

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Monitoring výskytu a míry rezistence *Parascaris* spp.
na pyrantel u hříbat v České republice**

Diplomová práce

Bc. Eliška Zikmundová

Management zdraví a welfare zvířat

Ing. Jana Nápravníková, DiS., Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Monitoring výskytu a míry rezistence *Parascaris* spp. na pyrantel u hříbat v České republice" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26.4.2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala paní Ing. Janě Nápravníkové, Dis., Ph.D. za všechny výzvy, kterým jsem musela čelit během naší spolupráce v tomto projektu. I když některé situace byly náročné, Váš přístup mě naučil, jak se vypořádat s obtížnými situacemi a posílit svou odolnost. Vaše vedení mě posunulo vpřed a pomohlo mi získat cenné zkušenosti. Děkuji za Vaši podporu, ochotu a vedení v této práci.

Monitoring výskytu a míry rezistence *Parascaris* spp. na pyrantel u hřibat v České republice

Souhrn

Cílem této diplomové práce bylo poskytnout informace tématu anthelmintické rezistence. Tato práce byla založena na experimentální činnosti, která cílila na ověření anthelmintické účinnosti zvoleného léčiva pyrantel embonát proti koňským škrkavkám (*Parascaris* spp.) na celém území České republiky v letech 2023 až 2024.

Parascaris sp. se postupně stává celosvětově se vyskytujícím parazitem u koní. Cyathostominy a *Parascaris* spp. patří do skupin parazitů ovlivňujících zdravotní stav a kondici hřibat a mladých koní. Celosvětovým problémem cyathostomin je vysoká rezistence na anthelmintika, která poukazuje na dnešní trend nevhodného používání anthelmintik a nutnost zahájení prevence proti vzniku rezistence na daná léčiva i u jiných parazitů jako jsou *Parascaris* spp.

Celková rezistence výrazně komplikuje kontrolu infekcí způsobených těmito parazity, z tohoto důvodu je klíčové včasné rozpoznání anthelmintické rezistence a prevence jejího dalšího šíření.

V této studii bylo získáno celkem 292 pozitivních vzorků hřibat z celé České republiky ke koprologickému vyšetření. Koprologické vyšetření za využití metody Mini-FLOTAC probíhalo od roku 2023 do roku 2024. Všechna vyšetření se uskutečnila v parazitologické laboratoři FAPPZ ČZU v Praze. Determinovaná vajíčka parazitů byla následně vyhodnocena pomocí základní popisné statistiky. Následně se selektovaly vzorky s nálezem škrkavek k vyhodnocení jejich rezistence na léčivo pyrantel embonát, které bylo podáno k dehelmintizaci. Pro vyhodnocení účinnosti léčiva byl použit test redukce počtu vajíček ve výkalech (FECRT), který je založen na vyšetření zvířat před léčbou a po léčbě. Byla stanovena hranice účinnosti a vyhodnocena rezistence za pomoci Bayesovských hierarchických modelů.

Účinnost léčiva pyrantel byla u 84,3 % vzorků zjištěna jako dostatečná (více než 95% hranice účinnosti), 15,7 % vzorků pak tvořilo nedostatečnou účinnost testovaného anthelmintika.

Na základě výsledků lze konstatovat, že účinnost pyrantel embonátu je dostačující, ale vzhledem k současnému a často nesprávnému využití anthelmintik, které souvisí se vznikem anthelmintické rezistence, je nutno brát zřetel na správný celkový managementem stáji včetně vhodného antiparazitárního programu.

Klíčová slova: koně, škrkavky, Mini-FLOTAC, rezistence, pyrantel

Monitoring of incidence and level of resistance of *Parascaris* spp. to pyrantel in foals in the Czech Republic

Summary

The aim of this thesis is to provide information for the anthelmintic resistance. This thesis was based on experimental work, which goal was to verify the anthelmintic efficacy of the selected medication – pyrantel embonate against horse roundworms (*Parascaris* spp.) throughout the Czech Republic between 2023 and 2024.

Parascaris spp. is gradually becoming a worldwide parasite in horses. Cyathostomines and *parascaris* spp. belong to the group of parasites affecting the health and condition of foals and young horses. A worldwide problem of cyathostomin is a high resistance to anthelmintics. This problem is pointing towards the current trend of inappropriate usage of anthelmintics and also towards the necessity to begin with prevention against medication resistance in other parasites as well such as *Parascaris* spp.

The overall resistance significantly complicates the control over infections caused by these parasites, therefore early recognition of anthelmintic resistance and prevention of its further spread is crucial.

In this study, a total of 292 positive foal samples from the entire Czech Republic were obtained for coprological examination. The coprological examination using the Mini-FLOTAC method took place from 2023 to 2024. All examinations were carried out in the parasitological laboratory FAPPZ CZU in Prague. Determined parasite eggs were evaluated afterwards using basic descriptive statistics. The samples with roundworm findings were then selected for evaluation of their resistance to the pyrantel embonate medicament, which was given for dehelminthization. To evaluate the efficacy of the medication, the fecal egg count reduction test (FECRT) was used. The test is based on the examination of the animals before and after the treatment. An efficacy threshold was determined and resistance was evaluated using the Bayesian hierarchical models.

The efficacy of the medication pyrantel was found to be sufficient in 84,3 % of the samples (more than 95 % of the efficacy threshold), while 15,7 % of the samples were found to be insufficiently effective for the tested anthelmintic.

Based on the results, it can be concluded that the efficacy of the pyrantel embonate is sufficient, but due the current and often incorrect use of anthelmintics, which is associated with the emergence of the anthelmintic resistance, it is necessary to be cautious about overall management of the stables including an appropriate antiparasitic program.

Keywords: horses, *Parascaris* spp., Mini-FLOTAC, anthelmintic resistance, pyrantel

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
3 Literární rešerše	11
Charakteristika hlístice rodu <i>Parascaris</i>	11
3.1.1. Klasifikace	11
3.1.2. Morfologie a vývojový cyklus.....	11
3.1.3. Vývojový cyklus	12
3.1.4. Rozšíření, hostitelé, klinický význam	14
3.1.5. Vliv vnějších podmínek na vývoj larev na pastvině	16
Anthelmintika	16
3.2.1. Rozdělení anthelmintik.....	17
3.2.1.1. Benzimidazoly	17
3.2.1.2. Makrocyclické laktony	18
3.2.1.3. Tetrahydropyrimidiny	19
3.2.2. Mechanismus účinku léčiva pyrantel.....	19
Anthelmintická rezistence	20
3.3.1. Rezistence škrkavky koňské u koní na benzimidazoly	21
3.3.2. Rezistence škrkavky koňské na makrocyclický laktony	21
3.3.3. Rezistence škrkavky koňské na tetrahydropyrimidiny	23
3.3.4. Prevence vzniku anthelmintické rezistence	23
3.3.4.1. Rizikové faktory pro rozvoj rezistence	24
3.3.4.2. Frekvence, správné dávkování, cílení, zajištění účinnosti.....	25
3.3.4.3. Preventivní programy.....	25
3.3.4.4. Strategie ponechání dostatečného množství parazitů v prostředí	26
3.3.4.5. Cílená léčba při ošetření celého stáda na základě dosažené úrovně parazitismu.....	26
3.3.4.6. Ošetření části stáda na základě identifikace jedinců majících užitek z cílené léčby.....	26
3.3.4.7. Nechemická kontrola	26
.Metody diagnostiky anthelmintické rezistence	27
3.4.1. In vivo metody – FECRT	27
3.4.1.1. Naplánování testování a počet vybraných zvířat	27
3.4.1.2. Kvantifikace počtu vajíček.....	28
3.4.1.3. Mini-FLOTAC metoda	29
3.4.1.4. Podání léčiva	31
3.4.1.5. Odběr vzorků a jejich vyhodnocení.....	31

3.4.1.6. Detekce antehlmintické rezistence	32
3.4.1.7. Identifikace dospělých parazitů.....	33
3.4.2. In vitro metody	33
4 Metodika.....	34
4.1. Popis postupu vyšetření vzorku.....	34
4.2. Statistické vyhodnocení dat pomocí FECRT a Bayesovských modelů	37
5 Výsledky.....	38
5.1. Statistica ANOVA	39
5.2. Analýza dle Bayesovských hierarchických modelů	40
6 Diskuze.....	42
7 Závěr	44
8 Literatura.....	45
9 Seznam použitých zkratek a symbolů.....	50
10 Samostatné přílohy.....	I

1 Úvod

Endoparazitózy koní jsou často podceňovaným problémem v chovech koní a věnuje se jim pouze malá pozornost, přestože jsou spojeny s vysokou mírou anthelmintické rezistence. Parazité mohou potrápít nejen koně, ale také jejich majitele, kteří řeší s tím spojené komplikace nejen z hlediska obtížné dehelmintizace, ale i snahy udržet pastvy co nejméně infekční pro zdravé jedince. Paraziti mohou způsobit závažná onemocnění koní a ovlivnit jejich výkonnost snížením kondice (Lyons et al. 2000). U koní jsou infekce gastrointestinálními hlísticemi běžné a mohou často probíhat i bez příznaků. To může vést k nedostatečné pozornosti chovatelů při prevenci a dodržování vhodných anthelmintických programů. Z tohoto důvodu bychom se měli více soustředit na zajištění chovatelských opatření, hygieny, managementu pastvin a preventivního vyšetření koní

Pyrantel embonát, který je řazen mezi tetrahydropyrimidiny, je jedním z často používaných širokospektrálních anthelmintik k tlumení helmintóz v podobě pasty Equistrong. Z tohoto důvodu byl v této práci vybrán k testování účinnosti u koní v ČR.

Pro chovatele má velký význam mít povědomí o rizicích spojených s rezistencí parazitů na dostupná léčiva a základních chybách, jako je například poddávkování či časté podávání stejného léčiva nebo nevyužití preventivního koprologického vyšetření. Na základě koprologického vyšetření se sestaví anthelmintický program, který může výrazně napomoci ke zpomalení rezistence.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem závěrečné práce bylo zhodnocení výskytu anthelmintické rezistence škrkavky koňské (*Parascaris* sp.) na území České republiky. Zpracování přehledu literatury na téma škrkavky koňské, obecné anthelmintické rezistence a aktuálního stavu rezistence ve světě i u nás. Experimentální činností vyhodnotit současný stav výskytu anthelmintické rezistence škrkavek vůči léčivu pyrantel embonát v České republice. Mezi hodnocené ukazatele bude zahrnut i věk koní. Na základě výsledků bude posouzen stav rezistence škrkavky koňské na léčivo pyrantel embonát u hříbat v České republice a budou navržena doporučení ke zpomalení vzniku rezistence.

Hypotéza 1: Pyrantel embonát má dostatečnou účinnost při léčbě infekcí škrkavkami.

Hypotéza 2: Počet nalezených vajíček škrkavek s věkem koně klesá.

3 Literární rešerše

Škrkavka koňská (*Parascaris* sp.) je klinicky podstatným vnitřním parazitem koní.

Charakteristika hlístice rodu *Parascaris*

Rod škrkavky, *Parascaris* spp. jsou významnými hlísticemi hříbat (Zhou et al. 2023) a mladých koní (Martin et al. 2018). Rod *Parascaris* spp. jsou velmi velké, tuhé, statné a bělavé hlístice žijící v tenkém střevě koňovitých (Taylor et al. 2016).

Parascaris spp. jsou morfologicky identické (Martin et al. 2018). Dle karyotypu se rozlišuje *Parascaris equorum* a *Parascaris univalens* (Zhou et al. 2023). *Parascaris equorum* má dva páry chromozomů, zatímco *Parascaris univalens* má jeden pár (Goday a Pimpinelli, 1986 In Martin et al. 2018).

Zajímavostí je, že v minulosti byly využívány jako modelové organismy v oblasti buněčné biologie (Zhou et al. 2023) a *Parascaris* sp. je prvním člověkem identifikovaným parazitem (Bodeček et al. 2017).

3.1.1. Klasifikace

Parascaris spp. (Goeze, 1782) patří do kmene hlístice (Nematoda), třídy Secernentea, řádu škrkavice (Ascaridida), čeledi škrkavkovití (Ascarididae), označované také jako askaridé, rodu *Parascaris* (BioLib, 2024).

3.1.2. Morfologie a vývojový cyklus

Parascaris sp. je největším vnitřním parazitem koní (Bodeček et al. 2017). Délka dospělce je u samice 60 až 380 mm (Mehlhorn 2016) či 400 mm (Bodeček et al. 2017) nebo dokonce je uváděno i 500 mm (Taylor et al. 2016). Samci dorůstají délky 150 až 250 mm (Mehlhorn 2016). Při těžkých infekcích však mohou být paraziti menší (Taylor et al. 2016). *Parascaris* spp. se podobají *Ascaris suum* epidemiologicky, ale také cestou, kterou její larvy migrují přes tkáň (Bowman 2014).

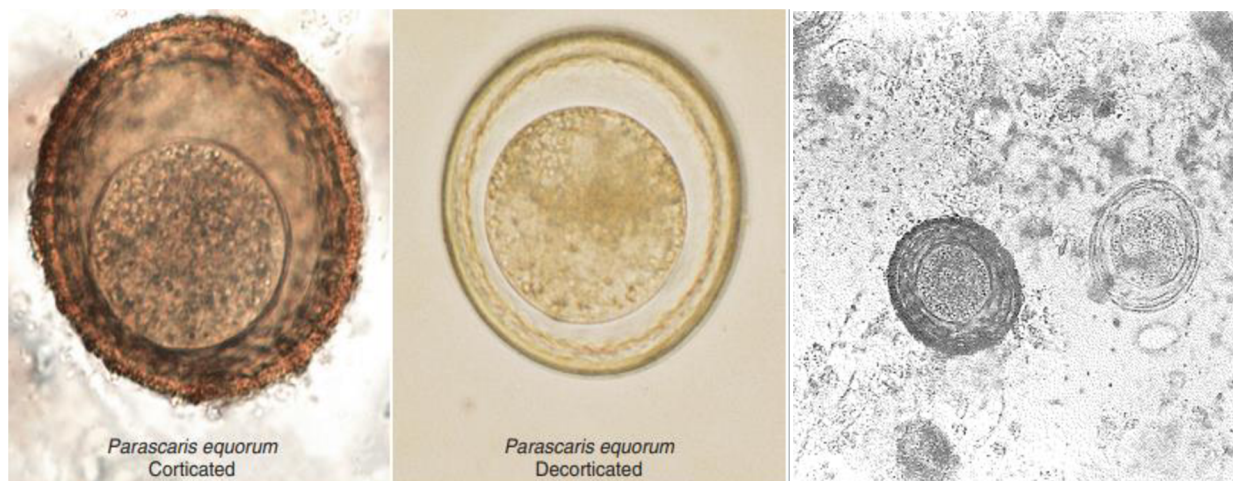
Jedná se o dlouhého červa se statnou hlavou, na které jsou tři hlavní pysky odděleny třemi menšími interlabiálními pysky a rozděleny na přední a zadní část vodorovnými rýhami (Taylor et al. 2016). (Obrázek 1)

Samec má na ocase malé boční alae. Jsou zde tři jednoduché páry a dva dvojité páry postkloakálních papil a je přítomno velké množství prekloakálních papil s jednou střední papilou na předním okraji kloaky (Taylor et al. 2016).



Obrázek 1 *Parascaris sp.* – dospělec a hlava samice s charakteristickými pysky
Zdroj: Bowman 2014

Vajíčko je kulovité, hnědožlutavé a je pokryto vrásčitou a bílkovitou (stahující se) vrstvou (Mehlhorn 2016). Obaly mají drsný povrch. Vajíčka obsahují jednu buňku. Vajíčka mají proteinovou vrstvou částečně nebo úplně oddělenou. Odkryté části takových obalů jsou hladké a čiré (Bowman 2014). (Obrázek 2)

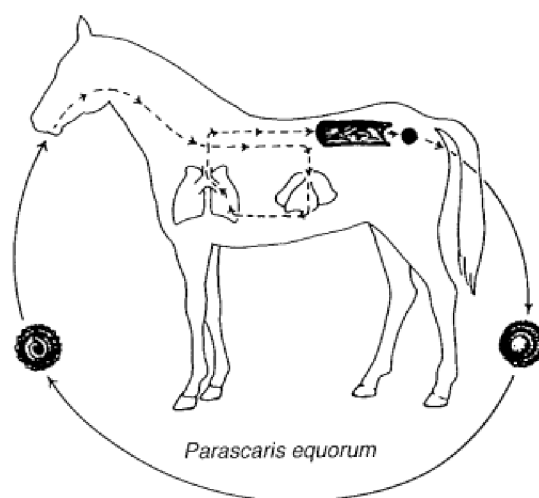


Obrázek 2 *Parascaris sp.* – vajíčko s obalem, vajíčko bez obalu, mikroskopický záznam vzorku
Zdroj: Bowman 2014, Foreyt 2001

Larva má rozměry 90–120 × 60 μm (Mehlhorn 2016).

3.1.3. Vývojový cyklus

Životní cyklus *Parascaris sp.* je přímý a migrační a zahrnuje hepatopulmonální cestu (Taylor et al. 2016), respektive hepatotracheální migraci přes játra a plíce (Fabiani et al. 2016). (Obrázek 3)



Obrázek 3 *Parascaris sp.* – vývojový cyklus

Zdroj: Foreyt 2001

K infekci *Parascaris spp.* dochází neúmyslným pozřením vajíček (Reinemeyer 2009), ve kterých se vyvíjejí larvy (Zajac & Conboy 2012). Při spolknutí infekčních vajíček *Parascaris spp.* se následně vylíhnou larvy (Bowman 2014). Larvy opouští vajíčko v trávicím traktu koně (Reinemeyer 2009) a zavrtávají se do stěny tenkého střeva (Bowman 2014).

