

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra zoologie a rybářství**



**Vybraní paraziti koní, jejich léčba a prevence**

**Bakalářská práce**

**Autor práce: Viktorie Špičková**

**Obor studia: ABPS**

**Vedoucí práce: Prof. Ing. Ivana Jankovská, PhD.**

© 2017 ČZU v Praze

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Vybraní paraziti koní, jejich léčba a prevence" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 18.04.2017

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Prof. Ing. Ivaně Jankovské, PhD., za odborné vedení, velmi cenné a podnětné rady při psaní mé bakalářské práce.

# Vybraní paraziti koní, jejich léčba a prevence

## Souhrn

Parazitární onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin onemocnění zvířat a s tím souvisejících problémů s tělesným a výživným stavem organismu, v chovech hospodářských zvířat navíc spojených se snížením výkonu nebo užitkovosti. Příznaky parazitárních onemocnění jsou různé, často podobné nebo shodné s onemocněními způsobenými viry, bakteriemi nebo onemocněními alimentárního původu (nevhodné nebo nekvalitní krmivo, otravy apod.).

Prevence a léčba se historicky opírala zejména o zjišťování parazitů nebo jejich vývojových stádií v trusu, zpočátku se jednalo o náhodnou detekci, postupně cílená detekce makro- i mikroskopicky. Následovala léčba – cíleně u jedince s nálezem v trusu, případně plošné přeléčení celého stáda. Rozdíly byly i v cílové skupině zvířat. U volně žijících se parazitózy vesměs neřešily, případně se zvěř příkrmovala medikovanou krmnou směsí. U PET zvířat záleží na odborném a individuálním přístupu chovatele. Největší nebezpečí hrozí u hospodářských zvířat, a to z důvodu vysoké koncentrace zvířat a tím případně větším promoření prostředí a s tím souvisejícím snadnějším přenosem. Preventivní opatření spočívají v častějším odklizení trusu, likvidaci možných mezipřenositelů a také v medikování krmných směsí. Časté podávání sice většinou vede ke snížení počtu parazitárních onemocnění, zároveň to však vedlo k získávání a zvyšování odolnosti parazitů vůči antiparazitikům.

Ve své práci jsem se zabývala získáváním informací o jiných, nových metodách diagnostiky parazitóz. Práce je rozdělena tak, že nejprve popisuje některé vybrané skupiny parazitů koní a metody jejich diagnostiky. Jedná se zejména o serologické diagnostické metody (např. IFAT testy, Western blot, SAG, ELISA), možnosti jejich použití, výhody a nevýhody a klinické výsledky z praxe. V druhé části jsou popisovány některé možnosti léčby a prevence, opět z klinické a chovatelské praxe.

**Klíčová slova:** kůň, parazit, infekce, nové metody diagnostiky, léčba

# **Selected parasites of horses, their treatment and prevention**

## **Summary**

Parasitic diseases are one of the most frequent reasons of animals' illnesses and related problems with physical and nutritive stage of organism. Moreover: at farm animal breedings connected with decrease of output or productivity. Symptoms of parasitic diseases vary, often are similar or identic to illness of virus, bacteria or alimentary origin (inappropriate or poor quality feedstuff, poisons etc.).

Prevention and treatment was historically based on findings of parasites or their developmental stage in faeces. Initially it was random detection, sequentially aimed macro and microscopic detection. Followed treatment – targeted at individuals with findings in faeces, eventually surface retreatment of the whole herd. Differences were detected also at targeted group of animals. At wild living animals parasitoses have not been dealt mostly, eventually animals were supplementary fed by medicated feed mixture. At pet animals depends on professional and individual approach of breeder. The biggest danger threatens at farm animals because of high concentration of animals and related prospected higher of environment contamination followed by easier transmission of diseases. Preventive provisions were based on more frequent clearance of faeces, disposal of possible intermediate hosts and also at medication of feed-mixtures. This mostly leads to decrease of the number of parasitic diseases but at the same time it led to higher endurance of parasites against antiparasitics.

In my work I dealt with acquiring of information about other, new methods of parasitosis. The work is divided in such way that first describes some selected groups of horses parasites and methods of its diagnostics. In particular serological diagnostic methods (eg. IFAT assays, Western blot, SAG, ELISA), the possibilities of their use, advantages and disadvantages and the clinical results of the practice. The second part describes some options of treatment and prevention, again from clinical and animal husbandry practice in these countries.

**Keywords:** parasites of horses, new diagnostic methods, control strategy

# Obsah

<b>1 Úvod.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Cíl práce .....</b>	<b>2</b>
<b>3 Literární rešerše .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Prvoci parazitující u koní .....</b>	<b>3</b>
<b>3.2 Ploštěnci parazitující u koní.....</b>	<b>19</b>
3.2.1 <i>Tasemnice u koní .....</i>	<i>19</i>
<b>3.3 Hlístice parazitující u koní .....</b>	<b>23</b>
3.3.1 <i>Hlístice čeledi Strongylidae .....</i>	<i>23</i>
Malí Strongylidi .....	27
Velcí Strongylidi.....	29
Léčba malých a velkých Strongylidů.....	32
Strongylus vulgaris .....	35
3.3.2 <i>Škrkavky u koní .....</i>	<i>37</i>
Parascaris spp.....	39
<b>3.4 Léčba .....</b>	<b>41</b>
Doporučení pro léčbu koní s parazity způsobující koliky .....	41
<b>4 Závěr.....</b>	<b>49</b>
<b>5 Seznam použité literatury .....</b>	<b>50</b>

# 1 Úvod

Parazitární onemocnění koní jsou stále vážným problémem, způsobujícím zdravotní potíže koní a s tím související pokles výkonu a výkonnosti, chovatelské hodnoty i životní pohody zvířat (welfare). Neméně důležitý pohled je i pohled ekonomický. Vlastní kontrola, diagnostika a případná léčba u jednotlivě chovaných zvířat nebývá finančně tak náročná. U chovů s vyšší koncentrací zvířat nabývá ekonomika chovu, tím i ekonomika kontroly parazitů, na důležitosti. Není tedy náhodou, že se novými metodami kontroly parazitů v chovech začali zabývat chovatelé špičkových jezdeckých koní a také chovatelé koní, určených k produkci masa.

Životní cykly jednotlivých parazitů jsou obecně v odborné a chovatelské veřejnosti známé. Parazitologie je propracovaný a progresivní vědní obor. Popisuje morfologii, fyziologii i patogenezi většiny známých parazitů. Popisuje možnost, četnost i závažnost klinických příznaků onemocnění. Zabývá se i diagnostikou jednotlivých druhů a následnou léčbou a prevencí. A právě na tuto oblast je zaměřena v posledním období pozornost vědců, veterinářů i chovatelů.

Kontrola parazitů v chovech, spočívající především na detekci parazitů nebo jejich vývojových stádií v trusu a následná léčba cíleně u jedince s nálezem, případně plošně přeléčení celého stáda, vedla k získávání a zvyšování odolnosti parazitů vůči antiparazitikům. K tomu přispěla i opatření spočívající v preventivní medikaci bez předchozí detekce i medikování krmných směsí. Vlastní diagnostika tím stále nabývá větší důležitosti a jsou vyvíjeny stále sofistikovanější metody a metodiky, případně jsou aplikovány metody známé doposud z jiných oborů – například z virologie, bakteriologie nebo alergologie.

V ČR se, zatím, touto problematikou zabývají odborníci velmi okrajově. Je pravděpodobné, že je to dáno malou poptávkou ze strany chovatelů a vyšší finanční náročností těchto metod. I v zahraničí je pouze omezené množství pokusů a prací. Jsou to však metody perspektivní a to nejen z důvodu zvyšujícího se počtu chovaných koní, ale i z důvodu vlastní péče a pohody zvířat a v neposlední řadě i z důvodů ekonomických.

## **2 Cíl práce**

Cílem mé práce na téma **Vybraní paraziti koní, jejich léčba a prevence** bylo podat základní stručný přehled o nových metodách a možnostech v diagnostice, léčbě a celkové kontrole vybraných parazitů koní.



## 3 Literární rešerše

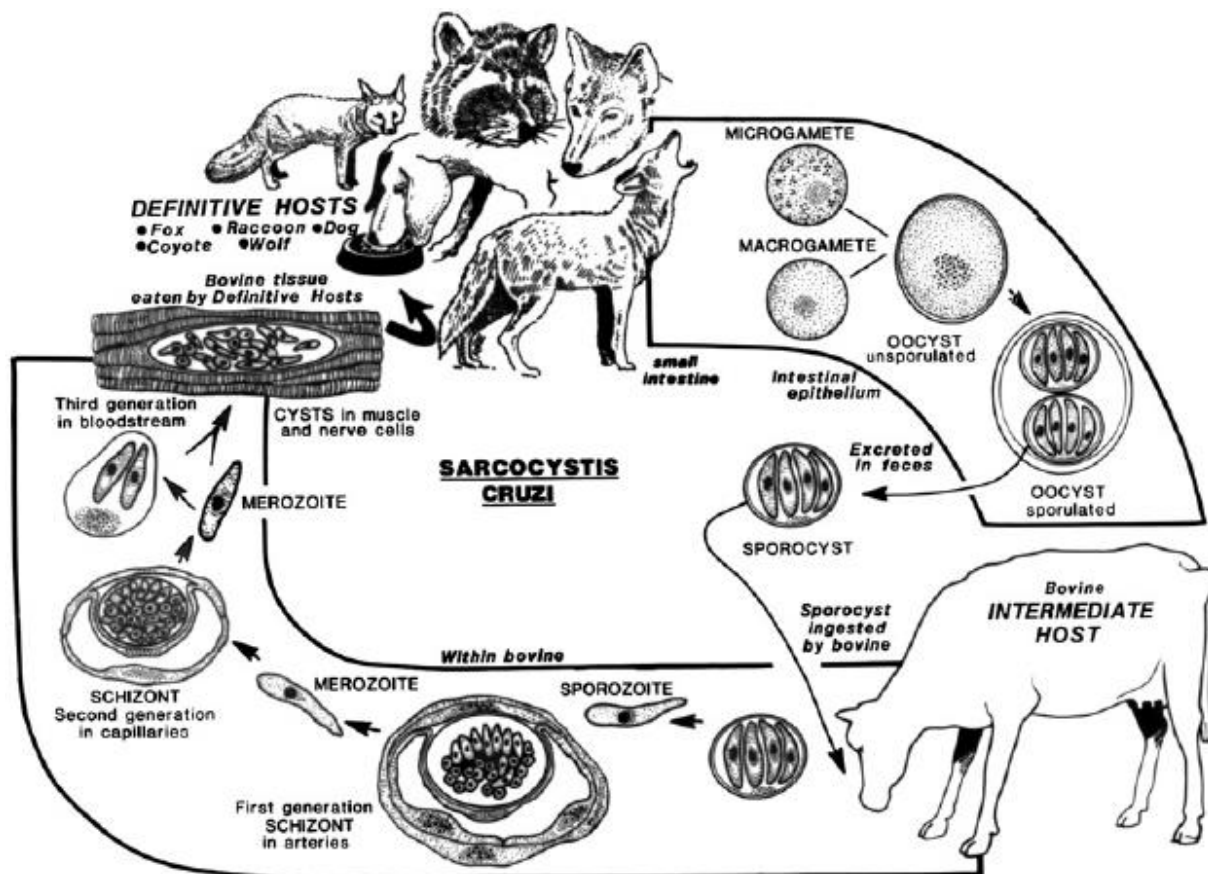
### 3.1 Prvoci parazitující u koní

Mezi prvoky parazitující u koní patří například bičíkovci, mezi které řadíme zástupce *Giardia intestinalis* nebo *Giardia lamblia*, kokcidie *Cryptosporidium parvum*, *Cryptosporidium muris* a *Eimeria leuckarti*. Dále u koní můžeme najít různé druhy svalovek, jako například *Sarcocystis neurona*, *Sarcocystis cruzi* a *Sarcocystis equicanis*, kde je kůň mezihostitelem. Dalšími zástupci parazitujících prvoků jsou také *Neospora hughesi*, *Babesia caballi*, *Theileria equi* nebo nejznámější *Toxoplasma gondii*.

Ve své práci, týkající se vybraných prvoků, jsem se zaměřila především na *Sarcocystis neurona*, *Sarcocystis cruzi* a *Neospora hughesi*.

#### 3.1.1. Kokcidie rodu *Sarcocystis*

Rod *Sarcocystis* má více než 100 druhů, které infikují různé druhy zvířat. K dokončení svého životního cyklu potřebují mezihostitele a definitivního hostitele. Svalovky jsou jedny z nejrozšířenějších původců parazitárních onemocnění u zvířat, vyskytující se po celém světě (Tenter, 1995). Psovité šelmy jsou definitivními hostiteli (DH) *Sarcocystis cruzi* (Dubey and Lindsay, 2006) a vačice (*Didelphis* spp.) jsou DH *Sarcocystis neurona* (Dubey et al., 2001) a koně mohou být jejich mezihostitelé (Dubey et al., 2001). Transplacentární přenos prvoky *Neospora* a *Toxoplasma* z kmene Apicomplexa, jsou spojeny se zvířaty různých druhů (Dubey, 2003). U koní byly zjištěny *Neospora* spp. a *Toxoplasma gondii* u plodů, novorozenců a hříbat, což naznačuje, že může dojít k vertikálnímu přenosu parazitů (Lindsay et al., 1996).

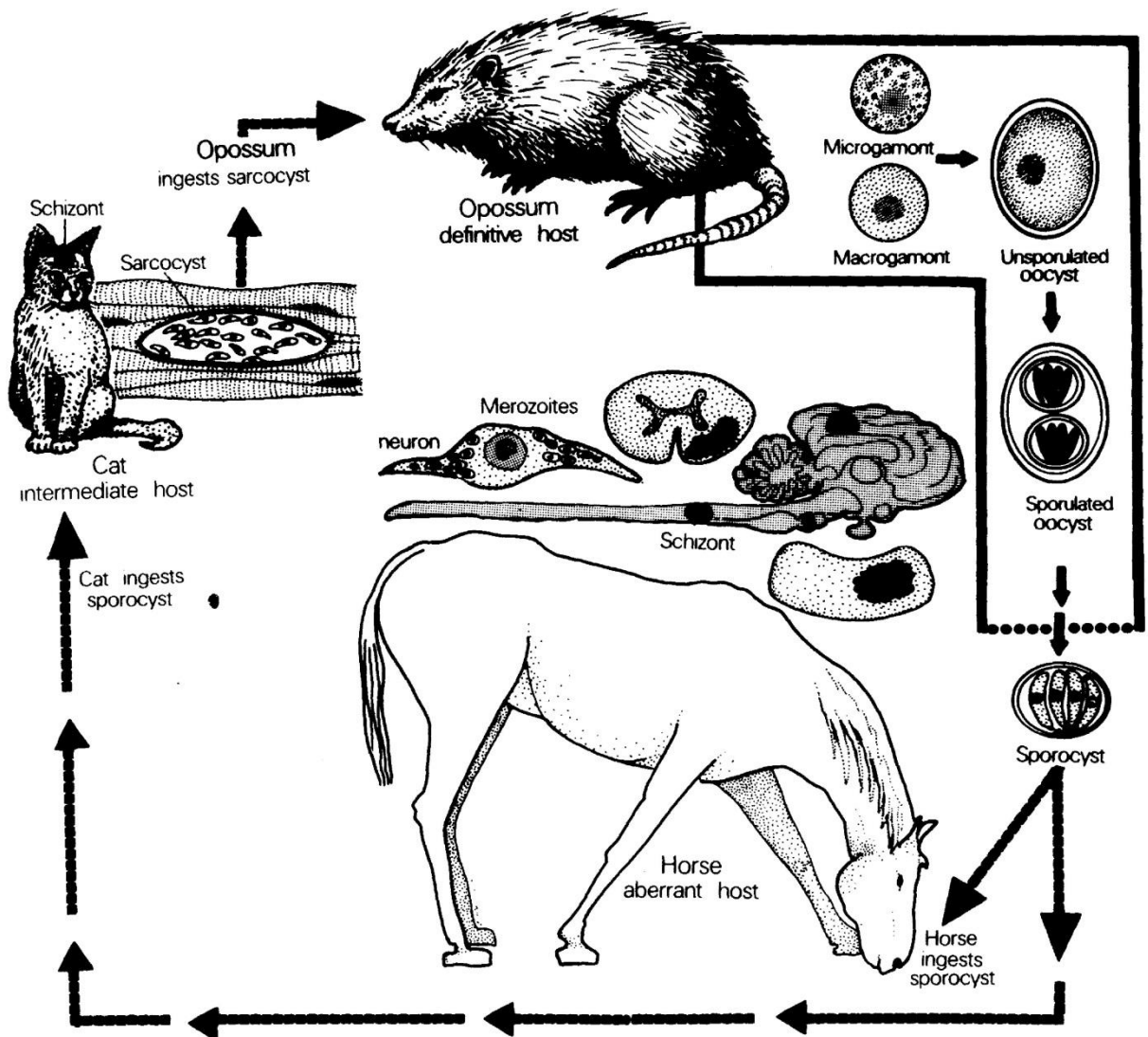


Obr. 1 Vývojový cyklus *Sarcocystis cruzi*

*S. neurona* je popsána jako hlavní původce koňské protozoální myeloencefalitidy (EPM), což je neurologické onemocnění, které je často smrtelné (Dubey *et al.*, 2001). S EPM je také spojena *Neospora hughesi*, vyvolávající podobné klinické příznaky a mikroskopické léze jako *S. neurona* (Marsh *et al.*, 1996). Diagnóza EPM je obvykle založena na výsledcích klinických vyšetření a zjištění přítomnosti *Sarcocystis* spp., specifických protilátek v séru a mozkomíšním moku (CSF), vyhodnocené imunoblot testem (laboratorní test, hledající protilátky nebo antigeny), (Granstrom *et al.*, 1993).

Vícehostitelská kokcidie - svalovka *Sarcocystis neurona* má dvouhostitelský cyklus, ve kterém se střídá konečný hostitel a mezihostitelé, kterými mohou být různí savci. Pro *S. neurona* je v severní Americe definitivním hostitelem vačice *Didelphis virginiana* (Fenger *et al.*, 1995). Stejně tak na jižní polokouli mohou vačice působit jako definitivní hostitelé u tohoto parazita (Dubey *et al.*, 2001). Výsledkem sexuální reprodukce parazitů ve střevním epitelu u infikovaných vačic je produkce sporozoitů, obsahujících sporocysty, které jsou předávány ve výkalech. Sporozoiti jsou infekční pro mezihostitele, kterými jsou skunci (Cheadle *et al.*, 2001), mývalové (Dubey *et al.*, 2001), pásovci (Cheadle *et al.*, 2001) a kočky

(Dubey et al., 2000). *S. neurona* tvoří latentní sarcocysty ve svalové tkáni u mezipřehoditelů; sarcocysty napadený sval je zdrojem infekce pro vačice. Vačice jsou běžně infikované parazitem *S. neurona* (Dubey et al., 2000), který může generovat kontaminaci životního prostředí v místech, kde jsou vačice časté.



Obr. 2 Vývojový cyklus *Sarcocystis neurona*

V roce 1970 byla podle Rooneyho EPM (equine protozoal myeloencephalitis = koňská protozoální myeloencefalitida) nazývána „segmentová myelitida“ (Rooney et al., 1970). Syndrom byl kvůli zapojení mozku přejmenován na „ohniskovou encefalo-myelitidu“. Na výročním zasedání Americké asociace koňských veterinářů (AAEP) popsali Prickett, Rooney a další, 44 případů nákazy v roce 1968 (Prickett et al., 1968) a 52 případů této choroby v roce 1970 (Rooney et al., 1970). Prvoci byli v roce 1974 poprvé pozorováni v souvislosti

s charakteristickými lézemi (Beech et al., 1974) a onemocnění dostalo svůj současný název EPM od Mayhewa et al., který na setkání AAEP v roce 1976 podal zprávu o 45 případech (Mayhew et al., 1977). Nyní je dobře známo, že EPM může být způsobena buď parazitem *Sarcocystis neurona* (Dubey et al., 1991) nebo *Neospora hughesi* (Lindsay et al., 1996), ačkoliv většina případů je způsobena infekcí od *S. neurona*.

Koně se infikují svalovkou *S. neurona* požitím vody nebo krmiva, které bylo kontaminované výkaly z infikované vačice. Ačkoli byli svalovky *S. neurona* popsány v jednom případě u 4 měsíce starého hříběte s klinickými známkami EPM (Mullaney et al., 2005), je nepravděpodobné, že koně jsou běžnými mezihostiteli, kteří napomáhají životnímu cyklu tohoto parazita. Svalovky *S. neurona* se typicky nenacházejí ve tkáních těchto zvířat a koňské kadávery jsou jen zřídka přístupné vačicím. *S. neurona* není horizontálně přenášena mezi koňmi, ani není přenášena na koně z jiných druhů zvířat, kteří jsou mezihostitelé. Byly hlášeny protilátky proti *S. neurona* u hříbat ještě před kojením (Pusterla et al., 2014), ale vertikální přenos tohoto parazita je pravděpodobně málo častý. Vačice jsou tedy hlavním zdrojem infekce *S. neurona* u koní. Přesné mechanismy, kterými *S. neurona* vstupuje do CNS nejsou zatím známy, ale je pravděpodobné, že se zapojují buď do infekce endoteliálních buněk nebo leukocytů (Lewis et al., 2014).

