

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Ověření účinnosti anthelmintik pomocí testu viability larev
*Haemonchus contortus***

Diplomová práce

Bc. Klára Pachulová

Management zdraví a welfare zvířat

Vedoucí práce Ing. Iveta Angela Kyrianová, Ph. D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Ověření účinnosti anthelmintik pomocí testu viability larev *Haemonchus contortus*" jsem vypracoval(a) 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 21. 4. 2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Ivetě Angele Kyriánové, Ph. D. za cenné rady, podněty, trpělivost a přátelský přístup v průběhu zpracovávání diplomové práce.

Ověření účinnosti anthelmintik pomocí testu viability larev *Haemonchus contortus*

Souhrn

Diplomová práce se zaměřuje na studium parazitů malých přežvýkavců, konkrétně pak na *Haemonchus contortus*, který je zodpovědný za značné narušení welfare a zdraví malých přežvýkavců a ekonomické ztráty v zemědělství. Onemocnění způsobené *H. contortus* se nazývá haemonchóza.

Práce systematicky představuje biologii a ekologii hlístic, do kterých je *H. contortus* zařazen, a zkoumá morfologii, fyziologii a životní cyklus tohoto specifického parazita. Dále se zaměřuje na mechanismy, jimiž parazit využívá k přežití a šíření mimo tělo hostitele, včetně podmínek nezbytných pro jeho vývoj ve volném prostředí.

Jedním z hlavních cílů práce je testování viability larev L₃ a L₄ *H. contortus* po aplikaci anthelmintik konkrétně ivermektinu, moxidektinu a benzimidazolu, pomocí *in vitro* metod, a následná evaluace fenotypů larev v průběhu testů.

Z výsledků vyplynulo, že nejúčinnějším anthelmintikem byl ivermektin, jehož účinnost v závislosti na koncentraci dosahovala 83,67 % - 98,02 %. Následoval moxidektin s hodnotami 77,61 % - 90,70 %. Účinek benzimidazolu na larvy L₃ a L₄ byl nejslabší s průměrnými hodnotami 70,60 % - 7,41 %, to může být způsobeno i tím, že je primárně ovicidní. Účinnost anthelmintik je přímo závislá na jejich koncentraci. Nesprávná volba dávkování anthelmintik je jednou z příčin vzniku rezistence.

Haemonchóza je vážné onemocnění, které může způsobit úhyn zvířat, proto je její kontrola zásadní. K řešení problematiky mohou přispět i alternativní metody tlumení haemonchózy. Dále je nutné si uvědomit, že různé preparáty s anthelmintickými účinky různě působí různá stádia *H. contortus*. Budoucí výzkum by se měl zaměřit na vhodnou kombinaci látek s anthelmintickými účinky a měl by zahrnovat jak *in vitro*, tak *in vivo* experimenty.

Klíčová slova: *in vitro* test, vlasovka slezová, fenotyp, chemoterapeutika

Evaluation of anthelmintic efficacy using the *Haemonchus contortus* larval

Summary

The thesis focuses on the study of parasites of small ruminants, specifically *Haemonchus contortus*, which is responsible for significant welfare and health disturbances in small ruminants and economic losses in agriculture. The disease caused by *H. contortus* is called haemonchosis.

The thesis systematically introduces the biology and ecology of nematodes, including *H. contortus*, and examines the morphology, physiology, and life cycle of this specific parasite. It further focuses on the mechanisms by which the parasite utilizes for survival and spread outside the host's body, including conditions necessary for its development in the environment.

One of the main goals of the thesis is to test the viability of L₃ and L₄ larvae of *H. contortus* after the application of anthelmintics, specifically ivermectin, moxidectin, and benzimidazole, using in vitro methods, followed by the evaluation of larval phenotypes during the tests.

The results revealed that the most effective anthelmintic was ivermectin, with efficacy ranging from 83.67% to 98.02% depending on the concentration. Moxidectin followed with values ranging from 77.61% to 90.70%. The effect of benzimidazole on L₃ and L₄ larvae was the weakest, with average values of 70.60% to 7.41%, likely due to its primarily ovicidal nature. The efficacy of anthelmintics is directly dependent on their concentration. Incorrect dosing of anthelmintics is one of the causes of resistant strains.

Haemonchosis is a serious disease that can cause animal deaths, so its control is crucial. Alternative methods for controlling haemonchosis may contribute to solving the problem. It is also important to note that different anthelmintic preparations work differently on various stages of *H. contortus*. Future research should focus on suitable combinations of anthelmintic substances and should include both in vitro and in vivo experiments.

Keywords: in vitro test, *Haemonchus contortus*, phenotype, chemotherapeutics

Obsah

1	Úvod	9
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	10
2.1	Vědecká hypotéza	10
2.2	Cíle práce	10
3	Literární rešerše	11
3.1	Charakteristika <i>Nematoda</i>	11
3.1.1	<i>Haemonchus contortus</i>	11
3.1.1.1	Vývojový cyklus a klimatická omezení	12
3.2	Hostitelé	14
3.2.1	Obranné mechanismy trávicího traktu	14
3.2.2	Změny v těle způsobené parazity	14
3.2.3	Imunitní systém	15
3.3	Haemonchóza	15
3.3.1	Klinické příznaky	16
3.3.2	Hospodářský význam	17
3.4	Terapie haemonchózy	18
3.4.1	Anthelmintika	19
3.4.1.1	Benzimidazoly	19
3.4.1.2	Imidazothiazoly	20
3.4.1.3	Makrocyclické laktony	20
3.4.2	Anthelmintická rezistence	21
3.4.3	Nepřímé metody tlumení haemonchózy	22
4	Metodika	23
4.1	Příprava roztoku ivermektinu	24
4.2	Příprava zásobního roztoku moxidexinu	25
4.3	Příprava zásobního roztoku Thiabendazolu	26
5	Výsledky	27
5.1	Ivermektin	28
5.1.1	ANOVA	29
5.1.2	Poměr larev L ₃ , L ₄ a mrtvých larev v IVM	30
5.1.3	Fenotyp larev <i>H. contortus</i> po aplikaci IVM	32
5.2	Moxidektin	33
5.2.1	ANOVA MOX	34
5.2.2	Poměr larev L ₃ , L ₄ a mrtvých larev v MOX	35
5.2.3	Fenotyp larev <i>H. contortus</i> po aplikaci MOX	37

5.3	Benzimidazol.....	38
5.3.1	ANOVA BMZ1	39
5.3.2	Poměr larev L ₃ , L ₄ a mrtvých v BMZ1	40
5.3.3	BMZ 2.....	42
5.3.4	ANOVA BMZ2	43
5.3.5	Poměr larev L ₃ , L ₄ a mrtvých larev v BMZ2.....	44
5.3.6	Fenotyp larev <i>H. contortus</i> po aplikaci BMZ.....	46
6	Diskuze.....	48
7	Závěr	51
8	Literatura	52
9	Seznam použitých zkratk a symbolů.....	60
10	Samostatné přílohy.....	I

1 Úvod

Mezi první domestikovaná zvířata využívaná člověkem jednoznačně patří předci ovcí a koz. Spolu s vývojem živočišných druhů, jako je například ovce domácí, dochází k vývoji jejich parazitů. Ovce domácí stejně jako ostatní malí přežvýkavci je hojně využívána člověkem ať už na úrovni intenzivního zemědělství nebo v drobnějších chovech. Všechny typy chovů se potýkají s výskytem parazitárních nákaz. Jedním z nejvýznamnějších parazitů malých přežvýkavců a velbloudů je kosmopolitní *Haemonchus contortus*, který při vhodných podmínkách dokáže napáchat značné ekonomické a hospodářské škody v živočišné výrobě. Jedná se o gastrointestinálního parazita vyskytujícího se v abomasu.

H. contortus svému hostiteli způsobuje onemocnění zvané haemonchóza. Mezi hlavní příznaky patří úbytek váhy, anémie a s tím spojené blednutí sliznice, nedostatek bílkovin a v horších případech i smrt. Haemonchózu tlumíme za pomoci léčiv nazývaných anthelmintika. Ty účinkují v různé míře na většinu vývojových stádií. Rezistence *H. contortus* vůči anthelmintikům a zhoršující se situace zvyšuje potřebu prozkoumat alternativy v prevenci, kontrole šíření a eliminace této infekce.

První kapitola literární rešerše je věnována skupině parazitů zvaných Nematoda, do které řadíme právě *H. contortus*. Jsou zde diskutovány různé aspekty biologie a ekologie hlístic, které jsou důležité pro pochopení jejich významu jako parazitů hospodářských zvířat. Další část práce je věnována samotnému parazitu *H. contortus*. Jsou zde popsány jeho morfologické charakteristiky, fyziologie a životní cyklus. Důraz je kladen na mechanismy, které tento parazit využívá k šíření a přežití mimo tělo hostitele. Včetně charakteristiky vhodných podmínek pro jeho vývoj ve volném prostředí. Následující část práce se zabývá změnami v těle hostitele způsobenými hematofágním *H. contortus*. Jsou zde popsány patologické změny, imunitní reakce a další aspekty, které jsou důležité pro pochopení vlivu této infekce na zdraví a produkci v chovu hospodářských zvířat.

Anthelmintika jsou klíčovým nástrojem v tlumení haemonchózy, ale vzhledem k rostoucí rezistenci parazitů je důležité zkoumat účinnost těchto léčiv a možné alternativy. V této práci je provedeno testování rezistence larev *H. contortus* vůči třem různým anthelmintikům: ivermektinu, moxidektinu a benzimidazolu. Tato anthelmintika byla testována v různých koncentracích. Zároveň byl fotografován a vyhodnocován fenotyp larev v průběhu testování.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1 Vědecká hypotéza

Existuje rozdíl v účinnosti anthelmintik (ivermektinu, moxidektinu a thiabendazolu) v eliminaci larev *Haemonchus contortus*.

2.2 Cíle práce

Cílem práce je pomocí *in vitro* metody otestovat viabilitu larev vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*) ve vybraných koncentracích ivermektinu (IVM) a moxidektinu (MOX) a vyhodnotit fenotypy larev v průběhu testu.

3 Literární rešerše

3.1 Charakteristika *Nematoda*

Význam termínu *Nematoda* pochází ze slova „nema“, čili nit' nebo vlákno (Rajan 2009; Taylor et al. 2007). Jedná se o velmi početnou skupinu organismů, která může žít jak volně, tak paraziticky. Vyskytují se kosmopolitně. Společným znakem je bilaterálně symetrický tvar těla, který je nečláňkovaný postupně zužující se na obou koncích (Gardner 2013). Variabilita životního cyklu a hostitelů poukazuje na schopnost adaptace (Blanxter 2003). Dle morfologických znaků jako je například stavba úst a hltanu, jsou zástupci *Nematoda* děleny do taxonomických skupin (Dorris et al. 1999). Povrch těla je pokryt kutikulou, pod kterou je hypodermis. Kutikula je bezbarvá, lehce průsvitná vrstva, která obsahuje kolagen (Taylor et al. 2007). Kutikula povrch těla nejen kryje, ale zasahuje do všech tělních otvorů, hltanu, ústního otvoru, genitálního a rektálního otvoru (Hendrix & Robinson 2014). Tvorba kutikuly probíhá v hypodermis. Je tvořena třemi základními vrstvy, a to je kortex, matrix a bazální zóna. Příslušnost k druhu ovlivňuje specifické podvrstvy kutikuly hlístice. Kortex funguje jako polopropustná membrána (Thorp & Covich 2001). Kutikula je oporou těla a také slouží k pohybu hlístice a plní funkci ochranné bariéry. Radiální rýha, připomínající články, se nachází na povrchu kutikuly a je označována za pseudosegmentaci. Na povrchu se nachází řada výběžků, žeber, výdutí, papil, trnů a hřebenů, které výborně slouží při druhové determinaci (Weischer a Brown 2000).

Dýchají pomocí povrchu těla. Pseudocel je nepravá tělní dutina, zajišťuje transportní funkci a je i jeho oporou. Trávicí soustava začíná ústní dutinou (stoma), pokračuje hltanem, střevem, konečníkem a anusem (Weischer & Brown 2000). Ústní dutina bývá zpravidla široká a je opatřena zuby nebo bodcem. Za pomocí sekrečních žláz posunuje svalnatý hltan potravu do střeva (Thorp & Covich 2001). Střevo je tvořeno jednoduchou trubicí. U samic je zakončeno anusem a u samců ústí do kloaky (Weischer & Brown 2000).

Nematoda jsou gonochoristi s různorodými vývojovými cykly, ale existují zde nějaké výjimky (Anderson 2000; Blanxter 2003). U samců je pohlavní soustava tvořena nepárovým trubicovitým varletem, chámovodem, semennými vácíky a vývodným kanálkem, který vyúsťuje v kloace. Kopulační organ je v zadní části těla, která bývá zahnutá nebo spirálově stočená. Nazývá se kopulační burza neboli *bursa copulatrix*, která bývá často vyztužena žebry a papilami což slouží k druhové determinaci. Není výjimkou ani přítomnost přídatných kopulačních struktur jako jsou spikuly a gubernakulum. U samic se pohlavní soustava skládá z 1-2 trubicových vaječníků, vejcovodů a dělohy (Blaxter 2011; Lamshead & Boucher 2003).

3.1.1 *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus byl poprvé popsán Cobem (1898) a Rudolphim (1803) jako *Strongylus contortus* (Veglia 1915). Řadí se do nadčeledi Trichostrongyloidea a parazitují hlavně malé přežvýkavce, ale i dobytka. Tento druh je abomasálním parazitem zkoumaným celosvětově pro jeho patogenitu a ztráty v produktivitě zvířat (Besier et al. 2016). Při prozkoumání slezu nakaženého zvířete lze u dospělců snadno detekovat pohlaví díky jejich morfologii, která se vyznačuje válcovitým tělem dlouhým asi 2-3 cm. U samic lze pozorovat

bílé vaječníky, které se spirálovitě vinnou kolem střev obsahující krev (Taylor et al. 2016). Pod mikroskopem lze pozorovat viditelné pohlavní orgány, tudíž samčí burzu a samičí vulvu. Tyto znaky charakterizují jejich polymorfismus (Carta et al. 2009). Gilleard a Redman (2016) uvádí, že bylo popsáno 14 morfologicky rozdílných vulev u samic *H. contortus*.

H. contortus je kosmopolitní parazit. Parazituje v gastrointestinálním traktu přežvýkavců a velbloudů. Dospělci v trávicí soustavě produkují velké množství vajíček, které s exkrementy odcházejí do prostředí. Tato vajíčka se potom dále vyvíjejí ve výkalech ve vnějším prostředí např. na pastvě. Infekční stádia larev se takto dostávají do prostředí a nakazí pasoucí se hostitele. Přítomnost parazita se zjišťuje laboratorně koprologickým vyšetřením flotačními metodami. Infekce tímto parazitem bývají asymptomatické, ale mláďata a neimunní zvířata jsou náchylná k subklinickým onemocněním. Klinické projevy zahrnují anémii, průjem, hypoproteinémii, snížený růst a ve vážných případech úhyn. Emery et al. (2016) zmiňuje, že dospělý jedinec a větší larvy L₄ mohou sát až 30 µl za den. (Nath et al. 2021) srovnává názor studie Taylor et al. 2015, kde tvrdí, že *H. contortus* a *H. placei* jsou jedním druhem, kdy *H. contortus* je kmenová adaptace na domácí přežvýkavce. Tento výrok však vyvrátil Amarante (2011), který poukázal na morfologické, biologické a genetické důkazy o existenci obou druhů.

H. contortus má protáhlý až nitkovitý tvar těla a má úzkou zaoblenou hlavu. Jeho distální část je středně dlouhá a zpravidla mírně zalomená. Délka jeho těla u samců činí 10-20 mm a šířka 0,4 mm. Samice jsou větší a jejich průměrná velikost dosahuje 18-30 mm a šířka 0,5 mm (Angulo-Cubillán et al. 2007). Dospělý samec i samice mají lícni kapsuli a dlouhý jícen a mají klínovité krční papily. Samci mají kopulační burzu asymetrickou se dvěma odlišnými laloky. Samice mají tenký rovný špičatý ocas. Vulva se nachází v zadní třetině těla. Je pokryta nápadnou kulatou řasou (Nath et al. 2021).

3.1.1.1 Vývojový cyklus a klimatická omezení

Vývojový cyklus *H. contortus* je přímý, proto se jedná o geohelmita a nemá mezihostitele ve svém cyklu. Dospělci parazitují na sliznici slezu, kde samice kladou vajíčka, která odchází s exkrementy do vnějšího prostředí (Zajac et al. 2012). Vývojový cyklus lze rozdělit na dvě stádia, kdy první je volně žijící v prostředí a druhý v hostiteli živící se paraziticky (Laing et al. 2013). Za příznivých podmínek se ve vajíčku vytvoří larva L₁, která žije volně a později se transformuje do stádia L₂ (Bush et al. 2001; Brightling 2006). Obě tyto stádia se živí bakteriemi obsaženými v exkrementech hostitele (Walken-Brown et al. 2008). Poté, co stádium L₂ částečně přejde na stádium L₃, vytvoří si další vrstvu kutikuly a není schopno získávat živiny z bakterií (Bush et al. 2001). Množství energie, které zůstává po fázi L₂, je klíčové pro přežití larev ve stádiu L₃ (Brightling 2006). Stádium L₁ a L₂ jsou neinfekční. Infekční stádium L₃ slouží k přenosu na budoucí hostitele (Laing et al. 2013). Larvy ve stádiu L₃ opouštějí exkrementy, putují po trávě díky ranní rose a vlhkosti, protože využívají povrchového napětí vody k pohybu (Brightling 2006). Pozřené infekční stádium L₃ svlékne ochranou kutikulu a migruje do sliznice slezu (abomasum), kde se přemění v L₄ (Angulo-Cubillán et al. 2007). Následují dvě dospělá stádia, kdy sexuálně nezralá dospělá stádia mohou být někdy nazývána L₅ (Walken-Brown et al. 2008). Když dospělí jedinci *H. contortus* dosáhnou dospělosti, začínají se pářit a klást vajíčka, čímž započínají nový cyklus reprodukce.

Při vývoji mimo hostitele je *H. contortus* limitován prostředím, především nízkými teplotami. Upřednostňuje teplé a vlhké prostředí, proto je jeho výskyt vyšší v tropických oblastech (O. Connor et al. 2006). *H. contortus* je velmi přizpůsobivý širokému spektru prostředí, nicméně jeho výskyt je velmi častý i u nás, a dokonce se dokázal přizpůsobit i v severských zemích (Waller & Chandrawathani 2005).

Jeho vysoký biotický potenciál mu dává schopnost využít krátké období podmínek vhodných pro vývoj mimo hostitele a schopnost přežít L₃. L₄ mají schopnost hypobiózy (adaptačního mechanismu). Genetické rozdíly v toleranci environmentálních podmínek vznikly v důsledku vysoké úrovně polymorfismu poskytují kmenům *H. contortus* výhodu při klimatických změnách. Proto se *H. contortus* a tedy i haemonchóza vyskytují téměř ve všech oblastech, kde se chovají přežvýkavci, bez závislosti na klimatickém pásmu. Výskyt *H. contortus* je kromě podnebí tedy srážek a rozsahu teploty dále závislý i na množství dostupnosti hostitelů. *H. contortus* může přežít i v suchých oblastech díky hypobióze (Besier 2016).

Počet vyloučených vajíček u *H. contortus* je 5000–15000 za den na samici. Nejkratší prepatentní perioda je cca 15 dnů a životní cyklus trvá 20 dnů, což dělá z *H. contortus* ze všech střevních *Nematoda*, nejrychleji se reprodukcujícího se parazita. V důsledku toho je genetická variabilita velmi vysoká a umožňuje okamžitou reakci na změny klimatu, hostitele a léčby (Kaplan 2004, Troell et al. 2006, Rose et al. 2014).

Rychlost doby líhnutí vajíčka koreluje s jeho velikostí. Menší vajíčka se líhnou rychleji, zatímco větší se dokážou líhnout i při nižších teplotách (Besier et al. 2016).

V tropických a subtropických oblastech je limitující pro výskyt *H. contortus* množství dešťových srážek. V místech s dlouhými a horkými obdobími sucha je vnější přežívání infekčních larev zanedbatelné, zde dochází především k hypobióze L₄ (Gibbs 1986; Michel 1974; Eysker & Kooyman 1993). Za příčinu vzniku hypobiózy jsou přisuzovány sezónní změny klimatu (Connan 1971; Muller 1968). Existuje předpoklad, že hypobióza je adaptací na přežití zimy v oblastech mírného pásu, pro vývoj volně žijících stádia (Blitz & Gibbs 1972; Waller & Thomas 1975). Allonby & Urtquhart (1975) nepotvrdil výskyt hypobiózy v tropických a subtropických oblastech ve vyšší četnosti.

Hrozba *H. contortus* je v mírném pásmu sezónní, zimy zde nejsou dostatečně chladné a teploty v létě dostatečně vysoké, aby omezily výskyt infekčních larev. Hlavním omezením je sucho a zimní nízké teploty omezující vývoj vajíček. Nejvyšší výskyt je v oblastech s letními srážkami. (Swan 1970; Veglia 1915). Při průměrných měsíčních teplotách 18 °C a minimálních srážkách do 50 mm byla pozorována nižší nákaza *H. contortus* (Gordon 1948). Rossanigo & Gruner (1995) stanovili optimální podmínky pro vývoj z vajíčka do L₃ na teplotu 28 °C a vlhkost nad 70 %. Žádný nebo minimální vývin vajíček byl pozorován při teplotě 9 °C a nižší (Silverman & Campbell 1959).

El-Ashram et al. (2017) přinesli důkazy o přímé korelaci mezi problémy s gastrointestinálními hlísticemi a srážkami během období dešťů v rozvojových zemích, kde jsou chována hospodářská zvířata. Dále Attindehou et al. (2012) zaznamenali v Beninu významnou souvislost mezi mírou haemonchózy a ročními obdobími. Minimální a maximální infekční míra byla zaznamenána v lednu (sušší měsíc) a v červenci (měsíc s vyššími srážkami). Tyto sezónní trendy v prevalenci parazitárních infekcí mohou pomoci při navrhování efektivních strategií kontroly, což je prospěšné zejména pro chov koz a průmysl (Singh et al. 2015). Kromě těchto environmentálních faktorů bylo zjištěno, že i další proměnné mohou ovlivnit parazitární infekce

u malých přežvýkavců: například výživa, management stáda jako je přeplněnost, špatné řízení a hygiena, genetické faktory zahrnující plemeno hostitele, věk a pohlaví zvířete (Knox et al. 2006; Mandonnet et al. 2003; Barnes et al. 2001; Saddiqi et al. 2011; Solomon-Wisdom a Matur 2014; Singh et al. 2015; Attindehou et al. 2012; Poddar et al. 2017).

Attindehou et al. (2012) zjistili, že neexistuje signifikantní rozdíl ve věku, původu, pohlaví ani druhu zvířete, ačkoli zvířata mladší než jeden rok, především kozy, byla nejvíce nakažena. Nakonec, jak uvádí Tasawar et al. (2010), jak hmotnost těla, tak reprodukční stav hostitele ovlivňují vývoj parazitární infekce prostřednictvím rozvoje získané imunity s postupným nárůstem hmotnosti s věkem zvířat.

3.2 Hostitelé

Hlístice *H. contortus* je známý jako hlavní patogen malých přežvýkavců. Má vysoký biotický potenciál a za příznivých podmínek může způsobit rozsáhlé ztráty. Některá plemena ovcí a koz mohou být velice náchylná na infekci *H. contortus* a infekce může být vysoce patogenní (Waller & Thamsborg 2004). Podle Kern et al. (2014) jsou masná plemena ovcí nejvíce ohrožena infekcí gastrointestinálního traktu.

3.2.1 Obranné mechanismy trávicího traktu

Hostitelské obranné mechanismy proti hlísticím zahrnují specifickou a nespecifickou imunitu, přičemž kolem období porodu klesá přirozená imunita. Specifická imunitní odpověď se sice rozvíjí pomaleji, ale je cílená přímo na parazity a má určitou formu paměti. Nespecifická imunita není přímo zaměřena na potlačení parazitů, ale spíše vytváří bariéru a reaguje na "antigen" stejnými mechanismy po každém setkání. Tím částečně brání uchycení parazitů v organismu hostitele a rozvoji infekce. Periparturientní oslabení imunity (PPRI) označuje období kolem porodu, kdy imunita klesá. Toto oslabení začíná asi 2-4 týdny před porodem, pokračuje 6-8 týdnů a poté se imunita postupně obnovuje. Během PPRI je klíčové zajistit správnou nutriční výživu zvířat, protože potřeba živin v tomto období výrazně stoupá (Houdijk 2000; Houdijk 2008; Pernthaner et al. 2006).

3.2.2 Změny v těle způsobené parazity

Pokles příjmu krmiva zapříčiňuje ztrátu produktivity zvířat nakažených parazity. Nechutenství není jediným důsledkem infekce parazity, ale důsledkem může být i změna střevní činnosti, motility, gastrointestinální sekrece, trávení a vstřebávání. Fox et al. (1989a) zjistili, že změny ve střevní motilitě spočívají ve výrazném snížení rychlosti průchodu střevem u telat nakaženými hlísticemi. Bueno et al. (1975, 1982) prokázali, že u ovcí infikovaných *H. contortus* a *T. axei* nastaly výrazné poruchy motility střev. Gregory (1985) předpokládal, že tyto změny cirkulujících hladin gastrointestinálních hormonů, např. gastrinu, jsou reakcí na změny pH ve slezu. Motilitu střev může také ovlivnit cholinesterázy gastrointestinálních hlístic (McKellar 1993).