Ze stěny tenkého střeva jsou larvy portální žilou zaneseny do jater (Bowman 2014). Do jater se dostávají do 48 hodin po požití (Taylor et al. 2016). V játrech larvy migrují ve tkáních, až se dostanou do jaterní žíly. Z jaterní žíly jsou larvy neseny kaudální dutou žilou a dostávají se do srdce (Bowman 2014).

Ze srdce larvy putují plicní tepnou do plic, kde vstoupí do alveolu (Bowman 2014). Do plic se dostávají do 2 týdnů (Taylor et al. 2016). V plicích larvy dokončují svlékání (Bowman 2014). Migrují vzhůru průduškami a průdušnicí (Taylor et al. 2016). Z plic larvy stoupají v expektoračním hlezu tracheobronchiálního stromu (Bowman 2014). Migraci přes játra a plíce stráví asi 14–17 dní (Nicholls et al. 1978 In Fabiani et al. 2016). Existuje však důvod se domnívat, že mnoho larev, které se dostanou do plic, se dále nevyvinou do dospělosti, zůstávají v plicích a způsobují patologii související s eozinofily (Bowman 2014).

Poté jsou vykašlávány (Fabiani et al. 2016) a spolknuty (Taylor et al. 2016) a vrací se přes lumen jícnu a žaludku do tenkého střeva, kde dokončují konečné svlékání (Bowman 2014) a dospívají (Zajac & Conboy 2012).

Taylor et al. (2016) uvádí, že místo výskytu a načasování líhnutí larev *Parascaris spp.* není přesně známo, ale zdá se, že vývoj z L2 do L3 probíhá mezi střevní sliznicí a játry a dva následující změny parazita se vyskytují v tenkém střevě.

Larvy migrují játry a plicemi, než se vrátí do tenkého střeva přibližně o měsíc později jako larvy čtvrtého stadia (L4). Škrkavky dozrávají progresivně v tenkém střevě asi 75 až 80 dnů po infekci (Reinemeyer 2009) či 90–110 dnů po infekci, jak uvádějí jiní (Lyons et al. 1976; Clayton a Duncan, 1978 In Fabiani et al. 2016).

V tenkém střevě se škrkavky rozmnožují (Bodeček et al. 2017). Dospělé samice zde kladou vajíčka (Reinemeyer 2009), kterých je až desetitisíce denně (Bodeček et al. 2017). Na konci vývojového cyklu žijí dospělci v tenkém střevě (Mehlhorn 2016) až několik měsíců (Bodeček et al. 2017).

Vajíčka prochází koňskými výkaly a vyvíjejí se v nich infekční larvy (Zajac & Conboy 2012). Infekčního stadia obsahujícího L₂ mohou dosáhnout již za 10–14 dní, i když při nízkých teplotách může být vývoj zpožděn (Taylor et al. 2016). S koňskými výkaly vajíčka přecházejí do prostředí (Reinemeyer 2009).

Minimální prepatentní období škrkavky koňské je 10 týdnů. Neexistuje žádný důkaz prenatalní infekce (Taylor et al. 2016). Doba mezi požitím zárodečného vajíčka parazita a výskytem životaschopných vajíček další generace v exkrementech (prepatentní perioda) je 2 1/2 měsíce (Bowman 2014).

3.1.4. Rozšíření, hostitelé, klinický význam

Infekce *Parascaris* spp. je velmi běžná u hříbat koní po celém světě (Fabiani et al. 2016), velmi zřídka však u dospělých koní (Zajac & Conboy 2012). Hostiteli *Parascaris* spp. jsou kromě koní také zebry a osli (Taylor et al. 2016).

Prevalence prokázaných infekcí u hříbat, odstavených a ročních mláďat mladších jednoho roku, se pohybuje mezi 0 a 80 % (Laugier et al. 2012; Relf et al. 2013; Armstrong et al. 2014; Lyons a Tolliver, 2014 In Fabiani et al. 2016).

K infekci *Parascaris* spp. dochází u hříbat mezi 3 a 18 měsíci věku (Radostits et al. 2006). První vlny invazních larev způsobují především mechanická poranění a lze pozorovat petechiální krvácení (Bowman 2014). U těchto mladších koní (tj. mladších než 2 roky) může být *Parascaris* sp. značným rizikem (Cribb et al. 2006 In Matthews 2014).

Bylo popsáno, že migrující larvy škrkavek způsobují patologii jater (Brown a Clayton, 1979 In Fabiani et al. 2016).

Infekce se může projevovat také parazitární pneumonií (Radostits et al. 2006). Migrující larvy škrkavek způsobují zánět dýchacích cest (Clayton a Duncan, 1978 In Fabiani et al. 2016).

Těžké infekce mohou způsobit také špatné prospívání, koliku, průjem a střevní obstrukci (Zajac & Conboy 2012). V tenkém střevě hříběte je možné nalézt stovky až tisíce *Parascaris* spp., což je už dostatečně velké množství parazitů, aby soutěžili s hostitelem o živiny (Bowman 2014). ()

Jakmile se však hostitel stane senzibilizovaným na antigeny *Parascaris* spp., tkáně reagují na přítomnost larev infiltrací eozinofilních leukocytů a dalších zánětlivých buněk (Bowman 2014).

Důsledky infekce jsou krátkodobé i trvalé. Poškození jater a plic se sice nakonec zahojí, ale chronické snížení funkční kapacity, kterým hříbě trpělo během období rychlého růstu, zanechává trvalé stopy (Bowman 2014).



Obrázek 4 *Parascaris* spp. – dospělci v tenkém střevě
Zdroj: Taylor et al. 2016

Infekce dospělými škrkavkami má za následek enteritidu a zpomaluje růst tím, že ovlivňuje trávení a vstřebávání živin (Bowman 2014). Výsledkem je podvyživený, podměrečný, nemocný kůň s malou výdrží a sníženou odolností vůči nemocem. Má matnou srst a jeho kůže je suchá a kožovitá. Břicho má příliš velké vůči postavě (Bowman 2014).

Těžké infekce mohou být i smrtelné (Zajac & Conboy 2012). Největším problémem u infekce škrkavkami je totiž zachytávání parazitů ve střevě a ruptura tenkého střeva. K ruptuře tenkého střeva může dojít spontánně (Fabiani et al. 2016). Dospělec *Parascaris* sp. perforuje stěnu střeva a způsobí fatální peritonitidu (Bowman 2014).

Podávání anthelmintik, která mají tendenci paralyzovat škrkavky (např. pyrantel emboát, piperazin a ivermektin), hříběti s vysokou infekcí, může příležitostně způsobit impakci nebo úplnou neprůchodnost střeva (Cribb et al, 2006; Schusser, Kopf, a Prosl, 1988 In Bowman 2014). Anthelmintická léčba byla proto identifikována jako rizikový faktor pro rupturu tenkého střeva (Southwood et al. 1996; Cribb et al. 2006 In Fabiani et al. 2016). Škrkavky mají totiž tendenci se shlukovat (), čímž pravděpodobně spouští silné peristaltické vlny, které někdy způsobují trhlinu podél mezenterického úponu (Drudge a Lyons, 1983 In Fabiani et al. 2016). Obstrukce se může objevit do 24 hodin po léčbě a je způsobena tím, jak mrtví nebo paralyzovaní paraziti se pohybují dolů tenkým střevem (Cribb et al. 2006 In Fabiani et al. 2016). Nedávný přehled 37 publikovaných případů podstoupení chirurgického zákroku z důvodu impakce škrkavek v tenkém střevě, ukázal, že 21 hříbat (57 %) přežilo až do propuštění a pouze 11 hříbat (30 %) přežilo déle než jeden rok po incidentu (Nielsen, 2016 In Fabiani et al. 2016).

Parascaris sp. je však jedním ze vzácných případů hlístic, které navozují absolutní získanou imunitu. Většina koní se tak stává imunní během prvního roku života. Patentní škrkavkové infekce jsou tak zřídka diagnostikovány u koní starších dvou let (Reinemeyer 2009).

Ze epidemiologického hlediska jsou u tohoto parazita klíčové dva faktory: vysoká reprodukční schopnost dospělých jedinců, což umožňuje uvolňování milionů vajíček denně výkaly, a vysoká odolnost těchto vajíček (Taylor et al., 2016).

3.1.5. Vliv vnějších podmínek na vývoj larev na pastvině

Vajíčka *Parascaris* spp. jsou mimořádně odolná (Taylor et al. 2016). Mají silný obal, který je chrání před teplotními extrémy a ultrafialovým zářením. Vajíčko je díky němu také velice odolné vůči vysychání a většině chemických dezinfekčních prostředků (Bowman 2014). Mimořádná odolnost umožňuje vajíčkům perzistenci v prostředí po několik let (Taylor et al. 2016). Larvovaná vajíčka přežívají v prostředí až pět nebo i deset let (Reinemeyer 2009). Trvanlivost vajíčka je klíčovým prvkem v epidemiologii infekce *Parascaris* sp. (Bowman 2014).

Šíření pomáhá také lepkavost vnějšího obalu vajíčka. Vajíčka tak snadno přilnou k vemeni a strukům březí klisny. Na severní polokouli jsou v létě takové teploty, že mnoho vajíček se stane infekčním v době, kdy je přítomna populace náchylných hříbat (Taylor et al. 2016). Infekční stádium je larva, které obsahuje třetí stádium (L₃). Její vývoj vyžaduje přibližně 10 dní při teplotách 25 °C až 35 °C (Reinemeyer 2009). Parazit poté, co projde ústrojím koně, se s koňskými výkaly dostává zpět na pastvinu. U těžce infikovaných hříbat se může jednat denně až o miliony vajíček parazitů (Clayton a Duncan, 1979 In Martin et al. 2018).

Pastvina je poté kontaminována vajíčky, která mohou přežít několik následujících sezón (Taylor et al. 2016). Vajíčka se ve znečištěných půdách léta hromadí a vytváří tak rostoucí rezervoár infekce (Bowman 2014).

Dospělí koně mohou být také hostiteli. Obvykle jsou hostiteli jen několika dospělců *Parascaris* spp., čímž se ale stávají také přenašeči. Šířiteli jsou ale převážně roční hříbata, která se nakazí zhruba od prvního měsíce života. Infekce je v chovu udržována především sezónním přenosem mezi skupinami mladých zvířat. U hříbat exponovaných infekci se často vyvine imunita, v jejímž důsledku se částečně nebo úplně zbaví parazita (Taylor et al. 2016).

Epidemiologie infekce *Parascaris* sp. se z důvodu vysoké odolnosti vajíček liší od epidemiologie strongylidů s jejich volně žijícími infekčními larvami. Pro účinnou sanitaci stájí se doporučuje každý týden odstraňovat veškerý hnůj a podestýlku a pečlivě čistit povrchy vysokotlakým čističem nebo parním čističem. Většina chovatelů to obvykle považuje za příliš pracné a spoléhají na anthelmintika. Díky mimořádné životnosti a odolnosti vajíček škrkavek vede ale postupná kontaminace vajíčky k jejich kumulaci. Důležité je proto důkladné vyčištění alespoň stáje pro hříbě a očištění vemene a struků klisny (Bowman 2014).

Anthelmintika

Anthelmintika jsou léčiva určená k léčbě helmintóz a preventivnímu tlumení populace parazitů (Bodeček et al. 2017). Jsou na ně kladeny následující nároky. V prvé řadě musejí být bezpečná (Taylor et al. 2016). Většina moderních anthelmintik je dle Bodečka et al. (2017) bezpečná a vedlejší účinky se téměř nevyskytují.

Anthelmintika by měla být také snadno dávkovatelná a aplikovatelná (Taylor et al. 2016) se širokým spektrem účinku. V minulosti tyto požadavky splňovaly benzimidazoly. Byly ale plošně používané bez střídání s jinými skupinami, což vyústilo v rezistenci cyathostominů vůči anthelmintikům. Důležitým požadavkem je proto absence rezistence parazitů. Dále je uváděn

larvicidní efekt, aby anthelmintikum nezlikvidovalo pouze dospělce a larvy se nezavlékaly dále do chovů (Bodeček et al. 2017). Dle Bodečka et al. (2017) dnes bohužel na trhu není žádný přípravek, který by naprosto spolehlivě eliminoval larvy po jednom použití.

3.2.1. Rozdělení anthelmintik

Anthelmintika se člení do tříd na: makrocyklické laktony, benzimidazoly, imidazothiazoly, tetrahydropyrimidiny, cyklické depsipeptidy, piperazin, organofosfáty, isochinolony, arseniky, různé širokospektrální kombinace (Bowman 2014).

Pro hubení hlístic (nematoda) koní jsou v současnosti registrovány v České republice tři širokospektrální léčivé látky:

- benzimidazoly (fenbendazol),
- makrocyklické laktony (ivermektin, moxidectin),
- tetrahydropyrimidiny (pyrantel) (Matthews 2014).

U koní se také ale používají nebo používaly například organofosfáty a fenothiazin (Bodeček et al. 2017), imidazothiazoly a piperazin (Foreyt 2001).

Piperazin má velmi omezené působení. Primárně působí proti škrkavkám (Papich, 2007; Reinemeyer a Courtney, 2001 In Bowman, 2014). Z důvodu svého úzkého zaměření není v současnosti nabízen k odčervení koní na českém trhu (Švehlová, 2011), ale ani v USA (Bowman, 2014).

3.2.1.1. Benzimidazoly

Benzimidazoly jsou širokospektrální léčiva. Prvním léčivem z této skupiny byl thiabendazol, zavedený před více než 40 lety. V době svého uvedení na trh byl thiabendazol skutečně širokospektrální produkt, který byl pro hostitelské zvíře velmi bezpečný. Za dobu svého užívání se však u několika druhů parazitů rozvinula rezistence.

Výsledkem působení benzimidazolů je pomalá destrukce parazita (Bodeček et al. 2017). Na trhu je přípravek nabízen ve formě např. suspenze, pasty, pelet, prášku aj. (Bodeček et al. 2017). Benzimidazoly jsou špatně rozpustné ve vodě, z toho důvodu se obvykle podávají perorálně. Mají tendenci být účinnější u koní a přežvýkavců kvůli rychlému metabolismu na aktivní metabolity gastrointestinálními mikroby (Lancusse et al, 2009 In Bowman, 2014).

Benzimidazoly jsou účinné proti dospělcům škrkavek v tenkém střevě, dospělcům malých a velkých strongylidů a také proti roupům v tlustém střevě. Opakované podávání vyšších dávek má larvicidní účinek na larvy malých strongylidů (cyathostominů) ovšem tyto vlastnosti benzimidazolů vedly v minulosti k jejich častému užívání (Bodeček et al. 2017).

Výhodou tohoto endoparazitika je, že má nízkou toxicitu, nízké dávkování a širší účinnost proti střevním parazitům. V současné době jsou benzimidazoly anthelmintikem vhodným pro terapii škrkavek a roupů rezistentních na ivermektin. Benzimidazoly lze také bezpečně kombinovat s jinými anthelmintiky (např. piperazin) (Bodeček et al. 2017).

Nevýhodou benzimidazolů je snadno vytvořitelná rezistence, a to nejen na konkrétní druh benzimidazolu, ale i ostatní zástupce této skupiny (Bodeček et al. 2017).

Příkladem benzimidazolů určených pro koně na českém trhu jsou fenbendazol (Panacur, Helmigal) (ÚSKVBL 2021).

3.2.1.2. Makrocyklické laktony

Dělí se na avermektiny a milbemyciny. Ivermektin je nejznámější látkou v této třídě. Jsou obecně považovány za dosud nejúčinnější a nejméně toxické parazitocidy. Všechny tyto produkty jsou podobné v tom, že jde o látky produkované mikroorganismy streptomycet a mají velké makrocyklické struktury (Bowman 2014).

Mechanismus účinku makrocyklických laktonů spočívá v tom, že se vážou na glutamátové chloridové kanály (Arena et al, 1991; Martin, 1993; Martin, 1997b; Shoop et al, 1995; Vercruyse and Rew, 2002; Wolstenholme and Rogers, 2005 In Bowman 2014) svalových membrán u bezobratlých. Výsledkem je ochrnutí hltanu, svaloviny celého těla i dělohy, čímž parazité ztrácí schopnost pohybu a kladení vajíček (Bodeček et al. 2017). Makrocyklické laktony navazují na glutamátové receptory, což vyvolává přísun chloridů, což způsobuje hyperpolarizaci neuronu parazita a brání vzniku nebo šíření normálních akčních potenciálů. V důsledku toho dochází k paralýze a smrti cílového parazita (Bowman 2014).

Avermektiny účinkují na dospělé velkých i malých strongylidů, škrkavky, roupy, onchocerky, trichostrongyly i plicnivky. Také vykazují efekt i proti migrujícím larvám škrkavek a velkých strongylidů, ale jsou téměř neúčinné u encystovaných larev cyathostominů (Bodeček et al. 2017). Avšak na avermektiny je u škrkavek celosvětově rozšířena rezistence. Tomuto tématu je blíže věnována kapitola 3.3.2.

Výhodou makrocyklických laktonů bývalo, že byly obecně vysoce účinné v nízkých dávkách, velmi bezpečné a širokospektrální proti hlísticím a členovcům. Dvojitá ochrana makrolidů, jako je ivermektin a selamektin, proti endoparazitům (jako jsou helminti) a ektoparazitům (jako jsou blechy), dala vzniknout termínu endektocid (Bowman 2014). Výhodou nejmladšího milbecinu moxidektinu je, že je nejmladší a je tudíž nejefektivnější anthelmintikum.

Z tohoto důvodu je vhodnější používat moxidektin spíše jako terapeutikum než jej pravidelně zařazovat do anthelmintického programu stáda (Bodeček et al. 2017).