*S. neurona* fylogeneticky úzce souvisí s dalšími prvky tvořícími cysty, u kterých probíhá vertikální přenos a některé studie také naznačují jeho endogenní (vnitřní) přenos u koní. Vyhodnocení výsledků sérologického vyšetření u mladých koní na přítomnost protilátek *Sarcocystis* spp. může být komplikováno možností *in utero exposure* (vystavení parazitární infekci během nitroděložního vývoje) a pasivního přenosu specifických mateřských protilátek (Cook et al., 2001). Detekce protilátek proti *S. neurona* v předkolostránním séru novorozence ukazuje, že hříbě bylo vystaveno antigenům parazitů již během nitroděložního života, infekcí parazitů transplacentární cestou (Abd-Elnaeim et al., 2006).

Cílem studie Antonello et al. (2016), bylo zjistit nitroděložní přítomnost antigenů *Sarcocystis* spp., určit počet hříbat, které mají detekovatelné rozředěné protilátky proti těmto původcům v séru ještě před požitím mleziva a nashromážďovat údaje o vystavení koní parazitům v Brazílii.

Studie Antonello et al. (2016), uvádí, že vzorky séra byly odebrány od 195 plnokrevných klisen a jejich novorozenců ze dvou farem v jižní Brazílii. Protilátky proti rodu *Sarcocystis* byly detekovány testem nepřímé imunofluorescenční protilátky (IFAT)

a analýzou imunoblotu. V 84,1 % (159/189) z březích klisen a 7,4 % (14/189) hříbat byly zjištěny protilátky anti-*Sarcocystis* spp. pomocí IFAT. Všechny vzorky od séropozitivních hříbat byly také pozitivní u příslušných klisen (matek). Vzorky séra u séropozitivních hříbat podle testu nepřímé imunofluorescenční protilátky, mající jako antigeny merozoity *S. neurona*, nevykazovaly reaktivitu u imunoblotu. Intrauterinní výskyt a přenos antigenů *Sarcocystis* spp. byl prokázán nejen u klisen, ale také u jejich hříbat. Tyto výskyty byly nižší před požitím kolostra.

Hostitelský rozsah rodu *Sarcocystis* je velký, takže kontrolovat jej ve stádech je velmi obtížné. Bylo hodnoceno vyšetření výskytu transplacentárního přenosu, přítomnost imonoglobulinů v séru klisen během porodu a u jejich novorozenců před požitím mleziva. Při zjišťování možnosti vertikálního přenosu rodu *Sarcocystis* u koní byly protilátky anti-*Sarcocystis* pomocí IFAT zjištěny v séru klisny a u jejich hříbat. 84 % březích klisen bylo séropozitivních na *Sarcocystis* spp. a 7,4 % hříbat bylo pozitivních na protilátky proti *Sarcocystis* spp. Vysoký výskyt u klisen byl pozorován a srovnáván s jinými studiemi (Dubey *et al.*, 1999; Hoane *et al.*, 2006), s ohledem na to, že prevalence se liší v závislosti na regionu a skupině hodnocených zvířat (Vardeleon *et al.*, 2001). Zjištění nižší úrovně protilátek proti *Sarcocystis* spp. u hříbat (7,4 % - 14/189) se očekávalo, protože novorozená hříbata mají před kojením nižší hladinu gamaglobulinů, a to vzhledem k placentě koní, která se vyznačuje tím, že je difúzní, epiteliiochoriálního typu, který zabraňuje jakémukoliv významnému placentárnímu přenosu protilátek během březosti (Jeffcott, 1975).

Nebyla nalezena žádná nitroděložní přítomnost parazitů *Sarcocystis*, navzdory jejich fylogenetické blízkosti s ostatními prvoky, z nichž byla transplacentální infekce potvrzena u *Neospora* spp. (Antonello *et al.*, 2012) a *T. gondii* (Williams *et al.*, 2005). Nicméně existují důkazy, že jako u ostatních parazitů kmene apikomplexa se i u rodu *Sarcocystis* může zjistit endogenní infekce. U hříběte, jehož matka byla séropozitivní na *S. neurona*, se ve 2 dnech věku projevil příznaky EPM a ve 2 měsících věku byla jeho cerebrospinální tekutina při western blot analýze (analytická technika používaná k detekci specifického proteinu ve směsi s dalšími proteiny) pozitivní na *S. neurona* (Gray *et al.*, 2001). Vzhledem k tomu, že protilátky v séru se vyskytují asi 30 dnů po infekci (Cutler *et al.*, 2001), je jisté, že toto hříbě bylo parazitem *S. neurona* infikováno již v děloze. Jiný důkaz, který podporuje hypotézu o vertikálním přenosu tohoto prvoka, je výskyt séropozitivních koní v oblastech, kde u konečného hostitele nebyl *S. neurona* nikdy nalezen (Pitel *et al.*, 2002). Tato zvířata,

narozená ve Francii a která nikdy neopustila zemia neměla žádný kontakt s *Didelphis* spp., byla přesto séropozitivní.

Pro detekci vertikálního přenosu byly vzorky odebrány již z novorozených hříbat. Vzorky séra od hříbat byly odebrány ještě před příjmem mleziva. V této studii bylo 14 hříbat s nízkou hladinou IFAT titru (test nepřímé imunofluorescenční protilátky) na *Sarcocystis* spp. a tyto titry byly nižší, než hladiny považované za ukazatel infekce, v porovnání se všemi pozitivními vzorky jak u hříbat, tak u klisen. Nižší hodnoty byly použity ke zvýšení citlivosti testu na screening přítomnosti a působení parazita. Koňský zárodek je schopen vytvořit humorální imunitní odpověď kolem 180. dne březosti (Perryman *et al.*, 1980), aby mohly být protilátky přítomny v pre-kolostrálním séru novorozenců. Statistická analýza těchto dat ukazuje, že neexistuje žádný rozdíl v pravděpodobnosti transplacentární infekce, pokud je ukazatelem titer mateřských protilátek. Tímto způsobem je možné konstatovat, že u hříbat, u kterých byla protilátka detekovaná v séru po narození a před požitím mleziva se může vyskytnout díky nitroděložní infekci a má vliv rozvoj adaptivní imunity pro kojence. To znamená, že ve studii Antonello *et al.* (2016), se vertikální přenos vyskytl u všech sledovaných hříbat, která byla séropozitivní a která se narodila séropozitivním klisnám.

Sérologické testy mohou v důsledku zkřížené reakce s přidruženými parazity vytvářet falešné výsledky, ale toto riziko bylo použitou metodikou sníženo. Podle IFAT (test nepřímé imunofluorescenční protilátky) nebyly žádné vzorky hříbat pozitivní na imunobloting (technika používající protilátky pro identifikaci cílových proteinů mezi řadou nepříbuzného proteinu), což naznačuje, že zvířata nebyla infikována parazitem *S. neurona*. IFAT má specifickou a citlivost podobnou imunoblotu, standardnímu testu pro *S. neurona*. Navzdory rodům, které patří do stejného kmene a které sdílí některé povrchové antigeny, je výsledek pozitivní pouze v případě, že celý povrch merozoitů rodu *Sarcocystis* byl fluorescenční (Duarte *et al.*, 2003). Imunoblot test detekuje přítomnost specifických protilátek proti *S. neurona* v séru a mozkomíšním moku, s citlivostí a specifickostí téměř na 100 %, a je založený na odstranění zkřížené reaktivity se *S. cruzi* (Rossano *et al.*, 2000).

### 3. 1. 2. *Neospora hughesi*

Kompletní životní cyklus *N. hughesi* není znám, takže všechny způsoby předání tohoto parazita koním zůstávají nepopsány. Psovité šelmy jsou definitivními hostiteli pro příbuzné druhy *Neospora caninum* (McAllister et al., 1998), ale nebylo prokázáno, že psi nebo divocí psovítí jsou definitivními hostiteli pro *N. hughesi*. Vertikální přenos *N. caninum* je velmi častý u skotu, a z několika nedávných studií vyplývá, že *N. hughesi* lze u koní přenášet transplacentárně (Pusterla et al., 2011).

Obecně platí, že séroprevalence parazita *Neospora hughesi* je u koní nízká. Protilátky v séru proti *N. hughesi* byly v některých oblastech hlášeny u více než 10 % koní (Villalobos et al., 2012), zatímco jiné studie zjistily protilátky proti *N. hughesi* v mnohem nižších poměrech (tj <3 %) (Hoane et al., 2005). Některé z variant mohou být z důvodu geografických rozdílů, ale studie, které používaly western blot, potvrdily sérologické výsledky, že séroprevalence *N. hughesi* je obvykle přeceňovaná (Hoane et al., 2005).

Průzkum, hlášený v roce 2001 v Národním monitorovacím systému zdraví zvířat (NAHMS = National Animal Health Monitoring System), odhaduje, že roční výskyt EPM u koní v 6 měsících věku nebo starších byl  $14 \pm 6$  případů na 10 000 koní (NAHMS 2001). I když je známo, že *N. hughesi* může způsobit u koní neurologické onemocnění (Lindsay et al., 1996), podíl případů EPM, související s tímto druhem parazitů, zůstává nejistý.

### 3. 1. 3. EPM - koňská protozoální myeloencefalitida

Všichni koně jsou považováni za citlivé vůči EPM (koňská protozoální myeloencefalitida), ale je jasné, že ne u všech koní, kteří jsou infikováni parazitem *S. neurona* nebo *N. hughesi* se vyvine choroba. Studie u myší a koní experimentálně infikovaných *S. neurona* prokázaly zásadní roli pro imunitní odpověď v prevenci chorob (Witonsky et al., 2005). Dále někteří z EPM postižených koní prokázali změněné imunitní reakce, z nichž některé jsou antigen-specifické (Yang et al., 2006). Ze zjištění použité metodiky vyplývá, že ne všichni koně prokázali snížení imunitní odpovědi, avšak mechanismy zahrnující vývoj nemoci zůstávají stále málo pochopeny.

Není jasné, co ovlivňuje progresi do závažných neurologických onemocnění. Faktory, jako jsou rozdíly v infekční dávce (protozoal inoculum) a stresem indukované imunosuprese, jsou zapojeny do výskytu EPM (Sofaly et al., 2002). Nicméně snaha o zvýšení stresu

(tj. dodatečná přeprava infikovaných koní) a léčba imunosupresivními steroidy nezpůsobila průvodní zvýšení závažnosti onemocnění (Saville et al., 2004). Genetická variace byla pozorována mezi kmeny *S. neurona*, které byly analyzovány a existují určité důkazy, že určité parazitické genotypy mohou být obzvláště virulentní u mořských savců (Wendte et al., 2010). Nicméně, takové závěry nebyly zřejmé po izolaci z koní trpících EPM.

Průzkum pomocí *post mortem* dat z 10 diagnostických center v celých Spojených státech a Kanadě, zjistil, že k většině případů EPM (61,8 %) došlo u koní, kterým byly 4 roky a méně, zatímco pouze 19,8 % případů EPM bylo u 8letých nebo starších koní (Fayer et al., 1990). Nejčastěji byli postiženi plnokrevníci, teplokrevníci a Quarter horses, ale nepodařilo se zjistit žádnou pohlavní nebo sezónní zaujatost. Menší retrospektivní studie 82 koní s histologickými lézemi, kompatibilními s EPM, naznačila, že riziko EPM bylo nejvyšší u mužského pohlaví teplokrevníků (Boy et al., 1990). Průměrný věk postižených koní byl  $3.6 \pm 2.8$  let, tedy podobný tomu, který byl nalezen Fayerem et al. (Fayer et al., 1990).

Séroprevalence (prevalence séropozitivity na určitý mikroorganismus) *S. neurona* u koní ze Spojených států amerických, se značně lišila od minima 15 % k maximu 89 %, v závislosti na geografické poloze (Tillotson et al., 1999). U koní v Brazílii a Argentině byla pozorována séroprevalence 35,6 % a 35,5 % (Dubey et al., 1999), což ukazuje, že tento parazit běžně infikuje koně v Jižní Americe.

EPM (koňská protozoální myeloencefalitida) se obvykle vyskytuje jen sporadicky a jen zřídka zahrnuje více než 1 koně na farmě (MacKay et al., 1992), i když se mohou objevit souběhy případů (Fenger et al., 1997; Granstrom et al., 1992). Retrospektivní studie zjistila, že mladí koně (1-5 let) a starší koně (> 13 let) měli vyšší riziko rozvoje EPM, (Saville et al., 2000). Nejméně se EPM vyskytovala v zimě. 3krát vyšší riziko bylo v jarních a letních měsících a 6krát vyšší na podzim. Přítomnost vačic (2,5krát), předchozí diagnóza EPM (2,5krát) a přítomnost zalesněné oblasti (2krát) byly také spojeny se zvýšeným rizikem EPM. O jednu třetinu se EPM snížila, když bylo zabráněno přístupu volně žijících živočichů ke krmivu a o polovinu, když byl zdrojem vody potok nebo řeka.

Potlačení imunity kvůli stresu nebo pokročilému věku by mohlo koně učinit náchylné k rozvoji EPM (Saville et al., 2000). Riziko EPM zvyšují také stresující události jako například silná zátěž, přeprava, chirurgické zákroky nebo porod (Saville et al., 2000). Dostihoví koně a koně drezurní měli vyšší riziko rozvoje EPM ve srovnání s koňmi pro chov a pro „radost“. Koně s EPM, kteří byli ošetřeni antikocidiky, měli 10krát větší pravděpodobnost zlepšení zdravotního stavu než neošetřeni koně (Saville et al., 2000).



Klinické příznaky EPM se liší od akutních po chronické, s pomalým nástupem kontaktních či multifokálních příznaků neurologického onemocnění postihující mozek, mozkový kmen nebo míchu (MacKay et al., 1992). Počáteční příznaky mohou zahrnovat disgafie (potíže při polykání), důkazy o abnormálních funkcích horních cest dýchacích, neobvyklé nebo atypické kulhání či dokonce záchvaty (Dunigan et al., 1995). Vážně postižení koně mohou mít potíže se stáním, chůzí nebo polykáním a nemoc může postupovat velmi rychle. Občas se klinické příznaky stabilizují, ale často o několik dnů nebo týdnů později zase recidivují.

Variabilita klinických příznaků je v důsledku infekce bílé a šedé hmoty v CNS na více místech. Znamky zapojení šedé hmoty zahrnují fokální svalovou atrofii a těžkou svalovou slabost, zatímco poškození bílé hmoty má často za následek ataxii a slabost zadních končetin. Časně příznaky EPM, jako je klopýtání a časté křížení (=interference) končetin, může být zaměňováno s kulháním. Konec postižení EPM obvykle vykazují postupný průběh závažnosti a rozsahu klinických příznaků. V některých případech se může postupný nástup změnit k náhlému zhoršení klinického onemocnění, to vše často jako následek polohy vleže.

U postižených koní jsou životní funkce obvykle normální a zvířata se jeví živě a pohodově. Avšak někteří koně s EPM jsou hubení. Neurologické vyšetření často odhalí asymetrickou ataxii, slabost a spasticitu (zvýšené svalové napětí), zahrnující všechny končetiny. Příležitostně jsou přítomny příznaky hyporeflexie (snížená reflexní aktivita), hypoalgesie (snížená citlivost na bolestivé podněty) nebo úplná ztráta citlivosti. Mezi nejčastější příznaky mozkových onemocnění patří otupělost, nakloněná hlava, periferní obrna lícního nervu a obtíže při polykání, i když příznaky nemusí být nutně omezeny na tyto oblasti (Reed et al., 1993).

Definitivní diagnóza EPM vyžaduje posmrtné potvrzení infekce CNS prvoky (viz níže). K dosažení nejvyšší přesnosti diagnózy těsně před smrtí jsou doporučeny následující kroky (Rooney et al., 1970). Přítomnost klinických příznaků, odpovídajících EPM, by měla být potvrzena provedením důkladného neurologického vyšetření (Prickett et al., 1968). Další potenciální příčiny je třeba vyloučit za použití dostupných nástrojů, jako jsou např. cervikální rentgenové snímky (Cusick et al., 1974) nebo imunodiagnostické testování (metody ke stanovení příčiny nemoci) CSF (mozkomíšni mok). Pro potvrzení produkce intratekálních protilátek (uvnitř mozkových plen) proti *S. neurona* nebo *N. hughesi* by mělo být provedeno imunodiagnostické testování (metody ke stanovení příčiny nemoci) CSF (mozkomíšni mok). Poměr protilátek v séru na CSF odhalí intratekální protilátky ve většině případů EPM. Goldman-Witmer koeficient (C-value) nebo index protilátka – specifický antigen (AI)

by měly být použity pro případy, které mají nejednoznačné ELISA titr výsledky (tj. sérum: poměr CSF = cut-off) nebo když je stav, který ohrožuje hematoencefalitickou bariéru podezřelý. Poměr séra SnSAG2, 4/3 ELISA:CSF titru a poměr séra NHSAG1 ELISA:CSF titru jsou v současné době na trhu jedinými nabízenými testy, které poskytují informace o intratekální produkci protilátek na bázi séra a CSF titrů. IFAT (indirect fluorescent antibody test – nepřímý fluorescenční test na protilátky) stanový titry protilátek v séru i v CSF u komerčně dostupných *S. neurona* a *N. hughesi*, ale laboratoře nepočítají poměry.

U koní se stejnými klinickými příznaky jako při onemocnění CNS, by EPM měla být považována za možnou. Postižení koně by měli mít zpočátku důkladné neurologické vyšetření k identifikaci abnormalit a lokalizaci lézí, což dále umožní zpřesnit rozdíly. V kombinaci s použitím vhodných diagnostických testů to bude napomáhat při diagnostice EPM a vyloučení jiných příčin. Některé klasické klinické příznaky zahrnují asymetrickou chůzi a ohniskovou svalovou atrofii. Pokud jsou přítomny tyto příznaky, diagnostika EPM by měla být kvalitní. Koně postižení EPM nemají bolesti a jen zřídka se vyskytují horečky. Výjimka jsou případy, kde je komorbidita (současný výskyt více nemocí).

Téměř všechna neurologická onemocnění u koní mohou mít stejné klinické příznaky jako při postižení EPM. Proto jsou k rozlišení zapotřebí důkladná neurologická vyšetření a diagnostické testy, které EPM rozliší. Příznaky, jako je postižení spíše pánevních končetin než hrudních, jsou obvykle stejné se stenotickou myelopatií (neinfekčním onemocněním CNS u koní) krční páteře (CVSM = cervical vertebral stenotic myelopathy). Fokální svalová atrofie není běžná. Trauma by mělo být rovněž považováno za rozdílnou příčinu poškození míchy na jakékoli úrovni, potenciálně způsobující abnormální neurologické příznaky pro všechny končetiny najednou.

U koní, kde se v historii vyskytovalo respirační onemocnění nebo vypuknutí potratu, by mělo být EHV-1 (Equine herpesvirus 1) spojené s neurologickým onemocněním považované za pravděpodobně možné. EHV-1 může koně ovlivňovat krátce před nebo při nástupu neurologických příznaků. U koní postižených EHV-1 se neurologické příznaky obvykle projevují jako symetrické, s primární slabostí pánevních končetin a ataxií, distenzí (roztažením) močového měchýře (obvykle bez inkontinence), perineální hypalgesií (povrchové snížené vnímání bolesti), paralýzou ocasu, zadržováním fekálií a v některých případech inkontinencí. Někteří koně vykazují rychle postupující známky ataxie a někdy mohou mít nervové lebeční deficity, které se často týkají VII. až XII. hlavového nervu. V jiných případech dochází k mozkovým příznakům.

Další onemocnění, která by měla být považována za rozdílnou diagnózu, jsou onemocnění motorických nervů u koní (EMND = equine motor neuron disease). V raných stádiích nemoci mají koně obvykle vážnou slabost končetin se samovolnými svalovými záškuby a třesem. Koně s chronickým EMND mohou mít rozsáhlou a hlubokou svalovou atrofii.

K ostatním rozdílným onemocněním míchy, které mohou mít za následek podobné klinické příznaky jako EPM, patří míšní nádory, epidurální abscesy (mezi tvrdou plenou a kostí), migrace parazitů, vzteklina, západonilská virová encefalomyelitida, koňská degenerativní dystrofie, otrava olovem, neuroborelióza nebo cévní malformace (vývojová vada).