3.2.3 Imunitní systém

Opakované vystavení parazitům může vést k vytvoření ochranné imunity u ovcí proti budoucím infekcím *H. contortus* (Barger et al. 1985; Christie et al. 1978; Miller et al. 1983). Schopnost ovcí odolávat patogenním účinkům této infekce závisí na složité interakci několika faktorů, jako je úroveň výživy, fyziologické charakteristiky, stav březosti, pohlaví, věk a přítomnost vrozené a adaptivní imunity u hostitelského zvířete (Andronicos et al. 2010; Hein et al. 2010; Saddiqi et al. 2011). Imunitní systém hraje klíčovou roli v poskytování ochrany proti těmto parazitárním infekcím a je ovlivněn dědičností (Wakelin 1985) a polygenní povahou (Kemper et al. 2009).

Infekce ovcí *H. contortus* způsobuje patologické změny ve slezu, které souvisejí s narušením sliznice (Nicholls et al. 1985) a s hyperplazií mnoha buněčných linií, včetně buněk produkujících hlen (Scott et al. 1998; Scott et al. 1999), lymfocytů (Gorrell et al. 1988), mastocytů (Miller 1996), granulocytů s globulemi (Stankiewicz et al. 1993) a eosinofilů (Balic et al. 2006).

3.3 Haemonchóza

H. contortus je nejpatogennější běžně se vyskytující hlísticí, a to kvůli svému způsobu obživy a rychlému generačnímu intervalu při příznivých podmínkách pro vývoj stádií mimo hostitele. Patofyziologie haemonchózy a s ní související klinické příznaky jsou spojeny především s anémií vznikající krev sajícím *H. contortus* (Dunn 1978; Levine 1980; Urquhart et al. 1996). Úbytek krve je pozorován až s objevením L₄ (Monnig 1950; Veglia 1915). Dle (Dargie & Allonby 1975; Hunter & McKenzie 1982) je anémie zjištělná 10-12 dní po infekci. Odhadované množství ztráty krve je 30-50 ml krve denně dle (Clarke et al. 1962; Dargie & Allonby 1975). Dle Albers & Le Jambre (1983) je denní ztráta krve u ovcí 30 ml po uplynutí 11 dní od infekce v rozsahu 10 000 infekčních larev *H. contortus*.

Míra ztráty krve u hostitele souvisí s počtem dospělců *H. contortus* v organismu, jelikož existuje korelace mezi ztrátou krve a množstvím larev (Le Jambre 1995). Výsledek infekce *H. contortus* je ovlivněn rychlostí příjmu infekčních larev, schopností organismu odmítnat larvy a schopností náhrady krve.

Dle intenzity infekce a reakci hostitele může být haemonchóza řazena do tří skupin syndromů (Dunn 1978; Urquhart et al. 1996). Při vzácnější hyperakutní formě dochází k obrovské ztrátě krve v důsledku silné infekce až 30 000 *H. contortus*. Kdy dochází k hemoragické gastritidě a terminální anémii (Dunn 1978). Úmrtí nastává náhle bez jakýchkoli příznaků nemoci, ale s příznaky těžké anémie u mnoha přeživších. Diagnóza je možná až při pitvě detekcí larev a krvácením na povrchu sliznice.

U akutní haemonchózy se v průběhu 4-6 týdnů od infekce vyvine silná anémie. Přítomnost larev v hostiteli je odhadována na 2000-20000 jedinců *H. contortus* (Urquhart et al. 1996), přičemž ve výkalech se může vyskytovat více než 50 000 vajíček na gram (Dunn 1978). Dargie & Allonby (1975) definovali tři stadia vývoje anémie v průběhu onemocnění akutní haemonchózy s počátečním poklesem objemu packed cell volume (PCV) krevních elementů po dobu přibližně 6 týdnů po infekci a zjevným zotavením v důsledku poklesu krevního tlaku což je kompenzační erytropoéze u zvířat, která přežila. V následujícím období však může dojít

k snížení PVC v důsledku nedostatečné krvetvorby a vyčerpání krevních buněk. V těle dochází i zásoby železa a proteinu. Při postmortálním vyšetření bude kadáver bledý se submandibulárním edémem, což odráží hypoproteinémií způsobenou ztrátou krve. Krev bývá vodnatá a má problémy s hemokoagulací. Sliznice slezu je často zduřelá s krevními výrony a přichycenými parazity na povrchu. Histopatologické změny související s akutní haemonchózou zahrnují traumatické poškození povrchu sliznice a stopy buněčné imunologie (Hunter & McKenzie, 1982; Silverman & Paterson 1960).

Chronická haemonchóza se vyznačuje menšími infekcemi trvající delší dobu (Allonby & Urquhart 1975; Dunn 1978). Chronická haemonchóza může probíhat bez povšimnutí, projeví se až při zvýšeném příjmu larev a tím i zvýšené infekci parazity nebo při zhoršení výživného stavu. Zhoršení výživného stavu snižuje schopnost hostitele tolerovat patogenní účinky. Syndrom byl poprvé popsán v Keni na základě pozorování (Allonby & Urquhart 1975) a dále v pasteveckém prostředí Austrálie, kde jsou srážky nízké a proměnlivé během ročních období a trvá malé zatížení hlísticemi (Cobon & O Sullivan 1992; De Chaneet & Mayberry 1978; Roberts & Swan 1981). Nejčastější výskyt chronické haemonchózy je v obdobích nepříznivých pro vývoj volně žijících stádií *H. contortus* a je často doprovázen infekcemi jinými helminty.

Chronická forma haemonchózy se může vyskytnout, ale i tam, kde jsou epidemie haemonchózy běžné, ale částečně účinná preventivní opatření zabraňují vzniku akutní haemonchózy. Zvýšení dopadu infekce *H. contortus* může urychlit snížení krmné dávky nebo snížení její kvality. Výrazný rozdíl v toleranci a odolnosti vůči *H. contortus* byl prokázán u ovcí s krmnou dávkou s extrémně nízkým obsahem bílkovin ve srovnání s ovcemi, které dostávaly krmné doplňky (Abbott et al. 1986a; Nnadi et al. 2009; Wallace et al. 1996) a to i v případě podobné intenzity infekce (Abbott et al. 1986b; Wallace et al. 1996). Snížení produkce mléka u ovcí je spojováno s chronickou haemonchózou (Thomas & Ali 1983) i koz (Nnadi et al. 2009) a částečná agalactie, neschopnost mléčné žlázy, u ovcí přispívá k snížení růstu jehňat. Efekt chronické infekce *H. contortus* u ovcí s horší úrovní výživy souvisí s nízkou dusíkovou bilancí (Abbott et al. 1985a; Rowe et al. 1988) a do jisté míry i s nechutenstvím (Abbott et al. 1985a; Holmes 1987), jak se běžně stává u infekcí mnoha trichostrongylidními hlísticemi (Fox 1997). Suplementace bílkovin vede ke zvýšené odolnosti ovcí vůči *H. contortus*, je největší u plemen nebo jednotlivých ovcí, které jsou náchylnější k infekci (Abbott et al. 1985b; Kahn et al. 2003; Steel 2003). Kromě toho rozdíl v patogenitě je způsoben i různými kmeny *H. contortus* (Hunt et al. 2008), kteří uvádějí genomické i fyziologické rozdíly mezi australskými kmeny. Dále Angulo-Cubillan et al. (2010), kteří uvádí rozdílnost mezi španělskými a skotskými kmeny.

3.3.1 Klinické příznaky

Klinické příznaky u haemonchózy závisí na počtu hematofágních dospělých jedinců přítomných ve slezu. Dále na vnímavosti a výživném stavu. Příznaky uváděné majitelům a veterináři se liší, jak v rychlosti nástupu, tak v rámci stáda. Vývoj haemonchózy od infekce po úhyn popsal Ross & Gordon (1936).

Nejčastějším klinickým znakem u různých hospodářských zvířat je variabilní stupeň anémie, který je ovlivněn délkou a intenzitou infekce a řadou dalších faktorů. Neexistuje spojení mezi infekcí a věkovou kategorií, nicméně onemocnění častěji postihuje jehňata, která neprošla přirozenou imunitou vůči helmintům. Anémie se také vyskytuje u laktujících ovcí a

koz kvůli periparturientní relaxaci vůči rezistenci (O'Sullivan & Donald 1973) a občas i u dospělých zvířat, která byla nedávno začleněna do stáda, ve kterém se *H. contortus* vyskytuje. Existuje přirozená variabilita imunitních reakcí mezi jednotlivci v rámci stáda v dané oblasti, která může být využita k vyšlechtění rezistentního plemene vůči *H. contortus* (Preston & Allonby 1979; Woolaston & Baker 1996) nebo k výběru odolných zvířat (Bissett & Morris 1996) plemena se liší v odolnosti vůči haemonchóze (Mugambi et al. 1997; Preston & Allonby 1979), s výhodou pro plemena adaptovaná na dané lokality (Besier et al. 2016). Výživný stav ovlivňuje závažnost příznaků haemonchózy (McArthur et al. 2013), stejně jako současná infekce jinými parazity nebo nemocemi.

Při hyperakutní haemonchóze dochází k náhlému úhynu bez předchozích příznaků anémie. Bledost sliznic je typickým znakem anémie, která je nejlépe pozorovatelná na spojivkách. Existuje úzký vztah mezi barvou spojivek a stupněm anémie.

Práce s ovci a nedávné studie na laboratorních zvířatech naznačují, že signály sytosti v mozku souvisí s nechutenstvím během střevních infekcí, spíše než s úpravami v hladinách peptidů v těle. Důležité jsou také změny v gastrointestinální funkci, především mechanismy, které způsobují zvýšenou sekreci určitých látek v trávicím traktu, jako je pepsinogen a gastrin.

3.3.2 Hospodářský význam

Dle (McLeod 2004; Perry et al. 2002; Emery et al. 2016; Jamalm et al. 2016) je haemonchóza považována za hospodářsky nejvýznamnější onemocnění způsobené parazitem. Je to ovlivněno příznivými podmínkami pro rozvoj *H. contortus*, rokem, ročním obdobím, podmínkami prostředí a rezistence vůči anthelmintikům. Onemocnění vede k vysoké mortalitě. Největší ekonomický dopad je v chovech s intenzivními komerčními podmínkami v oblastech s příznivými podmínkami. Avšak škody v tradičních systémech nejsou zdaleka zanedbatelné zvláště pokud jsou zvířata chována v extenzivních podmínkách a často se zhoršují v obdobích omezení dostupných potravních zdrojů. Dalším problémem je také cenová dostupnost anthelmintik (Vatta & Lindberg 2006). Jako přímý důsledek klesá jak výtěžnost masa zvířat, tak příjmy malých zemědělců. Současně s rostoucím, a ne vždy dobře zdůvodněným používáním anthelmintik se paraziti stávají stále odolnějšími. Dále, vysoké náklady, omezená dostupnost anthelmintik, zbytky léčiv ve finálních produktech a životním prostředí po jejich použití jsou dalšími faktory, které mnoho zemědělců odrazují od jejich používání v některých rozvojových zemích (Knox et al. 2006).

(Kelly et al. 2010) ve své studii tvrdí že úhyny u plemene merino větší než 10 % z velké části způsobila haemonchóza. Většina těchto uhynulých ovcí byly bahnice. Byly zde ale znatelné rozdíly mezi jednotlivými roky (Kelly et al. 2010). V tropických oblastech dochází k významnému poklesu růstu a produkce mléka u malých přežvýkavců, což má za následek ztráty ve výrobě, zejména u stád chovaných na pastvě (Andrea et al. 2011).

Účinky infekcí *H. contortus* na produkci malých přežvýkavců se dle Julienne et al. (2021) týkají především produkce mléka, jak z hlediska množství, tak kvality. Nicméně účinky infekcí *H. contortus* na produkci mléka u koz a ovcí nejsou ve srovnání s mléčnými kravami dostatečně zdokumentovány (Julienne et al. 2021). Při porovnání mléčného výtěžku u ovcí orálně infikovaných 2500 larvami *H. contortus* týdně během březosti a laktace Thomas a Ali (1983) hlásili výrazný úbytek hmotnosti a snížení mléčného výtěžku o 23 %, což bylo více než u

strojově dojených koz infikovaných třikrát larvami L₃ *H. contortus* v padesáti denních intervalech (Hoste & Chartier 1993). Nedávné studie odhalily ještě vyšší míru snížení produkce. V Itálii byl zaznamenán významný efekt haemonchózy na produkci mléka, s nejvyšším mléčným výtěžkem u ošetřených koz (Rinaldi et al. 2007).

Ve studii provedené v Argentině byl zjištěn významný rozdíl v průměrné celkové produkci mléka mezi ošetřenými a neošetřenými kozami (Suarez et al. 2017), kde ošetřené kozy vykazovaly nárůst celkové produkce mléka o 41,8 %. Dále byly hodnoceny účinky infekcí *H. contortus* na délku laktace, kdy byla zaznamenána delší doba laktace ve skupině léčené dietou s vysokým obsahem bílkovin ve srovnání se skupinou s normální dietou (Chartier et al. 2000). Anthelmintická léčba pozitivně ovlivnila délku období dojení (Suarez et al. 2009) a naopak byl zaznamenán negativní efekt infekcí *H. contortus* na délku období dojení (Suarez et al. 2017). Tyto různé výsledky mohou vysvětlit pozitivní korelaci mezi léčbou haemonchózy a trvalým zvýšením produkce mléka (Rinaldi et al. 2007). Studie také zdůrazňuje negativní efekt infekcí *H. contortus* na kvalitu mléka (Rinaldi et al. 2007). Tyto zjištění nejsou v souladu s dřívějšími studiemi (Hoste & Chartier 1993).

Dopad chronické infekce *H. contortus* je obtížné posoudit, protože je nejdůležitější v oblastech extenzivní pastvy, kde se pozorování provádí méně často, Qama et al. (2012) uvádějí významné ztráty v produkci zvířat, zatímco Fabiyi (1987) zaznamenal významné ztráty způsobené kombinovanými infekcemi helminty v chovu v mnoha afrických zemích, často spojenými s *H. contortus*. Často dochází k úhynům několik měsíců po infekci a je spojen s nedostatečnými výživovými podmínkami (Allonby & Urquhart 1975).

3.4 Terapie haemonchózy

Významní parazité se dokáží účinně vyhýbat imunitnímu obrannému systému hostitele a potlačují jeho snahu o vypuzení parazita (McSorley & Maizels 2012). Dříve se k potlačení helmintóz využívaly přírodní zdroje, zejména rostliny, jako je tabák, vlašský ořech, pelyněk, hřebíček, semena kalonji, česnek, kaprad' samec, ananas, křemelina, sója a další luštěniny, nebo směsi medu, vody a octa. V současnosti však máme k dispozici širokou škálu antiparazitních preparátů (Yadav & Singh 2011). V posledních letech se ovšem navrácí trend používání rostlin k tlumení haemonchózy kvůli rezistencím. Cílem terapie není kompletní eliminace parazitů, ale udržení jejich populace pod kontrolou tak, aby nepředstavovala život ohrožující nebezpečí pro hostitele (Getachew et al. 2007). Jak uvádí Hartl et al. (2012), nejběžnější metodou v potlačení helmintóz v současnosti je využití anthelmintik, což jsou léky určené k léčbě těchto parazitárních infekcí. Nicméně ke kontrole parazitárních onemocnění je důležité přistupovat komplexně (Niemann 2013).

Chybné užívání anthelmintik vede k anthelmintické rezistenci. Jednou z možností, jak řešit rezistenci proti anthelmintikům, jsou vakcíny. V současné době je na trhu jediná vakcína určená proti gastrointestinálním hlísticím, konkrétně pro druh *H. contortus* u ovcí (známá pod komerčním názvem Barbervax). Nicméně, v testech na kozách a větších přežvýkavcích nebyla dostatečně účinná (Meier et al. 2016). Zatím je možné ji využívat pouze v Austrálii, Jižní Africe a s určitými výjimkami ve Velké Británii. V současné době probíhá vývoj a testování dalších potenciálních vakcín pro zbývající druhy hlístic parazitujících u přežvýkavců. Jedním z nich je

například vakcína určená proti *T. circumcincta*, na níž byla testována rekombinantní vakcína s cílem snížit celkový počet parazitických vajíček u ovcí (Nisbet et al. 2016).

3.4.1 Anthelmintika

Anthelmintika jsou preparáty určené k potlačování helmintů. Slouží k jejich inaktivaci, paralýze nebo usmrcení (Silvestre et al. 2002). V minulosti byla používána anthelmintika, která se již v současnosti nepoužívají pro jejich toxicitu a nebezpečnost pro životní prostředí. Jedná se například o chlorované uhlovodíky a organofosfáty (Smith & Sherman 2009). Mezi nejčastěji používaná anthelmintika u malých přežvýkavců patří látky jako thiabendazol, albendazol, fenbendazol, ivermektin, moxidectin, levamisol, morantel a pyrantel (Kaplan 2004; Zajac & Garza 2020).

Anthelmintika lze rozdělit do tří hlavních skupin: benzimidazoly, do druhé skupiny patří imidazothiazoly (levamisoly) hydroypyrimidiny (parantel/morantel) a třetí skupinou jsou makrocyclické laktony (avermektiny a milbemyciny), mechanismus účinku se liší v každé skupině anthelmintik (Colese 2006; Silvestre et al. 2002).

Dle Abbot et al. (2012) lze anthelmintika rozdělit do pěti skupin: benzimidazoly, tetrahydroypyrimidiny, makrocyclické laktony, imidazothiazoly a aceto-aminonitrilové deriváty. Je klíčové aplikovat vhodné anthelmintikum, ideálně s úzkým spektrem účinku, na který je parazit citlivý, v dostatečné dávce a po dostatečně dlouhou dobu. Podání nesprávného anthelmintika nebo poddávkování, což znamená podání nižší dávky léčiva než terapeutická, patří mezi hlavní faktory, které přispívají k rychlému vzniku klinické rezistence (Hansen & Perry 1994).

V současné době je již dostupný rozsáhlý výběr anthelmintik, nejčastěji se širokospektrálním účinkem, nebo se specifickou účinností proti parazitární infekci (Hansen & Perry 1994). Laing et al. (2013) uvádějí, že *H. contortus* je v současné době pravděpodobně nejvíce experimentálně využívanou hlísticí, a to především v oblastech vývoje nových anthelmintik, výzkumu anthelmintické rezistence a vakcín. Vzhledem k tomu, že dospělé samice jsou poměrně velké a produkují tisíce vajíček denně, tak poskytují velký dostatek biologického či genetického materiálu pro výzkum. Výhodou je též možnost konzervace infekčních larev zmrazením se zachováním jejich životaschopnosti či možnost provádění *in vivo* studií včetně genetického křížení v prostředí přirozeného hostitele (Laing et al. 2013).

3.4.1.1 Benzimidazoly

Jedná se o první skupinu širokospektrálních anthelmintik. Lee (2002) řadí do této skupiny i dva probenzimidazoly a to febantel a thiofanát. Tyto látky jsou vytvářeny synteticky a vykazují řadu biologických aktivit (Lee 2002). V roce 1961 začal být používán tiabendazol jako první ze širokospektrálních anthelmintik (Brown et al. 1961). Schválenými preparáty z této skupiny jsou například albendazol a fenbendazol (Zajac 2006).

Benzimidazoly působí tím, že narušují vazbu β -tubulinu helmintu, což vede k inhibici polymerace mikrotubulů. Vzhledem k tomu, že mikrotubuly jsou nezbytné pro transport sekrečních granul a enzymů v cytoplazmě, dochází k následné buněčné smrti (Sutherland & Scott 2009; Lee 2002; Laudisi et al. 2020). Tento proces vede k destrukci podkoží, svalového epitelu a střeva parazita (Lacey 1988). Mechanismus těchto reakcí účinně likviduje hlístice,

motolice, prvoky a tasemnice (Lee 2002). Dále dochází k útlumu tvorby gametocytů a zamezení tvorby gamet (Hanser et al. 2002).

Tyto látky jsou dobře tolerovány organismem nakaženým parazity a předávkování je s většinou komerčně dostupných přípravků téměř nemožné. Jejich účinek na různé druhy a stádia parazitů je ovlivněn farmakokinetikou jednotlivých sloučenin, což způsobuje významné rozdíly v rámci skupiny benzimidazolů. Poločas rozpadu těchto látek je přibližně 10 hodin (Epe 2009). Podle farmakokinetiky těchto látek se doporučuje snížení krmné dávky u malých přežvýkavců, jako jsou kozy a ovce, 12 až 24 hodin před aplikací, aby se zpomalil průchod látky trávicím traktem a zvýšilo se vstřebávání přípravku. Důležité je si uvědomit, že kozy mají rychlejší metabolismus než ovce a potřebují proto vyšší dávky léčiva (Zajac 2006).

Benzimidazoly jsou známé pro svou mírnou toxicitu, avšak u některých z nich, jako je kambendazol, albendazol, mebendazol, parbendazol a oxfendazol, je jejich použití během březosti omezeno kvůli jejich schopnosti vyvolat vrozené vady plodu (Lee 2002). Obecně platí, že pokud nevyvinula cílená parazitní populace rezistenci, jsou tyto přípravky velmi účinné proti širokému spektru parazitů, včetně *H. contortus*, *Trichostrongylus spp.*, *Teladorsagia circumcincta*, *Oesophagostomum spp.*, *Nematodirus spp.* a *Strongyloides spp.*, avšak méně účinné jsou proti *Trichuris spp.* Tato skupina anthelmintik je obvykle považována za relativně bezpečnou (Smith & Sherman 2009).

Benzimidazoly se podávají perorálně, injekčně, aplikací na kůži tzv. spot-on nebo pour-on. Obvyklé dávkování proti hlísticím se pohybuje v rozmezí 5-10 mg/kg, s výjimkou thiabendazolu (Lee 2002).

3.4.1.2 Imidazothiazoly

Imidazothiazoly/tetrahydropyrimidiny jsou skupinou anthelmintik, z níž se nejčastěji používají tetramizol a levamizol. Tyto látky selektivně ovlivňují synaptické a extrasynaptické acetylcholinové receptory, což vede k spastickému ochrnutí helmintů a jejich následnému vyloučení z těla hostitele (Sutherland & Scott 2009). Účinnost těchto léčiv je podobná jako u benzimidazolů, avšak proti *Nematodirus spp.* může být jejich účinek ještě účinnější.

Farmakokinetika levamizolu se u koz liší od farmakokinetiky u ovcí. Poločas rozpadu levamizolu u koz je 222 minut, přičemž přibližně 55 % se vylučuje močí a 30 % stolicí. Méně než 1 % z celkové dávky se vylučuje do mléka (Smith & Sherman 2009).

3.4.1.3 Makrocyclické laktony

Nejnovější třídou anthelmintik jsou makrocyclické laktony, jako jsou avermektiny a milbemyciny, které jsou fermentovanými deriváty přírodních produktů (Sutherland & Scott 2009). Přírodní avermektiny jsou produktem plísně *Streptomyces avermitilis*, původně izolované z půdních vzorků v Japonsku, zatímco přírodní milbemyciny pocházejí od *Streptomyces spp.*, které byly izolovány po celém světě. V současnosti se nejčastěji používají nezměněné molekuly přírodních produktů, jako jsou abamektin, doramektin a milbemycin D, ale také semi-syntetické molekuly odvozené z přírodních avermektinů, jako jsou ivermektin, eprinomektin a selamektin, a dále i milbemyciny, mezi které patří milbemycin, oxim a moxidektin (Lee 2002).

Tyto látky ovlivňují kyselinu gama-aminomáselnou a chloridové kanály prostřednictvím receptorů (Bowman et al. 2002; Laudisi et al. 2020). Což vede k zvýšení permeability chloridových iontů, buněčné hyperpolarizaci, paralýze a smrti hlístice (Laudisi et al. 2020). Tato účinná místa se vyskytují u mnoha druhů hlístic a ektoparazitů, ale u tasemnic a motolic jsou velmi omezená, což vede k jejich přirozené rezistenci vůči těmto látkám. Ochrnutí parazita je způsobeno uzavřením těchto kanálů (Bowman et al. 2002).

3.4.2 Anthelmintická rezistence

Nárůst případů rezistence na anthelmintika je stále častější a způsobuje hrozbu pro chovy malých přežvýkavců, s novými případy zaznamenanými i u skotu. Již dlouhou dobu je známo, že kmeny těchto hlístic jsou schopny vyvinout rezistenci proti danému anthelmintiku v poměrně krátkém čase (Conway 1964 v Kaplan 2004). Tato schopnost způsobuje značné škody a problémy v celosvětovém potlačování parazitů. Jejich rezistence má negativní dopad nejen na samotná hospodářská zvířata, ale také na farmáře a konečné spotřebitele, stejně jako na celkovou ekonomiku a produktivitu tohoto průmyslu. Z tohoto důvodu je přesná identifikace kmene velmi důležitá.

