

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra zoologie a rybářství

Rezistence na anthelmintika

Bakalářská práce

Autor práce: Karolina Šafaříková

Vedoucí práce: Ing. Jaroslav Vadlejch, Ph.D.

2012

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Rezistence na anthelmintika vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příložené bibliografii.

V Praze dne 13. 4. 2012

.....

podpis autora práce

**Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu práce Ing. Jaroslavu Vadlejchovi, Ph.D. za pomoc při jejím vypracování a poskytnutí cenných rad.

## **Souhrn**

Tato bakalářská práce mapuje problematiku rezistence vůči anthelmintikům, která jsou v dnešní době komerčně dostupná a široce využívaná.

Schopnost helmintů odolávat účinkům léčiv je dnes rozšířeným jevem, který se nadále rozrůstá. Největší problémy způsobuje v oblastech s rozvinutým chovem ovcí, zejména v Austrálii, Africe, na Novém Zélandu a v Jižní Americe.

Rezistence je ireverzibilní, proto je nutné zaměřit se na alternativní metody kontroly parazitů, snížení frekvence ošetření, zmenšení závislosti na chemoterapeutikách. Aby bylo možné s rezistencí účinně bojovat, je nezbytná její spolehlivá detekce. Proto se část práce zabývá metodami, které jsou pro tyto účely využívané v laboratorních i terénních podmínkách. Pro chovatele je důležité, aby mohli využívat jednoduchou metodu, která by svojí dostupností neúměrně nezvyšovala náklady na chov.

Rezistence je spojena nejen se snížením zdravotní úrovně chovu, ale také s poklesem užitkovosti a snížením příjmů chovatelů. V extrémních případech museli chovatelé pro vysokou míru rezistence svoji činnost ukončit. Je proto nezbytné, aby se v této oblasti pokračovalo ve výzkumech, jejichž aktuální závěry byly shrnuty v této práci.

### **Klíčová slova:**

Helmint, antiparazitika, rezistence, mechanismus účinku

## **Summary**

The aim of this bachelor thesis is to survey the issue of resistance to commercially available and widely used anthelmintic.

Nowadays, the ability of helminths to resist the effect of drugs is widespread phenomenon, which continues to grow. The biggest problems are caused in areas with developed sheep breeding, especially in Australia, Africa, New Zealand and South America.

Resistance is non-reversible, therefore it is necessary to focus on alternative methods of controlling parasites, reduce the frequency of treatment and reduce dependence on chemotherapeutics. The reliable detection is necessary in order to fight with resistance effectively. Therefore, part of the thesis deals with methods that are used for these purposes in the laboratory and field conditions. For farmers it is important to be able to use a simple, accessible method in order to prevent farming costs from disproportionate increase.

Resistance is not only associated with a reduction in health standards of breeding, but also with a decrease in performance and reducing the income of farmers. In extreme cases, farmers are forced to end their businesses due to high degree of resistance in their breedings. It is therefore essential to continue research in this field, the current findings are summarized in this thesis.

### **Keywords:**

Helminth, anthelmintics, resistance, mechanism of efficacy

<b>1.</b>	<b>ÚVOD</b> .....	8
<b>2.</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	9
<b>3.</b>	<b>LITERÁRNÍ REŠERŠE</b> .....	10
3.1	Anthelmintika .....	10
3.1.1	Hlavní skupiny anthelmintik.....	10
3.1.1.1	Makrolidy.....	10
3.1.1.2	Benzimidazoly .....	12
3.1.1.3	Syntetické pyrazinové deriváty.....	13
3.1.1.4	Levamisol.....	13
3.1.2	Mechanismus účinku anthelmintik .....	13
3.1.3	Zdravotní rizika při použití anthelmintik u hostitelů, vedlejší účinky a toxicita .....	14
3.2	Rezistence na anthelmintika.....	15
3.2.1	Mechanismus rezistence .....	17
3.2.2	Rezistence na hlavní skupiny anthelmintik.....	19
3.2.2.1	Benzimidazoly .....	19
3.2.2.2	Makrocyclické laktony .....	19
3.2.2.3	Levamisol.....	20
3.2.3	Vznik rezistence.....	20
3.2.4	Rezistence u jednotlivých druhů hostitelů .....	21
3.2.4.1	Přežvýkavci.....	21
3.2.4.2	Koně.....	21
3.2.4.3	Psi.....	22
3.2.4.4	Prasata.....	22
3.2.5	Výskyt rezistence .....	23
3.2.6	Metody detekce rezistence .....	23
3.2.6.1	Test <i>in vivo</i> (FECRT).....	24
3.2.6.2	Testy <i>in vitro</i> .....	26

	3.2.6.3 PCR test .....	27
	3.2.7 Prevence rezistence .....	28
<b>4.</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>32</b>
<b>5.</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>33</b>
<b>6.</b>	<b>PŘÍLOHY</b> .....	<b>41</b>

## 1. Úvod

Rezistence vůči léčivům se stává rozšířeným fenoménem, který byl zaznamenán u mnoha organismů. Můžeme jej pozorovat, mimo helmintů, také u virů, bakterií, členovců, protozoí a rakovinných buněk. Přestože je tato problematika obecně spojována s rezistencí bakterií na antibiotika, míra rozšíření u helmintů je taktéž nezanedbatelná. Navíc má vzrůstající tendenci.

Onemocnění způsobená parazity mohou mít za následek nejen pokles užitkovosti, ale především snížení kvality života postižených zvířat, v horších případech nezřídka způsobí i smrt. Kontrola vhodnými terapeutiky je proto nezbytná. V případě rezistence je však nutné léčbu opakovat, což zvyšuje náklady chovatele za současného snížení užitkovosti. Problém rezistence vůči léčivům má tedy i značný ekonomický dopad.

Rezistence u skotu není zatím příliš častá, přesto již byly ve světě uváděny případy přítomnosti rezistentních kmenů. Nejčastěji onemocnění způsobují druhy *Trichostrongylus axei*, *Haemonchus placei*, *Cooperia* spp., *Oesophagostomum radiatum*. Nejzávažnější situace je u ovcí a koz, kde jsou původci parazitóz druhy *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus colubriformis* a *Nematodirus battus*. Tyto druhy mají nejvyšší prevalenci v rámci Evropy a často se mezi nimi vyskytují rezistentní populace. Podobně se s rezistentními jedinci můžeme setkat u zástupců Equidae. Zde se jedná o tzv. malé a velké strongylidy, kteří mohou způsobit vážné poškození tkání hostitele. U psů a koček se nejčastěji setkáváme se škrkavkami rodu *Toxocara*, v rámci rezistence jsou ale mnohem významnější zástupci *Ancylostoma caninum* a *Dirofilaria immitis*, u kterých již byla odolnost vůči použitým léčivům detekována.

Vzhledem k tomu, že člověk je také hostitelem mnoha druhů endoparazitů, je důležité zaměřit pozornost a výzkum i na situaci v humánní medicíně. Zároveň je možné převzít některé poznatky z veterinární oblasti a s ohledem na závažnost nastalého stavu a rychlému nástupu rozvoje rezistence, zejména u hospodářských zvířat, se z ní poučit. Přestože rezistence na anthelmintika způsobuje největší problémy v chovu ovcí a koz, neméně důležitý je monitoring u jiných druhů chovaných pro produkci, či zábavu. Neboť i u těchto druhů (skot, prasata, psy) můžeme očekávat zvýšení výskytu rezistentních populací. Pes, jakožto zvíře úzce spjaté s člověkem a žijící v jeho těsném kontaktu, je také možným zdrojem pro přenos zoonóz, rozšíření rezistence u populací způsobujících tato onemocnění by tedy mělo značný dopad v humánní medicíně.



## **2. Cíl práce**

Cílem této práce bylo zaměřit se na nejnovější poznatky získané v oblasti rezistence helmintů vůči léčivům, která jsou v současné době komerčně dostupná. Přestože je tento problém rozšířen zejména u malých přežvýkavců a koní, práce se zaměřuje také na ostatní druhy, a to skot, prasata a psy.

### 3. Literární rešerše

#### 3.1 Anthelmintika

Anthelmintika lze rozdělit na vermifuga, která působí paralýzu a následné vypuzení parazita ze střeva, a vermicida, která parazity usmrcují (Lingala a kol., 2011). Léčba parazitárních onemocnění má velmi dlouhou tradici, její historie spadá do dob před tisíci lety, kdy tyto choroby byly objeveny. Primárně se však zabývala parazity působícími onemocnění lidí, terapie hospodářských zvířat přišla na řadu mnohem později. Jako první léčebné přípravky posloužily různé nespecifické jedy, např. sloučeniny arzenu. Z rostlinných produktů byly využívány druhy obsahující nikotin. Mechanismus účinku, či aktivní složky terapeutik byly však neznámé a nebyly podrobovány žádným testům (Bennet-Jenkins a Bryant, 1996).

Dalším rostlinným přípravkem je esenciální olej získávaný z *Chenopodium ambrosioides*. Ten byl využíván zejména v Americe jako prostředek proti střevním parazitárním infekcím. Účinnou složku tvoří ascaridol, který má silné nematocidní účinky. Pro svoji toxicitu má však na svědomí také množství lidských obětí (MacDonald a kol., 2004). Mnoho prostředků rostlinného původu je využíváno v chemoterapii dodnes.

Moderní a bezpečnější širokospektrá anthelmintika byla objevena a vyvinuta farmaceutickými společnostmi mnohem později, v 50. letech 20. stol. Stále však musela být podávána po několik dní a měla omezené spektrum účinku (Horton, 2003). Po počáteční identifikaci potenciálních anthelmintik směřovaly studie k optimalizaci jejich činnosti. Lepší účinnosti se obvykle dosáhlo změnou ve farmakokinetice. Během let 1960 až 1970 se úspěšnost farmaceutických společností ve vývoji poněkud zpomalila. Ve stejnou dobu však došlo k příznivému pokroku při výzkumu základní biologie, biochemie a fyziologie parazitárních organismů. Toto rozšíření znalostí významně zvyšuje potenciál využití dostupných anthelmintik (Bennet-Jenkins a Bryant, 1996).

##### 3.1.1 Hlavní skupiny anthelmintik

###### 3.1.1.1 Makrolidy

Makrocyclické laktony se skládají ze dvou podskupin – avermectinů, které zahrnují abamectin, doramectin, ivermectin, eprinomectin a selamectin, a milbemyciny (zástupce moxidectin). Tyto dvě skupiny se liší v molekulární struktuře, avermectiny mají např. sacharidové substituenty na pozici C13 a milbemyciny sacharidové substituenty nemají

(Durden, 2007). Tyto rozdíly vedou k odlišné farmakokinetice a účinnosti (Parker a kol., 1999), biologická aktivita je však podobná (Shoop a kol., 1995). Avermectiny byly původně izolovány z kultur půdního organismu *Streptomyces avermitilis* a milbemyciny byly izolovány z druhů *S. cyanogrise* a *S. hygroscopicus*. Obě skupiny mají silné insekticidní vlastnosti (Durden, 2007).

Milbemycin objevili japonští vědci v roce 1973 jako sloučeninu s akaricidními a insekticidními účinky využívanou v zemědělství pro ochranu plodů. Avermectiny byly objeveny v roce 1975, o 6 let později byl polysyntetický ivermectin (IVM) poprvé představen pro komerční využití u zvířat. Od roku 1981 byl IVM uveden ve více než 60 zemí světa pro použití nejen u skotu, ale i dalších přežvýkavců, koní, prasat, psů a také lidí (Shoop a kol., 1995; Ikeda a kol., 2001).

