n=)	100	100	100	100	40	
EPG	50.2 (49.4–51.0)	50.4 (49.6–51.2)	50.1 (49.3–50.9)	50.2 (49.4–51.1)	50.3 (49.1–51.8)	
Day 14 (n=)	53	46	68	58	40	Spring 2022
EPG	8.1 (3.2–13.0)	9.6 (4.7–14.5)	12.1 (7.2–17.0)	12.4 (7.5–17.3)	68.2 (53.1–83.7)	
FECRT (%)	84 (78.1–89.6)	81 (74.7–87.2)	76 (69.7–82.2)	75 (68.7–81.2)	×	
Day 0 (n=)	100	100	100	100	40	
EPG	50.1 (49.3–50.9)	50.2 (49.4–51.0)	50.3 (49.5–51.1)	50.1 (49.3–50.9)	59.3 (53.1–66.2)	
Day 14 (n=)	65	56	69	63	40	Autumn 2022
EPG	11.7 (7.8–17.6)	12.5 (7.6–17.4)	17.3 (12.4–22.2)	26.1 (21.2–31.0)	68,3 (53.1–83.7)	
FECRT (%)	77 (70.9–83.4)	75 (69.0–81.5)	66 (59.7–72.2)	48 (42.1–54.6)	×	
<b>Average effectiveness (%)</b>	<b>80</b>	<b>78</b>	<b>71</b>	<b>62</b>	<b>×</b>	

N = the number of positive animals; "(± 95.0 %)" confidence interval;  $P > 0,05$ ; "×" = not rated.

## DISCUSSION

The results of this study (FECRT) clearly show that the effectiveness of veterinary medicinal products ranged from 62 to 80%. Specifically, it was the anthelmintic Closamectin (Closantel/Ivermectin; 80%), Distocur (Oxyclozanid; 78%), Aldifal (Albendazol; 71%) and Levatum Plus (Ivermectin/Clorsulon; 62%). In the Czech Republic, there are no equivalent findings on the inefficacy of benzimidazole treatment against *C. daubneyi*. These are the only preparations registered in the Czech Republic. The effectiveness of drugs can only be compared at the level of foreign sources. The active ingredient oxyclozanide is almost never found in veterinary medicinal products available in the Czech Republic and is mainly applied outside the Czech Republic (Huson et al., 2017; Avramenko et al., 2017).

In older studies, oxyclozanide was found to be highly effective against adult flukes when its dose was increased one and a half times from the standard dose of 1 ml per 50 kg (Spence et al., 1996). Recent studies, however, do not confirm this (Rolfe and Boray, 1987; Doyle and Cotton, 2019). In this study, standard dosage was followed for all applied anthelmintics (Table 1). Arias et al. (2013) found a high anthelmintic effect of oxyclozanide in dairy cattle (99% FECRT) using a standard dose. However, the effectiveness of Closamectin (Closantel/Ivermectin) in this study does not confirm the results compared to the study by Nzalawah et al. (2018), where the ineffectiveness of closantel was found at the standard dose. Other studies assess the effectiveness of *Fasciola hepatica* and paramphistome mixed infection in cattle (Ico-Gómez et al., 2021).

This fact can be influenced by the environment, resistance, or other factors such as cattle breed or age. It is known that underdosing is a factor that can lead to reduced drug effectiveness (Spence et al., 1996; Rolfe and Boray, 1987). A study by Huson et al. (2017) and Babják et al. (2018) shows that it is not always necessary to choose a treatment. According to them, it is more effective to keep parasites at a relevant level (Huson et al., 2017; Babják et al., 2018). After the second application of anthelmintics, the EPG value was higher (EPG 11.7 - 26.1) than the EPG value after the first application (EPG 8.1 - 12.4). However, the EPG value before the application of the drugs varied from 50.1 to 50.4 the entire time. The EPG value in the herds was unified at the beginning of the study to minimize differences on day 0 (control).