### **3. 1. 3. 1. Diagnostika EPM**

Potvrzení EPM (koňská protozoální myeloencefalitida) při posmrtném vyšetření je založeno na demonstraci prvoků v lézích CNS. Pokud jsou nalezeny charakteristické zánětlivé reakce, je diagnóza často prováděna na základě předpokladů, i když nejsou zjištěni paraziti. Ve dvou hlášených sériích byly organismy pozorovány v H&E úsecích tkáně CNS a to až u 10-36 % podezřelých případů (Hamir et al., 1993). Imunohistochemickým barvením s protilátkou proti *S. neurona* se citlivost zvýšila z 20 na 51 % (Hamir et al., 1993). I když to nebylo experimentálně prokázáno, může použití PCR (polymerázová řetězová reakce) pro detekci parazitů v tkáních CNS pomoci posmrtné diagnóze EPM.

V současné době existuje pro diagnostiku EPM (koňská protozoální myeloencefalitida) několik imunodiagnostických zkoušek. Je důležité vědět, že tyto testy jsou pouze doplňkem k diagnóze, ne jejím základem. Když je testován kůň bez neurologických příznaků, provedení sérologie jako součásti celkového zdravotního obrazu se z důvodu velmi nízké pozitivní zkušenosti nedoporučuje. U koní vykazujících deficit chůze, by neměla být EPM sérologie používána k odlišení toho, zda jsou deficity způsobeny CNS nebo muskuloskeletárním onemocněním (postihující svaly, klouby, šlachy, vazy). Přítomnost nebo nepřítomnost neurologických onemocnění je určena klinickým vyšetřením. Sérologií pak můžeme upřesnit seznam rozdílných diagnóz neurologického vyšetření koní.

Všechny běžně používané testy jsou založeny na detekci antiprotozoálních protilátek v séru, likvoru nebo v obojím. EPM se vyskytuje pouze u malého počtu koní infikovaných parazitem *S. neurona* (NAHMS, 2001). Pokud jsou sérologické výsledky negativní, testování protilátek v séru proti *S. neurona* má minimální diagnostickou hodnotu (nízká pozitivní

prediktivní hodnota, ale vysoká negativní prediktivní hodnota) (Reed et al., 2013). Nicméně detekce protilátek proti *N. hughesi* v séru neurologického koně má z důvodu mnohem nižší séroprevalence vyšší pozitivní prediktivní hodnotu. Negativní test séra obvykle ukáže, že kůň nebyl infikován a séroprevalencí by mělo být dosaženo jiné diagnózy, nebo že kůň podezřelý na EPM přebývá v zeměpisné oblasti s nízkým vystavením infekčních parazitů. Nicméně nedávno infikovaný kůň může zobrazit klinické příznaky před sérokonverzí. Pro koně s nedávným vývojem kompatibilních klinických příznaků je doporučeno opakované sérologické testování v 10-14 dnech. Detekce protilátek v mozkomíšním moku je více informativní, ale sama o sobě není definitivním ukazatelem EPM, jako je pasivní přenos protilátek přes zdravou hematoencefalitickou bariéru (BBB = blood-brain barrier) (Furr et al., 2002). Navíc, kontaminace krevních vzorků CSF (cerebrospinal fluid = mozkomíšní mok) může způsobit falešné pozitivní výsledky (Miller et al., 1999). Logicky, koně s vyššími titry v séru mají větší pravděpodobnost mít detekovatelné hladiny protilátek v mozkomíšním moku.

Využití kvantitativních testů pro detekci produkce intratekálních protilátek, označujících aktivní parazitní infekce v CNS, poskytuje přesný přístup pro diagnostiku EPM. Goldman-Witmer koeficient (C-value) nebo index protilátka – specifický antigen (AI) jsou testy proporcionality, které posoudí, zda je množství protilátky - specifického antigenu v mozkomíšním moku větší, než by mělo být přítomné v množství od běžného pasivního přenosu přes BBB (hematoencefalitickou bariéru). Tyto metody byly použity v humánní medicíně pro diagnostiku onemocnění CNS, způsobených různými patogeny (Lejon et al., 2003), včetně výrusovce *Toxoplasma gondii* (Potasman et al., 1988). Hodnotu výsledkům testů diagnostiky EPM dodává počet 29 sledovaných klinických případů (Furr et al., 2011). Studie Reed et al. (2016), také ukázala, že menší kontaminace vzorku CSF krví (tedy až 10 000 červených krvinek na  $\mu\text{L}$ ) nebude zkreslovat výsledky testu. Dvě následné studie, zkoumající rozsáhlejší skupinu koní s neurologickým onemocněním, ukázaly, že určení poměru protilátek v séru a titru CSF bylo dostatečné v mnoha případech pro určení přesné EPM, způsobené parazitem *S. neurona* (Reed et al., 2013). Ačkoli použití stejné metody poměru séra a titru CSF by mělo být stejně účinné pro diagnostiku EPM způsobené *N. hughesi*, optimálnější se jeví metoda zjištění poměru mezi sérem a titrem CSF cut-off.

Četné sérologické testy, které byly k dispozici během posledních 2 let pro pomoc při diagnóze EPM způsobené *S. neurona*, zahrnují Western blot (WB; analytická technika používaná k detekci specifického proteinu ve směsi s dalšími proteiny), nepřímý fluorescenční test protilátek (IFAT = indirect fluorescent antibody test), povrchový antigen

(SAG = surface antigen) a enzymatický imunitní test (ELISA = inzyne-linked immunosorbent assay). Všechny testy mohou být provedeny ze séra nebo mozkomíšního moku, ale žádný není považovaný za „zlatý standard“. WB, první popsáný imunodiagnostický test pro EPM, je kvalitní test na protilátky proti merozoitům (vývojová stádia kokcií, nepohlavně se množící v hostiteli). Jeho použití bylo nahrazené kvantitativními testy a pozitivní WB výsledky mají omezený diagnostický užitek. Nicméně, negativní WB výsledky udržují vysokou negativní prediktivní hodnotu. IFAT je kvantitativní (end-point titer) test na protilátky proti kultuře odvozené celými merozoity. Ačkoli sérové titry, získané pomocí IFAT, byly použity k predikci pravděpodobnosti EPM, s vyššími titry naznačují větší pravděpodobnost onemocnění. Studie, které použily různé sady neurologických případů nemocí, ukázaly, že titer séra je sám o sobě chabým modelem EPM (Johnson et al., 2013; Reed et al., 2013). IFAT lze použít jako kvantitativní test pro výpočet poměru séra a titru CSF. Tato informace není v laboratořích běžně poskytována.

Nejvíce nedávných výzkumů se zaměřilo na SAG ELISA, kvantitativní (end-point titer) zkoušky na základě povrchových antigenů *S. neurona*. Vzhledem k jejich vysoké úrovni exprese v parazitovi a jejich imunogenitě u infikovaných koní, se tyto molekuly v testech ukázaly jako dobré sérologické cíle (Marsh et al., 1999). SnSAG2 ELISA a SnSAG4/3 ELISA přesně detekovaly protilátky proti *S. neurona* v koňských sérech a vzorkách CSF (Hoane et al., 2005; Yeargan et al., 2011), a byly použity k prokázání hodnoty produkce intratekální protilátky pro diagnostiku EPM (Furr et al., 2002). ELISA byla popsána na základě povrchového proteinu SnSAG1 (Ellison et al., 2003). Tento antigen však nevyjadřuje všechny kmeny *S. neurona* (Howe et al., 2008), čímž snižuje svou užitečnost pro sérologickou detekci a diagnózu EPM (Granstrom et al., 1993). V současné době je nabízena ELISA kombinující SnSAG1 a SnSAG1 (SnSAG5 a SnSAG6). Avšak žádné publikované zprávy nepopisují validaci tohoto testu, takže není jasné, zda test spolehlivě detekuje protilátky proti *S. neurona*.

### **3. 1. 3. 2. Léčba EPM**

Pro léčbu EPM (koňská protozoální myeloencefalitida) se doporučuje, aby bylo ke kontrole infekce použito jedno z antikokcidiostatik, schválených FDA (úřad pro kontrolu potravin a léčiv). Stávající léky schválené FDA jsou a) Ponazuril (Marquis<sup>®</sup>; Merial, Inc., Duluth, Georgia, 30096, USA); b) Diclazuril (Protazil<sup>®</sup>; Merck Animal Health, Madison, NJ, 07940, USA); a c) Sulfadiazine/Pyrimethamine (eg, ReBalance<sup>®</sup>; PRN Pharmacal, Pensacola,

Florida, 32514, USA). Dodatečná lékařská a podpůrná léčba by měla být stanovena na základě závažnosti neurologických deficitů a komplikací vyplývajících z nich.

#### Folate-Inhibiting Drugs (Kyselina listová – léčivá účinná látka)

Jedna z počátečních léčeb EPM, byla kombinace sulfadiazinu a pyrimetaminu (SDZ/PYR). Sulfonamidy a pyrimetaminy působí synergicky tím, že zasahují metabolismem kyseliny listové do biosyntézy purinových a pyrimidinových nukleotidů, které jsou pro přežití parazita nezbytné.

Dávkovací režim PYR, 1 mg/kg PO q24 h, a SDZ, 20mg/kg PO q24 h po dobu 6 měsíců, to byla první léčba EPM. Protože dietní kyselina listová může mít vliv na absorpci léku diaminopyrimidinu jako PYR (Bogan et al., 1984), nemělo by být krmeno seno po dobu 2 hodin před nebo po léčbě. PYR, dodávaný per-orálně, pro koně v dávce 1mg/kg/d dosahuje koncentrace přibližně 0,02 a 0,10 ug/m v mozkomíšním moku 4-6 hodin po podání. Pokusní koně byli ponecháni s volným přístupem k préríjnímu senu, potencionálně snižujícímu biologickou účinnost léčiva (Bogan et al., 1984). Jednou z vlastností PK tedy je, že ustálený stav PYR v CSF může být získaný po 4-6 hodinách po podání jedné PO dávky 1 mg/kg/d. Krátké poločasy těchto sloučenin dále ukazují, že po jediném denním podání budou existovat velké výkyvy mezi maximální a minimální koncentrací v CSF. Navíc, jak je PYR soustředěn v tkáni CNS, ve srovnání s plazmou (Cavallito et al., 1978), koncentrace na požadovaném místě účinku může být >0.1 µg/mL. Průměrná maximální koncentrace sulfonamidů v CSF po jednorázovém nebo opakovaném podání (22-44 mg/kg) byla hlášena přibližně 2-8 µg/mL (Green et al., 1990). Tyto léky jsou k dispozici jako schválený výrobek FDA (ReBalance<sup>®</sup>; PRN Pharmacal). Účinnost léčby stanovená klinickým zlepšením (2 nebo více stupňů zlepšení v celkové neurologické dysfunkci) nebo návratem negativního stavu pro *S. neurona* metodou imunoblot, vykazala úspěch u 60-70% léčených koní již po 90 dnech (Reed et al., 1996).

Toxické účinky léků se vztahují k inhibici syntézy kyseliny listové a zahrnují potlačení kostní dřeně, anorexii, kopřivku a samoomezujícího průjmu (Welsch et al., 1991). V průběhu léčebného období, tedy 6 měsíců, je typická progresivní mírná anémie (PCV v nízkých 20s). V některých případech může být pozorována také neutropenie (nedostatek neutrofilů) a trombocytopenie (snížené množství trombocytů). Pyrimetamin je teratogenní, což způsobuje potraty a vrozené vady (Chung et al., 1993). Kromě toho klisny, ošetřené pyrimetaminem v pozdním těhotenství, měly u svých hříbat vyzorovaný fatální syndrom (Toribio et al., 1988). Ze čtyř klisen, měly tři klisny doplněnou kyselinou listovou. U jiných druhů doplnění kyselinou listovou nezabrání toxikóze, indukované PYR nebo jej dokonce zhorší (Chung et

al., 1993). Proto nemůže být použití kyseliny listové v EPM postižených koní, léčených PYR, odůvodněno.

Diclazuril a ponazuril jsou dva léky skupiny sloučenin benzenacetonitrilů, které byly schváleny FDA (úřad pro kontrolu potravin a léčiv) pro léčbu EPM. S prokázanými širokospektrálními antikokcidickými účinky u mnoha ptačích a savčích druhů se tyto léky vztahují k herbicidu atrazinu a jsou zaměřeny na organely apikoplasty (čtyřmembránová buněčná organela) parazita (Hackstein et al., 1995). Aktivita benzen-acetonitrilových sloučenin proti *S. neurona* a *N. caninum* byla původně zjištěna *in vitro* (mimo živé tělo, ve zkumavce) (Lindsay et al., 1994). Farmakokinetické studie u koní prokázaly, že terapeuticky ustáleného stavu koncentrace diclazarilu a ponazurilu se dosahuje 7. den za použití značené dávky (Hunyadi et al., 2015). Kromě toho použití zaváděcí dávky ponazurilu při 15 mg/kg vyústilo v ustálený stav koncentrace v krvi a CSF přes den 2. (Reed et al., 2012). Také je současně prokázáno, že podávání rostlinného oleje (1/2 šálku) zvyšuje biologickou účinnost FDA-schváleného produktu ponazurilu až o 15% (M. Furr, nepublikované pozorování). Avšak není nutná nárazová dávka FDA-schváleného produktu diklazarilu a použití rostlinného oleje nezvyšuje jeho biologickou účinnost (Hunyadi, nepublikované pozorování). Sloučeniny benzenacetonitrilů vykazovaly účinnost v rozmezí od 62 do 67 %. Vzhledem k tomu, že ponazuril a diclazaril jsou vysoce selektivní vůči výtrusovcům, v terapeutických dávkách je třeba očekávat malou či žádnou toxicitu (Bentz et al., 2000).

Doba léčby bude záviset především na reakci na antiprotozoální podání. Zatímco FDA (úřad pro kontrolu potravin a léčiv) schválené výrobky jsou označeny léčbou, trvající 28 dnů, u většiny koní se EPM léčí po delší dobu, obvykle 6-8 týdnů nebo déle, pokud je během léčby stále patrné klinické zlepšení. Vysazení antiprotozoální léčby by mělo být založeno na neurologickém zlepšení. V tomto okamžiku se pro ukončení testování protilátek v krvi, CSF nebo obojím nedoporučuje antiprotozoální podání léčiv.

Nesteroidní protizánětlivé léky, jako je například fluxin meglumine, jsou často podávány mírně nebo vážně zasaženým koním během prvních 3-7 dnů antiprotozoální léčby, ve snaze zabránit zhoršení neurologických deficitů během časně antiprotozoální léčby. V případě koní, kteří jsou v nebezpečí selhání organismu nebo vykazují známky poškození mozku, je vhodné dodatečné použití krátkého působení kortikosteroidů (0,1 mg/kg dexamethasonu jednou nebo dvakrát denně) a dymethyl-sulfoxidu (1 g/kg jako 10% roztok i.v. nebo nasogastrickou sondou jednou nebo dvakrát denně) může kontrolovat zánětlivé reakce a související klinické příznaky. Vzhledem k tomu, že poškození CNS je citlivé

na zranění oxidačními činidly, vitamin E (např. 20 UI/kg denně perorálně) se často používá jako antioxidantní doplněk léčby; zbývá experimentálně určit, zda je tato praktika prospěšná.

Na základě předpokladu, že koně, u kterých se vyvíjí EPM (koňská protozoální myeloencefalitida), mohou mít narušenou imunitu, byly do léčby zahrnuty některé imunomodulátory (látka, která je schopna měnit rozsah imunitní odpovědi). Mezi tyto používané léky patří levamisol (1 mg/kg per os po 12 hodinách po dobu prvních 2 týdnů antiprotozoální léčby a během prvního týdne každého měsíce poté), který zabíjí *Propionibacterium acnes* (Eqstim<sup>TM</sup>; Neogen, Lansing, MI). Ale vzhledem k tomu, že nebyly provedeny žádné studie ke zhodnocení jejich účinnosti u EPM koní, nemohou být provedena žádná doporučení.

K preventivním přístupům k EPM může být dosaženo snížením stresu spolu se snížením vystavení stolice z vačic. Snížit protozoální infekci mohou také pomoci praktické metody jako nepodávat potravu ze země, samostatné zdroje pitné vody a zabránění přístupu k volně žijícím živočichům na koňských pastvinách, výběžích a ve stájích.

Další používaná metoda pro zabránění EPM je přerušované používání kokcidiostatik. Dvě profylaktické studie se zaměřily na využití ponazurilu po pokusných infekcích (Mackay et al., 2008). Léčba ponazurilem, buď 2,5 nebo 5,0 mg/kg per os q24h, byla podána 7 dní před pokusnou infekcí a pokračovala po dobu 28 dnů (Furr et al., 2006). V této studii snížilo podávání ponazurilu klinické příznaky a opožděnou sérokonverzi. Střídané podávání pasty ponazurilu v dávce 20 mg/kg per os každých 7 dnů výrazně snížilo intratekální anti-*S. neurona* protilátky u koní, kteří byli experimentálně naočkovaní sporocystami *S. neurona* (Mackay et al., 2008). Souhrnně tyto 2 studie ukázaly, že denní nebo střídaná léčba ponazurilem minimalizovala, ale neodstranila infekce u experimentálně infikovaných koní parazitem *S. neurona*. V poslední době byla zkoumána farmatokinetika, podávána zdravým dospělým koním v nízké denní dávce diclazurilu (0,5 mg/kg per os q24h) (Hunyadi et al., 2015). Je známo, že pelety diclazurilu, podávané v nízkých dávkách, inhibují *S. neurona* a *N. caninum* v buněčných kulturách. Denní podávání nízkých dávek diklazurilu u zdravých zvířat ve výborné kondici na farmách s vysokou mírou výskytu *S. neurona*, výrazně snížilo měsíční séroprevalenci tohoto parazita ve srovnání s neléčenými hřibaty (Pusterla et al., 2015). Autoři této studie naznačili, že vykázaný rozdíl v časové séroprevalenci mezi ošetřenými a neošetřenými hřibaty byl pravděpodobně z důvodu úspěšného snižování infekce *S. neurona* u hřibat léčených denně nízkou dávkou diclaruzilu. Tato preventivní strategie má potenciál, který může být využit u vysoce rizikových koní, ve snaze snížit výskyt EPM.



Zatímco značného pokroku souhlasných závěrů o EPM bylo dosaženo v roce 2002, mnoho otázek zůstává nezodpovězených. Nejvyšší prioritní oblasti identifikované EPM zahrnují: (a) zjišťování, zda *S. neurona* může u koní navázat trvalé, ale inaparentní infekce (skryté), (b) objasnění charakteru imunitní odpovědi v oblasti ochrany a nemoci, (c) určování toho, jak *S. neurona* způsobuje onemocnění a zda musí být u organismů přítomné patologické změny a klinické příznaky, (d) objasnění, zda genotyp parazita *S. neurona* ovlivňuje infekci a závažnost příznaků, (e) zjišťování, zda ko-infekce (infekce více patogeny) může být prospěšným faktorem v případech EPM, (f) rozšíření základních znalostí o *N. hughesi* jako příčině EPM, včetně určení definitivního hostitele, určení všech způsobů přenosu a zkoumání vztahu hostitel-patogen, včetně ochranné imunitní odpovědi.

## 3.2 Ploštěnci parazitující u koní

Ploštěnci jsou celosvětově rozšíření paraziti vnitřních orgánů, kterých se na zemi vyskytuje okolo 20 000 druhů. Mezi ploštěnce, kteří parazitují u koní, řadíme motolice, z nichž původci nemocí u koní jsou motolice jaterní (*Fasciola hepatica*), *Fasciola gigantica*, *Fasciola magna* a dále jedny z nejčastějších vnitřních parazitů tasemnice, z kterých se u koní vyskytují zástupci *Anoplocephala magna*, *Anoplocephala perfoliata* a *Anoplocephaloides mamillana*, na které se ve své práci také nejvíce zaměřuji.

### 3.2.1 Tasemnice u koní

Tasemnice rodu *Anoplocephala* se vyskytují u koní po celém světě a stále více jsou považovány za potenciální příčiny různých forem kolik. Jsou známé 3 druhy, které infikují koně: *Anoplocephala perfoliata*, *Anoplocephala magna* a *Anoplocephaloides mamillana* (dříve nazývána jako *Paranoplocephala mamillana*). Zdaleka nejrozšířenější je z nich *A. perfoliata*, další dva druhy jsou uváděny pouze sporadicky (Rehbein et al., 2013). Na tasemnice koní se v posledních letech soustředily četné výzkumné studie. Většina z nich referovala o vývoji a vyhodnocování diagnostických nástrojů pro detekci tasemnic nebo zkoumala úlohu těchto parazitů v nemocech koní.

