

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zoologie a rybářství**



**Larvicidní účinnost methanolových extraktů vybraných rostlin proti gastrointestinální  
hlístici *Haemonchus contortus***

**Diplomová práce**

**Autor práce: Ing. Michaela Součková**

**Obor studia: Zootechnika - Živočišná produkce**

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

**© 2018 ČZU v Praze**

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci „Larvicidní účinnost methanolových extraktů vybraných rostlin proti gastrointestinální hlístici *Haemonchus contortus*“ jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 11.4.2018

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Doc. Ing. Jaroslavu Vadlejchovi, Ph.D. za trpělivé vedení, cenné rady a podněty v průběhu zpracování diplomové práce a Ing. Evě Burešové za konzultace a především své rodině, manželovi a svým dvěma synům, Metodějovi a Antonínovi za podporu a trpělivost.

## Souhrn

Gastrointestinální hlístice způsobují v chovu malých přežvýkavců velké ekonomické i hospodářské ztráty, jejich následkem je snížená produkce mléka, masa a zvýšené výdaje na léčbu a veterinární ošetření. Jedním z celosvětově nejvýznamnějších parazitů pastevně chovaných malých přežvýkavců je hlístice vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*), která způsobuje gastrointestinální onemocnění hemonchózu. Hlavní metodou v boji proti hemonchóze je aplikace anthelmintik, léčba však začíná být problematičtější, často jí komplikuje rozšiřování rezistentních kmenů hlístic. Velké naděje se vkládají do kombinace anthelmintik a rostlinných přípravků. Využívá se kombinace moderních metod a poznatků s tradiční medicínou, která se vztahuje ke geografické oblasti, kde chov malých přežvýkavců probíhá.

Diplomová práce hodnotila v *in vitro* podmínkách devitalizační účinnost methanolových extraktů ze třinácti rostlin vyskytujících se v běžné flóře České republiky. Jako modelový organismus pro testování účinnosti rostlinných extraktů sloužila gastrointestinální hlístice *H. contortus*, která byla kultivována z výkalů experimentálně nakaženého jehněte.

Larvicidní účinek methanolových extraktů z testovaných rostlin v nejnižší testované koncentraci 64 µg/ml byl pozorován v rozmezí 10 – 98 %. Významný anthelmintický účinek v této koncentraci vykazovaly extrakty z nati zemědělského (*Fumaria officinalis*), semene fenyklu obecného (*Foeniculum vulgare*) a kořene omanu pravého (*Inula helenium*). Larvicidní účinek methanolových extraktů z testovaných rostlin v nejvyšší testované koncentraci 1024 µg/ml byl pozorován v rozmezí 34 – 100 %. Významný anthelmintický účinek v této koncentraci vykazovaly extrakty z nati zemědělského (*Fumaria officinalis*), kořene omanu pravého (*Inula helenium*), kořene proskurníku lékařského (*Althaea officinalis*), květu slézu lesního (*Malva sylvestris*), listu rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*), květu heřmánku pravého (*Matricaria chamomilla*), kořene devětsilu lékařského (*Petasites hybridus*), semene fenyklu lékařského (*Foeniculum vulgare*).

Vědecká hypotéza, že rostliny s vysokým obsahem sekundárních metabolitů mají letální účinek na larvy hlístice *Haemonchus contortus* se potvrdila.

Pro zhodnocení praktické využitelnosti rostlin s anthelmintickými účinky v managementu tlumení parazitóz přežvýkavců je potřeba ověřit účinky rostlin i v *in vivo* podmínkách.

**Klíčová slova:** alternativní metody, malí přežvýkavci, rezistence, rostlinný extrakt, vlasovka slezová – *Haemonchus contortus*.

## Summary

Gastrointestinal nematodes cause large economic and business losses in a small ruminant breeding, the effect is reduced production of milk, meat and increased expenses on medication and veterinary treatment.

The most common and widely spread parasite of small ruminants is the nematode *Haemonchus contortus*, which causes gastrointestinal disease haemonchosis. The main method in the fight against haemonchosis is the application of anthelmintics, however, the treatment has become problematic, it is often complicated by a rapid increase in resistant strains. Great hopes are put into the combination of anthelmintics and herbal preparations. A combination of modern methods and knowledge with traditional medicine is used, which relates to the geographical area where small ruminants are farmed.

This thesis evaluated the devitalization efficiency of methanol extracts from thirteen plants occurring in the common flora in the Czech Republic in *in vitro* conditions. The gastrointestinal nematode *H. contortus* served as a model organism for testing the effectiveness of plant extracts, which was cultured from excrement of an experimentally infected lamb.

Larvicidal effect of methanol extract from tested plants in concentration 64 µg/ml was observed in range 10 – 98 %. Significant anthei effect in this concentration is shown by the extract of fumitory *Fumaria officinalis*, seeds *Foeniculum vulgare* and elecampane *Inula helenium*. Larvicidal effect of methanol extract from tested plants in concentration 1024 µg/ml was observed in range 34 – 100 %. Significant anthei effect in this concentration is shown by the extract of fumitory *Fumaria officinalis*, elecampane *Inula helenium*, elecampane *Althaea officinalis*, flowers *Malva sylvestris*, leafs *Rosmarinus officinalis*, bloom *Matricaria chamomill*, elecampane *Petasites hybridus* and seeds *Foeniculum vulgare*.

To evaluate the practical applicability of plants with anthelmintic effects in the management of control of ruminant parasitosis, it is necessary to verify the effects of plants even in *in vitro* conditions.

**Keywords:** alternative methods, *Haemonchus contortus*, plant extract, resistance, small ruminants

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíl práce</b> .....	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Vědecká hypotéza</b> .....	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Cíl práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Stručná charakteristika hlístic</b> .....	<b>3</b>
<b>3.2</b>	<b>Vlasovka slezová <i>Haemonchus contortus</i> (Rudolphi, 1803)</b> .....	<b>5</b>
3.2.1	Morfologie a fyziologie <i>Haemonchus contortus</i> .....	6
3.2.2	Vývojový cyklus .....	6
<b>3.3</b>	<b>Hostitelé</b> .....	<b>7</b>
<b>3.4</b>	<b>Hemonchóza</b> .....	<b>8</b>
3.4.1	Symptomy a diagnostika onemocnění .....	9
3.4.2	Ekonomický dopad .....	10
3.4.3	Léčba.....	11
3.4.4	Rezistence .....	15
3.4.5	Alternativní metody .....	17
<b>3.5</b>	<b>Rostliny</b> .....	<b>19</b>
3.5.1	Metabolismus rostlin.....	20
3.5.2	Anthelmintické účinky rostlin .....	21
<b>4</b>	<b>Materiál a metody</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Biologický materiál</b> .....	<b>27</b>
4.1.1	Rostlinný materiál.....	27
4.1.2	Parazitologický materiál .....	28
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>Diskuze</b> .....	<b>37</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>40</b>
<b>8</b>	<b>Seznam literatury</b> .....	<b>41</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů</b> .....	<b>54</b>

# 1 Úvod

Parazitární onemocnění představují ve veterinární medicíně velký problém. Celosvětově způsobují značné hospodářské a ekonomické ztráty v živočišné výrobě, snižují přírůstek hmotnosti zvířat a zvyšují úmrtnost skotu a malých přežvýkavců.

Hemonchóza je gastrointestinální onemocnění způsobené parazitickou hlísticí vlasovkou slezovou (*Haemonchus contortus*). Vlasovky jsou rozšířené celosvětově, napadají slez přežvýkavců jak ve volné přírodě, tak i v chovech, kde působí značné škody zvláště u malých přežvýkavců.

Hlavní metodou v boji proti hemonchóze jsou dnes širokospektrá anthelmintika, účinkující na většinu vývojových stádií helmintů. Léčbu však značně komplikuje rychlý nárůst rezistentních kmenů parazitů. Přesto, že v této oblasti je velmi intenzivní výzkum, nelze předpokládat významné snížení dopadu parazitů na chov malých přežvýkavců. Místo permanentní snahy o úplné odstranění parazitů jak z prostředí, tak z hostitelů je nezbytné se zaměřit i na další nové alternativní a především udržitelné metody. Současný přístup by měl v co nejvyšší míře využívat poznatky o parazitech, informace z jejich prostředí, geografické i meteorologické podmínky a zaměřit se na srozumitelnou komunikaci s chovateli malých přežvýkavců, což mnohdy představuje vysvětlení změny tradičního pohledu, zažitých přístupů a metod ve vztahu mezi chovatelem a parazitem.

Jednou z alternativních metod, do které vědci vkládají své naděje jsou přípravky z rostlin. Opírají se jak o tradiční tak o nové poznatky a studie. Rostliny obsahují různorodé látky, z nichž některé jsou přírodním anthelmintikem a právě na ty je zaměřen rozsáhlý výzkum napříč kontinenty.

## **2 Vědecká hypotéza a cíl práce**

### **2.1 Vědecká hypotéza**

Vědecká hypotéza: rostliny s vysokým obsahem sekundárních metabolitů mají letální účinek na larvy hlístice *Haemonchus contortus*.

### **2.2 Cíl práce**

**Cílem** této práce je v *in vitro* podmínkách vyhodnotit devitalizační účinek methanolových extraktů z vybraných rostlin na larvy gastrointestinální hlístice *Haemonchus contortus*.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Stručná charakteristika hlístic

Termín nematoda pochází z řeckého základu „nema“, v překladu nit nebo vlákno (Rajan, 2009).

Napadení gastrointestinálními hlísticemi patří mezi hlavní zdravotní a ekonomické problémy v chovu ovcí a koz po celém světě (Riggio et. al., 2014).

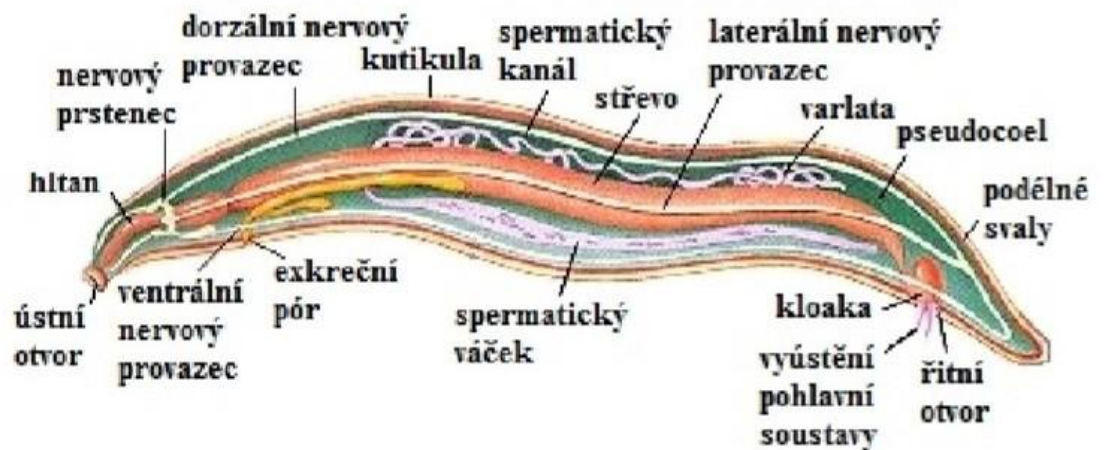
Téměř všichni malí přežvýkavci jsou v průběhu svého života infikováni gastrointestinálními hlísticemi a jde převážně o směsné infekce, které jsou způsobeny více druhy parazitů současně. Závažnost infekce je závislá na řadě faktorů – druhové spektrum hlístic a jejich počet, klimatické podmínky, výživa zvířat, zdravotní stav, kondice, imunita apod. (Kassai, 1999; Zajac et al., 2006).

#### Morfologie a fyziologie hlístic

Hlístice jsou až na výjimky gonochoristi s rozmanitými vývojovými cykly (Anderson, 2000). Tělo hlístic má válcovitý, nesegmentovaný tvar zužující se na obou koncích. Na povrchu těla je bezbarvá, mírně průsvitná vrstva kutikuly bohatá na kolagen (Taylor et al., 2007) pokrývající celý vnější povrch těla hlístice a zasahující do všech tělních otvorů, hltanu, ústního otvoru, genitálního a rektálního otvoru (Hendrix et Robinson, 2014).

Povrch těla hlístic je tvořen flexibilní několikavrstvenou kutikulou, ta je syntetizována v hypodermis. Kutikulu tvoří tři vrstvy: zevní kortex, prostřední matrix a vnitřní vlákno (neboli bazální zónu). Každá z vrstev se skládá ještě z dalších podvrstev, které se liší dle druhu hlístic. Důležitá je především funkce zevního kortexu coby semipermeabilní membrány (Thorp a Covich, 2001). Kutikula neplní jen opěrnou funkci, ale umožňuje i pohyb hlístice a zároveň tvoří ochrannou bariéru. Kutikulu rozděluje radiální rýha, která připomíná články tzv. pseudosegmentace a na povrchu mívá obvykle řadu výběžků v podobě trnů, papil, žeber, hřebenů a výdutí. Právě tyto útvary se hojně využívají pro rozlišení jednotlivých druhů. Základní funkcí trávicího systému je příjem potravy, získávání živin a následně vylučování nepotřebných zbytků. Trávicí soustavu tvoří ústní otvor s ústní dutinou (stoma), hltan, střevo, konečník a řitní otvor (Weischer a Brown 2000). Ústní otvor je široký a vybavený zuby nebo bodcem. Navazuje svalnatý hltan, který pumpuje do střeva pomocí sekrečních žláz (Thorp

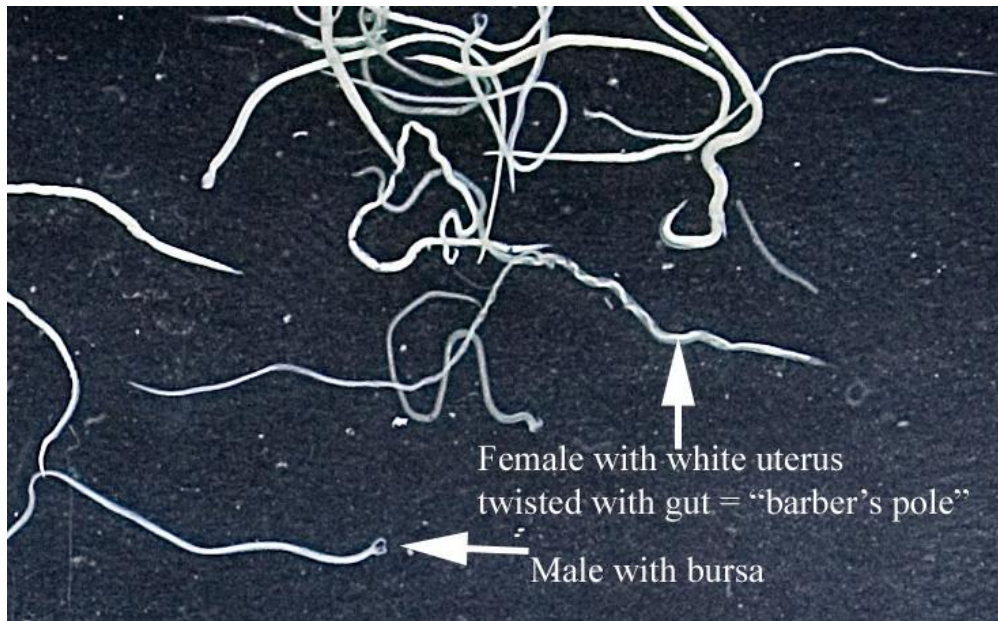
a Covich 2001). Střevo tvoří jednoduchá trubice, u samic ústí análním otvorem, u samců je vyústění společné s pohlavní soustavou do kloaky. Vylučovací soustava shromažďuje, detoxifikuje a vylučuje odpadní metabolity, především dusík jako konečný produkt proteinového metabolismu, a podílí se na osmoregulaci. Nervovou soustavu uvádí Weischer a Brown (2000) jako zprostředkovatele vnímání vnějších a vnitřních stimulů, ty jsou vedeny do nervového centra pro koordinaci a umožňuje přenášet příslušné podněty do orgánů jako jsou svaly či žlázy (Weischer a Brown, 2000).



**Obrázek 1: Anatomická stavba hlístice, samec**

Zdroj: [http://ahele.cz/vlasovka.anatomicka\\_stavba](http://ahele.cz/vlasovka.anatomicka_stavba)

### 3.2 Vlasovka slezová *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803)



**Obrázek 2: *Haemonchus contortus***

Zdroj: <http://bio390parasitology.blogspot.cz/2012/03/haemonchus-contortus-bite-in-gut.html>

*H. contortus* je typický parazit gastrointestinálního traktu přežvýkavců. Zejména těžké infekce způsobují anemii, ztrátu váhy, bledší oční spojivky a podkožní otoky v oblastech dolní čelisti. Infekce vyvolaná hlísticí *H. contortus* (hemonchóza) nezpůsobuje průjmové projevy a infikovaný jedinec nemusí mít dlouhou dobu žádné viditelné symptomy, takže často dochází k přehlédnutí infekce až do chvíle, kdy je na léčbu pozdě a jedinec uhynie (Elsheikha a Khan, 2011).

Dříve se všeobecně usuzovalo, že výskyt těchto hlístic se omezuje především na oblasti s teplým a vlhkým klimatem, to ale výzkumy vyvrátily a *H. contortus* se dnes považuje za celosvětově nejvýznamnějšího parazita malých přežvýkavců s velmi závažnými socio-ekonomickými dopady (Waller a Chandrawathani, 2005).