Nevýhodou makrocyklických laktonů je jejich ekotoxicita (působí proti řadě druhů hmyzu vyvíjejícího se ve výkalech) (Bodeček et al. 2017). Nevýhodou je však také rozvoj rezistence makrocyklických laktonů v léčbě škrkavky koňské u infikovaných koní, popsáný po celém světě (von Samson-Himmelstjerna, 2012 In Bowman 2014). Pokud se staly makrocyklické laktony neúčinnými, bylo nutné použít pyrantel embonát nebo fenbendazol (Bowman 2014). Osvědčila se 2× dávka pyrantel emboátu (Craig, Diamond, a Ferwerda, 2007 In Bowman 2014). Je tedy poměrně jasně doloženo, že si škrkavka koňská vyvinula rezistenci vůči ivermektinu a moxidektinu. Pokud je v chovu přítomna rezistence, může to mít pro hřebata vážné důsledky, pokud se infekce nezbaví (Bowman 2014).

Příkladem avermektinů určených pro koně na českém trhu jsou ivermectiny (Noromectin, Ecomectin, Equimax, Equiverm, Noromectin Praziquantel duo a příkladem milbemycinů moxidektiny (Equest, Equimoxin, Equest Pramox) (ÚSKVBL 2021).

3.2.1.3. Tetrahydropyrimidiny

Mezi tetrahydropyrimidiny patří četné soli pyrantelu, morantelu a oxantelu (Bowman, 2014). Mechanismus účinku tetrahydropyrimidiny je založen na tom, že všechny působí jako agonisté nikotinových receptorů, kteří interferují s nervosvalovým systémem, vyvolávají kontrakci a následnou tonickou paralýzu tím, že působí na nikotinové receptory (nAChR) jak na synaptických, tak na extrasynaptických místech na svalových buňkách hlístic (Aubry et al, 1970; Eyre, 1970; Lanusse et al, 2009; Martin, 1993; Martin, 1997 In Bowman, 2014).

3.2.2. Mechanismus účinku léčiva pyrantel

Pyrantel byl představen v roce 1966 a jedná se o nejrozšířenější ze všech tetrahydropyrimidinových anthelmintik (Lanusse et al, 2009 In Bowman 2014). Pyrantel-embonát je širokospektrální anthelmintikum (Bioveta, 2016). Je určen k léčbě a potlačení infekce nejen škrkavkou koňskou, ale také dospělci malých a velkých strongylidů, roupů a tasemnic (Bioveta, 2016). Cílovými druhy jsou nejen koně, ale také ostatní přežvýkavci, prasata a další. (Bowman 2014).

Mechanismus účinku tohoto léčiva spočívá ve vyvolání spastické paralýzy. Pyrantel je cholinergní agonista, který působí jako excitační neurotransmitter na nikotinergních receptorech ve svalových buňkách parazita, což vede k depolarizaci neuromuskulárních spojů a následné kontrakci muskulatury, podobně jako po působení acetylcholinu (Bioveta, 2016). V důsledku podání léčiva tedy nedochází k úhynu parazita, ale k jeho ochromení a z těla hostitele je vyloučen v živém stavu.

Pyrantel je pro koně dostupný jako tartarát nebo emboát. Tartarátová sůl pyrantelu je bílý prášek, rozpustný ve vodě. Tartarátová sůl pyrantelu se vstřebává lépe než emboátová sůl pyrantelu. Plazmatické hladiny dosahují vrcholu za 2 až 3 hodiny, následuje rychlý metabolismus a eliminace močí (Bowman 2014). Tartarátová sůl se používá u koní, ale i u prasat (Lanusse et al, 2009 In Bowman 2014). Užívá se ke omezení dospělých a L₄ stádií škrkavky koňské a je bezpečný pro všechny koně, včetně hříbat a březích kobyl. *Plodnost hřebce také není použitím pyrantel tartarátu ovlivněna.* Lék lze podávat současně s insekticidy, trankvilizéry, svalovými relaxanty a léky ovlivňujícími centrální nervový systém. (Bowman 2014). Nevýhodou každodenní léčby pyrantelem je však rozvoj rezistence parazitů na pyrantel a také, že hříbata odchovaná na denním pyrantelu nezískají rezistenci vůči strongylidům (Monahan et al, 1997 In Bowman 2014). Nerozlišující použití anthelmintika v celém stáde, aniž by bylo zaměřeno na konkrétní koně, kteří ho potřebují, má negativní dopad na udržení zdravého refugia. Tento přístup nakonec přispívá k vyšší odolnosti parazitů vůči anthelmintikům. Je tedy důležité zvážit individuální potřeby zvířat a cíleně používat léčiva, aby se minimalizoval negativní vliv na refugia (Bowman 2014).

Emboátová sůl pyrantelu je žlutý prášek a je nerozpustná ve vodě. Jako léčivo pro koně může mít formu pasty. Používá se také k omezení infekce škrkavkou koňskou. Tato sůl se špatně vstřebává z gastrointestinálního traktu a je primárně eliminován stolicí, přičemž méně než 15 % se vylučuje močovým traktem (USP, 2005 In Bowman 2014). Špatné vstřebávání ze střev přispívá k jeho bezpečnosti u velmi mladých nebo slabých zvířat.

Pyrantelové soli jsou stabilní v pevné formě, avšak fotodegradují. Poté, co se rozpustí ve vodě, snižuje se jejich účinnost (Bowman 2014). Pyrantel je ve světě dostupný pod širokou řadou obchodních názvů a v mnoha formách jako jsou pasty (Foreyt 2001), tablety, žvýkáci tablety (North American Compendiums, 2012 In Bowman 2014). Tablety a žvýkáci tablety nejsou ale dostupné v České republice.

Příkladem výrobku na českém trhu je pasta pro koně Equistrong. Léčivou látkou je Pyranteli embonát a pomocnou Butylhydroxytoluen. Léčivo nemá být používáno u hříbat mladších než 4 týdny a u výrazně oslabených zvířat, též při přecitlivělosti na léčivou látku nebo na některou z pomocných látek. Výrobce doporučuje, aby bylo léčivo podáváno obezřetně a aby se předešlo nadměrnému a opakovanému užívání anthelmintik ze stejné skupiny. Je důležité dodržovat správnou délku léčby, dávkování a vyhýbat se podávání nedostatečných dávek, což může být způsobeno nesprávným stanovením hmotnosti zvířat, chybným způsobem podání přípravku nebo špatným nastavením dávkovacího zařízení. Tato opatření jsou důležitá pro minimalizaci rizika vývoje rezistence na léčivo. Dále doporučuje provedení testů např. Testu redukce počtu vajíček FECRT (Fecal Egg Count Reduction Test) k vyšetření případů, kde existuje podezření na rezistenci k anthelmintikům. Pokud se rezistence vůči určitému anthelmintiku potvrdí, výrobce doporučuje použít anthelmintikum z jiné skupiny léčiv a s jiným účinkem (Bioveta, 2016).

Vzhledem k tomu, že se pyrantel a piperzin jeví být farmakologickými antagonisty, neměly by se podávat současně. Pyrantel by se také neměl podávat současně s levamisolem nebo morantelem kvůli podobnému mechanismu účinku. Při kombinaci pyrantelu s organofosfáty hrozí riziko nežádoucích účinků (Plumb, 2011 In Bowman 2014).

Anthelmintická rezistence

Anthelmintická rezistence představuje rozšířený a rychle rostoucí problém (Roepstorff & Nansen, 1998). Lze ji charakterizovat jako významné zlepšení tolerance jedinců v populaci parazitů vůči dávkám sloučeniny, které by normálně vedly k úmrtí většiny jedinců toho samého druhu v populaci (Roepstorff & Nansen, 1998).

Mechanismus vzniku rezistence na anthelmintika je založen na výběru odolných jedinců. Žádné léky nejsou schopny odstranit veškeré parazity. Několik jich vždy přežije. Když takto stále pokračuje selekce odolných jedinců, předávají se v populaci geny rezistence a lék tak ztrácí postupně svůj účinek. Bylo prokázáno, že obecná zdatnost populací odolných parazitů je vysoká a tak, jakmile si vyvinou solidní anthelmintickou rezistenci, přetrvává u nich a pravděpodobnost návratu k citlivosti je nízká. Populace parazitů zůstávají rezistentní po mnoho let, i bez další selekce (Roepstorff & Nansen, 1998).

Kromě rezistence na určité léčivo může vzniknout také tzv. vedlejší rezistence. Vedlejší rezistence je rezistencí i k dalším přípravkům se stejným mechanismem účinku. Tento efekt je typický například pro benzimidazoly. Další formou rezistence je tzv. zkřížená rezistence, která zahrnuje odolnost vůči dvěma různými chemickým skupinám léčiv s odlišným mechanismem účinku. Existuje také jev nazývaný polyrezistence, kde parazit vykazuje odolnost vůči dvěma nebo více skupinám látek s odlišným mechanismem účinku (Bodeček et al. 2017).

Od rezistence je třeba odlišit toleranci. Tolerance je dědičně získaná odolnost bez kontaktu s danou látkou. Návrat k citlivosti na látku u původně rezistentních parazitů se označuje jako reverze. Termín „refugia“ pak popisuje část populace parazita, která není vystavena působení anthelmintika v okamžiku proběhlé terapie. Tyto populace mají alely citlivé na používané látky a jsou důležité pro zmírnění rezistence v parazitní populaci. Nejvýznamnějšími složkami refugia jsou volně žijící parazitární stadia na pastvině, neléčení koně ve skupině a encystovaná stadia parazitů, včetně vývojových stádií mimo trávicí trakt (Bodeček et al. 2017).

Rezistence škrkavky koňské u koní byla prokázána na makrocyklické laktony, benzimidazoly a imidazothiazoly (Caffrey 2012). Výsledky shrnul Kaplan (2004) a Reinemeyer (2009). Dalším důležitým poznatkem je, že anthelmintika pro koně definovaná jako „širokospektrá“ a tedy působící proti více druhům parazitů, nejsou jednotně účinná na všechny druhy parazitů. Existují vždy druhy, proti kterým zabírá až vyšší dávka látky a škrkavka koňská je takovým parazitem u většiny koňských anthelmintik (Reinemeyer 2009).

Je třeba brát v potaz, že léky, na které jsou škrkavky rezistentní, si mohou zachovat podstatnou účinnost proti jiným důležitým koňským parazitům, jako jsou velcí strongylidé nebo cyathostominy (Reinemeyer 2009).

Pro kontrolu rezistence jsou důležité spolehlivé diagnostické informace. Důležité je pečlivě monitorovat přítomnost a množství parazitů *Parascaris* spp. u mladých koní, aby bylo zajištěno, že budou vybrána vhodná anthelmintika a že léčba bude účinná dle plánu (Fabiani et al. 2016).

3.3.1. Rezistence škrkavky koňské u koní na benzimidazoly

Rezistence škrkavky koňské u koní na benzimidazoly byla popsána na farmách v Saudské Arábii. Prevalence *Parascaris* spp. infekce byla 53 % (179/341 koní). Anthelmintická rezistence k *Parascaris* spp. byla nejvyšší po fenbendazolu (55 % farem a 65 % hříbat) (a v menší míře po ivermectinu nebo kombinaci abamektinu a praziquantelu, což zahrnovalo 27 % farem (a 46 % hříbat) a 18 % farem (a 10 % hříbat) (Alanazi et al. 2017). Matthews (2014) uvádí také pozorovanou rezistenci v hřebčinech ve Spojeném království. Rezistence škrkavky koňské na fenbendazol byla prokázána též Austrálii (Armstrong et al. 2014 In Martin et al. 2018).

Škrkavka koňská u koní vyžaduje vyšší dávku fenbendazolu než ostatní parazité (Reinemeyer 2009). Dle Bodečka et al. (2017) se k zabránění rozvoje rezistence v budoucnosti doporučuje nižší dávkování pro strongylidy a roupy a pouze pro škrkavky dvojnásobné.

3.3.2. Rezistence škrkavky koňské na makrocyklický laktony

Rezistence škrkavky koňské u koní na makrocyklické laktony byla poprvé popsána v Nizozemsku roce 2002 (Boersema et al. 2002) a v Kanadě v roce 2003 (Hearn & Peregrine, 2003). Poté také v USA (Craig et al. 2007, Lyons et al. 2007), v Dánsku (Schougaard & Nielsen, 2007), Německu (Von Samson-Himmelstjerna et al. 2007), v Brazílii (Molento et al.

2008) a v Itálii (Veronesi et al. 2009). V roce 2008 byla ve Švédsku hlášena rezistence vůči ivermektinu a později její rozšíření v hřebčinech ve Švédsku (Lindgren et al. 2008, Osterman Lind & Christensson, 2009 In Martin et al. 2018). V současnosti je už hlášena široce po celém světě (Peregrine et al. 2014).

Počátečním klinickým důkazem rezistence škrkavky koňské na makrocyclický lakton bylo selhávání ivermektinu nebo moxidektinu při snižování počtu vajíček škrkavek po léčbě (Kaplan et al. 2006). Taylor et al. (2016) uvádějí, že je rezistence u této skupiny čím dál rozšířenější.

S rozvojem rezistence škrkavky koňské u koní na makrocyclické laktony souvisí fakt, že tyto látky jsou nejperzistentnějšími anthelmintiky, které se podávají koním a účinné hladiny léčiva tak mohou po jednorázovém ošetření přetrvávat v plazmě dny až týdny, během této doby koncentrace léčiva klesá a nově získaní parazité jsou potom vystaveni velmi malým neúčinným hladinám, které mohou vést právě k rozvoji rezistence (Sangster, 1999 In Reinemeyer 2009), zatímco látky ze skupiny pyrimidinů a benzimidazolů jsou neperzistentní (avšak ani u nich to nebrání rozvoji rezistence) (Reinemeyer 2009).

Makrocyclické laktony jsou larvicidní proti škrkavce koňské, a tak má na tvorbu refugii a potažmo tak na rozvoj rezistence vliv délka období mezi léčbami (Kaplan, 2004 In Reinemeyer 2009). Při kratších intervalech tak dochází k postupné selekci odolných jedinců.

Tradičně se doporučuje interval 60 dnů, ale ten nemusí zamezit produkci vajíček ve výkalech. Především právě u makrocyclických laktonů může být vhodnější ponechat určitou kontaminaci vajíček v prostředí, aby se selekcí nevytvářela populace parazita odolná léčivu. Důkazem je velká odolnost škrkavky koňské na tato léčiva na některých farmách v Nizozemsku (van Doorn et al, 2007 In Reinemeyer 2009).

Zavlečení populace škrkavky koňské rezistentní vůči makrocyclickým laktonům je obtížně zvládnutelná, neboť není možné zachytit infekci a ověřit účinnost. Navíc anthelmintika kromě makrocyclických laktonů nemají žádnou účinnost proti migrujícím stádiím škrkavky v prvním měsíci po infekci a poté pouze částečnou účinnost, dokud populace plně nedospěje (Vandermyde et al. 1987 In Reinemeyer 2009).

Kromě rezistence na anthelmintika může teoreticky být důsledkem jejich podávání také vývoj parazita. Mohly by se vyvinout populace s nízkou imunogenicitou a rozšířit se na koně všech věkových kategorií, nejen na hříbata, jako je tomu u *Oxyuris equi* (roup koňský), kde byly pozorovány odchylky od typického věkového spektra hostitele vysvětlované pravděpodobným vývojem v imunitě (Reinemeyer et al. 2006 In Reinemeyer 2009). Dalším možným vývojem je zkrácení prepatentního období neboli období opětovného objevení se vajíček. Tento jev nebyl zatím zkoumán u škrkavek, ale u cyathostomin již bylo zdokumentováno zkrácení doby znovuobjevení vajíček v důsledku anthelmintického selekčního tlaku (Lyons et al. 2008, Von Samson-Himmelstjerna et al. 2007, Herd & Gabel, 1990, Woods et al. 1998, Tarigo-Martini et al. 2001, Little et al. 2003 In Reinemeyer 2009).

3.3.3. Rezistence škrkavky koňské na tetrahydropyrimidiny

Rezistence populace *Parascaris* spp. u koní byla prokázána vůči pyrimidinovým lékům v USA (Texasa a Kentucky) (Reinemeyer 2009). Rezistence škrkavky koňské u koní konkrétně vůči pyrantelu byla prokázána v USA (Taylor et al. 2016). Rezistence na pyrantel byla hlášena ale nejen v USA, ale i v Austrálii (Armstrong et al. 2014; Lyons et al. 2008 In Martin et al. 2018).

V Evropě byla ve švédských hřebčinech prokázána rezistence na pyrantel embonát u *Parascaris univalens* (Martin et al. 2018). Martin et al. (2018) zkoumali rezistenci přímo u karyotypu *Parascaris univalens*. Respektive, cílem studie bylo určit druh *Parascaris* přítomný u hřibat ve Švédsku a zjistit, zda je ve švédských hřebčinech přítomna anthelmintická rezistence vůči pyrantelu a fenbendazolu. Vajíčka škrkavek odebraná v různých oblastech ve Švédsku byla karyotypizována a všechna byla identifikována jako *Parascaris univalens*. Testy redukce počtu vajíček ve výkalech byly provedeny u celkem 142 hřibat na 9 farmách v období od září 2016 do května 2017. Do studie byla zahrnuta zdravá hřibata s minimálně 150 vajíčky na gram výkalů (EPG) a léčena perorálními pastami s pyrantelem embonát popř. fenbendazolem podle pokynů výrobce. Účinnost léků byla vypočtena Bayesovským modelem s použitím R balíčku „eggCounts“. V souladu s American Association of Equine Practitioners byli paraziti klasifikováni jako rezistentní vůči pyrantelu, pokud bylo snížení EPG ≤ 85 %, a vůči fenbendazolu, pokud byla pozorovaná účinnost ≤ 90 %. Čtyři z jedenácti skupin léčených pyrantelem měly pozorovanou účinnost ≤ 85 % a až 43 % hřibat léčených pyrantelem vylučovalo vajíčka 10–16 dní po léčbě. Naproti tomu jedna ze šesti skupin léčených fenbendazolem měla pozorovanou účinnost ≤ 90 % a pouze 6 % všech hřibat vylučovalo vajíčka 10–16 dní po léčbě. Vzhledem k tomu, že se již dříve ukázalo, že rezistence na ivermektin je ve Švédsku rozšířená u *Parascaris* sp. bylo pravděpodobné, že ve švédských hřebčinech jsou přítomny multirezistentní populace. Studie Martina et al. (2018) je první studií prokazující existenci pyrantel-rezistentních *Parascaris* spp. v Evropě.