IVM je směs dvou chemicky modifikovaných avermectinů, které obsahují minimálně 80 % z 22,23-dihydroavermectin-B1a a 20 % 22,23-dihydroavermectinu-B1b. Je to vysoce lipofilní látka, která se rozpouští ve většině organických rozpouštědel, ale je prakticky nerozpustná ve vodě. Má vynikající účinnost proti endo (hlístice) i ektoparazitům v extrémně nízkých dávkách, ale nepůsobí proti tasemnicím a motolicím (Yates a kol., 2003). Doporučené dávky jsou vyjádřeny jako  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , tento fakt také přispívá k jeho bezpečnosti. IVM je vysoce účinný proti širokému spektru druhů hlístic, včetně většiny larev a adultních jedinců, dále účinkuje proti mnoha členovcům parazitujícím u domácích zvířat. U psů je IVM účinný i proti larvám *Dirofilaria immitis* a je používán v profylaxi srdečních červů. Lék může být podán orálně, intramuskulárně (IM), subkutánně (SC) nebo lokálně (formou pour-on), v závislosti na druhu.

Způsob podání silně ovlivňuje farmakokinetiku léku. Největší biologická využitelnost je dosažena SC podáním, následováno je perorální formou. Nejnížší hodnoty jsou naopak dosaženy metodou pour-on. Vzhledem k lipofilní povaze IVM inklinuje k hromadění v tukové tkáni, která působí jako jeho rezervoár. Nejvyšší hladina IVM se nachází v játrech a tuku, nejnížší naopak v mozkové tkáni. IVM je vylučován převážně stolicí u všech druhů bez ohledu na způsob podání, menší množství je vylučováno močí (Canga a kol., 2009).

Moxidectin (MOX) je sloučenina účinkující při extrémně nízkých dávkách proti mnoha zástupcům hlístic a parazitujícím členovcům (Parker a kol., 1999). V současné době je komerčně dostupný v řadě přípravků pro použití u skotu, ovcí, koní a psů (Yazwinski

a kol., 1999). U domácích zvířat je používán ve formě pour-on, u skotu je využívána injekční aplikace, u ovcí orální. V nedávné době byl také registrován pro prevenci a léčbu ovčí strupovitosti (injekční podání). Využití MOX v této oblasti přináší rychlejší a bezpečnější aplikaci, snížení stresu pro zvířata, zároveň nejsou nutná speciální manipulační zařízení. Dalším nezanedbatelným faktem je možnost použití u březích bahnic (Parker a kol., 1999). Lipofilita MOX je mnohonásobně vyšší než u avermectinů (Dupuy a kol., 2007).

IVM je používán v dávce 200 µg/kg (SC nebo orálně) u skotu proti druhu *Haemonchus* spp., dále 500 µg/kg lokálně proti *Ostertagia* spp., *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Strongyloides papillosus*, *Bunostomum* spp., *Nematodirus* spp., *Trichuris* spp., *Oesophagostomum* spp.

U ovcí je cílení IVM velmi podobné, je však podáván v dávce 200 µg/kg SC, a to u druhů *Haemonchus* spp., *Chabertia ovina*, *Ostertagia* spp., *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Strongyloides papillosus*, *Bunostomum* spp., *Nematodirus* spp., *Trichuris ovis*, *Oesophagostomum* spp.

U prasat je IVM účinný proti *Strongylus* spp., *Parascaris equorum*, *Oxyuris equi*, *Draschia* spp., *Habronema* spp., *Trichostrongylus axei*, *Parascaris equorum*, *Strongyloides westeri*, *Dictyocaulus amfieldi*, *Onchocerca* spp. U psů zejména u druhu *Dirofilaria immitis* (mikrofilárie a čtvrté larvální stadium) v dávce 6 µg/kg orálně, *Toxocara canis*, *Toxascaris leonine*, *Ancylostoma caninum*, *Uncinaria stenocephala*, *Trichuris vulpis* (Canga a kol., 2009).

#### 3.1.1.2 Benzimidazoly

Anthelmintika na bázi benzimidazolu se zdají být nejdříve používaným dostupným léčivem parazitárních onemocnění hospodářských zvířat (Gilleard, 2006).

Thiabendazol, 4-(2-benzimidazolyl)thiazol, derivát této řady, se stal široce přijímaný proti různým druhům gastrointestinálních hlístic parazitujících u lidí a zvířat. Další zavedené sloučeniny BZ jsou mebendazol, albendazol, fenbendazol. Thiabendazol je účinný proti široké škále hlístic, zvláště však proti infekcím způsobených druhem *Strongylides stercoralis*, který je odolný vůči jiným anthelmintikům. Mebendazol je širokospektrální anthelmintikum efektivní proti smíšené infekci *Ascaris*, *Enterobius* a *Trichiuria* a měchovcům.

Antiparazitární spektrum benzimidazolů je široké a zahrnuje i některé druhy tasemnic a motolic (Mansour a kol., 2002). MBZ (methyl-5-benzoyl-2-benzimidazol-karbamát) byl uveden na trh v roce 1972 (Cañete a kol., 2009). BZ účinkují také u *Teladorsagia circumcincta*, druhu s vysokou prevalencí u koz a ovcí (Elard a kol., 1996).

### 3.1.1.3 Syntetické pyrazinové deriváty

Praziquantel patří mezi mladší anthelmintika, byl zaveden v roce 1970 jako léčivo s schistosomicidním a cestodozním účinkem. V dnešní době se používá ve veterinární a humánní medicíně, kde je důležitou složkou pro léčbu schistosomiázy (Martin, 1997). Úzce zaměřené anthelmintikum, triklabendazol, je významný svým účinkem proti široké škále vývojových stádií *Fascioloides* v rámci obratlovců jako hostitelích (Köhler, 2001). PZQ a epsiprantel jsou využitelné pro terapii echinokokózy.

Jsou účinné také vůči *Dipylidium caninum*, obvykle jsou dostupné v kombinaci s nematocidními sloučeninami, ve formě tablet pro orální podání, či ve formě spot-on a mohou být použity také jako součást širokospektrálního parazitárního programu (Canga a kol., 2009). Pipezarin je GABA ( $\gamma$ -aminomáselná kyselina) agonista receptorů ve svalstvu hlístic způsobující ochrnutí parazita (Martin, 1997).

### 3.1.1.4 Levamisol

Levamisol ((S)-2,3,5,6-tetrahydro-6-phenylimidazo-[2,1-b]thiazol) a pyrantel ((E)-1,4,5,6-tetrahydro-1-methyl-2-[2-(2thienyl)ethenyl]pyrimidin) jsou dvě široce používaná anthelmintika. Patří do skupiny nikotinových agonistů, tyto sloučeniny se váží na nikotinové acetylcholinové receptory lokalizované ve svalstvu parazitů. Tím způsobí spastickou paralýzu helminta (Robertson a kol., 2000).

## 3.1.2 Mechanismus účinku anthelmintik

Použití anthelmintik je nutno přizpůsobit specifickým fázím životního cyklu parazitů (Wood a kol., 1995). Cílová místa anthelmintik jsou především formace mikrotubulů (benzimidazoly), nervový systém (nikotinoví agonisté), glutamáto-chloridové kanály ve svalovině helmintů (makrocyclické laktony) (Jones a George, 2005).

Mikrotubuly jsou základní součástí cytoskeletu a podílejí se na buněčné motilitě, transportu, udržování tvaru buňky. Hrají také klíčovou roli při tvorbě dělicího vřeténka

při mitóze, které umožňuje oddělit chromozómy během buněčného dělení (Berrieman a kol., 2004).

Mnoho anthelmintik aktuálně používaných při terapii parazitárních onemocnění působí na nervový systém helmintů (Wolstenholme a Rogers, 2005). Makrocyclické laktony se váží v místě glutamát-chloridových kanálů, a to buď přímo aktivují kanál, nebo zvyšují účinek běžného agonisty, glutamátu. Helminti oplývají mnoha různými typy nikotinových receptorů, což představuje významnou rozmanitost, která do budoucna zaručuje množství důležitých cílů.

Nervový systém obsahuje také mnoho dalších iontových kanálů a receptorů, které doposud nebyly využívány v managementu kontroly helmintů, proto je třeba jejich dalších výzkumů pro vývoj nových účinných sloučenin. Cíl iontových kanálů má několik výhod. Jednou z nich je rychlé působení a tedy i rychlé potlačení infekcí. Obvykle parazity ochromují a jejich zjevné účinky působení jsou vhodné pro použití u schopných, rychlých a vysoce výkonných testů (Wolstenholme, 2011).

Levamisol působí jako agonista nikotinového acetylcholinového receptoru. Makrocyclické laktony, mezi něž patří ivermectin, abamectin, doramectin, eprinomectin, selamectin, působí na glutamát-chloridové kanály (Gilleard, 2006), inhibují (faryngální) čerpání a přijímání potravy, dále snižují motilitu, plodnost u citlivých hlístic a způsobují paralýzu (Yates a kol., 2003).

Milbemyciny působí podobně jako AVM – aktivátory chloridových kanálů ve svalových membránách hlístic, které jsou aktivovány endogenním glutamátem (Sangster, 1999).

### 3.1.3 Zdravotní rizika při použití anthelmintik u hostitelů, vedlejší účinky a toxicita

Přestože jsou moderní anthelmintika považována za relativně bezpečná, ošetření pomocí těchto léčiv (např. albendazol nebo mebendazol) může být doprovázeno různými vedlejšími příznaky. Nejčastěji se jedná o gastrointestinální potíže (bolest žaludku, průjem, nevolnost, zvracení), neurologické příznaky (bolesti hlavy, závratě) a alergické jevy (otoky, vyrážky, kopřivka) (Lingala a kol., 2011).

Mnohem závažnější problémy mohou způsobit některé druhy anthelmintik např. u psů. Přestože je toxicita u IVM vzácná v rámci všech živočišných druhů, neurotoxicita může

vyvstat u citlivých psů ovčáckých plemen (kolie, australský ovčák, šeltie, border kolie, bearded kolie) (Baars a kol., 2008).

Gen *mdr1* (multirezistence na léčiva) kóduje velký transmembránový protein, P-glykoprotein, který je nedílnou součástí hematoencefalitické bariéry (Mealey a kol., 2001). Jedním z mechanismů, který vede k multirezistenci na léčiva, je zvýšení činnosti systému efluxe cizorodých látek v důsledku nadměrné transmembránové exprese P-glykoproteinu kódovaného *mdr1* genem. Chemoterapeutika a ATP se váží na P-glykoprotein (Webster-Leveille a Arias, 1995). P-glykoprotein funguje jako pumpa pro transport léčiv z mozku zpátky do krve. Vzhledem k tomu, že ivermectin je substrátem pro P-glykoprotein, předpokládá se, že citliví psi mají změněnou exprese genu *mdr1* ve srovnání s nepostiženými jedinci. (Mealey a kol., 2001). Při výzkumu působení IVM u geneticky modifikovaných myší, jimž chyběl P-glykoprotein, se IVM hromadil v mozku a způsoboval neurotoxicitu (Roulet a kol., 2003).

Mezi projevy toxikózy patří rozšíření zřítelnic, ataxie, ulehnutí, může následovat smrt. Výzkumy však bylo zjištěno, že citlivá plemena tolerují i dávku 50 µg/kg, což je téměř 10krát vyšší dávka než doporučená terapeutická (Canga a kol., 2009). V rámci profylaxe srdečních červů psů je tedy možné podávat ivermectin i jedincům, kteří jsou z genetických linií, definovaných jako IMV citlivé, kdy se podává orálně 6 µg kg<sup>-1</sup> (Shoop a kol., 1995).

### 3.2 Rezistence na anthelmintika

V současné době jsou v profylaxi a léčbě parazitárních infekcí hospodářských zvířat používána moderní širokospektrá anthelmintika. Původci těchto infekčních chorob, kteří jsou pravidelně vystavováni terapeutickým dávkám, mají tendenci postupně rozvíjet odolnost proti těmto léčivům. Rezistence je definována jako schopnost parazitů přežít léčbu doporučenými dávkami anthelmintik a vyhnout se toxickým účinkům léků po opakovaném podání, oproti jiným jedincům, kteří vůči terapeutikům zůstávají citliví. Tato schopnost je založena geneticky. Jak je možno pozorovat u antibiotik, může nadužívání anthelmintik vést k podobnému vývoji rezistence u cílových organismů (Várady a kol., 2011).