*H. contortus* pochází ze subsaharské Afriky (Hoberg et al., 2004). Prvotním hostitelem byla antilopa, následně se hlístice rozšířila a infikovala i další malé přežvýkavce (Angulo-Cubillán et al., 2007). Také Sutherland a Scott (2009) uvádějí, že *H. contortus* se pravděpodobně u ovcí dříve neobjevoval, ale k přenosu došlo až po jejich importu člověkem do Afriky, zde se nakazily kontaktem s místními druhy přežvýkavců.

V současné době lze druh *H. contortus* nalézt v podstatě na všech kontinentech, převážně však v tropických a subtropických oblastech. Napadá především menší přežvýkavce, jako jsou ovce a kozy (Elsheikhat a Khan, 2011).

### 3.2.1 Morfologie a fyziologie *Haemonchus contortus*

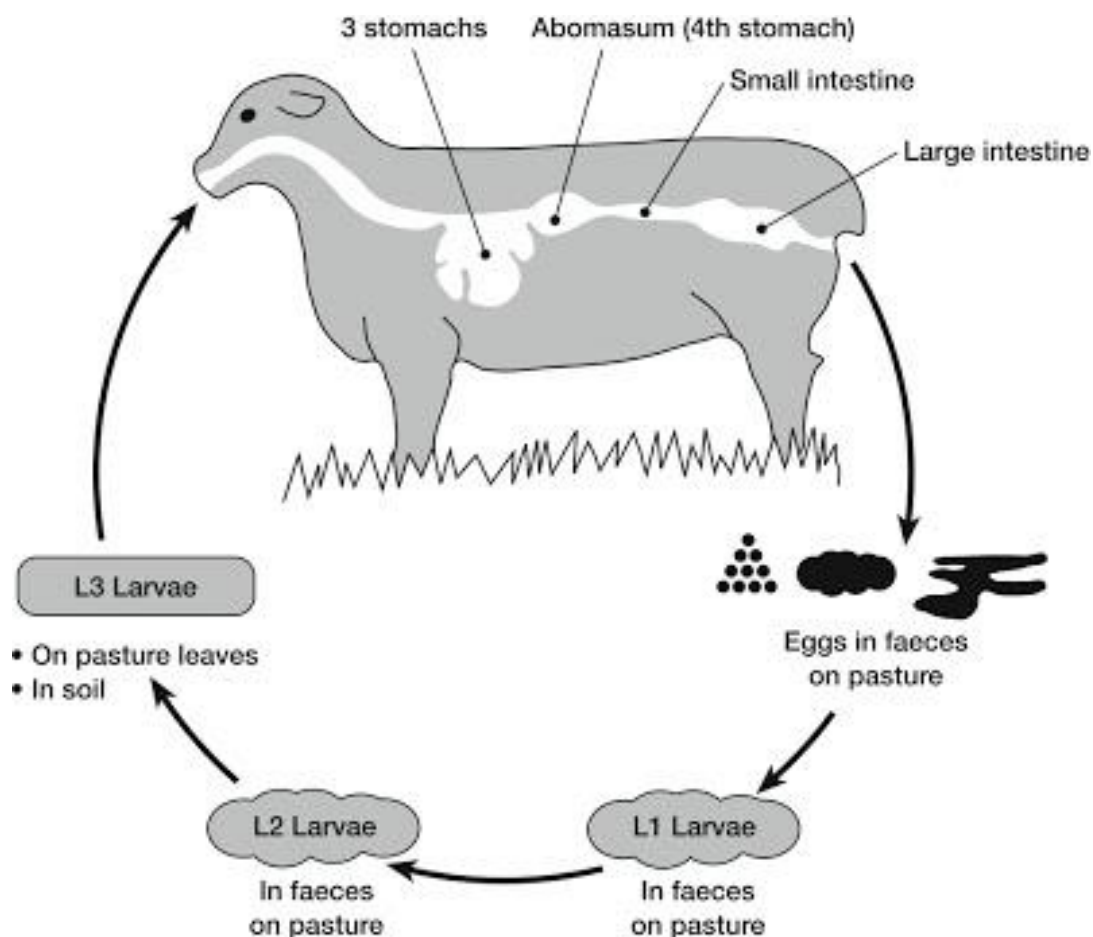
*H. contortus* má nitkovitý tvar těla, délka těla dospělých samců je 10-20 mm, šířka těla 0,4 mm, délka těla samice 18–30 mm, šířka těla 0,5 mm.

Zkonzumovaná krev tělo této hlístice zbarví do růžova až do červena. U samic je možné pozorovat bíle zbarvené vaječníky spirálovitě obtáčeující střevo, prosvítající pod pokožkou, viditelné i pouhým okem a vulvární chlopně kryté kutikulární řasou v poslední třetině těla. Samci mají v kaudální části těla hnědé spikuly a dvoulaločnou burzu vyztuženou žebry (Angulo-Cubillán a kol., 2007).

### 3.2.2 Vývojový cyklus

*H. contortus* má přímý životní cyklus, nepotřebuje mezipřehostitele, hovoří se proto o geohelminтови. Dospělí jedinci žijí prisátí na sliznici slezu, zde samičky nakladou vajíčka, ty následně společně s exkrementy odcházejí z těla hostitele do vnějšího prostředí. Larva se vyvíjí ve vaječném obalu a prochází několika stádii. První dvě stádia  $L_1$  a  $L_2$  jsou neinfekční. Následným postupným svlékáním a dalším vývojem vzniká larva  $L_3$  (Laing et al., 2013).  $L_3$  se po požití svléká v bachoru, zbaví se ochranné kutikuly ze stádia  $L_2$  a následně migruje do slezu. Zde proniká do sliznice a tam dospívá do stádia  $L_4$ . (Angulo-Cubillán et al., 2007). V ranném období volně žijící fáze je úspěšnost vývoje hlístic limitována citlivostí k nízkým teplotám. Poté, co hlístice dosáhnou infekčního stadia, vliv vlhkosti a teploty pro jejich přežití je již méně významný, nicméně extrémní podmínky mohou být pro vývojové stádium  $L_3$  letální (O'Connor et al., 2006). Taylor et al. (2007) uvádí přežívání suchých období v Austrálii, kdy larva čtvrtého stádia čeká na příhodné období dešťů, aby se mohla dovyvinout a začít produkovat vajíčka, která by jinak na vegetaci uschla.

Emery et al. (2016) uvádí, že dospělci a větší larvy  $L_4$  jsou schopné sát až 30  $\mu$ l za den. Oplodněné samice intenzivně produkují vajíčka, ta následně odcházejí s výkaly z trávicího traktu do vnějšího prostředí, tam se dále vyvíjejí viz. Obr. č. 3 (Zajac et al., 2012).



**Obrázek 3: Vývojový cyklus hlístice *Haemonchus contortus***

Zdroj: <http://drainameducci.blogspot.cz/2011/12/haemonchosis-barbers-pole-worm.html>

### 3.3 Hostitelé

*H. contortus* je považován za nejvíce patogenní hlístici malých přežvýkavců. Oplývá vysokým biotickým potenciálem, a pokud nastanou příznivé podmínky pro vývoj tohoto parazita, může způsobit obrovské ztráty. Malí přežvýkavci jsou nejčastějšími hostiteli této hlístice. Především plemena ovcí a koz jsou velmi náchylné k tomuto parazitu (Waller a Thamsborg, 2004). Kern et al. (2014) uvádí, že masná plemena ovcí mají nejvyšší riziko infekce gastrointestinálního traktu.

## Obranné mechanismy hostitele vůči GI hlísticím

Obrannými mechanismy hostitelů vůči hlísticím je specifická a nespecifická imunita a období kolem porodu, kdy klesá přirozená imunita. Specifický typ imunní odpovědi má sice pomalejší nástup, jeho výhodou je však zacílení přímo proti parazitům a vykazuje jistou formu paměti. Nespecifická imunita není zaměřena přímo na likvidaci parazitů, ale vytváří jakousi bariéru a odpovídá po každém setkání s „antigenem“ stejnými mechanismy, není tedy zaměřena přímo na likvidaci parazitů, ale částečně blokuje uchycení parazitů v organismu hostitele a tím i rozvinutí infekce. Oslabení v období kolem porodu označujeme PPRI (Periparturient relaxation in immunity). PPRI začíná cca 2-4 týdny před porodem a pokračuje dalších 6-8 týdnů, pak následuje návrat imunity do normálu. Při PPRI je důležité se zaměřit na nutriční výživu zvířat, potřeba živin v době PPRI se značně zvyšuje (Houdijk, 2000, 2008, Pernthaner et al., 2006).

## 3.4 Hemonchóza

Hemonchóza je gastrointestinální onemocnění způsobené parazitem *H. contortus*. Jedná se o onemocnění, které ohrožuje celé stádo a jeho důsledky mohou být velmi vážné. Při vysoké intenzitě infekce dochází k úhynu jehňat, převážně však přechází do chronické formy. Závažnost tohoto onemocnění závisí na různých faktorech – virulence parazita, zdravotním stavu nakaženého zvířete, plemenu, věku a především na intenzitě infekce. Hemonchóza vede ke snížení produktivity zvířat a může zapříčinit úhyn jedinců, což znamená značné ekonomické dopady pro chovatele (Angulo-Cubillán et al., 2007). Waller a Chandrawathani (2005) uvádějí, že jen samotné náklady na léčbu hemonchóz v Jižní Africe a Indii jsou odhadovány na několik desítek milionů dolarů a tato čísla stále stoupají.

Při fyziologickém stavu sliznice buňky produkují pepsinogen, který je kyselinou chlorovodíkovou a později též autokatalyticky aktivován na pepsin, ten plní standardně svoji trávicí funkci. Pokud je ale ve slezu jiné pH, tato přeměna je přirozeně narušena. Jak uvádějí Elsheikha a Khan (2011) tak nedostatečně kyselé prostředí slezu nedokáže zabít přirozenou cestou bakterie

Výskyt hemonchóz ovlivňují různé faktory v prostředí – teplota, vlhkost, vegetace, množství srážek. Ideálním teplotním rozmezím pro vývoj larev je považováno cca 22–26 °C při vlhkosti vzduchu blížící se 100 %, což podle Laing et al. (2013) odpovídá průměrné

měsíční teplotě 18 °C a 50 mm srážek. Právě proto jsou tato onemocnění nejrozšířenější především v tropech a subtropích. Mimo environmentálních faktorů má na rozvoj onemocnění vliv i věk hostitele, náchylnější jsou mladá zvířata s nepříliš vyvinutým či oslabeným imunitním systémem (Getachew et al., 2007).

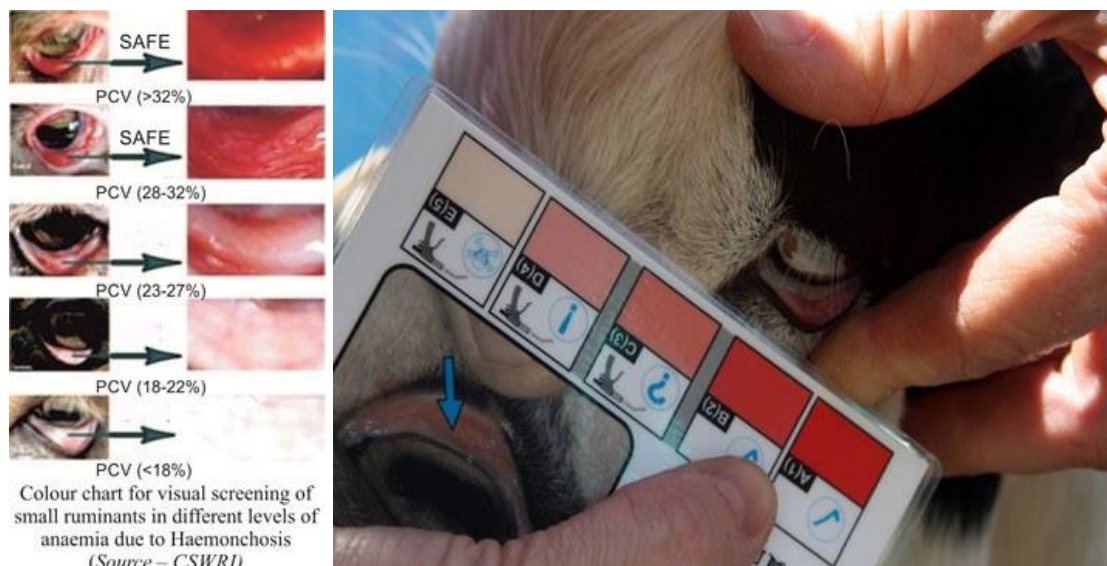
Důležité pro správnou volbu strategie léčby hemonchózy je rozlišení jednotlivých druhů vlasovek, těch existuje celkem 12. Rozlišují se na základě rozdílů v jejich morfologii (Amarante, 2011).

### **3.4.1 Symptomy a diagnostika onemocnění**

Sendow (2003) mezi hlavní symptomy řadí anemii, letargii, nižší produkci mléka, vlny, snižující se hmotnost, nechut' k jídlu. Postupně se mění barva spojivek z tmavě červené, kterou lze pozorovat u zdravých zvířat, přes různé odstíny růžové až po bílé – důsledek anémie (Van Wyk a Bath, 2002). Abbott (2012) poukazuje na otoky tělních dutin a hypertrofii lymfatických uzlin.

*H. contortus* produkuje substanci kalretikulin, ta váže vápník a srážecí faktor a tím usnadňuje parazitovi sání krve. Studie prováděné metodou experimentální nákazy prokázaly morfologické a fyziologické změny na tkáních hostitele, poškození epitelu, zvětšení uzlin, hyperplazii mukózy, snížení sekrece kyselin, snížení hladiny sérového gastrinu a pepsinogenu (Gilleard 2006, 2013, Getachew et al., 2007).

Jasným příznakem je akutní anémie. Možností, jak diagnostikovat napadené ovce, je využití testu FAMACHA (Faffa Malan chart). Systém, o který se zasloužil lékař F.S. Malan, je schopen určit jedince, které je již nutné léčit anthelmintiky. Je založen na změně barvy spojivek. FAMACHA test (Bath et al., 1996) je komerčně dostupný a velmi jednoduše aplikovatelný dle diagnostických karet (Van Wyk a Bath, 2002).



**Obrázek 4: FAMACHA test / karta**

*Zdroj: [https://www.researchgate.net/profile/Marcelo\\_Molento](https://www.researchgate.net/profile/Marcelo_Molento)*

### 3.4.2 Ekonomický dopad

Chov hospodářských zvířat má zásadní význam pro udržitelnost venkovských komunit po celém světě, je důležitý jak sociálně, ekonomicky tak politicky, a to jak na národní tak mezinárodní úrovni (Charlier, J., 2015). Užitek malých přežvýkavců a tím i ekonomika chovu závisí především na zdravotním stavu zvířat, který je odrazem celé řady faktorů působících na organismus zvířete jak pozitivně, tak negativně. Světovou produkci malých přežvýkavců výrazně ovlivňují především parazitární onemocnění způsobená nejčastěji hlísticemi (Domke et al., 2011). Gastrointestinální hlístice a následné onemocnění – nematodózy s tím spojené jsou jedním z hlavních zdravotních a ekonomických problémů v chovu malých přežvýkavců (Riggio et al., 2014). Celosvětově způsobují značné hospodářské a ekonomické ztráty v živočišné výrobě, snižují přírůstek hmotnosti zvířat a zvyšují úmrtnost skotu a malých přežvýkavců. Velkým problémem jsou nematodózy zejména v tropických a subtropických oblastech s teplým a vlhkým podnebím (Waller a Chandrawathani 2005), finanční ztráty jsou každoročně odhadovány v řádech stovek milionů dolarů. Během posledního desetiletí došlo ke změně vnímání celé situace. Výzkum je zaměřen více na diagnostiku těchto infekcí z pouhého zjišťování přítomnosti či nepřítomnosti infekce k detekci jejího dopadu na produkci. To bylo usnadněno studii pozorujícími konzistentní negativní korelaci mezi výsledky diagnostických testů a měřeními



produktivity. Kombinace lepších posouzení hospodářských dopadů parazitických infekcí spolu s hlubším porozuměním neekonomických faktorů, které vedou rozhodování farmáře v oblasti zdraví zvířat, by měla vést k účinnějším strategiím kontroly a ke zvýšení spokojenosti zemědělců.

Globální zemědělství se bude muset více zaměřit na kombinaci pokroku v laboratorní diagnostice helmintů a ekonomiku zdraví zvířat, jedině tak lze udržitelně řídit a kontrolovat infekce a integrovat je do ekonomického kontextu. Problémy vznikají, pokud nově navrhované strategie prevence jsou v kontrastu s dlouhotrvajícími a po generace zažitými tradicemi či vnímáním. Průzkumy sociologických studií o chování farmářů naznačují, že je třeba se zaměřit na komunikační strategii. Charlier et al. (2015) doporučují spolupráci vědeckých pracovníků s odborníky v oblasti sociologie a komunikace, aby byli schopni správně interpretovat navrhovaná řešení, změny a především farmáře a zemědělce přesvědčit, že prevence onemocnění je vždy podstatně levnější než následná léčba (Horák et al. 2012, Charlier et al. 2014).