Rezistence patogenů je v poslední době poměrně častým tématem ve vědecké oblasti, ať už hovoříme o rezistenci bakteriální, virové, nebo v našem případě gastrointestinálních hlístic. Podle směrnic Světové asociace pro pokrok ve veterinární parazitologii můžeme rezistenci definovat jako dědičnou změnu citlivosti na anthelmintikum v populaci parazitických červů, kdy terapeutická dávka, která obvykle poskytuje více než 95% úspěšnost eliminace dospělých červů, poskytuje úspěšnost méně než 80 % (Geary et al. 2012). Při každé anthelmintické léčbě existuje pravděpodobnost selekce rezistentních jedinců, kteří přežijí terapii a následně se rozmnožují a předávají své rezistentní geny dalším generacím (Prichard 1990). Podle Verma et al. (2018) lze vývoj rezistence rozdělit do tří hlavních fází: První fáze citlivosti je při prvním použití anthelmintika, kdy je frekvence rezistentních alel a jedinců v populaci nízká. Druhá fáze přechodu, kde dochází k postupnému zvyšování rezistentních alel s častější expozicí anthelmintiku. Poslední, třetí fáze rezistence je výsledkem selekčního tlaku s vysokou početností alel v populaci.

Dalším z faktorů vedoucím k vzniku rezistence může být dle Silvestre et al. (2002) frekvence anthelmintických léčebných cyklů, tedy časté používání anthelmintik ve stejné skupině přípravků během jednoho roku. Obrat stáda je také způsob, kterým lze přenášet rezistentní kmeny parazitů, zvláště pokud je to v období používání anthelmintik. Všechny tyto faktory vzájemně interagují a jsou hlavními rizikovými faktory přispívajícími k selekci rezistentních parazitů.

Existuje mnoho potenciálních příčin, které by mohly vést k neúčinnosti anthelmintik, a teprve po zvážení těchto možností bychom měli zvážit podezření na rezistenci. Mezi tyto příčiny patří podle Torres-Acosta & Hoste (2008) chybné skladování, což může vést ke snížení účinnosti, expirace přípravku, špatné dávkování v důsledku nesprávného odhadu hmotnosti zvířete nebo poškození dávkovacího zařízení, a nedostatečná karanténa nových zvířat.

Rezistence je závažným problémem u ovcí, ale i u koz, především těch mléčných. Podle Hoste et al. (2002) je vyšší prevalence rezistence u mléčných koz spojena především s častým ošetřováním, vzhledem k jejich nižší schopnosti vyvinout imunitní odpověď na infekci.

Rezistence byla již hlášena u všech hlavních parazitických hlístic u koz pro všechny 3 skupiny anthelmintik. Rezistence vůči jednomu léku ze skupiny znamená rezistenci vůči všem ostatním lékům ve skupině, protože mají stejný mechanismus účinku. Výjimky v rámci skupiny jsou způsobeny rozdíly v účinnosti, ale jsou jen dočasné (Hoste et al. 2002).

Výzkum provedený Gasbarre et al. (2009) objevil přítomnost *H. contortus* u skotu, který se pásal na pastvinách, jež nebyly využívány pro ovce nebo kozy po dobu přes 40 let. Další nedávná evropská studie naznačuje, že více než 96 % vajíček parazitů vylučovaných skotem, který se dostává na krmišť, patří *H. contortus*. Tato infekce významně snižuje produkční parametry u zvířat, která nebyla ošetřena anthelmintiky (Arsenopoulos et al. 2022).

3.4.3 Nepřímé metody tlumení haemonchózy

Cílem snížení zdroje kontaminace je přerušit vývojový cyklus gastrointestinálních hlístic tím, že se eliminuje infestace pastvin a tím minimalizuje riziko kontaktu mezi hostiteli a infekčními larvami L₃ (Paolini et al. 2004). Existuje několik metod kontroly pastvin, které mají tento cíl dosáhnout. Tyto metody se zakládají na třech hlavních principech: prevence, vyhýbání se zdroji a snižování zamoření pastvin (Pomroy 2006). Prevence spočívá v umístění zdravých zvířat na pastviny, které neobsahují larvy L₃, zatímco vyhýbání se zahrnuje přesun ošetřených zvířat s anthelmintiky z kontaminovaných pastvin na čisté pastviny (Julienne et al. 2021).

Zvýšení odolnosti hostitele lze dosáhnout dvěma způsoby, a to výběrem geneticky odolných zvířat nebo zlepšením jejich stravy. Výběr zvířat odolných vůči gastrointestinálním hlísticím představuje dlouhodobý přístup ke snížení používání syntetických anthelmintik (Pomroy 2006). Takový postup by teoreticky snižoval infestaci hostitelů a postupně by redukoval kontaminaci pastvin. Genetická variabilita v odolnosti vůči gastrointestinálním hlísticím byla pozorována buď mezi různými plemeny nebo u jedinců stejného plemene (Bishop a Morris 2007). Nicméně, výběr odolných zvířat může mít určitá omezení, jako je riziko zvýšené náchylnosti hostitele k jiným patogenům (Gruner et al. 1998) nebo nepříznivý vliv na produktivitu (Stear & Murray 1994; Gray 1997). Navíc tyto programy výběru odolných zvířat jsou dlouhodobými projekty, které musí brát v úvahu lokální chovatelské podmínky, dostupnost plemen a chovatelské cíle (Pomroy 2006).

Gastrointestinální hlístice vážně narušují fyziologii trávení a způsobují zvýšené potřeby hostitele na výživu, aby vyrovnal silné poruchy metabolismu bílkovin a energie (Hoste et al. 2005). Obecně platí, že metabolismus bílkovin je více ovlivněn gastrointestinálním parazitismem než metabolismus energie (Coop & Kyriazakis 1999). V důsledku toho se studie zaměřují na výhody suplementování bílkovin. Bylo navrženo, že strategie imunonutriceutik může přinést výhody, protože zlepšení krmné dávky vedoucí k větší odolnosti může snižovat dopady subklinických infestací a posilovat imunitní odpověď (Hoste et al. 2008).

Celosvětově se vzrůstající výskyt rezistence anthelmintik stal podnětem k průzkumu využití rostlin a jejich extraktů jako alternativního přístupu k eliminaci gastrointestinálních hlístic u přežvýkavců. Tyto léčivé rostliny jsou relativně cenově dostupné, přijímány zemědělci a jsou dostupné lokálně (Athanasiadou et al. 2007; Hoste et al. 2011).

4 Metodika

Testy viability larev *Haemonchus contortus* byly prováděny v parazitologické laboratoři katedry zoologie a rybářství FAPPZ ČZU. Larvy L₃ byly získávány z Univerzity Hradce Králové.

V další fázi experimentu byly larvy kultivovány do stádia L₄ metodou *in vitro*. Založení kultivace probíhalo modifikací dle Yilmaz et al (2017). Použitý kmen larev *H. contortus* byl ISE Inbred Susceptible Edinburgh, MHco3). Samostatná kultivace spočívala v simulování podmínek trávicího traktu malých přežvýkavců. Bylo odebráno 30 ml suspenze obsahující larvy ve stádiu L₃ z kultivační nádoby, ve které byly larvy skladovány v lednici při 4 °C. Do této suspenze byl pipetou přidán 1 ml chlornanu draselného (12% NaClO) a následně byla vložena do třepačky na 15 minut při teplotě 37 °C a intenzitou třepání v počtu 185 pohybů za minutu. Bylo nutné zkontrolovat pod mikroskopem, zda larvy svlékly kutikulu. Poté byla suspenze stočená v centrifuze na 500 g po dobu 5 minut, pipetou odsána tekutina a dvakrát propláchnuta v PBS. Propláchnutí probíhalo v 30 ml PBS a nastavení centrifugy bylo stejné a stočení probíhalo ihned po přidání PBS. Následně byly larvy umístěny do proplachovacího média.

Při práci v prostředí sterilního boxu byly dodržovány tyto postupy: pracovní plocha byla vždy předem ošetřena UV světlem a poté očištěna dezinfekčním roztokem 70 %. Tímto roztokem byly omyty všechny věci, které byly používány ve sterilním boxu. Při pipetování se špičkou pipety se ničeho nedotýkalo. Po ukončení práce ve sterilním boxu byla pracovní plocha znovu očištěna roztokem ethanolu a box ošetřen UV světlem. Při manipulaci s titrační destičkou a termostatem vždy byly vydezinfikované ruce. Titrační destička byla otevíraná pouze ve sterilním prostředí boxu a odebraný materiál z titrační destičky, pro focení, nebyl vrácen zpět.

Příprava proplachovacího média probíhala ve sterilním prostředí ve flowboxu. Do 50 ml BME (Basal Medium Eagle) bylo přidáno 500 µl prestepu (penicilin + streptomycin ze 100x koncentráty) a 500 µl antibiotika-antimykotika (penicilin + amphotericin B ze 100x koncentráty). Ve sterilním prostředí bylo následně odsáno PBS ze zkumavky a bylo doplněno proplachovací médium. Zkumavka byla přemístěna do termostatu na dobu 2 hodin při 37 °C a 5% CO₂.

Příprava kultivačního média spočívala v smíchání 440 ml BME, 50 ml FBS, 5 ml antibiotik-antimykotik a 5 ml penstrep.

Po 2 hodinách byly larvy centrifugovány při 500 g po dobu 5 minut. Následně bylo odsáto proplachovací médium těsně nad larvy. Do této zkumavky bylo připipetováno kultivační médium v množství 6 ml. Do dvou jamek bylo dáno pouze čisté médium bez larev pro kontrolu, tyto jamky vždy byly označeny křížkem. Pro rovnoměrné rozdělení larev byly larvy promíchány pipetou před pipetováním do každé jamky.

Titrační destička byla zakryta víčkem, popsána a vložena zpět do termostatu při 37 °C a 5% CO₂. Každý den byl kontrolován stav média v kultivaci, především jeho barva, pokud začalo zesvětlovat, bylo nutné médium vyměnit. Opět za sterilních podmínek ve sterilním boxu bylo opatrně odsáto médium od hladiny až k larvám a následně doplněno novým.

Doba kultivace je přibližně 8-14 dní. Poté byly larvy v kultivační destičce spočítány a vyfotografovány. Následně byla do titrační destičky připipetována anthelmintika do celkového objemu 200 µl, konkrétně ivermektin Aglycon, moxidexin a benzimidazol (thiabendazol).

Tento test byl založen ve 3 opakováních pro každou koncentraci léčiva a tři jamky byly ponechány pouze s médiem pro kontrolu. Během testu byly pořizovány fotografie procesu.

4.1 Příprava roztoku ivermektinu

Pro testy viability byly potřebné roztoky ivermektinu o různých koncentracích. Na přípravu zásobního roztoku ivermektinu bylo smícháno 8,75 mg ivermektinu v 1 ml DMSO (dimethylsulfoxid) ve výsledné koncentraci 10 mM. Ze zásobního roztoku o koncentraci 10 mM byly naředěny koncentrace 1 mM, 100 uM, 10 uM a 1 uM.

$$c = \frac{n}{V} = \frac{\frac{m}{M}}{V} = \frac{m}{M \cdot V} \Rightarrow m = c \cdot M \cdot V$$

m (ivermektin) = $c \cdot M \cdot V$ 10 mM . 875,1 g/mol . 1 ml = 0,01 M . 875,1 g/mol . 0,001 L
= 0,008751 g = 8,75 mg

Tabulka č. 1: Koncentrace ivermektinu

Výsledná koncentrace v jamce	Pipetování do jamek	Označení koncentrace
3 uM	6 ul ze 100 uM zásobního roztoku + 194 ul média s <i>H. contortus</i>	konc. 1
2,5 uM	5 ul ze 100 uM zásobního roztoku + 195 ul média s <i>H. contortus</i>	konc. 2
2 uM (IC ₅₀)	4 ul ze 100 uM zásobního roztoku + 196 ul média s <i>H. contortus</i>	konc. 3
1,5 uM	3 ul ze 100 uM zásobního roztoku + 197 ul média s <i>H. contortus</i>	konc. 4
1 uM	2 ul ze 100 uM zásobního roztoku + 198 ul média s <i>H. contortus</i>	konc. 5
0,1 uM	2 ul ze 10 uM zásobního roztoku + 198 ul média s <i>H. contortus</i>	konc. 6
0,01 uM	2 ul ze 1 uM zásobního roztoku + 198 ul média s <i>H. contortus</i>	konc. 7

4.2 Příprava zásobního roztoku moxidexinu

Pro přípravu zásobního roztoku bylo použito 6,4 mg moxidexinu, které byly rozpuštěny 1 ml DMSO, výsledná koncentrace tohoto zásobního roztoku byla 1 mM. Dalšími naředěnými koncentracemi z 10 mM byly 1 mM, 100 uM a 10 uM.

$$m (\text{moxidektin}) = c \cdot M \cdot V = 10 \text{ mM} \cdot 639,82 \text{ g/mol} \cdot 1 \text{ ml} = 0,01 \text{ M} \cdot 639,82 \text{ g/mol} \cdot 0,001 \text{ L} = 0,006398 \text{ g} \approx 6,4 \text{ mg}$$

Tabulka č. 2: Koncentrace moxidektinu

Výsledná koncentrace v jamce	Výsledná koncentrace v jamce	Označení koncentrace
0,5 uM	10 ul ze 10 uM zásobního roztoku + 190 ul média s <i>H. contortus</i>	konc. 1
0,4 uM	8 ul ze 10 uM zásobního roztoku + 192 ul média s <i>H. contortus</i>	konc. 2
0,3 uM	6 ul ze 10 uM zásobního roztoku + 194 ul média s <i>H. contortus</i>	konc. 3
0,25 uM (IC ₅₀)	5 ul ze 10 uM zásobního roztoku + 195 ul média s <i>H. contortus</i>	konc. 4
0,2 uM	4 ul ze 10 uM zásobního roztoku + 196 ul média s <i>H. contortus</i>	konc. 5
0,15 uM	3 ul ze 10 uM zásobního roztoku + 197 ul média s <i>H. contortus</i>	konc. 6
0,1 uM	2 ul ze 10 uM zásobního roztoku + 198 ul média s <i>H. contortus</i>	konc. 7

4.3 Příprava zásobního roztoku Thiabendazolu

K přípravě zásobního roztoku Thiabendazolu bylo použito dvou pomocných roztoků A a B. Pro přípravu roztoku A bylo použito 50 mg TBZ a rozpuštěno v 5 ml 100 % DMSO. Pro přípravu roztoku B bylo použito 1 ml roztoku A a 9 ml 100% DMSO. Následně byly do lahvíček rozpipetovány v množství uvedeném v tabulce. Do jamek bylo následovně vždy pipetováno 1,9 μ l média s *H. contortus* a 0,1 μ l thiabendazolu.

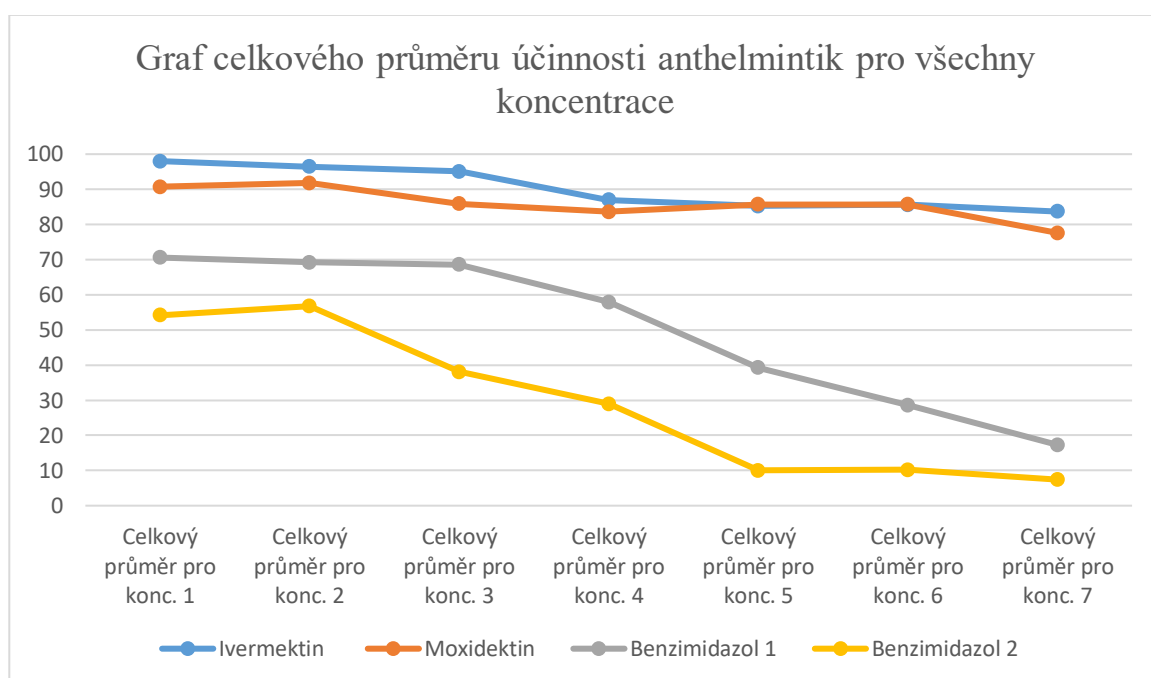
Tabulka č. 3: Koncentrace thiabendazolu

Výsledná koncentrace v jamce	100 % DMSO (ml)	Roztok B (μ l)
0,5 uM	9	1000
0,3 uM	9,4	600
0,2 uM	9,6	400
0,1 uM	9,8	200
0,05 uM	9,9	100
0,025 uM	9,95	50
0,01 uM	9,98	20

Výsledky byly zaznamenány v programu Microsoft Excel a následně zpracovány v programu Statistica 14.

5 Výsledky

V této diplomové práci je vyhodnocena účinnosti tří různých anthelmintik (ivermektin, moxidektin a thiabendazol) při eliminaci larválních stádií *H. contortus* L₃ a L₄. Každé z těchto anthelmintik bylo testováno v sedmi koncentracích. Cílem bylo vyhodnotit pomocí *in vitro* metody viabilitu larev *H. contortus* ve vybraných koncentracích ivermektinu (IVM), moxidektinu (MOX) a thiabendazolu (TBZ). V průběhu testu byly vyhodnoceny fenotypy larev v laboratorních podmínkách. Hodnocení účinnosti anthelmintik bylo provedeno sledováním změn v podílu larválních stádií po dobu tří po sobě následujících dnů. Výsledky těchto experimentů poskytují cenné informace o schopnosti jednotlivých anthelmintik eliminovat larvy *H. contortus*.



Obrázek č. 1: Graf celkového průměru účinnosti anthelmintik pro všechny koncentrace

Z grafu č. 1 je patrné, že nejúčinnějším anthelmintikem je ivermektin, který vykazuje významné snížení počtu živých larev. Moxidektin také prokázal účinnost na srovnatelné úrovni jako ivermektin. Benzimidazol 2 má nejnižší účinnost ve srovnání s ostatními anthelmintiky. U benzimidazolu 1 není tak výrazné zvýšení počtu mrtvých larev, což může naznačovat menší účinnost tohoto anthelmintika na larvy L₄. Je důležité zdůraznit, že účinnost anthelmintik může být ovlivněna nejen koncentrací, ale také dalšími faktory, jako je odolnost parazitů nebo jejich stářím.

Variable	Descriptive Statistics (List1)				
	Valid N	Mean	Minimum	Maximum	Std.Dev.
Ivermektin	7	90,14963	83,67347	98,01980	6,08925
Moxidektin	7	85,86854	77,61194	91,81818	4,68762
Benzimidazol 1	7	50,20714	17,30769	70,58824	21,76920
Benzimidazol 2	7	29,36822	7,40741	56,75676	21,07962

Obrázek č. 2: Výstup z programu Statistica

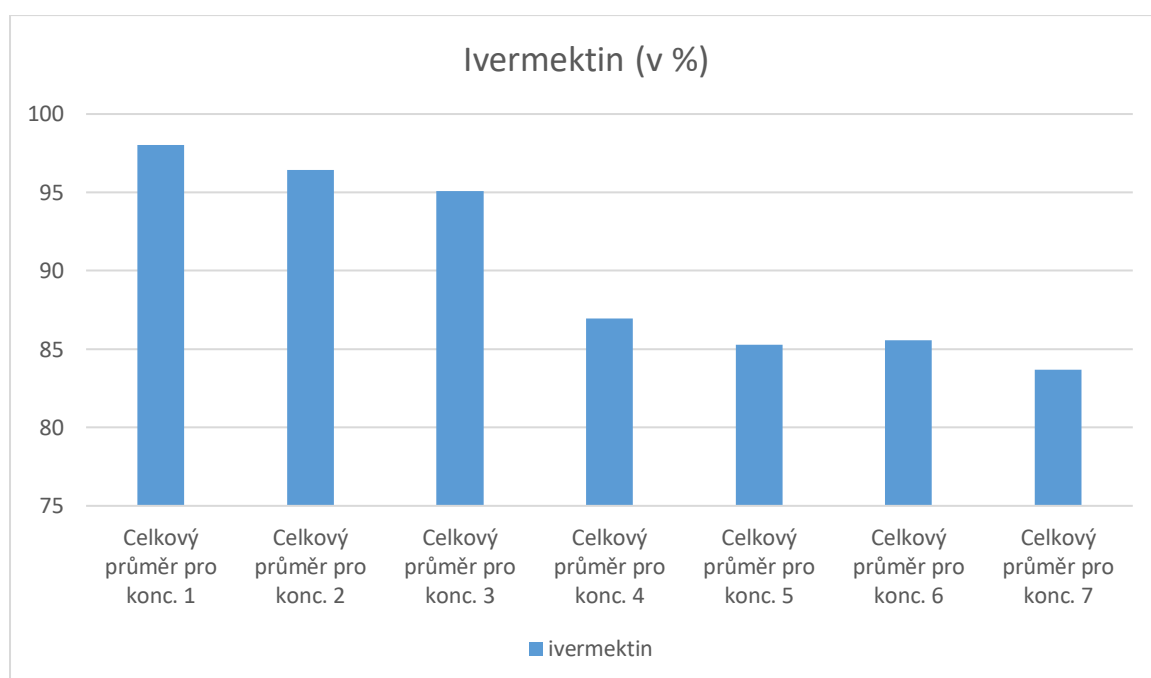
Pro proměnnou ivermektin bylo zaznamenáno 7 platných pozorování. Průměrná hodnota účinnosti je 90,15 s minimální hodnotou 83,67 a maximální hodnotou 98,02. Směrodatná odchylka je 6,09.

Stejně jako u ivermektinu bylo u moxidektinu také provedeno 7 platných pozorování. Průměrná účinnost tohoto léčiva je 85,87 s minimem 77,61 a maximem 91,82. Standardní odchylka je 4,67.

Pro proměnnou benzimidazol 1 bylo rovněž zaznamenáno 7 platných pozorování. Průměrná účinnost je 50,21 s minimem 17,31 a maximem 70,59. Standardní odchylka je 21,79.

Poslední proměnná benzimidazol 2, má opět 7 platných pozorování. Průměrná účinnost tohoto léčiva je nejnižší ze všech, s hodnotou 29,37. Minimální účinnost je 7,41 a maximální 56,76. Standardní odchylka je 21,08.

5.1 Ivermektin



Obrázek č. 3: Graf procentuální účinnosti IVM v eliminaci larev L₃ a L₄

Tento graf zobrazuje průměrné hodnoty procentuální účinnosti ivermektinu. Každý sloupec představuje průměr tří opakování testu dané koncentrace ivermektinu. Hodnoty jsou vyjádřeny v procentech. Z grafu vyplývá, že čím vyšší koncentrace ivermektinu tím vyšší účinnosti v eliminaci larev. Konkrétně koncentrace č. 1 je nejvyšší a dosahuje nejvyšší účinnosti v eliminaci larev, zatímco koncentrace č. 7 je nejnižší a dosahuje nejnižší účinnosti.

Před zahájením aplikace anthelmintik byly larvy spočítány, byl určen poměr L₃ a L₄ a byly pořízeny fotografie pro porovnání fenotypu larev. V grafu je zobrazeno, že s klesající koncentrací klesá i procentuální úspěšnost účinnosti anthelmintik. Po aplikaci anthelmintik do jamky se larvy začaly shlukovat v horní části jamky. L₄ po 24 hodinách začínají umírat, jejich počty se snižují. Larvy L₃ projevují spíše pomalejší pohyb, ale od koncentrace 4 jsou L₃ živější a larvy L₄ vypadají méně zasažené. Po 48 hodinách larvy projevují spíše pomalejší cukavý pohyb a larvy L₄ začínají vymírat. Jsou počítány pouze larvy, které mají minimálně zasažené struktury.

5.1.1 ANOVA

H0: neexistuje statisticky významný rozdíl mezi alespoň jednou dvojicí koncentrací ivermektinu.