3.3.4. Prevence vzniku anthelmintické rezistence

Pravděpodobnost, že v blízké budoucnosti budou licencovány další nové skupiny anthelmintik pro použití u koní, je nízká. Tento trend je částečně způsoben náklady a částečně, alespoň co se týče ovčího průmyslu, velikostí globálního trhu (Taylor et al. 2016), neboť mezi uvedením nových anthelmintických skupin na trh uplynuly tři desetiletí (Taylor et al. 2016). Existuje tak naléhavá potřeba strategií k zabránění rozvoje rezistence parazitů na anthelmintika (Roepstorff & Nansen, 1998). Je nutné, aby odvětví živočišné výroby přijalo strategie cílící na zachování účinnosti současných skupin léčiv. Studie totiž prokázaly minimální návrat k citlivosti u vysoce vybraných homozygotních izolátů po vysazení selekčního léku. Jakmile jsou rezistentní jedinci přítomni v chovu zvířat, mohou být považováni za trvalé. Z toho důvodu je velmi důležité být schopen zaznamenat vznik nových rezistentních izolátů hned na začátku (Taylor et al. 2016). Pozitivním zjištěním je, že modelování naznačilo, že v situacích, kdy starší anthelmintika stále vykazují dostatečně vysokou míru účinnosti, může přidání nové třídy anthelmintik pomoci zpomalit vývoj rezistence vůči těmto starším lékům (Taylor et al. 2016).

K vývoji preventivních programů proti rozvoji rezistence na anthelmintika pomáhá znalost rizikových faktorů (Roepstorff & Nansen, 1998).

3.3.4.1. Rizikové faktory pro rozvoj rezistence

Teoreticky byla rozpoznána řada rizikových faktorů pro rozvoj rezistence na anthelmintika a mnohé z nich se v praxi poté ukázaly jako důležité. Mezi nejdůležitější z nich patří frekvence anthelmintické léčby. Čím častěji jsou zvířata léčena anthelmintiky, tím vyšší je riziko rozvoje rezistence na anthelmintika. Vývoj rezistence může být rychlý, jestliže se období mezi podáním léčiv blíží prepatentnímu období, neboť se spáří pouze jedinci, kteří přežili kontakt s léčivem 2×. Toto je zřejmě hlavní důvod, proč je rezistence na anthelmintika rozšířená především u druhů ošetřovaných 5 až 12× ročně jako jsou koně, ovce a kozy. U prasat se tato léčiva používají obvykle 2 až 4× ročně či méně (Roepstorff & Nansen, 1998).

Dalším rizikovým faktorem je užívání stejné skupiny léčiv delší dobu, kdy se poté vytváří tzv. „vedlejší rezistence“ na léčiva ze stejné skupiny (Roepstorff & Nansen, 1998). Faktorem ovlivňujícím rozvoj rezistence na anthelmintika je také doba léčby přípravkem. Jestliže jsou zvířata léčena jen represivně a žijí v kontaminovaném prostředí, parazité, kteří léčbu přežijí, mají sice rezistentní potomstvo, to je ale geneticky „naředěno“ spářením s jedinci v prostředí, kteří rezistentní nejsou. Většinou se odčervení provádí před přesunem nového zvířete na pastvu. Zvíře se tam tak dostává už s rezistentními jedinci parazitů (Roepstorff & Nansen, 1998).

Velikost dávky léčiva je také důležitá. Proto, aby byl přípravek uznán jako účinný, stačilo dříve, když zničil 80 až 90 % populace parazitů. Tím, že se pravidla zpřísnila na „všechny jedince“, těch pár, kteří přežijí jsou základem pro rozvoj rezistence (Roepstorff & Nansen, 1998).

Rizikovým faktorem je také podávání nedostatečných dávek, tzn. poddávkování, obvykle z důvodu neznalosti váhy zvířete a kalkulování s průměrnou váhou zvířete ve stádu či hromadným přimícháním léku do krmiva či vody (Roepstorff & Nansen, 1998), což se ale neaplikuje v malochovech u koní.

Farmakokinetické vlastnosti léčiva mají rovněž vliv na vývoj rezistence. Různé látky dosahují různých koncentrací v těle hostitele v průběhu léčby, což ovlivňuje, jak dlouho jsou tyto koncentrace nad terapeutickou úrovní a jak dlouho přetrvávají subterapeutické, avšak stále selektivní koncentrace. Navíc není dosaženo stejně vysokých koncentrací léčiva ve všech částech těla hostitele, což má za následek rozdílný selekční tlak na vznik anthelmintické rezistence u různých druhů parazitů (Roepstorff & Nansen, 1998).

Šíření rezistentních kmenů probíhá transportem zvířat s rezistentními parazity (Roepstorff & Nansen, 1998). Z poznatků o faktorech působících na rozvoj rezistence vůči anthelmintikům byly vyvinuty následující preventivní programy a strategie.

Jedním z důležitých rysů biologie škrkavek, které je třeba vzít v úvahu při plánování léčby škrkavky koňské je to, že anthelmintická účinnost se zjevně zvyšuje s tím, jak cílová populace stárne. Například oxibendazol (10 mg/kg) byl 94 % (Lyons et al. 2007) až 100 % (Drudge et al. 1979 In Reinemeyer 2009) účinný proti patentním (tj. zralým) infekcím škrkavkami, měřeno FECRT. Stejná dávka však odstranila pouze 44,5 % nezralých škrkavek, když byla podána 28 dní po infekci (Austin et al. 1991 In Reinemeyer 2009). Z toho plyne, že léčba by byla účinnější

proti škrkavce koňské, pokud by byla podávána těsně před odchodem vajíček ve výkalech z těla ven, tj. 70 až 75 dnů po infekci. Tyto znalosti jsou však prakticky špatně využitelné, neboť k infekci dochází postupně, každý den a parazité se v těle hříbete nacházejí v různém stádiu vývoje (Reinemeyer 2009). Pokud je ale zřejmé, kdy k infekci došlo, je možné léčbu takto plánovat.

3.3.4.2.Frekvence, správné dávkování, cílení, zajištění účinnosti

Základem je snížení frekvence použití léčiv, správné dávkování a použití léčiv pouze v případě potřeby. Po použití by měla být zjišťována kontrola účinnosti (Roepstorff & Nansen, 1998). Mluví se o testu redukce počtu vajíček (Nielsen & Reinemeyer 2018).

Je třeba se vyhnout poddávkování. K vyhnutí se poddávkování během ošetření stáda se doporučuje stanovit dávku dle nejtěžšího zvířete, což lze u máých přežvýkavů (Roepstorff & Nansen, 1998). U koní, pokud nemáme k dispozici váhu, je lepší zvolit odhadem vyšší dávku odčervení.

Zajištění účinnosti léčiva má být také zajištěno nákupem registrovaných léků z autorizovaných zdrojů. K udržení účinnosti látky je doporučováno střídání skupin léčiv např. v rotačním schématu na roční bázi (tzn. každý rok jiná skupina léčiv). Dále je třeba se vyhýbat zavlečení infekce do stáda zvířat karanténou nových zvířat. Karanténa se doporučuje v délce 3 až 7 dnů, přičemž se zvířata ošetří hned po příjezdu a následně ještě několik dní poté (Roepstorff & Nansen, 1998) a počáteční léčba infekce škrkavkou koňskou u hříbat by neměla začínat dříve než ve věku 60 až 70 dnů. Poté by se léčba měla opakovat s co nejdelšími intervaly, aby se minimalizovalo vylučování vajíček škrkavek do prostředí (Reinemeyer 2009).

3.3.4.3.Preventivní programy

Cílené dávkování (angl. targeted dosing) znamená dávkování léčiv na základě pravidelného stanovení počtu vajíček parazitů ve výkalech jednotlivých zvířat (Bodeček et al. 2017).

Strategické dávkování (angl. strategic dosing) vychází z klimatických podmínek na pastvinách a jejich dopadu na vývoj parazitů. Léčiva jsou vhodně podávána všem koním v období pastvy a je brán v potaz opětovný výskyt vajíček parazitů po aplikaci. Obvykle jsou léčiva podávána na začátku a konci pastevního období (jaro/podzim). Smyslem je zamezení znečištění pastvin infekčními stádii parazitů (Bodeček et al. 2017).

Synchronní dávkování léčiv z různých skupin v pravidelných 6 až 8týdenních intervalech (angl. interval dosing) všem koním po celý rok. Tento postup je vhodný pro otevřené chovy s častou obměnou koní včetně hříbat (Bodeček et al. 2017).

Posledním antiparazitárním programem je kontinuální podávání anthelmintika (pyrantel, 2,6 mg/kg ž. hm.) v krmivu, který se využíval v USA, ale v Evropě není povolen (Bodeček et al. 2017).

Medikace by měla být v kombinaci s dalšími opatřeními, jako je řízení pastvy, s hygienou boxů a další. tak, aby se snížil počet ošetření léčivy (Roepstorff & Nansen, 1998). Dále existují tedy i programy, které cílí na snížení intenzity infekce v prostředí a méně spoléhají na medikamenty. Jedná se např. o zlepšené řízení pastvy společně s cíleným podáváním

anthelmintik. Tento program zahrnuje léčbu odvíjející se od počtu vajíček ve výkalech (FEC). Je pro něj potřebné, aby dostupné podpůrné diagnostické testy byly robustní a dobře aplikovatelné (Matthews 2014).

Právě cílené podávání medikace na základě sledování konkrétních druhů parazitů u konkrétních zvířat nyní nahrazují dříve častá profylaktická ošetření podávaná s pevnými intervaly po celý rok. Součástí je následné hodnocení účinnosti léčby (Fabiani et al. 2016).

3.3.4.4.Strategie ponechání dostatečného množství parazitů v prostředí

Strategie ponechání dostatečného množství parazitů v prostředí, které nejsou vystaveny anthelmintické léčbě (princip refugia) se těší v posledních letech velké pozornosti. Principem této strategie je nařazení genů rezistentních parazitů s nerezistentními v prostředí. Zvířata po ošetření je možné vyvést na tzv. „špinavou“ pastvu na určitou dobu tak aby se nařadila všechna vajíčka parazitů, která ošetření přežila s ostatními vajíčky, která již na pastvě jsou. Toho lze nejučinněji dosáhnout přesunem odolnějších dospělých ošetřených zvířat na „špinavé“ pastviny, což je vhodnější, než tam vyvádět náchylnější mladší zvířata (Taylor et al. 2016). Tento postup je uváděný také jako vhodný pro ošetření celého stáda.

3.3.4.5.Cílená léčba při ošetření celého stáda na základě dosažené úrovně parazitismu

Při ošetření stáda může být použita i cílená léčba, která je v tomto případě založená na indikaci úrovně parazitismu ve stádu. Úroveň parazitismu je sledována při pravidelném monitorování vajíček parazitů ve výkalech. Stádo je celé ošetřeno ve chvíli, kdy je dosažena předem stanovená úroveň. Takto je snížena frekvence léčby. Zvířata jsou neustále napadána parazity z pastvy a je snížen rozvoj refugií. Další výhodou je získání informací o jednotlivých druzích parazitů (Taylor et al. 2016).

3.3.4.6.Ošetření části stáda na základě identifikace jedinců majících užitek z cílené léčby

Jedná se o přístup, kdy jsou použity indexy k identifikaci těch zvířat ve stádě, která by měla větší prospěch z individuální léčby než z léčby celého stáda. Cílem je co nejvíce zvýšit počet parazitů nevystavených lékům a udržovat populaci parazitů citlivých na daný lék, tím se zpomaluje rozvoj rezistence (Taylor et al. 2016). Při tomto přístupu jsou ošetřena pouze zvířata, která léčbu nejvíce potřebují. Ostatní jsou ponechána bez léčby.

3.3.4.7.Nechemická kontrola

Nechemická kontrola představuje strategie založené na zvýšení přirozené účinné imunitní odpovědi, jako je vakcinace, selekce odolnějších hospodářských zvířat nebo zavedení doplňků výživy. Snižuje celkovou závislost na anthelmintikách (Taylor et al. 2016). Patří sem následující možné postupy:

1. Chov zvířat, která jsou schopna vzdorovat nebo tolerovat infekci.
2. Krmení nematofágními hubami schopnými zachytit larvy ve výkalech a tím snížit kontaminaci pastvin.
3. Periodické spásání pastvin obsahující krmné druhy s anthelmintickými vlastnostmi.

4. Aplikace měděných částic z oxidu mědi.
5. Využití fyzikálních přístupů: Zahrnuje úpravu stanovišť s cílem snížit populace hmyzích škůdců a přenašečů (například odstraňování hnízdišť, jako jsou hromady hnoje, použití bariér a pastí)" (Taylor et al. 2016).

.Metody diagnostiky anthelmintické rezistence

Diagnostiku anthelmintické rezistence lze realizovat *in vivo* nebo *in vitro* metodami, tzn. na živých zvířatech nebo v laboratorních podmínkách.

3.4.1. In vivo metody – FECRT

Nejčastěji publikovanou metodou k hodnocení rezistence parazitů na léčiva je Test redukce počtu vajíček ve výkalech zvířat (angl. Fecal Egg Count Reduction Test – FECRT). Tato metoda je velmi doporučovaná The World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP; Coles et al. 1992; Inn Matthews 2014). Metoda vypočítává účinnost na základě aritmetického průměru snížení FEC (Fecal eggs count) pozorovaného mezi dnem 0 neboli před léčbou FEC_{pre} a 14–17 dní po léčbě FEC_{post} (Matthews 2014). Podle Zajace a Conboye (2012) existuje několik technik pro posouzení účinnosti anthelmintik, ale jediná, která je v současnosti praktická pro použití v terénu u všech druhů, je FECRT.

Jeho principem je hodnocení účinnosti léčiva z pohledu poklesu množství vajíček ve výkalech (Zajac & Conboy 2012) a je vhodný pro všechny typy anthelmintik a všechny druhy helmintů, u kterých se vajíčka vylučují ve výkalech (Roepstorff & Nansen, 1998).

Tento test se používá také u škrkavek (Zajac & Conboy 2012), ačkoliv je standardní metodou pro detekci rezistence u strongylidních hlístic koní a pro škrkavky tento postup nebyl validován. Nicméně FECRT je jediným aktuálně dostupným testem pro kvantifikaci anthelmintického odstranění reprodukcí se dospělých samic *Parascaris* spp. (Reinemeyer 2009).

V protokolech pro provádění FECRT existují určité odchylky specifické pro hostitelské druhy (Zajac & Conboy 2012), avšak obecně lze postup shrnout do následujících kroků:

3.4.1.1. Naplánování testování a počet vybraných zvířat

Doporučuje se provádět FECRT v období roku, kdy je největší výskyt vajíček ve výkalech, což lze zjistit na základě epidemiologických dat o parazitech v dané oblasti (Zajac & Conboy, 2012). Přesný FECRT vyžaduje odpovídající počty zvířat, avšak u velmi velkých stád naopak stačí testovat cca 10 % zvířat z celkové populace (Zajac & Conboy 2012).

World Association of the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) doporučuje do testování zahrnout kontrolní skupinu neléčených zvířat. Tato neošetřená skupina umožňuje sledovat změny v počtu vajíček ve stádě, které nejsou ovlivněny léčbou (například kvůli změnám v populaci parazitů). V případě nedostatku možnosti zahrnout další skupinu lze FECRT provést i bez kontrolního srovnání (Zajac & Conboy, 2012).

Pro skupinu, u které se posuzuje účinek léčby, je nezbytné získat počáteční vzorky výkalů od zvířat, která nebyla léčena po dobu minimálně 2–3 měsíců. U *Parascaris* spp. nebo jiných

hlístů s dlouhou prepatentní dobou by měla být zvířata ponechána bez léčby podstatně déle (Roepstorff & Nansen, 1998).

3.4.1.2. Kvantifikace počtu vajíček

Po výběru zvířat k testování jsou v laboratoři vzorky výkalů podrobeny kvantifikaci vajíček (Reinemeyer 2009). Kvantifikace vajíček je relativně snadná metoda, při které lze odhadnout počet vajíček škrkavky koňské ve vzorku v určitém časovém okamžiku (Matthews 2014). Pro detekci parazitů se použije fekální flotace, což je jednoduchý, málo nákladný a obecně dostupný postup pro detekci škrkavek u koní (Reinemeyer 2009). Poté následuje samotná kvantifikace parazitů. Tradiční metoda je McMaster (Roepstorff & Nansen, 1998). Dalšími metodami jsou Modified Stoll, Centrifugace sacharózy (Reinemeyer 2009).

K dispozici je ještě několik metod kvantifikace vajíček, které se liší v citlivosti, rychlosti získávání výsledků a úrovni odbornosti požadované k provedení testu (Matthews 2014). Velmi přesnou a citlivou metodou detekce helmintů je metoda Mini-FLOTAC (Cringoli et al. 2017).

U všech technik je třeba dodržovat správné postupy, tzn. od odběru vzorků až po jejich zpracování a analýzu v laboratoři. Z řady studií vyplynula nejruznější doporučení pro provádění testů. Několik jich upozornilo na faktory, které ovlivňují přesnost kvantifikace ve výkalech u koní a jak tyto faktory mohou ovlivnit výsledek testování účinnosti (Nielsen a kol., 2010; Vidyashankar a kol., 2012; Lester a Matthews, 2014 In Matthews 2014). Obecně je výstup testu FECRT ovlivněn:

- rozdíly ve vylučování vajíček na individuální úrovni (Denwood et al. 2012 In Matthews 2014),
- nadměrným rozptýlením vajíček hlístic ve výkalech (Lester et al. 2012 In Matthews 2014),
- nerovnoměrným rozložením vajíček hlístic v suspenzi (Vidyashankar et al. 2012 In Matthews 2014),
- typem použité metody (Lester a Matthews, 2014 In Matthews 2014),
- postupem odběru vzorků a skladováním (Nielsen et al. 2010 In Matthews 2014).