Kenyon et al. (2017) upozorňují na časté podávání anthelmintik bez důkladných vyšetření zvířat, které je v budoucnu neudržitelné. Poukazují na alternativní metody a důvody, proč i přes množství provedených studií často s velmi dobrými výsledky se stále nedaří tyto metody začlenit do běžných zemědělských postupů. Domnívají se, že jedním z důvodů je často protichůdné vyjadřování v odborných textech a studiích. Je třeba chovatele malých přežvýkavců přesvědčit, že trvalá kontrola parazitických hlístic může přinést finanční přínos a zlepšit celkovou udržitelnou a finanční rentabilitu zemědělských podniků.

Vercruyse et al. (2016) představili vizi kontroly hlístic v chovu malých přežvýkavců do roku 2030, zde se soustředí především na globální pokrok v diagnostických nástrojích a metodách; inovační přístupy tlumení, založených na očkovacích látkách a selektivním chovu; anthelmintika a především jejich udržitelné využívání, inovaci stávajících produktů a hledání potenciálně nových účinných léčiv či doplňků; racionální integraci budoucích kontrolních postupů.

### **3.4.3 Léčba**

Cílem léčby není úplná eliminace parazitů, nýbrž udržení jejich populace pod určitou hranicí, která ještě nepředstavuje značné nebezpečí pro hostitele (Getachew et al., 2007). Jak uvádí Hartl et al. (2012), tak nejčastější metodou v boji s helmintózami je v současné

době využití anthelmintik, tedy léčiv používaných k terapii helmintóz. Ke kontrole parazitóz je však třeba mít komplexní přístup (Niemann, 2013).

## **Anthelmintika**

Anthelmintika jsou dle Colese (2006) rozdělena na tři hlavní druhy širokospektrálních léčiv, které jsou schopné tlumit nákazu hlístic u pastevně chovaných zvířat. První skupinou jsou benzimidazoly, druhá skupina obsahuje imidazothiazoly (levamisoly), hydroypyrimidiny (pyrantel/morantel) a třetí skupinou jsou makrocyclické laktony (avermektiny a milbemyciny), každá skupina má rozdílný mechanismus působení. Nitrofelony a salicylanilidy se používají jako anthelmintika s úzkým spektrem. Abbot et al. (2012) uvádí rozdělení do 5ti skupin – benzimidazoly, tetrahydroypyrimidiny, makrocyclické laktony, imidazothiazoly a aceto-aminonitrilové deriváty.

Podávání anthelmintik se řídí určitými zásadami. Klíčové je podat vhodné anthelmintikum, nejlépe úzkospektrý druh, ke kterému je parazit citlivý, a to v dostatečné dávce a po dostatečně dlouhou dobu. Následkem podání nesprávného anthelmintika či podání nižší dávky léčiva, než je dávka terapeutická (tzv. poddávkování), patří mezi jedny z hlavních faktorů, které urychlují vznik klinické rezistence.

V současné době je již dostupný rozsáhlý výběr bezpečných anthelmintik, nejčastěji se širokospektrálním účinkem, nebo se specifickou účinností proti parazitární infekci (Hansen a 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 zmražením se zachováním jejich životaschopnosti či možnost provádění *in vivo* studií včetně genetického křížení v prostředí přirozeného hostitele.

## **Benzimidazoly**

Benzimidazoly jsou významnou skupinu léčiv při léčbě helmintóz. Uplatnění nacházejí především ve veterinárním lékařství, ale omezeně se používají i v humánním lékařství (Furtado, 2016). Řadíme je mezi heterocyclické aromatické sloučeniny, které vznikly spojením benzenu a imidazolu. První širokospektré anthelmintikum – thiabendol

bylo objeveno roku 1961 (Köhler, 2001). Jeho účinek byl poměrně krátkodobý, a proto byly připraveny substituované deriváty benzimidazolu (Hartl et. al., 2006). Mezi ně patří fenbendazol, oxibendazol, albenzadol, ricobenzadol či substituovaný triklaben (McKellar a Jackson, 2004).

Mechanismus účinku benzimidazolových derivátů spočívá především v možnosti ovlivňovat mikrotubulární systém parazitů. Mikrotubuly jsou polymery s tzv. kladným a rostoucím koncem a představují nitrobuněčné organely, které se nacházejí v rostlinných, houbových, některých bakteriálních buňkách, ale i v lidských buňkách které kde plní mnoho důležitých funkcí; zodpovídají za intracelulární transporty, sekreci, kotvení receptorů a vytvářejí základní infrastrukturu cytoskeletonu, dodržují tvary buněk, rozdělování chromozómů při buněčném dělení a jsou součástí energetického systému buňky. Jsou tvořeny dvěma proteiny známými jako  $\beta$ -tubulin a  $\alpha$ -tubulin. Formování mikrotubulů probíhá dynamickým procesem, na jedné straně dochází polymerizací k prodlužování mikrotubulů, na druhé straně jsou depolymerizací mikrotubuly rozloženy. Benzimidazoly zablokuje jednotky  $\beta$ -tubulinu, a tím zastavují polymerizační děje, čímž mikrotubulární skelet nemůže být prodloužen. V případě, že nemohou být mikrotubuly dynamicky přestavovány, dochází k blokaci transportu sekrečních molekul a následně se sníží vychytávání glukózy, to má za následek postupné energetické vyčerpání parazitárního organismu. Parazit následně ztrácí schopnost motility, odumírá je vyloučen z gastrointestinálního traktu hostitele (Caviston a Holzbaaur, 2006; Belešová M., 2013).

### **Makrocyclické laktony**

Makrocyclické laktony jsou účinné především proti nematodům, jejich výhodou je, že působí i proti některým ektoparazitům, zvláště proti členovcům. Makrocyclické laktony patří mezi biosyntetické látky, vznikají kvašením aktinomycety rodu *Streptomyces avermitilis*. Rozdělují se do dvou skupin: avermektiny a milbemyciny. Mezi zástupce avermektinů patří i první makrocyclický lakton. Jedná se o ivermektin, který je stále využíván v terapii. Do téže skupiny náleží abamektin, doramektin, eprinomektin a selamektin. Do skupiny milbemycinů se řadí milbemycin a moxidektin, ten je oproti avermektinům lipofilnější, proto přetrvává delší dobu v organismu (Lamka a Ducháček, 2008, Dobšíková a kol., 2012).

Makrocyclické laktony způsobí paralýzu parazita vazbou na chloridové kanály ovládané glutamátem a GABA (u obratlovců se nevyskytují) (James et al., 2009). Dochází především k paralýze hltanových svalů a hlístice následně nejsou schopné přijímat potravu a vyhladovělé hynou (Dent et al., 2000). Makrocyclické laktony ovlivňují metabolismus hlístic, je tedy velmi pravděpodobné, že jejich anthelmintická aktivita se liší mezi druhy a tedy i mechanismy vzniku rezistence na tuto skupiny léčiv se mohou lišit. Gill a Lacey (1998) uvádějí, že i rezistentní kmeny stejného druhu *H. contortus* vykazují různé fenotypy. Genetické studie prokázaly, že rezistence na ivermektin u hlístice *H. contortus* je dominantní, pravá rezistence by tedy mohla být výsledkem polymorfismů několika přidružených genů.

Molento a Prichard 1999 pozorovali u rezistentního kmene hlístice *H. contortus* zvýšenou expresi P-glykoproteinu A, ta se však neobjevila u kmene, který nepřišel do kontaktu s ivermektinem. Studie využívající modulátory P-glykoproteinu jako je verapamil a jeho analog CL347,099 prokázaly zvýšenou účinnost ivermektinu a moxidektinu proti AM-rezistentnímu kmenu hlístice *H. contortus* u *Meriones unguiculatus* (pískomila mongolského). Zpočátku se studie soustředily na P-glykoprotein A, následně byly u hlístice *H. contortus* zjištěny další typy P-glykoproteinů (B-, C-, D-, E-), u kterých také může během léčby ivermektinem nebo moxidektinem docházet k expresi (Prichard a Roulet 2007).

### **Cílená anthelmintika**

Dostupných je i několik druhů cílených anthelmintik, například organofosfáty, closantel a suramin. Organofosfáty zahrnují synteticky vyrobené sloučeniny s účinkem zabránit acetylcholinestrázi. Closantel (Salicylanilid closantelu) způsobuje značné omezení aktivity hlístic. Pevně se naváže na plazmatické bílkoviny a má dlouhý poločas rozpadu. Důsledkem vazby na plazmatické bílkoviny v krvi jsou dobře přístupné pro hlístice, které sají krev (Condera 1990, 2002).

### **Agonisté nikotinu a GABA**

Agonisté fungují na extrasynaptických a synaptických nikotinových receptorech pro acetylcholin ve svalech parazitů. Způsobují spastickou paralýzu (Dent et al., 2000). Velké množství komerčně dostupných antinematodik se v praxi uplatňuje pro své účinky na nikotinových receptorech, zejména ve funkci acetylcholinových agonistů ovlivňujících

nervový systém parazita (Köhler 2001). Do této skupiny léčiv zahrnujeme imidazothiazoly, především rozšířeně používaný levamisol, tetrahydropyrimidiny jako je morantel, pyrantel nebo, kvartérní aminy např. bifenin (Beech et al. 2011, Martin et al. 2004) a deriváty amino-acetonitrilu (Ducray et al. 2008). Výjimkou je paraherquamid a derquantel, kteří se chovají jako antagonisté bránící aktivaci acetylcholinových kationtových kanálů (Beech et al. 2011). Přibližně před 10ti lety byly poprvé veřejně publikovány studie o derivátech amino-acetonitrilu (AAD), které vykazují velký anthelmintický účinek proti parazitickým nematodům, zejména proti hlístici *H. contortus* a *Trichostrongylus colubriformis*, ve svých studiích je zmiňují i Ducray et al. (2008). Deriváty amino-acetonitrilu využívají rozdílnosti acetylcholinových receptorů a u hlístic *H. contortus* se váží odlišně na různé druhy nikotinových receptorů (Kaminsky et al. 2008). U laboratorně vytvořeného rezistentního kmene hlístice *H. contortus* byla rezistence spojena se ztrátou nebo expresí dvou nAChR (Nicotinic acetylcholine receptors) podjednotek (Kaminsky et al. 2008).

#### 3.4.4 Rezistence

První zmínka o rezistenci helmintů na léčbu antiparazitiky u hospodářských zvířat se objevuje v sedmdesátých letech dvacátého století. V první fázi nebyla tomuto problému věnována přílišná pozornost. Situace se však některých oblastech, převážně specializovaných na chov ovcí radikálně změnila a došla až tak daleko, že některá parazitární onemocnění nebyla téměř léčitelná. U helmintů rezistentních na benzimidazoly byla objevena specifická allela pro  $\beta$ -tubulin. Tito helminti jsou schopni syntetizovat takový  $\beta$ -tubulin, jehož polymerizace nemůže být navázáním benzimidazolů zastavena (Geerts, 2001, Jabbar, 2013).

Rezistence u gastrointestinálních infekcí je rozšířena celosvětově (Fleming et al., 2006). Základem úspěšné léčby je porozumět mechanismům vzniku rezistence pro vývoj alternativní strategie léčby (James et al., 2009). Nastane-li rezistence na určitou látku z chemické skupiny, je velmi pravděpodobné, že k rezistenci dojde i na ostatní látky z té samé chemické skupiny. Je stále běžnější, že parazit si postupně vyvine rezistenci dokonce na několik skupin anthelmintik. Rezistence nemusí být však pouze výsledkem podávání léčiv, vždy totiž záleží na poměru rezistentní a citlivé alely v populaci. Pokud se ale již vyvine, jedná se o nezvratný jev (Wolstenholme et al., 2004).

Čím častěji jsou aplikována antiparazitika, tím rychleji a ve větším rozsahu se rezistence vyvíjí. Příčinou je intenzivnější selekce genů rezistence, které jsou následně

přenášeny do dalších generací. Geny citlivosti hlístic na léčiva se s každou další generací zředňují, zároveň se zvyšováním frekvence genů rezistence. Přenos rezistentních genů se řídí základními mendelovskými principy (Sangster, 1999).

James et al. (2009) taktéž uvádí, že k rezistenci může dojít i vlivem dědičných změn, a to jednak způsobenou častým užíváním anthelmintik, nebo vlivem dědičných změn jako odpovědi na expozici danou látkou. Genetický potenciál helminta hraje velmi důležitou roli při vytváření rezistence. *H. contortus* je vysoce rezistentní na většinu anthelmintik, rezistence na léky se u tohoto druhu hlístice rozvíjí velmi rychle. Nastalá situace si vyžádala celou řadu výzkumů, díky nimž je *H. contortus* jedním z druhů s doposud nejlépe popsaným mechanismem, genetickými aspekty, diagnózou i managementem rezistence či mechanismem účinku anthelmintik (Gilleard, 2013).

## **Prevence rozvoje rezistence**

### **Faktory ovlivňující vznik rezistence**

Léčiva jsou často používána i v případech, kdy to není nezbytně nutné, což stávající situaci ještě zhoršuje. Rovněž sdílení pastviny několika farmáři má za následek, že populace rezistentních parazitů se snadno rozšíří mezi několik stád. Rezistenci též podporuje časté používání stejného léčiva, poddávkování, kdy chovatelé podají zvířeti nedostatečnou dávku léčiva uvedenou výrobcem a nesprávné načasování odčervení zvířat, které může být příčinou silného selekčního tlaku. Ten vzniká na základě toho, že po odčervení zůstávají v tělech zvířat pouze rezistentní parazité. Poté, co se tato zvířata vypustí na začátku sezony na pastvinu, dojde k její kontaminaci vajíčky rezistentních parazitů. Míra selekčního tlaku pak závisí na tom, kolik infekčních larev citlivých jedinců dokázalo na pastvině přezimovat a vytvořit tak konkurenci rezistentním larvám (Silvestre et al., 2002). Důvodem poddávkování je chybný odhad hmotnosti zvířete. V ideálním případě by měla být zvířata před podáním léčiva zvážit. Dalším faktorem, který je třeba brát v úvahu je počasí.

### **Mechanismy rezistence**

Mechanismů, kterými si parazité vytvořili schopnost kontakt s léčivem a zároveň přežít, existuje mnoho. Wolstenholme et al. (2004) uvedl čtyři základní mechanismy rezistence. Změnu molekulárního cíle, v tomto případě již daná látka není schopna rozpoznat cíl

a následně ztrácí svůj účinek; změna metabolismu parazita, ten inaktivuje nebo zneškodní podaná léčiva a celkově tak přejde do jeho aktivace; změnu distribuce podávaných léčiv, která následně znemožní přístup do daného cíle a amplifikaci cílových genů, která zabraňuje účinku léčiva.

### 3.4.5 Alternativní metody

Nefarmakologická opatření a alternativní metody jsou vzhledem k výskytu rezistence parazitů na předkládaná anthelmintika nezastupitelnou součástí opatření.

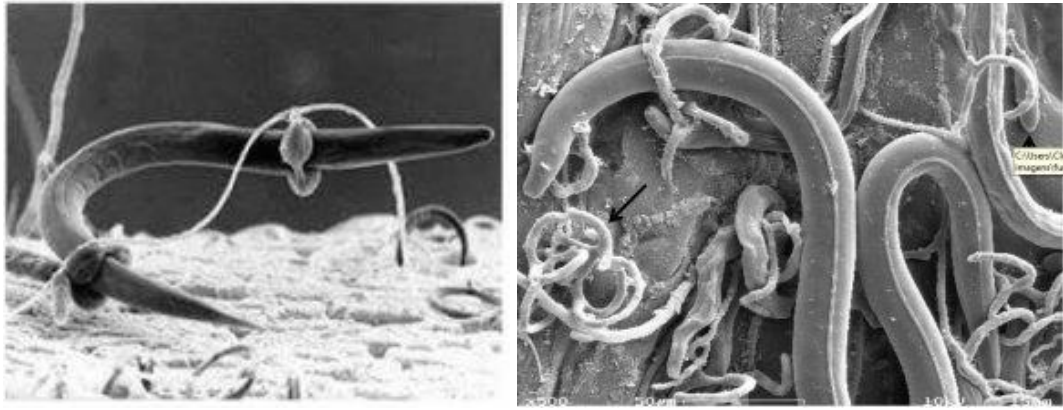
### Zoohygienická pravidla

Riziko nákazy lze snížit dodržováním zoohygienických pravidel. Vajíčka jsou vylučována s výkaly, z vajíček se následně líhnou larvy a ty jsou opět spaseny. Jedním z řešení tedy je odstraňování výkalů z pastvin. Getachew et al. (2007) upozorňují na výzkumy na tropických ostrovech v Tichém oceánu. Výsledky ukázaly, že nejvyšší množství larev *H. contortus* je na pastvině první týden po kontaminaci, po 9 týdnech je množství parazita stěží detekovatelné. Stejná situace je u *Trichostrongylus colubriformis*. Na základě těchto výsledků se vyvinul systém rotace pastvin. Rotace pastvin se uplatní tam, kde stáda nejsou náchylná na stejné parazity. Na mnoha místech není možné rotaci pastvin využít z důvodu geografických, klimatických a sociálních podmínek.

### Houby

Další nefarmakologickou metodou tlumení infekcí vyvolaných gastrointestinálními hlísticemi je využití hub. Jedním z antagonistů, kteří slouží ke kontrole gastrointestinálních hlístic je plíseň *Duddingtonia flagrans*, jejíž anatomická struktura chlamydospor projde zažívacím traktem zvířat bez ztráty dravých schopností (Sagues et al., 2011). *D. flagrans* vytváří 3D lepkavé síť, ty parazita znehybní a tím zlikviduje larvy žijící ve výkalech (Getachew et al., 2007).