This fact indicates a theoretical reduction in the effectiveness of the selected anthelmintic and a further study is needed, where the resistance of the parasite to the applied anthelmintic will be evaluated. In this study, the effectiveness of anthelmintics was monitored 14 days after drug administration in accordance with the study by Flanagan et al. (2011), who recommends to determine the drug effectiveness by FECRT on the 14<sup>th</sup> day after the treatment in domestic ruminants infected with flukes, as this sampling time allows complete removal of eggs from the host.

However, the development cycle of flukes is much longer, for excysting the trematode takes more than a month to reach the rumen (Moazeni and Ahmadi, 2016). Yet Feces samples were collected on the 14<sup>th</sup> day, according to the methodology (Flanagan et al., 2011). Similar findings were observed by Brockwell et al. (2014), who stated that, according to the FECRT results, the effectiveness of the anthelmintic is already demonstrable on the 7<sup>th</sup> day after the treatment in fluke-infected cattle.

Studies by Cabaret and Berrag (2004) and Holm et al. (2014) confirmed that FECRT results can be affected by various factors such as environmental conditions, level of infection in the herd and anthelmintic effectiveness. The effectiveness of the treatment is further confirmed by studies by Vadlejch et al. (2014) and Martínez-Valladares

et al. (2015). The study by Vadlejch et al. (2014), Gunathilaka et al. 2018 and Vineer et al. (2020) point out that biosecurity conditions must be observed on each farm to prevent the spread of infectious diseases outside the farm. Although our study did not show a change in the condition of the animal before and after treatment, the study by Cerda et al. (2019) shows a completely opposite case for fluke infection in a herd.

Identification of the fluke *C. daubneyi* was performed according to Swart (1954), Ferreras et al. (2014), and Jones et al. (2015). Morphological and morphometric features confirming *C. daubneyi* infection were identified by microscopic imaging and DNA was verified by PCR sequencing (Rinaldi et al. 2005; Thienpont et al., 1986; Lotfy et al., 2010). The sequence was identical to studies of this kind (Martínez-Ibeas et al., 2013). *Calicophoron daubneyi* is the most common fluke of the genus Paramphistomatidae in farm animals. This fact is also confirmed by studies by Gordon et al. (2013) and Atcheson et al. (2020).

In this study, only natural *C. daubneyi* infection was monitored in animals. Apart from the study on nematode infection Babják et al. (2018), the effectiveness of medicaments for natural paramphistomosis infection in farm animals was not monitored in the Czech Republic. In New Zealand and South America, there are nematodes infecting cattle that are resistant to multiple anthelmintic groups (active ingredients contained in veterinary medicinal products) (Mejía et al., 2003; Atcheson et al., 2020; Ziółkowska et al., 2012). A better understanding of the extent of resistance is needed in Europe to develop and support more sustainable approaches to parasite control.

However, in this study, only the effectiveness of the most commonly applied anthelmintics against *C. daubneyi* was monitored, resistance was not monitored here. A database of European published and unpublished research on resistance to gastrointestinal helminths (GIN) and liver fluke (*Fasciola hepatica*) was collected by members of the European COST action "COMBAR" (Combating anthelmintic resistance in ruminants) and combined with



data from a previous systematic review of resistance in GIN. A total of 197 publications on GIN resistance were available for analysis. There are 535 studies in 22 European countries covering the period from 1980 to 2020 (Vineer et al., 2020; Jones et al. 2015), but no similar studies have been conducted in Paramphistomatidae. As medications are often used at doses higher than the minimum required to kill most parasites in terrain, this dosage could induce a high frequency of resistance alleles (Doyle and Cotton, 2019; Wolstenholme et al., 2004). Parasite resistance is now widespread across Europe and there are still gaps in our knowledge in some regions and countries. The risk of resistance is a major threat to the sustainability of modern ruminant animal production. It causes reduced productivity and threats to animal health (Vineer et al., 2020; Jones et al. 2015; Atcheson et al., 2020; Ziółkowska et al., 2012). The establishment of resistance is difficult to assess on the sole measure of FECR since it depends strongly on the experimental procedure (with or without controls) and the evaluation of the reduction (Cabaret and Berrag, 2004).