Rezistenci je možné pozorovat u virů, bakterií, členovců, protozoí, rakovinných buněk a helmintů (Sangster, 2001). Odolnost vůči chemoterapeutickým léčivům se postupně

rozrostla z jeho poněkud sporadického výskytu na počátku 60. let do současného stavu, kdy rezistence ohrožuje udržitelnost mnoha intenzivních systémů chovu.

V současné době se problém rezistence vyskytuje u několika skupin helmintů a hrozbou se stala především u malých přežvýkavců infikovaných gastrointestinálními hlísty čeledi Trichostrongylidae. *Haemonchus contortus*, parazitující ve slezu malých přežvýkavců, byl prvním druhem, u něhož byla detekována rezistence na anthelmintika (Várady a kol., 2011).

Rezistentní jedinci o tuto schopnost během svého života již nepřijdou (Sangster, 2001), naopak ji předávají pomocí genů svým potomkům. Pro další využití dnes dostupných anthelmintik je nezbytné vytvořit účinné strategie, které by pomohly minimalizovat vliv rezistence. Především je nutné ještě lépe porozumět podstatě biologie parazitů a systému, jakým rezistence vzniká. Dále je třeba zaměřit se na alternativní možnosti kontroly v chovech, zejména u nejvíce postižených chovů malých přežvýkavců. Dnes je rezistence známá u všech hlavních skupin širokospektrálních anthelmintik, mezi něž spadají benzimidazoly, levamisol, avermectiny (ivermectin, doramectin) a milbemyciny (moxidectin). Rezistence byla však detekována i u úzce zaměřených anthelmintik, např. closantelu. Tento fakt je alarmující zejména pro zemědělce, kterým snižuje příjmy, neboť odolnost je spojená se zvýšenými náklady na opakovanou léčbu, snížením produktivity zvířat a úrovně jejich životních podmínek (Wolstenholme a kol., 2004).

Rezistence vůči moderním širokospektrálním anthelmintikům byla evidována nedlouho po jejich zavedení, vyvíjela se prakticky ve stejném pořadí, v jakém byly léky vyvinuty a uvedeny na trh. V případě prvního široce rozšířeného anthelmintika phenothiazinu, které bylo zavedeno v roce 1940, byla rezistence detekována v roce 1957. U thiabendazolu to bylo dokonce 3 roky po jeho zavedení, tedy v roce 1964. Stejná situace nastala u levamisolu (vznik 1970, výskyt rezistence 1979), ivermectinu (1981, rezistence 1985) a moxidectinu (1991, rezistence 1995) (James a kol. 2009; Le Jambre a kol., 1995).



### 3.2.1 Mechanismus rezistence

Poznatky o mechanismu rezistence na anthelmintika jsou k dispozici pro antimikrotubulové látky, nikotinové agonisty, makrocyclické laktony a oxamniquine (Köhler, 2001). Intenzivní využívání těchto anthelmintik vedlo k selekci na rezistenci v cílových populacích a omezuje další používání léků (Demeler a kol., 2010).

U dvou ze tří hlavních skupin anthelmintik, avermectinů působících na glutamáto-chloridové kanály a levamisolu patřícímu mezi nikotinové agonisty, jejichž terapeutický účinek je zaměřen na ligandem řízené membránové iontové kanály helmintů, je vzhledem k vlastnostem jejich působení možno použít elektrofyzilogické metody k prozkoumání vlastnosti kanálů, vlivu anthelmintik a změny v receptorech spojených s rezistencí na anthelmintika (Martin a kol., 1998).

Podstatným faktorem pro rozvoj rezistence je genetická rozmanitost selektované populace helmintů. Samotné vystavení léčivům nevytváří odolné organismy, ale selektuje pro přežití jednotlivce nesoucí alelu genu nebo genů, která snižuje citlivost vůči léčivu. Rezistence se tedy může rozvinout pouze v případě, že je daná alela přítomna v léčené populaci. U druhů, které jsou geneticky rozmanitější, tedy existuje vyšší pravděpodobnost vzniku rezistence, neboť můžeme předpokládat, že potřebná alela pro vznik rezistence je přítomna v léčené populaci. (Geary a kol., 1999).

Za předpokladu, že genetické predispozice k rozvoji rezistence se vyskytují v populaci, existují další dvě podmínky, které jsou nezbytné pro to, aby se rezistence rozvíjela. První z nich je selekce na rezistenci léčivy a druhá je schopnost rezistentních parazitů úspěšně se množit, najít hostitele a dokončit svůj vývoj (Sangster, 2001).

Dnešní výzkum v oblasti parazitologie se zaměřuje primárně na odhalení a výzkum genů zapojených aktivně do systému rezistence a provádění experimentálních prací pro testování hypotézy. Většina této experimentální práce se týkala hledání spojitostí fenotypu rezistence a polymorfismu v uvedených genech. To se provádí buď porovnáním rezistentní a citlivé populace nebo umělou selekcí rezistence během experimentální infekce.

Nejpozoruhodnějším počinem této metody byla identifikace izotypu 1b tubulinového lokusu jako hlavní příčina rezistence na BZ u *Haemonchus contortus* (Gilleard, 2006).

Toto vedlo k mnoha dalším studiím, které potvrdily tento lokus jako hlavní příčinu rezistence na BZ u jiných parazitujících hlístic.

Fenotypově se odolní helminté se vyznačují ztrátou vysoké afinity vazebného místa pro tyto léky na bílkovině podjednotky mikrotubulů (Lacey, 1988). Molekulární podstata rezistence BZ se týká změny v genu  $\beta$ -tubulinu, který je cílovým místem pro BZ (Elard a kol., 1996). Elard a Humbert (1999) ve svém výzkumu prokázali, že rezistence u *Teladorsagia circumcincta*, helminta parazitujícího u malých přežvýkavců, je spojena se selekcí jedinců, kteří se vyznačují přítomností tyrozinu (Tyr) na aminokyselině 200 isotypu 1b-tubulinu. Tato mutace se zdá být recesivní, protože pouze homozygotní jedinci (Tyr/Tyr) přežili léčbu BZ dvou rezistentních populací, ve které byly původně přítomny tři genotypy (Rr, rs, ss). Homozygoti (Phe/Phe) a heterozygoti (Phe/Tyr) léčbu nepřežili. Vývoj rezistence na BZ znamená minimálně dva kroky na samostatných lokusech  $\beta$ -tubulinu, počáteční ztráta citlivosti na izotopu lokusu 1 (nízká až střední úroveň rezistence), následuje selekce jedinců, ztráta na izotypu lokusu 2 (vysoká hladina rezistence) (Roos a kol., 1996).

Mezi faktory, které významně ovlivňují rozvoj rezistence patří počet helmintů v refugiu, frekvence genů zodpovědných za rezistenci v neléčené populaci, skutečnost, zda je rezistence dominantní nebo recesivní, biologická fitness rezistentních helmintů v porovnání s vnímavými populacemi (Coles, 2005).

Nejvíce prostudována je rezistence trichostrongyloidů (*H. contortus*) u ovcí, kde došlo k rozvoji odolnosti vůči všem hlavním třídám anthelmintik. Prevalence rezistence se postupně zvyšuje a nyní má 90 % farem zabývajících se chovem ovcí problém s přítomností rezistence. Léčiva, která měla kdysi téměř 100 % spolehlivost účinku v léčbě, nyní vykazují úspěšnost v rozmezí 0 – 70 %. Tento problém je tak závažný, že v některých částech jižní Afriky, kde jsou endemické regiony *H. contortus*, bylo pro další neudržitelnost nutno skončit s chovem. Přesto, existují parazité a léčiva, u kterých je rezistence dosud vzácná. Například, levamisol (LEV) zůstává účinný vůči *H. contortus* a také IVM zůstává účinný vůči *Trichostrongylus* ve většině regionů. Na druhé straně, rezistence u populací se těžko vrátí k citlivosti, takže situace se jen těžko může zlepšit (Sangster, 2001).

Velkou komplikací je tzv. zkrřížená rezistence, která vzniká v případě, že mechanismus rezistence na několik léčiv je stejný. Toto je způsobeno shodnými genetickými mutacemi.

V každém případě se zkřížená rezistence objeví za působení jednoho léku a může generovat odolnost proti jednomu dalšímu či více lékům, kterým však patogen nebyl původně vystaven.

Dalšími mechanismy, které jsou někdy označovány jako nescifické, jsou tzv. bezreceptorové mechanismy. Zahrnují pozměněné hladiny enzymů zapojených do metabolismu léčiv, transportního mechanismu, jenž upravuje následnou koncentraci léčiva, která dosáhne efektorového místa na receptoru. Může se jednat o eflux léčiva z buněk, obsahující receptory, zhoršenou absorpci, zvýšený metabolismus léků a jejich inaktivace. Tyto mechanismy mohou ovlivnit farmaceutika z jiné chemické skupiny nebo dokonce léčiv jiného způsobu účinku (Lespine a kol., 2011)

### 3.2.2 Rezistence na hlavní skupiny anthelmintik

#### 3.2.2.1 Benzimidazoly

Benzimidazoly jsou účinná a širokospektrá anthelmintika, která se selektivně váží na mikrotubuly, jež rozrušují. Odolnost vůči BZ se však rychle vyvinula do dnešních rozměrů. Je způsobena genetickými změnami v genech kódujících  $\beta$ -tubulin, podjednotky mikrotubulů. (Blackhall a kol., 2008).  $\beta$ -tubulin se liší ve své reakci na tubulinové inhibitory, parazitární tubulin váže BZ více než savčí. Zdá se, že ztráta vazebné afinity tubulinu vede v populaci parazitů k vytvoření rezistence. (Sangster, 2002).

Rezistence BZ u *Haemonchus contortus* je spojena především s mutací genu izotypu podjednotky  $\beta$ -tubulinu, kdy fenylalanin (Phe) nahrazuje tyrosin (Tyr) na kodonu 200 genu (Tiwari a kol., 2006).

#### 3.2.2.2 Makrocyclické laktony

Od svého uvedení v roce 1981 IVM získal široké přijetí a využití jako silné a účinné anthelmintikum pro kontrolu hlístic. Rezistence vůči IVM byla poprvé potvrzena v populaci *Haemonchus contortus* u ovcí chovaných v jižní Africe, a to již v roce 1985 (Le Jambre a kol., 1995). Odolnost *Haemonchus contortus* vůči AVM korelovala s genetickými změnami v genu kódujícím P-glykoprotein, transportní protein v buněčné membráně, který má vysokou afinitu k IVM.

Substrátová specifita P-glykoproteinu je velmi široká a odolnost vůči BZM může být přizpůsobena lektiny specifickými pro P-glykoprotein (Blackhall a kol., 2008). Hlavním cílem anthelmintik AM skupiny jsou glutamát-chloridové kanály bezobratlých. Mutace v těchto kanálech a receptorech jsou spojeny s rezistencí vůči IVM, kterou můžeme pozorovat u volně žijícího druhu *Caenorhabditis elegans* a parazitující hlístice *Cooperia oncophora* (Tandon a kol., 2006).

### 3.2.2.3 Levamisol

Martin a McKenzie (1990) při výzkumech dědičnosti rezistence na anthelmintika zjistili, že odolné kmeny F1 generace *Trichostrongylus colubriformis* (vyvinuté recipročním křížením mezi citlivými a rezistentními kmeny) dědí schopnost rezistence jako recesivní znak vázaný na pohlaví. Výskyt rezistence potomků po zpětném křížení tuto hypotézu potvrdil. Ze závěru vyplývá, že rezistence je ovládána jediným genem nebo těsně propojenou skupinou genů, a zároveň naznačuje, že jiné autozomální lokusy mají zanedbatelný vliv. U *H. contortus* je rezistence autozomálně recesivní a zdá se, že je v ní zapojeno více genů. Odolnost vůči LEV je pravděpodobně založena na ztrátě cholinergního receptoru. Acetylcholinové receptory jsou obvykle uspořádány jako heteropentamerický transmembránový receptor. Dva členové pentameru jsou  $\alpha$ -podjednotky, kde každá z nich obsahuje vazebné místo pro acetylcholin. Další tři z nich tvoří iontový kanál, který při navázání agonistů jako je LEV nebo acetylcholin otevře kanál a umožní průchod kationtů. Rezistence má pravděpodobně svoji podstatu právě v těchto místech (Sangster, 2002).