Další zástupci endoparazitických hub jsou *Drechumeria coniospora* a *Harposporium anguillulae*. Zástupci masožravých hub jsou *Arthrobotis oligospora* a *Arthrobotis robusta* (Getachew et al., 2007).



**Obrázek 5: Duddingtonia flagrans a larva hlístice**

*Zdroj:*

<http://www.apsnet.org/edcenter/illglossary/Article%20Images/Forms/DispForm.aspx?ID=51>

### **Oxid měďnatý**

Getachew et al. (2007) mezi alternativní metody řadí využití oxidu měďnatého. U ovcí bylo sníženo množství vajíček přítomných výkalech při podání dávky 2,5–5 g/kg ž.hm. Nicméně již dávka 4 gramy vyvolávala problémy u ovcí v poslední fázi březosti a u malých jehňat. Podávání oxidu měďnatého se zdá být dobrým řešením při eliminaci GIN, především u *H. contortus*, ale spíše u dospělých jedinců, u odstavených jehňat by bylo třeba dalších výzkumů. (Soli et al., 2010).

### **Extrakty z rostlin**

Ve využití látek rostlinného původu se očekává velký potenciál. Využívají se léčivé rostliny nebo rostlinné extrakty obsahující taniny, esenciální oleje, saponiny, flavonoidy, polyfenoly a další sekundární metabolity. Zlepšují ruminální fermentaci a metabolismus (Patra a Saxena, 2009, Wencelová a kol., 2015) a jsou schopny ovlivnit populace parazitů v různých fázích jejich životního cyklu (Waller a Thamsborg, 2004; Yadav a kol., 2010; Wink, 2012).



### 3.5 Rostliny

Nadměrné používání anthelmintik způsobuje rezistenci a zároveň významně zatěžuje životní prostředí, celosvětovým zájmem je proto hledat i jiné bezpečné a účinné látky. (Bashtar et al., 2011, Andre, WPP et al. 2016).

Využití rostlin či jejich extraktů k léčebným účelům není novinkou, naopak se využívala již od 2. století př. n. l., významným představitelem byl lékař starého Říma Cladius Galén. Vývoj rostlinných produktů závisel na místní botanické flóře, což vedlo k vývoji rozličných nutraceutik v různých částech světa. Využití rostlin s anthelmintickým účinkem se používalo po mnoho staletí především v rozvojových zemích. S příchodem chemoterapeutické éry, objevy a vývojem řady vysoce účinných léků s velmi širokým spektrem se rostliny a jejich extrakty přinejmenším v západním světě dostaly do pozadí. Tento postoj se v posledních letech velmi změnil. Existuje rozsáhlé oživení v léčbě přírodními léčivými přípravky, a to především z důvodu hrozby multirezistence (Bruneton, 1995; Waller, 2001).

Rostliny představují velký potenciál různorodých chemických struktur. Využití poznatků o jejich výskytu v rostlinném systému ve prospěch farmacie a medicíny, tj. poznání a popsání surovinových zdrojů účinných léčivých látek, je jedním z úkolů farmakobotaniky. K rozšiřování poznatků o biologicky aktivních, resp. farmakoterapeuticky využitelných látkách se v současnosti využívají tři strategie:

- 1) Vyhledávací studie využívající taktiky „biassay-guided“ separace pracující s moderními separačními technikami provázenými vhodnými jednoduchými screeningovými biologickými testy. Výsledky testu řídí každý následný krok frakcionace až k vytčenému cíli – v ideálním případě k čistému, identifikovanému chemickému jedinci vykazujícímu hledanou biologickou aktivitu;
- 2) Cílené studie vycházející z poznatků etnofarmakologie. Shromáždění poznatků tradiční medicíny umožní bezprostřední zaměření na zdroje hledaných biologických aktivit s cílem potvrdit je moderními farmakologickými metodami a metodami fytochemie účinné složky izolovat;
- 3) Počítačové modelování farmakoforu spolu s virtuálním screeningem 3D multikonformačních databází přírodních látek. Tyto databáze obsahují značné poznatky o strukturách doposud izolovaných molekul z rostlinného materiálu, počítačové zpracování umožní po zadání strukturních požadavků pro aktivátory

receptorů vyhledat perspektivní látky a orientovat zájem na jejich možné zdroje (Jahodář, 2011).

V České republice je dlouholetá tradice používání léčivých rostlin jak v humánní tak veterinární medicíně. Pro současnou oblast České republiky byla sbírka rostlin pro léčivé použití poprvé hlášena již při příchodu slovanských národů do oblasti střední Evropy v době velké migrace ve čtvrtém a pátém století (Baloun, 1985; Prunerová, 2006). Ve středověku byla první farmakobotanická zahrada založena v roce 1341 lékárníkem Henricusem Schwabem v Praze. První česká literatura o sběru a použití léčivých rostlin je ilustrovaný herbář Matthioli Herbalu od Tadeáše Hájka z Hájek, publikovaný v roce 1562 (Drábek 2004). Moderní etnofarmakologické studie anthelmintických účincích českých léčivých rostlin je publikována minimálně (Urban, 2014).

### **3.5.1 Metabolismus rostlin**

Metabolismem rostlin se označuje soubor regulovaných biochemických reakcí, které organismům zajišťují stavební látky a nezbytnou energii pro jejich funkce (Macholán, 2003).

#### **Primární metabolity rostlin**

Primární metabolismus rostlin zahrnuje metabolismus lipidů, sacharidů, bílkovin a nukleových kyselin, které jsou důležité pro růst, vývoj a reprodukci rostlin. Primární metabolity jsou základní látky, lipidy, sacharidy, jednoduché karboxylové kyseliny náležící citrátovému cyklu, 20 základních proteinogenních aminokyselin a některé deriváty těchto látek. Tvoří základ pro syntézu dalších látek (Macholán, 2003).

#### **Sekundární metabolity rostlin**

Sekundární metabolity nejsou jen ochrannými látkami, rostliny často potřebují živočichy pro opylení či pro rozptýlení semen. V těchto případech metabolit má úlohu atraktantu (vonné monoterpeny, barevné anthokyany nebo karotenoidy). Molekula sekundárního metabolitu obsahuje více funkčních skupin a její biologická aktivita je vícestranná. Některé z nich jsou zapojené současně i do dalších biogenetických procesů, např. některé alkaloidy a peptidy mohou mít funkci dusíkového depa, iridoidní monoterpeny mohou být konečnými produkty, ale mohou také vstoupit do biosyntézy komplexních indolových alkaloidů a stát se složkou jejich molekul (ajmalin, ibogain, affinin aj.). Z toho je patrný závěr, že význam sekundárních metabolitů pro rostliny je mnohem komplexnější,

zahrnující mnoho funkcí v plnohodnotné realizaci života rostliny. Biogeneze sekundárních metabolitů se odvíjí pouze z několika málo primárních metabolitů: aminokyselin, acetylkoenzymu A, mevalonové kyseliny a meziproductů biosyntézy šikimové kyseliny. Vznikající terminální produkty lze poté označit jako polyketidy, terpeny a stereoidy, polyalkiny, šikimáty, alkaloidy a polyfenoly (Jahodář, 2011; Hansen 2016). Sekundární metabolity se řadí do mnoha skupin s ohledem na jejich terapeutické využití, ale z hlediska stresové fyziologie rostlin je důležité řazení do třech hlavních skupin: terpeny, dusíkaté látky, fenolické látky (Taiz et Zeiger, 2010).

### 3.5.2 Anthelmintické účinky rostlin

#### Evropa

Urban et al. (2008) prezentovali studii o hodnocení etanolových extraktů z 16ti léčivých rostlin, druhy byly vybrány podle jejich tradičního použití při léčbě parazitických infekcí zaznamenaných v české (bývalé československé) farmakognostické literatuře. Účinky testovali na vajíčkách *Ascaris suum* a L<sub>3</sub> vývojovém stadiu *Trichostrongylus colubriformis*.

Všechny testované rostlinné extrakty potvrdily anthelmintické účinky na embryogenezi vajíček u *A. suum* ve srovnání s negativní kontrolou. Nicméně žádný z testovaných rostlinných extraktů v žádné koncentraci neměl vyšší ovocidní účinek než pozitivní kontroly. Výtažky z rostlin *Allium sativum* (česnek setý), *Artemisia absinthium* (pelyněk pravý), *Consolida regalis* Gray (ostrožka stračka), *Cucurbita pepo* (tykev turek), *Dryopteris filix-mas* Schott (kaprad' samec), *Hedera helix* (břečťan popínavý), *Inula helenium* (oman pravý), *Juglans regia* (ořešák královský), *Satureja hortensis* (saturejka zahradní), *Tanacetum vulgare* (kopretina vratič), *Thymus vulgaris* (mateřídouška tymián) a *Valeriana officinalis* (kozlík lékařský) vykazovaly pozitivní závislost mezi jejich ovocidními účinky a úrovní koncentrace, zatímco extrakty *Carum carvi* (kmín kořený), *Daucus carota* (mrkev obecná) a *Erigeron canadensis* (turanka kanadská) nebyly účinné v závislosti na koncentraci. Významný anthelmintický účinek na embryogenezi vajec byl prokázán extraktem z *A. sativum*, *A. absinthium*, *C. carvi*, *D. carota* aj. *regia* ve všech testovaných koncentracích. Ve studii všechny testované rostlinné extrakty vykazovaly inhibiční účinky na embryogenezi vajec. Maximální snížení embryovaných vajíček bylo cca 53 %, s výjimkou *A. sativum*, jehož inhibiční účinek dosáhl 39 %. Podobně byl v případě všech testovaných rostlinných extraktů pozorován vliv rostlinných extraktů na L3 hlístice *T. colubriformis* měřené testem LMI

(The larval migration inhibition, Rabel et al., 1994). Výsledky se však výrazně liší v jejich efektivním rozmezí. Celkový účinek byl pozorován u všech koncentrací na úrovni 22 – 87 % a pro koncentraci 1000 µg /ml v rozmezí 27% až 63 %.

Valderrábano et al. (2010) zahrnul do své studie čtyři skupiny jehňat uměle infikovaných parazitem *H. contortus*, kterým v rámci potravy byly přidávány sušené rostliny. Krmné směsi obsahovaly vojtěškové seno, kopyštník věncolistý (*Hedysarum coronarium*), pelyněk pravý (*Artemisia absinthium*) a vičenec vikolistý (*Onobrychis viciifolia*). Podíl bylin byl v krmné dávce až 20 %. Valderrábano et al. (2010) zjistil, že významnou redukci parazitů vykazoval pouze pelyněk pravý (*Artemisia absinthium*), a to až 49 %. Vajíčka vyloučená trusem byla též nejvýrazněji redukována u pelyňku pravého (*Artemisia absinthium*), a to až ve výši 73 %, u vičence vikolistého (*Onobrychis viciifolia*) 54 % a u kopyštníku věncolistého (*Hedysarum coronarium*) 22 %. Pelyněk pravý (*Artemisia absinthium*) zmiňuje i studie Tariqa et al. (2009). Ve své studii vyhodnocoval účinnost surových ethanolových extraktů z nadzemní části pelyňku pravého (*Artemisia absinthium*) a účinnost surových vodných extraktů. Pozitivní výsledky se projevily u dospělců parazita *H. contortus*, extrakty způsobovaly ochrnutí či smrt dospělců. Vzhledem k tomu, že alkohol vykazuje lepší absorpci do těl parazitů, výsledky alkoholových extraktů byly významnější. Z dlouhodobých výzkumů vyplývá, že bylina pelyněk pravý (*Artemisia absinthium*) a jeho extrakty jsou slibnou alternativou oproti anthelmintikům.

Novobilský et al. (2011) zpracovali studii s rostlinnými extrakty z rostlin *Onobrychis viciifolia* (Vičenec ligurský), *Lotus pedunculatus* (Štírovník bažinný) a *Lotus corniculatus* (Štírovník růžkatý), rostliny poskytl Národní ústav zemědělské botaniky, Cambridge, Velká Británie. Zkoumali přímé anthelmintické účinky taninu na hlístice *Cooperia oncophora* a *Ostertagia ostertagi*. Testy probíhaly s pomocí LARVAL FEEDING INHIBITION ASSAY (LFIA) testu a Larval exsheathment assay (LEA). Nejvyšší účinek po vyhodnocení testem EC<sub>50</sub> na obě hlístice měl extrakt z *L. pedunculatus*. Anthelmintické účinky rostlin obsahujících tanin jsou dobře zdokumentovány, ale je také zřejmé že účinky se liší u druhů nematodů (Hoste et al., 2006). Anthelmintický účinek rostlin obsahujících tanin koreloval s obsahem taninu v rostlinném materiálu (Molán et al., 2002). Účinnost taninu byla prokázána již v mnoha studiích, tyto rostliny představují alternativu ke komerčně vyráběným anthelmintikům. Tanin zlepšuje imunitní reakci hostitele a nepřímo tak ovlivňuje biologii hlístic. Taniny jsou schopny vázat bílkoviny a tím snížit jejich ruminální degradaci. Předpokládá se, že působením nízkého pH ve slezu se proteinové komplexy působením

tříslovin oddělí od proteinů, tím projde do tenkého střeva větší množství aminokyselin a peptidů, kde jsou následně absorbovány (Hoste et al., 2012).

Váradýová a kol. (2017) testovali anthelmintické efekty u 13 tradičních léčivých rostlin běžných ve střední Evropě (*Inula helenium*, *Rosmarinus officinalis*, *Matricaria chamomilla*, *Althaea officinalis*, *Petasites hybridus*, *Malva sylvestris*, *Plantago lanceolata*, *Foeniculum vulgare*, *Solidago virgaurea*, *Melissa officinalis*, *Fumaria officinalis*, *Artemisia absinthium*, *Hyssopus officinalis*). Některé rostliny byly zároveň léčivé i toxické s příznivým nebo neblahým účinkem v závislosti na jejich množství v potravě. Avšak těchto 13 rostlin bylo při fermentacích *in vitro* detekováno bez nepříznivého vlivu. Závěr studie Váradýové a kol. o infekci zažívacího traktu jehňat hlísticí vlasovkou slézovou (*H. contortus*) zdůraznil potencionální význam léčivých bylin, které snižují produkci vajíček parazita při parazitické infekci zažívacího traktu. Kombinace těchto léčivých bylin z různých biologických čeledí přispěla ke zpomalení dynamiky infekce a zlepšila ukazatele produkce jehňat. Hermix představil příznivou bylinnou směs léčivých rostlin k potlačení infekcí způsobených hlísty a jeho použití je v souladu s principy ekologického zemědělství.

Spiegrel et al. (2016) představili studii, která shrnuje přehled studií a výsledků anthelmintických výsledků u rostlinných extraktů v léčbě nematodových inekcí od roku 2001 až do roku 2016. Vyhodnocení bylo provedeno systematicky v Scifinderu® a PubMedu. Studie vyhodnocovala výsledky studií zaměřených na polyfenoly - kondenzované a hydrolyzované třísloviny, flavonoidy, oligomerní proanthokyanidiny, fenypropanoidy a příbuzné sloučeniny. Kondenzované třísloviny (taniny) a hydrolyzované třísloviny byly ve studiích zastoupeny nejčastěji a jejich anthelmintické účinky byly potvrzeny *in vitro* i *in vivo* na mnoha druzích hlístic. Nicméně stále chybí relevantní klinické srovnání, které by splnilo mezinárodní společné parametry. Je velmi mnoho studií *in vitro*, ale méně jednoznačných výsledků přímo v chovech malých přežvýkavců.

## **Afrika**

V Africe hlístice všeobecně způsobují vysoká omezení živočišné produkce. Hlístice *H. contortus* patří mezi nejrozšířenější hlístici vůbec a je zodpovědná za velké ekonomické ztráty, místy doslova decimuje chovy malých přežvýkavců. Vysoké náklady na anthelmintika jsou pro drobné zemědělce mnohdy neúnosné až likvidační. Adamu et al. využili ke své studii 13 rostlin, které jsou v Jižní Africe běžné, využívané v místním lékařství jak v současnosti, tak v minulosti. Účinky rostlin již byly prokázány, cílem výzkumu bylo zjistit, jaké

koncentrace jsou třeba k vyššímu účinku. Nejméně účinný extrakt byl s hodnotou 0,17 mg / ml z rostliny *Cyathea dregei*, neúčinnější s hodnotou 0,003 mg / ml. z rostliny *Clausena anisata*. Výpočet prováděli pomocí statistického testu EC<sub>50</sub>.

Zabré, G et al. (2017) provedli studii v oblasti Sahelu (Afrika), cílem bylo zjistit potenciální anthelmintické vlastnosti extraktů z listů rostlin akácie arabské (*Acacia nilotica*) a akácie paprsčité (*Acacia raddiana*) na hlístice *H. contortus*. Olmedo et al. (2017) též ve své studii hodnotili druh akácie, tentokrát hydroalkoholové extrakty z *Acacia cochliacantha*. Výsledky všech rostlin vykazují larvicidní účinky proti *H. contortusovi*. Zabré, G et al. (2017) a Olmedo et al. (2017) shledávají tento rostlinný druh alternativou, respektive doplňující možností léčby proti *H. contortusovi*.