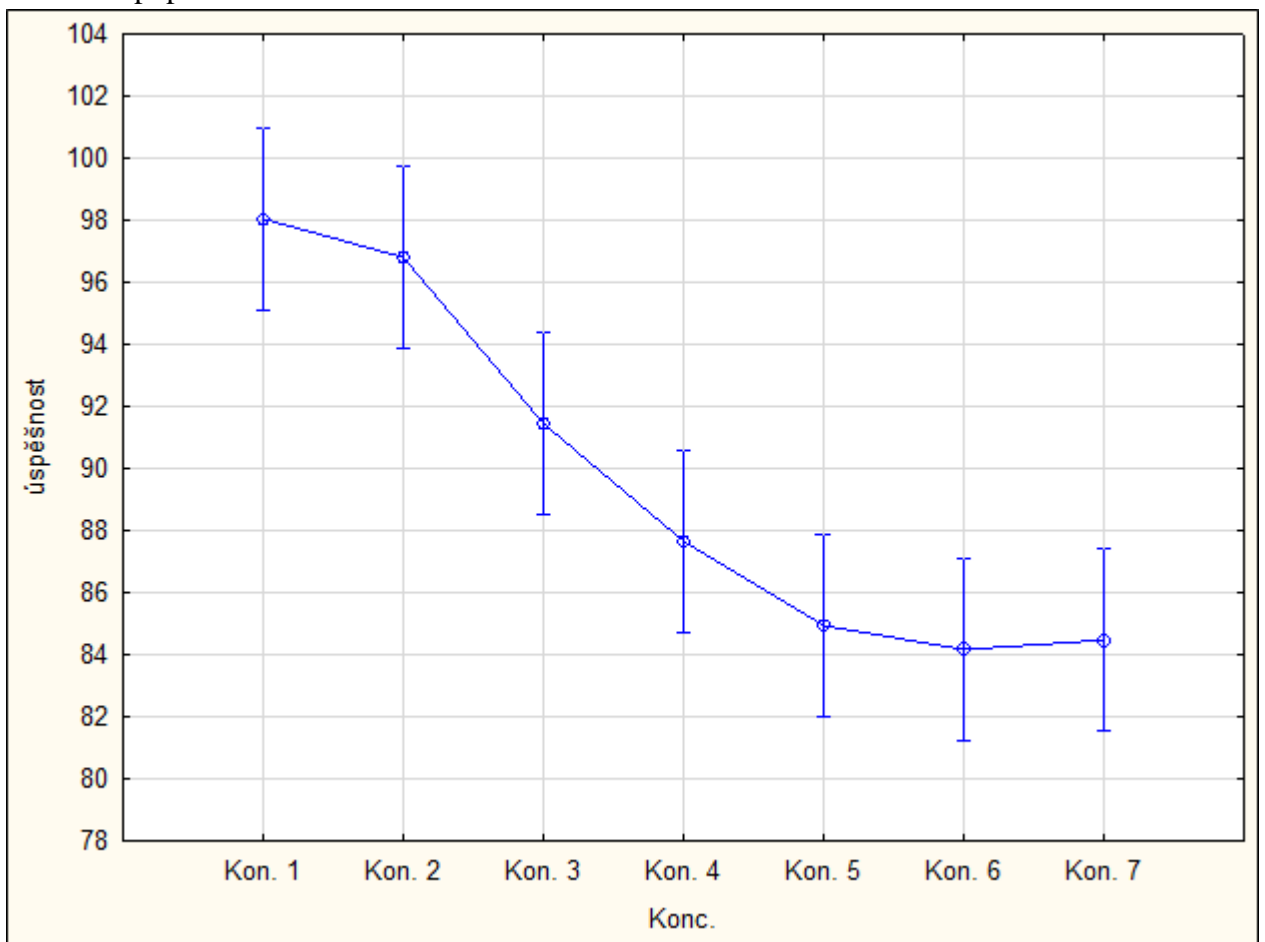
H1: existuje statisticky významný rozdíl alespoň mezi jednou dvojicí koncentrací ivermektinu.

Hladina významnosti alfa byla 0,05 a byla zvolena jednofaktorová ANOVA.

Univariate Tests of Significance for úspěšnost (ANOVA)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	168735,3	1	168735,3	30024,58	0,000000
Konc.	624,8	6	104,1	18,53	0,000006
Error	78,7	14	5,6		

Obrázek č. 4: Výstup z programu Statistica

Hodnota $F = 30024,58$ a p -hodnota $< 0,0001$ naznačují, že existují statisticky významné rozdíly mezi alespoň jednou dvojicí koncentrací ivermektinu v úspěšnosti snižování populace *H. contortus*. Tento výsledek ukazuje, že různé koncentrace ivermektinu mají různý účinek na eliminaci populace larev *H. contortus*.



Obrázek č. 5: Výstup z programu Statistica

Scheffe test; variable úspěšnost (ANOVA)								
Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = 5,6199, df = 14,000								
Cell No.	Konc.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
		98,043	96,798	91,439	87,653	84,927	84,148	84,459
1	Kon. 1		0,998254	0,143946	0,007352	0,000867	0,000484	0,000610
2	Kon. 2	0,998254		0,328534	0,020067	0,002265	0,001238	0,001573
3	Kon. 3	0,143946	0,328534		0,698851	0,153630	0,086597	0,109329
4	Kon. 4	0,007352	0,020067	0,698851		0,909641	0,764939	0,830624
5	Kon. 5	0,000867	0,002265	0,153630	0,909641		0,999881	0,999994
6	Kon. 6	0,000484	0,001238	0,086597	0,764939	0,999881		0,999999
7	Kon. 7	0,000610	0,001573	0,109329	0,830624	0,999994	0,999999	

Obrázek č. 6: Výstup z programu Statistica

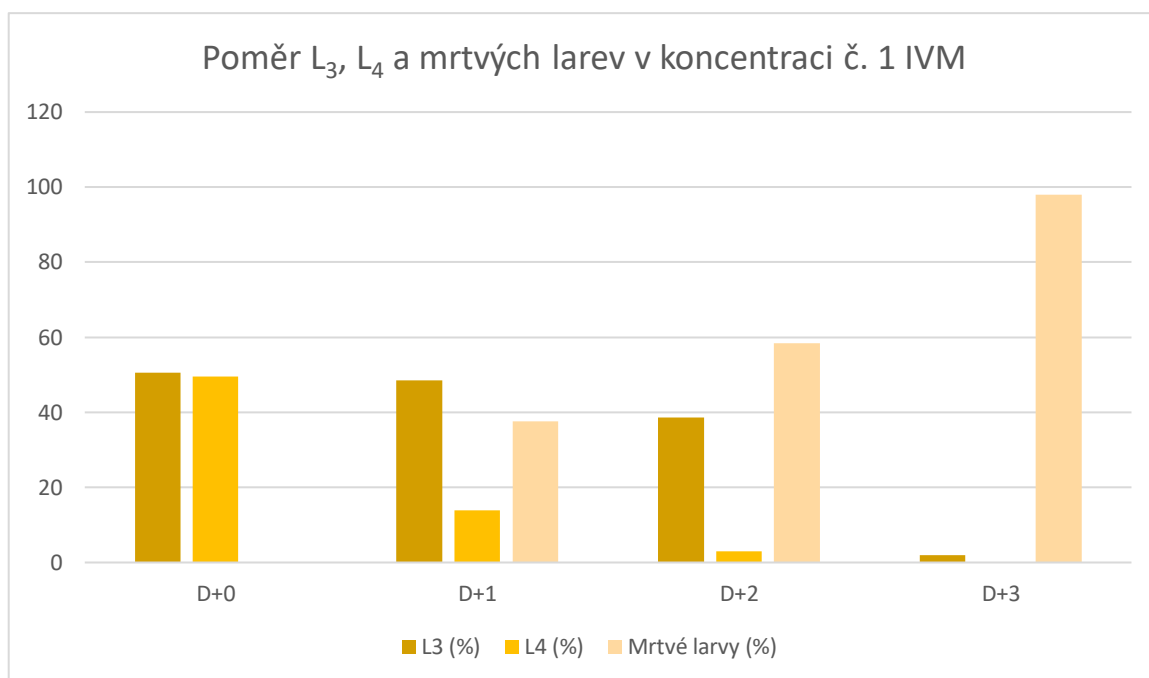
Tento obrázek zobrazuje výsledky Scheffeho testu, který slouží k zjišťování rozdílů průměrů mezi jednotlivými koncentracemi ivermektinu. Pravděpodobnosti pro post-hoc testy jsou zobrazeny v tabulce č. 6, která ukazuje, jak se konkrétní koncentrace liší od sebe. Pravděpodobnosti porovnání s ostatními koncentracemi jsou obecně velmi nízké. Vysoká pravděpodobnost mezi koncentracemi č. 1 a 2 (0,007352) naznačuje, že koncentrace č. 1 je statisticky podobná koncentraci č. 2 a vykazují tak vyšší účinnost než ostatní koncentrace, ale statisticky odlišná od ostatních koncentrací vykazujících nižší účinnost.

Pravděpodobnosti porovnání koncentrací č. 3-7 s ostatními jsou obecně vyšší než u koncentrací č. 1 a 2. To naznačuje, že tyto koncentrace mají méně významné rozdíly ve srovnání s ostatními koncentracemi. Například pravděpodobnosti mezi koncentracemi č. 3 a 4, 5, 6, 7 jsou větší než 0,05, což naznačuje, že tyto koncentrace jsou statisticky podobné.

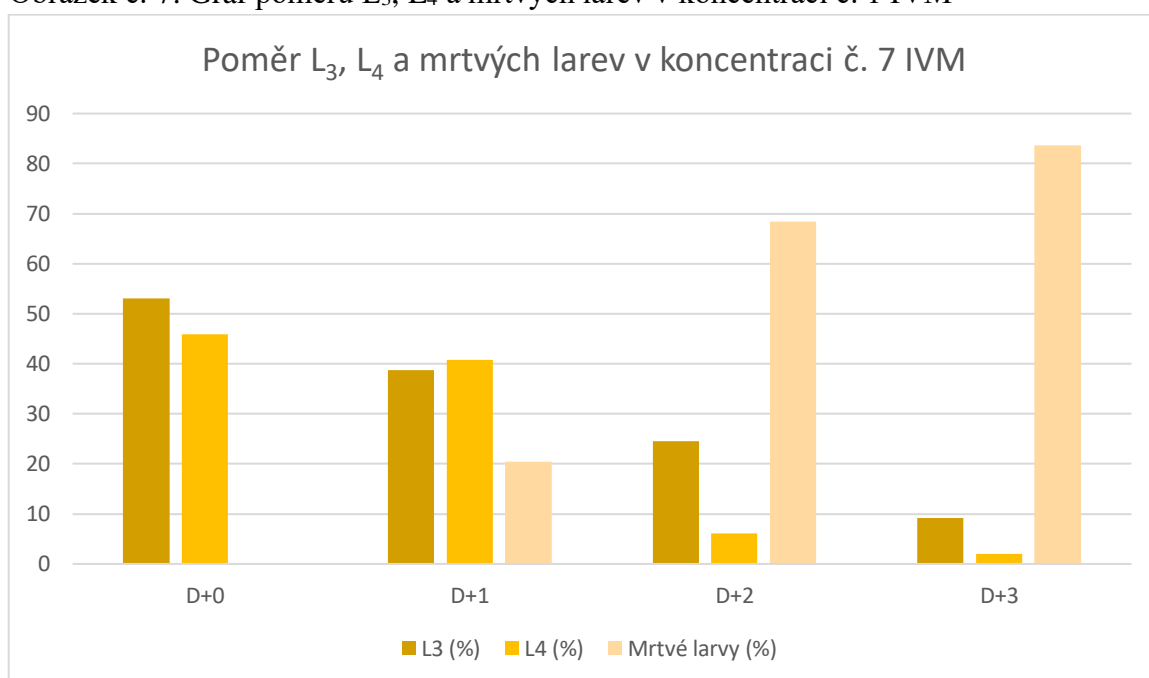
Celkově lze z těchto výsledků usoudit, že koncentrace č. 1 a 2 mají významně odlišnou účinnost ve srovnání s ostatními koncentracemi, zatímco ostatní koncentrace mají menší statistické rozdíly mezi sebou. Ivermektin nejlépe účinkoval v koncentraci č. 1.

5.1.2 Poměr larev L₃, L₄ a mrtvých larev v IVM

Následující grafy zobrazují poměr larev ve dvou fázích (L₃, L₄) a procentuální podíl mrtvých larev v průběhu testu viability larev *H. contortus* ve dvou vybraných koncentracích ivermektinu a to koncentraci č. 1 a 7. Na vodorovné ose pozorujeme postup času značený jako D+0, D+1, D+2, D+3. Grafy ukazují podobný trend zvyšujícího se procentuálního podílu mrtvých larev s časem po aplikaci ivermektinu. Nejvýraznější nárůst mrtvých larev je pozorován na D+3, což naznačuje postupný účinek ivermektinu. Na grafech je patrné, že po aplikaci ivermektinu dochází k postupnému snižování podílu larev ve fázích L₃ a L₄, což naznačuje účinnost ivermektinu při eliminaci larev.



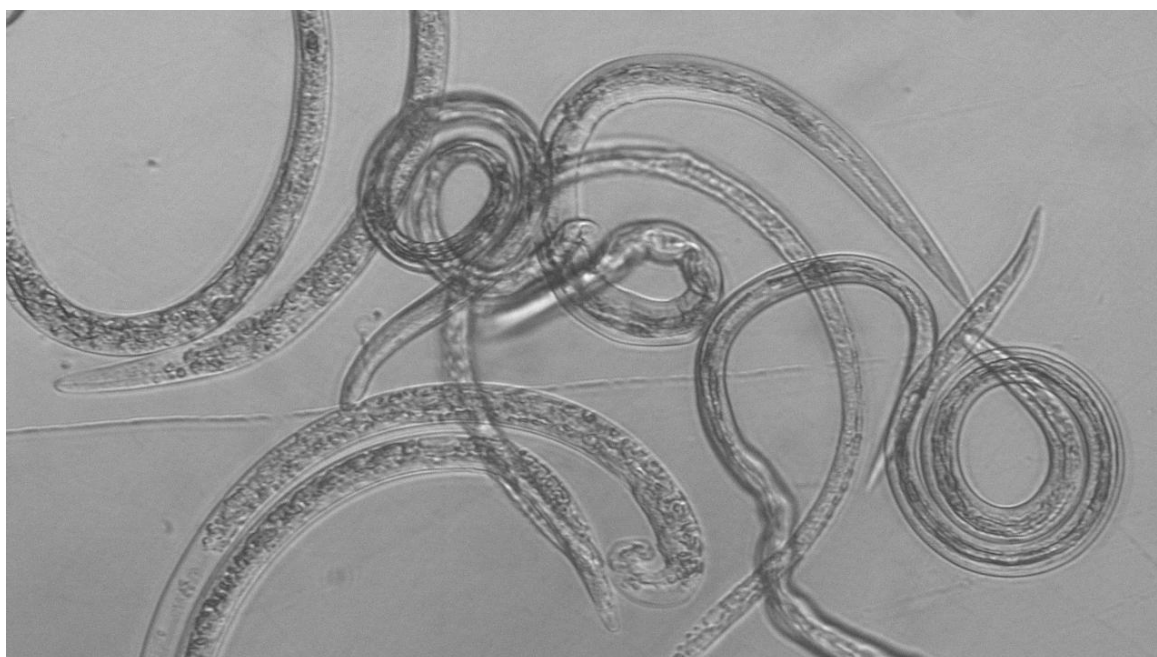
Obrázek č. 7: Graf poměru L₃, L₄ a mrtvých larev v koncentraci č. 1 IVM



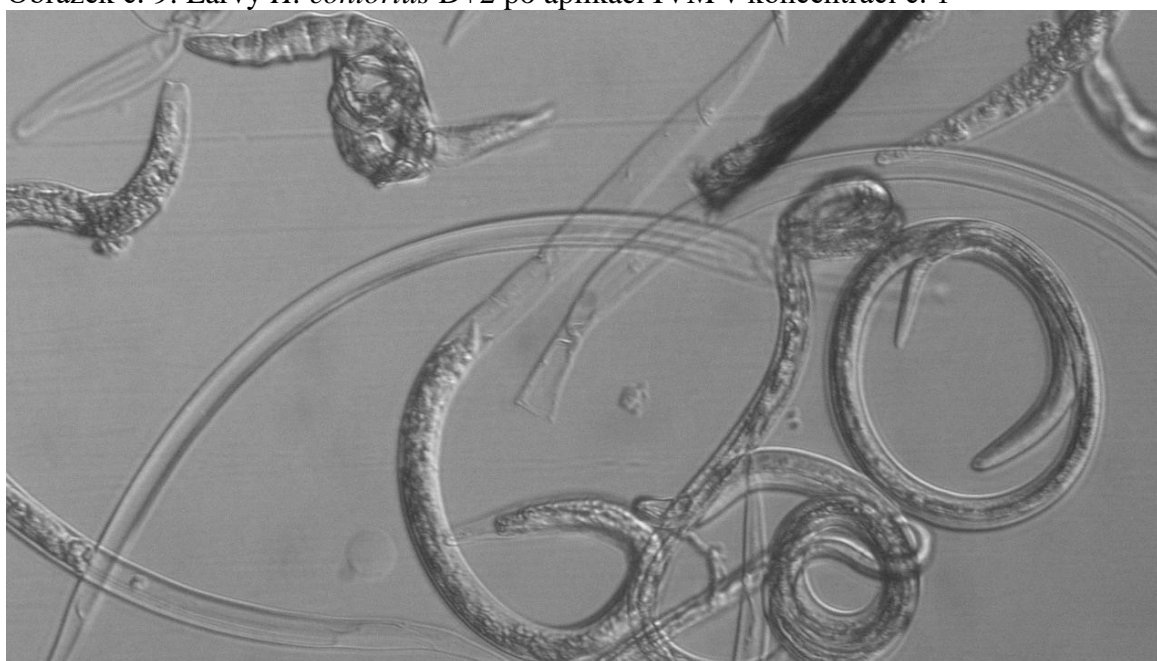
Obrázek č. 8: Graf poměru L₃, L₄ a mrtvých larev v koncentraci č. 7 IVM

Z grafu č. 7 a 13 je patrné, že po aplikaci anthelmintik časem narůstá procentuální podíl mrtvých larev. Zvláště třetí den po aplikaci je zaznamenán vysoký podíl mrtvých larev. Tento trend naznačuje, že účinek ivermektinu se projevuje postupně. Nicméně, zároveň lze také vidět, že vyšší koncentrace anthelmintik vede k rychlejší eliminaci larev a vyšší úspěšnosti ve srovnání se slabšími koncentracemi. To naznačuje, že účinnost anthelmintik závisí na jejich koncentraci, a silnější dávky mohou mít intenzivnější účinek na *H. contortus*.

5.1.3 Fenotyp larev *H. contortus* po aplikaci IVM



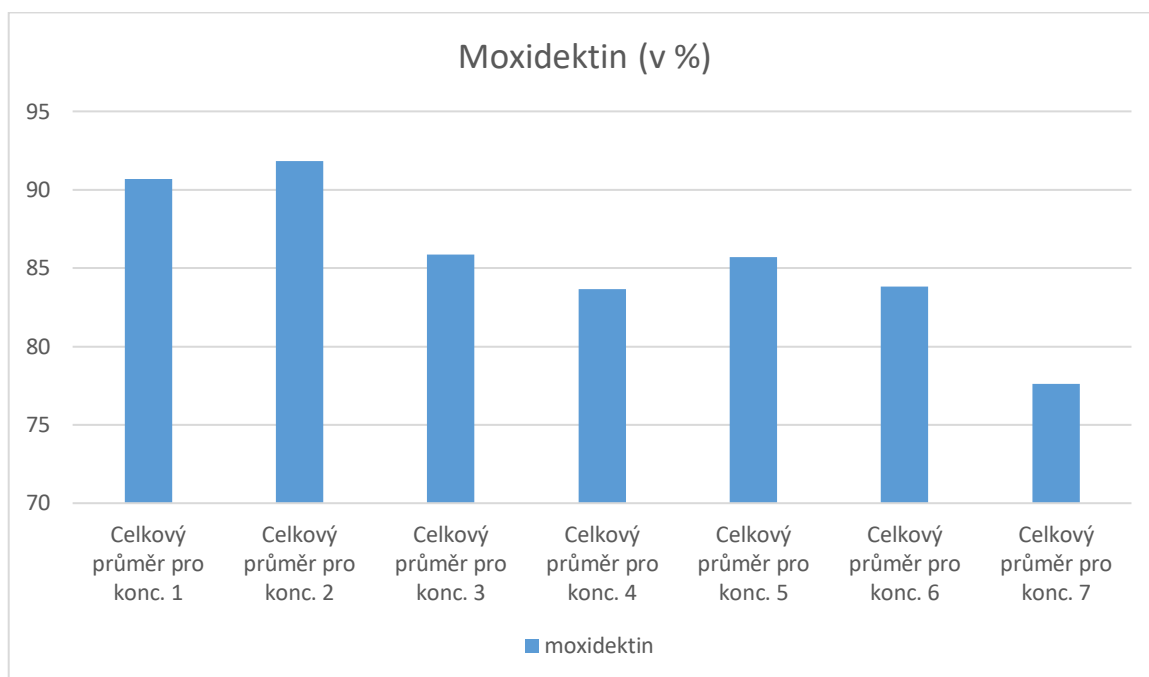
Obrázek č. 9: Larvy *H. contortus* D+2 po aplikaci IVM v koncentraci č. 1



Obrázek č. 10: Larvy *H. contortus* D+2 po aplikaci IVM v koncentraci č. 7

U ivermektinu bylo možno pozorovat, že larvy L_4 po 24 hodinách začínají umírat, jejich počty se snižují. Larvy L_3 projevují spíše pomalejší pohyb, ale od koncentrace 4 jsou L_3 pohyblivější a larvy L_4 vypadají méně zasažené. Po 48 hodinách larvy projevují spíše pomalejší cukavý pohyb a larvy L_4 začínají vymírat. Jsou počítány pouze larvy, které mají minimálně zasažené struktury. U ivermektinu bylo patrné větší poškození uvnitř larvy. Lze pozorovat jak zrnitou strukturu, tak poškození tvaru larev.

5.2 Moxidektin

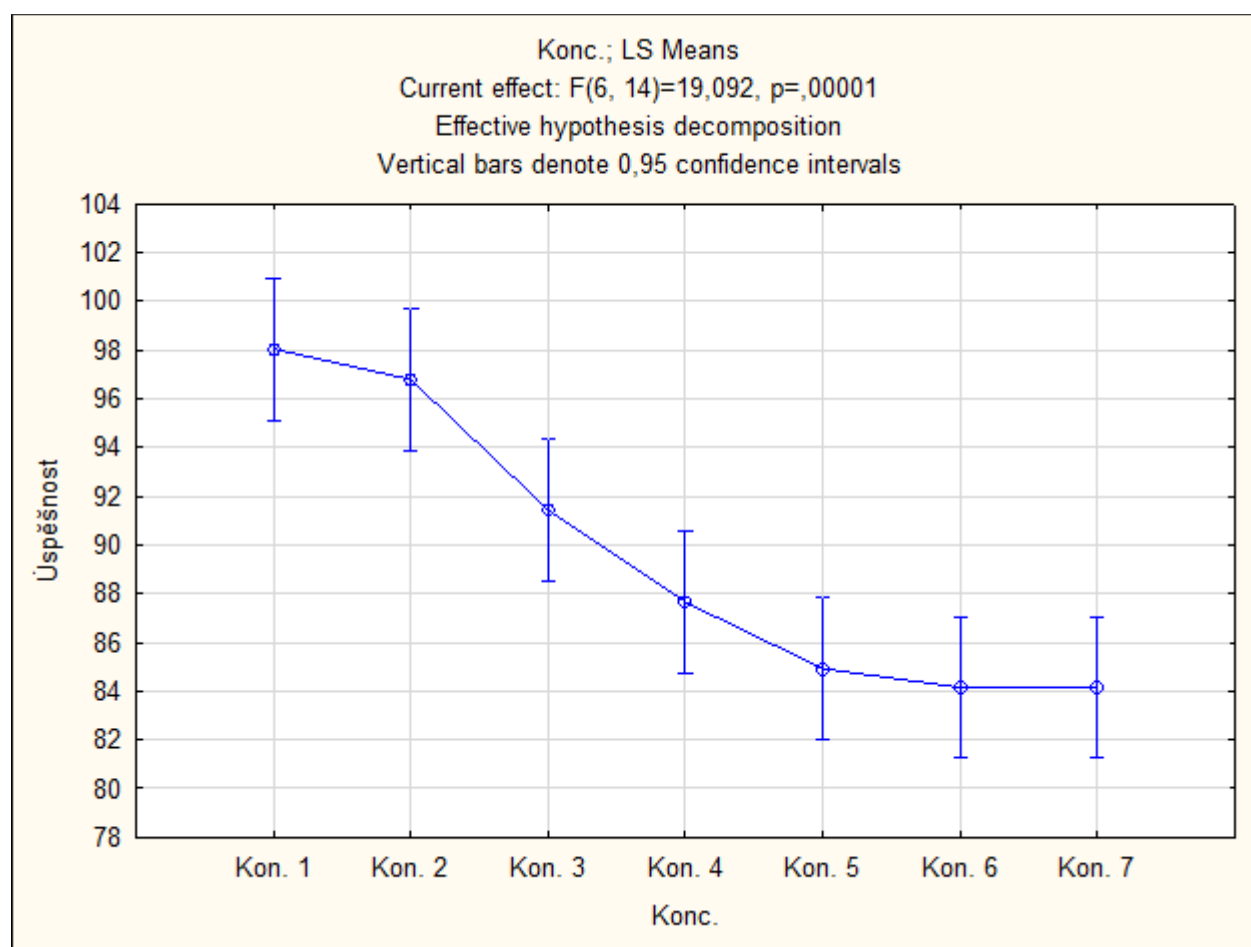


Obrázek č. 11: Graf procentuální účinnost moxidektinu v eliminaci larev L_3 a L_4

Tento graf prezentuje průměrné hodnoty procentuální úspěšnosti moxidektinu. Každý sloupec reprezentuje průměr tří opakování testu dané koncentrace moxidektinu. Hodnoty jsou udávány v procentech. Z grafu je patrné, že s rostoucí koncentrací moxidektinu roste i míra úspěšnosti v eliminaci larev *H. contortus*.