Všechny tasemnice rodu *Anoplocephala* využívají mezihostitele, kterými jsou četné druhy roztočů pancířníků (Denegri 1993), koňmi požitých omylem při pastvě. Některé druhy

pancířníků dávají přednost určitým stanovištím před ostatními a vykazují maximální hojnost v určitých časech v průběhu roku (van Nieuwenhuizen et al., 1994). To může částečně vysvětlit geografické rozdíly ve výskytu. Nicméně *Anoplocephala perfoliata* je velmi rozšířená v řadě zemí na několika kontinentech, což představuje širokou škálu možných stanovišť (Tomczuk et al., 2015). Španělská studie prokázala sezónní změny pro oba druhy *A. perfoliata* a *A. magna* (Meana et al., 2005). U obou parazitů je většina zjevné infekce pozorována ve druhé polovině roku, což odráží infekci získanou a stanovenou během předchozího pastevního období. Stejně pozorování bylo pro *A. perfoliata* uvedeno v Polsku a Švédsku, kde byly nejvyšší počty červů zjištěny u koní, poražených během čtvrtého čtvrtletí roku (Tomczuk et al., 2015). To znamená, že tyto tasemnice jsou přizpůsobeny životnímu cyklu, zahrnujícímu jednu generaci parazita za rok. Pro *Anoplocephaloides mamillana* nejsou takovéto epidemiologické informace k dispozici, a to především díky svému vzácnému a sporadickému výskytu. Některé důkazy naznačují, že *A. perfoliata* bývala před desítkami let mnohem méně dominantní a že *A. magna* se vyskytovala mnohem častěji, než je tomu dnes (Chapman et al., 2002). Důvody pro tyto změny nejsou zcela objasněny, ačkoli někteří autoři předpokládají, že častá léčba ivermectinem může způsobit nárůst prevalence a početnosti *A. perfoliata* (French et al., 1994).

Jako většina tasemnic savců, tak i *Anoplocephaloides mamillana* a *Anoplocephala magna* parazitují v tenkém střevě, zatímco *Anoplocephala perfoliata* se liší preferencí pro oblast kolem ileocekálního spojení kyčelníku a slepého střeva. Dalším důležitým rozdílem mezi těmito druhy je, že pouze u *A. perfoliata* bylo hlášeno, že způsobuje patologické reakce kolem jejich vazebných míst, vyznačující se překrvením zhušťováním sliznice a nekrotickými vředy (Kjær et al., 2007). To může vysvětlovat, proč byl pouze tento druh spojován s klinickým onemocněním koní.

Většina výzkumných studií se zaměřila na vývoj a validaci diagnostických technik pro detekci tasemnic a jejich úlohu v gastrointestinálních onemocnění koní. Pro diagnózu *A. perfoliata* bylo nalezeno několik užitečných diagnostických technik, ale každá z nich má své silné i slabé stránky. Technika počítání vajíček (egg counting techniques) byla upravena tak, aby bylo dosaženo přijatelného diagnostického výkonu, ale trade-off (porovnávání výsledků počítání) je často časově náročnější způsob. Validací studie ukazují, že tyto metody mohou spolehlivě detekovat zátěže tasemnicemi při počtu nad 10 červů. Bylo vyvinuto několik komerčně dostupných ELISA testů (testy sloužící k detekci protilátek a antigenů). Ty mohou generovat užitečné informace o výskytu tasemnic na úrovni stáda, ale zároveň jsou méně spolehlivé pro individuální diagnostiku. Bohužel, žádná z dostupných diagnostických

metod není užitečná pro vyhodnocení účinnosti léčby anthelmintiky. Jako budoucí diagnostická metoda může najít uplatnění také koproantigen (jakékoliv antigeny, nalezeny ve výkalech) testy, ale k tomu je zapotřebí další charakterizace. Přestože mezi různými studii existuje určitý rozpor, velká část vědeckých důkazů vztah mezi infekcí *A. perfoliata* a některými typy kolik podporuje. Detekce a kontrola tasemnic, by měly být považovány za součást celkové kontrolní strategie parazitů. Při správném použití by měly být aktuálně dostupné diagnostické nástroje vodítkem pro veterináře při učinění strategického rozhodnutí, týkajícího se kontroly tasemnic.

Zahrnout určitý prvek sledování tasemnic do kontrolních strategií parazitů se ukázalo být poněkud náročné (Nielsen et al., 2014). Množství důkazů, které je k dispozici, naznačuje, že *A. perfoliata* je parazit běžný na různých kontinentech a v různých klimatických podmínkách po celém světě, ale jeho prevalence kolísá v rozmezí 20-80 % (Rehbein et al., 2013). To znamená, že by se měla očekávat přítomnost tohoto parazita u většiny koní, ale nemusí být nutně u každého zvířete. Z tohoto důvodu je teoreticky možné zaměřit se selektivní léčbou pouze na infikovaná zvířata, což je podobné doporučení jako pro kontrolu strongylidů (Kaplan and Nielsen, 2010), ale dostupné důkazy naznačují, že vhodné pro tento účel jsou pouze pracné a časově náročné koprologické techniky. Zatímco určitý podíl v daném stádě nepotřebuje nutně ošetření pro likvidaci tasemnic, zdá se být rozumné dbát předběžné opatrnosti a ošetřit všechny jedince, nikoli některé nechat neošetřené. Zároveň je nemožné na pastvě zcela zlikvidovat veškerá vajíčka tasemnic desinfekcí pastvin. Léčba častěji než jednou či dvakrát do roka by měla být odůvodněna klinickými nebo diagnostickými důkazy výskytu tasemnic, měla by se provádět opatrně, protože rezistence koňských tasemnic je stejně biologicky možná jako rezistence na anthelmintika, potvrzená u strongylidů a koňských škrkavek. Z tohoto důvodu se jedná o pragmatické řešení, obsahující jedno nebo 2 cílené ošetření tasemnic u všech koní přítomných na dané farmě. To je uvedeno v nedávno zveřejněných pokynech pro kontrolu parazitů (Nielsen et al., 2013). Načasování takovéto léčby bude záviset na dynamice šíření parazitů v daném chovu koní. V mírném podnebí se zátěže tasemnicemi obecně hromadí v průběhu pastevního období, takže vhodný čas pro léčbu je podzim nebo začátek zimy. Podstatně odlišné to může být pro teplejší podnebí, kde mohou být pro přenos tasemnic léta příliš suchá a horká.

V důsledku toho může určitá forma dohledu na tasemnice poskytnout užitečné informace jak pro odborníky, tak pro jejich klienty. Odborník se potýká s řadou rozhodnutí, týkajících se kontroly tasemnic na dané koňské farmě. Mezi tyto rozhodnutí patří například: když léčit, kolikrát v rámci jednoho kalendářního roku nebo v jaké době začít zvažovat zahrnutí léčby

tasemnic u hříbat, ročků a odstávčat. Z dostupného séra nebo ze slin, ELISA dokáže generovat informace o relativní úrovni vystavení tasemnic, což napomůže lékařům učinit (informované) rozhodování založené na důkazech. Koprologické metody pro detekci vajíček tasemnic ve výkalech mohou být pro dohled ve velkém měřítku ve veterinární praxi příliš pracné a časově náročné, ale zůstávají velmi užitečné jako diagnostická technika pro použití u jednotlivých koní, protože dokáží spolehlivě detekovat větší zátěže tasemnicemi (> 20 červů), u kterých je více pravděpodobné, že způsobí klinické problémy.

Mezi parazity koní je tasemnice *Anoplocephala perfoliata* nejlépe charakterizována jako patogen, spojený s klinickými onemocněními, protože v řadě dobře provedených studií různých případů a kontrol značně přesahuje jakékoliv jiné koňské gastrointestinální parazity. Pravděpodobnou příčinou obecného nedostatku obdobných údajů pro jiné hlístice u koní je absence použitelných diagnostických testů, zaměřených na příslušné druhy a fáze, i přestože bylo dosaženo nedávného pokroku (Andersen et al., 2013). V případě *A. perfoliata*, práce prováděné v průběhu roku 1990, zaměřené na vyhodnocování a vylepšení koprologických metod, jakož i vývoj nových sérologických testů, umožnilo případy kontrolních studií, odkazované ve studii Nielsen (2016). Je důležité si uvědomit, že relativní absence podobných dat pro jiné běžné koňské parazity nutně neznamená, že jsou méně patogenní. Patogenita tasemnice *A. perfoliata* se v tomto případě stala pouze důkladněji vyhodnocenou.

Stručně řečeno, větší množství užitečných vědeckých důkazů o koňských tasemnicích bylo předloženo v posledních několika desetiletích, ale několik otázek přesto zbývá ještě vyřešit. I přesto, že je několik diagnostických metod ověřeno a jsou dostupné, žádná z nich se nezdá být ideální pro vyhodnocení účinnosti léčby. Proto je zapotřebí pokračovat v pátrání po nových a vylepšených diagnostických metodách. Dále, ileocekální kolika (na přechodu kyčelníku do slepého střeva) byla u několika případů a kontrolních studií statisticky spojena s infekcí tasemnicí *A. perfoliata*, ale skutečné riziko koliky u infikovaných koní nebylo kvantifikováno. V důsledku toho je potřeba více epidemiologických studií k objasnění okolností, za kterých *A. perfoliata* způsobuje koliky.

### 3.3 Hlístice parazitující u koní

Hlístice jsou jedna z nejvíce rozšířených a nejpočetnějších skupin živočichů na zemi. Hlístic rozdělujeme na řád Hád'ata, z kterých můžeme u koní nalézt hád'ě dobytčí (*Strongyloides westeri*), hlístice řádu Strongylida, které se rozdělují na velké a malé strongylidy. Mezi velké strongylidy koní patří *Strongylus vulgaris*, *Strongylus edentatus* a *Strongylus equinus*. Do tzv. malých Strongylidů patří cca 51 druhů parazitů, z nichž nejznámější zástupci vyskytující se u koní jsou *Cylicocylus nassatus*, *Cylicostephanus calicatus* nebo *Cyathostomum catinatum*. Dále patří mezi hlístice řád Ascarida, s nejznámějšími zástupci roup koňský (*Oxyuris equi*) a škrkavka koňská (*Parascaris equorum*) a řád Spirurida, mezi který patří například *Habronema muscae*.

#### 3.3.1 Hlístice čeledi Strongylidae

Nejběžnější patogenní hlístice parazitující u koní, jsou hlístice čeledi Strongylidae, kteří zahrnují velké strongylidy (Strongylinae) a malé strongylidy (Cyathostominae). Skupina koňských strongylidů zahrnuje okolo 60 popsaných druhů (Lichtenfels et al., 2008), kteří všudypřítomně infikují koně v různých typech prostředí po celém světě, navzdory některým epidemiologicky souvisejícím rozdílům v důsledku bioklimatických podmínek (Corning, 2009). Četné práce o endogenních stádiích strongylidů jsou zaměřeny na populace dospělých červů. Larvální stadia představují významnou část biocenózy parazitů, a populační dynamika druhů cyathostom je silně ovlivněna larvální dynamikou.

Existují především důkazy o tom, že předchozí odhalení parazitů, imunita a ošetření ovlivňují celkovou parazitární zátěž a podíl jednotlivých fází cyathostomů ve střevě koní (Chapman et al., 2003). Nicméně, podle Chapmana et al. (2002), není jasné, zda získaná rezistence zabraňuje reinfekci nebo indukuje vyšší úroveň hypobiózy (pozastavení endogenního vývoje larev ve střevě hostitele) v nově získaných larvách. Často je pozorováno snížení všech parazitárních fází. Rozdíly v experimentálních důkazech mohou být způsobeny jak odlišným časováním experimentálního designu, tak komplexní interakcí mezi zúčastněnými proměnnými. Navíc, se vzácnými výjimkami, experimentální skupiny zpravidla zahrnují velmi málo zvířat. Žádní autoři dosud nepovažovali výčet slizničních cyst, které byly ponechány prázdné, za vznik čtvrtého larválního stádia (L4). Tento druh údajů tím, že odráží vývoj od larvy po dospělé, by mohl být velmi zajímavý, protože vznik larev představuje nejdůležitější fázi ve vývoji patogenetické infekce u malých strongylidů (Love et al., 1999).

Ve studii Mughini et al. (2011), byl zkoumán vliv hostitelských a s parazity souvisejících faktorů na strongyloidní infekce u koní, porážených v Itálii na produkci masa, za použití přístupů variantního (multivariantního) modelování. Studie byla provedena s cílem vyhodnotit vliv hostitelského původu, věku a pohlaví na endogenní fáze velkých a malých strongylidů a vyhodnotit faktory, které ovlivňují vznik encystovaných larev cyathostom. Konkrétním cílem bylo porovnat italské koně – většinou vyšlechtěné pro rekreační účely a poražené na konci své kariéry – s těmi východoevropskými – často chovanými přímo pro produkci masa (Martuzzi et al., 2001).

Mughini et al. (2011) uvádějí, že vliv hostitelských a s parazity souvisejících faktorů na strongyloidní infekce u 50 koní, pocházejících z šesti evropských zemí a porážených v Itálii pro produkci masa, byl zkoumán s použitím více proměnných modelových přístupů. Studie byla provedena porovnáním dospělých hlístic, fekálních vajíček (identifikovány kultivací na třetím larválním stádiu) a slizničních larválních stádií cyathostom. Byla provedena modifikovaná transmuralní (procházející celou stěnou) osvětlovací technika (TMI) a u cyathostom byly také hodnoceny prázdné slizniční cysty za účelem získání dalších údajů o dynamice malých strongylidů. Všechny druhy, nalezené v této studii, byly již dříve hlášeny u evropských koní. Byly zjištěny významné rozdíly ve srovnání maďarských a italských koní. Také bylo potvrzeno, že pohlaví nemá vliv, zatímco vztah s věkem hostitele byl částečně v souladu s rozvojem získané rezistence. Analýza slizničních larev cyathostom (více v Itálii) a procento prázdných cyst (více v Maďarsku), spolu s nízkou hodnotou velkých strongylidů v Maďarsku, vedla k formulaci hypotéz širšího použití antimikrobní léčby u maďarských koní, ve srovnání s těmi italskými. Výsledek, týkající se dospělých cyathostom (nebyly žádné významné rozdíly, ani pokud jde o věk nebo původ), odhalil důležitou roli ekologické interakce mezi larvami a dospělci při regulaci populace malých strongylidů.

Všechny druhy, nalezené ve studii Mughini et al. (2011), byly již dříve nalezeny u evropských koní. Celková prevalence a četnost velkých strongylidů byla v souladu se zjištěním jiných autorů (Gavor, 1995), zatímco celková prevalence a četnost dospělců malých strongylidů byla nižší než ty, které uvedly jiné studie (Collobert-Laugier et al., 2002a). Rozdíly v technikách vyhledávání hlístic jsou hlavní příčinou rozdílů pozorovaných ve výsledcích, protože v této práci byli shromážděni pouze makroskopicky viditelní parazité. Protože, jak již bylo uvedeno v Stancampiano et al. (2010), tyto vyhledávací techniky nepochybně podcenily hojnost dospělých cyathostom. Nicméně do modelů byli zařazeni i malí strongylidi, protože stejná metoda zjišťování a vyhledávání byla použita stejným

pozorovatelem pro všechna zkoumaná zvířata. Tím byla zajištěna srovnatelnost výsledků mezi různými kategoriemi koní.

Studium cyst ve sliznici střeva hraje hlavní roli v pochopení biologie, patogenity a epidemiologie cyathostom, a to zejména při zkoumání infrakomunity (paraziti všech druhů obývajících jednoho hostitele) cyathostom uvnitř hostitele, stejně jako účinky anthelmintik (Chapman et al., 1999). V Mughini et al. (2011) bylo poprvé provedeno počítání slizničních larev a prázdných cyst. Výsledky, týkající se mukózních larválních stádií, počítány modifikovanou technikou TMI, a slizničních larválních stádií, počítaných po žaludečním trávení, vykazují velmi blízká čísla, což podporuje dříve uvedenou spolehlivost. V dostupné literatuře nebylo nikdy dříve počítání prázdných cyst hlášeno, pravděpodobně proto, že prázdné cysty nepředstavují část infrakomunity. Nicméně tím, že představují stopy nedávného vzniku larev, jsou důležitým indexem dynamiky malých strongylidů. V souladu s většinou dostupné literatury, nebyl věk koní ve spojení se zátěží dospělých cyathostom (Chapman et al., 2003), i když někteří autoři zjistili vyšší zátěž cyathostom u ročků (Love and Duncan, 1992). Podobné zátěže dospělých cyathostom byly hlášeny také u koní, kteří zažili různé vystavení infekcím cyathostom (Chapman et al., 2002), nehledě na důkazy o přirozeném získání rezistence (Chapman et al., 2002). V Mughiniho studii jsou u starších hostitelů slizniční larvy na 1 gram tkáně méně hojné, což naznačuje, že podle Love a Duncan (1992) a Monahan et al. (1998), má věk hostitele vliv na slizniční larvy. Pokud jde o velké strongylidy, jako *S. edentatus*, dospělce a IEPG (počet juvenilních jedinců na gram), a *Triodontophorus* spp. IEPG, vykazují pozitivní vztah s věkem, což naznačuje nárůst v průběhu času a tím neefektivní získanou rezistenci. Chapman et al. (2003) oznámil snížení prevalence a intenzity velkých strongylidů u starších zvířat. Nicméně, jak bylo navrženo od stejných autorů, rozdíly mohou být z důvodů jejich výběru vysoce parazitických zvířat, zatímco jejich koně byli vybráni náhodně. Ovšem v průzkumu Chapman et al. (2003), kde byly sledovány pouze vzácné druhy velkých strongylidů, průměrná intenzita byla nižší u mladších koní. Ve studii Mughini et al. (2011), byl věk zařazen do modelu společně s pohlavím a původem, který bral v úvahu určitou míru variability v souvislosti se způsobem chovu koní. V důsledku toho jsou výsledky týkající se věku spolehlivější ve srovnání s podobnými analyzovanými údaji s jednorozměrnými statistikami. Pokud jde o pohlaví hostitele, parazitické rozdíly jsou u koní hlášeny jen zřídka a zdají se být spojeny spíše s konkrétním způsobem chovu (např. stáj vs. pastvina), než se samotným pohlavím (Francisco et al., 2009). Výsledky studie Mughini et al. (2011), podporují irelevanci pohlaví koní na infekci strongylidů.

Pokud jde o původ hostitele, studie Mughini et al. (2011), zdůraznila zajímavý vztah se vznikem slizničních cyathostom, zastupujících procento prázdných cyst. Modely ukázaly, že procento prázdných cyst bylo větší u maďarských koní než u těch italských, kdežto slizniční larvy na 1 gram tkáně byly méně četné u maďarských koní. Kromě toho, italští koně byli podstatně více napadeni *S. vulgaris* a *S. edentatus*, ve srovnání s těmi maďarskými. Je vysoce pravděpodobné, že italští koně obdrželi méně protihlístové léčby, než ti maďarští. Hypobiotický stav larev cyathostom je řízen, alespoň částečně, pomocí negativní zpětné vazby z lumenu do sliznice červů, která chrání hostitele před zaplavením nebezpečného larválního vývoje (Love et al., 1999). Podání anthelmintik může vyvolat vývoj slizničních larev do dospělých červů (Lyon et al., 2009), čímž se zvýší množství prázdných cyst, jako je pozorováno u maďarských koní. Kromě toho měli maďarští koně méně velkých strongylidů, jejichž cyklus neobsahuje zastavení larválního vývoje. Hypotéza je v souladu s různými způsoby chovu koní v Itálii a ve východoevropských zemích. Ve většině východoevropských zemí vyvinuli velmi dobrý systém produkce koňského masa (Dobranić et al., 2008), zatímco velké množství italských koní je chováno pro různé účely a poraženo až na konci své kariéry (Martuzzi et al., 2001). Proto se chovatelé z východní Evropy velmi zajímají o odčervení zvířat, s cílem usnadnit jejich výkrm. Naopak, italští koně na maso jsou většinou vyřazená zvířata bez zájmu o zlepšení jejich tělesného stavu a množství tuku. Důkaz o dospělých v lumenu střeva, regulujících vznik slizničních cyathostom, dále potvrzuje výsledky, pokud jde o nedostatek výrazných rozdílů v hojnosti dospělých cyathostom mezi maďarskými a italskými koňmi. Skupina dospělců malých strongylidů zůstává stabilní, a to díky řízené zpětné vazbě mezi larvami a dospělci. Skutečný mechanismus této funkce není zcela známý, ale za hlavní faktor byla považována imunita (Chapman et al., 2003). Nicméně je možné v ekologických vztazích vysvětlit, proč je fenomén zvýšení hypobiózy (hubnutí, hladovění, snížený životní komfort) pozorován u zvířat vystavených zvýšenému působení parazitů výraznější. Jelikož úmrtnost malých strongylidů v důsledku ošetření vyvolává vznik slizničních larev, měl by tento aspekt odradit od využívání slepých léčeb u zvířat bez klinických příznaků, přičemž je bráno v úvahu, že vznik larev způsobuje významné patogenetické důsledky (Love et al., 1999).