## CONCLUSIONS

The incidence of flukes in the Czech Republic has increased significantly in recent years. Waterlogged pastures and the problem with medicines are the main factors. In the Czech Republic, there are no registered medicines with the active substance oxyclozanide for the treatment of flukes, their application in the herd is only possible with an exceptional permit. In the event of a strong infection, it is necessary that every breeder take this measure. The results are useful in designing further studies on the seasonality of infection, intermediate host environments, interactions with other flukes and appropriate control strategies for paramphistomiasis. The results of this study are beneficial to any cattle breeder where natural paramphistomatidae infection is a problem. The dynamics of the occurrence of *C. daubneyi* during the year, and the associated design of the most suitable time for the application of drugs and their frequency, is a subject for further study.

## REFERENCES

- Anuracpreeda, P., Poljaroen, J., Chotwivatthanakun, C., Tinikul, Y., Sobhon, P. (2013) Antigenic components, isolation and partial characterization of excretion-secretion fraction of *Paramphistomum cervi*. *Experimental Parasitology*, 133 (3), 327-333. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.12.006>.
- Arias, M., Lomba, C., Dacal, V., Vázquez, L., Pedreira, J., Francisco, I., Piñeiro, P., Cazapal-Monteiro, C., Suárez, J.L., Díez-Baños, P., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A. (2011) Prevalence of mixed trematode infections in an abattoir receiving cattle from northern Portugal and north-west Spain. *Veterinary Record*, 168 (15), 408. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.d85>.
- Arias, M.S., Sanchís, J., Francisco, I., Francisco, R., Piñeiro, P., Cazapal-Monteiro, C., Cortiñas, F., Suárez, J.L., Sánchez-Andrade, R., Paz-Silva, A. (2013) The efficacy of four anthelmintics against *Calicophoron daubneyi* in naturally infected dairy cattle. *Veterinary Parasitology*, 197 (1-2), 126-129. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.06.011>.
- Atcheson, E., Skuce, P.J., Oliver, N.A.M., McNeilly, T.N., Robinson, M.W. (2020) *Calicophoron daubneyi* - the path toward understanding its pathogenicity and host Interactions. *Frontiers Veterinary Science*, 7, 606. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00606>.
- Avramenko, R.W., Redman, E.M., Lewis, R., Bichuette, M.A., Palmeira, B.M., Yazwinski, T.A., Gilleard, J.S. (2017) The use of nemabiome metabarcoding to explore gastro-intestinal nematode species diversity and anthelmintic treatment effectiveness in beef calves. *International Journal for Parasitology*, 47 (13), 893-902. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.06.006>.
- Babják, M., Königová, A., Dolinská, M.U., Vadlejch, J., Várady, M. (2018) Anthelmintic resistance in goat herds - *In vivo* versus *in vitro* detection methods. *Veterinary Parasitology*, 254, 10-14. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.02.036>.
- Brockwell, Y.M., Elliott, T.P., Anderson, G.R., Stanton, R., Spithill, T.W., Sangster, N.C. (2014) Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. *International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance*, 4 (1), 48-54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2013.11.005>.
- Cabaret, J., Berrag, B. (2004) Faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy: average versus individually based estimations. *Veterinary Parasitology*, 121, 105-113. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.01.020>.
- Cerda, C., Veloso-Frías, J., Lobos-Chávez, F., Oyarzún-Ruiz, P., Henríquez, A., Loyola, M., Fuente, M.C.S., Ortega, R., Letelier, R., Landaeta-Aqueveque, C. (2019) Morphological and molecular identification with frequency analysis of *Calicophoron microbothrioides* in central Chile. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 28 (4), 582-591. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612019076>.
- Červená, B., Anetová, L., Nosková, E., Pafčo, B., Pšenková, I., Javorská, K., Příhodová, P., Ježková, J., Václavěk, P., Malát, K., Modrý D. (2022) The winner takes it all: dominance of *Calicophoron daubneyi* (Digenea: Paramphistomidae) among flukes in Central European beef cattle. *Parasitology*, 149 (5), 612-621. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182021002158>.
- Coles, G.C., Stafford, K.A. (2001) Activity of oxyclozanide, nitroxynil, clorsulon and albendazole against adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Veterinary Record*, 148 (23), 723-724. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.148.23.723>.
- de Waal, T. (2010) *Paramphistomum* - a brief review. *Irish Veterinary Journal*, 63 (5), 313-315.