Z grafu lze vyčíst, že účinnost moxidektinu v eliminaci larev byla největší při koncentraci č. 2. Tato koncentrace dosáhla v grafu nejvyšší průměrné procentuální úspěšnosti v eliminaci larev. Zároveň je patrné, že s rostoucí koncentrací moxidektinu tendence k vyšší účinnosti roste, což odpovídá očekávanému účinku anthelmintik. Nicméně, koncentrace vyšší než č. 2 nevykazují výrazný nárůst účinnosti, což naznačuje, že koncentrace č. 2 byla optimální pro dosažení maximální účinnosti. Tento výsledek může být důležitý pro výběr vhodné koncentrace moxidektinu pro efektivní kontrolu infekce způsobené *H. contortus*.

5.2.1 ANOVA MOX



Obrázek č. 12: Výstup z programu Statistica

Graf zobrazuje grafické znázornění průměrné účinnosti aplikace moxidektinu v jednotlivých koncentracích. Graf ukazuje, že s klesající koncentrací moxidektinu klesá i účinnost v eliminaci larev.

H0: neexistuje statisticky významný rozdíl mezi alespoň jednou dvojicí koncentrací moxidektinu.

H1: existuje statisticky významný rozdíl alespoň mezi jednou dvojicí koncentrací moxidektinu.

Hladina významnosti alfa byla 0,05 a byla zvolena jednofaktorová ANOVA.

Effect	Univariate Tests of Significance for Úspěšnost (ANOVA) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition				
	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	168568,4	1	168568,4	30425,37	0,000000
Konc.	634,7	6	105,8	19,09	0,000005
Error	77,6	14	5,5		

Obrázek č. 13: Výstup z programu Statistica

Tato tabulka poskytuje výsledky analýzy rozptylu (ANOVA) pro úspěšnost aplikace moxidektinu v různých koncentracích. Sumy čtverců (SS), stupně volnosti (Degrees of Freedom), střední kvadrát (MS), hodnota F a p-hodnota jsou uvedeny pro efekt koncentrace (Kconc.). P-hodnota je $<0,0001$, což naznačuje, že existují statisticky významné rozdíly mezi alespoň jednou dvojicí koncentrací moxidektinu v úspěšnosti působení na larvy *H. contortus*.

		Scheffe test; variable Úspěšnost (ANOVA) Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS = 5,5404, df = 14,000						
Cell No.	Konc.	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
		98,043	96,798	91,439	87,653	84,927	84,148	84,148
1	Kon. 1		0,998183	0,139138	0,006926	0,000807	0,000450	0,000450
2	Kon. 2	0,998183		0,321080	0,019037	0,002119	0,001155	0,001155
3	Kon. 3	0,139138	0,321080		0,692267	0,148614	0,083232	0,083232
4	Kon. 4	0,006926	0,019037	0,692267		0,906891	0,759270	0,759270
5	Kon. 5	0,000807	0,002119	0,148614	0,906891		0,999876	0,999876
6	Kon. 6	0,000450	0,001155	0,083232	0,759270	0,999876		1,000000
7	Kon. 7	0,000450	0,001155	0,083232	0,759270	0,999876	1,000000	

Obrázek č. 14: Výstup z programu Statistica

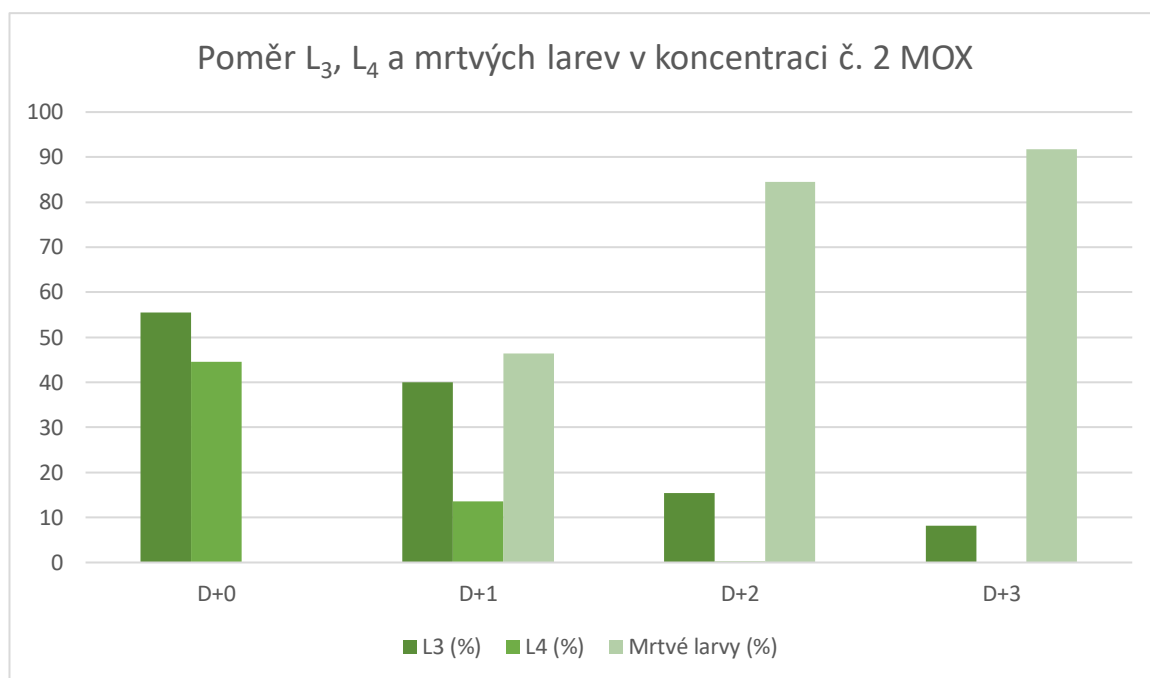
Scheffeho test poskytuje další detaily o rozdílech mezi jednotlivými koncentracemi moxidektinu. Pravděpodobnosti porovnání mezi koncentracemi jsou uvedeny v tabulce. Nižší hodnoty pravděpodobnosti ($<0,05$) naznačují statisticky významné rozdíly mezi koncentracemi. Lze říct, že koncentrace č. 1 se statisticky významně liší od většiny ostatních koncentrací. U koncentrace č. 2 podobně jako u koncentrace 1 jsou pravděpodobnosti porovnání s ostatními koncentracemi velmi nízké. To naznačuje, že koncentrace č. 2 je také statisticky významně odlišná od většiny ostatních koncentrací.

Pravděpodobnosti porovnání koncentrací č. 3-7. s ostatními jsou obecně vyšší než u koncentrací č. 1 a 2. To naznačuje, že tyto koncentrace mají menší statistické rozdíly ve srovnání s koncentracemi č. 1 a 2. Mezi nimi jsou malé rozdíly, ale žádná z koncentrací zcela oddělena od ostatních.

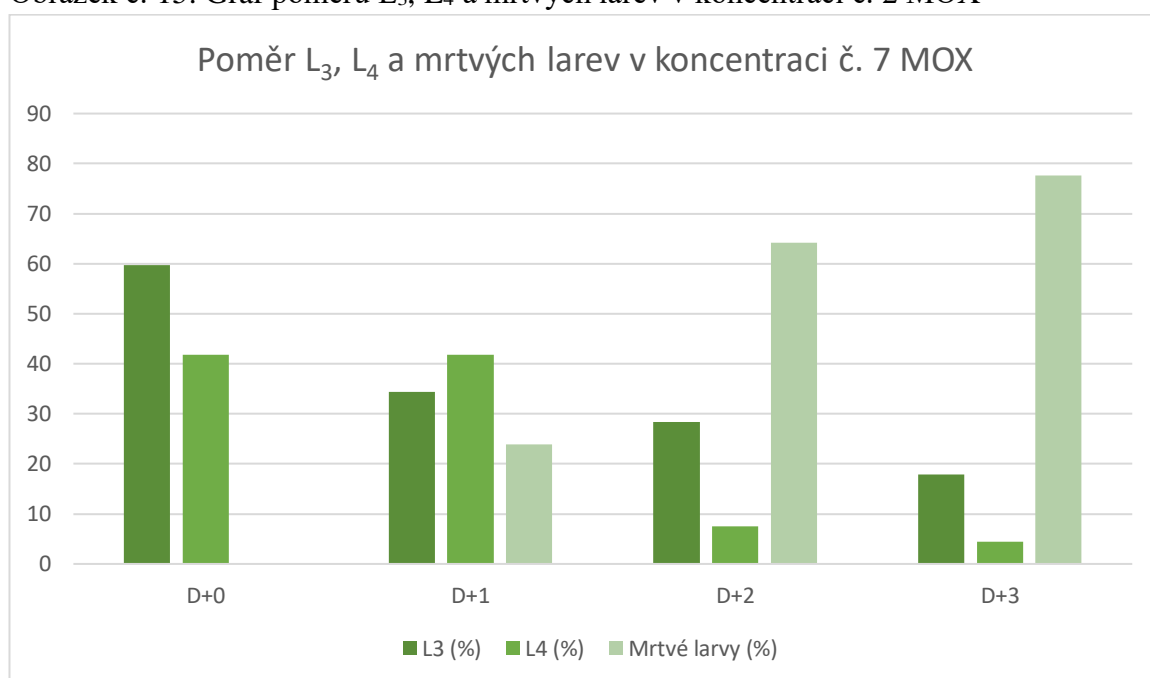
Celkově lze říci, že koncentrace č. 1 a 2 mají statisticky významné rozdíly ve srovnání s ostatními koncentracemi, které jsou si statisticky podobné. To naznačuje, že koncentrace č. 1 a 2 jsou pravděpodobně nejúčinnější při eliminaci larev *H. contortus*.

5.2.2 Poměr larev L₃, L₄ a mrtvých larev v MOX

V prezentovaných grafech je demonstrován vývoj larev *H. contortus* v závislosti na koncentraci anthelmintik v průběhu experimentu. Zjišťuje se poměr mezi larválními stádii L₃ a L₄ spolu s procentuálním zastoupením mrtvých larev v průběhu času a při různých koncentracích moxidektinu. Na začátku experimentu (D+0) je pozorována vyšší četnost stádia L₃, s postupujícím časem dochází k postupné eliminaci stádia L₄. Což vede ke zvýšení procenta mrtvých larev, což může být způsobeno různými faktory, jako je stárnutí kultivace nebo účinky moxidektinu. Dále je patrný vliv koncentrace moxidektinu na vývoj larev, tzn. že vyšší koncentrace vykazují vyšší mortalitu larev.



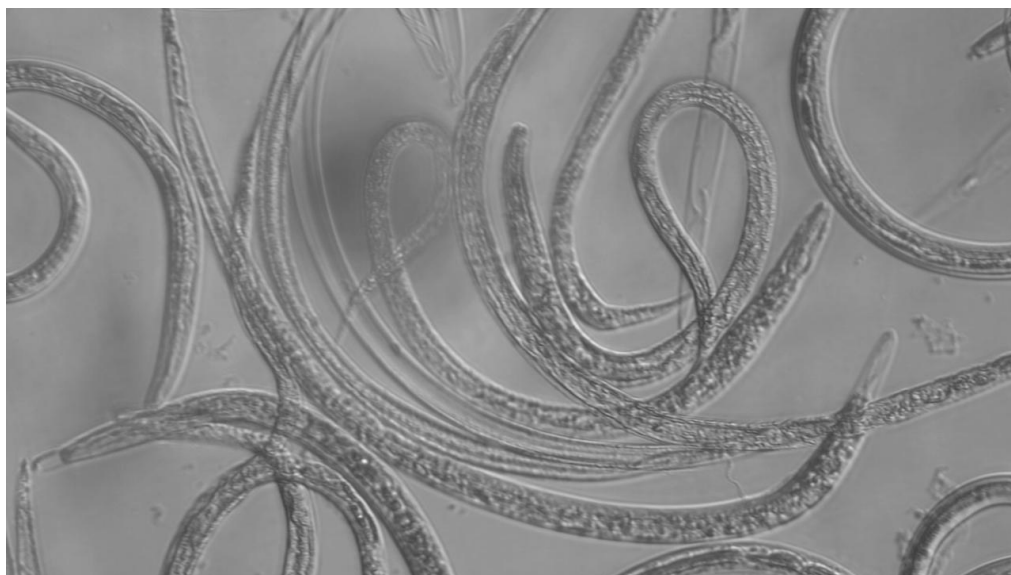
Obrázek č. 15: Graf poměru L₃, L₄ a mrtvých larev v koncentraci č. 2 MOX



Obrázek č. 16: Graf poměru L₃, L₄ a mrtvých larev v koncentraci č. 7 MOX

Analýza výsledků grafů č. 15 a 16 ukazuje postupný nárůst procentuálního podílu mrtvých larev po aplikaci moxidektinu. Zvláště v grafu č. 15 je patrný rychlý pokles larev L₄ již od prvního dne (D+1), zatímco v grafu s nejnižší koncentrací moxidektinu tento trend začíná až od D+2. Druhý den po aplikaci anthelmintiku v grafu č. 16 dochází k úplné eliminaci larev L₄.

5.2.3 Fenotyp larev *H. contortus* po aplikaci MOX



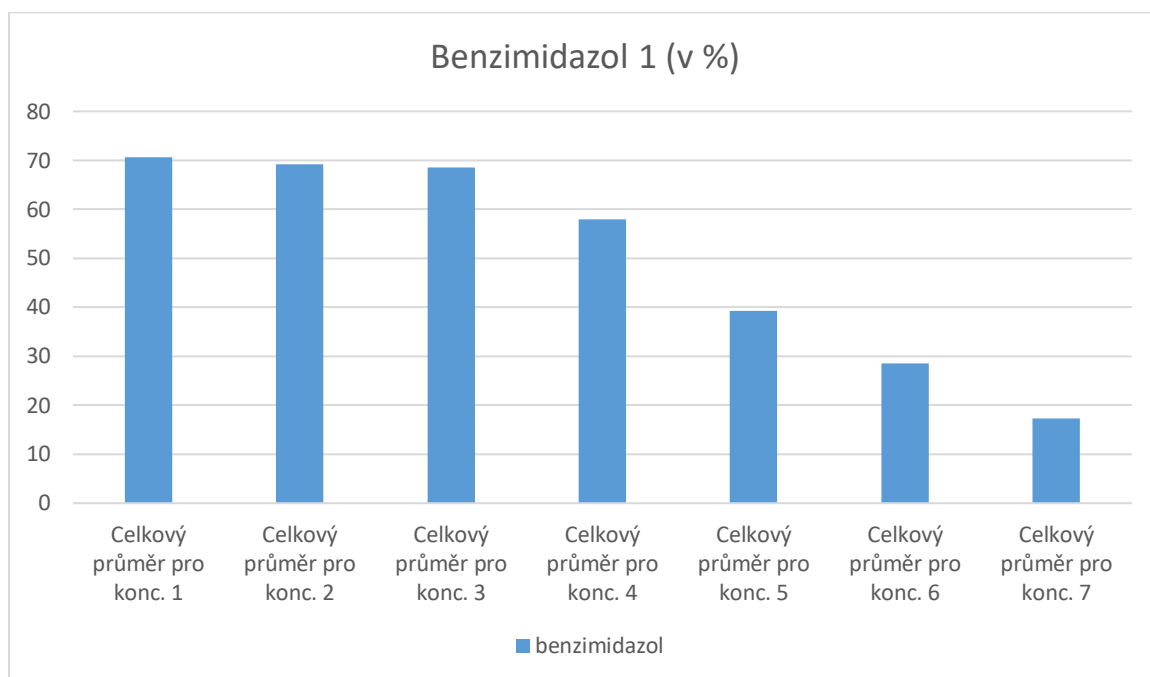
Obrázek č. 17: Larvy *H. contortus* D+2 po aplikaci MOX v koncentraci č. 2



Obrázek č. 18: Larvy *H. contortus* D+2 po aplikaci MOX v koncentraci č. 7

Po aplikaci moxidektinu do jamek se larvy začaly shlukovat v horní části jamky. Oproti ivermektinu byl patrný rozdíl v množství larev L₃ a L₄. S nižší koncentrací byla pozorována nižší mortalita. U moxidektinu bylo možno pozorovat poškození jak na povrchu, tak uvnitř larev. U larev L₃ i L₄ lze pozorovat narušení struktury, larvy mají pokroucený tvar a lze vidět deformace kutikuly.

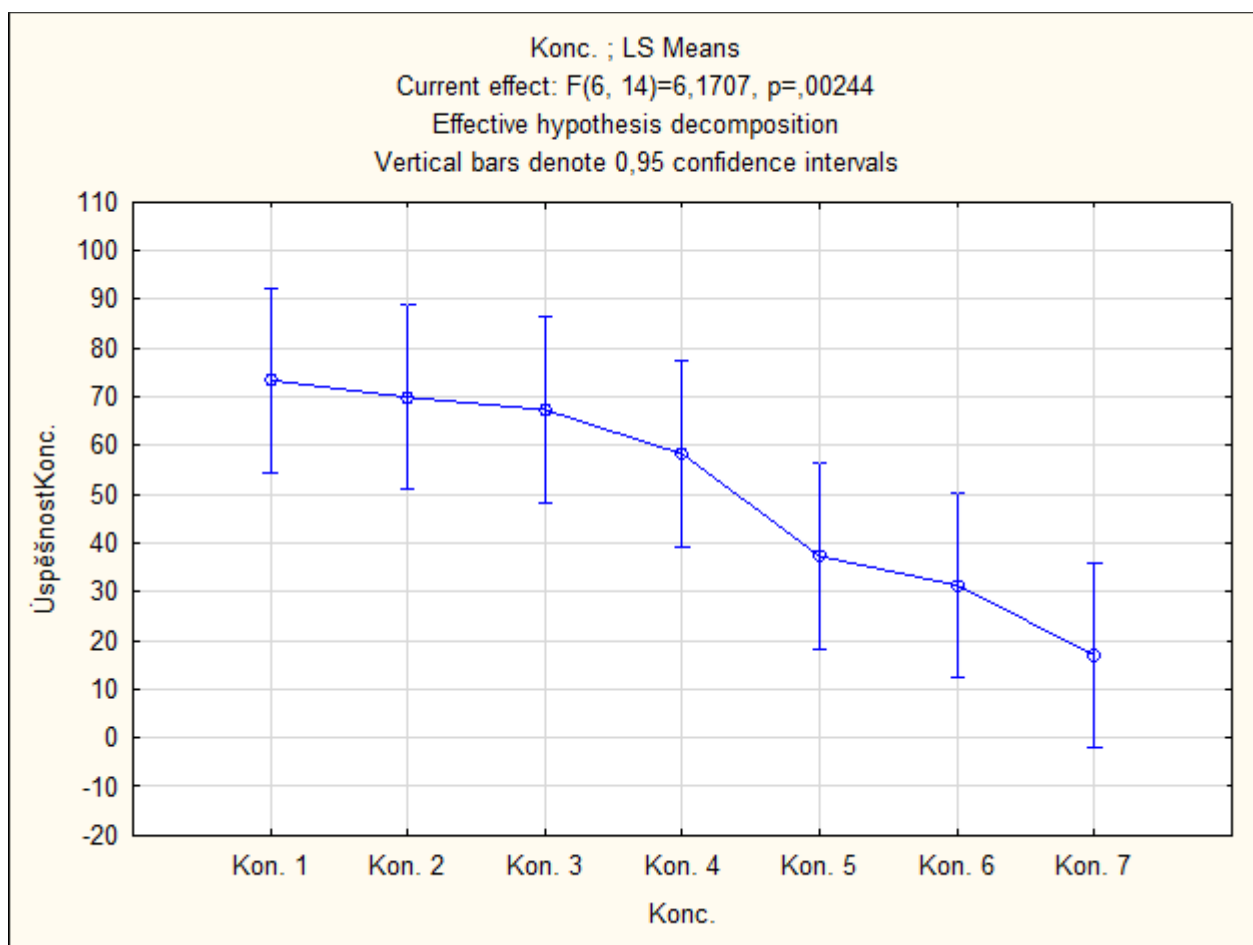
5.3 Benzimidazol



Obrázek č. 19: Graf procentuální účinnost BMZ1 v eliminaci larev L₃ a L₄

Graf č. 19 prezentuje průměrné hodnoty procentuální úspěšnosti aplikace benzimidazolu 1. Ve sloupcích lze vidět průměr tří opakování testů. Zjištění naznačují, že účinnost v odstranění larev *H. contortus* se zvyšuje s rostoucí koncentrací ivermektinu. Zvláště koncentrace č. 1-3 vykazují srovnatelné úspěšnosti, zatímco koncentrace č. 4-7 vykazují pokles v účinnosti, s koncentrací č. 7 dosahující nejnižších hodnot. To ukazuje na nedostatečnou účinnost nižších koncentrací v eliminaci *H. contortus*, zatímco vyšší koncentrace přispívají k vyšší mortalitě larev. Tento jev je pravděpodobně spojen s primárními oxicidními účinky anthelmintika.

5.3.1 ANOVA BMZ1



Obrázek č. 20: Výstup z programu Statistica

Graf ukazuje průměrnou úspěšnost aplikace benzimidazolu v jednotlivých koncentracích. Z grafu je patrné, že průměrná účinnost klesá se snižující se koncentrací benzimidazolu. Nejvyšší procentuální úspěšnost tedy vidíme u koncentrace č. 1. s hodnotou 70,59 %. Naopak nejnižší vidíme u koncentrace č. 7 s hodnotou 17,31 %.

H0: neexistuje statisticky významný rozdíl mezi alespoň jednou dvojicí koncentrací benzimidazolu 1.

H1: existuje statisticky významný rozdíl alespoň mezi jednou dvojicí koncentrací benzimidazolu 1.

Hladina významnosti alfa byla 0,05 a byla zvolena jednofaktorová ANOVA.

Univariate Tests of Significance for ÚspěšnostKonc. (ANOVA)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	53821,02	1	53821,02	228,1943	0,000000
B	8732,40	6	1455,40	6,1707	0,002438
Error	3301,99	14	235,86		

Obrázek č. 21: Výstup z programu Statistica Test Signifikace

Tato tabulka poskytuje výsledky analýzy rozptylu (ANOVA) pro účinnost aplikace benzimidazolu v různých koncentracích. Sumy čtverců (SS), stupně volnosti (Degrees of Freedom), střední kvadrát (MS), hodnota F a p-hodnota jsou uvedeny pro efekt koncentrace (benzimidazol). P-hodnota je 0,002438, což naznačuje, že existují statisticky významné rozdíly mezi alespoň jednou dvojicí koncentrací benzimidazolu v účinnosti eliminace populace larev *H. contortus*.

Scheffe test; variable ÚspěšnostKonc. (ANOVA)								
Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = 235,86, df = 14,000								
Cell No.	B	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
		73,370	69,902	67,306	58,252	37,300	31,303	16,942
1	Kon. 1		0,999987	0,999654	0,954655	0,289222	0,155732	0,028457
2	Kon. 2	0,999987		0,999998	0,987377	0,396371	0,225017	0,043591
3	Kon. 3	0,999654	0,999998		0,996696	0,488994	0,291075	0,059706
4	Kon. 4	0,954655	0,987377	0,996696		0,822709	0,606090	0,169132
5	Kon. 5	0,289222	0,396371	0,488994	0,822709		0,999675	0,840627
6	Kon. 6	0,155732	0,225017	0,291075	0,606090	0,999675		0,964385
7	Kon. 7	0,028457	0,043591	0,059706	0,169132	0,840627	0,964385	

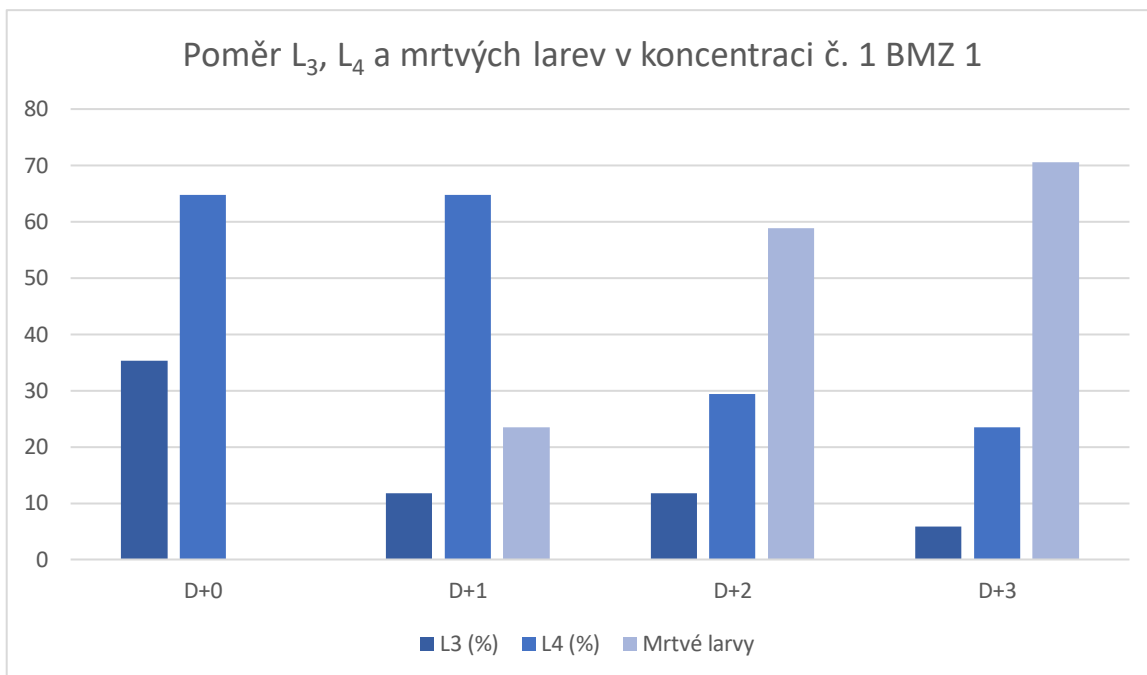
Obrázek č. 22: Výstup z programu Statistica

Scheffeho test poskytuje pravděpodobnosti porovnání mezi jednotlivými koncentracemi benzimidazolu. Pro koncentraci č. 1 a 2 platí, že pravděpodobnosti porovnání s ostatními koncentracemi jsou obecně velmi vysoké. To naznačuje, že koncentrace 1 a 2 jsou statisticky podobné většině ostatních koncentrací, pouze u koncentrace č. 7 jsou statisticky významně odlišné. U koncentrace 3-6 můžeme pozorovat, že pravděpodobnosti porovnání těchto koncentrací s ostatními jsou obecně vyšší než u koncentrace 1. To naznačuje, že tyto koncentrace jsou si statisticky podobné a mají menší rozdíly ve své účinnosti.