Ze studií vyplynula následující doporučení:

- Vzorky by měly být odebírány co nejčerstvější, tj. maximálně do 12 hodin a poté chlazeny na 4° (Nielsen et al. 2010 In Matthews 2014).
- Je třeba odebírat více vzorků výkalů z různých částí výkalů, vzorky dostatečně promíchat, neboť vajíčka hlístic jsou ve výkalech rozmístěna nerovnoměrně (Denwood et al. 2012 Lester a Matthews, 2014 In Matthews 2014).
- Pokud je třeba vzorky skladovat po nějakou dobu, doporučuje se anaerobní skladování (Nielsen et al. 2010).
- Vzhledem k tomu, že koně mívají nižší hodnoty vajíček na gram než jiné druhy, jako jsou např. ovce, měly by se používat metody kvantifikace vajíček ve vzorku s vyšší citlivostí. Například při použití modifikované metody McMaster s multiplikačním faktorem 25 nebo 50 mohou být limity detekce vajec vyšší. V takovém případě test nemusí být dostatečně citlivý na drobné změny v množství vajíček pod nebo kolem detekčního limitu, což může zvýšit pravděpodobnost

falešně negativních výsledků (Lester a Matthews, 2014 In Matthews 2014). Matthews (2014) uvádí, že to je důležité, protože po léčbě jsou počty obvykle ještě nižší. Doporučuje se použít test s nízkým limitem detekce vajíček, tj. test s nižším nebo žádným multiplikačním faktorem pro převod počtu vajíček, který je citlivější a poskytne přesnější odhad vajíček na gram. Takovým testem je Mini-FLOTAC.

Při správném provedení testu by vyšetření reprezentativních vzorků mělo poskytnout přiměřený odhad úrovně vylučování vajíček u každého jedince (Matthews 2014).

3.4.1.3. Mini-FLOTAC metoda

Tato metoda vychází z metody FLOTAC, což je citlivá a přesná technika pro diagnostiku prvoků a helmintových infekcí. Je koncipována k provádění multivalentní, kvalitativní a kvantitativní diagnostiky hlístových a prvokových infekcí v lidských a zvířecích výkalech a moči. Její nevýhodou však je, že je při ní nutná centrifugace, díky které je potom nedostupná v prostředí s omezenými možnostmi (Cringoli et al. 2017). Metoda Mini-FLOTAC je logickým vývojem metody FLOTAC a je určena do terénu.

Pro použití v terénu jsou na trhu nabízeny sady Fill-FLOTAC (Cringoli et al. 2017). Fill-FLOTAC lze vidět na obrázku 5.



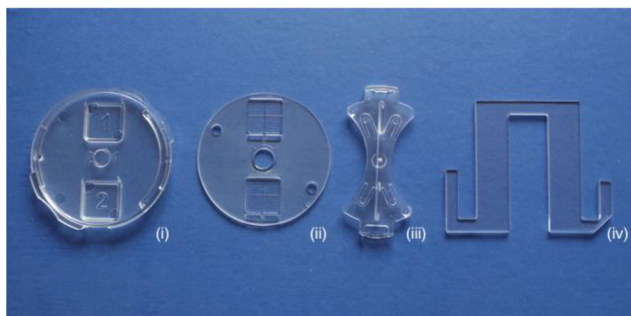
Fill-Flotac 2 a Fill-Flotac 5:

- (i) Fill-Flotac 2;
- (ii) Víko Fill-Flotac 2 (se sběračem/homogenizátorem a filtrem);
- (iii) malý šroubovací uzávěr;
- (iv) velký šroubovací uzávěr;
- (v) špičkou k plnění Mini-Flotac; (vi) Fill-Flotac 5;
- (vii) víko Fill-Flotac 5 (se sběračem/homogenizátorem a filtrem);
- (viii) zařízení používané k rozebrání Fill-Flotac

Obrázek 5 Příklad sady Fill-Flotac


Zdroj: Cringoli et al. 2017

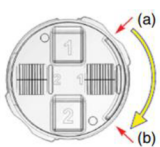
Podstatou diagnostické metody Mini-FLOTAC je využití stejnojmenného zařízení „Mini-FLOTAC“. Mini-FLOTAC je zařízení určené k analýze vzorků, vyrobené z polykarbonátového amorfního termoplastu. Tento materiál byl vybrán pro svou vynikající propustnost světla, vysokou odolnost vůči teple, robustnost, stabilitu rozměrů a dobré izolační vlastnosti. Zařízení Mini-FLOTAC se skládá ze dvou částí – základny a čtecího disku – a dvou doplňků - klíče a adaptéru mikroskopu. Obsahuje dvě flotační komůrky o objemu 1 ml, které jsou navrženy pro optimální mikroskopické vyšetření suspenzí fekálních vzorků uvnitř komůrek (celkový objem: 2 ml) pomocí dvou řádkovaných mřížek na povrchu čtecího disku, které rozdělují každou komůrku na 12 oddělených sekcí. (Cringoli et al. 2017). () Postupná montáž komponentů je zobrazena na dalším obrázku. ()

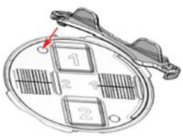


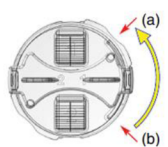
Komponenty Mini-FLOTAC. (i) základna; (ii) čtecí disk se dvěma řádkovanými mřížkami; (iii) klíč; a (iv) adaptér mikroskopu.

Obrázek 6 Mini-FLOTAC – komponenty
Zdroj: Cringoli et al. 2017

- 

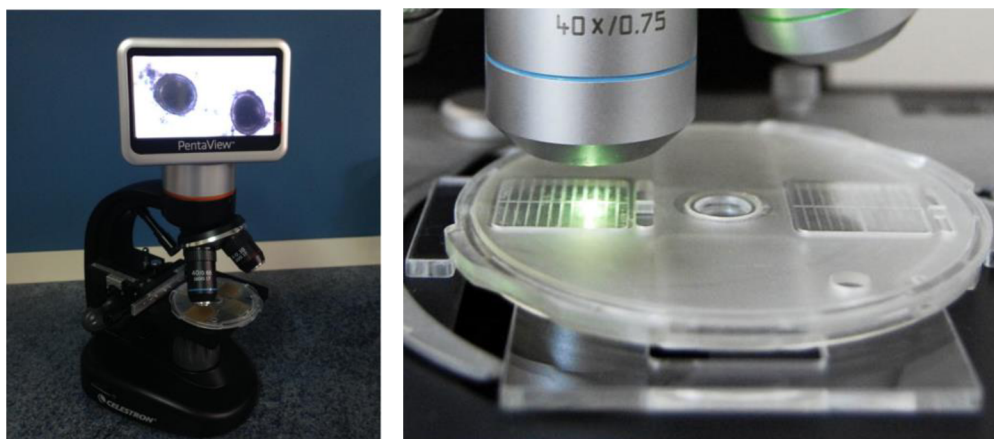
1. Umístěte spodní stranu čtecího disku na horní stranu základny tak, aby malý knoflík čtecího disku zapadl do slotu základny.
- 

2. Držte základnu a otáčejte čtecím diskem ve směru hodinových ručiček, dokud knoflík čtecího disku nezastaví další pohyb z (a) do (b).
- 

3. Umístěte klíč na sestavu tak, aby dva knoflíky na spodní straně klíče zapadly do dvou otvorů na čtecím disku.
- 

4. Klíč se používá k otáčení čtecího disku proti směru hodinových ručiček (asi 90°), dokud se čtecí disk neposune z (b) do (a).

Obrázek 7 Mini-FLOTAC – montáž komponentů
Zdroj: Cringoli et al. 2017



Obrázek 8 Mini-FLOTAC – disk pod mikroskopem
Zdroj: Cringoli et al. 2017

Metoda Mini-FLOTAC umožňuje současnou diagnostiku vajíček i larev helmintů (maximální zvětšení 400×), což je její výhoda oproti kopromikroskopickým technikám jako je Kato-Katz metoda, která je pro larvální diagnostiku nevhodná, nebo jako je McMaster technika, která neumožňuje identifikaci střevních larev. Nejdůležitější rozdíl mezi Mini-FLOTAC a FLOTAC je v jejich analytické citlivosti. Zatímco citlivost Flotac je 1 vajíčko na gram stolice (EPG/LPG/OPG/CPG), příslušná citlivost Mini-FLOTAC je 5 EPG/LPG/OPG/CPG, což je způsobeno 5× nižším objemem vzorku v komůrkách Mini-FLOTAC ve srovnání s objemem FLOTAC (2 ml fekální suspenze uchovávané v zařízení Mini-FLOTAC oproti 10 ml ve Flotac) (Cringoli et al. 2017).

Hlavní výhodou této metody je, že ji lze provádět na čerstvých nebo fixovaných vzorcích stolice, což nabízí možnost zpracovat vzorky dny nebo týdny po přenosu do laboratoře. Ve skutečnosti použití uzavřeného systému Fill-FLOTAC umožňuje uchování vzorku stolice a umožňuje uživateli pokračovat v diagnóze, aniž by byl vyžadován přenos vzorku do jiné nádoby, čímž se minimalizuje vystavení lidí potenciálně infekčnímu fekálnímu materiálu a fixačním prostředkům (Barda et al. 2014).

Při porovnání s McMaster metodou se metoda Mini-Flotac ukázala jako uspokojivější a spolehlivější technika jak pro diagnostiku parazitů, tak pro stanovení EPG (Alowanou et al., 2021, Lozano et al., 2021, Class et al. 2023).

Výhodou je také možnost používání fixativ, což u některých jiných technik jako je např. Kato-Katzova technika není možné. Metoda Mini-Flotac navíc umožňuje zpracování shromážděných vzorků stolice. Výhodou také je, že jak Mini-Flotac, tak Fill-Flotac, jsou po umytí znovu použitelné (Cringoli et al. 2017).

3.4.1.4. Podání léčiva

Zvířata, u kterých se zkoumá efekt léčiva, by měla být pečlivě zvážena a podle hmotnosti jim podán lék, u kterého je podezření na rezistenci (Roepstorff & Nansen, 1998). Každý jedinec se ošetří podle pokynů na štítku anthelmintikem, které má být testováno. (Reinemeyer 2009). Léky mají být podány v perorální formě, neboť použití injekčních nebo topických forem může zkomplikovat hodnocení účinnosti z důvodu přetrvávajícího působení (Zajac & Conboy 2012).

U velkých stád, kde nelze vážit jednotlivá zvířata, lze podat dávku odhadovanou pro nejtěžší zvíře ve skupině (Zajac & Conboy 2012).

Zvířata z kontrolní skupiny zůstávají neléčená.

3.4.1.5. Odběr vzorků a jejich vyhodnocení

Po ošetření léčivem se od stejných jedinců odeberou nové vzorky po 10-14 dnech (Roepstorff & Nansen, 1998) či 14–21 dnech (Reinemeyer 2009). Ideální časový odstup se liší dle testovaného léku z důvodu různých účinků na larvální stadia a z důvodu dočasných sterilizačním účinkům na dospělé parazity. Pro přežvýkavce se doporučují následující intervaly:

- levamisol 3–7 dní,
- benzimidazoly 8–10 dní,
- makrolidy 14–17 dní. (Zajac & Conboy 2012)

U přežvýkavců i u koní se často doporučuje pro jistotu standardní období 14 dnů (Zajac & Conboy 2012).

3.4.1.6. Detekce antehlmintické rezistence

Při použití kontrolní a léčené skupiny se % FECR vypočítá pomocí aritmetických průměrů skupin v následujícím vzorci (Zajac & Conboy 2012):

$$\% \text{ FECR} = \left(\frac{[\text{FEC kontrolní skupina} - \text{FEC ošetřená skupina}]}{\text{FEC kontrolní skupina}} \right) * 100$$

Pokud se místo kontrolní skupiny použijí výsledky před ošetřením a po ošetření pro každé zvíře, vzorec se odpovídajícím způsobem změní pomocí aritmetických průměrů před ošetřením a po ošetření:

$$\% \text{ FECR} = \left(\frac{[\text{FEC před ošetřením} - \text{FEC po ošetření}]}{\text{FEC před ošetřením}} \right) * 100$$

Anthelmintikum je považováno za účinné, pokud FECR > 95 %. Rezistence je přítomna, pokud je FECR < 95 % a hladina spolehlivosti 95 % je nižší než 90 %. Pokud je splněno pouze jedno z těchto dvou kritérií, existuje podezření na rezistenci (Roepstorff & Nansen, 1998).

Tyto rozsahy představují pouze hrubé pokyny, které však musejí být použity, dokud nebude FECRT ověřena i pro *Parascaris* (Reinemeyer 2009).

Směrnice WAAVP byly původně vytvořeny pro malé přežvýkavce. Limity pro stanovení rezistence parazitů u koní u jednotlivých skupin Anthelmintik neexistují a v jednotlivých publikovaných zprávách se liší. Celkově chybí metodika pro koně. Z toho důvodu je obtížné porovnávat výsledky různých studií (Matthews 2014). Kromě toho může inherentní variabilita pozorovaná v souborech údajů FEC u koní zkomplikovat výsledek testu (Denwood a kol., 2010; Lester a kol., 2013; Stratford a kol., 2014 In Matthews 2014).

Řada studií se pokusila definovat přesnější metody pro výpočet anthelmintické účinnosti u koní (Vidyashankar et al. 2007; Kaplan a Nielsen, 2010; Vidyashankar et al. 2012; Lester et al. 2013; Relf et al. 2014; Stratford et al. 2014 In Matthews 2014). Pro koně byly minimální mezní hodnoty pro účinnost léčiva ve FECRT navrženy jako 95 % pro macrolidy a 90 % až 95% pro benzimidazoly a pyrantel (Zajac & Conboy 2012).

V těchto studiích byly vypočteny 95% dolní meze spolehlivosti (LCL) (Vidyashankar et al. 2007; Lester et al. 2013; Relf et al. 2014 In Matthews 2014). Pokud jde o dolní hranice spolehlivosti 95 %, které byly vybrány pro klasifikaci rezistence, ty se lišily v závislosti na skupině léčiv. Procentuální redukční práh použitý pro klasifikaci rezistence vůči makrocyclickým laktonům byl nastaven na 90 %, zatímco pro benzimidazoly a tetrahydropyrimidiny byl nastaven na 80 %. Autoři zvolili mezní hodnoty tak, aby reflektovaly původní úroveň účinnosti, které byly hlášeny u populací strongylidů citlivých na anthelmintika, brzy poté, co byly produkty zaregistrovány pro použití u koní. (Cornwell & Jones, 1969; Colglazier a kol., 1977; Xiao a kol., 1994 (Vidyashankar et al. 2007; Lester et al. 2013; Relf et al. 2014 In Matthews 2014).

Dále byly vytvořeny modely maximální věrohodnosti založené na záporném binomickém rozdělení pro odhadování snížení FEC (Torgerson et al. 2005 In Matthews 2014). Metody Markov Chain Monte Carlo (Denwood et al. 2010 In Matthews 2014) byly také navrženy tak,

aby zohlednily vysoce agregované rozdělení, které je vlastní pro údaje FEC koní (Matthews 2014). Úpravy v těchto metodologiích vycházejí z toho, že hodnocení rezistence vyžaduje využití pokročilých statistických programů jako je R. Existuje také webové rozhraní umožňující zadávat datové soubory FEC online, spolu s detekčním limitem použité metody FEC a generovat výpočty. Toto rozhraní odhaduje procento snížení FEC pomocí bayesovských hierarchických modelů prostřednictvím vzorkování Markov Chain Monte Carlo (<http://www.math.uzh.ch/as/index.php?id=calc>) (Torgerson et al. 2014 In Matthews 2014) a zpřístupňuje i laikům využití robustních statistických metod (Matthews 2014).

Pokud je například o 10 % snížení, je pravděpodobné, že velká část hlístů u zvířat je rezistentních. Při snížení o 80 % je podíl rezistentních parazitů mnohem menší, ale stále významný (Zajac & Conboy 2012). Množství dospělých jedinců škrkavky koňské nelze odvodit z počtu vajíček ve výkalech. Nedokázala se prokázat souvislost mezi množstvím vajíček (EPG – počet vajíček na gram) a infestací parazity, což znamená, že předpoklad, že koně s vysokým počtem vajíček mají více dospělých ascaridů, není opodstatněný. (Reinemeyer 2009), což je důležitá informace pro hodnocení rezistence. Velké množství vajíček neznamená jednoznačně velké množství dospělců. Test FECRT sleduje vliv léčiva na dospělé parazity, ale vzhledem k tomu, že není znám počet jedinců parazita ve střevě, ani jejich reprodukce, není možné určit efektivnost léčiva, jen vliv na počet vyloučených vajíček.

3.4.1.7. Identifikace dospělých parazitů

Parazity může být obtížnější identifikovat.

U koní je možné ve výkalech detekovat kromě škrkavky koňské (*Parascaris equorum*) menší hlístice, tj. velké a malé strongylidy nebo *Oxyuris*). Hlístice je možné vidět ve výkalech právě po léčbě (Zajac & Conboy 2012). Identifikace dospělých nematodů je obvykle založena na morfologických variacích vnější vrstvy nebo kutikuly parazitů. Může být nutné mikroskopické vyšetření ústních částí a přídatných pohlavních struktur. Parazit může být umístěn do speciálních roztoků pro lepší vizualizaci. V některých případech nestačí k identifikaci veterinář a je třeba vzorek předložit k vyšetření parazitologovi (Zajac & Conboy 2012).