- Dorny, P., Stolaroff, V., Charlier, J., Meas, S., Sorn, S., Chea, B., Holl, D., Van Aken, D., Vercruysse, J. (2011) Infections with gastrointestinal nematodes, *Fasciola* and *Paramphistomum* in cattle in Cambodia and their association with morbidity parameters. *Veterinary Parasitology*, 175 (3-4), 293-299.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.023>.
- Doyle, S.R., Cotton, J.A. (2019) Genome-wide approaches to investigate anthelmintic resistance. *Trends Parasitology*, 35, 289-301.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.004>.
- Elard, L., Cabaret, J., Humbert, J.F. (1999) PCR diagnosis of benzimidazole-susceptibility or -resistance in natural populations of the small ruminant parasite, *Teladorsagia circumcincta*. *Veterinary Parasitology*, 80 (3), 231-237.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00214-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00214-3).
- Ferreras, M.C., González-Lanza, C., Pérez, V., Fuertes, M., Benavides, J., Mezo, M., González-Warleta, M., Giráldez, J., Martínez-Ibeas, A.M., Delgado, L., Fernández, M., Manga-González, M.Y. (2014) *Calicophoron daubneyi* (Paramphistomidae) in slaughtered cattle in Castilla y León (Spain). *Veterinary Parasitology*, 199 (3-4), 268-271.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.10.019>.
- Flanagan, A., Edgar, H., Gordon, A., Hannab, R., Brenna, G., Fairweather, I. (2011) Comparison of two assays, a faecal egg count reduction test (FECRT) and a coproantigen reduction test (CRT), for the diagnosis of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 176 (2-3), 170-176.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.10.057>.
- González-Warleta, M., Lladosa, S., Castro-Hermida, J.A., Martínez-Ibeas, A.M., Conesa, D., Muñoz, F., López-Quílez, A., Manga-González, Y., Mezo, M. (2013) Bovine paramphistomosis in Galicia (Spain): Prevalence, intensity, a etiology and geospatial distribution of the infection. *Veterinary Parasitology*, 191 (3-4), 252-263.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.09.006>.
- Gordon, D.K., Roberts, L.C.P., Lean, N., Zadoks, R.N., Sargison, N.D., Skuce, P.J. (2013) Identification of the rumen fluke, *Calicophoron daubneyi*, in GB livestock: possible implications for liver fluke diagnosis. *Veterinary Parasitology*, 195 (1-2), 65-71.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.01.014>.
- Gunathilaka, N., Niroshana, D., Amarasinghe, D., Udayanga, L. (2018) Prevalence of gastrointestinal parasitic infections and assessment of deworming program among cattle and buffaloes in Gampaha District, Sri Lanka. *BioMed Research International*, 2018, 30483730.  
DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/3048373>.
- Holm, S.A., Sörensen, C.R., Thamsborg, S.M., Enemark, H.L. (2014) Gastrointestinal nematodes and anthelmintic resistance in Danish goat herds. *Parasite*, 21, 37.  
DOI: <https://doi.org/10.1051/parasite/2014038>.
- Horak, I.G. (1971) Paramphistomiasis of domestic ruminants. *Advances in Parasitology*, 9, 33-72.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60159-1](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60159-1).
- Hotessa, A.S., Kanko, D.K. (2020) Review on Paramphistomosis. *Advances in Biological Research*, 14 (4), 184-192.  
DOI: <https://doi.org/10.5829/idosi.abr.2020.184.192>.
- Humbert, J.F., Cabaret, J., Elard, L., Leignel, V., Silvestre, A. Molecular approaches to studying benzimidazole resistance in trichostrongylid nematode parasites of small ruminates. (2001) *Veterinary Parasitology*, 101 (3-4), 405-414.  
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00565-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00565-9).
- Huson, K.M., Oliver, N.A.M., Robinson, M.W. (2017) Paramphistomosis of Ruminants: An Emerging Parasitic Disease in Europe. *Trends in Parasitology*, 33 (11), 836-844.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.07.002>.