Použití GLM (generalizovaný lineární model) syntéz u některých složitých interakcí mezi nezávislými proměnnými, velmi užitečné v průřezových průzkumech, jsou proměnné často vzájemně závislé a mohou působit jako zkreslující činitelé. Z tohoto důvodu vytvářel Mughini výsledky ze dvou modelů, týkajících se procent prázdných cyst. A pouze druhý model je považován za zcela korektní. Rozdíly mezi těmito dvěma modely upozornily



na některé zajímavé interakce mezi hostitelem a parazitologickými proměnnými. Porovnání obou modelů ukazuje, že množství *S. vulgaris* a EPG (egg per gram = počet larev na 1 gram) jsou v tomto pořadí pozitivně a negativně vztahující se k procentu prázdných cyst pouze v modelu kovariát (kontrolovaných proměnných), což umožňuje zdůraznit, že vztah mezi *S. vulgaris* a původem skutečně existuje. Tento vztah byl schopný odhalit pouze kontrolou variability hostitele, jak bylo dokázáno při použití úplného modelu.

V závěru byla provedena upravená TMI technika (transmural illumination technique), což je první přehled, ve kterém byly zaznamenány prázdné cysty cyathostom ke kvantifikaci vzniku slizničních larev. Použití GLM (generalizovaný lineární model) bylo prokázáno jako užitečné k analýze různých závislých proměnných a získání cenných výsledků v průsečných studiích. Bylo potvrzeno, že při infekci koňských strongylidů nemá pohlaví žádný vliv, zatímco vztahy s věkem hostitele jsou částečně v souladu s rozvojem získané rezistence. Analýza slizničních larev a prázdných cyst cyathostom, umožňuje lepší porozumění zvláštním eko-epidemiologickým vzorům infekce malých strongylidů, ukazuje zajímavé rozdíly spojené s původem koní a umožňuje formulaci hypotéz širšího využití protihlístových ošetření u maďarských koní, ve srovnání s těmi italskými. Získané výsledky také naznačují významnou roli v ekologických interakcích v regulaci populace malých strongylidů.

### **Malí Strongylidi**

Hlístice podčeledi Cyathostominae jsou velmi rozšířené hlístice u koní. Makrocyclické laktony (ML) jsou v současné době nejvíce využívaná anthelmintika, z čehož jsou ivermectin (IVM) a Moxidectin (MOX), registrovány pro léčbu cyathostom u koní (Nielsen et al., 2014).

Egg reappearance period (ERP) je doba mezi léčbou a znovuobjevením vajíček ve výkalech. V době zavádění bylo hlášeno, že ERP pro IVM a MOX je 8-9 týdnů (Boersema et al., 1998) a 12-15 týdnů (Boersema et al., 1998).

Zkrácení ERP lze vysvětlit několika mechanismy. Po léčbě makrocyclickými laktony je ERP často kratší než nejkratší prepatentní období (PPP=inkubační doba od pozření L3 do vyloučení vajíčka výkaly) 57 dnů pro cyathostomy (Lyon set al., 2011a) a zkrácená ERP byla také pozorována u domácích koní (van Doorn et al., 2014). To znamená, že larvy přítomné v hostiteli již v době léčby musí být odpovědné za zkrácení ERP. Z tohoto důvodu, snížená ERP je považována za častou známku vzniku rezistence (Lyons et al., 2009). Posun v rámci populace cyathostom směrem k druhům s kratší dobou vývoje není pravděpodobnou příčinou, protože koně s nebo bez zkrácené ERP vykazovali podobnou druhovou skladbu před zahájením léčby (van Doorn et al., 2014). Kromě toho, 20 let léčby ML nevedlo ke změně

v druhovém složení v týchž stádech (Chapman et al., 2002). Z tohoto důvodu je zkrácení ERP s největší pravděpodobností způsobeno sníženou citlivostí vývojových stádií pro ML nebo rychlejším tempem rozvoje vývojových stádií do dospělců, produkujících vajíčka. V kritickém testu, popsaném Lyonsem et al. (2010), účinnost MOX proti luminálním larválním stádiím (v dutině střeva) u jednoho koně byla jen 82 %, zatímco účinnost proti dospělým cyathostomům u stejného koně byla stále 100 %. Kritické testy, provedené u stejné skupiny, prokázaly efektivitu IVM proti L4 36-80 % (Lyons et al., 2009) a o 4 roky později klesla účinnost proti L4 na pouhých 0-16 % (Lyons and Tolliver, 2013). Efektivita proti dospělým byla v obou případech vyšší než 99 %. Autoři naznačují, že toto bylo způsobeno sníženou účinností ML proti nezralým fázím v lumenu střeva, ale nemohli vyloučit možnost rychlého vývoje slizničních fází do luminálních fází v 6 dnech mezi ML léčbou a pitvou.

Experimentálně je možné rozlišit rychlejší vývoj od snížené citlivosti na ML, protože vyšší rychlost vývoje z L4 do stádia dospělého, schopného produkovat vajíčka, se také může objevit po léčbě anthelmintiky mimo skupinu ML, například pyrantelem (PYR). Rychlejší vývoj může být pro parazita výhodný. Zvyšuje šanci pro reprodukci mezi dvěma následnými ošetřeními. Plasticita (tvárlivost, poddajnost) doby vývoje u hlístic byla prokázána dříve, například u *Anguillicola crassus*, parazitické hlístice u japonského a říčního úhoře (Weclawski et al., 2013).

Zkrácená ERP (doba mezi léčbou a znovuobjevením vajíček ve výkalech) nemusí nutně zahrnovat všechny přítomné druhy cyathostom. Jeden druh může být náchylnější k rozvoji rezistence, nebo může mít vyšší stupeň plasticity než jiný. I když diferenciací morfologicky pomocí vajíček nebo kultivovaných L3 není možná, mohou být rozlišeny pomocí molekulárních metod (Cwiklinski et al., 2012). Tyto studie používají obrácené linie bodu (RLB = reverse line blot), což je metoda založená na hybridizaci druhově specifických sond se zesíleným fragmentem intergenové distanční oblasti. Jednotlivé L3 mohou být rozlišeny do 21 nejběžnějších druhů cyathostomů (Cwiklinski et al., 2012). V poslední době bylo RLB popsáno na základě souhrnných L3 pro diferenciaci larválních kultur, umožňující odhad larev na gram u druhů cyathostom (Kooyman et al., 2016).

Cílem studie Kooyman et al. (2016), bylo zjistit, které druhy hlístic jsou zapojeny do zkrácení ERP a stanovit příčinu zkrácení ERP (egg reappearance period), snížení náchylnosti k ML nebo rychlejší vývoj daných druhů.

## Velcí Strogylidi

*Strongylus vulgaris* je patogenní hlístice napadající koně. Parazit *S. vulgaris* je nazýván „zabiják koní“ (Kester, 1975). Odhaduje se, že až 90 % ze všech koňských kolik bylo způsobeno tímto parazitem (Drudge, 1979). Migrující larvy tohoto parazita způsobují silné endarteritidy (zánětlivé postižení vnitřní vrstvy tepen) v lebečních mezenterických tepnách (Morgan et al., 1991). Samostatný trombus může zničit menší tepny a způsobit lokální ischemii (Erigk, 1951). Infarkt a možnost prasknutí střevních segmentů je spojeno s projevy koliky (Drudge et al., 1966). Klinické příznaky jsou tradičně popisovány jako velmi bolestivé s pocením, cyanózou sliznice (modravé zbarvení), vysokou srdeční frekvencí, kardiovaskulárním šokem a často fatálními následky (Erigk, 1951).

Z těchto důvodů, byl *S. vulgaris* identifikován jako primární cíl programů moderní kontroly parazitů (Drudge et al., 1966). Historicky byl tento parazit široce rozšířen, s hlášenou prevalencí v rozsahu 80-100 % (Trolliver et al., 1987), ale desetiletí časté anthelmintické léčby snížilo výskyt na nedetekovatelné úrovni (Herd, 1990). Nicméně, z důvodů zvýšení úrovně rezistence u jiných důležitých koňských parazitů, jako jsou cyathostoma a *Parascaris equorum*, dochází u přístupů ke kontrole parazitů k podstatným změnám (Kaplan et al., 2010). V roce 1999 zavedlo Dánsko vnitrostátní právní předpisy omezující všechny anthelmintické léky na předpis pouze pro použití, která usnadňují velkou míru parazitárního dohledu, čímž se významně snižuje intenzita léčby (Nielsen et al., 2014). Dohled, založený na kontrole parazitů, je doporučen po celém světě (Stratford et al., 2014) a nyní ho lze považovat za obecný trend. Nedávná studie, hodnotící výskyt *S. vulgaris* na dánských koňských farmách, používá různé parazitární kontrolní strategie, zvyšující znepokojení nad zjevným výskytem *S. vulgaris* (Nielsen et al., 2012). Koně na farmách, používajících dohled založený na metodě selektivní terapie, měli prevalenci *S. vulgaris* 15,4 %, ve srovnání se 7,7 % na farmách založených na kontrole počtu vajíček parazitů. Odpovídající prevalence farmy byla 83 % a 39 %, v daném pořadí. Proto je důležité posoudit možná rizika, spojená s infekcí a vyhodnotit diagnostická a prognostická opatření u klinických případů.

Infekce *S. vulgaris* je stále považována za nežádoucí událost, ale skutečná zdravotní rizika spojená s touto infekcí jsou pozoruhodně neznámá. Dostupné vědecké důkazy popisující klinické příznaky infekce *S. vulgaris* se skládají především z kazuistiky (Oymada et al., 2007) a experimentální infekce parazitů u dosud neléčených hříbat (Duncan, 1974). Zatímco oba typy důkazů jsou užitečné při popisu potenciální patogenní infekce *S. vulgaris*, neřeší však rizika této choroby u daného infikovaného koně. Celkově vzato, v současné době není známo, do jaké míry může být výskyt *S. vulgaris* spojen s kolikou.

Cílem studie Nielsen et al. (2016) bylo zhodnotit, do jaké míry mohou být protilátky, specifické pro migrující larvy *S. vulgaris*, spojeny s definovanými typy kolik mezi koňmi, sledovanými na univerzitní fakultní nemocnici v Dánsku.

Každý případ koliky byl porovnán s koňovitými stejného typu (pony, teplokrevní nebo chladnokrevní), věku, pohlaví a připuštěných ve stejném měsíci a roce, ale kvůli problémům které nesouvisí s trávicím traktem. Vzorky séra byly analyzovány na přítomnost protilátek proti migrujícím larvám *S. vulgaris*, pomocí ELISA testu (test na detekci protilátek). Byly použity následující 4 definice případů: koliky *sensu lato*, tedy všechny koně s příznaky koliky (n=274), s dalšími podskupinami, tj. nedagnostikovanými kolikami (n=48), strangulating obstructions (n=76) (překážky, kde se vytvoří smyčka ve střevě, která odřízne krevní zásobení) a nonstrangulating infarctions (n=20) (přítok krve do úseku střeva je uzavřen, a to bez jakýchkoliv překážek).

Studie Nielsen et al. (2016) je první, která poskytuje epidemiologické posouzení spojení *S. vulgaris* s kolikami u koní. Dokumentuje významný vztah mezi protilátkami migrujících larev tohoto parazita a nonstrangulating infarctions. Kromě toho hladiny protilátek byly významně odlišné mezi strangulating obstructions a nonstrangulating infarctions.

Studie Nielsen et al. (2016), poskytuje stupeň biologické validace *S. vulgaris* pomocí ELISA. Předchozí práce potvrdila zkoušku ryzosti proti zlatým standartním informacím o parazitární infekci stavů získaných vyšetřením *post mortem* (Andersen et al., 2013), a bylo zjištěno provedení na uspokojivé úrovni, s citlivostí a specifíčností nad 70 % a významné korelace s počtem migrujících larev *S. vulgaris*. Pozorovaná statistická asociace s nonstrangulating střevním infarktem zde naznačila, že může být ještě silnější v soupravě dat s větší velikostí vzorku. To ilustruje možnou aplikaci testu v klinické praxi. V budoucích studiích by bylo zajímavé zhodnotit přítomnost *S. vulgaris* v případech koní, spojených s peritonitidou (zánět pobřišnice), protože to může mít společné pokračování ke střevní ischémii.

Výsledky séra *S. vulgaris* uváděné v testu ELISA naznačují relativně vysoké vystavení *S. vulgaris* ve studované populaci. Nedávná práce v laboratoři doložila, že hladiny protilátek *S. vulgaris* přetrvávají po dobu až 5 měsíců po léčbě anthelmintiky (Nielsen et al., 2015). Vzhledem k dlouhé životnosti ~6,5 měsíců, může být pozitivní výsledek ELISA testu interpretován jako aktuální nebo nedávná infekce tímto parazitem. Zhruba 40 % séroprevalence by byla ve většině populací spravovaných koní považována za vysokou. Nicméně, nedávná studie na dánské farmě dokumentuje, s použitím koprokultury, prevalenci

až 80 %, takže vystavení parazitem *S. vulgaris* je v této zemi obecně vysoké (Nielsen et al., 2012). To je důležité, protože vztah mezi tímto parazitem a kolikami se může v nižších mírách prevalence lišit. Dalo by se očekávat, že relativně vysoké vystavení parazita ve studované populaci bude stimulovat určitý stupeň imunity, která by mohla snížit následky infekce. Bylo prokázáno, že infekce *S. vulgaris* vyvolává relativně silnou imunitní odpověď a také bylo zjištěno, že očkování je proveditelné (Monahan et al., 1994). Tudíž, nižší prevalence může být spojena s vyšší patogenitou a extrapolace (přechod z užší na širší oblast) z této studované populace koní jinam do světa, kde je výskyt parazita často podstatně nižší, by měla být provedena s velkou opatrností. Přísnější předpisy používání anthelmintik v zemích EU způsobují zvýšení případů *S. vulgaris* spojených s kolikami i jinde ve světě. Například nedávná studie ohlásila vysokou infekci *S. vulgaris* se spojenou patologií v populaci řízených a pravidelně odčervěných sardinských koní (Pilo et al., 2012), dokumentující možné riziko a nemoci, spojené s tímto parazitem. Z tohoto důvodu by měly být součástí řídicího programu parazitů i kontrolní opatření, zaměřené na *S. vulgaris* (Nielsen et al., 2012).

Je důležité si všimnout, že hodnoty *S. vulgaris* z ELISA testu nejsou spojené s dvěma nespécifickými kategoriemi kolik. Tím pádem není žádný náznak toho, že mají koliky celkový vztah s parazitem *S. vulgaris*, což je v souladu s povahou multifaktoriálních gastrointestinálních potíží (způsobeny více nebo mnoha faktory). Navíc pro koně se skrytou infekcí *S. vulgaris* bez klinických příznaků to není vůbec neobvyklé. Toto bylo ilustrováno pozorováním, že vyšetření koní v nedávné prevalenci neodhalila žádné zjevné známky onemocnění i přes běžný výskyt parazita. (Nielsen et al., 2012). Kromě toho, v experimentálním stádě na University of Kentucky, které bylo od roku 1979 zachováno bez anthelmintického zásahu, bylo prokázáno, že skrývá vysoké zátěže *S. vulgaris* s výraznými nálezy při vyšetření *post mortem*, ale jen velmi málo, pokud vůbec, s klinickými známkami onemocnění (Lyons et al., 1994). Výsledky studie Nielsen et al. (2016), jsou srovnatelné s podobnými studii kolik, prováděnými na koňské tasemnici *Anoplocephala perfoliata*. Byly nalezeny významné souvislosti s dopadem na střevní aparát, potvrzené chirurgicky a *post mortem* vyšetřením, stejně jako křečovitá kolika, a definované řadou klinických kritérií (Proudman et al., 1998), zatímco širší definici koliky se nepodařilo odhalit žádnou studií (Trotz-Williams et al., 2008). Celkově vzato, existují důkazy, že paraziti, jako jsou gastrointestinální hlístice, mohou být spojeny s určitými typy kolik, ale nemusí být nutně identifikováni jako významné rizikové faktory pro méně definované příznaky kolik.

## Léčba malých a velkých Strongylidů

Kooyman (2016) říká, že pro kontrolu cyathostom u koní jsou nejčastěji používána anthelmintika makrocyclické laktony (ML), z nichž nejvíce moxidectin (MOX) a ivermectin (IVM). Zkrácení ERP může být způsobeno sníženou citlivostí nezralých červů na ML. Nebo se mohou nezralí červi, v důsledku opakovaných ošetření ML, rychleji vyvinout do dospělců produkujících vajíčka. Druhovú skladbu larválních kultur získaná krátce po léčbě ML a pyrantelem (PYR), může potvrdit hypotézu snížení citlivosti na ML, což je často specifický případ, zatímco rychlejší vývoj může také nastat po ošetření anthelmintiky s odlišným způsobem účinku. Od 3 farem se známou historií o zkracování ERP bylo vybráno 8 koní a následně rozděleno do 2 skupin. Skupina MOX-PYR-MOX se dvakrát ošetří MOX (den 0 a 126) a jednou PYR (den 84) a skupina IVM-PYR-IVM se dvakrát ošetří IVM (den 0 a 98) a jednou PYR (den 56). Kultivované infekční larvy (L3) byly spočítány a diferencovány s obrácenou linií bodu (RLB = reverse line blot) ze směsných vzorků. Pomocí určení druhů cyathostomů se vypočítá počet larev na gram. Účinnost všech procedur ML dosáhla 100 % a zkrácená ERP byla nalezena na všech třech farmách. Druhovú složení larválních kultur po léčbě ML se nijak významně nelišilo od ošetření PYR ve skupině IVM-PYR-IVM, ale liší se to ve skupině MOX-PYR-MOX. Larvální kultury získané po ošetření MOX se skládaly převážně z *Cylicocyclus nassatus*, zatímco po léčbě PYR byly nejhojnější druhy *Cylicostephanus longibursatus*. V kulturách od 42 dnů po ukončení léčby MOX bylo zjištěno 6 druhů cyathostomů z 3 rodů na farmě s nejnižší aktivitou (farma 1), zatímco na farmě s nejvyšší aktivitou (farma 3) byly ve stejném počtu zkoumaných L3 nalezeny pouze 3 druhy z 1 rodu. Zjištění vysokého počtu L3 z druhů *Cylicocyclus*, 42 dnů po léčbě MOX a nízké množství 42 dnů po léčbě PYR, může být vysvětleno sníženou citlivostí nezralých červů na MOX, ale ne rychlejším vývojem. Tudiž lze říci, že zkrácení ERP po léčbě MOX je, s největší pravděpodobností, proces, ve kterém je rostoucí množství nezralých červů z rostoucího počtu druhů stále méně citlivé k účinné látce.

Kultivované larvy L3, získané po léčbě ML a PYR z farem se zkrácenou ERP (doba mezi léčbou a znovuobjevením vajíček ve výkalech) byly spočítané a získané pomocí RLB (obrácená linie bodu) ze směsných vzorků. Diferenciace vyloučených vajíček nebo kultivovaných L3, získaných krátce po různých způsobech léčby, může poskytnout větší porozumění možných příčin kratší ERP. Vzhledem k tomu, že počet vajíček a larev lineárně koreluje, bylo rozhodnuto zaměřit se na L3, protože mohou být odebrány a uloženy snadněji než vajíčka. Cwiklinski et al. (2012) popsal diferenciaci 21 druhů cyathostom s RLB, ale pro 3 z uvedených druhů nebyla specifická sond ověřena s homologními diferenciovanými

dospělci. Kooyman et al. (2016) prokázal, že z 18 zbývajících druhů nemohla být sonda pro *Cylicocyclus radiatus* použita v RLB na směsné vzorky z důvodu předpokládané křížové hybridizace. Proto byly ve studii Kooyman et al. (2016), použity sondy pro 17 druhů hlístic podčeledi *Cyathostominae* a pouze u druhů *Cylicodontophorus bicoronatus*, *Cyathostomum tetracanthum* a *Coronocyclus labratus* nebyly nalezeny žádné L3. Tyto LPG (larvae per gram = počet larev na 1 gram), získané přímo z počtu larválních kultur, byly podobné výsledku všech LPG podle druhů, získaných ze směsných vzorků v RLB. Z toho vyplývá, že to poskytuje spolehlivé odhady na LPG podle druhů.