### 3.2.3 Vznik rezistence

Předpokládá se, že helminté, kteří přežijí průběh léčby, jsou nejvíce odolnou částí populace. Tito jedinci poté kontaminují okolní prostředí většinou rezistentních larev pro další generace, což vede k dalšímu selekčnímu tlaku na rezistenci. Tato selekce je závislá na zastoupení rezistentních jedinců v další generaci mezi ostatními helminty a dalších, kteří nebyli vystaveni účinkům léčiv (refugium). Genetická vlastnost, která podporuje rozvoj rezistence, se stává významnou po celém světě a omezuje produkci zejména v chovu malých přežvýkavců. Vývoj rezistence představuje velkou hrozbu především pro budoucnost a využitelnost dostupných anthelmintik.

Vývoj různého stupně rezistence helmintů byl hlášen pro všechny hlavní skupiny terapeutik. Proto je důležitá spolehlivá detekce, aby bylo možné navrhnout vhodný

management kontroly helmintů a oddálit rozvoj rezistence. Zachování parazitů v refugiu (neošetřená část populace), kteří nebyli vystaveni anthelmintikům, se zdá být klíčovým bodem v boji s rezistencí, protože tito jedinci jsou geneticky citliví. Bohužel, žádná z nechemických metod pro kontrolu parazitů, např. výživa, vakcíny, plemena rezistentní vůči určitým druhům parazitů, není natolik účinná, aby mohla nahradit chemoterapii anthelmintiky (Papadoupolos, 2008).

### 3.2.4 Rezistence u jednotlivých druhů hostitelů

#### 3.2.4.1 Přežvýkavci

Rezistence na anthelmintika je nejvíce rozšířeným problémem u malých přežvýkavců, zejména ovcí. Rezistence ovlivňuje regulaci onemocnění způsobené trichostrongylidy u ovcí (Sangster, 1998). V Brazílii, kde je vysoká prevalence rezistence v chovech ovcí, je nejzávažnějším problémem AR u druhů *Haemonchus contortus*, který se vyskytuje zejména během letních měsíců, další nejčastější druhy *Trichostrongylus* a *Teladorsagia circumcincta* naopak dominují v zimních a jarních měsících (Echevarria a kol., 1996). U skotu byla detekována rezistence u *Haemonchus* a *Cooperia* v Brazílii (Anziani a kol., 2004).

Přestože se zdá, že rezistence u skotu se vyvíjí pomaleji než u hlístic malých přežvýkavců, z výzkumů posledních let vyplývá, že má stupňující se tendenci.

Rezistence byla v posledních letech hlášena u všech tří skupin širokospektrálních anthelmintik a nejméně deseti druhů nematod. Toto může znamenat vzestup výskytu rezistence po celém světě, zvýšení testování přítomnosti rezistence nebo obou těchto faktorů.

V některých oblastech se prevalence rezistence ukázala být velmi vysoká. Nejvíce případů bylo hlášeno v Jižní Americe (Argentina, Brazílie), Nového Zélandu, několik případů se také vyskytlo v Evropě (UK, Belgie, Švédsko), ale také v USA nebo Indii. Zastoupeny byly všechny tři hlavní způsoby podání (injekční, orální, pour-on forma). U druhu *Cooperia* spp. byla detekována rezistence vůči ML a také BZ. Je zajímavé, že i přes relativně řídké se vyskytující rezistentní populace u skotu, existují četné případy, které zahrnují druhy rezistentní vůči více než jedné skupin anthelmintik (Sutherland a Leathwick, 2011).

#### 3.2.4.2 Koně

Cyathostomy jsou v současné době kontrolovány pomocí léčiv spadajících do tří různých skupin – BZ, tetrahydropyrimidiny, avermektiny/milbemyciny (Matthews a kol., 2011). Avermektiny a milbemyciny jsou silné látky proti všem hlavním hlísticím, ale jejich trvalé použití vedlo k vývoji rozšířené rezistence, nejprve u přežvýkavců a parazitů koní, s výjimkou cyathostom, u nichž byla rezistence zaznamenána teprve nedávno, po desetiletích používání. Údaje o vyvinutí rezistence u cyathostom pocházejí z brazilské studie, další zprávy o výskytu rezistence pocházejí z USA a Německa. Množství informací o rozsahu tohoto problému je však malé (Molento a kol. 2012). Zkřížená rezistence nebyla u koní hlášena (Wescott, 1987). U koní je rozšířená rezistence vůči benzimidazolům a pyrantelu, zejména v USA (Coles a kol., 2006).

Velcí strongylidé způsobují u koní velké problémy, infekce může mít část fatální následky. Zástupci *S. vulgaris*, *S. equinus* a *S. edentatus* mohou migrací v hostiteli způsobit ucpání cév a tím jej zahubit. Vzhledem k závažnosti tohoto onemocnění je důležité zaměřit se na výzkum problému rezistence, která je u koní velmi rozšířená (Brady a Wade, 2009) a vyvinout inovativní kontrolní programy, které budou méně závislé na léčivech (Lyons a kol., 1999).

#### 3.2.4.3 Psi

Kopp a kol. (2007) identifikovali rezistenci měchovce *Ancylostoma caninum* vůči pyrantelu v Austrálii, kdy účinnost proti tomuto parazitu byla pouhých 25,7 %. Vznikající rezistence tohoto druhu je rozvíjející se problém veterinární praxe. Hlášena byla také rezistence vůči ML u *Dirofilaria immitis* (Prichard, 2005). Terapeutika použitelná v profylaxi srdečních červů se dostala na trh v roce 1977, kdy se začal používat diethylcarbamazin na denní bázi. O desetiletí později již byla dostupná anthelmintika ze skupiny ML.

První známky o neúčinnosti se začaly objevovat v roce 1998. Zpočátku se předpokládalo, že je to způsobeno pouze špatným použitím léčiva a nedodržením doporučených postupů chovatelem (Hampshire, 2005). Problém rezistence přitahuje značnou pozornost. Rezistentní populace *D. immitis* se vyznačuje nukleotidovou polymorfií genu kódujícím P-glykoprotein, složený z homozygotních reziduí guanosinu na 2 místech (GG-GG genotyp) (Geary a kol., 2011).

#### 3.2.4.4 Prasata

Kontrola parazitů u prasat je prováděna častým používáním anthelmintik, přesto rezistence není tak rozšířená jako u jiných druhů hospodářských zvířat. Doposud byly hlášeny případy výskytu AR v chovech v Dánsku a v Německu u populací *Ascaris suum* (Theodoropoulos a kol., 2001).

### 3.2.5 Výskyt rezistence

Rezistence je prakticky všudypřítomná, přičemž nejvyšší prevalence je v oblastech s rozvinutým extenzivním chovem hospodářských zvířat, nejčastěji ovcí, tedy v Austrálii, Jižní Americe, Africe a na Novém Zélandu (Sangster a kol., 2002). Rezistence u ovcí, koz a koní byla hlášena ze všech kontinentů. Přestože situace u skotu není tak kritická jako u výše uvedených druhů, je třeba mít se na pozoru, neboť již několik případů bylo hlášeno z několika zemí. U prasat byly zaznamenány případy v Dánsku a Německu. V některých zemích se stávají ekonomické důsledky AR mnohem výraznější, neboť ziskové zemědělství již není možné. Mimo vrozené odolnosti daných helmintů výrazně přispělo k rozvoji AR nekontrolované používání anthelmintik, zejména u ovcí, koz a koní (Borgsteede, 1998). Závěry výzkumu Echevarria a kol. (1996) prokazují prevalenci rezistence vůči třem hlavním skupinám anthelmintik (BZ, LEV, IVM) v Brazílii v chovech ovcí od 20 % do 90 %.

Výskyt rezistence na anthelmintika 27 ovčích farem na Slovensku byl zkoumán v roce 2003 a 2004 (Čerňanská a kol., 2006) pomocí testu FECRT podle pokynů WAAVP. Odolnost proti albendazolu byla zjištěna na jedné farmě, rezistence vůči ivermectinu byla testována na 26 farmách. U šesti farem výsledky poukazyvaly na přítomnost rezistence. První záznamy o rezistenci v ČR pochází z výzkumu ve vybraných chovech ovcí, koní a skotu (Chroust, 1998). K detekci byl použit test FECRT a EHA v případě benzimidazolu. V případě ovcí byla rezistence potvrzena u levamisolu a fenbendazolu s účinností 67,8 % a 83,7 %. Rezistentní helminti byli definováni jako druhy *Ostertagia* spp. a *Trichostrongylus* spp. V chovech koní byla rezistence zjištěna u malých strongylidů vůči mebendazolu a fenbendazolu s hodnotami 61,5 % a 84,1 %. U skotu nebyla rezistence zjištěna.

### 3.2.6 Metody detekce rezistence

Vznik a šíření rezistence na anthelmintika po celém světě vedly k nutnosti vývoje několika *in vitro* a *in vivo* metod pro detekci rezistence. Obecně platí, že *in vivo* techniky jsou poměrně časově a finančně náročné a často se vyznačují nízkou reprodukovatelností výsledků

(přesnost a interpretace), které mohou být způsobeny farmakodynamikou léčiv u léčených zvířat (Várady, 2011).

Pro stanovení rozsahu problému rezistence jsou třeba spolehlivé testy. Podrobný přehled testů a doporučený způsob jejich provedení přinesl Coles (1992) v metodách WAAVP. Nejvíce využívaným je test FECRT (Coles, 1995). Nicméně, náklady spojené s touto metodou vedly k rozvoji *in vitro* testů (Douch a Morum, 1994). Dva z nich, které jsou často nejvyužívanější, jsou test líhnutí vajíček (EHT - Eggs hatch test) a test larválního vývoje (LDT - Larval Development Test). U testu EHT je zkoumáno procentuální množství vajíček vyvíjejících se v roztoku thiabendazolu. V testu LDT je pozorován vývoj vajíček do třetího infekčního vývojového stádia. Na rozdíl od testu EHT, LDT může probíhat s různými skupinami anthelmintik. K výraznému zlepšení citlivosti dochází u použití polymerázové řetězové reakce (Polymerase chain reaction – PCR), která je nyní posuzována pro detekci rezistence na benzimidazoly (Coles, 1995)

Dalšími metodami *in vitro* jsou testy LMIT (Larval Migration Inhibition Test – test inhibice larvální migrace) a MMT test (Micromotility metr test), které byly upraveny k detekci rezistence u nematod skotu (Demeler a kol., 2010).

*In vitro* testy lze rozdělit do dvou skupin dle jejich působení na farmakologické a biochemické. Farmakologické testy působí přímo na fyziologické funkce parazitů (např. produkce vajíček nebo larev), zatímco biochemické ovlivňují biochemické procesy helmintů (vazba na larvální tubulin nebo receptory eserinu) (Várady a kol., 2011).

#### 3.2.6.1 Test *in vivo* (FECRT)

Test FECRT je nejvíce využívaným *in vivo* technikou (Várady a kol., 2007), ale je poněkud náročný na práci chovatelů, neboť je založen na opakovaném sběru vzorků výkalů a provádění počítání vajíček (Tandon a Kaplan, 2004). Jako další negativum lze uvést nízkou citlivost a finanční nákladnost (Tiwari a kol., 2006 ; Kenyon a kol., 2009). Naopak, velkou výhodou je využitelnost u všech skupin anthelmintik a jednoduchost provedení. V tomto bodě je požadována pouze schopnost testující osoby provádět počítání vajíček, či pracovat McMasterovou technikou.