3.4.2. In vitro metody

Mezi in vitro neboli laboratorní postupy patří experimenty prováděné mimo živý organismus. Princip fungování metody in vitro spočívá v izolaci parazitů nebo parazitických struktur, jako jsou vajíčka, larvy nebo dospělci, a jejich následnému studiu ve speciálních laboratorních podmínkách. Tímto způsobem lze sledovat růst, vývoj, chování nebo reakce parazitů na různé podněty, včetně léčivých látek (Craven et al. 1999). Pro odhalení anthelmintické rezistence patří především testy líhnutí vajíček a vývoje larev. Vajíčka jsou v kontaktu s koncentrovanými léky a měří se jejich líhnutí nebo přežití (Roepstorff & Nansen 1998). Tyto testy jsou však časově náročné a nejsou dostatečně citlivé, neboť rezistentní paraziti se detekují pouze tehdy, pokud tvoří asi 25 % celkové populace. Citlivost se může zvýšit vyšší dávkou léku. Nové sondy na molekulární bázi, které jsou citlivější, jsou však dostupné pouze pro benzimidazoly a používají se především ve výzkumu (Taylor et al. 2016).

4 Metodika

Během období od roku 2023 do roku 2024 bylo v rámci celé České republiky přijato celkem 292 vzorků výkalů hřibat ke koprologickému vyšetření. Do studie byla zařazena hřibata přibližně od dvou měsíců věku až do dvou let věku. Zpracování vzorků a dat probíhalo v laboratoři Katedry zoologie a rybářství na Fakultě potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze.

Všechny vzorky byly vyšetřeny kvantitativní vyšetřovací metodou Mini-FLOTAC identifikovány a precizně kvantifikovány vajíčka škrkavek. Vzorky od hřibat byly vyšetřovány před a po aplikaci anthelmintika. V programu STATISTICA 14 byly zhodnoceny základní parametry. Následně byla stanovena míra rezistence prostřednictvím vyhodnocení redukce počtu vajíček (FECRT; Fecal egg count reduction test) a Bayesovských hierarchických modelů pro léčivo pyrantel embonát.

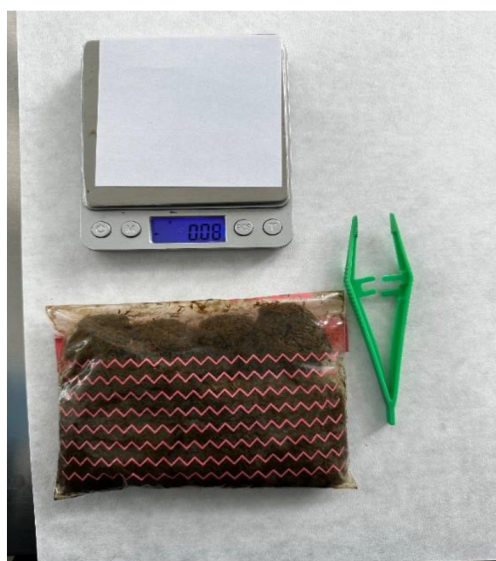
Výsledky byly vyhodnoceny a graficky znázorněny pomocí tabulek a grafů vytvořených v programu MS excel (Microsoft Windows 2023), STATISTICA 14 (TIBCO software 2016) a online SHINY MATH calculator (SHINY R 2012).

4.1. Popis postupu vyšetření vzorku

Vzorek byl převzat na základě informací poskytnutých majitelem zvířete a následně koprologicky vyšetřen.

Použité vybavení: váha, třecí miska, tlouček, sítko, hustoměr, odměrný válec, kádinky, klikr, MiniFlotac, pipeta, pinzeta, nasycený flotační roztok (NaCl+glukoza: 1,28g.cm-3).

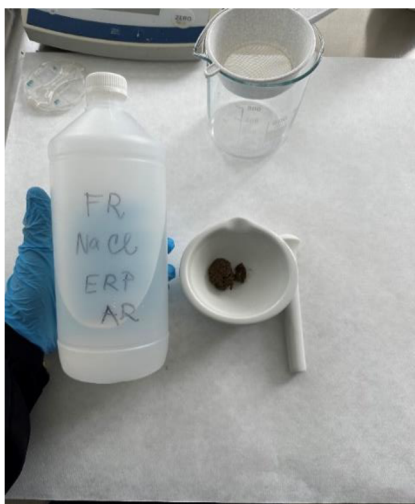
Pro samotné vyšetření byla využita metoda Mini-FLOTAC, která zajistila co nejpřesnější zhodnocení intenzity infekce, tedy stanovení počtu vajíček na gram výkalu EPG (eggs per gramm). V první řadě byl připraven nasycený flotační roztok o hustotě 1200 kg/m³. Ze vzorku výkalů bylo naváženo 5 gramů a vloženo do třecí misky (obrázek 9 a 10).



Do třecí misky se postupně přilávalo 45 ml nasyceného roztoku NaCl+glukoza: 1,28g.cm-3. Navážené výkaly s flotačním roztokem se homogenizovaly do úplného rozmíchání. Po rozmíchání se směs procedila přes sítko do kádinky viz obrázek 12. Z kádinky se co nejdříve pipetou odebrala homogenní tekutina, která se aplikovala do každé z komůrek disku Mini-FLOTAC o objemu 2 ml tak, aby tekutina lehce přečnívala přes okraj komůrky dle doporučeného návodu (Cringoli et al. 2017). Poté jsme nechali tekutinu flotovat po dobu deseti minut. Naplněný Mini-FLOTAC disk připravený mikroskopování lze vidět na obrázku 11.

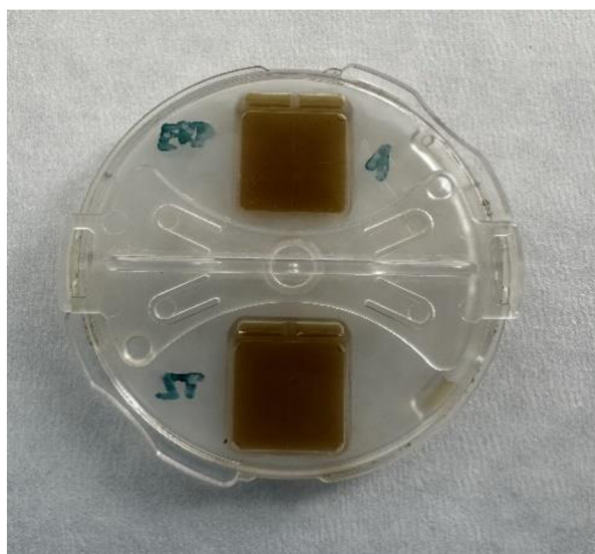
Obrázek 9 vzorek připravený ke zvážení

Zdroj: Eliška Zikmundová



Obrázek 10 vzorek a NaCl + glukóza
Zdroj: Eliška Zikmundová

Do nastaveného mikroskopu Olympus, který je znázorněn na obrázku 13, se nasadila redukce a do ní následně Mini-FLOTAC disk. Zvětšení používané na mikroskopu bylo 100×. Vajíčka byla morfologicky identifikována a spočítána pomocí klikru. (Obrázek 14) Počet nalezených vajíček v levé a pravé komůrce byl sečten a vynásoben číslem 5 (citlivost metody), výsledek udává hodnotu intenzity infekce EPG (počet vajíček na gram výkalu).



Obrázek 11 Mini-FLOTAC naplněný tekutinou
Zdroj: Eliška Zikmundová



Obrázek 12 přeceděná tekutina
Zdroj: Eliška Zikmundová

Komentář k obrázku 12

Přeceděná tekutina se ihned nabrala do kapátka za pomoci krouživých pohybů z důvodu rovnoměrného zachycení případných vajíček v tekutině.



Obrázek 13 Vyšetřovací mikroskop Olympus a klikr
Zdroj: Eliška Zikmundová



Obrázek 14 Identifikace nalezených vajíček
Na obrázku lze pozorovat vajíčko *Parascaris* sp. v levém rohu fotografie.
V pravé části pak vidíme 3 vajíčka strongylidních hlístic.
Zdroj: Eliška Zikmundová

4.2. Statistické vyhodnocení dat pomocí FECRT a Bayesovských modelů

K záznamu a vyhodnocení výsledků byl využit program MS Excel. Pro zhodnocení vlivu věku na intenzitu infekce a druhové spektrum parazitů byla použita základní popisná statistika a test jednofaktorová ANOVA v programu STATISTICA 14 (Tibco). Základní popisnou statistikou jsme získali počet vzorků, průměrnou, minimální a maximální hodnotu FECRT a míru variability. Pomocí metody ANOVA byl vyhodnocen statisticky významný vliv věku mladých koní na intenzitu infekce a druhové spektrum parazitů. Do statistického programu byla vložena data s hodnotami EPG u všech tří skupin sledovaných parazitů (závislá proměnná) a věk koní (nezávislá proměnná). Jako statisticky významná hladina pro zhodnocení vlivu věku koní na druhové spektrum parazitů byla určena hladina $p=0,005$.

Ke stanovení rezistence byla využita metoda FECRT (Fecal egg count reduction test) dle Zajac & Conboy 2012. Tato analýza anthelmintické rezistence se provedla za pomoci FECRT vzorce za jednotlivce na základě výsledků každého jednotlivého zvířete zvlášť před léčbou a po léčbě, tj. po aplikaci pyrantel embonát.

Vzorec:

$$\% \text{ FECR} = ([\text{FEC před ošetřením} - \text{FEC po ošetření}] / \text{FEC před ošetřením}) * 100$$

V dalším kroku byly použity pokročilé statistické programy dostupné online prostřednictvím webových stránek <https://shiny.math.uzh.ch/user/furrer/shinyas/shiny-eggCounts/> SHINY MATH calculatoru umožňujícím zadávat datové soubory FEC (fecal egg count) online, spolu s detekčním hranicí účinnosti použité metody FEC. Tato hranice účinnosti odhaduje procento snížení FEC pomocí Bayesovských hierarchických modelů (Torgerson et al. 2014 In Matthews 2014).

Analýza dat byla nastavena na spodní hranici účinnosti 95 %, v tomto případě pro léčivo pyrantel embonát. Značíme tím tedy věrohodný interval s 95% pravděpodobností pro odhad prevalence rezistence na léčivo pyrantel embonát.

1 Popis grafického znázornění

Výsledky byly analyzovány a vizualizovány pomocí standardních tabulek a grafů vytvořených ve výše zmíněných programech.

5 Výsledky

V této studii bylo koprologicky vyšetřeno celkem 292 vzorků výkalů hřibat. Koně se pohybovali ve věku od 3 měsíců do 2 let a 2 měsíců. Hřibata byla z celého území České republiky. Ze vzorků byly získány hodnoty FEC_{pre} – počet nalezených vajíček před ošetřením zvířete a FEC_{post} – počet nalezených vajíček po ošetření. FEC_{post} data byla získána přibližně 14 až 16 dní po podání anthelmintika pyrantel embonátu.

Studie se v první řadě zaměřuje na výskyt vajíček *Parascaris* spp., který byl prokázán, ovšem dále byla ze vzorků identifikována i vajíčka *Anoplocephala* a strongylidních hlístic.

Počet vyšetřených vzorků výkalů pro každého parazita včetně celkového výskytu (%) pozitivních nálezů je znázorněn v tabulce 1.

Tabulka 1 Počet vzorků a výskyt vajíček pro jednotlivé parazity za sledované období

Identifikace parazita	Celkem vyšetřeno	Celkem pozitivních	Výskyt %
Strongylidní hlístice	292	264	90,0
Parascaris spp.	292	75	25,7
Anoplocephala spp.	292	6	2,1

V tabulce 1 lze pozorovat nejvyšší počet pozitivních vzorků u strongylidních hlístic, pro který udáváme 90% (264 pozitivních) podíl pozitivních vzorků z celkového počtu 292 vyšetřených. U *Anoplocephala* lze pozorovat opak, tedy nejnižší počet pozitivních vzorků, pouhých 2,1 % (6 pozitivních) z celkem 292 vzorků.

Z celkem 292 vzorků pak bylo 75 pozitivních na škrkavky (*parascaris* spp.), což je 25,7% výskyt a je to oproti rozšíření tohoto parazita relativně nízké procento.

Tabulka 2 Základní popisná statistická analýza FECRT %, dat po podání léčiva pyrantel

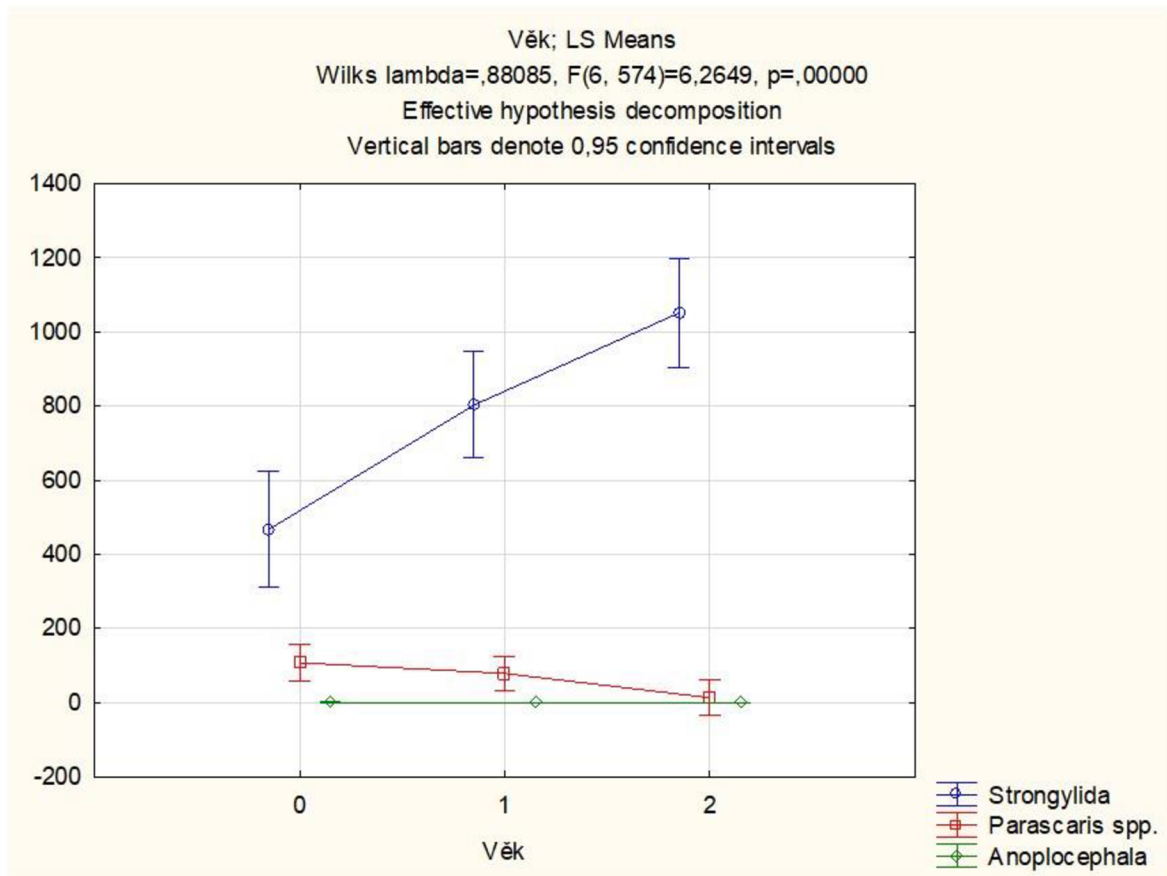
Variable	Valid N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev
FECRT (%) Strongylida	123	88,21	-12	100	15,29
FECRT (%) Parascaris spp.	83	92,14	60	100	9,27

V tabulce 2 je k vidění základní popisná statistika dat výpočtu FECRT (%), jako je průměrná hodnota jednotlivých FECR testů, minimální hodnota a maximální. Valid N udává počet vyšetřených vzorku před a po léčbě pyrantel embonátem. Pro zajímavost a porovnání byly vloženy i průměrné hodnoty FECRT (%) u strongylidních hlístic.

Průměrná hodnota FECRT u *Parascaris* spp. je 92,14 %, maximální 100 % a minimální však pouhých 60 %. Mírně záporná hodnota -12 % u minimálních FECRT výsledků strongylidů značí vyšší výskyt vajíček po odčervení než před aplikací léčiva pyrantel. Std.Dev. = standartní odchylka hodnotí míru variability hodnot v datovém souboru.

5.1. Statistica ANOVA

Graf 1 Anova analýza k porovnání vlivu věku hřibat na výskyt a intenzitu infekce u všech nalezených druhů parazitů



V grafu 1 je znázorněn statistický test ANOVA pro porovnání statistické významnosti věku na intenzitu infekce u každého nalezeného druhu parazita. Minimální věk vyšetřených hřibat byl 3 měsíce, maximální 2 roky a 2 měsíce.