- Ico-Gómez, R., González-Garduño, R., Ortiz-Pérez, D., Mosqueda-Gualito, J., Flores-Santiago, E., Sosa-Pérez, G., Salazar-Tapia, A. (2021) Assessment of anthelmintic effectiveness to control *Fasciola hepatica* and paramphistome mixed infection in cattle in the humid tropics of Mexico. *Parasitology*, 148 (12), 1458-1466.  
DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182021001153>.
- Itagaki, T., Tsumagari, N., Tsutsumi, K.I., Chinone, S. (2003) Discrimination of three amphistome species by PCR-RFLP based on rDNA ITS2 markers. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65 (8), 931-933.  
DOI: <https://doi.org/10.1292/jvms.65.931>.
- Jones, R.A., Williams, H.W., Dalesman, S., Brophy, P.M. (2015) Confirmation of *Galba truncatula* as an intermediate host snail for *Calicophoron daubneyi* in Great Britain, with evidence of alternative snail species hosting *Fasciola hepatica*. *Parasites & Vectors*, 8, 1-4.  
DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1271-x>.
- Keyyu, J.D., Kassuku, A.A., Kyvsgaard, N.C., Monrad, J. (2008) Comparative efficacy of anthelmintics against *Fasciola gigantica* and amphistomes in naturally infected cattle in Kilolo District, Tanzania. *Tanzania Veterinary Journal*, 25 (1), 40-47.  
DOI: <https://doi.org/10.4314/tvj.v25i1.42027>.
- Keyyu, J.D., Kassuku, A.A., Msalilwa, L.P., Monrad, J., Kyvsgaard, N.C. (2006) Cross-sectional prevalence of helminth infections in cattle on traditional, small-scale and large-scale dairy farms in Iringa District, Tanzania. *Veterinary Research Communications*, 30 (1), 45-55. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11259-005-3176-1>.
- Kochapakdee, S., Pandey, V.S., Pralomkarn, W., Chondumrongkul, S., Ngampongsai, W., Lawpetchara, A. (1995) Anthelmintic resistance in goats from Southern Thailand. *Veterinary Record*, 137 (5), 124-125.
- Kotze, A.C., Gilleard, J.S., Doyle, S.R., Prichard, R.K. (2020) Challenges and opportunities for the adoption of molecular diagnostics for anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology-Drugs and Drug Resistance*, 14, 264-273.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2020.11.005>.
- Liu, G.H., Gasser, R.B., Young, N.D., Song, H.Q., Ai, L., Zhu, X.Q. (2014) Complete mitochondrial genomes of the 'intermediate form' of *Fasciola* and *Fasciola gigantica*, and their comparison with *F. hepatica*. *Parasites & Vectors*, 7, 1-10.  
DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-150>.
- Lotfy, W.M., Brant, S.V., Ashmawy, K.I., Devkota, R., Mkoji, G.M., Loker, E.S. (2010) A molecular approach for identification of paramphistomes from Africa and Asia. *Veterinary Parasitology*, 174 (3-4), 234-240. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.08.027>.
- Malrait, K., Verschave, S., Skuce, P., Van Loo, H., Vercruysse, J., Charlier, J. (2015) Novel insights into the pathogenic importance, diagnosis and treatment of the rumen fluke (*Calicophoron daubneyi*) in cattle. *Veterinary Parasitology*, 207 (1-2), 134-139.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.10.033>.
- Martínez-Ibeas, A.M., González-Warleta, M., Martínez-Valladares, M., Castro-Hermida, J.A., González-Lanza, C., Miñambres, B., Ferreras, C., Mezo, M., Manga-González, M.Y. (2013) Development and validation of a mtDNA multiplex PCR for identification and discrimination of *Calicophoron daubneyi* and *Fasciola hepatica* in the *Galba truncatula* snail. *Veterinary Parasitology*, 195 (1-2), 57-64.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.048>.
- Martínez-Valladares, M., Geurden, T., Bartram, D.J., Martínez-Pérez, J.M., Robles-Pérez, D., Bohórquez, A., Florez, E., Meana, A., Rojo-Vázquez, F.A. (2015) Resistance of gastrointestinal nematodes to the most commonly used anthelmintics in sheep, cattle and horses in Spain. *Veterinary Parasitology*, 211 (3-4), 228-233.  
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.05.024>.