## **Amerika**

Andre, WPP et al. (2018) zkoušel proti hlístici *H. contortus* esenciální oleje. Esenciální oleje jsou komplexní směsí bioaktivních sloučenin s těkavými, lipofilními, obvykle vonnými a tekutými látkami. Esenciální oleje se skládají z terpenů, terpenoidů, aromatických a alifatických složek a mají různé farmakologické účinky, které jsou předmětem zájmu v preventivní veterinární medicíně, jejich účinky jsou antibakteriální, antifungální, antikoicidní, insekticidní a anthelmintní. Andre, WPP et al. (2017) uvádí esenciální oleje a jejich bioaktivní sloučeniny jako slibnou alternativu pro kontrolu rezistentních populací parazitů. Navrhuje přijmout strategii, kdy přirozené produkty nahradí syntetická anthelmintika například v období sucha. Navrhuje provedení hodnocení farmakokinetiky a farmakodynamiky pro definování léčebných protokolů.

Squires et al. si jako experimentální zvíře k nákaze vybrali *Meriones unguiculatus* (pískomil mongolský). Zkoušeli esenciální olej z *Artemisia annua* (pelyněk roční) a ethanolový extrakt *Artemisia absinthium* (pelyněk pravý). přesto, že ve většině studií vychází anthelmintické výsledky z rostlin rodu *Artemisia* úspěšně, zde tomu tak není a Squires et al. uvádí, že nebyly pozorovány žádné významné účinky ani extraktu ani esenciálního oleje vůči hlístici *H. contortus*.

Brito et al. (2018) vybrali pro svůj výzkum v boji s hlísticí *H. contortus* v Jižní Americe rostlinu/keř *Mimosa caesalpinifolia* (z rodu Citlivek) bohatou na taniny, které v praxi vykazují slibnou anthelmintickou účinnost. Tento keř se hojně vyskytuje v Brazílii, kde ho běžně spásají malý přežvýkavci. Listy z rostlin byly sklizeny, sušeny a rozemlety. Ve svém experimentu použili 24 kastrovaných malých přežvýkavců, kteří byli experimentálně

nakaženi hlísticí *H. contortus*. Zvířata rozdělili do 4 skupin, kontrolní skupina dostávala koncentrát bez taninů a nedostávala žádné anthelmintické přípravky. Další dvě skupiny dostaly prášek listu *M. caesalpinifolia* ve dvou fázích po sedmi po sobě jdoucích dnech (dny 1-7 a 14-21), přičemž jedna ze skupin rovněž dostávala 10 g polyethylenglykolu / den. Poslední skupina dostala antiparazitikum ZOLVIX (Monepantel) a koncentrát bez taninů. Denně byly kontrolovány a zaznamenávány počty vajec ve výkalech. Snížení počtu vajec hlístice *H. contortus* ve výkalech u skupin, které dostávaly prášek z listu *M. caesalpinifolia* bylo až o 57,7 %. Brito et al. (2018) doporučují zavést prášek z *M. caesalpinifolia* jako součást běžného krmiva malých přežvýkavců.

Flota-Burgos, GJ et al. (2017) vidí jako další možnou alternativu v boji s hlísticí *H. contortus* methanolové extrakty z kůry *Diospyros anisandra* a listů *Petiveria alliacea*. Silice z kůry *Diospyros anisandra* sbírané v období dešťů měla velmi silný účinek při použití *in vitro* a významně inhibovala vývoj larev. Silice z listů *Petiveria alliacea* sbíraných v období dešťů při aplikaci bránila líhnutí vajíček hlístic.

## Asie

Vláknina z citrusů je uváděna jako vedlejší produkt z citrusových plodů. Do složky potravy přežvýkavců je doporučována nejen z důvodu vysokého obsahu sacharidů, ale především pro své anthelmintické účinky. Limonen, který se nachází v citrusové vláknině a je popsán jako hlavní sloučenina esenciálních olejů z citrusů s výraznými anthelmintické účinky. Studie probíhala 42 dní, zvířaty byla zkrmována vláknina s obsahem 0,02 % silice (hlavní sloučeniny byly 85,9 % limonenu a 7,6 % valencenu) a vláknina z pomerančů s obsahem 1,5 % silice (hlavní sloučeniny byly 65,5 % limonenu a 31,2 % alfa- a gamma-terpineol) a výsledkem bylo značné snížení počtu vyloučených vajíček. (Nordi et al., 2014).

Katiki et al. (2012) testoval citronovou trávu (*Cymbopogon schoenanthus*) patřící do čeledi lipnicovité (*Poaceae*). Původní výskyt je v tropech, především Indie, Srí Lanka a jihovýchodní Asie (Cibulka a spol., 2006). Má sedativní, insekticidní, digestivní, aromatické vlastnosti a velmi výraznou a charakteristickou vůni. Hlavní složkou je geraniol (59 %), druhou významnou složkou je geranial (13 %). Podle studií byla nalezena *in vitro* anthelmintická aktivita esenciálního oleje *C. schoenanthus* proti trichostrongylidům nacházejících se u ovcí. Při experimentu na dvouměsíčních jehňatech, nakažených *H. contortus*, byl orálně aplikován esenciální olej citronové trávy nepřetržitě tři dny. U jehňat, kterým byla podávána dávka 360 mg/kg, byla pozorována první den po léčbě inhibice

larválního vývoje, nicméně je důležité upozornit na možnost toxických účinků (Katiki et al., 2012).

Jednou z dalších rostlin, kde se opět objevuje vyšší výskyt taninu je *Pelargonium endlicherianum*, vyskytující se převážně v Turecku a Sýrii, kde extrakty z této rostliny patří k turecké i syrské lidové medicíně. Kozan et al. (2016) studovali methanolvý extrakt z kořenu *P. endlicherianum* a jeho anthelmintickou účinnost *in vitro*. Anthelmintický účinek proti vajíčkům, L<sub>1</sub> i dospělcům hlístic *H. contortus* byl prokázán. Tyto výsledky jen potvrdily folklórní použití rostliny pro léčebné účely (Kozan, 2016).

V Pákistánu používají v tradičním lékařství výtažky z listů banánovníku rajského (*Musa paradisiaca*). Hussain et al. (2011) uvádí jeho inhibiční účinky na vajíčka i na dospělé *H. contortus*. V severních oblastech Pákistánu je běžnou praxí užívání terapeutik založených na rostlinách rodu *Artemisia*, protože jsou již dlouhá léta známy jejich anthelmintické a další terapeutické účinky. Irum et al. (2017) vyhodnocoval účinky *in vitro* a *in vivo* methanolvých extraktů z rostlin *Artemisia sieversiana* (pelyněk Sieversův) a *Artemisia parviflora* proti hlístici *H. contortus*. Výtažky s obou rostlin se ukázaly jako velmi významné v boji proti hlístici *H. contortus*.

Khan a Kishor (2014) se zaměřili na léčbu helmintóz polyherbálními preparáty. Ve své studii použili rostliny *Momordica charantia* (Hořká okurka), obsahuje řadu biologicky aktivních chemických látek jako jsou alkaloidy, saponiny, steroidy atd.. Další rostlinou byl *Azadirachta indica* (Zederach indický), který obsahuje látku azadirachtin a jiné látky, které blokují svlékání larev i vývoj vajíček a *Allium sativum* (česnek kuchyňský), známý svými účinky při léčbě helmintóz. Výše uvedené rostliny v různých koncentracích použili u sledované skupiny malých přežvýkavců. Druhá skupina zvířat byla přeléčena fenbendazolem. Sledována byla hladina hematokritu a počet erytrocytů. Jejich počet se po podání polyherbálních preparátů výrazně zvýšil, výsledky byly dokonce srovnatelné se skupinou zvířat, kterým byl podán fenbendazol. Skupina zvířat, které byl podán polyherbální preparát byla celkově ve velmi dobrém stavu, došlo ke zlepšení globulinu, albuminu i celkového proteinu. Studie Khan a Kishor (2014) poukazuje na fakt, že léčba polyherbálními preparáty by byla za předpokladu vyšší dávky velmi efektivní, téměř srovnatelná s komerčními anthelmintiky.



## 4 Materiál a metody

### 4.1 Biologický materiál

#### 4.1.1 Rostlinný materiál

Bylo vybráno 13 rostlin s potenciálně anthelmintickými účinky, z těch byly připraveny methanolové extrakty.

Rostliny byly získány z komerčních zdrojů (AGROKARPATY, Plavnica, Slovenská republika) a BYLINY Mikeš s.r.o., Čičenice, Česká republika) v sušeném stavu. Celkem bylo použito 13 rostlin a použity byly různé části - nať, květ, kořen, semeno.

**Tabulka 1:** Testované rostliny s potenciálně anthelmintickými účinky

	název český	název latinský	část rostliny
1	oman pravý	<i>Inula helenium</i>	kořen
2	rozmarník lékařský	<i>Rosmarinus officinalis</i>	list
3	heřmáněk pravý	<i>Matricaria chamomilla</i>	květ
4	proskurník lékařský	<i>Althaea officinalis</i>	kořen
5	devěsíl lékařský	<i>Petasites hybridus</i>	kořen
6	sléz lesní	<i>Malva sylvestris</i>	květ
7	jitrocel kopinatý	<i>Plantago lanceolata</i>	list
8	fenykl obecný	<i>Foeniculum vulgare</i>	semeno
9	zlatobýl obecný	<i>Solidago virgaurea</i>	nať
10	meduňka lékařská	<i>Melissa officinalis</i>	nať
11	zemědým lékařský	<i>Fumaria officinalis</i>	nať
12	pelyněk pravý	<i>Artemisia absinthium</i>	nať
13	yzop lékařský	<i>Hyssopus officinalis</i>	nať

*Zdroj: Vlastní zpracování*

Příprava rostlinných extraktů probíhala v laboratořích Fakulty tropického zemědělství České zemědělské univerzity v období března - června 2017 dle Kundera (2017).

Z každé připravené sušené rostliny bylo naváženo cca 7 g, mlýnkem zapnutým na 5000 otáček / 3 min. se připravila mletá směs. Do laboratorní baňky bylo naváženo 6,67 g sušených rostlin a přidáno 200 ml methanolu, baňka se zakryla alobalovým víčkem a dala

do laboratorní třepačky při rychlosti 200 otáček za minutu na 24 hodin. Po 24 hodinách na laboratorní třepačce byl roztok přefiltrován metodou vakuové filtrace (USA Patent 2 894 541, 1934). Büchnerova nálevka (Büchner, G., 1813) byla pomocí pryžového těsnění upevněna na silnostěnnou Erlemeyerovu baňku s vývodem a přes pojistnou láhev byla připojena vývěva. Do nálevky se vložil filtrační koláč a přitiskl se k nálevce. Následně byla zapnuta vývěva a do nálevky se nalila filtrovaná směs. Po skončení filtrace se přerušilo vakuum.

Roztoky byly přelity do tlustostěnných kulatých baněk a následně odpařeny do sucha na rotační vakuové odparce, následně se zahřívaly při teplotě 40 °C. Výsledný odparek byl rozdělen do plastových mikrozkušavek. Poté byly vzorky rozpuštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO) na finální koncentraci v DMSO 102400 µg/ml. Pro důsledné rozpuštění odparku byla použita ultrazvuková lázeň.

#### **4.1.2 Parazitologický materiál**

Jako modelový organismus pro testování účinnosti rostlinných extraktů sloužila gastrointestinální hlístice *H. contortus* - citlivý kmen ISE (Inbred Susceptible Edinburgh).

Experimentálně bylo nakaženo jehně (stáří 2-3 měsíce, cca 15 kg), plemeno kříženec Romanovské ovce, pohlaví samec. Jehně bylo ustájeno v Demonstrační a pokusné stáji ČZU a následně koprologicky vyšetřeno. Koprologické vyšetření probíhalo koncentrovanou McMasterovou (Roepstroff s Nansen, 1998), a Cornell-Wisconsinovou metodou (Egwang, 1982).

Jehněti byl dva dny po sobě aplikován fenbendazol (Panacur 2,5%) v dávce 10 mg/kg ž.h.

Za 6 dní po aplikaci 2. dávky fenbendazolu bylo provedeno koprologické vyšetření s negativním výsledkem. Za 3 týdny po dehelmintizaci bylo provedeno koprologické vyšetření.

Před vlastní inokulací bylo jehněti podáno imunosupresivum dexametazon (Dexadreson inj. s.c.) v dávce 0,3 mg/kg ž. hm., tj. 0,15,1 DXM/kg ž.h. a následně bylo aplikováno perorálně cca 6 000 L3 hlístice *H. contortus* (ISE kmen). U hlístic *H. contortus* byla zkontrolována motilita. Úspěšnost experimentální infekce byla ověřena 21. den po inokulaci.

Vzorky výkalů byly průběžně odebrány přímo z konečníku experimentálně infikovaného jehněte v časovém období říjen 2017 až březen 2018. Vajíčka gastrointestinální hlístice *H. contortus* (ISE kmen) byla získána Cornell – Wisconsinovou metodou dle Egwanga (1982) a Levecke et al. (2012).

Do třetí misky byly vloženy 4 g výkalu, které byly zality 15 ml vodovodní vody, směs byla tloučkem rozetřena do kašovitě konzistence, vzniklá suspenze byla přefiltrována přes čajové sítko do nádoby, z této nádoby se 10 ml suspenze přelilo do centrifugační zkumavky, centrifugovalo se 5 minut při 1200 otáčkách za minutu, supernatan byl slit, ke vzniklému sedimentu ve zkumavce byl přelit flotační roztok (nasyčený NaCl + 500 g glukózy na 1 litr NaCl) do poloviny výšky zkumavky, pomocí Pausteurovy pipety byla suspenze promíšena, flotační roztok byl přelit tak, aby zkumavka byla plná a vytvořil se tzv. pozitivní meniskus, na hladinu se přiložilo krycí sklíčko, zkumavka se nechala centrifugovat 3 minuty při 1 100 otáčkách za minutu, krycí sklíčko se odejmulo a spodní stranou, kde byla ze suspenze vytvořena kapka, ta se vložila na podložní sklíčko, prohlížením celé plochy krycího sklíčka se zaznamenávala veškerá propagační stadia parazitů, součet všech propagačních stádií představoval intenzitu infekce.

Získaná vajíčka hlístice byla 20 hodin inkubována v destilované vodě při teplotě 26 °C. Po uplynutí této doby se z většiny vajíček vylíhly larvy 1 (L<sub>1</sub>) stadia, a použily se ty, které prolezly do 30 minut; nashromáždil se biologický materiál. Pro testování byly použity mikrozkušavky (1,5 ml) – provedeny byly 3 pozitivní kontroly a 3 negativní kontroly, 6 koncentrací rostlinných extraktů ve trojím opakování. Jako pozitivní kontrola slouží ivermektin (IVM) v koncentraci 1 µg/ml + L<sub>1</sub> + FITC (Fluorescein isothiocyanate) *Escherichia coli*. Negativní kontrola – PBS + L<sub>1</sub> + FITC. Použité extrakty byly v koncentracích 64, 256, 1024 µg/ml (dle Urbana et al. 2008, upraveno) + L<sub>1</sub> + FITC *E. coli*; inkubace L<sub>1</sub> (s extrakty, anthelmintikem a PES) cca 2 hod při 25 °C – mikrozkušavky byly umístěny v horizontální poloze. Následně se přidalo 10 (20) µl FITC *E. coli* a mikrozkušavky se inkubovaly ve tmě, po té byly mikrozkušavky obaleny alobalem a umístěny v horizontální poloze 18 hod při 25 °C; centrifugovány byly 1 min při 6 000 g a byly odsáty v supernatanu (cca 800 µl). Sediment byl napipetován na podložní sklíčko, následně se prohlížel fluorescenčním mikroskopem pod UV (FITC filtr 450 – 490nm)

s využitím i mikrotitračních destiček s plochým dnem. Poté byly spočítány nakrmené a nenakrmené larvy a byl vyjádřen jejich poměr.

Veškeré přístrojové a laboratorní vybavení se nacházelo na České zemědělské univerzitě, v laboratoři parazitologie na Katedře zoologie a rybářství, fakulty Agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU a v laboratořích Fakulty tropického zemědělství ČZU. Postup byl upravován dle Amarante et al. (2005), Jackson, F. a Hoste, H., (2010) a Vercoe et al. (2015).

### **Zpracování dat**

Larvicidní účinek testovaných rostlin byl vyhodnocen jako procentuální podíl nakrmených larev oproti larvám nenakrmeným. Zároveň byla pomocí probit modelu s log-normálním rozdělením dat vyhodnocena průměrná letální koncentrace, která je potřebná pro devitalizaci 50 % larev – LD<sub>50</sub>

Ze získaných dat byla statisticky vyhodnocena hodnota EC<sub>50</sub> ([Half Maximal] Effective Concentration – Statisticky odvozená koncentrace látky, u které se předpokládá, že způsobí určitý efekt (snížení měřené životní funkce, např. snížení růstu, změna chování apod.) u 50 % testovaných organismů dané populace za definovaných podmínek (Vubp, 2004).

Procentuální účinnost jednotlivých testovaných rostlinných extraktů byla graficky znázorněna v programu Microsoft Office Excel.