Na dalších 3 farmách se LPG (larvae per gram = počet larev na 1 gram) druhů cyathostomů a druhové složení larválních kultur mění v závislosti na různých ošetřeních ve skupinách MOX-PYR-MOX, ale ne ve skupině IVM-PYR-IVM. ERP pro MOX byla mnohem delší než pro IVM, s největší pravděpodobností v důsledku larvicidního účinku MOX. Nicméně, aktivita léčby IVM a MOX byla ve studii Kooyman et al. (2016) v ten samý den po ošetření srovnatelná. To může vysvětlit poměrně malé rozdíly v druhovém složení před a po ošetření IVM, zatímco před a po zákroku MOX byly rozdíly větší. Očekává se, že bude nalezeno více hlístic rodu *Cylicocyclus*, je-li odběr vzorků prováděn nejdříve po ošetření IVM. To je v souladu i se studií van Doorn et al. (2014). Jsou rozlišeny larvy L3, získané dříve po léčbě IVM (den 28 až 35) a relativně více druhů rodu *Cylicocyclus* bylo nalezeno v těchto dnech, než ve 42. nebo 56. dni po ukončení léčby. Důležitým rozdílem mezi současnou studií a studií van Doorn et al. (2014), bylo použití léčeb ML a PYR. To nabídlo možnost srovnání druhové skladby kultivovaných L3, získaných 42 dní po ošetření ML, s výsledky získanými ze stejného koně 42 dnů po léčbě PYR. Kromě toho lze vyhodnotit i vliv sezóny. Protože 2 léčby ML byly odděleny v čase (98 dnů pro ošetření IVM a 126 dnů pro MOX) s léčbou PYR mezi nimi. Získaná EPG (eggs per gram = lineární korelace mezi vajíčky na gram) a druhové složení kultur L3, bylo po 1. a 2. léčbě ML srovnatelné. To znamená, že neexistuje žádný jasný sezónní vliv. Ještě důležitější je, že případné rozdíly v účinku léčby PYR a ML tedy nemohou být přičítány sezónním vlivům.

Druhové složení larválních kultur bylo zjišťované 42 dnů poté, co byly porovnány léčby MOX a PYR. Ve srovnání s *Cylicocyclus nassatus*, *Cylicostephanus longibursatus* bylo hojnější po léčbě PYR než MOX. *Cylicostephanus longibursatus* je o hodně menší červ než *Cylicocyclus nassatus* s menší PPP (prepatent period = infekční období), 57 dnů oproti 71 dnům (Lyons et al., 2011a), a proto je pravděpodobné, že čas, potřebný pro vývoj od slizničních stádií do dospělého červa, je také kratší u *Cys. longibursatus* než u *Cyc. nassatus*. MOX má aktivitu proti slizničním stádiím, zatímco u PYR je aktivita omezena

na dospělé a v menší míře i u jiných stádií v lumenu střeva (Lind et al., 2003). To může vysvětlit, proč počet LPG *Cys. longibursatus* byl vyšší 42 dnů po ošetření PYR, než po ošetření MOX a také to, že počet LPG *Cys. longibursatus* byl vyšší než počet LPG *Cyc. nassatus* 42 dní po podání PYR. Odolnost *Cys. longibursatus* proti PYR by také vysvětlila vysoké LPG těchto červů po podání PYR. Studie prokazuje velmi vysokou účinnost (99 %) PYR. (Lyons, 1974). A i když je zde odpor *Cys. longibursatus* proti PYR, nemůžeme vysvětlit nízkou hladinu LPG u *Cyc. nassatus* po ošetření PYR.

V porovnání, druhy z rodu *cylicocyclus*, zejména *Cylicocyclus nassatus*, byly hojnější po ošetření MOX, než po ošetření PYR. To lze vysvětlit pouze přítomností červů, kteří se vyvíjeli rychleji z L4 na dospělé nebo citlivostí červů k MOX. Rychlejší tempo vývoje nebude závislé na použití anthelmintik, a proto by to samé bylo pozorováno po léčbě PYR. Avšak vyšší počet LPG (larvae per gram) u rodu *cylicocyclus* byl nalezen 42 dnů po ošetření MOX, než ve stejný den po ošetření PYR. To znamená, že zkrácení ERP (doba mezi léčbou a znovuobjevením vajíček ve výkalech) není způsobeno rychlejším vývojem druhů rodu *Cylicocyclus*. Navzdory tomu, že předběžné výsledky léčby byly na farmách 1 a 3 podobné, konečné výsledky byly vyšší na farmě 1. Nejnižší aktivita MOX byla na farmě 3, nejvyšší aktivita MOX, po ošetření MOX, byla na obou farmách podobná. Pokud by to bylo způsobeno rychlejším vývojem, to samé by se očekávalo po léčbě PYR. Nicméně, po léčbě PYR byly zjištěny na obou farmách u rodu *Cylicocyclus* podobné počty LPG. Proto se dospělo k závěru, že zkrácení ERP po ošetření MOX je, s největší pravděpodobností, způsobeno sníženou citlivostí na nezralé červy (zejména *Cylicocyclus*), a nikoliv rychlejším vývojem od nezralých po dospělé. Je nepravděpodobné, že by zde hrála roli zkřížená rezistence, protože druhy, které se vrátily brzy po léčbě MOX, byly odlišné od těch, které se vrátily brzy po léčbě PYR.

Skutečnost, že snížená citlivost a nezrychlený vývoj je nejpravděpodobnější příčinou zkrácení ERP (egg reappearance period), má s největší pravděpodobností také vliv na možnost zvrácení vývoje rezistence vůči MOX, či přesněji obnovení původní ERP. Je třeba očekávat, že v případě rychlejšího rozvoje budou jak pomalu, tak rychleji se vyvíjející nezralí červi zabiti MOX, protože v obou způsobech rozvoje budou mít na MOX podobnou citlivost. V případě snížené citlivosti larev k MOX zabíjí MOX převážně citlivé jedince. V době, kdy byl MOX poprvé uveden na trh, se většina larev stále vyvíjela 84. den po ošetření MOX, kdy se znovu objevila první vajíčka. V důsledku toho většina larev s pravidelnou pomalou rychlostí nebo s pravidelnou citlivostí nedosáhne dospělosti 84. den po MOX. To znamená, že léčba PYR, uvedená v 84. den po MOX, bude převážně zabíjet jedince s rychlejším



vývojem nebo sníženou citlivostí na MOX, odpovědné za zkrácení ERP. Z tohoto důvodu čistý výsledek (kombinovaný účinek MOX, následovaný PYR v 84. den) bude mít jen malý vliv na obnovu zkrácené ERP v případě snížené citlivosti na MOX, protože MOX zabije vnímavé jedince, zatímco PYR, podávaný 84 dnů poté, většinou zabije odolné jedince odpovědné za zkrácení ERP. Z tohoto důvodu je možné předpokládat, že poměr mezi citlivými a méně citlivými jedinci zůstává do značné míry stejný. V případě, že je zkrácení ERP způsobeno rychlejším vývojem, výsledkem by byl přirozený výběr jedinců s rychlejším vývojem, protože MOX zabije jak pomalu, tak rychle se rozvíjející jedince, zatímco PYR by převážně zabíjel rychle se rozvíjející červy. V důsledku toho by se poměr mezi pomalými a rychle rozvíjejícími se jedinci změnil ve prospěch rozvoje pomalejších jednotlivců. To znamená, že v tomto případě by mohlo být možné zvrátit zpět zkrácenou ERP na původní ERP s léčbou PYR, následovanou 84 dní po ošetření MOX, v porovnání se situací snížené citlivosti larev na MOX. V případě, že by nastala zkřížená rezistence mezi MOX a PYR, různé účinky v důsledku snížené citlivosti by byly ještě výraznější ve srovnání s rychlejším vývojem, protože v takovém případě by byl PYR méně schopný zabít jedince odolné na MOX.

Počet LPG (larvae per gram) ve 42. den po ošetření MOX byl na farmě s nejméně sníženou ERP (farma 3) nízký, zatímco LPG na farmě s nejsilnějším snížením ERP (farma 1) byl LPG vysoký. Mezi těmito dvěma farmami se rovněž lišilo i druhové složení; na farmě 3 byly pouze druhy rodu *Cylicocyclus* (hlavně *Cyc. nassatus*) nalezeny v kulturách po obou léčbách MOX, zatímco na farmě 1 byly hojné i další druhy rodu *Cylicocyclus*, stejně jako druhy z jiných rodů (*Cylicostephaus*, *Cyathostomum* a *Coronocyclus*). To naznačuje, že v počátečních fázích zkrácení ERP převládají druhy *Cylicocyclus*, nebo se zdají být prvním druhem, u kterého se projevuje menší náchylnost. V pozdějších fázích, kdy zkrácení ERP (egg reappearance period) pokročilo, se druhová skladba stává mnohem rozmanitější a jiné druhy se staly méně citlivé. Podobný vzor byl nalezen u studie van Doorn et al. (2014), Canever et al. (2013) a Traversa et al. (2009), kdy ve svých studiích prokázali znovuobjevení vajíček již za 14 dnů po ošetření ML. Pokud je známo, není hlášeno nic o druhovém složení těchto brzy vylučovaných vajíček.

### **Strongylus vulgaris**

*Strongylus vulgaris* byl historicky nejdůležitější parazitární hlísticí koní. Faecal egg counts (počty vajíček ve výkalech) neukazují přítomnost tohoto parazita konkrétně, jako to vykazují podobná vajíčka z jiných druhů koňských strongylidů. Konečné testování proto vyžaduje koprokulturu a vyšetření třetí larvární fáze L3, i když polymerázové řetězové reakce

a ELISA test (test na detekci protilátek a antigenu) byly vyvinuty pro výzkumné účely (Andersen et al., 2013). Při častějším testování koní na přítomnost parazita *Strongylus vulgaris* je třeba doporučit, že je důležité se ptát; co by bylo nejvhodnější terapeutickou léčbou, pokud jsou testy koní pozitivní? Všechny dostupné důkazy naznačují, že *Strongylus vulgaris* má dosud vyvinutou rezistenci na některé z aktuálně dostupných anthelmintik. Ve skutečnosti se jedná o hlavní vysvětlení, proč se tento parazit stal „vzácný“ ve většině řízených koňských populací. Tento citlivý vzor ukazuje, že jakékoliv registrované anthelmintikum by mohlo být použito k léčbě parazita, ale každé z nich má odpovídající vlastnost ke zvažení. Například pyrantelové sole, mají účinnost pouze proti střevním fázím hlístic, a tudíž nezabíjejí migrující larvy. Vzhledem k několika měsícům dlouhé migrační fázi *Strongylus vulgaris*, by bylo vhodnější použít anthelmintikum s larvicidními vlastnostmi, tj. makrocyccký lakton (ML). Hladiny účinnosti proti larvám *Strongylus vulgaris* v lebečních mezenterických tepnách byly považovány za podobné u ivermectinu i moxidectinu, ačkoliv jedna studie uváděla vyšší účinnost pro moxidectin (Costa et al., 1998). Nedávný průzkum naznačil, že v rané fázi pátého stádia, které je obsaženo v arteriálním lumenu, reagovalo špatně na léčbu ivermectinem, ačkoli byla pozorována dobrá účinnost oproti čtvrtému larválnímu stadiu (Nielsen et al., 2015). Fenbendazol byl také hlášen, že má dobrý účinek proti migraci larev *Strongylus vulgaris* na 10mg/kg, pokud je podáván alespoň po dobu 3 dnů (Slocombe et al., 1983), a pravděpodobně zůstane možnost larvicidní léčby tohoto parazita.

Veterináři si často kladou otázku, zda nežádoucí účinky mohou nastat při ošetřování koní, nesoucích velkou zátěž arteriálních larev. Jedna často vyjadřovaná obava je, zda léčba může vést k zvýšenému nebezpečí tromboembolie vzhledem k rozkladu mrtvých červů v arteriálním lumenu. Neexistují však žádné publikované studie na podporu této hypotézy. Naopak bylo popsáno, že arteriální larvy zůstávají životaschopné po dobu nejméně 14 dnů po léčbě ivermectinem, a že jsou nakonec zabity celulární imunitní reakcí hostitele, vyskytující se po dobu několika týdnů (Slocombe et al., 1987). Někteří lékaři se rozhodli doplnit protihlístovou léčbu kortikosteroidy a tím tlumit předpokládané zánětlivé reakce po léčbě. Nicméně neexistuje žádný vědecký důkaz pro podporu tohoto postupu. Ve skutečnosti je možné, že kortikosteroidy by mohly působit proti výše uvedené imunitní odpovědi hostitele, která zabíjí larvy.

### 3.3.2 Škrkavky u koní

Škrkavka koňská (*Parascaris equorum*) je škrkavka, které běžně infikuje hříbata a mladé koně. Přenos nastane, když jsou vajíčka, mající již embrya, ve výkalech infikovaných koní a citliví koňovití vajíčka pozřou. Jakmile jsou infekční vajíčka pozřena, v tenkém střevě se líhnou larvy, zavrtávají se do stěny střeva a podrobují se hepato-tracheální migraci (přes jaterní portál žilní krví do jater a plic) (Srihakim and Swerczek, 1978). Larvy opouštějí plicní sklípky, migrují do hltanu, jsou polknuty a vracejí se zpět do tenkého střeva, kde dospívají a množí se (Clayton a Duncan, 1979). Během migrace, mohou larvy způsobit patologické změny na játrech a plicích, spolu s respiračními příznaky (Srihakim and Swerczek, 1978). Velké parazitární obtíže tenkého střeva mohou vést ke ztrátě hmotnosti, depresi, střevní blokádě nebo k prasknutí střeva (Clayton, 1978). Líhnutí larev z vajíček *P. equorum* začíná až po 10-15 týdnů po počáteční nákaze (Lyons et al., 1976).

Pro identifikaci vajíček škrkavky koňské (*P. equorum*) ve výkalech mohou být koně diagnostikováni pomocí mikroskopu (kopromikroskopie). V poslední době ukázala potenciál pro diagnostiku zralých škrkavek v tenkém střevě také ultrasonografie (Nielsen et al., 2015). Nicméně diagnóza v prepatentním období není v současné době možná a kopromikroskopické metody neposkytují přesné zobrazení celkové parazitární zátěže v tenkém střevě (Nielsen et al., 2010). Proto je problematické využít stávající diagnostické metody pro vydávání léčebných doporučení nebo hodnocení účinnosti anthelmintik. Kromě toho se vyskytují obavy o odolnosti škrkavky koňské (*P. equorum*) vůči několika třídám anthelmintik (Matthews, 2014). Je stále důležitější rozšiřovat možnosti pro dohled, takže frekvence léčby může být snížena bez nepříznivých účinků na zdraví koní. Vývoj nových sérologických diagnostických nástrojů by mohl umožnit detekci během prepatentního období a poskytnout nové informace o imunitních reakcích hostitelů na tohoto parazita.

Exkrementně-sekrecní (ES) produkty, shromážděné z parazitů *in vitro*, byly použity při vývoji sérologických testů pro detekci infekce nebo migrujících larev „larvae migrans“ (larvy hlístic, migrující po těle hostitele) u škrkavky psí (*Toxocara canis*) (de Savigny et al., 1979), *Baylisascaris procyonis* (Boyce et al., 1988; Dangoudoubiyam and Kazacos, 2009), škrkavky prasečí (*Ascaris suum*) (Lind et al., 1993) a škrkavky dětské (*Ascaris lumbricoides*) (Chatterjee et al., 1996). Také byly vyvinuty sérologické testy pro hodnocení koňských IgG (T) - (protilátky proti alergenům) reakcí na somatické parazity nebo ES produkty. Diagnostický potenciál sérologických testů byl hodnocen s použitím antigenů z tasemnice koňské *Anoplocephala perfoliata* (Proudman and Trees, 1996), hlístic podčeledi

*Cyathostominae* (Dowdall et al., 2002), a *Strongylus vulgaris* (Andersen et al., 2013). Dříve byla přezkoumána séra ze dvou hříbat s infekcí *P. equorum* (Burk et al., 2014) a bylo zjištěno, že obsahují protilátky IgG (T), což naznačuje potenciál pro diagnostické použití.

Cílem studie Burk et al. (2016) bylo za 1. zkoumat IgG (T) rozpoznané protilátky larválních ES produktů *P. equorum* s použitím séra od infikovaných koní a za 2. testování séra z březích klisen a jejich hříbat od narození až do doby ubývání vajíček.

Burk (2016) udává, že; Jsou-li vajíčka parazita identifikována během vyšetření stolice, je aktuální diagnóza omezena na detekci patentových infekcí. Studie Burk et al. (2016) využívala ES produkty larev *P. equorum* ve western blot testu pro diagnózu prepatentní infekce *P. equorum* u koní. Jako kontrola byla ve studii použita séra od dospělých klisen, negativní na patentní infekci *P. equorum*, hříbata konzumující kolostrum a hříbata infikovaná *P. equorum*. Studijní vzorky zahrnovaly séra od 18 chovných klisen před porodem a séra od jejich hříbat v průběhu procesu přirozené infekce. Séra ze studie koní byla vyšetřena na IgG (T) protilátky, rozpoznávajících ES produkty. Hříbata přirozeně infikovaná *P. equorum* v IgG (T) měla protilátky proti 19 kDa, 22 kDa, 26 kDa a 34 kDa ES produktům. Bylo však prokázáno, že pasivní přenos kolostrálních protilátek z klisen zabraňuje použití hrubých larválních ES produktů na bázi western blot testu pro diagnózu prepatentní infekce *P. equorum* u hříbat.

Přestože nemají *P. equorum* patentní infekce, séra ze všech klisen, kromě jednoho, obsahovala IgG (T) protilátky, rozpoznávající ES produkty *P. equorum*. Podobně i v dalších studiích u Quarter horse byly zjištěny v séru protilátky proti *P. equorum* (Bello et al., 1974). Je pravděpodobné, že klisny sice požijí vajíčka *P. equorum*, ale jsou schopny imunitní odpovědi k odstranění parazitů před tím, než vajíčka uzrají.

Sérum hříběte před kojením neobsahovalo protilátky rozpoznávající ES produkty *P. equorum*. Vzhledem k epitelochoriální placentě koní (Jeffcott, 1972), je hříbě nejprve vystaveno prostřednictvím mleziva mateřským protilátkám (Jeffcott, 1972). Sérum všech hříbat po kojení obsahovalo IgG (T) protilátky, které rozpoznávají larvální ES produkty *P. equorum*, podobně jako mateřské kolostrum, což naznačuje pasivní přenos těchto protilátek z klisny na hříbě. Protože většina séra u týdenních hříbat obsahovala protilátky rozpoznávající ES produkty, mohou tyto mateřské protilátky přetrvávat u hříběte až do doby, než se hříbě nakazí škrkavkou *P. equorum*. V jiné studii, mateřské IgG (T) protilátky, specifické pro chřipky, přetrvávaly po dobu 12 týdnů, zatímco mateřské IgG (T) protilátky proti tetanu přetrvávaly po více než 26 týdnů (Wilson et al., 2001). Sérum klisny #1 prokázalo malé množství IgG (T) protilátek, rozpoznávajících ES produkty *P. equorum*. Western blot analýza

sér od jejího hříbete může představovat endogenní produkci protilátek proti ES produktům *P. equorum*. Sérum hříbete #1 zobrazovalo protilátky rozpoznávající ES produkty *P. equorum* okolo 8 týdnů věku (6 týdnů před patentní infekcí), a to zejména na ES produkt 19 kDa. Většina hříbat se stala negativní na ubývání vajíček *P. equorum* (alespoň dočasně), bez zjevných změn protilátek rozpoznávajících ES produkty.

Použití western blot testu k detekci prepatentní infekce se jeví jako omezené v důsledku pasivního přenosu látek, který rozpozná hrubé larvální ES produkty *P. equorum*. Nicméně měly by být zkoumány spíše možnosti alternativních testů, případně s využitím specifických ES molekul nebo detekcí antigenu než protilátky. Zjištění, popsané ve studii Burk et al. (2016), by mohlo také poskytnout základ pro nové otázky, týkající se imunity vůči *P. equorum*. Přenos IgG (T) z klisny na hříbě se neobjevuje při zabrání infekce; to znamená, že funkce tohoto izotypu imunoglobulinu proti *P. equorum* není jasná. Ačkoli mateřské protilátky nezabránilly infekci, stále ještě mohou mít ochranný účinek. U krys, experimentálně infikovaných parazitem *Taenia taeniaeformis*, mateřské protilátky proti *T. taeniaeformis*, redukuje zátěž tasemnicemi, následující pokusné infekci ve srovnání s kontrolami (Musoke et al., 1975). U hříbat, je úspěšný pasivní přenos IgG nezbytně nutný, protože porucha pasivního přenosu byla spojena s propuknutím infekčních chorob a v důsledku s úhynem hříbat (McGuire and Crawford, 1972). V některých případech může být přenos mateřských protilátek pro zdraví hříbete škodlivý. Bylo zjištěno, že přenos mateřských proti-tetanových protilátek IgGa, IgGb a IgG(T) inhibuje hříběcí endogenní produkci protilátek po vakcinaci (Wilson et al., 2001). Je třeba dalšího výzkumu k prozkoumání přetrvávání *P. equorum* protilátek u imunokompetentních koní, přetrvávání mateřských protilátek u hříbat a stanovit funkci (pokud existuje) IgG (T) protilátek, rozpoznávajících ES produkty.