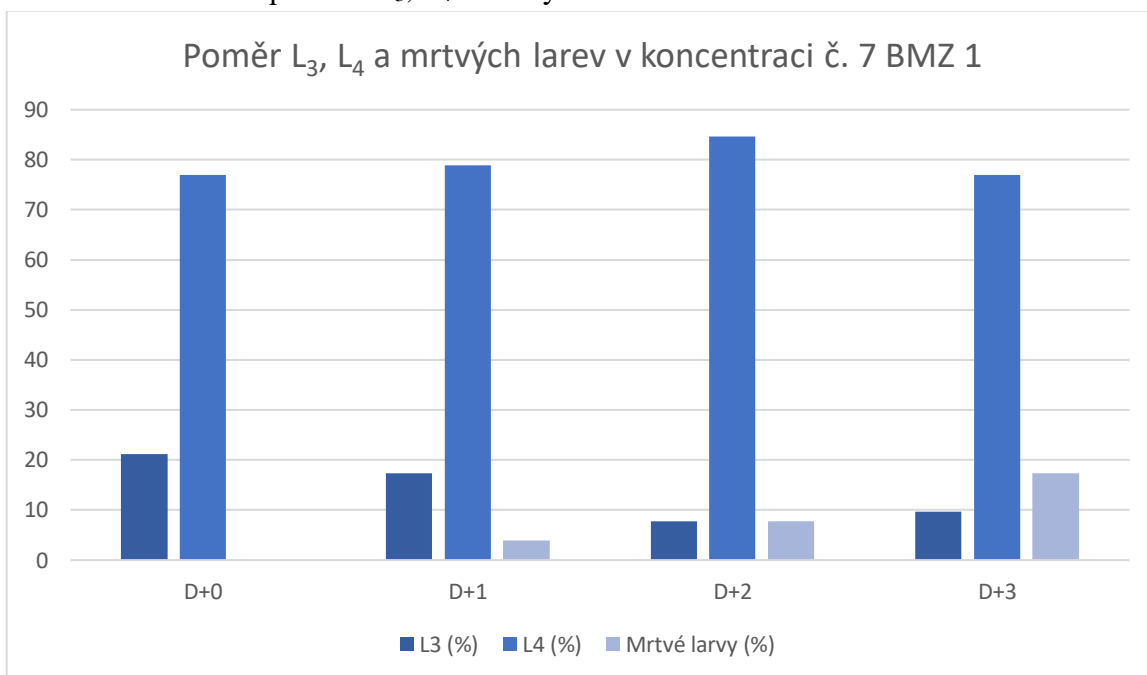
5.3.2 Poměr larev L₃, L₄ a mrtvých v BMZ1

Následující grafy zobrazují vývoj poměru larev L₃, L₄ a mrtvých larev *H. contortus* v průběhu tří dnů při použití různých koncentrací (označených jako 1-7). Při srovnání koncentrací mezi sebou lze pozorovat značné rozdíly v působení na životaschopnost parazita. Například u grafů č. 1 BMZ 1 je patrné, že vyšší koncentrace mají větší vliv na snížení počtu živých larev což zároveň zvyšuje poměr mrtvých larev v porovnání s nižšími koncentracemi.

Důležitým faktorem je také dynamika změn v poměru mezi larvami L₃ a L₄ v různých koncentracích. U některých koncentrací, jako je č. 1 BMZ 1, se může stát, že počet L₄ larev převyší počet L₃ larev, což může naznačovat, že daná koncentrace má silnější účinek na starší stádia larev, nebo že larvy L₃ nejsou schopny se v takhle silné koncentraci kultivovat do L₄. Naopak, u jiných koncentrací, jako je č. 7 BMZ 1, může být poměr L₄ larev vyšší, což může naznačovat, že larvy L₃ jsou schopny se kultivovat i v přítomnosti nízké koncentrace benzimidazolu v jamce.

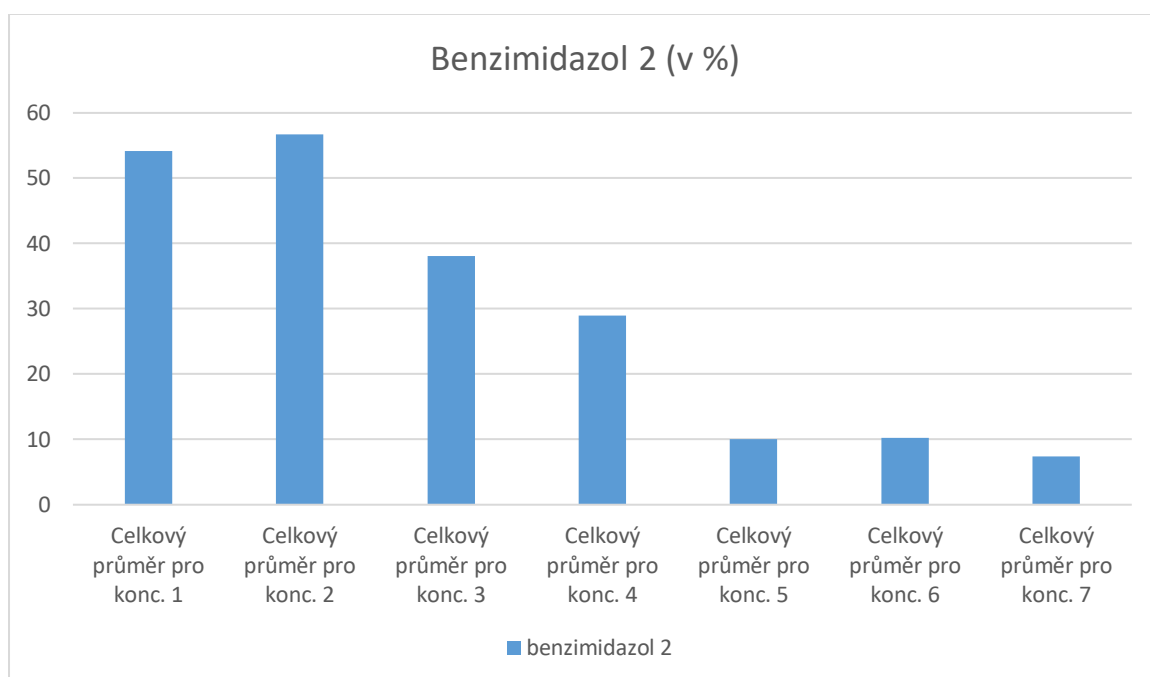


Obrázek č. 23: Graf poměru L₃, L₄ a mrtvých larev v koncentraci č. 1 BMZ1



Obrázek č. 24: Graf poměru L₃, L₄ a mrtvých larev v koncentraci č. 7 BMZ1

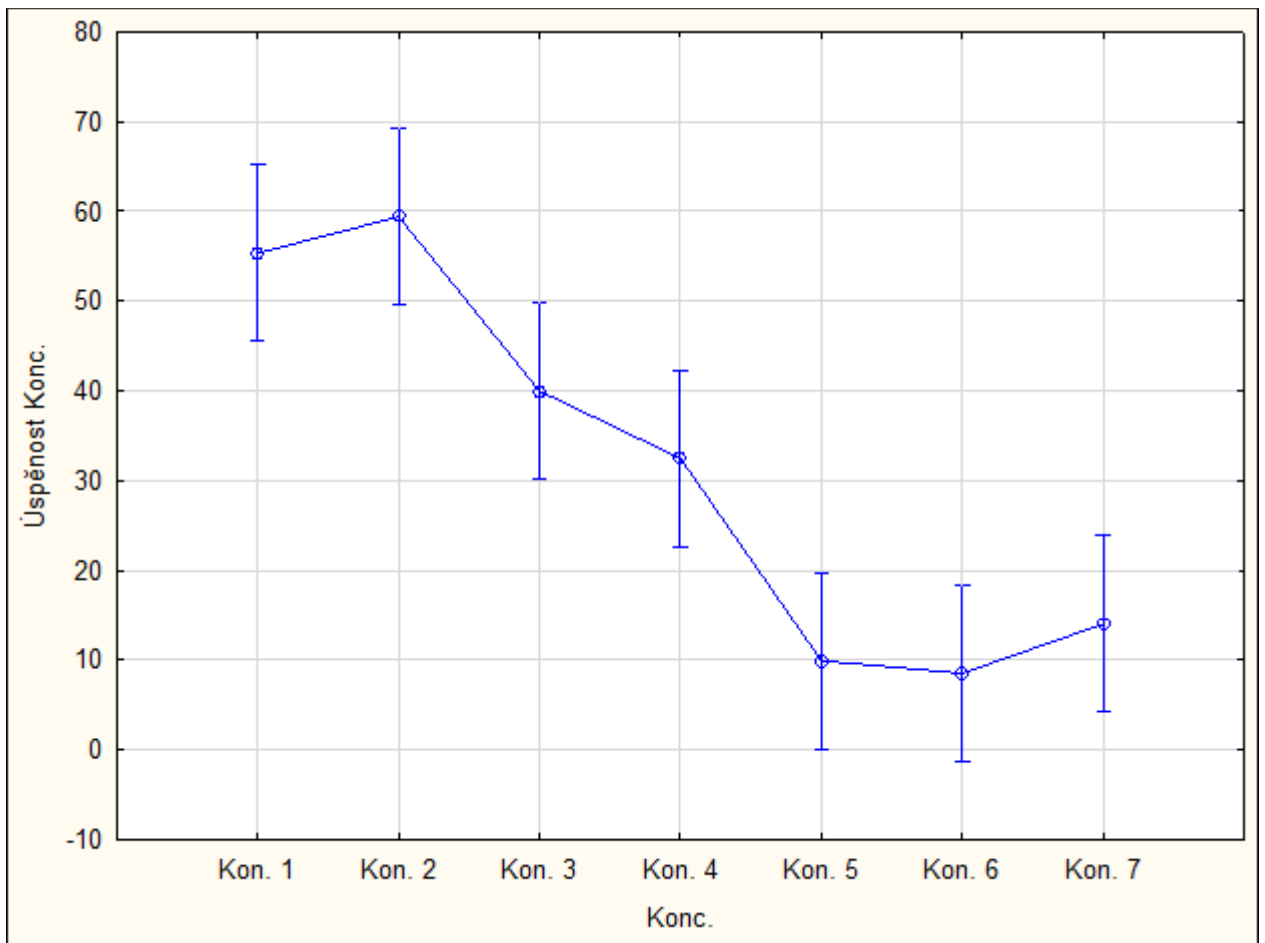
5.3.3 BMZ 2



Obrázek č. 25: Graf procentuální účinnost BMZ2 v eliminaci larev L_3 a L_4

Data prezentovaná v grafu č. 25 ukazují, že účinnost benzimidazolu 2 v eliminaci larev *H. contortus* se zvyšuje s rostoucí koncentrací benzimidazolu. Zejména vyšší koncentrace (č. 1-2) vykazují podobnou účinnost, zatímco nižší koncentrace (č. 3-7) ukazují výrazný pokles účinnosti, přičemž koncentrace č. 7 dosahuje nejnižších hodnot. Koncentrace 2 se jeví jako nejefektivnější, ale i tak je nedostatečná k efektivní eliminaci. Tento jev je pravděpodobně spojen s primárními ovicidními účinky anthelmintika.

5.3.4 ANOVA BMZ2



Obrázek č. 26: Výstup z programu Statistica

Graf vizualizuje procentuální účinnost jednotlivých koncentrací benzimidazolu v eliminaci larev *H. contortus*. Lze z něj vyčíst, že účinnost postupně klesá s klesající koncentrací benzimidazolu. Tento trend odpovídá očekávanému chování anthelmintika, kde vyšší koncentrace obvykle vykazují vyšší účinnost.

H0: neexistuje statisticky významný rozdíl mezi alespoň jednou dvojicí koncentrací benzimidazolu 2.

H1: existuje statisticky významný rozdíl alespoň mezi jednou dvojicí koncentrací benzimidazolu 2.

Hladina významnosti alfa byla 0,05 a byla zvolena jednofaktorová ANOVA.

Univariate Tests of Significance for Úspěšnost Konc. (ANOVA)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	20670,09	1	20670,09	326,5915	0,000000
B	8164,70	6	1360,78	21,5006	0,000003
Error	886,06	14	63,29		

Obrázek č. 27: Výstup z programu Statistica

F-test ANOVA poskytuje informace o celkové statistické významnosti mezi koncentracemi benzimidazolu. Nulová hypotéza, která říká, že není žádný rozdíl mezi koncentracemi, je zamítnuta ($p < 0,05$), což naznačuje, že existují statisticky významné rozdíly v účinnosti mezi různými koncentracemi.

Scheffe test; variable Úspěšnost Konc. (ANOVA)								
Probabilities for Post Hoc Tests								
Error: Between MS = 63,290, df = 14,000								
Cell No.	B	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}	{6}	{7}
		55,361	59,403	39,963	32,469	9,9093	8,4938	14,014
1	Kon. 1		0,998552	0,499494	0,122928	0,000628	0,000459	0,001596
2	Kon. 2	0,998552		0,250781	0,049033	0,000259	0,000192	0,000637
3	Kon. 3	0,499494	0,250781		0,963119	0,023372	0,016638	0,061686
4	Kon. 4	0,122928	0,049033	0,963119		0,132134	0,096740	0,301742
5	Kon. 5	0,000628	0,000259	0,023372	0,132134		0,999997	0,998419
6	Kon. 6	0,000459	0,000192	0,016638	0,096740	0,999997		0,992066
7	Kon. 7	0,001596	0,000637	0,061686	0,301742	0,998419	0,992066	

Obrázek č. 28: Výstup z programu Statistica

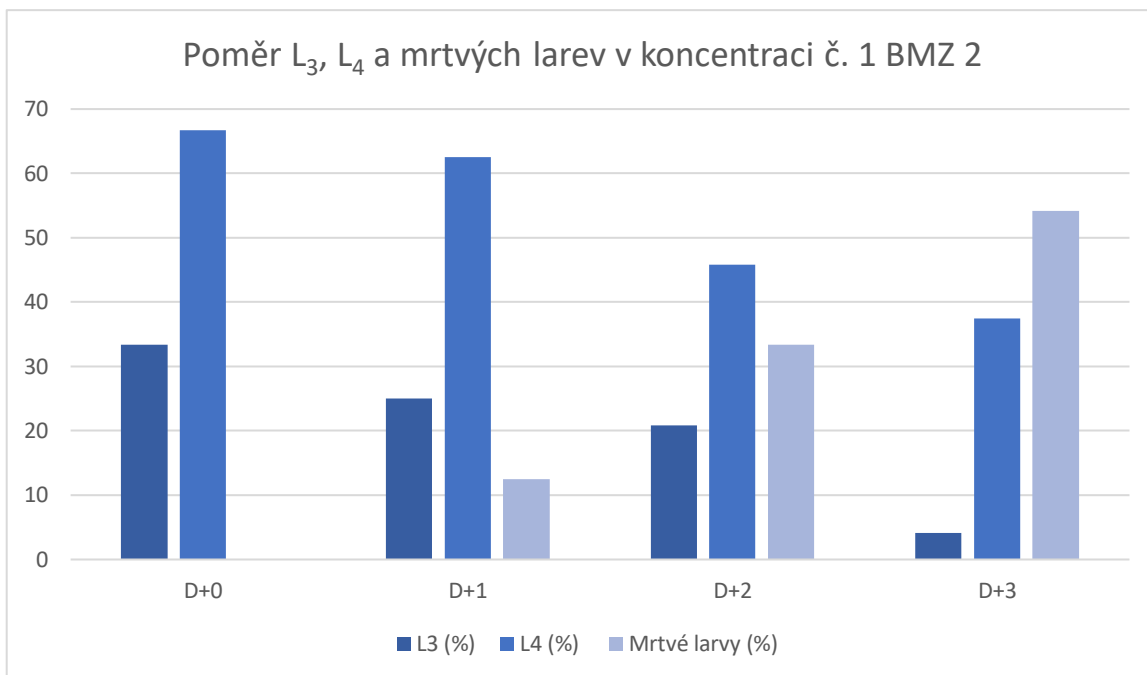
Tento test porovnává úspěšnost mezi jednotlivými koncentracemi benzimidazolu. Pravděpodobnosti porovnání úspěšnosti mezi koncentracemi jsou vyjádřeny černě a červeně. Pokud jsou tyto hodnoty menší než 0,05, znamená to, že existuje statisticky významný rozdíl v úspěšnosti mezi příslušnými koncentracemi.

Pravděpodobnost úspěšnosti pro koncentraci č. 1 je větší než 0,05 ve srovnání s koncentracemi č. 5, 6 a 7. To znamená, že koncentrace č. 1 má statisticky významný rozdíl v účinnosti oproti těmto koncentracím. Koncentrace č. 2 má statisticky významný rozdíl v účinnosti v porovnání s koncentracemi č. 4, 5, 6 a 7. Koncentrace č. 3 má statisticky významný rozdíl v účinnosti ve srovnání s koncentracemi č. 5 a 6.

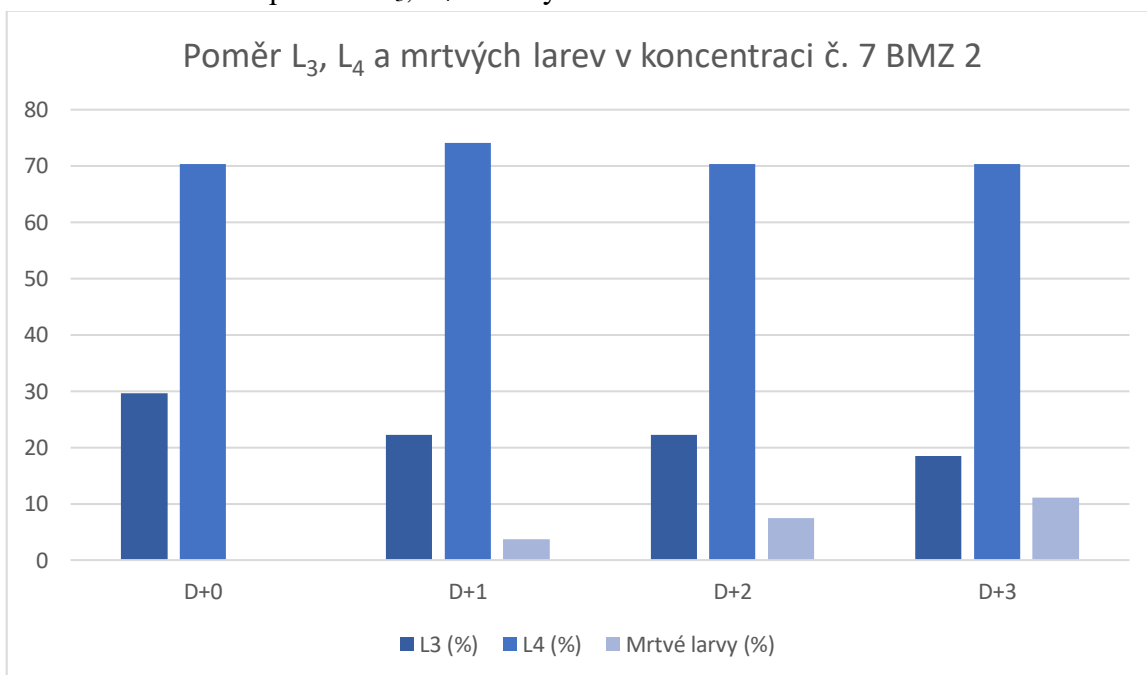
5.3.5 Poměr larev L_3 , L_4 a mrtvých larev v BMZ2

Grafy znázorňují vývoj poměru larev L_3 , L_4 a mrtvých larev *H. contortus* v různých koncentracích (označených jako Konc. č. 1 až 7 BMZ2) v průběhu času (D+0, D+1, D+2 a D+3). Z grafů je patrné, že vyšší koncentrace obvykle vedou k vyššímu procentu mrtvých larev, což naznačuje vyšší účinnost anthelmintik při vyšší koncentraci. Důležitým zjištěním je také, že v některých případech může být účinnost anthelmintik snížena, což může být způsobeno rezistencí parazitů na používané léčivo. U koncentrace č. 7 benzimidazolu 2, byl zjištěn vyšší poměr L_4 larev, což by mohlo naznačovat, že larvy L_3 jsou schopny se kultivovat i při nízkých koncentracích benzimidazolu.

Další důležitým aspektem je srovnání vývoje poměrů a účinků anthelmintika mezi jednotlivými koncentracemi. Například ve vyšších koncentracích může být pozorováno rychlejší úmrtnost larev, což naznačuje vyšší účinnost léčiva při vyšší koncentraci. Naopak, nižší koncentrace mohou vykazovat nižší účinnost a menší nárůst poměru mrtvých larev. Celkově tyto grafy poskytují cenné informace o dynamice účinku léčiva na různé stádia parazitů v závislosti na jeho koncentraci.



Obrázek č. 29: Graf poměru L_3 , L_4 a mrtvých larev v koncentraci č. 1 BMZ2

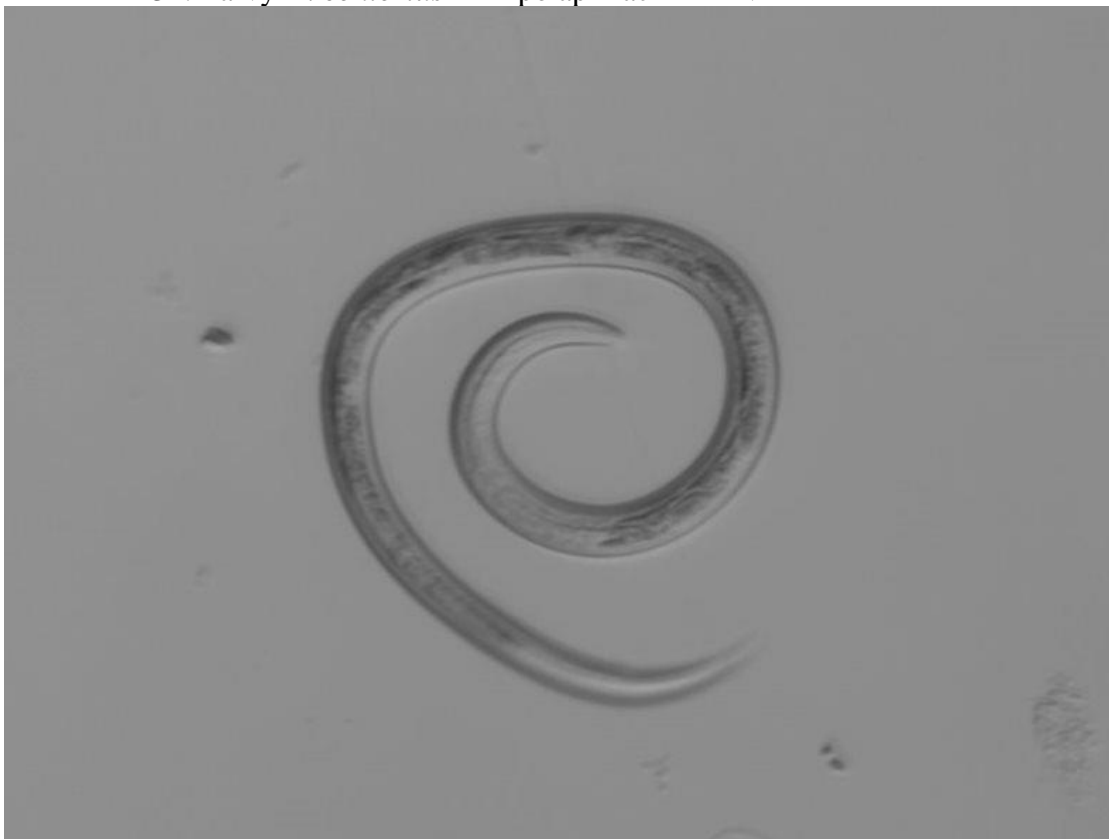


Obrázek č. 30: Graf poměru L_3 , L_4 a mrtvých larev v koncentraci č. 7 BMZ2

5.3.6 Fenotyp larev *H. contortus* po aplikaci BMZ



Obrázek č. 31: Larvy *H. contortus* D+2 po aplikaci BMZ v koncentraci č. 1



Obrázek č. 32: Larvy *H. contortus* D+2 po aplikaci BMZ v koncentraci č. 7

Během testů benzimidazolu se larvy shlukovaly po okrajích jamky. Po 24 hodinách se larvy v koncentracích č. 1-4 vyznačovaly zrnitou strukturou a projevovaly pomalý a cukavý pohyb. V nižších koncentracích č. 5-6 se začínala objevovat zrnitost. Larvy v koncentraci č. 7 se jevíly jako vitální, bez známek poškození, a pohybovaly se klidně. Po 48 hodinách bylo možné pozorovat, že larvy v koncentracích č. 1-5 vykazovaly rychlý pohyb a mrskaly se. V koncentraci č. 6 byly larvy lehce zrnité, avšak stále životaschopné. Larvy v koncentraci č. 7 přešly do klidové fáze a svíjely se do tvaru telefonní šňůry. V koncentracích č. 1 a 2 přežily pouze 3 larvy, avšak bez zjevného poškození. Larvy přeživší v koncentracích č. 3-4 projevovaly známky poškození a občasné cukání přední částí těla. Podobně se projevovaly i larvy v koncentraci č. 5, které byly poškozené a měly cukavý pohyb. V koncentracích 6-7 bylo poškození menší, ale larvy stále projevovaly rychlý a neklidný pohyb při plavání.