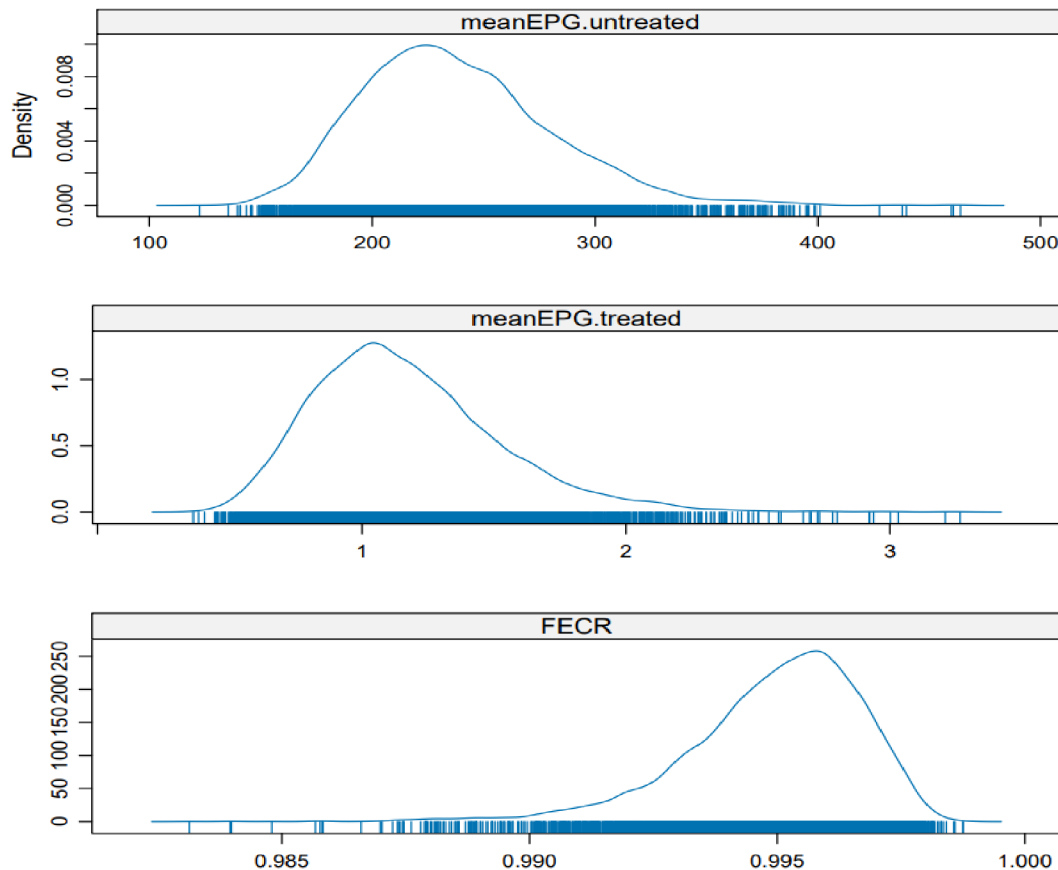
Do statistického programu byla vložena data s hodnotami EPG u všech tří skupin sledovaných parazitů (závislá proměnná) a věk koní (nezávislá proměnná). Jako statisticky významná hladina pro zhodnocení vlivu věku koní na výskyt počtu vajíček EPG u druhového spektra parazitů byla určena hladina $p=0,005$.

Z grafu 1 lze pozorovat značný rozdíl v kolísání intenzity infekce u daného parazita v závislosti na věku zvířete. V případě modré křivky, značící intenzitu infekce EPG u strongylidních hlístic, můžeme potvrdit, že se počet nalezených vajíček zvyšuje se vzrůstajícím věkem. Červená křivka znázorňuje intenzitu infekce EPG u Parascaris spp. a poukazuje opačný výskyt vajíček, oproti strongylidním hlísticím zde pozorujeme snížení počtu nalezených vajíček se stoupajícím věkem. V případě zelené křivky, značící výskyt vajíček Anoplocephala nevidíme významné rozdíly v počtu vajíček v souvislosti se stářím zvířete.

$P= 0.0000$, hladina významnosti je $< než 0.05$. Jedná se tedy o statisticky významný vliv mezi věkem a intenzitou infekce.

5.2. Analýza dle Bayesovských hierarchických modelů

Graf 2 Vyhodnocené grafy pomocí analýzy Bayesovských hierarchických modelů ve Shiny kalkulátoru



Graf 2 byl sestaven za pomoci analýzy Shiny Modelling Fecal Egg Counts online kalkulátoru s využitím Bayesovských hierarchických modelů.

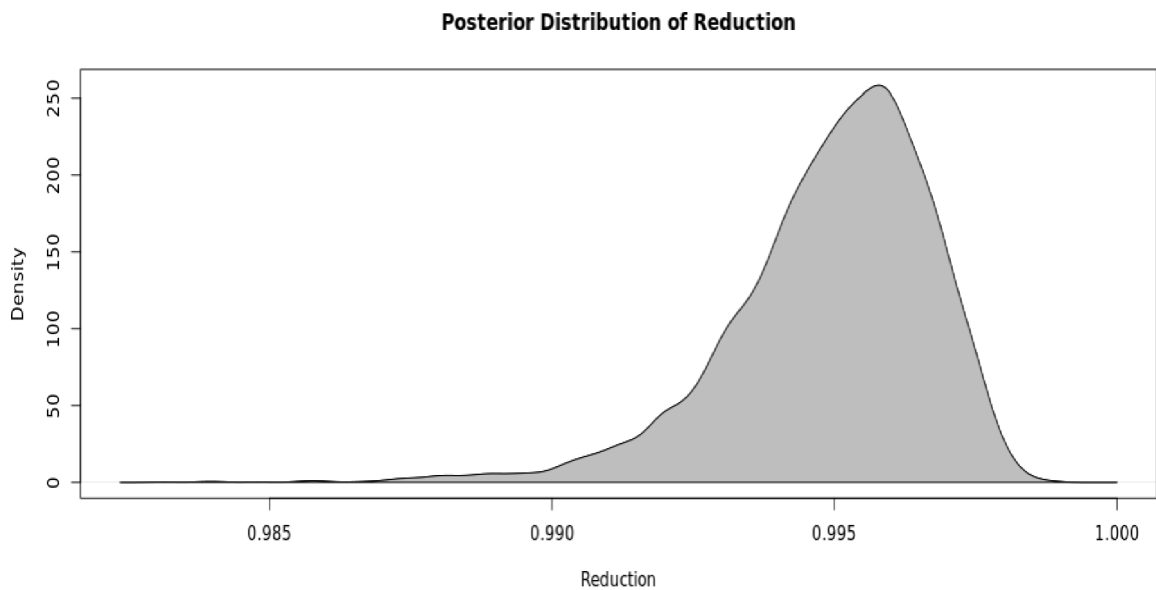
Graf 2 uvádí celkem 3 možnosti grafického porovnání:

MeanEPGuntreated/FECpre – horní graf ukazuje průměrné hodnoty EPG nalezených vajíček *Parascaris* spp. získaných před léčbou zvířat pyrantelem

MeanEPG.treated/FECpost – prostřední graf značí průměrné hodnoty EPG nalezených vajíček *Parascaris* spp. získané po léčbě zvířat pyrantelem

FECR – poslední udává grafické znázornění, kdy byla pro jednotlivá data vypočtena procentuální hranice účinnosti. V tomto případě byla hranice účinnosti nastavena na průměrnou hodnotu 95 %. Tomuto grafu se budeme dále věnovat v dalším grafickém zobrazení níže na straně 43.

Graf 3 Znárodně posouzení hranice účinnosti léčiva pyrantel embonát



Posterior Distribution of Reduction je graficky znázorněný výsledek Bayesovské statistiky, jakým popisujeme pravděpodobné změny ve výskytu parazitů po léčbě (FEC_{post}). Pomáhá nám pochopit, jak účinně léčba snižuje počet parazitů a také umožňuje sledovat, zda se parazité stávají rezistentními na léčivo.

V případě grafu 3 nám vertikální osa, s názvem Density (denzita), udává počet FECR testů. Horizontální osa, Reduction (redukce), udává redukci počtu vajíček v procentech. Hodnoty od 0.985 do 1.00 jsou procenta redukce počtu škrkavek, tedy 98,5 %, 99 %, 99,5 %, 100%. Celá linie ukazuje jednotlivé testy, které jsou seřazené za sebe.

V grafu 3 jsou obvykle k vidění dvě rozdělené oblasti dle barev, šedá a bílá část. Bílá část odpovídá hodnotám, které nesplňují minimální hranici účinnosti, tedy prokazují rezistenci parazita na léčivo. Šedě vybarvená část, v tomto případě prakticky celá část grafu, nám znázorňuje dostatečnou účinnost léčiva pyrantel. Hodnota 1,00 = 100% a značí nejvíce účinný test, kde se prokázala nulová rezistence.

Křivka se přibližně od hodnoty 0,985 do hodnoty 0,990 vyskytuje v nízkých hodnotách testů redukce počtu vajíček, zde byla nízká účinnost. Přibližně u hodnoty 0,990 až 0,995 postupně vidíme vzestup křivky. V rámci této studie byla stanovena hranice účinnosti 95% FECRT pro pyrantel na základě jiných studií viz diskuze. Nastavená hranice účinnosti je již u hodnoty 0,950 a je rozhodující, tvoří dělící část. V tomto grafu není možné tuto hranici zaznamenat, protože se rezistence škrkavek prokázala jako minimální.

Četnost účinnosti FECRT zde hodnotíme jako nejvyšší mezi 99,3 % až 99,7 %. Celkem 84,3 % ze všech provedených FECRT bylo nad hranicí účinnosti, zbylých 15,7 % je snížených FECRT pod hranicí účinnosti a potvrzuje výskyt rezistence *Parascaris* spp. na léčivo pyrantel.

6 Diskuze

Tato diplomová práce se zabývala vznikem anthelmintické rezistence a její mírou u zvoleného léčiva pyrantel embonát. Nedílnou součástí této práci byl přehled o anthelmintické rezistenci ve světě a porovnání s výsledky monitoringu rezistence u škrkavek (*Parascaris* spp.) na pyrantel embonát v České republice.

Do výzkumu bylo zařazeno celkem 292 hříbat z chovů z celé České republiky. Odebrané vzorky výkalů každého hříběte byly koprologicky vyšetřeny za pomoci Mini-FLOTAC metody pro získání co nejpřesnějších hodnot EPG dle Cringoli et al. 2017. Went et al. (2018) označuje tuto metodu za nejrychlejší, nejcitlivější a nejužitečnější v běžné praxi koňských farem.

V první řadě byly stanoveny výsledky popisné statistiky na základě identifikace vajíček parazitů. Ve vyšetřených vzorcích jsme dohledali tyto parazity: *Parascaris* spp., *Anoplocephala* spp. a strongylidní hlístice. Strongylidní hlístice se vyskytly v 90,04 % vzorků, čemuž odpovídá fakt, že strongylidy řadíme mezi nejrozšířenější a nejvíce patogenní parazity koní (Lyons et al. 1999; Corning 2009). V Německu se vyskytli až v 98,4 % ze všech vyšetřených koní, a to dokonce i s vysokou intenzitou infekce (Hinney 2009) a v Polsku je řadí mezi nejvíce nalezené helminty u koní (Kornaš et al. 2010). Výskyt *Parascaris* spp. byl o pár desítek procent menší, celkem 75 % ze všech vyšetřených vzorků koní v ČR. Pires et al. (2024) ve své studii uvádí, že *Parascaris* sp. začíná být rozšířena po celém světě a ohrožuje převážně podvyživená hříbata či mladé koně s oslabenou imunitou.

Harvey (2019) ve svém výzkumu potvrdil, že imunita hostitele hraje složitou úlohu v šíření a vývoji parazitárních infekcí a je také ovlivněna dalšími faktory, jako je věk. Z tohoto důvodu jsme se v tomto projektu zaměřili také na statistický test ANOVA pro porovnání statistické významnosti věku na intenzitu infekce u každého nalezeného druhu parazita. Ovšem jednalo se zde převážně o hříbata a mladé koně. I přes to se vliv věku na intenzitu infekce prokázal. Ve studii od Elghryani et al. (2023) bylo také potvrzeno, že dospělí koně mají schopnost odolat těmto parazitům, ale u hříbat a koní mladších pěti let jsou tyto infekce běžné. S touto skutečností se spojuje i Fabiani, který ve svém výzkumu uvedl že věk má výrazný vliv v této věci a počty vajíček škrkavek jsou na vrcholu kolem čtvrtého měsíce věku hříběte. U koní mladších 10 let bylo zjištěno významně vyšší procento parazitární infekce, které potvrdil Rosenthal (2009) a tvrdí také, že přirozená imunita proti malým strongylidům se s věkem pomalu vyvíjí, avšak zůstává neúplná. Toto by mohlo vysvětlit zjištěnou negativní korelaci mezi věkem a infekcí strongylidy.

V současné době je test snížení počtu fekálních vajíček jedinou dostupnou metodou pro posouzení účinnosti anthelmintické léčby (Nielsen et al., 2019). Tato metoda byla následně využita k vyhodnocení testů.

V tomto experimentální projektu byla nastavena hranice účinnosti FECR na průměrnou hraniční hodnotu účinnosti 95 % a na jejím základě byla provedena analýza za pomoci Bayesovského hierarchického modelu. Pro koně byly dle Zajac & Conboy (2012) minimální mezní hodnoty pro účinnost léčiva u strongylidních hlístic ve FECRT navrženy jako 95% pro macrolidy, 90% pro benzimidazoly a 94% pro pyrantel. Matthews (2014) poznamenal, že limity pro identifikaci rezistence parazitů u koní v rámci jednotlivých skupin anthelmintik jsou špatně standardizované, liší se v různých publikacích a chybí metodologie pro hodnocení rezistence

Parascaris spp. na pyrantel. Tento nedostatek metodiky komplikuje porovnání výsledků mezi různými studii.

Výsledky FECRT u všech 292 vyšetřených hřibat, kteří byli léčeni pyrantelem v této studii, vykazují nízkou úroveň rezistence škrkavek na pyrantel a tím potvrzují vysokou účinnost tohoto léčiva. Armstrong et al. v roce 2014 provedl FEC analýzu u 252 hřibat na osmi farmách. Ve 147 z nich byla nalezena vajíčka Parascaris spp., což znamenalo prevalenci infekce Parascaris 58,3 %. V jejich studii byl pyrantel účinný proti Parascaris spp. na třech ze čtyř farem. Dá se tedy říci, že jsou tyto výsledky shodné s výsledky studie dle Armstrong et al. (2014) provedenými v Austrálii.

V této studii se pyrantel z hlediska účinnosti proti Parascaris spp. prokázal jako velice účinný. Celkem 84,3 % FECRT se prokázalo nad hranicí účinnosti (stanovena na 95 %) a zbylá procenta, 15,7 % FECRT tvořila část pod hranicí účinnosti.

I přestože je v Evropě rozšíření rezistence proti anthelmintikům výrazné (Nielsen, 2022), v České republice bylo prozatím provedeno málo studií o rezistenci škrkavek na pyrantel na rozdíl od rezistence cyathostomin na pyrantel, se kterou se zde již potýkáme déle a věnuje se jí vyšší pozornost (Bodeček et al., 2018).

V roce 2008 provedli Traversa et al. průzkum týkající se účinnosti anthelmintik na cyathostominy na různých koních v evropských chovech. Testování pyrantelu, ivermektinu a moxidektinu proběhlo na více jak stovce koňských farem, přičemž u 25 % z nich byla zaznamenána nízká rezistence na pyrantel. Redukovaná účinnost pyrantelu mimo Evropu byla zkoumána například ve studii Ricarda et al. (2013). Cílem jejich výzkumu bylo posoudit účinnost hlavních tříd anthelmintik dostupných na trhu. Výzkum probíhal v Brazílii a zahrnoval 498 koní z 11 různých farem. Snížená účinnost pyrantelu byla zaznamenána u 5 z 11 stájí. V roce 2014 provedl testování anthelmintické rezistence Bodeček et al. (2018) ve které bylo zahrnuto 186 koní, z toho 54 infikovaných škrkavkami. Redukce počtu vajíček ve výkalech u Parascaris spp. byla v rozmezí 87,9 % do 100 %. V Kentucky od roku 2009 do roku 2010 byla při podobném výzkumu vyhodnocena průměrná účinnost 71 % z celkem 316 vyšetřených hřibat Zanet et al. (2021). Naopak z výzkumu ve Finsku pak uvedli Nareaho et al. (2011) opak tvrzení k rezistenci na pyrantel embonát, kdy bylo vyšetřeno 112 hřibat a výsledky poukázaly silně rezistentní jedince, kteří měli i po léčbě z většiny vysoký nález počtu vajíček Parascaris spp. Je toba brát v potaz, že v tomto výzkumu se testovali pouze jediny s velmi silnou intenzitou infekce.

7 Závěr

- Téma nevhodného používání anthelmintik u koní a rezistence parazitů na ně je v současné době významné a velmi diskutovaný námět znám na globální úrovni. I přes mnoho provedených výzkumů jsou stále potřebná nová data k vyhodnocení rezistence. Jsem si vědoma, že tento experimentální projekt bude nápomocný k novým informacím o účinnosti *Parascaris* spp. vůči pyrantel embonátu. Úlohou této práce bylo zhodnotit míru výskytu anthelmintické rezistence škrkavek (*Parascaris* spp.) na léčivo pyrantel u hříbat na území České republiky.
- Cíle této diplomové práce, tak jak byly definovány, byly splněny.
- Z výsledků této studie se dá říci, že došlo k potvrzení hypotézy 1. Výskyt rezistence *Parascaris* spp. na pyrantel embonát se udržuje ve velmi nízkých hodnotách a prokazuje dostatečnou účinnost při léčbě infekcí *Parascaris* spp.
- Vzhledem k dnešnímu celkovému výskytu rezistence parazitů na anthelmintika je klíčové zvážit, jak bychom mohli být nápomocni k tomu ji předejít. Z tohoto důvodu doporučuji chovatelům, aby nepodceňovali prevenci, správný management stáje a pastvin a dodržovali antiparazitární programy s cílem zachovat zdraví svých koní. Je vhodné zařadit pravidelné koprologické vyšetření jako preventivní opatření s cílem snížit kontaminaci pastvin infekčními stádii. Tím se zároveň předejde vzniku rezistence na anthelmintika, protože léčba bude založena na přesné determinaci parazita z provedeného koprologického vyšetření.
- Vlivu věku na intenzitu infekce u každého nalezeného druhu parazita byl prokázán jako statisticky významný. Je známo, že se škrkavky nachází převážně u hříbat a mladých koní. V této studii bylo prokázáno, že s vyšším věkem koně se snižuje počet výskytu vajíček u daného jedince.