K tomuto testu by měla být použita neošetřená kontrolní skupina, aby bylo možné sledovat přirozený vývoj počtu vajíček během celého testu. Tato podmínka však nebývá vždy



splnitelná v rámci provozu běžné farmy. V případě použití této metody u ovcí a koz jsou na začátku testu nejprve vybrána zvířata ve věku 3 - 6 měsíců. U zvířat starších se použijí jedinci s hodnotou EPG (počet vajíček na gram faeces) vyšší než 150. Ideální hodnota EPG je více než 200. Dovolují-li to podmínky farmy, pracuje se s 10 zvířaty ve skupině. Při prvním odběru se odebere z rekta vzorek 3 - 5 g výkalů, který je pečlivě uložen do samostatných nádob. Samotné počítání se provede pomocí McMasterovy techniky, a to co nejdříve po odběru vzorků. Není-li možné se vzorkem ihned pracovat a je nutné jej uchovat, uloží se při 4 °C nejvýše 24 hodin.

Po prvním počítání následuje vážení zvířat, které je důležité pro podání správné dávky léčiva doporučené výrobcem. Léčivo se podává orálně nejlépe pomocí stříkačky, aby bylo možné zajistit přesné dávkování. V případě, že anthelmintikum funguje efektivně, neměli by žádní parazité přežít dobu potřebnou pro vyprázdnění střev, což trvá přibližně 48 hodin. Avšak, další odběr trusu pro druhé počítání se provádí až po lhůtě, která je individuální pro každou skupinu anthelmintik a závisí tedy na tom, jaký druh jsme při ošetření použili. Časové rozmezí je tedy delší než uvedená lhůta 48 hodin, neboť v případě, že by bylo anthelmintikum zčásti efektivní, došlo by k dočasné sterilizaci samiček a potlačení produkce vajíček. Výsledek by byl tedy zkreslený a dával by nám falešnou informaci o účinnosti léčiva.

Nejkratší lhůta je u levamisolu (3 - 7 dní), následován benzimidazoly (8 - 10 dní) a makrocyclickými laktony, kde je potřeba 14 - 17 dní. Uvádí se také zjednodušená varianta tohoto požadavku – 1 týden pro skupinu levamisol (tetrahydropyrimidiny a imidazothiazoly), 1,5 týdne pro benzimidazoly a 2,5 týdne pro makrocyclické laktony (Coles, 2005). V případě využití více skupin léčiv je třeba kompromisu. Po této době by, v případě funkčnosti anthelmintika, neměla být ve výkalech přítomna žádná vajíčka. Jsou-li přítomna vajíčka, rezistentní jedinci jsou pravděpodobně přítomni. I nepatrné množství vajíček může svědčit o problému rezistence, což by při nezměněném managementu a dalším používáním stejného léčiva podpořilo vzrůst zastoupení odolných jedinců. Proto by i v tomto případě měl být další vývoj pečlivě monitorován (Coles a kol., 2006).

U tohoto testu nesmíme opomenout fakt, že pro nízkou citlivost je požadováno alespoň 25 % zastoupení rezistentních jedinců pro spolehlivý a pravdivý závěr (Martin, 1989). Rezistence nemusí být také detekována v případě nízkého množství množství helmintů ovlivněného přirozeným výskytem v závislosti na ročním období. Toto se může přihodit například u rodu *Cooperia* parazitujícím u skotu, který se vyskytuje nejčastěji na jaře

a počátkem léta, případně u rodu *Ostertagia*, který, naopak, je záležitostí pozdního léta a podzimu.

U skotu probíhá test FECRT obdobně, avšak vzhledem k nedostatečnému množství poznatků a zkušeností je třeba lépe definovat podmínky provedení, aby test byl skutečně spolehlivý.

Mnohem problematičtější je standardizace skupin u koní. S ohledem na jejich častější přesuny mezi různými stády snadno dojde k situaci, že test u dané skupiny naznačuje absenci rezistence, avšak dojde-li k selhání léčby u jednoho, či dvou jedinců, tato skutečnost může mít značný dopad na celý chov. V případě potřeby je možné provést test počítání vajíček u jednoho jedince, i když je doporučováno alespoň 6 koní pro provedení testu.

U koní je doporučována podobná metoda počítání vajíček FECPAK. V tomto testu se použije 15 – 20 g výkalů, který se v uzavřeném plastickém sáčku smíchá se čtyřmi dílky vody. Poté se odebere 45 ml vzorku do vhodné nádoby a přidá se 185 ml nasyceného solného roztoku. Obsah se prolíje přes 1 mm síto, poté se důkladným mísením vyplní obě strany sklíčka FECPAK. Hodnotí se počet přítomných vajíček, 1 vajíčko značí hodnotu 25 EPG (Coles a kol., 2006).

#### 3.2.6.2 Testy *in vitro*

Mezi testy *in vitro* patří test líhnutí vajíček (EHT Eggs hatch test), testy larválního vývoje (LDT Larval development test, MALDT Microagar larval development test), paralýzy (Larval paralysis test) a motility (Larval migration inhibition test).

Test založený na pozorování paralýzy a motility larev je efektivní pouze u léků, které ovlivňují svalovou činnost helminta. V případě parazitů trávicího ústrojí, má paralýza za následek jejich rychlé odstranění z těla hostitele. Kromě toho, je monitoring pohybu a výsledné posouzení zda je parazit živý nebo mrtvý (mnoho druhů se pohybuje neustále) snadnou metodou hodnotící účinnost anthelmintika (Wolstenholme, 2011).

Schopnost nízkých koncentrací širokospektrálních anthelmintik působit na líhnutí a motilitu je již dlouho známa (Geary a kol., 1999). Test EHT pracuje pouze s nevyvinutými vajíčky a je vhodný jen u benzimidazolů (Tandon a Kaplan, 2004), které zabraňují líhnutí vajíček (Taylor a kol., 2002).

Testy larválního vývoje a líhnutí vajíček mohou poskytnout spolehlivou alternativu k jiným testům detekce za přijatelných nákladů a ušetření lidské práce s opakovaným odběrem vzorků, který není požadován. Výhodou je možnost současného testování několika léčiv za minimálního omezení týkající se mechanismu působení léčiva. Stáří vajíček není podstatné. Test larvální paralýzy, migrace a motility DrenchRite®, který byl vyvinut v Austrálii, používá mikrotitrační destičku s jamkami obsahující anthelmintikum.

Tento test je využíván pro detekci rezistence u čtyř různých skupin anthelmintik – BZ, LEV, kombinace BZ/LEV a AVM (Tandon a Kaplan, 2004). Jamky mikrotitrační destičky se naplní deionizovanou vodou s neutrálním pH a poté je dodán thiabendazol, úroveň rezistence je určována dle použitého množství anthelmintika (0,05, 0,1, 0,2, 0,3 a 0,5 µg/ml), případně je možné použít jednu koncentraci (v případě stanovení diskriminační dávky). Do jamek se umístí čerstvá vajíčka (ne starší než 3 hodiny, případně uložená v anaerobních podmínkách), která jsou inkubována při 25 °C po 48 hodin. Do každé z jamek se přidají dvě kapky Lugolova roztoku. Poté se počítá alespoň 100 zbývajících vajíček a vylíhnutých larev. Počítá se za pomoci inverzního mikroskopu nebo se vajíčka a larvy počítají na mikroskopickém sklíčku, či Petriho misce.

Testy larválního vývoje (Microagar larval development test, larval development test), podobné komerčně využívanému DrenchRite®, jsou použitelné pro BZ a LEV, u ML a salicylanilidů byly pozorovány určité problémy (Waller, 1997). U tohoto testu není stáří vajíček rozhodující. Podstatou těchto testů je sledování vývoje vajíček do třetího larválního stádia L<sub>3</sub>. Při tomto testu je možné určit druh testovaných helmintů. Diskriminační dávky, jejichž použití zvyšuje citlivost testu, jsou stanoveny pro hlístice ovcí a koní, případně mohou být použity hodnoty LD<sub>50</sub> a LD<sub>95</sub> (koncentrace brání 50 %/95 % vajíček) (Coles a kol., 2006).

Test larvální paralýzy (Larval paralysis test), který byl jako první zaveden pro detekci rezistence LEV a morantel-tartátu, určuje procento ochrnutých larev L<sub>3</sub> stádia vystavených *in vitro* roztokům anthelmintik. Dalším testem zaměřeným na pohyblivost larev je test inhibice migrace larev (Migration-Inhibition Assay) (Waller, 1997).

### 3.2.6.3 PCR test

Použití molekulárních metod pro detekci rezistence není bohužel v současné době možnou alternativou pro ostatní testy, neboť znalosti o molekulárních mechanismech rezistence jsou stále omezené, a to zejména u BZ. Biochemické testy také nejsou k dispozici

pro většinu léků a nejsou prakticky snadno proveditelné pro běžné podmínky, jelikož vyžadují velké množství vzorků helmintů (Tandon a Kaplan, 2004).

PCR (Polymerase Chain Reaction) test má výhodu nad ostatními testy zejména ve specifitě, citlivosti, rychlém výsledkům a menším nákladům. Určuje stav rezistence na základě jejich genotypů (rr, rS a SS), zatímco *in vivo* a *in vitro* testy pouze poskytují informaci, zda je parazit rezistentní, či nikoliv (Tiwari a kol., 2007)

Test na bázi PCR může být použit k detekci BZ rezistentních hlístic ovcí, ale pokud se jedná o jinou mutaci, než na pozici 200 v  $\beta$ -tubulinu, aktuální testy nezjistí rezistenci. Pro rutinní použití PCR testu jsou nezbytné ještě další výzkumy v této oblasti (Coles a kol., 2006).

### 3.2.7 Prevence rezistence

Řada obtíží spojená s vývinem a zaváděním nechemických prostředků pro kontrolu parazitů přispěla k nadměrné závislosti na chemoterapii a tuto situaci ještě stěžuje rozvoj rezistence na zavedená léčiva (Sangster, 2001). Se šířením rezistence vůči všem hlavním skupinám širokospektrálních anthelmintik roste poptávka po nových účinných léčivech. Schopnost vývoje nových léčiv farmaceutickým průmyslem je však oproti minulosti poněkud omezena. Výrazně se snížil počet společností, které se věnují výzkumu nových léčiv. Prodej veterinárních léků a očkovacích látek tvoří pouze malé procento oproti humánním léčivům a s výjimkou případů v zájmových chovech se použití léčiv řídí otázkou nákladů a výnosů (Coles, 2001).

Zavedení přístupů, které by byly méně závislé na chemických anthelmintikách je mnohem obtížnější pro realizaci. Některé z problémů, které komplikují rozvoj vhodných strategií kontroly parazitů na úrovni farem jsou rozdíly v regionální a místní rozšíření parazitů, místní klima, epidemiologie parazitů, velikost stáda, management chovu (Kaplan a Vidyashankar, 2012).

Zkušenosti s rezistencí ukázaly, že se vyvíjí nejprve pozvolna a postupem času stoupá relativně rychle. Toto je dáno akumulací genů způsobující rezistenci, kdy dojde k selhání léčby. Je pravděpodobné, že geny pro rezistenci jsou přítomny v mnoha populacích helmintů nebo proces je způsoben jednoduchou mutací genu zodpovědného za rezistenci. Protože geny rezistence jsou snadno selektovány při ošetření, je důležité toto zohlednit při managementu

snížení rezistence. K tomu patří snížení selekce citlivých jedinců, kteří v další generaci rozmělní geny rezistence ve prospěch zachování citlivosti na anthelmintika v rámci populace parazita (Sangster, 1999).