## 5 Výsledky

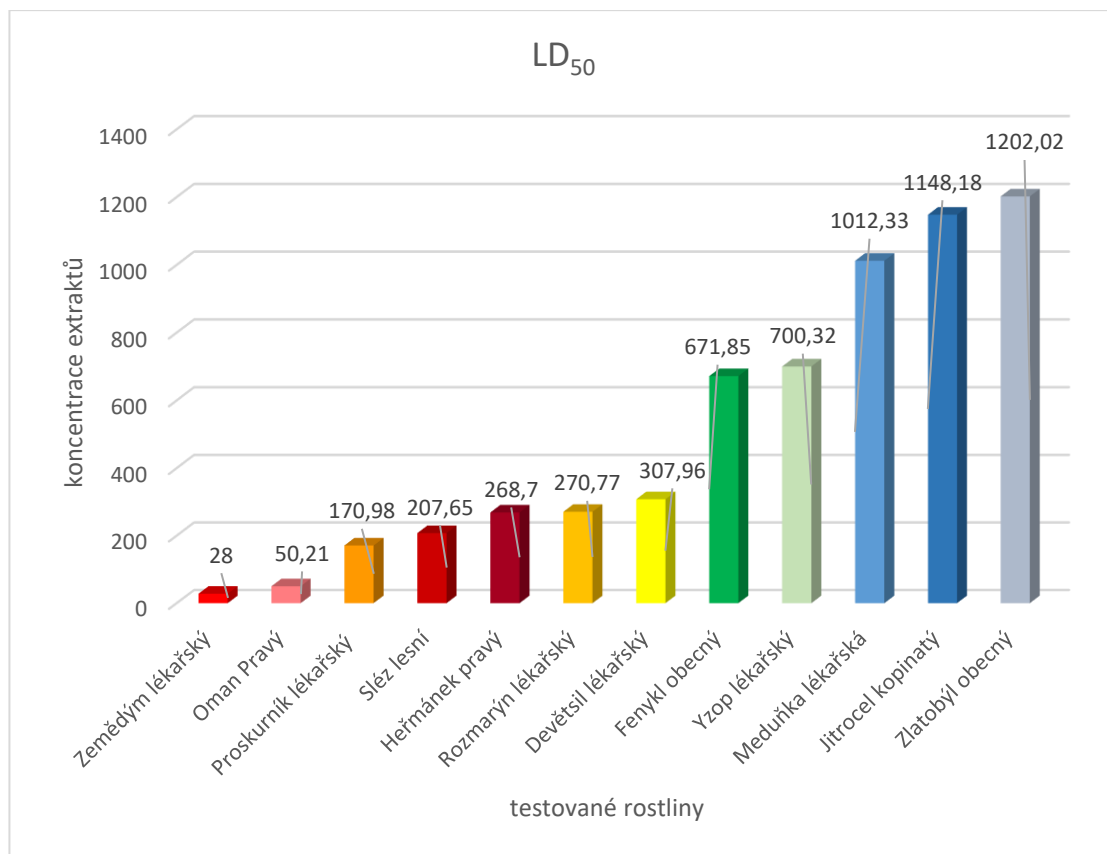
Graficky je znázorněná statisticky odvozená koncentrace látky, u které se předpokládá letální koncentrace, při které uhynie 50 % testovaných organismů statistickou metodou EC<sub>50</sub>. Testem byla získána průměrná letální koncentrace (LD) potřebná k devitalizaci larev parazita.

**Extraktů jsou uvedeny v mikrogramech na mililitry [ $\mu\text{g/ml}$ ]**

**Tabulka 2:** Testované rostliny s vyhodnocením LD<sub>50</sub>.

	<b>název český</b>	<b>název latinský</b>	<b>část rostliny</b>	<b>LD<sub>50</sub></b>
1	oman pravý	<i>Inula helenium</i>	kořen	50,21
2	rozmarýn lékařský	<i>Rosmarinus officinalis</i>	list	270,77
3	heřmánek pravý	<i>Matricaria chamomilla</i>	květ	268,71
4	proskurník lékařský	<i>Althaea officinalis</i>	kořen	170,98
5	devětsil lékařský	<i>Petasites hybridus</i>	kořen	307,96
6	sléz lesní	<i>Malva sylvestris</i>	květ	207,65
7	jitrocel kopinatý	<i>Plantago lanceolata</i>	list	1148,18
8	fenykl obecný	<i>Foeniculum vulgare</i>	semeno	671,85
9	zlatobýl obecný	<i>Solidago virgaurea</i>	nať	1202,02
10	meduňka lékařská	<i>Melissa officinalis</i>	nať	1012,33
11	zemědým lékařský	<i>Fumaria officinalis</i>	nať	28
12	pelyněk pravý	<i>Artemisia absinthium</i>	nať	9653,9
13	yzop lékařský	<i>Hyssopus officinalis</i>	nať	700,32

*Zdroj: vlastní zpracování*



**Graf 1: Koncentrace látky mikrogramech na mililitry [ $\mu\text{g}/\text{ml}$ ] u testovaných rostlin u které se předpokládá letální koncentrace, při které uhne 50 % testovaných organismů ( $\text{LD}_{50}$ )**

*Zdroj: vlastní zpracování*

Larvicidní účinek methanolových extraktů z testovaných rostlin v koncentraci  $64 \mu\text{g}/\text{ml}$  byl pozorován v rozmezí 10 – 98 % viz. graf č. 2.

Významný anthelmintický účinek v této koncentraci vykazovaly extrakty z nati zemědýmu lékařského (*Fumaria officinalis*), semene fenyklu obecného (*Foeniculum vulgare*) a kořene omanu pravého (*Inula helenium*), nejméně významný anthelmintický účinek vykazoval extrakt z listu jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata*).

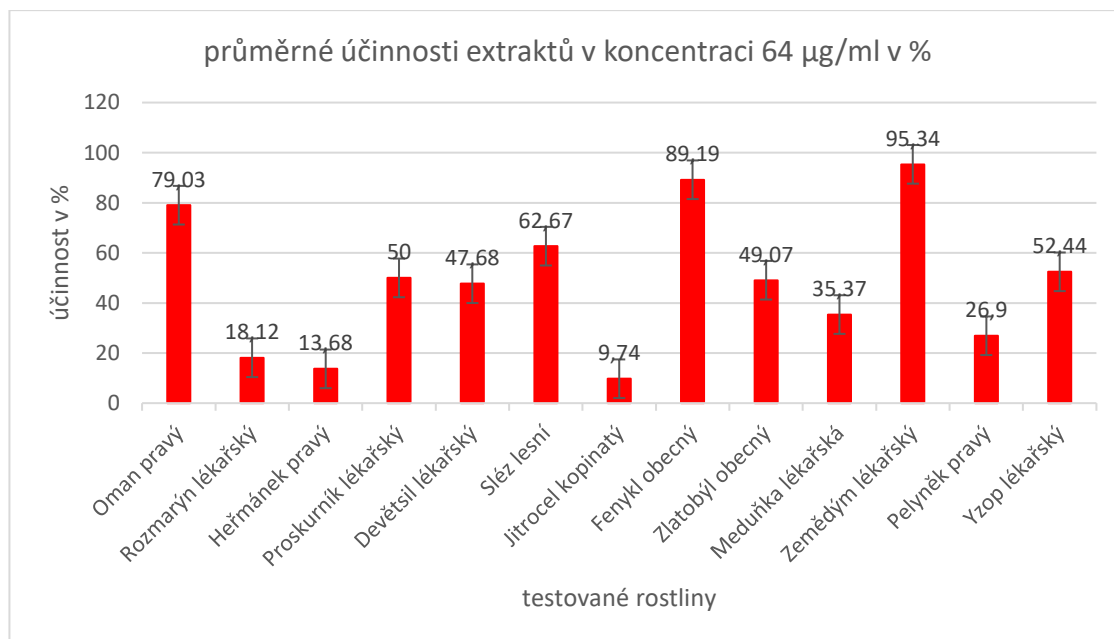
Larvicidní účinek methanolových extraktů z testovaných rostlin v koncentraci  $256 \mu\text{g}/\text{ml}$  byl pozorován v rozmezí 5 – 100 % viz. graf č. 3.

Významný anthelmintický účinek v koncentraci vykazovaly extrakty z nati zeměděly lékařského (*Fumaria officinalis*), kořene omanu pravého (*Inula helenium*), kořene proskurníku lékařského (*Althaea officinalis*) a květu slézu lesního (*Malva sylvestris*), nejméně významný anthelmintický účinek vykazoval extrakt z listu jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata*)

Larvicidní účinek methanolových extraktů z testovaných rostlin v koncentraci 1024 µg/ml byl pozorován v rozmezí 34 – 100 % viz. graf č. 4.

Významný anthelmintický účinek v této koncentraci vykazovaly extrakty z nati zeměděly lékařského (*Fumaria officinalis*), kořene proskurníku lékařského (*Althaea officinalis*), květu slézu lesního (*Malva sylvestris*), listu rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*), květu heřmánku pravého (*Matricaria chamomilla*), kořene devětsilu lékařského (*Petasites hybridus*), semene fenyklu lékařského (*Foeniculum vulgare*) a nati yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*), nejméně významný anthelmintický účinek vykazovaly extrakty z listu jitrocele kopinatého a nati pelyněku pravého (*Artemisia absinthium*).

**Vědecká hypotéza:** rostliny s vysokým obsahem sekundárních metabolitů mají letální účinek na larvy hlístice *Haemonchus contortus* se potvrdila.

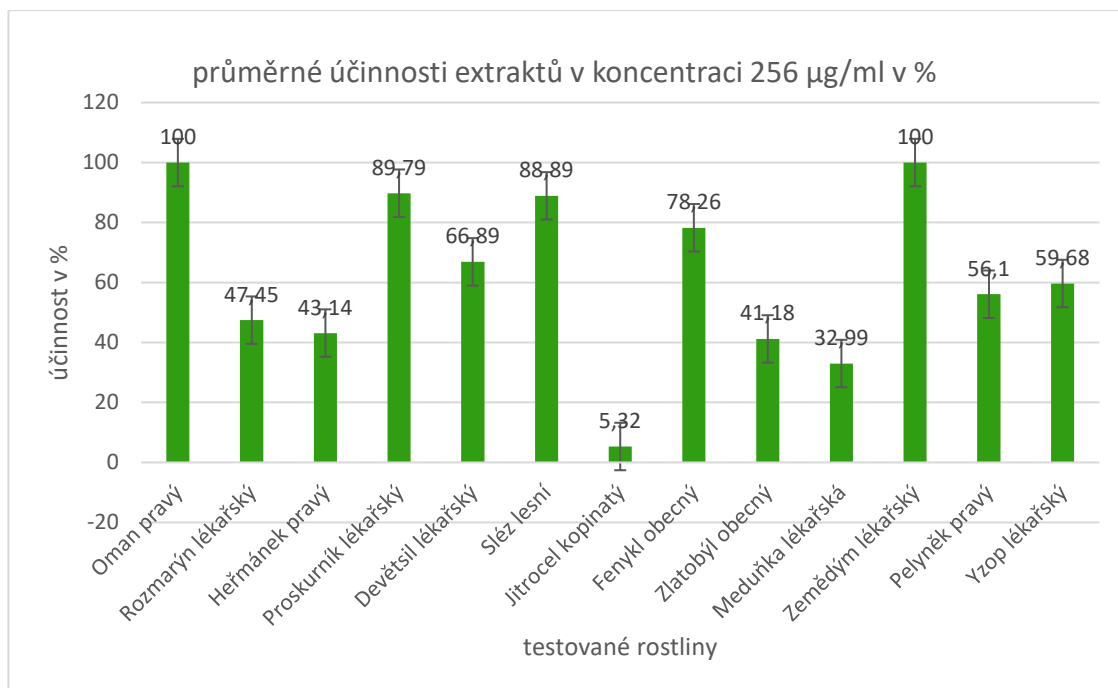


**Graf 2: Přehled průměrné účinnosti extraktů v koncentraci 64 µg/ml v %**

*Zdroj: vlastní zpracování*

Významný anthelmintický účinek v této koncentraci vykazovaly extrakty z nati zemědýmu lékařského (*Fumaria officinalis*), semene fenyklu obecného (*Foeniculum vulgare*) a kořene omanu pravého (*Inula helenium*), nejméně významný anthelmintický účinek vykazoval extrakt z listu jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata*).

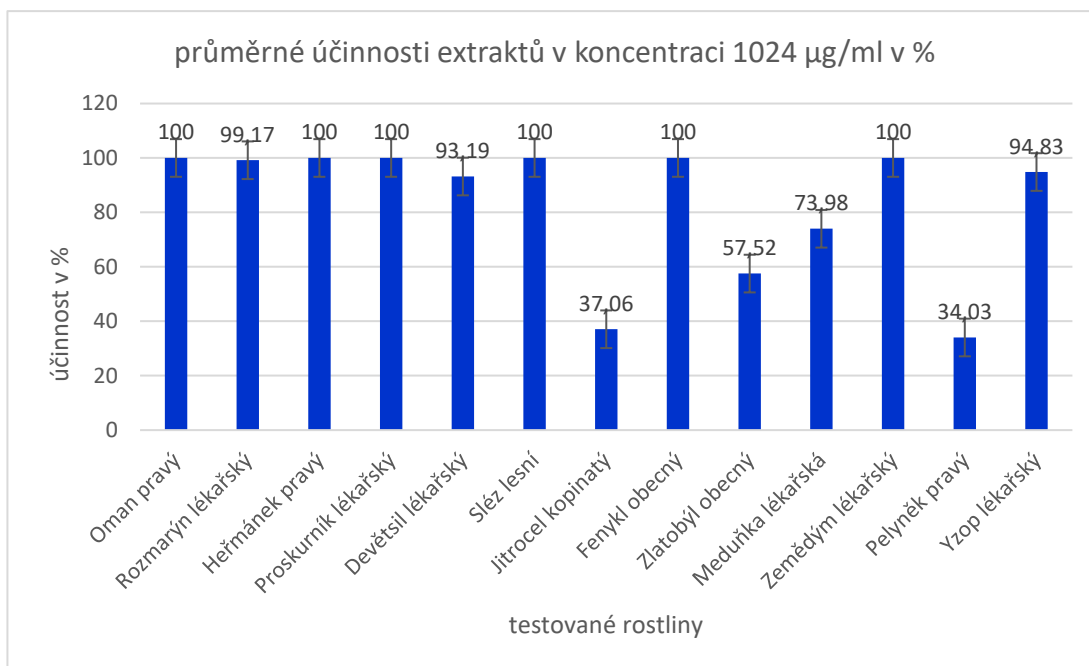




**Graf 3: Přehled průměrné účinnosti extraktů v koncentraci 256 µg/ml v %**

*Zdroj: vlastní zpracování*

Významný anthelmintický účinek v koncentraci vykazovaly extrakty z nati zemědýmu lékařského (*Fumaria officinalis*), kořene omanu pravého (*Inula helenium*), kořene proskurníku lékařského (*Althaea officinalis*) a květu slézu lesního (*Malva sylvestris*), nejméně významný anthelmintický účinek vykazoval extrakt z listu jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata*).



**Graf 4: Přehled průměrné účinnosti extraktů při koncentraci 1024 µg/ml v %**

*Zdroj: vlastní zpracování*

Významný anthelmintický účinek v této koncentraci vykazovaly extrakty z nati zemědýmu lékařského (*Fumaria officinalis*), kořene omanu pravého (*Inula helenium*), kořene proskurníku lékařského (*Althaea officinalis*), květu slézu lesního (*Malva sylvestris*), listu rozmarýnu lékařského (*Rosmarinus officinalis*), květu heřmánku pravého (*Matricaria chamomilla*), kořene devětsilu lékařského (*Petasites hybridus*), semene fenyklu lékařského (*Foeniculum vulgare*) a nati yzopu lékařského (*Hyssopus officinalis*), nejméně významný anthelmintický účinek vykazoval extrakt z listu jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolata*) a nati pelyněku pravého (*Artemisia absinthium*).

## 6 Diskuze

Cílem této diplomové práce bylo vyhodnotit *in vitro* anthelmintickou účinnost třinácti methanolových extraktů z rostlin běžně rostoucích v České a Slovenské republice uvedených v tabulce č. 1 této diplomové práce na larvy gastrointestinální hlístice *Haemonchus contortus*.

Jak uvádí Urban (2014), tak moderní etnofarmakologické studie anthelmintických účinků českých léčivých rostlin je publikováno minimálně, oproti tomu studií, které se zabývají účinností extraktů z tropických či subtropických rostlin najdeme v odborné literatuře mnoho.

Obecně lze konstatovat, že rostlinné extrakty či přípravky často působí až při relativně vysokých koncentracích, čímž se značně snižuje jejich praktická využitelnost při tlumení hemonchózy.

V této diplomové práci byly použity koncentrace 64 µg/ml, 256 µg/ml a 1024 µg/ml.

Celkový anthelmintický účinek byl pozorován v souhrnu všech koncentrací na úrovni od 5 do 100 %. Urban et al. (2008, 2014) uvádějí koncentrace 62,5 µg/ml, 125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml a 2000 µg /ml s tím, že celkový anthelmintický účinek u všech koncentrací dohromady byl pozorován od 22 do 87 %.

Významný anthelmintický účinek na hlístice v této studii při průměrné účinnosti extraktů v koncentraci 64 µg/ml vykazuje zemědělný lékařský (*Fumaria officinalis*) 95,34 %, fenykl obecný (*Foeniculum vulgare*) 89,19 % a oman pravý (*Inula helenium*) 79,03 %.