8 Literatura

- Alanazi DA, Mukbel MR, Alyousif MS, AlShehri ZS, Alanazi IO, & Hamdan IA., 2017. A field study on the anthelmintic resistance of *Parascaris* spp. in Arab foals in the Riyadh region, Saudi Arabia., *Veterinary Quarterly*, **37:1**, 200-205.
- Alowanou GG., Adenilé AD, Akouèdegni GC, Bossou AC, Zinsou FT, Akakpo GCA., ... Hounzangbé-Adoté S. , 2021. A comparison of Mini-FLOTAC and McMaster techniques in detecting gastrointestinal parasites in West Africa Dwarf sheep and goats and crossbreed rabbits. *Journal of Applied Animal Research*, **49(1)**, 30–38 p.
- Armstrong SK, Woodgate RG, Gough S, Heller J, Sangster NC, Hughes KJ., 2014. „The efficacy of ivermectin, pyrantel and fenbendazole against *Parascaris equorum* infection in foals on farms in Australia." *Veterinary Parasitology* 205 **(3-4)**: 575-580, DOI:10.1016/2014.08.028.
- Barda B, Ianniello D, Zephyryne H, Rinaldi L, Cringoli G, Burioni R, Albonico M. 2014. Parasitic infections on the shore of Lake Victoria (East Africa) detected by Mini-FLOTAC and standard techniques. *Acta Trop.* **137**: 140–146 p.
- BioLib. 2024. Profil taxonu druh *Parascaris equorum* (Goeze, 1782). Dostupné z <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id88718/>
- Bioveta. 2016. Equistrong 400 mg/g perorální pasta pro koně. Dostupné z <https://www.bioveta.cz/pripravky/veterinarni-pripravky/equistrong-400-mg-g-peroralni-pasta-pro-kone.html>
- Bodecek S, Svetlikova J, Hargitaiova K, Kecerova Z, Mrackova M. 2018. „Monitoring the avermectin and pyrantel resistance status of nematode parasites of horses in the Czech Republic." *Veterinární medicína* **63 (7)**: 299-305. DOI: 10.17221/125/2017-VETMED
- Bodeček Š, Kecerová Z, Drahoňovská A. 2017. Endoparazité u koní: diagnostika, terapie, prevence – výukový materiál. Veterinární a farmaceutická univerzita, Interní vzdělávací agentura IVA VFU Brno. **39 s.**
- Boersema JH, Eysker M, Nas JW. 2002. Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones. *Vet Rec* **150**: 279-281.
- Bowman DD. 2014. *Georgis' parasitology for veterinarians*. 10th ed. College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, New York, **477 p.**
- Caffrey CR. 2012. *Parasitic Helminths*. Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **516 p.**
- Class CSC, Fialho PA, Alves LC, Silveira RL, Amendoeira MRR, Knackfuss FB, Barbosa ADS. 2023. Comparison of McMaster and Mini-FLOTAC techniques for the diagnosis of internal parasites in pigs. *Rev Bras Parasitol Vet. Mar* **27**; 32(2).
- Corning S. 2009. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasites & Vectors* **2**: (Suppl 2).

- Craven J, Bjørn H, Barnes EH, Henriksen SA, Nansen P, 1999. „A comparison of in vitro tests and a faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles." *Veterinary Parasitology* **85** (1): 49-59, DOI:10.1016/S0304-4017
- Cringoli G, Maurelli M, Levecke B. 2017. The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nat Protoc* 12, 1723–1732 p.
- Despommier DD, Griffin DO, Gwadz WR, Hotez PJ, Knirsch CA. 2017. *Parasitic Diseases*. 6th ed. *Parasites Without Borders*; Springer-Verlag, New York, USA, **590 p**.
- Elghryani N, McOwan T, Mincher C, Duggan V., Waal T. 2023. „Estimating the Prevalence and Factors Affecting the Shedding of Helminth Eggs in Irish Equine Populations." *Animals* **13** (4), <http://dx.doi.org/10.3390/ani13040581>.
- Fabiani JV, Lyons ET, Nielsen MK. 2016. Dynamics of *Parascaris* and *Strongylus* spp. parasites in untreated juvenile horses. *Veterinary Parasitology* **230**:62-66.
- Foreyt WJ. 2001. *Veterinary parasitology*. 5th ed. Blackwell Publishing, Iowa State University Press, **235 p**.
- Harvey A. 2019. Wild horse populations in south-east Australia have a high prevalence of *Strongylus vulgaris* and may act as a reservoir of infection for domestic horses. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* [online]. (8), 156-163
- Hearn FP, Peregrine AS. 2003. Identification of foals infected with *Parascaris equorum* apparently resistant to ivermectin. *J Am Vet Med Assoc* **223**:482-485.
- Hinney B. 2009. Prevalenz von helminthen und riskfaktoren für ihre Befallsstärke bei pferden in Brandenburg (Prevalence of helminths in horse farms in the federal state Brandenburg and risk factors for a high endoparasitic burden). Thesis, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, **134 pp**.
- Kaplan RM. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol.*, **20**: 477–481.
- Kaplan RM, Reinemeyer CR, Slocombe JO, Murray MJ. 2006. Confirmation of ivermectin resistance in a purportedly resistant Canadian isolate of *Parascaris equorum* in foals. In *Proceedings of the American Association of Veterinary Parasitologists*. 15-18 July, **2006**:69-70.
- Kornaś S, Cabaret J, Skalska M, Nowosad B. 2010. Horse infection with intestinal helminths in relation to age, sex, Access to grass and farm system. *Vet. Parasitol.* **174**, 285– 291.
- Lozano J, Almeida C, Victório AC, Melo P, Rodrigues JP, Rinaldi L, Cringoli G, Gomes L, Oliveira M, Paz-Silva A. 2021. Implementation of Mini-FLOTAC in Routine Diagnosis of Coccidia and Helminth Infections in Domestic and Exotic Birds. *Veterinary Sciences*. **8**(8):160 p.
- Lyons ET, Tolliver SC, Ionita M, Collins SS. 2007. Evaluation of parasitocidal activity of fenbendazole, ivermectin, oxibendazole, and pyrantel pamoate in horse foals with emphasis on ascarids (*Parascaris equorum*) in field studies on five farms in Central Kentucky in 2007. *Parasitol Res* 2008, **103**:287-291.

- Lyons ET, Tolliver SC, Drudge JH. 1999. Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs. *Vet. Parasitol.* **85**, 113–122.
- Martin F, Höglund J, Bergström TF, Karlsson OL, Tydén E. 2018. Resistance to pyrantel embonat and efficacy of fenbendazole in *Parascaris univalens* on Swedish stud farms. *Veterinary Parasitology* **264**:69-73.
- Matthews JB. 2014. Anthelmintic resistance in equine nematodes. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **4**:310-315.
- Mehlhorn H. 2016. *Animal Parasites*. Springer International Publishing Switzerland, Cham, Switzerland, **719 p**.
- Modelling Fecal Egg Counts online kalkulátor Bayesovských hierarchických modelů. Dostupné z <https://shiny.math.uzh.ch/user/furrer/shinyas/shiny-eggCounts/>
- Molento M, Antunes J, Bentes RN. 2008. Anthelmintic resistance in Brazilian horses. 2008. *Vet Rec* **162**:384-385.
- Näreaho A, Vainio K, Oksanen A. 2011. „Impaired efficacy of ivermectin against *Parascaris equorum*, and both ivermectin and pyrantel against strongyle infections in trotter foals in Finland." *Veterinary Parasitology* **182** (2-4): 372-377. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.05.045>.
- Nielsen MK, Banahan M, Kaplan RM. 2020. Importation of macrocyclic lactone resistant cyathostomins on a US thoroughbred farm. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* **14**:99–104. doi: 10.1016/j.ijpddr.2020.09.004
- Nielsen MK, Reinemeyer CR. 2018. *Handbook of Equine Parasite Control*. 2th ed. John Wiley & Sons, Hoboken, USA, **229 p**.
- Nielsen MK. 2016. Evidence-based considerations for control of *Parascaris* spp. infections in horses. *Equine Veterinary Education* **28**:224–31.
- Peregrine AS, Molento MB, Kaplan RM, Nielsen MK. 2014. Anthelmintic resistance in important parasites of horses: does it really matter? *Vet. Parasitol.* **201**, 1–8.
- Pires LSA, Abrahão C, Dias de Castro LL, Hammerschmidt J, Antunes J, Molento CFM, Molento MB. 2024. „Welfare assessment of Thoroughbred horses naturally infected with gastrointestinal parasites in Southern Brazil: Quantifying the host-parasite relationship." *Journal of Equine Veterinary Science* **136 p**. DOI: 10.1016/105062
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD, 2006. *Veterinary medicine*. 10th ed. Saunders, **2156 p**.
- Reinemeyer CR. 2009. Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*. *Parasites & Vectors* **2** (S8) DOI: 10.1186/1756-3305-2-S2-S8.
- Reinemeyer CR, Marchiondo AA. 2007. Efficacy of pyrantel pamoate in horses against a macrocyclic lactone-resistant isolate of *Parascaris equorum*. In *Proceedings of the American Association of Veterinary Parasitologists*, **2007**:78

- Reinemeyer CR. 2009. „Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*." *Parasites & Vectors* 2 (Suppl 2), <http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-2-S2-S8>.
- Roepstorff A, Nansen P. 1998. Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine. Danish Centre for Experimental Parasitology, The Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark, **161 p.**
- Rosenthal BM. 2009. Intrinsic Factors Influencing the Infection by Helminth Parasites in Horses under an Oceanic Climate Area (NW Spain). *Journal of Parasitology Research* cit. 2023-03-29. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/jpr/2009/616173/>
- Schougaard H, Nielsen MK. 2007. Apparent ivermectin resistance of *Parascaris equorum* in foals in Denmark. *Vet Rec* 2007, **160**:439-440.
- Smith RD. 2005. *Veterinary Clinical Epidemiology*. 3th ed. Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA, **149 p.**
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL. 2016. *Veterinary Parasitology*. 4th ed. Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, UK, **354 p.** 1006.
- Traversa D. 2008. The Little-known Scenario of Anthelmintic Resistance in Equine Cyathostomes in Italy. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases* **1149**:167–169.
- Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv. 2013. Detail přípravku VLP. Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv, Brno. Available from <http://www.uskvbl.cz/cs/registrace-a-schvalovani/registrace-vlp/seznamvlp/aktualne-registrovane-vlp/detail-pipravku-vlp?Id=0910f7c7801a9e29> (accessed October 2021).
- Veronesi F, Moretta I, Moretti A. 2009. Field effectiveness of pyrantel and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment in Italian horse farms. *Vet Parasitol* 2009, **161**:138-141.
- Von Samson-Himmelstjerna G, Fritzen B, Demeler J, Schurmann S, Rohn K, Schnieder T, Epe C. 2007. Cases of reduced cyathostomin eggreappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. *Vet Parasitol* 2007, **144**:74-80.
- Went HA, Scare JA, Steuer AE, Nielsen MK. 2018. Effects of homogenizing methods on accuracy and precision of equine strongylid egg counts. *Veterinary Parasitology* **261**:91–95.
- Zajac AM, Conboy GA. 2012. *Veterinary Clinical Parasitology*. 8th ed. Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, UK, **354 p.**
- Zanet SE, Battisti F, Labate F, Oberto E, Ferroglio. 2021. „Reduced Efficacy of Fenbendazole and Pyrantel Pamoate Treatments against Intestinal Nematodes of Stud and Performance Horses." *Veterinary Sciences* **8** (3), <http://dx.doi.org/10.3390/vetsci8030042>.

Zhou M, Lu Y, Han L. 2023. Exploration of Parascaris species in three different Equus populations in China. *Parasites Vectors* **16**, 202 (2023). Dostupné z <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-023-05768-3#citeas>

9 Seznam použitých zkratk a symbolů

EPG- počet vajíček na gram výkalu

PYR- pyrantel

FECpost- výsledek odběru po dehelmintizaci

FECpre- výsledek odběru před dehelmintizací

FECR (%)- redukce počtu vajíček - procentuální výsledek FECRT

FECRT- test redukce počtu fekálních vajíček

L₁- první fáze larválního vývoje

L₂- druhá fáze larválního vývoje

L₃- třetí fáze larválního vývoje

L₄- čtvrtá fáze larválního vývoje

WAAVP- Světová asociace pro rozvoj veterinární parazitologie

10 Samostatné přílohy

Příloha 1 – Tabulka dat z vyšetření hříbat léčených pyrantel embonátem

Pořadí:	věk	Strongylida pre	Strongylida post	FECR (%) STR	Parascaris pre	Parascaris post	FECR (%) PAR	Anoplocephala pre	Anoplocephala post
PYR	2	2680	10	99,63	45	0	100,00	0	0
PYR	0	1665	5	99,70	280	0	100,00	0	0
PYR	1	1860	0	100,00	105	0	100,00	0	0
PYR	1	680	0	100,00	50	0	100,00	0	0
PYR	1	1285	5	99,61	35	0	100,00	0	0
PYR	1	2060	5	99,76	60	0	100,00	0	0
PYR	2	675	0	100,00	45	0	100,00	0	0
PYR	2	370	0	100,00	5	0	100,00	0	0
PYR	0	415	0	100,00	105	0	100,00	0	0
PYR	0	150	5	96,67	320	0	100,00	0	0
PYR	0	225	0	100,00	150	0	100,00	0	0
PYR	1	1270	0	100,00	20	0	100,00	0	0
PYR	0	350	20	94,29	640	0	100,00	0	0
PYR	1	2330	10	99,57	95	0	100,00	0	0
PYR	1	1995	0	100,00	55	0	100,00	0	0
PYR	1	765	0	100,00	215	0	100,00	0	0
PYR	2	175	0	100,00	70	0	100,00	0	0
PYR	2	190	0	100,00	75	0	100,00	0	0
PYR	1	1305	5	99,62	15	0	100,00	0	0
PYR	1	300	0	100,00	45	0	100,00	0	0
PYR	1	355	0	100,00	715	0	100,00	0	0
PYR	1	2630	5	99,81	45	0	100,00	0	0
PYR	1	215	0	100,00	0	0		0	0
PYR	1	2065	0	100,00	825	0	100,00	0	0
PYR	1	250	0	100,00	30	0	100,00	0	0
PYR	0	25	0	100,00	105	0	100,00	0	0
PYR	1	215	0	100,00	35	0	100,00	0	0
PYR	0	0	0		520	0	100,00	0	0
PYR	1	1140	0	100,00	30	0	100,00	0	0
PYR	0	680	0	100,00	20	0	100,00	0	0
PYR	0	830	0	100,00	220	0	100,00	0	0
PYR	0	702	25	96,44	2845	0	100,00	0	0
PYR	0	390	0	100,00	860	0	100,00	0	0
PYR	1	655	0	100,00	25	0	100,00	5	0
PYR	2	1960	0	100,00	60	0	100,00	0	0
PYR	1	1640	5	99,70	80	0	100,00	0	0
PYR	1	1965	0	100,00	5	0	100,00	5	0
PYR	1	415	0	100,00	75	0	100,00	0	0
PYR	1	680	0	100,00	110	0	100,00	0	0
PYR	1	960	0	100,00	10	0	100,00	0	0
PYR	1	1285	0	100,00	310	0	100,00	0	0
PYR	0	35	10	71,43	10	0	100,00	0	0
PYR	1	470	0	100,00	295	0	100,00	0	0
PYR	0	325	0	100,00	80	0	100,00	0	0
PYR	1	70	0	100,00	1225	0	100,00	0	0
PYR	0	470	5	98,94	655	0	100,00	0	0
PYR	2	570	0	100,00	260	0	100,00	0	0
PYR	1	455	0	100,00	315	0	100,00	0	0
PYR	1	320	0	100,00	155	0	100,00	0	0
PYR	0	225	110	51,11	0	0		0	0
PYR	0	380	180	52,63	15	0	100,00	0	0
PYR	1	50	0	100,00	0	0		0	0
PYR	0	1480	15	98,99	5	0	100,00	0	0
PYR	1	1600	0	100,00	0	0		0	0
PYR	0	495	50	89,90	0	0		0	0

PYR	1	2065	0	100,00	825	0	100,00	0	0
PYR	1	250	0	100,00	30	0	100,00	0	0
PYR	0	25	0	100,00	105	0	100,00	0	0
PYR	1	215	0	100,00	35	0	100,00	0	0
PYR	0	1720	5	99,71	625	0	100,00	0	0
PYR	1	1275	220	82,75	25	10	60,00	0	0
PYR	1	1315	0	100,00	220	0	100,00	0	0
PYR	1	185	0	100,00	220	0	100,00	0	0
PYR	2	180	0	100,00	90	0	100,00	0	0
PYR	1	1550	5	99,68	230	0	100,00	0	0
PYR	1	485	0	100,00	215	0	100,00	0	0
PYR	1	970	0	100,00	10	0	100,00	5	0
PYR	1	210	0	100,00	75	0	100,00	0	0
PYR	1	780	0	100,00	1365	0	100,00	0	0
PYR	2	650	0	100,00	510	0	100,00	0	0
PYR	2	860	0	100,00	40	0	100,00	0	0
PYR	2	715	5	99,30	65	0	100,00	0	0
PYR	1	810	0	100,00	445	0	100,00	0	0
PYR	1	1710	0	100,00	10	0	100,00	0	0
PYR	1	955	0	100,00	240	0	100,00	0	0
PYR	0	5	0	100,00	60	0	100,00	0	0
PYR	1	2235	10	99,55	30	0	100,00	0	0
PYR	0	1615	0	100,00	95	0	100,00	0	0
PYR	1	1245	0	100,00	60	0	100,00	0	0
PYR	0	40	0	100,00	75	0	100,00	0	0
PYR	0	205	0	100,00	190	0	100,00	0	0
PYR	0	1710	5	99,71	630	0	100,00	0	0
PYR	0	0	0		520	0	100,00	0	0
PYR	1	475	0	100,00	970	70	92,78	0	0
PYR	1	685	15	97,81	0	0		0	0
PYR	0	580	20	96,55	0	0		0	0
PYR	0	1330	62	95,34	110	5	95,45	0	0

V tabulce lze vidět jednotlivé výsledky všech parazitů před a po léčbě pyrantelem, věk (roky) zvířete a také vyhodnocené FECRT testů u *parascaris* spp. a strongylidních hlístic.