Časté ošetření, poddávkování, používání jednoho typu anthelmintika způsobuje, že jsou vyselektovány populace s genotypem, které vyjadřují rezistenci k účinku léčiva (Elard a kol., 1996). Je důležité nepodceňovat význam detekce rezistence a sdílení dat mezi státy a regiony výskytu. Ve vývoji detekčních testů byl, od jejich první publikace v roce 1992 (Coles, 1992) skutečně pouze malý pokrok. Dosud neexistují platné testy, běžně používané u nematod, které by bylo lze použít u motolic a tasemnic (Coles a kol., 2006). Management rezistence vyžaduje zejména citlivé testy ke spolehlivé detekci rezistence. S tímto souvisí také znalost molekulární podstaty rezistence (Coles, 2001).

V rámci profylaxe helmintů u ovcí se používá metoda kombinace anthelmintik s podobným spektrem účinnosti a různými mechanismy akce a rezistence. Tato metoda zajišťuje účinnou kontrolu v případě jednoduché rezistence nebo multirezistence, případně zpomaluje její rozvoj k určitým skupinám (Bartram a kol., in press).

Míra rozvoje rezistence úzce souvisí s úrovní refugia v populaci parazita v době provádění léčby. Refugia jsou část populace helmintů, která v minulosti nepřišla do styku s léčivem a je tedy vůči němu citlivá. V případě velkého zastoupení refugia dojde ke snížení selekčního tlaku pro rezistenci a v další generaci k nařazení genů způsobujících odolnost, což může zvýšit další úspěšnost léčby. Refugia zahrnují neošetřené parazity, stádia parazitů v hostiteli, která nebyla ovlivněna léčbou a volně žijící stádia ve vnějším prostředí. Využití refugia v managementu rezistence je proto považováno za podstatné ke snížení míry prevalence a zachování účinnosti léčiv po dlouhou dobu. Nicméně, aplikace konceptu refugia pro praktické využití vyžaduje změny stávajících režimů chovu, nutnost povědomí o faktorech, které mají vliv na použitelnost jednotlivých přístupů. Pro zavedení této strategie jsou důležité podmínky chovu, vliv prostředí, druh parazita, výrobní cíle a finanční zdroje daného chovatele.

Strategie na bázi refugia obvykle zahrnuje změny v pastevním režimu nebo zavedení selektivní péče, kdy některá zvířata zůstanou neošetřena. V případě přežití velkého množství jedinců je však důležité dosáhnout rovnováhy mezi úspěšností této strategie a možných nepříznivých dopadů z nadměrného zamoření parazity, zejména u neošetřených jedinců.

Velký problém by mohl být v podnicích úzce zaměřených na maximální produkci, kde je kladen zvláštní důraz na efektivní kontrolu parazitů. Tento přístup však opět zvyšuje riziko vzniku rezistence (Knox a kol., 2012, Besier, 2012). Strategie kontroly parazitů vyžaduje načasování ošetření na základě aktuálního rozšíření parazita podle ročního období a také předcházet kontaminaci pastvy dalšími vajíčky a larvami parazitů (Besier, 2012).

V rámci chovu koní a obrany proti rezistenci je velký důraz kladen na management chovu. V první řadě je doporučováno zamezit kontaminaci pastvin a vody hnojem, který je primárním zdrojem infekce. Další doporučovanou metodou je rotace pastvin, kdy jsou pastviny po určitou část roku nevyžívané (alespoň několik měsíců), aby larvy nepřežily, případně se na nich koně střídají s jinými druhy. Výhodné je střídání s přežvýkavci, protože při pozření larválních parazitů jiné hostitelské kategorie (skot x koně), nedojde k rozvinutí infekce, ale zahubení parazita. Tento systém funguje dobře, s výjimkou přítomnosti parazita *Trichostrongylus axei*, který je hostitelsky nespecifický a tudíž by mohlo dojít k nákaze koní vysokým počtem larev, který pochází z přežvýkavců, zejména skotu. (Lyons a kol., 1999). Rotace na pastvinách byla vždy záležitostí produkčního chovu ovcí, který se používal k minimalizaci napadení helminty po více jak 40 let. Přestože je tento systém významnou zbraní proti helmintům, jeho využití je omezeno požadavkem na znalost podmínek hospodářství a tamním výskytu helmintů.

Chovatelé se také mohou zaměřit na jedince, kteří jsou odolní vůči parazitárním infekcím a jsou schopni v chovu geneticky upevňovat účinnou imunitní odpověď proti helmintům. V několika zemích je již možné vybírat jedince dle plemenných hodnot zahrnujících údaje na základě FECRT testů (Jackson a kol., 2009). V Brazílii, kde je extrémní výskyt rezistence, je používána metoda FAMACHA<sup>®</sup> sloužící k identifikaci jedinců, kteří jsou odolní nebo citliví k *Haemonchus contortus* (Molento a kol., 2009).

V rámci chemoterapie se při rezistenci používá kombinace anthelmintik, což může zvýšit jejich účinnost. Tuto hypotézu potvrdili Leathwick a kol. (in press) v testech provedených u ovcí. Kombinace IVM a LEV v testu vykazovala vyšší účinnost, než použití samotného ivermectinu.

Obecně je proti rozvoji rezistence doporučováno několik zásad (Borgsteede, 1998, Lyons a kol., 1999). V první řadě je důležité snížit frekvenci ošetření anthelmintiky. Pastviny je třeba udržovat v optimální čistotě, zajišťovat pravidelný odklíz výkalů (nejméně 1 krát

za dva dny), také je možné vláčet pastviny, což napomáhá rozrušitv výkaly a vajíčka jsou tak vystavena nepříznivým podmínkám a vyschnutí. V případě vlhkého počasí však dosáhneme opaku, kdy budou vajíčka pravidelně roz distribuována po celé pastvině.

Nová zvířata je třeba nejprve držet odděleně v karanténě a provést u nich účinnou dehelmintizaci vhodnými přípravky (důležité zejména u koní, vzhledem k jejich častým přesunům mezi stájemi). Stanovení správné dávky léčiv je nutné přizpůsobit váze zvířete, za současného dodržení doporučení výrobce, je lépe mírně předávkovat léčivem, než poddávkovat. Nedostatečnou dávkou se pouze docílí toho, že někteří jedinci přežijí a vznikne nová rezistentní populace. U velkých zvířat může nastat problém se stanovením hmotnosti, není-li dostupná vhodná váha. Toto lze orientačně nahradit použitím různých pásek (např. u koní) s odhadem hmotnosti. Léčiva se musí používat pouze ze spolehlivého původu, zařízení používaná k léčbě je nutné udržovat v optimálním stavu a čistotě.

V chovu koz je třeba dbát faktu, že je třeba užít vyšší dávky než u ovcí, také je doporučeno vyvarovat se smíšené pastvy ovcí a koz. Je-li to technicky možné, je vhodné provést alespoň jednou ročně test na detekci AR (FECRT).

#### 4. Závěr

Rezistence vůči léčivům je velkým problémem, který naznačuje silně vzrůstající tendenci. Také rezistence vůči anthelmintikům se značně šíří, a to již od počátku zavedení moderních anthelmintik. Aby chov hospodářských zvířat byl i nadále udržitelný na přijatelné úrovni produkce a zejména byly dodrženy podmínky welfare zvířat, je nezbytné pokračovat v průzkumech této oblasti.

Proces rozvoje rezistence je nevratný, přesto je možné dosáhnout dalšího pokroku v rozvoji metod detekce, u nichž je kladen důraz především na jejich jednoduchost a cenovou dostupnost, aby je snadno mohli používat přímo chovatelé. Spolehlivá detekce je klíčovým momentem, od něhož se vyvíjejí další postupy v boji s rezistencí. Nezbytným bodem je také vývoj alternativních prostředků a strategií v boji proti parazitům bez závislosti na chemoterapii.

Přestože rezistence u psů není příliš rozšířená, je třeba, s ohledem na poznatky a zkušenosti u jiných druhů zvířat (zejména malých přežvýkavců, kde je problém nejzávažnější) předvídat možný nárůst. Rezistence parazitů u psů se totiž velmi úzce dotýká lidí, neboť psi jsou častými přenašeči původců helmintóz u lidí. Představíme-li si provázaný život lidské populace s domácími zvířaty, mohl by se rozvoj rezistence více dotknout humánní medicíny.

V oblasti problematiky rezistence vůči helmintům byl učiněn značný pokrok, avšak vzhledem k rychlému rozvoji odolnosti parazitů jsou nezbytné další výzkumy, aby produkční chovy zvířat v rizikových oblastech byly i nadále udržitelné.



## 5. Seznam použité literatury

Anziani O. S., Suarez V., Guglielmone A. A., Warnke O., Grande H., Coles G. C. 2004. Resistance to benzimidazole and macrocyclic lactone in cattle nematodes in Argentina. *Veterinary Parasitology*. 122. 303-306.

Baars C., Leeb T., Klopmann T., Tipold A., Potschka H. 2008. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional MDR1 polymorphism in dogs. *The Veterinary Journal*. 177. 394-397.

Bartram D. J., Leathwick D. M., Taylor M. A., Geurden T., Maeder S. J. 2011. The role of combination anthelmintic formulations in the sustainable control of sheep nematodes. *Veterinary Parasitology*. In press.

Bennet-Jenkins E., Bryant C. 1996. Novel Sources of Anthelmintics. *International Journal for Parasitology*. 26. 937-947.

Berrieman K. H., Lind M. J., Cawkwell L. 2004. Do  $\beta$ -tubulin mutations have a role in resistance to chemotherapy?. *The Lancet Oncology*. 5. 158-164.

Besier R. B. 2012. Refugia-based strategies for sustainable worm control: Factors affecting the acceptability to sheep and goat owners. *Veterinary Parasitology*. 186. 2-9.

Blackhall W. J., Liu H. Y., Prichard R. K., Beech R. N. 2008. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. *Veterinary Parasitology*. 152. 101-107.

Borgsteede F. H. M. 1998. Gastrointestinal helminthiasis: anthelmintic resistance and how to prevent and control. *Parasitology International*. 47. 23-48.

Brady H. A., Wade T. N. 2009. Drug resistance in Equine parasites: an emerging global problem. *Journal of Equine Veterinary Science*. 29. 285-295.

Cañete R., Escobedo A. A., Almirall P., Gonzáles M. E., Brito K., Cimerman S. 2009. Mebendazole in parasitic infections other than those caused by soil-transmitted helminths. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 103. 437-442.

Canga A. G., Prieto A. M. S., Liébana J. D., Martínez N. F., Vega M. S., Vieitez J. J. G. 2009. The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species. *The Veterinary Journal*. 179. 25-37.

Coles G. C. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 44. 35-44.

Coles G. C. 1995. Chemotherapy of human nematodes: learning from the problems in sheep. *Journal of the Royal society of medicine*. 88. 649-651.

Coles G. C. 2001. The future of veterinary parasitology. *Veterinary Parasitology*. 98. 31-39.

Coles G. C. 2005. Anthelmintic resistance – looking to the future: a UK perspective. 78. 99-108.

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

Demeler J., Küttler U., Samson-Himmelstjerna G. 2010. Adaptation and evaluation of three different in vitro tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. *Veterinary Parasitology*. 170. 61-70.

Douch P. G. C. a Morum P. E. 1994. The effects of anthelmintics on ovine larval nematode parasite migration in vitro. *International Journal for Parasitology*. 24. 321-326.

Dupuy J., Sutra J. F., Alvinerie M. 2007. Pharmacokinetics assessment of moxidectin long-acting formulation in cattle. *Veterinary Parasitology*. 147. 252-257.

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

Echevarria F., Borba M. F. S., Pinheiro A. C., Waller P. J., Hansen J. W. 1996. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites sheep in Southern Latin America: Brazil. *Veterinary Parasitology*. 62. 199-206.

Elard J., Humbert J. F. 1999. Importance of the position of amino acid 200 of the isotype 1b-tubulin gene in the benzimidazole resistance of the small-ruminant parasite *Teladorsagia circumcincta*. *Parasitol Resistance*. 85. 452-456.

Elard L., Cornes A. M., Humbert J. F. 1996. Sequences of  $\beta$ -tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants. *Veterinary Parasitology*. 62. 199-206.