Urban et al. (2008, 2014) uvádí významný anthelmintický účinek při průměrné účinnosti extraktů v koncentraci 62,5 µg/ml u pelyňku pravého (*Artemisia absinthium*), omanu pravého (*Inula helenium*) a kozlíku lékařského (*Valeriana officinalis*).

Významný anthelmintický účinek na hlístice v této studii při průměrné účinnosti extraktů v koncentraci 259 µg/ml vykazuje zemědělný lékařský (*Fumaria officinalis*), oman pravý (*Inula helenium*), proskurník lékařský (*Althaea officinalis*) a sléz lesní (*Malva sylvestris*). V koncentraci 1024 µg/ml byl pozorován larvicidní účinek v rozmezí 34 – 100 %, významný anthelmintický účinek vykazuje zemědělný lékařský (*Fumaria officinalis*), oman pravý (*Inula helenium*), proskurník lékařský (*Althaea officinalis*), sléz lesní (*Malva sylvestris*), rozmarýn lékařský (*Rosmarinus officinalis*), heřmánek pravý (*Matricaria chamomilla*), devětsil lékařský (*Petasites hybridus*), fenykl lékařský (*Foeniculum vulgare*) a yzop lékařský (*Hyssopus officinalis*)

Urban et al. (2008, 2014) uvádí významný anthelmintický účinek extraktů v koncentraci 125 µg/ml u omanu pravého (*Inula helenium*) a ořešáku královského (*Juglans regia*), v koncentraci 250 a 500 µg/ml u pelyňku pravého (*Artemisia absinthium*), ořešáku královského (*Juglans regia*) a ostrožky stračky (*Consolida regalis Gray*). V koncentraci 1000 µg/ml všech testovaných bylin byl larvicidní účinek v rozmezí 27 % až 63 %.

Brunet et al. (2007) prokázali významný anthelmintický účinek rostliny vičenec ligrus (*Onobrychis viciifolia*) a to u všech testovaných koncentrací: 300, 600 a 1200 µg/ml na larvy hlístic *H. contortus* a *Trichostrongylus colubriformis*.

Rod rostlin *Artemisia* je vyhledávaný pro své již prokázané anthelmintické účinky. Různé druhy pelyňků již prokázali vysokou larvicidní i ovicidní účinnost v mnoha studiích. V rámci této diplomové práce byl testován rostlinný extrakt z natě pelyňku pravého (*Artemisia absinthium*). Účinek v koncentraci 64 µg/ml a v koncentraci 256 µg/ml byl pozorován v rozmezí od 26 – 56%. Obdobné výsledky uvádějí Squires et al. (2011) i v jejich studii nebyly pozorovány žádné významné účinky, a to ani u esenciálního oleje z pelyňku ročního (*Artemisia annua*), ani u ethanolového extraktu z pelyňku pravého (*Artemisia absinthium*) vůči hlístici *H. contortus*.

Urban et al. (2008, 2014) naopak prokázali účinnost ethanolových extraktů z česneku setého (*Allium sativum*) a pelyňku pravého (*Artemisia absinthium*) na embryogenezi vajec *Ascaris suum* a larvy hlístice *T. colubriformis*, Tariqua et al. (2009) ve své studii pozitivně vyhodnotili účinky surových ethanolových extraktů z nadzemní části pelyňku pravého (*Artemisia absinthium*) na larvy hlístice *H. contortus*. Valderrábano et al. (2010) zase uvádějí ve své studii významnou redukci hlístic *H. contortus* u použití pelyňku pravého (*Artemisia absinthium*), a to až 49 %. Vajíčka vyloučená výkaly byla též nejvýrazněji redukována u pelyňku pravého (*Artemisia absinthium*), a to až ve výši 73 %, rostlinu podávali sušenou formou v krmivu.

Nejvyšší letální účinek na larvy hlístice *H. contortus* ze 13 ti testovaných evropských rostlin v této studii měly extrakty z natě zemědělní lékařského (*Fumaria officinalis*) s výsledným LD<sub>50</sub> - 28 µg/ml a kořenu omanu pravého (*Inula helenium*) s výsledným LD<sub>50</sub> - 50,21 µg/ml, Adamu et al. (2013) oproti tomu testoval 13 běžných z jižní Afriky. Nejúčinnější byl extrakt z rostliny *Cyathea dregei*, kde výsledná hodnota LD<sub>50</sub> byla 3 µg/ml, oproti naší nejnižší naměřené hodnotě 28 µg/ml u omanu pravého (*Inula helenium*), a nejnižší výsledky

s výslednou hodnotou Adamu et al. (2013) uvádí LD<sub>50</sub> 170 µg/ml, u rostliny *Clausena anisati* oproti naší nejméně naměřené hodnotě LD 1202,02 µg/ml u zlatobýlu obecného (*Solidago virgaurea*) a naměřené hodnotě LD<sub>50</sub> 1012,3 µg/ml u meduňky lékařské (*Melissa officinalis*). Zabré et al. (2017) oblasti Sahelu (Afrika) testoval extrakty z listů rostlin akácie arabské (*Acacia nilotica*) a akácie paprsčité (*Acacia raddiana*), kdy akácie arabská vykazovala výslednou hodnotu LD<sub>50</sub> 195µg/ml a akácie paprsčitá vykazovala výslednou hodnotu LD<sub>50</sub> 840 µg/ml, což v naší studii přibližně odpovídá larvicidním výsledkům extraktů ze semene fenyklu obecného (*Foeniculum vulgare*) s výslednou hodnotou LD<sub>50</sub> 671,85 µg/ml a z nati zypu lékařského (*Hyssopus officinalis*) s výslednou hodnotou LD<sub>50</sub> 700,32 µg/ml.

Nejnižší larvicidní účinky v této studii prokázaly extrakty z listu jitrocele kopinatého (*Plantago lanceolat*) s výslednou hodnotou LD<sub>50</sub> 1148,18, z natě zlatobýlu obecného (*Solidago virgaurea*) s výslednou hodnotou LD<sub>50</sub> 1202,02, z natě meduňky lékařské (*Melissa officinalis*) a překvapivě z natě pelyňku pravého (*Artemisia absinthium*) s výslednou hodnotou LD<sub>50</sub> 9653,9 byť mnoho studií (Urban et al., 2008, 2014; Tariqua et al. 2009; Valderrábano et al. 2010) pelyněk pravý uvádí jako velmi slibnou alternativu k léčbě parazitóz.

Z výsledků je patrné, že účinky rostlin jsou závislé nejen na druhu, ale i na lokalitě sběru, jiném vegetačním stádiu vývoje rostliny (Tomko, 1999), meteorologických podmínkách a způsobu zpracování či použití. Proto se mnohdy účinky stejných rostlin poměrně liší. Aktuální hladina biologicky účinných látek v rostlině může být ovlivněna řadou faktorů, např. fáze růstu rostliny, teplota okolního prostředí, vlhkost, atd.. Jinou účinnost lze také vysvětlit použitím jiného parazita, či jiným stádiem jeho vývoje (Tomko, 1999, Hoste et al., 2006).

## 7 Závěr

Parazitární onemocnění představují ve veterinární medicíně velký problém, představují faktor, který velmi významně ovlivňuje chov malých přežvýkavců. Léčbu značně komplikuje rychlý nárůst rezistentních kmenů parazitů.

Nedílnou součástí managementu každého chovu by měla být důsledná opatření, nikoliv pouze řešení důsledků. Místo permanentní snahy o úplné odstranění parazitů jak z prostředí, tak z hostitelů je nezbytné se zaměřit i na další možné metody, které budou schopny udržet stav v přijatelné rovině. Tím je kombinace podávání vhodných anthelmintik a využití alternativních metod a využívat moderní poznatky, které mnohdy představují odlišné chápání obvyklého pohledu již zažitých metod a přístupů

Rostliny vyskytující se v extrémním prostředí tropů a subtropů jsou k tomuto životu přizpůsobeny, mimo jiné, produkcí specifických látek. Mezi tyto látky patří i sekundární metabolity. Naopak rostliny z mírného podnebí mohou obsahovat mnohem nižší koncentrace těchto účinných látek. Což může vysvětlit mnohdy nižší účinnost extraktů z mírného podnebí oproti rostlinám z tropů a subtropů. Obvykle také v přírodě rostliny nevykazují tak vysoké koncentrace účinných látek, které se prezentují ve studiích jako slibné alternativy a navíc se mohou vzájemně více či méně ovlivňovat. Pro stanovení typů sloučenin zodpovědných za anthelmintické vlastnosti těchto druhů jsou tedy nutné další fytochemické studie.

Přesto, že výsledky *in vitro* mnohdy vykazují velmi slibné účinky, zůstává otázkou, jaké by bylo uvedení do praxe, mnohdy se totiž užitečné larvicidní účinky projevují až při vysokých koncentracích rostlinných přípravků, je tedy velmi důležité zvážit i nežádoucí či toxické účinky především u mladých zvířat a březích samic. Pro lepší přehlednost účinků a využití rostlinných přípravků by bylo vhodné sjednotit metodiku interpretace získaných výsledků a zobjektivizovat hladiny účinnosti.

## 8 Seznam literatury

Abbott K. A., Taylor M., Stubbings L. A. 2012. Sustainable worm control strategies for sheep. Context Publication, ISBN 0-9547447-4-8.

Adamu, M., Naidoo, V., Eloff, N.J. 2013. Efficacy and toxicity of thirteen plant leaf acetone extracts used in ethnoveterinary medicine in South Africa on egg hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. *BMC Veterinary Research*. **9**(1), 38. DOI: 10.1186/1746-6148-9-38. ISSN 1746-6148.

Alvarez-Sanchez, M.A., Garcia, J.P., Bartley, D., Jackson, F., Rojo-Vazquez, F.A. 2005. The larval feeding inhibition assay for the diagnosis of nematode anthelmintic resistance. *Exp. Parasitol.* 110, 56–61. ISSN 00144894

Amarante, A. F. 2011. Why is it important to correctly identify *Haemonchus* species? *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 20(4), 263-268. DOI: 10.1590/S1984-29612011000400002. ISSN 1984-2961.

Andre W.P.P., Ribeiro W.L.C., Cavalcante G.S., Santos, J.M.L., Macedo I.T.F., Paula H.C.B., Freitas R.M., Morais S.M., Melo J.V. & Bevilaqua C.M.L. 2016. Comparative efficacy and toxic effects of carvacryl acetate and carvacrol on sheep gastrointestinal nematodes and mice. *Veterinary Parasitology*. 218: 52-58. 1384-1861.

Andre ,W.P.P., Cavalcante, G.S., Riberio, W.L.C., Santos, J.M.L.D.m Macedo I.T.F., Paula H.C.B., Morais, S.M., Mělo, J.V., Bevilaqua, C.M.L. 2017. Anthelmintic effect of thymol and thymol acetate on sheep gastrointestinal nematodes and their toxicity in mice. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 26(3), 323-330. DOI: 10.1590/s1984-29612017056. ISSN 1984-2961.

Andre W.P.P, Ribeiro, WLC, de Oliveira, LMB, Macedo, ITF, Rondon, FCM, Bevilaqua, CML. 2018. Essential Oils and Their Bioactive Compounds in the Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminant. *Acta Scientiae Veterinariae*, ISSN 1678-0345.

Anderson, R. C. 2000. Nematode Parasites of Vertebrates. Their Development and Transmission. 2nd edition. CABI Publishing Wallingford UK. pp. 672. ISBN: 9780851997865.

Angulo-Cubillán, F. J., García-Coiradas L., Cuquerella M., de la Fuente C., Alunda J. M. 2007. *Haemonchus contortus*-Sheep Relationship: a review. *FCV-LU*, Vol XVII, No. 6, 577-58. ISSN 00207519.

Baloun, J. 1985. Medicinal plant gardens in the history of Czechoslovak pharmacy (the 14th to the 18th century). *Cesk Farm* 34:449–452.

Bath, G.F., Malan, F.S., Van Wyk, J.A. 1996. The „FAMACHA“ Ovine Anaemia Guide to assist with the control of haemonchosis, in : Proceedings of the 7th Annual Congress of the Livestock Health and Production Group of the South African Veterinary Association, Port Elizabeth, 5-7 June, p.5. ISSN 0928-4249.

Bashtar A-R., Hassanein M., Abdel-Ghaffar, F., Al-Rasheid K., Hassan S., Mehlhorn H., AlMahdi M., Morsy K., Al-Ghamdi A. 2011. Studies on monieziaiasis of sheep I. Prevalence and anthelmintic effects of some plant extracts, a light and elektron microscopic study. *Parasitol Research* 108: 177–186. ISSN 0932-0113.

Beech, R. N., Skuce, P., Bartley, D. J., Martin, R. J., Prichard R. K., Gilleard, J. S. 2011. Anthelmintic resistance: markers for resistance, or susceptibility?. *Parasitology*. 138(02), 160-174 DOI: 10.1017/S0031182010001198. ISSN 0031-1820.

Brito, D.R.B., Costa-Júnior, L.M., Garcia, J.L. , Torres-Acosta, J.F.J., Louvandini, H., Cutrim-Júnior, J.A.A., Araújo, J.F.M., Soares, E.D.S. 2018. Supplementation with dry *Mimosa caesalpiniiifolia* leaves can reduce the *Haemonchus contortus* worm burden of goats. *Veterinary Parasitology*. 252, 47-51. DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.01.014. ISSN 03044017.

Bruneton, J. 1999. Pharmacognosy, phytochemistry and medicinal plants. 2nd ed. 1995 Andover : Intercept Ltd. 1119 s. ISBN 2743000287.



Brunet, S., JAaurere, J., Fouraste, I., Hoste, H. 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract (sainfoin) both in vitro and in vivo. *Parasitology*. 134(09), 1253. DOI: 10.1017/S0031182007002533. ISSN 0031-1820.

Caviston, J. P., Holzbaaur L.F. 2006. Microtubule motors at the intersection of trafficking and transport. *Trends in Cell Biology*. 16(10), 530-537. DOI: 10.1016/j.tcb.2006.08.002. ISSN 09628924.

Conder, G.A., Jen, L.W., Marbury, K.S., Johnson, S.S., Guimond, P.M., Thomas, E.M., Lee, B.L. 1990. A novel anthelmintic model utilizing *Meriones unguiculatus*, infected with *Haemonchus contortus*. *J. Parasitol.* 76, 168–170. ISSN 00223395.

Dent, J.A., Smith, M.M., Vassilatis, D.K., Avery, L. 2000. The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* vol. 97, no. 6, s. 2674–2679. ISSN 10716995.

Dobšíková R., Šíroká Z., Blahová J. 2012. *Farmakologie v produkci potravin*. Brno: Veterinární a farmaceutická fakulta Brno. ISBN 978-80-7305-616-2.

Elsheikha, H., Naveed A., Khan. 2011. *Essentials of veterinary parasitology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-794.

Geerts S., Gryseels B. 2001. Anthelmintic resistance in humanhelimnths: a rewie. *Tropical Medicine and International Health*. November, volume 6, pp. 915-921. ISSN 1360-2276.

Emery, D. L., Hunt, W.P., Jambre, L. 2016. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here?. *International Journal for Parasitology*. 46(12), 755-769. DOI: 10.1016/j.ijpara.2016.07.001. ISSN 00207519.

Fleming S.A., Craig T., Kaplan R.M., Miller J.E., Navarre CH., Rings M. 2006. Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants, *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20, 431 – 441 s. ISSN 16594607.

- Flota-Burgos, G.J., Rosado-Aguilar, J.A., Rodríguez-Vivas, R.I., Arjona-Cambranes, K.A. 2017. Anthelmintic activity of methanol extracts of *Diospyros anisandra* and *Petiveria alliacea* on cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) larval development and egg hatching. *Veterinary Parasitology*. 248, 74-79. DOI: 10.1016/j.vetpar.2017.10.016. ISSN 03044017.
- Furtado, L. F. V., Passos De Paiva Bello, A. C., Rabelo, É. M. L. 2016. Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis. *ActaTropica*. vol. 162, s. 97–112. ISSN 0001706X.
- Getachew, T., P. Dorchies, Jacquiet, P. 2007. Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonchus contortus* infection in sheep. Review. *Parasite*. 14(1), 3-14. DOI: 10.1051/parasite/2007141003. ISSN 1252-607X.
- Gill, J.H, Lacey, E. 1998. Avermectinmilbemycin resistance in trichostrongyloid nematodes. *International Journal for Parasitology*. **28**(6), 863-877, DOI: 10.1016/S0020-7519(98)00068-X. ISSN 00207519.
- Gilleard, J. S. 2006. Understanding anthelmintic resistance: The need for genomics and genetics. *International Journal for Parasitology*. 36(12), 1227-1239. DOI: 10.1016/j.ijpara.2006.06.010. ISSN 00207519.
- Gilleard, J. S. 2013. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. *Parasitology*. 140(12), 1506-1522 DOI: 10.1017/S0031182013001145. ISSN 0031-1820.
- Grzybek, M., Kukula-Koch, W., Strachecka, A., Jaworska, A., Phiri, A., Paleolog, J., Tomczk, K. 2016. Evaluation of Anthelmintic Activity and Composition of Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seed Extracts—In Vitro and in Vivo Studies. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(9), 1456. DOI: 10.3390/ijms17091456. ISSN 1422-0067.
- Hansen, J., Perry, B. 1994. The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants, 129 s ISBN 92-9055-703-1.
- Hartl, J. 2012. Farmaceutická chemie IV. 2. nezměněné vydání. Praha: Karolinum, 2012. 166 s. ISBN 978–80–246–2129–6.