- Mason, C., Stevenson, H., Cox, A., Dick, I., Rodger, C. (2012) Disease associated with immature paramphistome infection in sheep. *Veterinary Record*, 170 (13), 343-344. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.e2368>.
- Mavenyengwa, M., Mukaratirwa, S., Monrad, J. (2010) Influence of *Calicophoron microbothrium* amphistomosis on the biochemical and blood cell counts of cattle. *Journal of Helminthology*, 84 (4), 355-361. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022149X10000015>.
- Mejía, M.E., Igartúa, B.M.F., Schmidt, E.E., Cabaret, J. (2003) Multispecies and multiple anthelmintic resistance on cattle nematodes in a farm in Argentina: the beginning of high resistance? *Veterinary Research*, 34 (4), 461-467. DOI: <https://doi.org/10.1051/vetres:2003018>.
- Moazeni, M., Ahmadi, A. (2016) Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*. *Experimental Parasitology*, 169, 81-89. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.07.010>.
- Mooney, L., Good, B., Hanrahan, J.P., Mulcahy, G., de Waal, T. (2009) The comparative efficacy of four anthelmintics against a natural acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in the west of Ireland. *Veterinary Parasitology*, 164 (2-4), 201-205. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.017>.
- Nzalawahe, J., Hannah, R., Kassuku, A.A., Stothard, J.R., Coles, G., Eisler, M.C. (2018) Evaluating the effectiveness of trematocides against *Fasciola gigantica* and amphistomes infections in cattle, using faecal egg count reduction tests in Iringa Rural and Arumeru Districts, Tanzania. *Parasites & Vectors*, 11, 384. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2965-7>.
- Paraud, C., Gaudin, C., Pors, I., Chartier, C. (2009) Efficacy of oxiclozanide against the rumen fluke *Calicophoron daubneyi* in experimentally infected goats. *Veterinary Journal*, 180 (2), 265-267. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.01.002>.
- Rieu, E., Recca, A., Bénét, J.J., Saana, M., Dorchies, P., Guillot, J. (2007) Reliability of coprological diagnosis of *Paramphistomum* sp. infection in cows. *Veterinary Parasitology*, 146 (3-4), 249-253. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.033>.
- Rinaldi, L., Perugini, A.G., Capuano, F., Fenizia, D., Musella, V., Veneziano, V., Cringoli, G. (2005) Characterization of the second internal transcribed spacer of ribosomal DNA of *Calicophoron daubneyi* from various hosts and locations in southern Italy. *Veterinary Parasitology*, 131 (3-4), 247-253. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.035>.
- Rolfe, P.F., Boray, J.C. (1987) Chemotherapy of paramphistomosis in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 64 (11), 328-332. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1987.tb06060.x>.
- Sanabria, R., Ceballos, L., Moreno, L., Romero, J., Lanusse, C., Alvarez, L. (2013) Identification of a field isolate of *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and susceptible to triclabendazole. *Veterinary Parasitology*, 193 (1-3), 105-110. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.11.033>.
- Sangster, N.C., Rickard, J.M., Hennessy, D.R., Steel, J.W., Collins, G.H. (1991) Disposition of oxfendazole in goats and efficacy compared with sheep. *Research in Veterinary Science*, 51 (3), 258-263. DOI: [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(91\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0034-5288(91)90074-X).