Finkel R., Cubeddu L. X., Clark M. A. (eds.) 2009. *Pharmacology*. Lippincott Williams & Wilkins. p. 541. ISBN: 9780781771559.

Gallagher A. E., Grant D. C., Noftsinger M. N. 2008. Coma and respiratory failure due to moxidectin intoxication in a dog. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*. 18. 81-85.

- Geary T. G., Sangster N. C., Thompson D. P. 1999. Frontiers in anthelmintic pharmacology. *Veterinary Parasitology*. 84. 275-295.
- Geary T. G. , Bourguinat C., Prichard R. K. 2011. Evidence for Macrocyclic Lactone Anthelmintic Resistance in *Dirofilaria immitis*. *Topics in Companion Animal Medicine*. 4. 186-192.
- Gilleard J. S. 2006. Understanding anthelmintic resistance: The need for genomics and genetics. *International Journal for Parasitology*. 36. 1227-1239.
- Hampshire V. A. 2005. Evaluation of efficacy of heartworm preventive products at the FDA. *Veterinary Parasitology*. 133. 191-195.
- Heggen B. 2008. Therapeutic Review. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 17. 307-310.
- Horton J. 2003. Global anthelmintic chemotherapy programs: learning from history. *Trends in Parasitology*. 19. 405-409.
- Chroust K. 1998. The first occurrence of anthelmintic resistance in strongylid nematodes of sheep and horses in Czech Republic. *Parasitology International*. 47. 242.
- Ikeda H., Nonomiya T., Omura S. 2001. Organization of biosynthetic gene cluster for avermectin in *Streptomyces avermitilis*: analysis of enzymatic domains in four polyketide synthases. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 27. 170-176.
- Jackson F., Bartley D., Bartley Y., Kenyon F. 2009. Worm control in sheep in the future. 2009. *Small Ruminants Research*. 86. 40-45.
- James C. E., Hudson A. L., Davey M. W. 2009. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest?. *Trends in Parasitology*. 25. 328-335.
- Jones P. M., George A. M. 2005. Multidrug resistance in parasites: ABC transporters, P-glycoproteins and molecular modelling. *International Journal for Parasitology*. 35. 555-566.
- Kaplan R., Vidyashankar A. N. 2012. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*. 186. 70-78.
- Kenyon F., Greer A. W., Coles G. C., Cringoli G., Papadopoulos E., Cabaret J., Berrag B., Várady M., Van Wyk J. A., Thomas E., Vercruysse J., Jackson F. 2009. The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Veterinary Parasitology*. 164. 3-11.
- Knox M. R., Besier R. B., Le Jambre L. F., Kaplan R. M., Torres-Acosta J. F. J., Miller J., Sutherland I. 2012. Novel approaches for the control of helminth parasites of livestock VI: Summary of discussions and conclusions. *Veterinary Parasitology*. 186. 143-149.

- Köhler P. 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*. 31. 336-345.
- Kopp R. S., Kotze A. C., McCarthy J. S., Traub R. J., Coleman G. T. 2008. Pyrantel in small animal medicine: 30 years on. *The veterinary Journal*. 178. 177-184.
- Kopp R. S., Kotze A. C., McCarthy J. S., Coleman G. T. 2007. High-level pyrantel resistance in the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Veterinary Parasitology*. 143. 299-304.
- Kopp R. S., Coleman G. T., McCarthy J. S., Kotze A. C. 2008. Application of in vitro anthelmintic sensitivity assays to canine parasitology: Detecting resistance to pyrantel in *Ancylostoma caninum*. *Veterinary Parasitology*. 152. 284-293.
- Lacey E. 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology*. 18. 885-936.
- Le Jambre L. F., Gill J. H., Lenane I. J., Lacey E. 1995. Characterisation of an Avermectin Resistant Strain of Australian *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. 25. 691-698.
- Leathwick D. M., Waghorn T. S., Miller C. M., Candy P. M., Oliver A. M. 2012. Managing anthelmintic resistance - Use of a combination anthelmintic and leaving some lambs untreated to slow the development of resistance to ivermectin. *Veterinary Parasitology*. In Press.
- Lespine A., Ménez C., Bourguinat C., Prichard R. K. 2012. P-glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology*. 2. 58-75.
- Lingala S., Nerella R., Sambasiva Rao K. R. S. 2011. Synthesis, antimicrobial and anthelmintic activity of some novel benzimidazole derivatives. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 10. 100-105.
- Lyons E. T., Tolliver S. C., Drudge J. H. 1999. Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs. *Veterinary Parasitology*. 85. 97-112.
- MacDonald D., VanCrey K., Harrison P., Rangachari P. K., Rosenfeld J., Warren C., Sorger G., 2004, Ascaridole-less infusions of *Chenopodium ambrosioides* contain a nematocide(s) that is(are) not toxic to mammalian smooth muscle. *Journal of Ethnopharmacology*. 92. 215-221.

- Mansour T. E., Mansour MacKinnon J. 2002. Chemotherapeutic Targets in Parasites. Cambridge University Press. p. 226. ISBN: 0521620651.
- Martin P. J., Anderson N., Jarrett R. G. 1989. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. Australian Veterinary Journal. 66. 236-240.
- Martin P. J., McKenzie J. A. 1990. Levamisole resistance in *Trichostrongylus colubriformis*: a sex-linked recessive character. International Journal Parasitology. 20. 867-872.
- Martin P. J., Murray I., Robertson A. P., Bjorn H., Sanster N. 1998. Anthelmintic and ion-channels: after a puncture, use a patch. International Journal Parasitology. 28. 849-862.
- Matthews J. B., McArthur C., Robinson A., Jackson F. 2012. The in vitro diagnosis of anthelmintic resistance in cyathostomins. Veterinary Parasitology. 185. 25-31.
- McKenna P. B. 2006. Further comparison of faecal egg count reduction test procedures: Sensitivity and specificity. Veterinary Journal. 54. 365-366.
- Mealey K. L., Bentjen S. A., Gay J.M., Cantor G. H. 2001. Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene. Pharmacogenetics. 11. 727-733.
- Molento M. B., Nielsen M. K., Kaplan R. M. 2012. Resistance to avermectin/milbemycin anthelmintics in equine cyathostomins – Current situation. Veterinary Parasitology. 185. 16-24.
- Molento M. B., Gavião A. A., Depner R. A., Pires C. C. 2009. Frequency of treatment and production performance using the FAMACHA method compared with preventive control in ewes. Veterinary Parasitology. 162. 314-319.
- Mottier L., Alvarez L., Ceballos L., Lanusse C. 2006. Drug transport mechanisms in helminth parasites: Passive diffusion of benzimidazole anthelmintic. Experimental Parasitology. 113. 49-57.
- Papadopoulos E. 2008. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. Small Ruminants Research. 76. 99-103.
- Parker L. D., O'Brien D. J., Bates P. G. 1999. The use of moxidectin for the prevention and treatment of psoroptic mange (scab) in sheep. Veterinary Parasitology. 83. 301-308.

- Prichard R. K. 2005. Is anthelmintic resistance a concern for heartworm control? What can we learn from the human filariasis control programs?. *Veterinary Parasitology*. 133. 243-253.
- Robertson A. P., Bjorn H. E., Martin R. J. 2000. Pyrantel resistance alters nematode nicotinic acetylcholine receptor single-channel properties. *European Journal Pharmacology*. 394. 1-8.
- Roos M. H., Kwa M. S. G., Grant W. N. 1995. New Genetic and Practical Implications of Selection for Anthelmintic Resistance in Parasitic Nematodes. *Parasitology Today*. 1. 148-150.
- Roulet A., Puel O., Gesta S. Lepage J. F., Drag M., Soll M., Alvinerie M., Pineau T. 2003. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European Journal of Pharmacology*. 460. 85-91.
- Sangster N., Batterham P., Chapman H. D., Duraisingh M., Le Jambre L., Shirley M., Upcroft J., Upcroft P. 2002. Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. *International Journal for Parasitology*. 32. 637-653.
- Sangster N. C. 2001. Managing parasiticide resistance. *Veterinary Parasitology*. 98. 89-109.
- Sangster N. C. 1999. Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal for Parasitology*. 29. 115-124.
- Sangster N. C., Redwin J. M., Bjorn H. 1998. Inheritance of levamisole and benzimidazole resistance in an isolate of *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. 28. 503-510.
- Shoop W. L., Mrozik H., Fisher M. H. 1995. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*. 59. 139-156.
- Sutherland I. A., Leathwick D. M., 2011, Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue?, *Trends in Parasitology*, 27, 176-181
- Tandon R., Kaplan R. M., 2004, Evaluation of a larval development assay (DrenchRite®) for the detection of anthelmintic resistance in cyathostomin nematodes of horses. *Veterinary Parasitology*. 121. 125-142.
- Tandon R., LePage K. T., Kaplan R. M. 2006. Cloning and characterization of genes encoding  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of glutamate-gated chloride channel protein in *Cylicocyclus nassatus*. *Molecular and biochemical parasitology*. 150. 46-55.
- Taylor M. A., Hunt K. R., Goodyear K. L. 2002. Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*. 103. 183-194.

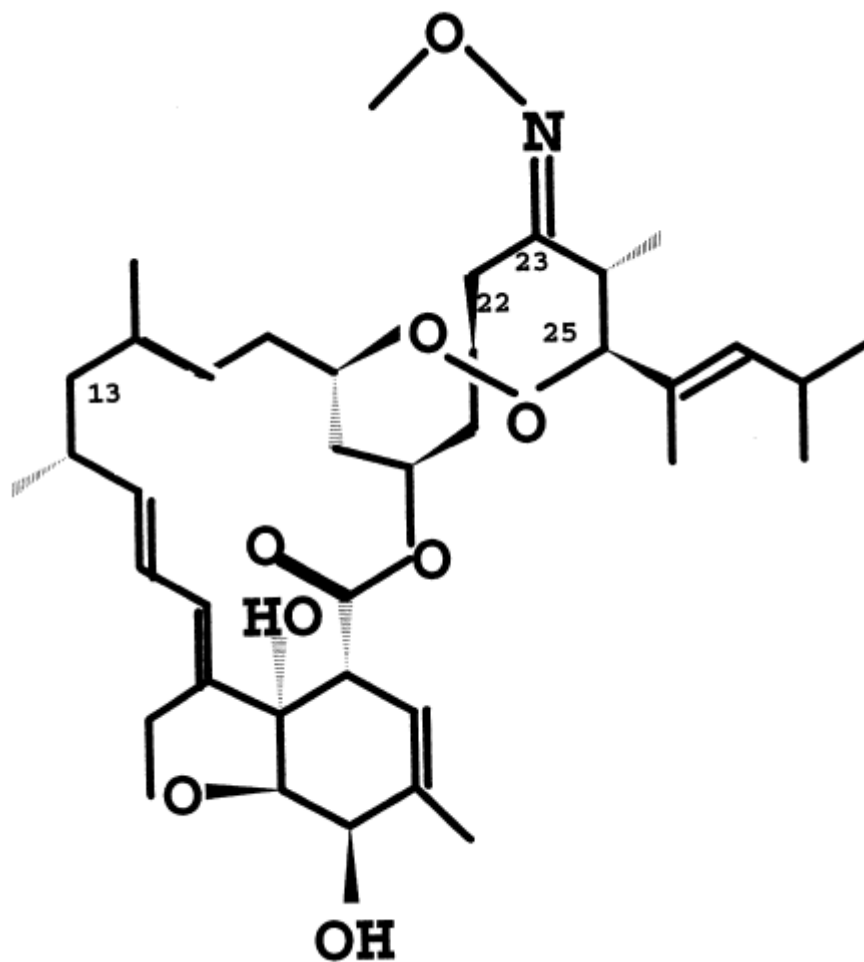
- Theodoropoulos G., Theodoropoulou E., Melissaropoulou G. 2001. Worm control practices of pig farmers in Greece. *Veterinary Parasitology*. 97. 285-293.
- Tiwari J., Kumar S., Kolte A. P., Swarnkar C. P., Singh D., Pathak K. M. L. 2006. Detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using RFLP-PCR technique. *Veterinary Parasitology*. 138. 301-307.
- Tiwari J., Kolte A. P., Kumar S., Swarnkar C. P., Singh D., Pathak K. M. L. 2007. Diagnosis of Benzimidazole Resistance in *Haemonchus contortus* of Sheep by Allele Specific PCR. *Asian-Australasian Journal Animal Societies*. 20. 7-11.
- Van Wyk J. A., Stenson M. O., Van der Merwe J. S., Vorster R. J., Viljoen P. G. 1999. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Veterinary Resistance*. 66. 273 – 284.
- Várady M., Čudeková Čorba J. 2007. In vitro detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: Egg hatch test versus Larval development test. *Veterinary Parasitology*. 149. 104-110.
- Várady M., Papadopoulos E., Dolinská M., Königová A. 2011. Anthelmintic resistance in parasites of small ruminants: sheep versus goats. *Helmintologia*. 48. 137 – 144.
- Waller Peter J. 1997. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*. 72. 391-412.
- Webster-Leveille C. R., Arias I. M. 1995. The Biology of the P-Glycoproteins. *The Journal of Membrane Biology*. 143. 89-102.
- Wolstenholme A. J., Fairweather I., Prichard R., Samson-Himmelstjerna G., Sangster N. C. 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*. 20. 469-476.
- Wolstenholme A. J. a Rogers A. T. 2005. Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*. 131. 85-95.
- Wolstenholme A. J. 2011. Ion channels and receptor as targets for the control of parasitic nematodes. *International Journal for Parasitology*. 1. 2-13.
- Wood I. B., Amaral N. K., Bairden K., Duncan J. L., Kassai T., Malone J. B. Jr., Pankavich J. A., Reinecke R. K., Slocombe O., Taylor S. M. 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintic in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary Parasitology*. 58. 181-213.
- Yates D. M., Portillo V., Wolstenholme A. J. 2003. The avermectin receptors of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans*. *International Journal for Parasitology*. 33. 1183-1193.