### **Parascaris spp.**

Léčba anthelmintiky je s ohledem na fatální ucpání tenkého střeva rizikovým faktorem a je třeba definovat optimální klinický přístup pro hříbata s ultrasonografickými důkazy zátěže škrkavek *Parascaris* spp. Neexistují žádné publikované studie, které by hodnotily přímo bezprostřední i dlouhodobé důsledky odčervení hříbat s latentní zátěží velkých škrkavek, takže na tento problém není snadné odpovědět. Avšak některé informace mohou být zodpovězeny z literatury. Například 2 publikace, zahrnující celkem 34 klinických případů uvádějí, že většina ucpání škrkavkami souvisela s podáváním anthelmintik s „paralytickým“ způsobem účinku, tedy tokoferolu pamoate nebo ivermectinu (Cribb et al., 2006). Naopak benzimidazol (anthelmintikum) byl podáván pouze v jednom případě. Ačkoliv to může

odrážet pouze frekvenci antihelmintických tříd, které používají, jeden výklad je, že léčba benzimidazolem může být spojena s nižším rizikem ucpání (Austin et al., 1990). Existuje určitá logika pro tuto hypotézu, protože benzimidazol není schopen paralyzovat červy, spíše narušuje buněčný metabolismus. Tedy pokud benzimidazol způsobuje likvidaci červů pomaleji, následuje další postupné odstraňování červů a snižuje se riziko ucpání. Přestože to vypadá jako logické vysvětlení, je zapotřebí další výzkum k testování této hypotézy. Dalším důležitým faktorem jsou očekávané účinnosti dostupných anthelmintik. Populace škrkavek rezistentní na ivermectin se běžně uvádí v chovech koní po celém světě (Peregrine et al., 2014), zatímco odolnost vůči tokoferolu nebo benzimidazolu byla zjištěna jen v pár studiích (Peregrine et al., 2014). Avšak výskyt prevalence u *Parascaris* spp. nebyl dostatečně vyhodnocen; je tedy třeba provést celoregionální studie pro všechny tři hlavní skupiny léků a určit prevalenci rezistence u tohoto parazita.

Celkově vzato, relativně omezené dostupné důkazy naznačují, že benzimidazolové léčivo může být lékem pro hříbata, pokud existují důkazy nebo podezření na zátěž velkými škrkavkami. Literatura nenabízí doporučení ohledně dávkování nebo výběr benzimidazolu v příslušných lokalitách. Také nejsou žádné publikované důkazy, které naznačují, že lékaři by měli používat vyšší či nižší dávkování benzimidazolu, než je označené doporučení. Někteří veterináři volí k léčbě jako první dané anthelmintikum s poloviční dávkou a až o jeden týden později postupují s dávkou plnou. Nicméně potencionální důsledky takového přístupu nebyly zkoumány. 5ti-denní režim fenbendazolu, podávaný v dávce 10 mg/kg, se ukázal jako účinný při léčení migrujících larev ascarid v plicích, (Vandermyde et al., 1987), a také může nabídnout některé klinické výhody pro těžce vystavená hříbata. Někteří veterináři doporučují podávání minerálních olejů nasogastrickou sondou, s cílem usnadnit průchod mrtvým či umírajícím červům. Nicméně, není zde žádný vědecký důkaz pro klinické výhody tohoto postupu a procházení nasogastrickou sondou může být pro hříbě stresující. Také není známo, zda minerální oleje, obalující trávicí trakt absorbují a metabolizují anthelmintika, jak se očekávalo, nebo zda minerální olej může zasahovat přímo s anthelmintiky. Jistě se doporučuje, aby hříbata, která představují prokázanou zátěž velkými škrkavkami, byla prvních 24-28 hodin po léčbě pozorována.

### 3.4 Léčba

V dnešní době již existují důkazy o tom, že zkrácení ERP (doba mezi léčbou a znovuobjevením vajíček ve výkalech) je proces, ve kterém jsou rostoucí počty parazitárních hlístic stále méně náchylní k MOX a případně IVM, i když to ve studii Kooyman et al., (2016), nebylo plně prokázáno. Monitorování zkrácení ERP, jako časné znamení vzniku rezistence, může pomoci při hodnocení starých i nových léčebných postupů, aby bylo možné používat i nadále účinné ML.

Konvenční strategie pro kontrolu koňských helmintů zahrnují profylaktickou anthelmintickou léčbu, podávanou v pravidelných intervalech, nebo aplikovanou v taktických časech během roku (Robert et al., 2015). Nicméně v posledních letech byl kladen stále větší důraz na využití informací o typech přítomných parazitů, množství vylučování vajíček helmintů, a poté vyhodnotit účinnost léčby (Nielsen et al., 2013). V důsledku těchto doporučení bylo vyvinuto úsilí vyvíjet nové specifické diagnostické nástroje, které detekují přítomnost konkrétního druhu. Tuto problematiku řešily dva články v *Equine Veterinary Journal*, které se zaměřily na diagnostiku dvou důležitých koňských patogenů: *Parascaris* spp. (Nielsen et al., 2016) a *Strongylus vulgaris* (Nielsen et al., 2016). Pro oba parazity je zřejmá otázka: „Jaká je volba léčby při dané detekované parazitární infekci?“ Zatímco jsou zde nějaké vědecké informace jako odpovědi na tuto otázku, je zde skutečný nedostatek podpůrných důkazů, a často se léčba řeší na základě zkušeností z praxe. Zde jsou nabídnuty úvahy pro léčbu koně s 1) značnou zátěží *Parascaris* spp., diagnostikovanou pomocí ultrasonografie, nebo 2) infekcí *Strongylus vulgaris*, diagnostikovanou koprokulturou nebo sérologickým vyšetřením.

#### **Doporučení pro léčbu koní s parazity způsobující koliky**

Při řešení koliky je parazitární etiologie jen jednou z možných příčin, řešení je do značné míry závislé na klinické prezentaci. Typicky se terapeutická intervence zaměřuje na léčbu bolesti, normalizačních tekutin a zůstatků elektrolytů, zatímco se pokouší zjistit, zda je nutný chirurgický zákrok. Možné antimikrobní a antiparazitární zásahy však nejsou prioritou v nouzové situaci.

K některým případům zaklínění škrkavek v tenkém střevě lze přistupovat s lékařským ošetřením v případě, že případ nemá žaludeční reflux (proniknutí obsahu žaludku do jícnu), a je obecně zvládnutelný. V takovýchto situacích, anthelmintickou léčbu, možná s bemzimidazolem, lze považovat za zásadní součást léčebného plánu, spolu s vhodnými léky proti bolesti, spasmolytiky, terapií tekutin a pravidelným vyhodnocováním pro žaludeční

reflux. Chirurgická intervence je indukována v případech, kdy lékařská léčba nevyřeší ucpání. Zveřejněné důkazy naznačují, že chirurgický zákrok enterotomie (proříznutí střevní stěny) má špatnou prognózu (Cribb et al., 2006). Na rozdíl od toho nedávné retrospektivní studie uvádí přežití >1 rok u 60 % hříbat, ve kterém bylo ucpání řešeno ruční evakuací do slepého střeva, spíše než enterotomií (Tatz et al., 2012). S ohledem na tyto závěry lze konstatovat, že úspěch bude více záviset na zátěži červy v časovém rámci, než na rozhodování o intervenci a lokálním chirurgickým řešení.

Situace je zcela odlišná pro *S. vulgaris*, spojenými s případy koliky, protože ty obvykle zahrnují střevní ischémii a infarkt, což vede k zánětu pobřišnice (Nielsen et al., 2016). Zde rozsah poškození střevní tkáně a závažnost doprovázející zánět pobřišnice do značné míry určují prognózu. U antihelmintického zásahu je nepravděpodobné, že bude mít nějaký pozitivní vliv v tomto kontextu. Střevní infarkt může vyžadovat průzkumnou laparotomii a resekci postižené části střeva. Terapie anthelmintiky v podobě ivermectinu nebo moxidectinu by měla být zvážena, jakmile byl pacient úspěšně léčen a stabilizován.

Úvahy zde uvedené se týkají pouze léčby jednotlivých koní s diagnostikovanou *Parascaris* spp. nebo infekcí *S. vulgaris*. Je zřejmé, že kontrola těchto parazitů na úrovni stáda vyžaduje jinou taktiku, zejména integrované plány chovu, zahrnující diagnostické postupy, které se zaměřují na všechny potencionální parazitární druhy a osvědčených postupů pastevní praktiky.

Historicky se kontrola gastrointestinálních parazitů u koní spoléhala na pravidelnou léčbu anthelmintiky (Nielsen et al., 2014). Nicméně časté používání anthelmintik, v kombinaci s nevhodnou protiparazitární strategií a omezeným výběrem aktivních látek, má za následek zjištění anthelmintické rezistenci u koní a to u různých druhů parazitů (Reinemeyer, 2010). Bylo doporučeno snížit závislost na anthelmintikách a v důsledku toho snížit rezistenci parazitů na anthelmintika (Nielsen et al., 2014; Kaplan et al., 2014). Nicméně zavádění této nové strategie je pomalé, pravidelné odčervování a v dostihovém sportu je stále ještě široce rozšířené (Robert et al., 2015).

Nový Zéland je jednou z mála zemí, kde se plnokrevníci i teplokrevníci, chovají pro závodění. Předchozí studie postupů kontroly parazitů v komerčních hřebčíněch na Novém Zélandu zjistila závislost na anthelmintických produktech a několik postupů, které by oddálily rozvoj rezistence parazitů na anthelmintika v chovu jak plnokrevných, tak teplokrevných hřebců (Bolwell et al., 2015). Zatímco je většina koní na Novém Zélandu chována na pastvině, plnokrevní a teplokrevní dostihoví koně tvoří unikátní populaci tím, že jsou chováni intenzivně (Williamson et al., 2007), čímž se omezí vystavení parazitům



na pastvinách. Studie identifikovala časté používání anthelmintik bez známek zatížení parazity v chovných zařízeních pro plnokrevníky ve Spojeném království (Comer et al., 2006). Do současnosti nebyly provedeny u plnokrevných koní na Novém Zélandu podobné studie, ani žádné studie zkoumaných praktik u teplokrevných dostihových koní. V rámci účinného provádění dohledu, na základě kontrolních strategií, je nutné pochopit současné postupy při kontrolách parazitů, používané v závodním průmyslu, a identifikovat faktory, které jsou potencionálními inhibitory v zavádění nové strategie. Rezistence na ivermectin byla nedávno identifikována na Novém Zélandu u *Parascaris equorum* (Bishop et al., 2014). Různé druhy cyathostom jsou stále považovány za citlivé k ivermectinu, ale pravděpodobně je v této skupině rozšířena rezistence vůči benzimidazolu (Scott et al., 2015). O odolnosti vůči pyrantelu v této zemi nebyly žádné zprávy. Cílem studie Rosanowski et al., (2016) bylo popsat aktuální kontrolu parazitů a kontrolní postupy používané pro plnokrevné a teplokrevné dostihové koně na Novém Zélandu. Pokud jde o rezistenci parazitů na anthelmintika, je zde rostoucí zájem po celém světě. Základním cílem je zlepšit postupy kontroly parazitů a snížit spektrum rezistentních parazitů.

Trenéři plnokrevných a teplokrevných koní byli dotazováni on-line, v oblasti demografie, metod antiparazitární strategie, řízení pastvy a karantény a použití „fecal egg count“ = počet vajíček ve výkalech (FEC), s dotazy rozdělenými podle typu koně, tj. dostihoví koně v tréninku, dostihoví koně na přestávce od tréninku a závodní plnokrevníci a teplokrevníci. Pro zkoumání vztahů s využití FEC byla využita multivariabilní logistická regrese. Celkem 234 respondentů průzkum dokončilo (míra reakcí 16%). 50,5% z trenérů léčilo koně ve strategickém léčebném intervalu, používaném průměrně 6krát ročně (mezikvartilové rozpětí (IQR 4-7) a 6 (IQR 4-8) pro příslušné plnokrevné a teplokrevné dostihové koně. Celkem 62,5 % (130/208) respondentů uvedlo, že hledají veterinárního lékaře pro odčervení a FEC bylo provedeno u 20,1 % (39/194) respondentů. Šance, že trenér provede FEC, byla 4krát vyšší, pokud trenér provedl konzultaci s veterinářem, ve srovnání s těmi, kteří nekonzultovali. Studie Rosanowski et al. (2016) zdůraznila nadužívání anthelminticích výrobků v celém odvětví s tím, že jen několik trenérů používalo dozor na bázi kontrolních strategií. Vztahy mezi veterináři a trenéry by měly být prohloubeny a dále posilováno šíření informací a prosazování účinné kontrolní strategie k udržení zdraví koně a snížení anthelminticích rezistencí.

Studie Rosanowski et al. (2016) dále poskytla základní údaje o postupech při kontrole parazitů, používaných trenéry dostihových koní na Novém Zélandu a zjistila závislost na protihlistových výrobcích, a to navzdory omezeným důkazům o parazitismu u těchto koní

nebo příležitosti pro zamoření v důsledku omezeného přístupu na pastvu pro koně v aktivním výcviku. Dozor na bázi kontrolních strategií je nyní považován za nejlepší způsob, jak kontrolovat parazity u koní a zpomalovat rozvoj anthelmintické rezistence (Gomez et al., 1991). Nicméně zjištění aktuální studie vedle časté léčby koní v komerčních hřebčínách (Bolwell et al., 2015) svědčí o systémovém selhání v šíření nebo zavádění dozoru na bázi kontrolních strategií.

Polovina z trenérů plnokrevníků a teplokrevníků využívá pro koně režim s přestávkami. Spoléhání se na strategie s přestávkami je v souladu s předchozími studiemi plnokrevníků a teplokrevníků na Novém Zélandu (Scott et al., 2015). Stejně tak průměrný počet ošetřených koní byl každoročně srovnatelný s počtem ošetření v hřebčínách. Dostihoví koně byli léčeni tak často jako ročci, až 15krát ročně (Bolwell et al., 2015). Po celém světě je léčba plnokrevníků ve stanovených intervalech a s vysokou frekvencí samozřejmostí v tréninkových zařízeních (Comer et al., 2006) a hřebčínách (Robert et al., 2015). Nicméně problémem je systematické nadužívání anthelmintických produktů, vyskytujících se v celém odvětví, a budoucí důsledky těchto praktik.

Makrocyclické laktony (ML) byly nejběžněji používanou skupinou anthelmintik, používaných respondenty v aktuální studii, s nejčastěji využívaným abamektinem a ivermektinem. Toto je v souladu s předchozími studiemi (Stratford et al., 2014). Protože je nejasné jaké faktory ovlivňují trenéry při volbě anthelmintik – dostupnost produktu, ekonomika, úroveň znalostí o anthelmintické rezistenci – vzrůstají obavy z jejich volby s ohledem na rezistenci vůči anthelmintikům ze skupiny makrocyclických laktonů. Objevují se zprávy o rezistenci makrocyclických laktonů ve studiích, uvádějících zkrácení období znovuoobjevení vajíček po léčbě koní touto skupinou anthelmintik (Relf et al., 2014), spíše než snížené účinnosti ihned po ošetření v testech snižování FEC (Relf et al., 2014). V souladu s předchozími studiemi z Nového Zélandu (Bolwell et al., 2015), 13 % trenérů uvádí použití anthelmintik bez licence, včetně levamisolu a doramektinu. Časně podání je relativně bezpečné pro použití u koní (DiPietro et al., 1987), a pozdější účinnost při podání ve formě injektovaného roztoku není známa (Pérez et al., 2010). V aktuální studii uvádí aplikaci koním pomocí injekčních produktů bez licence 40 trenérů na Novém Zélandu. Podobně ivermectin pour-on produkty také nejsou licencované pro použití u koní.

Ve studii Rosanowski et al. (2016) měli dostihoví koně omezený nebo žádný přístup k trávě, ve srovnání s koňmi na přestávce od tréninku, kteří byli na pastvě celou dobu. Ve studii chovatelských stájích ve Velké Británii nemělo 7 % koní na pastvu žádný přístup (Hilyer et al., 2001), zatímco v předchozích studiích na Novém Zélandu mělo přístup na

pastvu 50% dostihových koní (Williamson et al., 2007). Alespoň jednou za čtrnáct dní jedna třetina chovatelů odstraňovala trus z výběhů a 15 % koní výběhy střídalo. Hilyer et al. (2011) uváděl pravidelné střídání výběhů u 25 % chovatelů. Odstraňování výkalů bylo hlášeno ve Velké Británii a pravidelně je praktikuje 12 % trenérů (Hylier et al., 2001) alespoň jednou týdně 44% trenérů (Comer et al., 2006) a z toho 51% trenérů uvádí kontaminaci (Earle et al., 2002). Odstraňování výkalů, střídání výběhů a využití křížové pastvy může sloužit ke snížení infekčnosti pastvin a tím v konečném důsledku ke zpomalení rozvoje anthelmintické rezistence. Nicméně tyto postupy by mohly být také vnímány jako značná omezení potenciálu pro refugia na pastvině. (Van Wyk, 2001). Nedostatek refugií na pastvě, v kombinaci s častým pohybem dostihových koní (Bolwell et al., 2010; Rosanowski et al., 2013; Perkins et al., 2005) a nedůsledné používání odčervovacích postupů aplikovaných na koně, kteří přijedou do hřebčínů (Rosanowski et al., 2013) naznačují, že jakmile se na anthelmintikum vyvíjí rezistence, rezistentní paraziti by pravděpodobně mohli být rozšířeni po celé závodní populaci.

Rychlost odezvy ve studii Rosanowski et al. (2016) je srovnatelná s předchozími studiiemi v dostihovém sportu (Bolwell et al., 2015; Bolwell et al., 2013) a tato skupina respondentů předtím uvedla, že dávají přednost e-mailu nebo osobnímu kontaktu (Bolwell et al., 2013). Rozdělení respondentů podle věku, zkušeností a geografické rozdělení je reprezentativní pro základní populace trenérů plnokrevníků a teplotokrevníků (Rosanowski et al., 2015). Ačkoliv Rosanowskiho studie zjistila, že praktiky jsou relativně stejné mezi odvětvími a mezi chovnými a vzdělávacími zařízeními (Bolwell et al., 2015), je třeba dbát při interpretaci na zobecnitelnost těchto výsledků a další práce by měly být prováděny také v této oblasti.

Za účelem provedení změn ve stávajících postupech při kontrolách parazitů, při dozoru na bázi kontrolních strategií, budou trenéři požadovat důkazy o finančním přínosu a efektivitě. Lester et al. (2016) odhaduje, že dohled, založený na kontrolních strategiích léčby ivermectinem nebo pyrantelem v návaznosti na FEC (fecal egg count) po >200 vajíček na gram, by byl finančně výhodnější ve srovnání s intervalovou strategií, založenou na čtvrtletním ošetření buď moxidectinem (2 ošetření) nebo moxidectinem a praziquantelem. Přídavné náklady na zjišťování FEC (fecal egg count) byly kompenzovány nižší frekvencí léčby anthelmintiky a léčby s levnějšími produkty. Zatímco pouze 5 % trenérů využívalo FEC v rámci cílené kontrolní strategie, 20 % trenérů využívalo FEC v rámci svého výcvikového zařízení. Proto existuje prostor pro zvýšení využívání FEC kontroly parazitů.

Na rozdíl od některých evropských zemí, kde je prodej anthelmintik pro koně omezen a většina majitelů koní nakupuje anthelmintika u veterinářů (Nielsen et al., 2014), nákup a používání anthelmintik na Novém Zélandu omezeno není. Tato studie ilustruje mezery ve znalostech o kontrole parazitů a není jasné, které metody a zdroje používají trenéři k informování o použití anthelmintik nebo o anthelmintické rezistenci a zda a jak trenéři jednají na základě těchto informací. Nicméně, trenéři dostihových koní, kteří hledali veterinární poradenství ve vztahu k anthelmintickým produktům, častěji prováděli FEC (fecal egg count), v porovnání se stájeri, které radu veterináře nevyhledávaly. Zjištění, že trenéři přijímají postupy, které by snížily závislost na anthelmintikách a že hledají veterinární poradenství, naznačuje, že veterináři mohou mít pozitivní vliv na postupy při kontrolách parazitů a mohou mít v současné době nevyužitou roli, pokud jde o komunikaci osvědčených postupů při kontrole parazitů. Vztah veterinář – trenér vyžaduje další zkoumání s cílem zajistit efektivní šíření současných i budoucích poznatků.