Hartl, J. 2006. Farmaceutická chemie IV. 1.vyd. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2006. 166 str. ISBN 978-80-246-1169-3. Kapitola 1.7, Anthelmintika, s. 156–164.s. ISBN 978–80–243–2141–7.

Hoberg, E.P., Lichtenfels, J.R. 2004. L.phylogeny for spesces of Haemonchus (Nematoda: Ttichostrongyloidea). *Journal of Parasitology*. 2004, 90(5), 1085-1102. DOI: 10.1645/GE-3309. ISSN 0022-3395.

Hussain A., Khan M. N., Iqbal Z., Sajid M. S., Khan M. K. 2011. Anthelmintic aktivty of *Trianthema portulacastrum* L. and *Musa paradisiaca* L. against gastrointestinal nematodes of sheep. *Veterinary parasitology* 179: 92–99. ISSN 03044017.

Hendrix, Ch. M., Robinson, E. 2014. Diagnostic Parasitology for Veterinary Technicians. Fourth Edition. Elsevier Health Sciences USA. p. 416. ISBN: 9780323291255.

Hoste, H., Martinez- Ortiz- De- Montellano, C., Manolaraki, F., Brunet, S., Ojeda-Robertos, N., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A. 2012. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology*. 186. 18-27. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.042. ISSN 03044017.

Hoste, H., Sotiraki, S., Torres-Acosta, J.F.J. 2011. Control of Endoparasitic Nematode Infections in Goats. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 27. 163-173. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.10.008. ISSN 07490720.

Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.K., Sandoval-Castro, C.A., Meller-Harvey, I., Sotiraki, S., Louvandini, H., Thamsborg, S.M., Terrill, T.H. 2015. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology* 2015, 212(1-2), 5-17 DOI: 10.1016/j.vetpar.06.026. ISSN 03044017.

Houdijk, J.G., Kyriazakis, I., Jackson, F., Huntley, J.F., Coop, R.L. 2000. Can an increased intake of metabolizable protein affect the periparturient relaxion in immunity against *Teladorsagia circumcincta* in sheep? *Veterinary Parasitology*, 91 (1-2), 43-62. ISSN 014044216.

Houdijk, J.G. 2008. Influence of periparturient nutritional demand on resistance to parasites in livestock. *Parasite Immunology*, 30 (2), 113-121. ISSN 01419838.

Charlier, J., Van Der Voort, M., Kenyon, F., Pskuce, P., Vercruysse, J. 2014. Chasing helminths and their economic impact on farmed ruminants. *Trends in Parasitology* 2014, 30(7), 361-367 DOI: 10.1016/j.pt.2016.04.009. ISSN 14714922.

Charlier, J., Waele, V., Ducheyne, E., Van Der Voort, M., Vande Velde, F., a Edwin Claerebout, E. 2016. Decision making on helminths in cattle: diagnostics, economics and human behaviour. *Irish Veterinary Journal*. 69(1), DOI: 10.1186/s13620-016-0073-6. ISSN 2046-0481.

Charlier, J., Vande Velde, F., Mariska, Vande Velde, F., Van Meennel, J., Lauwers, L., Cauberghe, V., Jozef Vercruysse, J., Claerebout, E. 2015. Placing helminth infections of livestock in an economic and social context. *Veterinary Parasitology* . 2015, 212(1-2), 62-67 DOI: 10.1016/j.vetpar.06.018. ISSN 03044017.

Irum, S., Ahmed, H., Mirza, B., Dnskow-Lysoniewska, K., Muhamadd, A., Qayyum, M., Simsek, S. 2017. In vitro and in vivo anthelmintic activity of extracts from *Artemisia parviflora* and *A. sieversiana*. *Helminthologia*. 54(3), DOI: 10.1515/helm-2017-0028. ISSN 1336-9083.

Jabbar, A., Caapbell, A.JD., Charles, A.J., Gasser, R.B. 2013. First report of anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* in alpacas in Australia. *Parasites & Vectors*. 6(1), 243 DOI: 10.1186/1756-3305-6-243. ISSN 1756-3305.

Jahodář, L. 2011. Farmakobotanika semenné rostliny. Praha: Univerzita Karlova v Praze. stránky 15-26. 80-246-1225-9.

Jackson, F., Hoste, H. 2010. In vitro methods for the primary screening of plant products for direct activity against ruminant gastrointestinal nematodes. In: Vercoe, P.E., Makkar, H.P.S., Schlink, A.C. (Eds.), *In Vitro Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies*. Springer Science + Business Media B.V., Dordrecht, Germany, pp. 25–45. ISBN 978-90-481-3297-3.

James, C.E., Davey, M.W. 2008. Increased expression of ABC transport proteins is associated with ivermectin resistance in the model nematode *Caenorhabditis elegans*. *International Journal for Parasitology*. 39(2), 213-220. DOI: 10.1016/j.ijpara.2008.06.009. ISSN 00207519.

James, C. E., Hudson, A.L., Davey, M.W. 2009. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest?. *Trends in Parasitology*. 2009, 25(7), 328-335. DOI: 10.1016/j.pt.2009.04.004. ISSN 14714922.

Kaminsky, R., Ducray, P., Jung, M. 2008. A new class of anthelmintics effective against drug-resistant nematodes. *Nature*. 452(7184), 176-180 DOI: 10.1038/nature06722. ISSN 0028-0836.

Kandasamy G., Rajapakse R. P. V. J., Rajakaruna R. S. 2014. Gastrointestinal and blood parasites of a free grazing flock of sheep in Kaithady farm in the Jaffna District. *Journal of the national science foundation of Sri Lanka* 41: 195–201. ISSN 2362-0161.

Katiki L. M., Chagas A. C. S., Takahira R. K., Juliani H. R, Ferreira J. F. S., Amarate A. F. T., 2012. Evaluation of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil in lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*, *Veterinary parasitology*. 186: 312–3. ISSN 03044017.

Kassai, T. 1999. *Veterinary helminthology*. Boston: Butterworth-Heinemann. ISBN 9780750635639.

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. ISSN 03044017.

Khan, A. I., Kishor, P. 2014. Haemato-biochemical changes in caprine helminthosis treated with polyherbal anthelmintics. *Livestock Research International*. Vol. 2 (3). 59-62. ISSN 01024016.

- Kozan, E., Küpeli, A., E., Süntar, I. 2016. Potential anthelmintic activity of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. *Journal of Ethnopharmacology* 187. 183-186 DOI: 10.1016/j.jep.2016.04.044. ISSN 03788741.
- Köhler, P. 2001. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *International Journal for Parasitology*. vol. 31. no. 4, s. 336–345. ISSN 00207519.
- Laing, R., Kikuchi, T., Martinelli, A. 2013. The genome and transcriptome of *Haemonchus contortus*, a key model parasite for drug and vaccine discovery. *Genome Biology*. 14(8). DOI: 10.1186/gb-2013-14-8-r88. ISSN 1465-690.
- Lamka, J., Ducháček, L. (2014). Veterinární léčiva pro posluchače farmacie. Vydání čtvrté nezměněné. Praha: Karolinum, 2014. 151 s. ISBN 978–80–246–2790-8.
- Egwang, T.G. 1982. Evaluation of the Cornell-Wisconsin centrifugal flotation technique for recovering trichostrongylid eggs from bovine feces, *Canadian journal of comparative medicine. Revue canadienne de medecine comparee*. 46(2):133- with 92 Reads. ISSN: 0008-4050.
- Levecke B., Rinaldi L., Charlier J., Maurelli M.P., Bosco A., Vercruyse J., Cringoli G. 2012. The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods. *Veterinary Parasitology*, 188, 194–199. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.03.017. ISSN 03044017.
- Macholán, L. 2003. Sekundární metabolity. 2. díl. Vydání Brno. Masarykova univerzita. 150 s. ISBN 8021030682.
- Mckellar, Q. A., Jackson, F. 2004. Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends in Parasitology*. 2004, 20(10), 456-461. DOI: 10.1016/j.pt.2004.08.002. ISSN 14714922.

Nordi E. C. P., Costa R. L. D., David C. M. G., Parren G. A. E., Freitas A. C. B., Lameirinha L. P., Katiki L. M., Bueno M. S., Quirino C. R., Gama P. E. 2014. Supplementation of moist and dehydrated citrus pulp in the diets of sheep artificially and naturally infected with gastrointestinal nematodes on the parasitological parameters and performance. *Veterinary parasitology* 205: 532–53 vetpar. 2014.09.015. ISSN 03044017.

Novobilský, A., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M. 2011. Condensed tannins act against cattle nematodes. *Veterinary Parasitology*. **182**(2-4), 213-220 DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.06.003. ISSN 03044017.

O'Connor, L.J., Walkden-Brown, SW., Kahn, L.P. 2006. Ecology of the free – living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*, 142 (1-2), 1-15. vetpar.2006.08.035. ISSN 03044017.

Patra, A. K., Saxena, J. 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Antonie van Leeuwenhoek*. 96(4), 363-375. DOI: 10.1007/s10482-009-9364-1. ISSN 0003-6072.

Prichard, R. K., Roulet. A. 2007. ABC transporters and  $\beta$ -tubulin in macrocyclic lactone resistance: prospects for marker development. *Parasitology*. 134(08), 1123. DOI: 10.1017/S0031182007000091. ISSN 0031-1820.

Prunerova, M. 2006. Development of pharmacy in the Czech Republic. *Cas Lek Ces* 145:815–816. ISSN 1712-1077.

Rabel, M., Gregor, R. Mc, Gcdouch, P. 1994. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *Int J Parasitol* 24:671–676. ISSN 00207519.

Rajan, T. V. 2009. Textbook of Medical Parasitology. 1. vyd. New Delhi: BI Publications, 200 str. 10-62. ISBN 978-81-7225-317-2.

Riggio V., Pong-Wong R., Salle G., Usai M. G., Casu S., Moreno C. R., Matika O., Bishop S. C. 2014. A joint analysis to identify loci underlying variation in nematode resistance in three European sheep populations. *Journal of animal breeding and genetics* 131: 420–431. ISSN 09312668.

Ruano, Z. & C. Nuno, M. T. 2017. Gastrointestinal parasites as a threat to grazing sheep. *Large Animal Review*. 23. 231-238. ISSN: 1124-4593.

Sagues M. F., Fuse L. A., Fernandez A. S., Iglesias L. E., Moreno F. C., Saumell C. A. 2011. Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the kontrol of gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitol Research* 109: 706–719. ISSN 0932-0113.

Sangster, N.C. 1999. Anthelmintic resistance: past, present and future. *International Journal for Parasitology*. 29(1), 115-124 [cit. 2018-03-24]. DOI: 10.1016/S0020-7519(98)00188-X. ISSN 00207519.

Sendow, J. 2003. "Haemonchus contortus", *Animal Diversity Web*. Accessed March 23, 2018. ISSN 00306518.

Silvestre, A., Leignel, V., Berrag, B., Gasnier, N., Humbert, J.F., Chartier, Ch., Cabaret, J. 2002. Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. *Veterinary Research*. 33(5), 465-480. DOI: 10.1051/vetres:2002033. ISSN 0928-4249.

Soli, F., Terrill, T.H., Shaik, S.A., Getz, W.R., Miller, J.E., Vanguru, M., Burke, J.M. 2010. Efficacy of copper oxide wire particles against gastrointestinal nematodes in sheep and goats. *Veterinary Parasitology*. 168. 93-96. doi: 10.1016/j.vetpar.2009.10.004. ISSN 03044017.



Spiegler, V., Liebau, E. Hensel, A. 2016. Medicinal plant extracts and plant-derived polyphenols with anthelmintic activity against intestinal nematodes. *Natural Product Reports*. 34(6), 627-643. DOI: 10.1039/C6NP00126B. ISSN 0265-0568.

Squires, J.M., Ferrira, J.F.S., Lindsay, D.S., Zajac, M.A. 2010. Effects of artemisinin and Artemisia extracts on Haemonchus contortus in gerbils (Meriones unguiculatus). *Veterinary Parasitology*. 2011, **175**(1-2), 103-108 DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.09.011. ISSN 03044017.

Sutherland, I., Scott, I. 2009. *Gastrointestinal nematodes of sheep and cattle: biology and control*. Chichester, U.K: Wiley-Blackwell. ISBN 9781405185820.

Tariq K. A., Chishti M. Z., Ahmad F., Shawl A. S. 2009. Anthelmintic activity of extracts of Artemisia absinthium against ovine nematodes. *Veterinary Parasitology* 160 : 83–88. ISSN 03044017.

Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. 2007. *Veterinary Parasitology*. Wiley. 900 s. ISBN: 1405119640.

Thorp, J.H., Covich, A.P. 2001. *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates*. 2. vyd. Orlando (Florida): Academic Press, 1049 str. ISBN 0-12690647-5. Kapitola 9, Nematoda and Nematomorpha, s. 242–291. ISBN 9780123748553.

TOMKO, J. 1999. *Farmakognózia*. Martin : Osveta. ISBN 80-217-0083-1.

Urban, J., Kokoška, L., Langrová, I., Matejková, J. 2008. In Vitro Anthelmintic Effects of Medicinal Plants Used in Czech Republic. *Pharmaceutical Biology*, 46(10-11), 1-6. ISSN 1388-0209.

Valderrábano J., Calvete C., Uriarte J. (2010). Effect of feeding bioactive forages on infection and subsequent development of *Haemonchus contortus* in lamb faeces. *Veterinary Parasitology* 172: 89–9. ISSN 03044017.

Van Wyk, J. A., Bath, G.A. 2002. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research*. 33(5), 509-529. DOI: 10.1051/vetres:2002036. ISSN 0928-4249.

Váradyová, Z., Kišidayová, S., Čobanová, K., Grešáková, L., Babják, M., Königová, A., M. Dolinská, M.U., Várady, M. 2017. The impact of a mixture of medicinal herbs on ruminal fermentation, parasitological status and hematological parameters of the lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*. 2017, 151, 124-132. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2017.04.023. ISSN 09214488.

Vercruyse, J., Charlier, J., Van Dijk, J., Morgan, E.R. Geary, T. 2016. Control of helminth ruminant infections. *Parasitology*. 1-10 DOI: 10.1017/S003118201700227X. ISSN 0031-1820.

Vercoe, P.E., Makkar, H.P.S., Schlink, A.C. 2010. *In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010. ISBN 978-90-481-3296-6.

Waller, P. J., Chandrawathani, P. 2005. *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics – Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Tropical biomedicine*. vol. 22, no. 2, s. 130-138. ISSN 0031-1820.

Waller, P.J., Bernes, G., Thamsborg, S.M., Sukura, A., Richter, S.H., Ingebringtsen, K., Hoglund, J. 2001. Plants as De-Worming Agents of Livestock in the Nordic Countries: Historical Perspective, Popular Beliefs and Prospects for the Future. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 42(1), 31-44. ISSN 14714922.

Waller, P. J., Thamsborg. M.S. 2004. Nematode control in 'green' ruminant production systems. *Trends in Parasitology*. 2004, 20(10), 493-497. DOI: 10.1016/j.pt.2004.07.012. ISSN 14714922.

Wencelová, M., Váradyová, Z., Mihaliková, K., Čobanová, K., Plachá, I., Pristaš, P., Jalč, D., Kišidayová, S. 2015. Rumen fermentation pattern, lipid metabolism and the microbial community of sheep fed a high-concentrate diet supplemented with a mix of medicinal plants. In *Small Ruminant Research : the journal of the International Goat Association*, vol. 125, p. 64-72. (1.125 – IF2014). (2015 – Current Contents). ISSN 0921-4488.

Wink, M.: 2012. A Source of anti-parastic secondary metabolites. *Molecules, Medicinal Plants* 17, 12771-12791. ISSN 1420-3049.

Wolstenholme, A. J., Fairweather, I., Prichard, R., Von Samson-Himmelstjerna, G. Sangster. C.N. 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*. 2004, 20(10), 469-476. DOI: 10.1016/j.pt.2004.07.010. ISSN 14714922.

Yadav A, Saini V, Arora S. 2010. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. *Clin Chim Acta*. 411(21-22):1570–1579. ISSN 00098981.

Zabré, G., Kaboré, A., Bayala, B. 2017. Comparison of the in vitro anthelmintic effects of *Acacia nilotica* and *Acacia raddiana*. *Parasite* . **24**, 44. DOI: 10.1051/parasite/2017044. ISSN 1776-1042

Zajac, A., Conboy. G.A. 2012. *Veterinary clinical parasitology*. 8th ed. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell. ISBN 978-0-813-82053-8.

Zajac, A., Conboy. G.A., Sloss M.W. 2006. *Veterinary clinical parasitology*. 7th ed. Ames, Iowa: Blackwell Pub., c ISBN 081381734X.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

<b>DMSO</b>	dimethylsulfoxid
<b>L<sub>1</sub></b>	larva 1. vývojového stadia
<b>L<sub>2</sub></b>	larva 2. vývojového stadia
<b>L<sub>3</sub></b>	larva 3. vývojového stadia
<b>L<sub>4</sub></b>	larva 4. vývojového stadia
<b>LD<sub>50</sub></b>	Larval Death 50%
<b>FITC</b>	Fluorescein isothiocyanate
<b>ISE kmen</b>	Inbread Susceptible Edinburgh kmen
<b>IVM</b>	Ivermektin
<b>PPRI</b>	Periparturient relaxation in immunity