Yazwinski T. A., Tucker C., Copeland S., Yazwinski T., Guerino F. 1999. Dose confirmation of moxidectin pour-on against natural nematode infections in lactating dairy cows. *Veterinary Parasitology*. 86. 223-228.



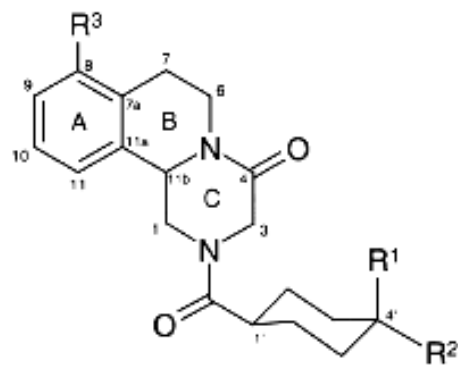


Obrázek č. 2



Chemická struktura moxidectinu (Cardamone a kol., 1998)

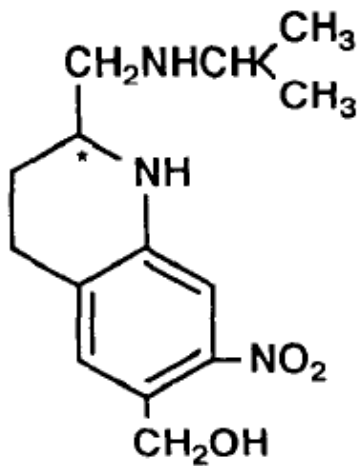
Obrázek č. 3



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
praziquantel	H	H	H
<i>trans</i> -4'-hydroxypraziquantel	H	OH	H
<i>cis</i> -4'-hydroxypraziquantel	OH	H	H
8-hydroxypraziquantel	H	H	OH

Chemická struktura praziquantelu a jeho metabolitů (Schepmann a Gottfried, 2001)

Obrázek č. 4



Chemická struktura Oxamniquinu (Cioli a kol., 1995)

Obrázek č. 5

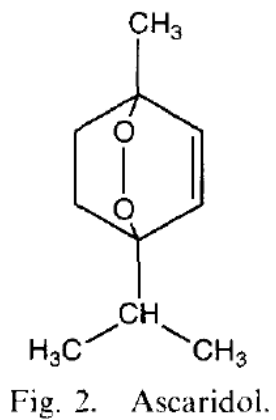
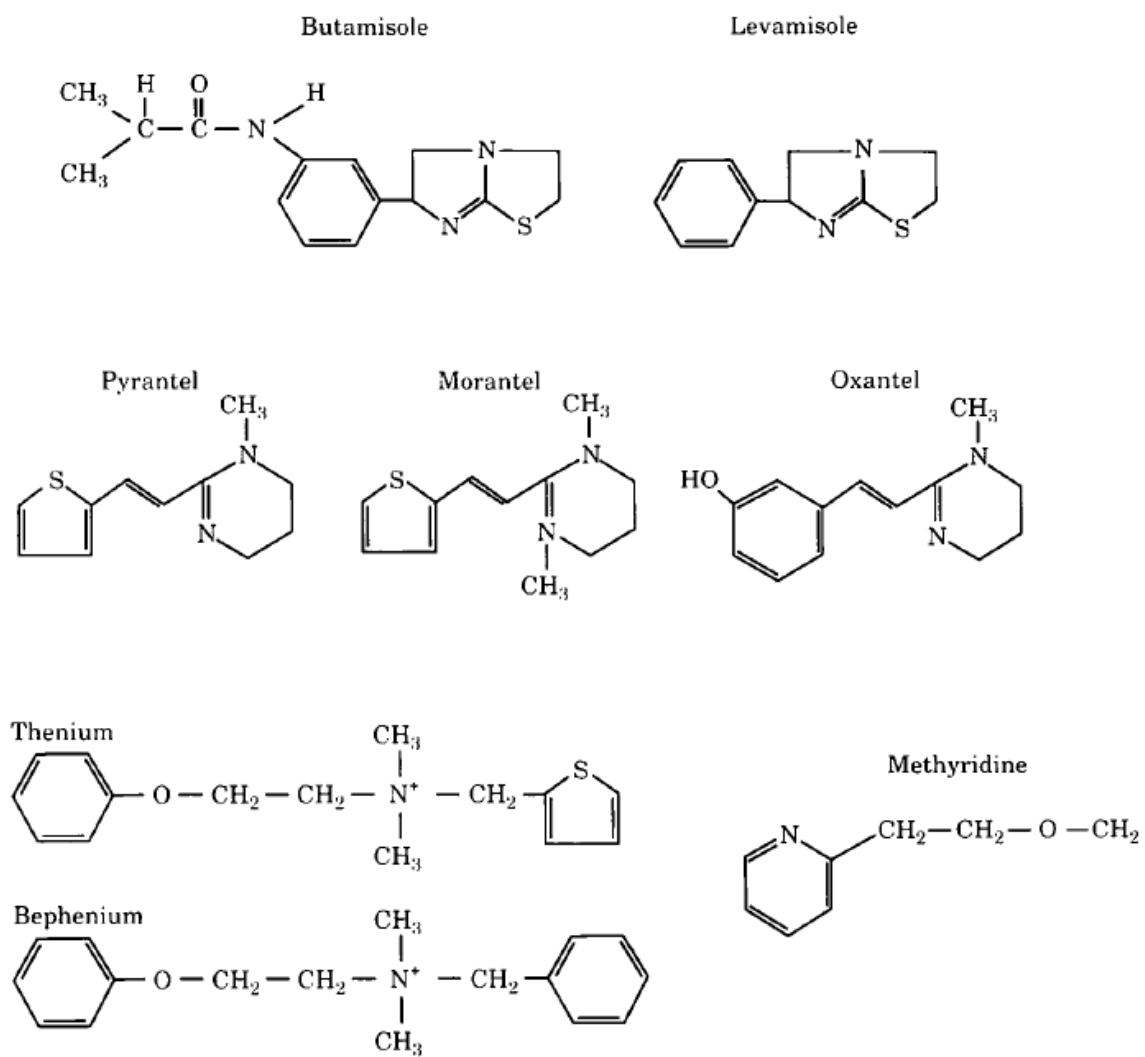


Fig. 2. Ascaridol.

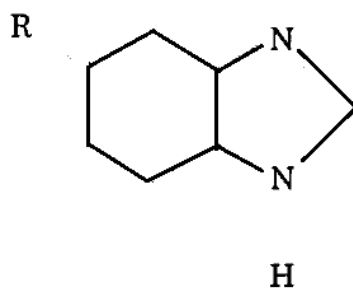
Chemická struktura ascaridolu (Bennet-Jenkins a Bryant, 1996)

Obrázek č. 6



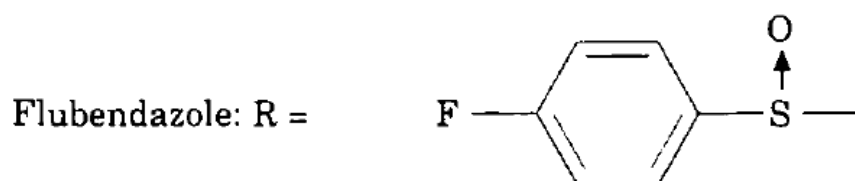
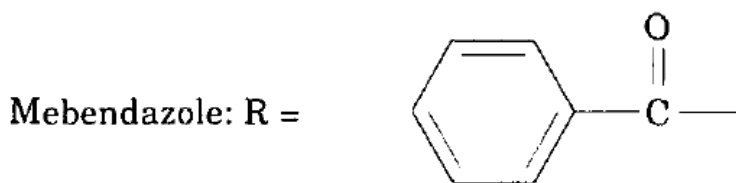
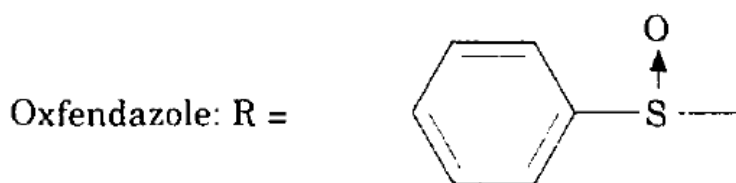
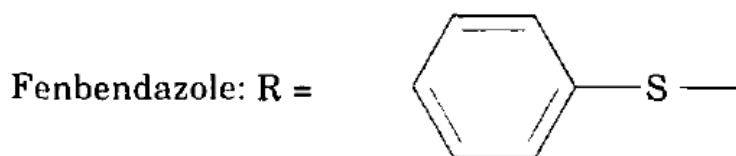
Chemická struktura nikotinových agonistů (Martin, 1997)

Obrázek č. 7



Oxibendazole:  $R = \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$

Albendazole:  $R = \text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$



Chemická struktura benzimidazolů (Martin, 1997)

Zdroje obrázků:

Cioli D., Pica-Mattoccia L., Archer S. 1995. Antischistosomal drugs: past, present...and future?. *Pharmacology Therapy*. 68. 35-85.

Bennet-Jenkins E., Bryant C. 1996. Novel Sources of Anthelmintics. *International Journal for Parasitology*. 26. 937-947.

Cardamone M., Lee R. P., Lucas J. C., Birks D. V. A., O'Donoghue M., Lofthouse S. A., Brandon M. R. 1998. Sustained-release delivery systems and their application for endoparasite control in animals. *Journal of Controlled Release*. 51. 73-83.

Gokbulut C., Karademir U., Boyacioglu M., McKellar Q. A. 2006. Comparative plasma dispositions of ivermectin and doramectin following subcutaneous and oral administration in dogs. *Veterinary Parasitology*. 135. 347-354.

Martin R. J. 1997. Modes of Action of Anthelmintic Drugs. *The Veterinary Journal*. 154. 11-34