- Selemetas, N., Phelan, P., O'Kiely, P., de Waal, T. (2015) The effects of farm management practices on liver fluke prevalence and the current internal parasite control measures employed on Irish dairy farms. *Veterinary Parasitology*, 207 (3-4), 228-240. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.12.010>.
- Spence, S.A., Fraser, G.C., Chang, S. (1996) Responses in milk production to the control of gastrointestinal nematode and paramphistome parasites in dairy cattle. *Australian Veterinary Journal*, 74 (6), 456-459. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1996.tb07569.x>.
- Spence, S.A., Fraser, G.C., Dettmann, E.B., Battese, D.F. (1992) Production responses to internal parasite control in dairy cattle. *Australian Veterinary Journal*, 69 (9), 217-220. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1992.tb09928.x>.
- Swart, P.J. (1954) The identity of so-called *Paramphistomum cervi* and *P. explanatum*, two common species of ruminant trematodes in South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 26 (3), 463-473. DOI: <https://repository.up.ac.za/handle/2263/58802>.
- Thienpont, D., Rochette, F., Vanparijs, O.F.J. (1986) Diagnosing helminthiasis by coprological examination, 3<sup>rd</sup> ed., Jassen Research Foundation: Beerse, Belgium, pp. 34-35.
- Torres-Acosta, J.F.J., Hoste, H. (2008) Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 77 (2-3), 159-173. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2008.03.009>.
- Torres-Acosta, J.F.J., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Caballero, A.J., Cuéllar-Ordaz, J.A. (2012) Anthelmintic resistance in sheep farms: update of the situation in the American continent. *Veterinary Parasitology*, 189 (1), 89-96. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.03.037>.
- 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 (2-3), 183-190. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.01.003>.
- Vineer, H.R., Morgan, E.R., Hertzberg, H., Bartley, D.J., Bosco, A., Charlier, J.C., Claerebout, E., de Waal, T., Hendrickx, G., Hinney, B., Höglund, J., Ježek, J., Kašný, M., Keane, O.M., Martínez-Valladares, M., Mateus, T.L., McIntyre, J., Mickiewicz, M., Munoz, A.M., Phythian, C.J., Ploeger, H.W., Rataj, A.V., Skuce, P.J., Simin, S., Sotiraki, S., Spinu, M., Stuen, S., Thamsborg, S.M., Vadlejch, J., Varady, M., von Samson-Himmelsjerna, G., Rinaldi, L. (2020) Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: creation and meta-analysis of an open database. *Parasite*, 27, 69. DOI: <https://doi.org/10.1051/parasite/2020062>.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelsjerna, G., Sangster, N.C. (2004) Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*, 20 (10), 469-476. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2004.07.010>.
- Zhao, Y.Y., Yang, X., Chen, H.M., Wang, L.X., Feng, H.L., Zhao, P.F., Tan, L., Lei, W.Q., AO, Y., HU, M., Fang, R. (2017) The complete mitochondrial genome of *Orthocoelium streptocoelium* (Digenea: Paramphistomidae) for comparison with other digeneans. *Journal of Helminthology*, 91 (2), 255-261. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0022149X16000183>.
- Ziółkowska, E., Ostapowicz, K., Kuemmerle, T., Perzanowski, K., Radeloff, V.C., Kozak, J. (2012) Potential habitat connectivity of European bison (*Bison bonasus*) in the Carpathians. *Biological Conservation*, 146 (1), 188-196. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.12.017>.