6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo pomocí *in vitro* metody otestovat viabilitu larev vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*) ve vybraných koncentracích ivermektinu (IVM) a moxidektinu (MOX) a vyhodnotit fenotypy larev v průběhu testu.

V této diplomové práci bylo použito celkem 7 koncentrací ivermektinu, které výsledně v jamkách odpovídaly 3 uM, 2,5 uM, 2 uM, 1,5 uM, 1 uM, 0,1 uM a 0,01 uM. Celkový anthelmintický účinek byl pozorován v souhrnu všech koncentrací ivermektinu na úrovni od 83,67347 % do 98,0198 %.

Druhým zkoumaným anthelmintikem byl moxidektin, který byl také použit v 7 koncentracích a to 0,5 uM, 0,4 uM, 0,3 uM, 0,25 uM, 0,2 uM, 0,15 uM a 0,1 uM. Účinek moxidektinu se pohyboval od 77,61194 % do 90,69767 %.

Aby byly vyzkoušeny všechny hlavní skupiny anthelmintik, bylo zařazeno i pozorování benzimidazolu, který byl také použit v 7 koncentracích. Finální koncentrace benzimidazolu v jamkách odpovídaly 0,5 uM, 0,3 uM, 0,2 uM, 0,1 uM, 0,05 uM, 0,025 uM a 0,01 uM. Benzimidazol působil na larvy L₃ a L₄ *H. contortus* v rozmezí od 7,41 % do 70,59 %.

Molento & Prichard (2001) porovnávali účinnost různých kombinací léčiv proti vybraným kmenům *H. contortus*. Výsledky jejich studie naznačují, že kombinace moxidektinu s verapamilem (2 mM) vykazuje významně vyšší účinnost (65 %) ve srovnání s použitím pouze moxidektinu (41 %) proti kmeni MOF17. Podobně kombinace ivermektinu s verapamilem prokázala významně vyšší účinnost (84 %) ve srovnání s použitím ivermektinu samostatně (55 %) proti stejnému kmenu. Dále bylo zjištěno, že verapamil významně zvýšil účinnost moxidektinu proti kmenu IVF17, ale ne ivermektinu. Výzkum rovněž ukázal, že CL 347,099 (2 mM) zvýšil účinnost moxidektinu proti oběma zkoumaným kmenům. Kombinace ivermektinu s CL347.099 také prokázala signifikantní zvýšení účinnosti ivermektinu proti oběma kmenům. Naopak cyklosporin A ve 3 μM neprokázal pozitivní účinek při kombinaci s endektocidy proti některým kmenům, avšak zvýšil účinnost ivermektinu proti kmenu IVF17. Tyto výsledky naznačují možnosti kombinační terapie pro kontrolu parazitární infekce a potenciální cesty k překonání rezistence na anthelmintika. Jejich výsledky jsou výrazně nižší než naše, což bude pravděpodobně zapříčiněno tím, že si vybrali silně rezistentní kmen.

Ngaradom et al. (2017) prováděli studii na larvách a vajíčkách *H. contortus in vitro*. Použitými anthelmintikem byl albendazol a kůra *Ziziphus Mucronata*. Kůra *Ziziphus Mucronata* byla použita ve dvou druzích extraktů, a to vodním a metanolovým. Pro test larev byla u kůry *Ziziphus Mucronata* použita koncentrace 0,4 mg/ml. Účinek methanolového extraktu byl 53,3 % a vodního extraktu 43,3 %. U albendazolu byla použita pro dosažení 100 % účinnosti 0,5 mg/ml. U vajíček bylo pozorováno, ale vyšší líhnutí a nejvíc u albendazolu méně u metanolových extraktů a nejmíň u vodních.

Egualo et al. (2007) se zaměřili na anthelmintický potenciál vybraných rostlinných extraktů v eliminaci líhnutí vajíček *H. contortus*, kdy vodní extrakt *Coriandrum sativum* měl IC₅₀ 0,12 mg/ml (koncentrace inhibitoru), zatímco alkoholový extrakt měl IC₅₀ 0,18 mg/ml v testu.

Studie od Al-Shaibani et al. (2008) ukázala, že účinná koncentrace (EC₅₀) vodního extraktu *Fumaria officinalis* proti *H. contortus* byla 10,23 mg/ml. Podobně srovnatelné výsledky testu mortality larev byly pozorovány s EC₅₀ 15,14 mg/ml pro vodní extrakt

Adhatoda vasica a 12,88 mg/ml pro ethanolový extrakt *Adhatoda vasica*. Výsledky této studie naznačují, že zvýšení koncentrace rostlinných extraktů vedlo k vyšší anthelmintické aktivitě. Tento jev byl pozorován i v předchozích studiích, které ukázaly, že receptory se nasycují s rostoucí koncentrací účinné látky. Pravděpodobně ve vyšších koncentracích byly receptory na larvách již zcela nasyceny, což vedlo k ztrátě schopnosti řízeného pohybu a paralýze svalů.

Olmedo-Juárez et al. (2017) zaznamenali larvicidní účinky extraktu z listů *Acacia cochliacantha*, přičemž účinnost přesáhla 70 % při dávce 150 mg/ml. LC50 a LC90 byly stanoveny na 127,3 resp. 177,8 mg/ml. Podobné pozorování bylo učiněno Chan-Pérez et al. (2016), kteří zjistili, že larvy *H. contortus* vystavené vodnímu extraktu z *A. pennatula* a *O. viciifolia* vykazovaly projevy, jako je oddělení kutikuly a vnitřních struktur při koncentracích 600 µg/ml. Při dávkách 5000 µg/ml byla kutikula larev oteklá a vnitřní struktury nebyly rozlišitelné. Tyto výsledky prokazují, že larvicidní aktivita extraktu je přímo závislá na koncentraci. Podobně vyžaduje methanolový extrakt z plodů *C. coriaria* vysoké koncentrace nad 300 mg/ml, aby byla dosažena larvicidní účinnost vyšší než 90 %. Tato tendence byla také pozorována (Alonso-Díaz et al. 2008) ve své studii s extrakty z jiných rostlin. Nicméně existují i další faktory, které je třeba zohlednit při použití rostlinných extraktů k ovlivnění parazitárních onemocnění, jako je například typ izolace parazitů. Calderón-Quintala et al. (2010), (Alonso-Díaz et al. 2011) a Vargas-Magana et al. (2014) zaznamenali rozdíly ve vnímavosti larev *H. contortus* mezi mexickými a francouzskými izoláty, což naznačuje existenci určité tolerance vyvinuté parazitem.

Dřívější studie ukázaly, že vodní extrakty *Hedera helix* vykazovaly IC50 hodnotu 0,12 mg/ml při testech proti vajíčkům *H. contortus*. Extrakt z *Coriandrum sativum* měl IC50 hodnotu 0,12 mg/ml, zatímco hydroalkoholický extrakt měl hodnotu 0,18 mg/ml při testech na vylíhnutí vajíček. Albendazol vykázal srovnatelné výsledky s in vitro imunostimulačními účinky čtyř etiopských léčivých rostlin proti *H. contortus*, které měly hodnotu IC50 0,04 mg/ml, což je hodnota blízká této studii (Egualo et al. 2007).

Jak uvádí Kaplan & Vidyashankar (2012) a Vercruyse et al. (2018) rezistence gastrointestinálních hlístic vůči anthelmintikům je klíčovým faktorem omezujícím produkci přežvýkavců v rámci celého světa. Dle Hoste et al. (2015) je vznik anthelmintické rezistence nevyhnutelný na farmách, které používají chemoterapeutika. Identifikace a porozumění faktorům ovlivňujících vývoj je stěžejní pro udržení účinnosti anthelmintik.

Molento et al. (1999) zjistili výskyt rezistence prostřednictvím *in vivo* testů srovnání účinků anthelmintik na kmeny PF14 (neselektovaný kmen na rezistenci) a MOF14 (selektovaný kmen na rezistenci vůči moxidektinu). Při aplikaci nízkých dávek byly pozorovány významné rozdíly v účinnosti na mortalitu *H. contortus* mezi oběma typy anthelmintik. Při použití dávky 0,025 mg/kg u kmene PF14 dosáhl moxidektin účinnosti 96 % a u MOF14 dosáhl moxidektin účinnosti 61 %, zatímco ivermektin dosáhl účinnosti 55 % a 28 % na tyto kmeny. Aby byla dosažena účinnost ≥ 95 %, bylo nutné podávat moxidektin v dávce 0,1 mg/kg u kmene MOF14 a ivermektin nad 0,1 mg/kg a 0,4 mg/kg u kmenů PF14 a MOF14.

Dle Chartier et al. (2001) za anthelmintickou rezistenci lze považovat nedostatečné snížení počtu vajíček v exkrementu po podání anthelmintika. Hranice procentuálního snížení počtu vajíček byla stanovena na 95 %.

Výskyt rezistence na jižní polokouli, především v jižní Africe a Austrálii, je častější a existuje zde rezistence na všechny hlavní širokospektrální anthelmintika (včetně trojitě

rezistence) u pastevních přežvýkavců (Sutherland & Scott 2009). V Evropě je situace mírně příznivější, ale byla zaznamenána rezistence vůči třem hlavním hlísticím. Chartier et al. (2001) poprvé zmiňují rezistenci *H. contortus* vůči více skupinám anthelmintik ve Francii, konkrétně se jedná o benzimidazol a ivermektin. První duální anthelmintickou rezistenci v České republice prokázali Vadlejch et al. (2021).

Anthelmintická rezistence není jediným aspektem ovlivňujícím míru působení na *H. contortus*. Paolini et al. (2004) uvádí, že stejný extrakt z rostlinného materiálu má rozdílný účinek na různá vývojová stádia *H. contortus*. Alonso-Díaz et al. (2011) toto tvrzení potvrzuje. Dále tvrdí, že rostlinný extrakt může vykazovat anthelmintický účinek proti larválnímu stadiu L₃ *H. contortus* a mít minimální nebo žádný anthelmintický účinek proti jinému stadiu jako jsou vajíčka. Navíc anthelmintický účinek může být patrný pouze na určitém aspektu stejného vývojového stadia, jako je inhibice kutikuly L₃ larvy, ale nemusí mít jasný účinek na jiný aspekt, jako je motilita stejných L₃ larev. Diferencované účinky byly zaznamenány i u řady konvenčních anthelmintik, jako je levamisol. Ten vykazuje účinek na motilitu L₃, ale ne na inhibici kutikuly nebo vajíčka (Hoste et al. (2015).

Castañeda-Ramírez et al. (2014) uvádí rozdíly mezi extrakty stejného rostlinného materiálu působícího na stejné vývojové stádium vykazující různé anthelmintické aktivity vlivem různých extrakčních postupů.

Naše práce naznačuje, že *in vitro* testy mohou být užitečným nástrojem pro identifikaci potenciálních anthelmintických látek. Nicméně je důležité si uvědomit, že výsledky *in vitro* testů nemusí vždy přesně předpovídat účinnost látek *in vivo*. Různé faktory, jako je trávení a metabolismus hostitele, mohou ovlivnit účinnost anthelmintik v reálném prostředí (Hoste et al. (2015).

Vzhledem k narůstajícímu problému s rezistencí a potřebě nalezení nových účinných látek je důležité pokračovat v výzkumu anthelmintických metod a látek s cílem posílit naše možnosti kontroly parazitárních infekcí (Hoste et al. (2015).

7 Závěr

Tato práce měla za cíl prostřednictvím *in vitro* metody otestovat viabilitu larev vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*) ve vybraných koncentracích ivermektinu (IVM), moxidektinu (MOX) a benzimidazolu (BMZ). Larvy ve stádiu L₃ byly kultivovány dle postupu Yilmaz et al. (2017) do stádia L₄. Následně byly přepipetovány do kultivačních destiček s 24 jamkami, kde byly aplikovány anthelmintika v 7 koncentracích. Před aplikací anthelmintik byla provedena dokumentace v podobě fotografií a byl zaznamenán poměr stádií a počtu larev. Sledování počtu živých a mrtvých larev včetně určení poměru stádií pokračovalo i v následujících třech dnech. Výsledky byly zaznamenány do programu Microsoft Excel a statisticky zpracovány pomocí programu Statistika 14.

Ivermektin byl aplikován v sedmi různých koncentracích, kde celkový anthelmintický účinek vykazoval rozpětí od 83,67347 % do 98,0198 %. Moxidektin byl testován také v sedmi koncentracích, přičemž se jeho účinek pohyboval od 77,61194 % do 90,69767 %. Benzimidazol byl aplikován ve stejném počtu koncentrací, kde jeho účinnost vůči larvám *H. contortus* dosahovala hodnot od 7,41 % do 70,59 %. Nižší účinek benzimidazolu na larvy *H. contortus* je způsoben tím, že benzimidazol je primárně ovicidní.

Pozorován byl zvýšený účinek ivermektinu a moxidektinu na larvy ve stádiu L₄, a to zejména v třech nejvyšších koncentracích. Obecně lze konstatovat, že se snižující se koncentrací anthelmintik klesá úspěšnost léčby. Nesprávné dávkování anthelmintik může vést k rozvoji rezistentních kmenů, což ztěžuje léčbu a zvyšuje výskyt rezistentních parazitů.

Vedení chovu vyžaduje systematická opatření, která se neomezují pouze na řešení okamžitých problémů, ale sledují dlouhodobé strategie. Namísto trvalého úsilí o úplné vymýcení parazitů z prostředí a hostitelů je nutné hledat další přístupy, které umožní udržet situaci pod kontrolou. To zahrnuje kombinaci podávání efektivních anthelmintik a využívání alternativních metod, založených na moderních poznacích, které mohou přinést nové pohledy a přístupy k léčbě.

Pro další výzkum je vhodné zaměřit se na detailnější analýzu účinků anthelmintik na různá stadia *H. contortus* a získání rozsáhlejších dat pomocí více kmenů. Dále je vhodné zvážit úpravu metodiky, jako je například snížení počtu testovaných koncentrací a larev v jednotlivých jamkách pro dosažení snazšího počítání.

8 Literatura

- Allonby EW, Urquhart GM. 1975. The epidemiology and pathogenic significance of haemonchosis in a merino flock in East Africa. *Veterinary Parasitology* **1**:129-143.
- Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Aguilar-Caballero AJ, Hoste H. 2008. In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology* **153**:313-319.
- Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H. 2011. Comparing the sensitivity of two in vitro assays to evaluate the anthelmintic activity of tropical tannin rich plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology* **181**:360-364.
- Al-Shaibani IRM, Phulan MS, Arijo A, Qureshi TA. 2008. Ovicidal and larvicidal properties of *Adhatoda vasica* (L.) extracts against gastrointestinal nematodes of sheep in vitro. *Pakistan Vet. J.* **28**:79-83.
- Amarante AFT do. 2011. Why is it important to correctly identify *Haemonchus* species? *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* **20**:263-268.
- Angulo-Cubillán FJ, García-Coiradas L, Cuquerella M, Fuente C, Alunda JM. 2007. *Haemonchus contortus*-Sheep relationship: A review. *Revista Científica* **17**:577-587.
- Arsenopoulos KV, Katsarou EI, Mendoza Roldan JA, Fthenakis GC, Papadopoulos E. 2022. *Haemonchus contortus* Parasitism in Intensively Managed Cross-Limousin Beef Calves: Effects on Feed Conversion and Carcass Characteristics and Potential Associations with Climatic Conditions. *Pathogens* **11**.
- Ashram SE, Nasr IA, mehmood R, Hu M, He L, Suo X. 2017. *Haemonchus contortus* and ovine host: A retrospective review. *International Journal of Advanced Research* **5**:972-999.
- Athanasiadou S, Githiori J, Kyriazakis I. 2007. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Animal* **1**:1392-1400.
- Attindehou S, Salifou S, Biao CF, Gbati OB, Adamou-N'diaye M, Pangui LJ. 2012. Epidemiology of haemonchosis in sheep and goats in Benin. *Journal of Parasitology and Vector Biology* **4**:20-24.
- Barnes EH, Dobson RJ, Stein PA, Le Jambre LF, Lenane IJ. 2001. Selection of different genotype larvae and adult worms for anthelmintic resistance by persistent and short-acting avermectin/milbemycins. *International Journal for Parasitology* **31**:720-727.
- Becskei C, Kryda K, Thys M, Holzmer S, Bowersock L, Fernandes T, Meyer L, Reinemeyer C, Mahabir SP. 2020. Efficacy of a new oral chewable tablet containing sarolaner, moxidectin and pyrantel (Simparica Trio™) against induced ascarid infections in dogs. *Parasites & Vectors* **13**:281-285.
- Besier RB, Kahn LP, Sargison ND, Van Wyk JA. 2016. The Pathophysiology, Ecology and Epidemiology of *Haemonchus contortus* Infection in Small Ruminants. 95-143 in *Haemonchus contortus* and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends. Elsevier.

- Bishop SC, Morris CA. 2007. Genetics of disease resistance in sheep and goats. *Small Ruminant Research* **70**:48-59.
- Blitz NM, Gibbs HC. 1972. Studies on the arrested development of *Haemonchus contortus* in sheep—I. The induction of arrested development. *International Journal for Parasitology* **2**:5-12.
- Bouix J, Krupinski J, Rzepecki R, Nowosad B, Skrzyzala I, Roborzynski M, Fudalewicz-Niemczyk W, Skalska M, Malczewski A, Gruner L. 1998. Genetic resistance to gastrointestinal nematode parasites in Polish long-wool sheep. *International Journal for Parasitology* **28**:1797-1804.
- Brightling T. 2006. Livestock diseases in Australia: diseases of cattle, sheep, goats and farm dogs. CSIRO:400.
- Bush AO, Fernandez JC, Esch GW, Seed JR. 2001. Parasitism: The diversity and ecology of animal parasites. Cambridge University Press, Cambridge.
- Calderón-Quintala JA, Torres-Acostaa JFJ, Sandoval-Castroa CA, Alonsob MA, Hostec H, Aguilar-Caballeroa A. 2010. Adaptation of *Haemonchus contortus* to condensed tannins: can it be possible? *Arch Med Vet* **42**:165-171.
- Carta LK, Handoo ZA, Hoberg EP, Erbe EF, Wergin WP. 2009. Evaluation of Some Vulval Appendages in Nematode Taxonomy. *Comparative Parasitology* **76**:191-209.
- Castañeda-Ramírez GS, Torres-Acosta JFJ, Mendoza-de-Gives P, Chan-Pérez JI, Tun-Garido J, Rosado-Aguilar RA. 2014. In vitro anthelmintic effect of the foliage from three plant species of the Annonaceae family against *Haemonchus contortus*. In 13th International Congress of Parasitology.
- Connan RM. 1971. The Seasonal Incidence of Inhibition of Development in *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science* **12**:272-274.
- Conway D. P. 1964. Variance in the effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. *American Journal of Veterinary Research* **25**:844-846.
- Coop RL, Kyriazakis I. 1999. Nutrition–parasite interaction. *Veterinary Parasitology* **84**:187-204.
- Doeschl-Wilson AB, Davidson R, Conington J, Roughsedge T, Hutchings MR, Villanueva B. 2011. Implications of Host Genetic Variation on the Risk and Prevalence of Infectious Diseases Transmitted Through the Environment. *Genetics* **188**:683-693.
- Donald AD, Southcott WH, Dineen JK. 1978. The epidemiology and control of gastrointestinal parasites of sheep in Australia. CSIRO Publications, Australia.
- Eguale T, Tilahun G, Debella A, Feleke A, Makonnen E. 2007. *Haemonchus contortus*: In vitro and in vivo anthelmintic activity of aqueous and hydro-alcoholic extracts of *Hedera helix*. *Experimental Parasitology* **116**:340-345.
- Emery DL, Hunt PW, Le Jambre LF. 2016. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *International Journal for Parasitology* **46**:755-769.

- Epe C. 2009. Intestinal Nematodes: Biology and Control. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **39**:1091-1107.
- Eysker M, Kooyman FNJ. 1993. Notes on necropsy and herbage processing techniques for gastrointestinal nematodes of ruminants. *Veterinary Parasitology* **46**:205-213.
- Fox MT, Gerreili D, Pitt SR, Jacobs DE, Gill M, Gale DL. 1989. *Ostertagia ostertagi* infection in the calf: effects of a trickle challenge on appetite, digestibility, rate of passage of digesta and liveweight gain. *Research in Veterinary Science* **47**:294-298.
- Fox MT, Gerreili D, Pitt SR, Jacobs DE, Gill M, Simmonds AD. 1989. *Ostertagia ostertagi* infection in the calf: effects of a trickle challenge on the hormonal control of digestive and metabolic function. *Research in Veterinary Science* **47**:299-304.
- Fox MT. 1993. Pathophysiology of infection with *Ostertagia ostertagi* in cattle. *Veterinary Parasitology* **46**:143-158.
- Gasbarre LC, Smith LL, Lichtenfels JR, Pilitt PA. 2009. The identification of cattle nematode parasites resistant to multiple classes of anthelmintics in a commercial cattle population in the US. *Veterinary Parasitology* **166**:281-285.
- Geary TG, Hosking BC, Skuce PJ, von Samson-Himmelstjerna G, Maeder S, Holdsworth P, Pomroy W, Vercruyse J. 2012. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Guideline: Anthelmintic combination products targeting nematode infections of ruminants and horses. *Veterinary Parasitology* **190**:306-316.
- Getachew T, Dorchies P, Jacquet P. 2007. Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Review. Parasite* **14**:3-14.
- Gilleard JS, Redman E. 2016. Genetic Diversity and Population Structure of *Haemonchus contortus*. 31-68 in *Haemonchus contortus* and *Haemonchosis* – Past, Present and Future Trends. Elsevier.
- Gordon HML. 1948. The epidemiology of parasitic diseases, with special references to studies with nematode parasites of sheep. *Australian Veterinary Journal* **24**:17-45.
- Gray GD. 1997. The use of genetically resistant sheep to control nematode parasitism. *Veterinary Parasitology* **72**:345-366.
- Hanser E, Mehlhorn H, Hoeben D, Vlaminck K. 2002. In vitro studies on the effects of flubendazole against *Toxocara canis* and *Ascaris suum*. *Parasitology Research* **89**:63-74.
- Hartl J. 2012. *Farmaceutická chemie IV.2., nezměn. vyd.*. Karolinum, Praha.
- Hendrix CM, Robinson E. 2016. *Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians 4th.*. Elsevier Health Sciences, USA.
- Holmes PH. 1985. Pathogenesis of trichostrongylosis. *Veterinary Parasitology* **18**:89-101.
- Holmes PH. 1993. Interactions between parasites and animal nutrition: the veterinary consequences. *Proceedings of the Nutrition Society* **52**:113-120.

- Hoste H, Chartier C, Le Frileux Y. 2002. Control of gastrointestinal parasitism with nematodes in dairy goats by treating the host category at risk. *Veterinary Research* **33**:531-545.
- Hoste H, Chartier C. 1993. Comparison of the effects on milk production of concurrent infection with *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in high-and low-producing dairy goats. *American Journal of Veterinary Research* **54**:1881-1885.
- Hoste H, Sotiraki S, de Jesús Torres-Acosta JF. 2011. Control of Endoparasitic Nematode Infections in Goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **27**:163-173.
- Hoste H, Torres-Acosta JF, Alonso-diaz MÁ, Brunet S, Sandoval-Castro C, Adote SH. 2008. Identification and validation of bioactive plants for the control of gastrointestinal nematodes in small ruminants. *Trop Biomed.* **25**:56-72.
- Hoste H, Torres-Acosta JF, Paolini V, Aguilar-Caballero A, Etter E, Lefrileux Y, Chartier C, Broqua C. 2005. Interactions between nutrition and gastrointestinal infections with parasitic nematodes in goats. *Small Ruminant Research* **60**:141-151.
- Hoste H, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Mueller-Harvey I, Sotiraki S, Louvandini H, Thamsborg SM, Terrill TH. 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology* **212**:5-17.
- Houdijk JGM, Kyriazakis I, Jackson F, Huntley JF, Coop RL. 2000. Can an increased intake of metabolizable protein affect the periparturient relaxation in immunity against *Teladorsagia circumcincta* in sheep? *Veterinary Parasitology* **91**:43-62.
- Houdijk JGM. 2008. Influence of periparturient nutritional demand on resistance to parasites in livestock. *Parasite Immunology* **30**:113-121.
- Chan-Pérez JI, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Castañeda-Ramírez GS, Vilarem G, Mathieu C. 2016. In vitro susceptibility of ten *Haemonchus contortus* isolates from different geographical origins towards acetone: water extracts of two tannin rich plants. *Veterinary Parasitology* **217**:53-60.
- Chartier C, Etter E, Hoste H, Pors I, Mallereau M-P, Broqua C, Mallet S, Koch C, Massé A. 2000. Effects of the initial level of milk production and of the dietary protein intake on the course of natural nematode infection in dairy goats. *Veterinary Parasitology* **92**:1-13.
- Kaplan RM, Vidyashankar AN. 2012. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology* **186**:70-78.
- Kaplan RM. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology* **20**:477-481.
- Kern G, Traulsen I, Stamer E, Kemper N, Krieter J. 2014. Effects and risk factors influencing longevity and animal health in sheep on organic farms: Development of preventive measures. *Zuchtungskunde* **86**:261-277.
- Knox MR, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ. 2006. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* **139**:385-393.

- Kuiseu J, Tazinsou F, AOLOUNLADE P, Galowanou G, Dadenile A, Dansou CC, Hounzangbe-Adote S, Jbabayemi O, Aedorh P. 2021. Prevalence, effects and alternative control methods of *Haemonchus contortus* in small ruminants: A review. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* **13**:84-97.
- 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.
- Laing R et al. 2013. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biology* **14**.
- Laudisi F, Marônek M, Di Grazia A, Monteleone G, Stolfi C. 2020. Repositioning of Anthelmintic Drugs for the Treatment of Cancers of the Digestive System. *International Journal of Molecular Sciences* **21**.
- Lee DL. 2002. *The Biology of Nematodes* 1th.. CRC Press.
- MacRae JC. 1993. Metabolic consequences of intestinal parasitism. *Proceedings of the Nutrition Society* **52**:121-130.
- Mandonnet N, Ducrocq V, Arquet R, Aumont G. 2003. Mortality of Creole kids during infection with gastrointestinal strongyles: A survival analysis. *Journal of Animal Science* **81**:2401-2408.
- McSorley HJ, Maizels RM. 2012. Helminth Infections and Host Immune Regulation. *Clinical Microbiology Reviews* **25**:585-608.
- Molento MB, Prichard RK. 2001. Effect of multidrug resistance modulators on the activity of ivermectin and moxidectin against selected strains of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **21**:117-121.
- Molento MB, Wang GT, Prichard RK. 1999. Decreased ivermectin and moxidectin sensitivity in *Haemonchus contortus* selected with moxidectin over 14 generations. *Veterinary Parasitology* **86**:77-81.
- Muller GL. 1968. The epizootiology of helminth infestation in sheep in the south-western district of the Cape. *Onderstepoort journal of veterinary research* **35**:159-193.
- Nath TC et al. 2021. Morphometrical and Molecular Characterization of *Oesophagostomum columbianum* (Chabertiidae: Oesophagostominae) and *Haemonchus contortus* (Trichostrongylidae). *Journal of Parasitology Research* **2021**:1-9.
- Ngaradoum O, SM K, Karanja SM, Kipyegon K, Maina N. 2017. In Vitro Ovicidal and Larvicidal Activity of Aqueous and Methanolic Extracts of *Ziziphus Mucronata* Barks Against *Haemonchus Contortus*. *European Journal of Experimental Biology* **07**.
- Niemann D. 2013. *Raising goats naturally: the complete guide to milk, meat and more*. New Society Publishers, Gabriola Island.
- Olmedo-Juárez A, Rojo-Rubio R, Zamilpa A, Mendoza de Gives P, Arece-García J, López-Arellano ME, von Son- de Fernex E. 2017. In vitro larvicidal effect of a hydroalcoholic

- extract from *Acacia cochliacantha* leaf against ruminant parasitic nematodes. *Veterinary Research Communications* **41**:227-232.
- Paolini V, Fouraste I, Hoste H. 2004. In vitro effects of three woody plant and sainfoin extracts on 3rd-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology* **129**:69-77.
- Parkins JJ, Holmes PH. 1989. Effects of Gastrointestinal Helminth Parasites on Ruminant Nutrition. *Nutrition Research Reviews* **2**:227-246.
- Poddar P, Begum N, Alim M, Dey A, Hossain M, Labony S. 2017. Prevalence of gastrointestinal helminths of sheep in Sherpur, Bangladesh. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* **4**:274-280.
- Pomroy WE. 2011. Anthelmintic resistance in New Zealand: A perspective on recent findings and options for the future. *New Zealand Veterinary Journal* **54**:265-270.
- Prichard RK. 1990. Anthelmintic resistance in nematodes: Extent, recent understanding and future directions for control and research. *International Journal for Parasitology* **20**:515-523.
- Rinaldi L, Veneziano V, Cringoli G. 2007. Dairy goat production and the importance of gastrointestinal strongyle parasitism. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **101**:745-746.
- Rose H, Hoar B, Kutz SJ, Morgan ER. 2014. Exploiting parallels between livestock and wildlife: Predicting the impact of climate change on gastrointestinal nematodes in ruminants. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* **3**:209-219.
- Rossanigo CE, Gruner L. 1995. Moisture and temperature requirements in faeces for the development of free-living stages of gastrointestinal nematodes of sheep, cattle and deer. *Journal of Helminthology* **69**:357-362.
- Saddiqi HA, Jabbar A, Sarwar M, Iqbal Z, Muhammad G, Nisa M, Shahzad A. 2011. Small ruminant resistance against gastrointestinal nematodes: a case of *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research* **109**:1483-1500.
- Silverman PH, Campbell JA. 1959. Studies on parasitic worms of sheep in Scotland. *Parasitology* **49**:23-38.
- Silvestre A, Leignel V, Berrag B, Gasnier N, Humbert JF, Chartier Ch, Cabaret J. 2002. 2002. Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. *Veterinary Research* **33**:465-480.
- Singh AK, Das G, Roy B, Nath S, Naresh R, Kumar S. 2015. Prevalence of gastro-intestinal parasitic infections in goat of Madhya Pradesh, India. *Journal of Parasitic Diseases* **39**:716-719.
- Smith H, Holland C, Taylor M, Magnaval J-F, Schantz P, Maizels R. 2009. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends in Parasitology* **25**:182-188.

- Solomon-Wisdom GO, Matur BM, Ibe KC. 2014. Prevalence of intestinal helminth infection among sheep and goats raised for slaughtering in Gwagwalada abattoir, Abuja-Nigeria. *J Glob Pharm Sci* **2**:12-9.
- Stear MJ, Murray M. 1994. Genetic resistance to parasitic disease: particularly of resistance in ruminants to gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology* **54**:161-176.
- Suarez VH, Cristel SL, Busetti MR. 2009. Epidemiology and effects of gastrointestinal nematode infection on milk productions of dairy ewes. *Parasite* **16**:141-147.
- Suarez VH, Martínez GM, Viñabal AE, Alfaro JR. 2017. Epidemiology and effect of gastrointestinal nematodes on dairy goats in Argentina. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* **84**.
- Sutherland I, Scott I. 2010. *Gastrointestinal Nematodes of Sheep and Cattle: Biology and Control*. Blackwell, West Sussex.
- Sykes AR, Coop RL. 1977. Intake and utilization of food by growing sheep with abomasal damage caused by daily dosing with *Ostertagia circumcincta* larvae. *The Journal of Agricultural Science* **88**:671-677.
- Tasawar Z, Ahmad S, Lashari MH, Hayat CS. 2010. Prevalence of *Haemonchus contortus* in Sheep at Research Centre for Conservation of Sahiwal Cattle (RCCSC) Jehangirabad District Khanewal, Punjab, Pakistan. *Pakistan J. Zool.* **42**:735-739.
- Taylor MA, Coop RL, Wall RL. 2015. *Veterinary Parasitology*. John Wiley, Hoboken, NJ, USA.
- Thomas RJ, Ali DA. 1983. The effect of *Haemonchus contortus* infection on the pregnant and lactating ewe. *International Journal for Parasitology* **13**:393-398.
- Torres-Acosta JFJ, Hoste H. 2008. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research* **77**:159-173.
- Troell K, Engström A, Morrison DA, Mattsson JG, Höglund J. 2006. Global patterns reveal strong population structure in *Haemonchus contortus*, a nematode parasite of domesticated ruminants. *International Journal for Parasitology* **36**:1305-1316.
- Vargas-Magana JJ, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ, Sandoval-Castro, CA, Hoste H, Chan-Pérez JI, Vilarem G. 2014. In vitro susceptibility to tannin rich extracts differs amongst *Haemonchus contortus* isolates from tropical and temperate regions. In *Proceedings of the 13th International Congress of Parasitology*.
- Veglia F. 1915. The anatomy and life-history of the *Haemonchus contortus* (Rud). Third and Fourth Reports of the Director of Veterinary Research. Onderstepoort, Pretoria, South Africa.
- Vercruyse J, Charlier J, Van Dijk J, Morgan ER, Geary T, von Samson-Himmelstjerna G, Claerebout E. 2018. Control of helminth ruminant infections by 2030. *Parasitology* **145**:1655-1664.

- Verma R, Lata K, Das G. 2018. An overview of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of livestock and its management: India perspectives. *International Journal of Chemical Studies* **6**:1755-1762.
- Walkden-Brown WS, Sunduimijid B, Olayemi M, Van Der Werf J, Ruvinsky A. 2008. Breeding Fibre Goats for Resistance to Worm Infections. Rural Industry Research and Development Corporation.
- Waller PJ, Chandrawathani P. 2005. *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics – Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Tropical biomedicine* **22**:130-138.
- Waller PJ, Thamsborg SM. 2004. Nematode control in ‘green’ ruminant production systems. *Trends in Parasitology* **20**:493-497.
- Waller PJ, Thomas RJ. 1975. Field studies on inhibition of *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasitology* **71**:285-291.
- Yadav P, Singh R. 2011. A review on anthelmintic drugs and their future scope. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **3**:17-21.
- Yilmaz E, Ramünke S, Demeler J, Krücken J. 2017. Comparison of constitutive and thiabendazole-induced expression of five cytochrome P450 genes in fourth-stage larvae of *Haemonchus contortus* isolates with different drug susceptibility identifies one gene with high constitutive expression in a multi-resistant isolate. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **7**:362-369.
- Zajac AM, Conboy GA, MV, Reichard SE. 2012. *Veterinary clinical parasitology* 8th edition. Wiley-Blackwell, Chichester.
- Zajac AM, Garza J. 2020. Biology, Epidemiology, and Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **36**:73-87.
- Zajac AM. 2006. Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants: Life Cycle, Anthelmintics, and Diagnosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **22**:529-541.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

L₁ larva 1. vývojového stadia

L₂ larva 2. vývojového stadia

L₃ larva 3. vývojového stadia

L₄ larva 4. vývojového stadia

LD50 Larval Death 50%

IVM ivermektin

MOX moxidektin

BMZ benzimidazol

10 Samostatné přílohy

Tabulka č. 4: Počet larev v testu ivermektinu (D+0 a D+1)

Ivermektin D+0				Ivermektin D+1				
konc.	L ₃	L ₄	mrtvé	celkem	konc.	L ₃	L ₄	mrtvé
1	42	32	16	90	1	48	11	31
1	70	65	12	147	1	66	17	64
1	40	53	20	113	1	32	13	68
<u>průměr</u>	51	50	16	117	<u>průměr</u>	49	14	54
2	54	46	9	109	2	48	10	51
2	62	57	13	132	2	53	6	73
2	68	50	7	125	2	65	11	49
<u>průměr</u>	61	51	10	122	<u>průměr</u>	55	9	58
3	63	57	8	128	3	58	28	42
3	48	40	10	98	3	46	16	36
3	52	47	12	111	3	52	17	42
<u>průměr</u>	54	48	10	112	<u>průměr</u>	52	20	40
4	5	3	4	12	4	5	3	4
4	53	49	7	109	4	52	22	35
4	50	45	8	103	4	49	36	18
<u>průměr</u>	36	32	6	75	<u>průměr</u>	35	20	19
5	4	2	3	9	5	3	1	5
5	32	72	9	113	5	34	56	23
5	50	42	7	99	5	50	19	30
<u>průměr</u>	29	38	6	74	<u>průměr</u>	29	25	19
6	46	43	7	96	6	48	46	8
6	54	59	6	119	6	55	36	28
6	64	45	8	117	6	54	53	10
<u>průměr</u>	55	49	7	111	<u>průměr</u>	52	45	13
7	57	45	10	112	7	37	39	36
7	46	42	12	100	7	33	37	30
7	54	49	14	117	7	44	44	29
<u>průměr</u>	52	45	12	110	<u>průměr</u>	38	40	32

Tabulka č. 5: Počet larev v testu ivermektinu (D+2 a D+3)

Ivermektin D+2				Ivermektin D+3			
konc.	L₃	L₄	mrtvé	konc.	L₃	L₄	mrtvé
1	43	2	45	1	3	0	87
1	53	3	91	1	1	0	146
1	22	3	88	1	1	0	112
<u>průměr</u>	39	3	75	<u>průměr</u>	2	0	115
2	38	4	67	2	2	0	107
2	35	3	94	2	3	0	129
2	45	3	77	2	6	0	119
<u>průměr</u>	39	3	79	<u>průměr</u>	4	0	118
3	48	1	79	3	9	0	119
3	41	0	57	3	8	0	90
3	40	0	71	3	9	0	102
<u>průměr</u>	43	0,3	69	<u>průměr</u>	9	0	107
4	4	1	7	4	1	0	11
4	30	3	76	4	10	0	99
4	37	6	60	4	14	0	89
<u>průměr</u>	24	3	48	<u>průměr</u>	8	0	66
5	2	0	7	5	1	0	8
5	20	3	90	5	15	0	98
5	43	3	53	5	12	1	86
<u>průměr</u>	22	2	50	<u>průměr</u>	9	0,3	64
6	36	9	51	6	11	0	85
6	32	8	79	6	18	0	101
6	41	6	70	6	20	1	96
<u>průměr</u>	36	8	67	<u>průměr</u>	16	0,3	96
7	28	6	78	7	15	0	97
7	19	5	76	7	10	1	89
7	25	8	84	7	16	4	97
<u>průměr</u>	24	6	79	<u>průměr</u>	9	2	94

Tabulka č. 6: Počet larev v testu moxidektinu (D+0 a D+1)

Moxidektin D+0					Moxidektin D+1			
konc.	L₃	L₄	mrtvé	celkem	konc.	L₃	L₄	mrtvé
1	57	35	11	103	1	35	6	62
1	35	47	12	94	1	33	1	60
1	43	40	10	93	1	37	12	44
<u>průměr</u>	45	41	11	97	<u>průměr</u>	35	6	55
2	69	62	11	142	2	44	23	75
2	55	45	9	109	2	54	13	42
2	59	41	7	107	2	35	10	62
<u>průměr</u>	61	49	9	119	<u>průměr</u>	44	15	60
3	52	41	9	102	3	31	16	55
3	48	34	7	89	3	37	15	37
3	55	46	9	110	3	15	3	92
<u>průměr</u>	52	40	8	100	<u>průměr</u>	28	11	61
4	54	42	8	104	4	35	13	59
4	58	48	7	113	4	33	25	55
4	56	52	7	115	4	44	26	45
<u>průměr</u>	56	47	7	111	<u>průměr</u>	37	21	53
5	44	39	3	86	5	32	31	23
5	47	36	16	99	5	38	31	30
5	58	48	9	115	5	22	5	88
<u>průměr</u>	50	41	9	100	<u>průměr</u>	31	22	47
6	52	45	11	108	6	23	23	62
6	57	48	9	114	6	35	27	52
6	50	46	10	106	6	39	49	18
<u>průměr</u>	53	46	10	109	<u>průměr</u>	32	33	44
7	60	41	10	111	7	38	48	25
7	10	3	6	19	7	9	4	6
7	49	39	8	96	7	22	32	42
<u>průměr</u>	40	28	8	75	<u>průměr</u>	23	28	24

Tabulka č. 7: Počet larev v testu moxidektinu (D+2 a D+3)

Moxidektin D+2				Moxidektin D+3			
konc.	L ₃	L ₄	mrtvé	konc.	L ₃	L ₄	mrtvé
1	15	1	87	1	7	0	96
1	18	0	76	1	9	0	85
1	16	0	77	1	6	0	87
<u>průměr</u>	16	0,3	80	<u>průměr</u>	7	0	89
2	19	0	123	2	7	0	135
2	21	0	88	2	9	0	100
2	12	1	94	2	11	0	96
<u>průměr</u>	17	0,3	102	<u>průměr</u>	9	0	110
3	21	2	79	3	11	3	88
3	18	2	69	3	13	1	75
3	20	0	90	3	12	1	97
<u>průměr</u>	20	1	79	<u>průměr</u>	12	2	87
4	19	3	82	4	18	1	85
4	25	2	86	4	11	2	100
4	17	1	97	4	19	0	96
<u>průměr</u>	20	2	88	<u>průměr</u>	16	1	94
5	8	0	78	5	7	1	78
5	20	5	74	5	12	3	84
5	19	3	93	5	15	2	98
<u>průměr</u>	16	3	82	<u>průměr</u>	11	2	87
6	22	6	80	6	15	3	90
6	27	5	82	6	16	2	96
6	23	5	78	6	10	2	94
<u>průměr</u>	24	5	80	<u>průměr</u>	14	2	93
7	32	9	70	7	18	7	86
7	8	0	11	7	4	0	15
7	18	7	71	7	13	3	80
<u>průměr</u>	19	5	51	<u>průměr</u>	12	3	60

Tabulka č. 8: Počet larev v testu benzimidazolu 1 (D+0 a D+1)

Benzimidazol D+0					Benzimidazol D+1			
konc.	L ₃	L ₄	mrtvé	celkem	konc.	L ₃	L ₄	mrtvé
1	10	3	3	16	1	3	6	7
1	3	12	2	17	1	0	11	6
1	4	19	5	28	1	3	17	8
průměr	6	11	3	20	průměr	2	11	7
2	5	12	4	21	2	3	10	8
2	3	7	4	14	2	0	6	8
2	3	9	3	15	2	1	6	8
průměr	4	9	4	17	průměr	1	7	8
3	9	30	1	40	3	9	26	5
3	14	29	4	47	3	9	29	9
2	7	15	4	26	3	6	13	7
průměr	10	25	3	38	průměr	8	23	7
4	3	15	3	21	4	3	11	7
4	3	14	4	21	4	2	13	6
4	5	19	4	28	4	5	17	6
průměr	4	16	4	23	průměr	3	14	6
5	4	15	7	26	5	3	13	10
5	5	13	3	21	5	3	13	5
5	15	32	6	53	5	14	32	7
průměr	8	20	5	33	průměr	7	19	7
6	5	25	1	31	6	5	24	2
6	7	32	6	45	6	6	31	8
6	8	29	8	45	6	8	29	8
průměr	7	29	5	40	průměr	6	28	6
7	5	40	2	47	7	4	39	4
7	10	39	6	55	7	9	39	7
7	19	42	5	66	7	15	44	7
průměr	11	40	4	56	průměr	9	41	6

Tabulka č. 9: Počet larev v testu benzimidazolu 1 (D+2 a D+3)

Benzimidazol D+2				Benzimidazol D+3			
konc.	L ₃	L ₄	mrtvé	konc.	L ₃	L ₄	mrtvé
1	2	2	12	1	2	1	13
1	0	3	14	1	0	2	15
1	3	11	14	1	2	8	18
průměr	<u>2</u>	<u>5</u>	<u>13</u>	průměr	<u>1</u>	<u>4</u>	<u>15</u>
2	3	6	12	2	2	4	15
2	0	3	11	2	0	3	11
2	0	4	11	2	0	3	12
průměr	<u>1</u>	<u>4</u>	<u>11</u>	průměr	<u>1</u>	<u>3</u>	<u>13</u>
3	8	25	7	3	5	10	25
3	7	24	23	3	2	8	37
3	3	11	12	3	2	6	18
průměr	<u>6</u>	<u>20</u>	<u>14</u>	průměr	<u>3</u>	<u>8</u>	<u>27</u>
4	2	11	8	4	2	7	12
4	3	6	12	4	2	3	16
4	4	12	12	4	2	9	17
průměr	<u>3</u>	<u>10</u>	<u>11</u>	průměr	<u>2</u>	<u>6</u>	<u>15</u>
5	3	13	10	5	1	11	14
5	3	11	7	5	2	9	10
5	8	27	18	5	3	27	23
průměr	<u>5</u>	<u>17</u>	<u>12</u>	průměr	<u>2</u>	<u>16</u>	<u>16</u>
6	4	20	7	6	3	6	22
6	3	33	9	6	3	33	9
6	5	32	8	6	3	28	14
průměr	<u>4</u>	<u>28</u>	<u>8</u>	průměr	<u>3</u>	<u>22</u>	<u>15</u>
7	2	39	6	7	7	35	12
7	7	37	11	7	6	33	16
7	4	55	7	7	3	53	10
průměr	<u>4</u>	<u>44</u>	<u>8</u>	průměr	<u>5</u>	<u>40</u>	<u>13</u>

Tabulka č. 10: Počet larev v testu benzimidazolu 2 (D+0 a D+1)

Benzimidazol D+0					Benzimidazol D+1			
konc.	L ₃	L ₄	mrtvé	celkem	konc.	L ₃	L ₄	mrtvé
1	7	15	0	22	1	6	15	1
1	9	17	0	26	1	8	15	3
1	7	17	0	24	1	5	15	4
<u>průměr</u>	8	16	0	24	<u>průměr</u>	6	15	3
2	18	32	0	50	2	16	31	3
2	4	22	0	26	2	3	22	1
2	11	23	0	34	2	10	21	3
<u>průměr</u>	11	26	0	37	<u>průměr</u>	10	25	2
3	8	19	0	27	3	7	20	0
3	7	15	0	22	3	4	14	4
3	4	10	0	14	3	4	9	1
<u>průměr</u>	6	15	0	21	<u>průměr</u>	5	14	2
4	18	42	0	60	4	17	40	3
4	5	22	0	27	4	5	20	2
4	8	19	0	27	4	8	18	1
<u>průměr</u>	10	28	0	38	<u>průměr</u>	10	26	2
5	15	34	0	49	5	13	34	2
5	6	15	0	21	5	5	16	0
5	7	14	0	20	5	7	14	0
<u>průměr</u>	10	21	0	30	<u>průměr</u>	8	21	1
6	24	60	0	84	6	22	59	3
6	7	16	0	23	6	7	16	0
6	14	26	2	42	6	13	26	3
<u>průměr</u>	15	34	1	50	<u>průměr</u>	14	34	2
7	5	12	0	17	7	3	14	0
7	5	13	0	18	7	4	12	2
7	14	32	2	48	7	12	33	3
<u>průměr</u>	8	19	1	28	<u>průměr</u>	6	20	2

Tabulka č. 11: Počet larev v testu benzimidazolu 2 (D+2 a D+3)

<u>Benzimidazol D+2</u>				<u>Benzimidazol D+3</u>			
konc.	L₃	L₄	mrtvé	konc.	L₃	L₄	mrtvé
1	3	10	9	1	0	10	12
1	8	10	8	1	3	7	16
1	3	13	8	1	1	11	12
<u>průměr</u>	5	11	8	<u>průměr</u>	1	9	13
2	4	27	19	2	1	22	27
2	0	20	6	2	0	9	17
2	7	17	10	2	3	11	20
<u>průměr</u>	4	21	12	<u>průměr</u>	1	14	21
3	5	19	3	3	3	16	8
3	4	12	6	3	2	8	12
3	4	8	2	3	2	7	5
<u>průměr</u>	4	13	4	<u>průměr</u>	2	10	8
4	14	39	7	4	11	35	14
4	3	18	6	4	3	14	10
4	8	17	2	4	4	13	10
<u>průměr</u>	8	25	5	<u>průměr</u>	6	21	11
5	12	34	3	5	11	33	5
5	5	16	0	5	4	15	2
5	6	14	1	5	4	14	2
<u>průměr</u>	8	21	1	<u>průměr</u>	6	21	3
6	20	58	6	6	16	56	12
6	7	15	1	6	6	15	2
6	12	27	3	6	11	28	3
<u>průměr</u>	13	33	3	<u>průměr</u>	11	33	6
7	2	13	2	7	2	12	3
7	4	10	4	7	4	10	4
7	11	34	3	7	9	36	3
<u>průměr</u>	6	19	3	<u>průměr</u>	5	19	3