Parazitické hlístice jsou stále častěji předmětem zájmu pro chovatele hospodářských zvířat jak z hlediska dobrých životních podmínek zvířat, tak ekonomických nákladů. Obecně vedlo dřívější podávání anthelmintik k vysokým úrovním rezistence parazitů na léky u většiny druhů hospodářských zvířat (Kaplan and Vidyashankar, 2012). Ačkoliv není nedoporučováno, obecné podávání léků pokračovalo a pravděpodobně v některých podnicích, navzdory doporučení, zdůrazňující význam individuálních anthelmintických režimů, pokračovat stále bude (Wilson et al., 2015). V rámci těchto režimů u vysoce namáhaných jedinců, nesoucích v sobě rezistentní parazity, je lze identifikovat pomocí faecal egg count technigues (FEC = technika zjišťování počtu vajíček ve výkalech) a následně selektivně ošetřit (Wilson et al., 2015).

McMaster FEC technika je nejvíce běžně používaná metoda k určení odolnosti a vylučování vajíček hlístic (Seivwright et al., 2004). Nicméně aby se minimalizovalo riziko líhnutí vajíček, které vede k nedostatečným reprezentativním počtům (může k tomu přispět i destrukce vajíček), musí být vzorky analyzovány brzy po odběru. Toto omezení vede k používání různých metod skladování, ale přesto je účinek těchto různých metod na obnovu vajíček zpochybněn (Jagla et al., 2013). Doporučuje se druhově specifické posouzení účinků skladování k vysvětlení rozdílů ve výsledcích. Ačkoli je mrazení exkrementů běžnou metodou skladování pro pozdější analýzu počtu vajíček hlístic, časová doporučení se liší od tří do padesáti dnů (Rinaldi et al., 2011). Jako dvojí možnosti se k chlazení mohou použít fixační roztoky, ethanol nebo formalin, které mohou být také vhodné pro dlouhodobější skladování (Baines et al., 2015). Těch několik málo studií, testujících fixační roztoky však naznačují, že

ethanol i formalin mohou být pro udržení počtu vajíček nevhodné (Baines et al., 2015). Ačkoli ve veterinární parazitologii je to neobvyklé, studie na lidech a některých divokých zvířatech nadále používají fixační roztoky na ukládání vzorků bez zohlednění redukce vajíček (Garg et al., 2005).

Crawley et al. (2016) ve své studii zkoumali účinnost skladovacích technik pro udržení počtu vajíček hlístic u nepřežvýkavého býložravého hostitele - domestikovaného koně (*Equus ferus caballus*). Testovali účinek (a) koncentrace fixačních roztoků ethanolu a formalinu po dvou až čtyřech týdnech skladování, (b) chlazení (3-5 °C) v průběhu dvou týdnů.

Crawley et al. (2016) zjistili výrazný pokles počtu vajíček v trusu (FEC) po dvou týdnech uskladnění ve vysokých i nízkých koncentracích obou fixativních roztoků, který se však po 4 týdnech opět stabilizoval. Tento vzor byl rovnoměrně opakován. Po týdnu chlazení zůstal FEC relativně stabilní, ale klesal, pokud chlazení překročilo 8 dní. Autoři před FEC analýzou doporučují chladit vzorek ne více než jeden týden. Skladování v každém fixačním roztoku je optimální pro uchování vajíček hlístic, i rovnoměrnost poklesu napříč vzorky mohla obsahovat potenciál pro projektivní výpočet ubývání vajíček parazitů, když je doba skladování účinně kontrolována. Výsledkem studie Crawley et al. (2016) je, že pro vzorky koňských výkalů je chlazení přijatelné pro krátkodobé skladování, ale dlouhodobé chlazení ve fixačním roztoku neudrží počet vajíček. Chlazení vzorků výkalů se často používá pro udržení FEC (počet vajíček ve výkalech) pro pozdější analýzu, ačkoli dříve nebylo zjišťováno, v jakém okamžiku přesnost odhadu počtu vajíček klesá. Bylo zjištěno, že počet vajíček zůstává konzistentní po dobu až pěti dnů po chlazení (Nielsen et al., 2010). V dlouhodobějších metodických studiích byly vzorky testovány spíše jednou týdně, než denně (Seivwright et al., 2004). Když Crawley et al. (2016) testovali vzorky denně po dobu čtrnácti dnů, nenalezli v prvním týdnu žádný pokles. Pokles počtu vajíček byl velký osmý den od začátku skladování. Jejich výsledky podporují doporučení Nielsen et al. (2010), že vzorky s vajíčky mohou být uložena v chladničce po dobu nejméně jednoho týdne bez významného poklesu jejich detekovatelnosti. Vzorky byly skladovány při teplotách 3 a 5 °C, pod minimální teplotou líhnutí (6 °C), a zároveň nad bodem mrazu, u kterého je známo, že snižuje detekovatelnost vajíček (Jagla et al., 2013). Pokles je tedy s největší pravděpodobností důsledkem biologické degradace (Nielsen et al., 2010).

Pro dlouhodobější uchování a zachování vajíček jsou fixativní roztoky používány velmi často. Nicméně po skladování při nízkých koncentracích fixačních roztoků (40% ethanol, 4% formalin) bylo hlášeno snižování počtu vajíček (Jagla et al., 2013). Stupeň

působení vyšších koncentrací je známý méně. Crawley et al. (2016) zjistili, že ani vyšší koncentrace buď ethanolu nebo formalinu není schopna uchovat FEC po dobu dvou týdnů. Po počátečním poklesu nedošlo k dalšímu výraznému poklesu dva až čtyři týdny. To naznačuje, že pokles počtu vajíček ovlivňuje spíše ukládání do fixačního roztoku, než doba skladování, ale není jasné, co by mohlo takové účinky způsobit. Skladování ve fixačním prostředí může mít za následek potopení vajíček ve flotačním roztoku, což by mohlo snížit počty vajíček (Baines et al., 2015). Ale do jaké míry ovlivňuje potopení vzorku, není známé. Bylo by to zajímavé pro budoucí studie, které by porovnály ošetřené vzorky v časovém bodě 0 a posoudily by vliv okamžitého uložení do fixačního roztoku. Pokles detekovatelnosti – bez ohledu na příčinu – naznačuje, že skladování ve formalinu nebo ethanolu není pro přesné posouzení zátěže parazity pomocí flotace příznivé. Fixace může být ještě užitečná i pro jiné techniky počítání vajíček. Protože ve studii Crawley et al. (2016) není přesně známo, zda tyto poklesy jsou potenciálně způsobené fixací vyvolanými změnami ve schopnosti flotace vajíček, spíše než ztrátou vajíček. Kromě toho, ve všech čtyřech skladováních byl pokles vajíček hlístic rovnoměrný napříč různými vzorky, což naznačuje, že to může být možné vysvětlení poklesu počtu vajíček pro výpočet úrovně ubývání vajíček. K tomu je však zapotřebí další výzkum. V důsledku odhadovaného předpokládaného poklesu počtu vajíček nemohou být tyto výpočty použity pro odhad prevalence; původní nízké počty mohou po skladování klesnout na nulu. Výpočty však mohou být použity pro odhad intenzity infekce do té míry, aby relativní infekce mezi jednotlivci zůstala konstantní; vysoce infikovaní jedinci by měli mít po skladování vyšší počty, než méně infikovaní.

## 4 Závěr

Chovatelé koní se snaží zajistit svým koním co nejlepší péči. Základem toho je zajištění dobrého zdravotního stavu. Jak bylo uvedeno, parazitární onemocnění patří k nejčastějším příčinám nemocí koní, zároveň jsou často obtížně detekovatelná a diagnostikovatelná. Jejich prevence a léčba jsou navíc provozně a finančně náročné. Velkým problémem je často i nízká úroveň znalostí chovatelů a jejich informovanost o problematice parazitóz. Nevhodné, nadbytečné a časté užívání antiparazitik vedlo k získání a posílení rezistence parazitů vůči lékům. Nové diagnostické metody by mohly přispět k sofistikovanějším metodám řízení a kontroly parazitů v chovech koní i jiných hospodářských a PET zvířat.

Práce popisující nové metody a jejich aplikaci v pokusech a praxi, jsou i ve světě, zatím, ojedinělé. Prvními respondenty byli zejména větší chovatelé koní, a to jak koní sportovních, tak koní určených k produkci masa. I u těchto chovatelů však převažovala kontrola parazitů, spočívající na plošném léčení při výskytu parazitů nebo jejich vývojových stádií, nebo i na podávání léčiv periodicky bez konkrétní detekce. Pro výraznější progres bude nutné nejen pokračovat v získávání dalších poznatků, v klinické praxi, ale i v osvětové práci s chovateli a v prohlubování spolupráce vědců, veterinárních lékařů a chovatelů. Pro přesvědčení chovatelů by bylo vhodné zároveň pracovat na ekonomickém zhodnocení přínosu nových diagnostických metod.

## 5 Seznam použité literatury

Abd-Elnaeim, M. M. M., Leiser, R., Wilsher, S., Allen, W. R. 2006. Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. *Placenta*. 27 (11). 1103-1113.

Antonello, A. M., Cadore, G. C., Pivoto, F. L., Camillo, G., Braunig, P., Sangioni, L. A., Vogel, F. S. F. 2016. Intra-uterine exposure of horses to *Sarcocystis* spp. antigens. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 68(2). 271-275.

Andersen, U. V., Howe, D. K., Olsen, S. N., Nielsen, M. K. 2013. Recent advances in diagnosing pathogenic equine gastrointestinal helminths: the challenge of prepatent detection. *Veterinary parasitology*. 192(1). 1-9.

Austin, S. M., Foreman, J. H., Todd, K. S., DiPietro, J. A., Baker, G. J. 1990. *Parascaris equorum* infections in horses. *Compendium on Continuing Education for the practicing veterinarian*. 12(8). 1110-1119.

Bain, S. A., Kelly, J. D. 1977. Prevalence and pathogenicity of *Anoplocephala perfoliata* in a horse population in South Auckland. *New Zealand veterinary journal*. 25(1-2). 27-28.

Baines, L., Morgan, E. R., Ofthile, M., Evans, K. 2015. Occurrence and seasonality of internal parasite infection in elephants, *Loxodonta africana*, in the Okavango Delta, Botswana. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 4(1). 43-48.

Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., Walker, S. 2014. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *arXiv preprint arXiv:1406.5823*.

Benton, R. E., Lyons, E. T. 1994. Survey in central Kentucky for prevalence of *Anoplocephala perfoliata* in horses at necropsy in 1992. *Veterinary parasitology*. 55(1-2). 81-86.



Boersema, J. H., Borgsteede, F. H. M., Eysker, M., Elema, T. E., Gaasenbeek, C. P. H., & Van der Burg, W. P. J. (1991). The prevalence of anthelmintic resistance of horse strongyles in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, 13(4), 209-217.

Borgsteede, F. H. M., Boersma, J. H., Gaasenbeek, C. P. H., Van Der Burg, W. P. J. 1993. The reappearance of eggs in faeces of horses after treatment with ivermectin. *Veterinary Quarterly*. 15(1). 24-26.

Borgsteede, F. H. M., Van Beek, G. 1998. Parasites of stomach and small intestine of 70 horses slaughtered in The Netherlands. *Veterinary quarterly* 20(1) 31-34.

Bucknell, D. G., Gasser, R. B., Beveridge, I. 1995. The prevalence and epidemiology of gastrointestinal parasites of horses in Victoria, Australia. *International Journal for Parasitology*. 25(6). 711-724.

Burk, S. V., Dangoudoubiyam, S., Brewster-Barnes, T., Howe, D. K., Carter, C. N., Bryant, U. K., Rossano, M. G. 2016. Equine antibody response to larval *Parascaris equorum* excretory-secretory products. *Veterinary Parasitology*. 226. 83-87.

Chapman, M. R., French, D. D., Klei, T. R. 2002. Gastrointestinal helminths of ponies in Louisiana: a comparison of species currently prevalent with those present 20 years ago. *Journal of Parasitology*. 88(6). 1130-1134.

Chapman, M. R., French, D. D., Klei, T. R. 2002. Gastrointestinal helminths of ponies in Louisiana: a comparison of species currently prevalent with those present 20 years ago. *Journal of Parasitology*. 88(6). 1130-1134.

Chapman, M. R., French, D. D., Klei, T. R. 2003. Prevalence of strongyle nematodes in naturally infected ponies of different ages and during different seasons of the year in Louisiana. *Journal of Parasitology*. 89(2). 309-314.

Chapman, M. R., French, D. D., Taylor, H. W., Klei, T. R. 2002. One season of pasture exposure fails to induce a protective resistance to cyathostomes but increases numbers of hypobiotic third-stage larvae. *Journal of Parasitology*. 88(4). 678-683.

- Chapman, M. R., Kearney, M. T., Klei, T. R. 1999. An experimental evaluation of methods used to enumerate mucosal cyathostome larvae in ponies. *Veterinary parasitology*. 86(3). 191-202.
- Crawley, J. A., Chapman, S. N., Lummaa, V., Lynsdale, C. L. 2016. Testing storage methods of faecal samples for subsequent measurement of helminth egg numbers in the domestic horse. *Veterinary parasitology*. 221. 130-133.
- Christensen, R. H. B. 2012. Ordinal regression models for ordinal data (2010). R package version 2011.09-14.
- Coles, G. C., Bauer, C., Borgsteede, F. H. M., Geerts, S., Klei, T. R., Taylor, M. A., Waller, P. J. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary parasitology*. 44(1-2). 35-44.
- Collobert-Laugier, C., Hoste, H., Sevin, C., Dorchies, P. 2002. Prevalence, abundance and site distribution of equine small strongyles in Normandy, France. *Veterinary parasitology*. 110(1). 77-83.
- Collobert-Laugier, C., Hoste, H., Sevin, C., Chartier, C., Dorchies, P. 2002. Mast cell and eosinophil mucosal responses in the large intestine of horses naturally infected with cyathostomes. *Veterinary parasitology*. 107(3). 251-264.
- Cook, A. G., Buechner-Maxwell, V., Morrow, J. K., Ward, D. L., Parker, N. A., Dascanio, J. J., Ley, W. B., Cooper, W. 2001. Interpretation of the detection of *Sarcocystis neurona* antibodies in the serum of young horses. *Veterinary Parasitology*. 95 (2). 187-195.
- Costa, A. J., Barbosa, O. F., Moraes, F. R., Acuña, A. H., Rocha, U. F., Soares, V. E. Sanches, A. 1998. Comparative efficacy evaluation of moxidectin gel and ivermectin paste against internal parasites of equines in Brazil. *Veterinary parasitology*. 80(1). 29-36.

- Cribb, N. C., Cote, N. M., Bouré, L. P., Peregrine, A. S. 2006. Acute small intestinal obstruction associated with *Parascaris equorum* infection in young horses: 25 cases (1985–2004). *New Zealand veterinary journal*. 54(6). 338-343.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., Scala, A. 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary parasitology*. 123(1). 121-131.
- Demeulenaere, D., Vercruyse, J., Dorny, P., Claerebout, E. 1997. Comparative studies of ivermectin and moxidectin in the control of naturally acquired cyathostome infections in horses. *The Veterinary Record*. 141(15). 383-386.
- Denegri, G. M. 1993. Review of oribatid mites as intermediate hosts of tapeworms of the Anoplocephalidae. *Experimental and Applied Acarology*. 17(8). 567-580.
- DiPietro, J. A., Hutchens, D. E., Lock, T. F., Walker, K., Paul, A. J., Shipley, C., Rulli, D. 1997. Clinical trial of moxidectin oral gel in horses. *Veterinary parasitology*. 72(2). 167-177.
- Dobranić, V., Večkovec, A., Kadivc, M., Njari, B. 2008. HORSEMEAT AND HIPPOPHAGIA. *Meso*. 10(4).
- Duarte, P. C., Daft, B. M., Conrad, P. A., Packham, A. E., Gardner, I. A. 2003. Comparison of a serum indirect fluorescent antibody test with two Western blot tests for the diagnosis of equine protozoal myeloencephalitis. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 15 (1). 8-13.
- Dubey, J. P., Lindsay, D. S., Saville, W. J. A., Reed, S. M., Granstrom, D. E., Speer, C. A. 2001. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). *Veterinary parasitology*. 95 (2). 89-131.
- East, M. L., Otto, E., Helms, J., Thierer, D., Cable, J., Hofer, H. 2015. Does lactation lead to resource allocation trade-offs in the spotted hyaena?. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 69(5). 805-814.

- Eysker, M., Boersema, J. H., Kooyman, F. N. J. 1989. Emergence from inhibited development of cyathostome larvae in ponies following failure to remove them by repeated treatments with benzimidazole compounds. *Veterinary parasitology*. 34(1-2). 87-93.
- Eysker, M., Klei, T. R. (1999). Mucosal larval recovery techniques of cyathostomes: can they be standardized?. *Veterinary parasitology*. 85(2). 137-149.
- Fenger, C. K., Granstrom, D. E., Langemeier, J. L., Stamper, S., Donahue, J. M., Patterson, J. S., Gajadhar, A. A., Marteniuk, J. V., Xiaomin, Z., Dubey, J. P. 1995. Identification of opossums (*Didelphis virginiana*) as the putative definitive host of *Sarcocystis neurona*. *The Journal of parasitology*. 81 (6). 916-919.
- Foreyt, W. J. 1986. Recovery of nematode eggs and larvae in deer: evaluation of fecal preservation methods. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 189(9), 1065-1067.
- French, D. D., Chapman, M. R., Klei, T. R. 1994. Effects of treatment with ivermectin for five years on the prevalence of *Anoplocephala perfoliata* in three Louisiana pony herds. *Veterinary record*. 135(3). 63-65.
- Garg, P. K., Perry, S., Dorn, M., Hardcastle, L., Parsonnet, J. 2005. Risk of intestinal helminth and protozoan infection in a refugee population. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 73(2). 386-391.
- Gawor, J. J. 1995. The prevalence and abundance of internal parasites in working horses autopsied in Poland. *Veterinary Parasitology*. 58(1). 99-108.
- Geering, R. R., Johnson, P. J. 1990. Equine tapeworms more prevalent. *Veterinary Record*. 127(4).
- Gibson, T. E. 1953. The effect of repeated anthelmintic treatment with phenothiazine on the faecal egg counts of housed horses, with some observations on the life cycle of *Trichonema* spp. in the horse. *Journal of Helminthology*. 27(1-2). 29-40.

Gillespie, T. R. 2006. Noninvasive assessment of gastrointestinal parasite infections in free-ranging primates. *International Journal of Primatology*. 27(4). 1129.

Granstrom, D. E., Dubey, J. P., Davis, S. W., Fayer, R., Fox, J. C., Poonacha, K. B., Giles, R. C., Comer, P. F. 1993. Equine protozoal myeloencephalitis: antigen analysis of cultured *Sarcocystis neurona* merozoites. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 5 (1). 88-90.

Gray, L. C., Magdesian, K. G., Sturges, B. K., Madigan, J. E. 2001. Suspected protozoal myeloencephalitis in a two-month-old colt. *The Veterinary Record*. 149 (9). 269-273.

Hing, S., Othman, N., Nathan, S. K., Fox, M., Fisher, M., Goossens, B. 2013. First parasitological survey of Endangered Bornean elephants *Elephas maximus borneensis*. *Endangered Species Research*. 21(3). 223-230.

Hinney, B., Wirtherle, N. C., Kyule, M., Miethe, N., Zessin, K. H., Clausen, P. H. 2011. Prevalence of helminths in horses in the state of Brandenburg, Germany. *Parasitology research*. 108(5). 1083.

Hoane, J. S., Gennari, S. M., Dubey, J. P., Ribeiro, M. G., Borges, A. S., Yai, L. E., Aguiar, D. M., Cavalcante, G. T., Bonesi, G. L., Howe, D. K. 2006. Prevalence of *Sarcocystis neurona* and *Neospora* spp. infection in horses from Brazil based on presence of serum antibodies to parasite surface antigen. *Veterinary Parasitology*. 136 (2). 155-159.

Jagła, E., Śpiewak, J., Zaleśny, G., Popiołek, M. 2013. Effect of storage and preservation of horse faecal samples on the detectability and viability of strongylid nematode eggs and larvae. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 57(2). 161-165.

Jeffcott, L. B. 1975. The transfer of passive immunity to the foal and its relation to immune status after birth. *J Reprod Fertil Suppl*. 23. 727-733.

Kaplan, R. M., Nielsen, M. K. 2010. An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60s anymore. *Equine Veterinary Education*. 22(6). 306-316.

- Kaplan, R. M., Vidyashankar, A. N. 2012. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary parasitology*. 186(1). 70-78.
- Kjaer, L. N., Lungholt, M. M., Nielsen, M. K., Olsen, S. N., Maddox-Hyttel, C. 2007. Interpretation of serum antibody response to *Anoplocephala perfoliata* in relation to parasite burden and faecal egg count. *Equine veterinary journal*. 39(6). 529-533.
- Klei, T. R., Chapman, M. R. 1999. Immunity in equine cyathostome infections. *Veterinary Parasitology* 85(2) 123-136.
- Kooyman, F. N. J., van Doorn, D. C. K., Geurden, T., Mughini-Gras, L., Ploeger, H. W., Wagenaar, J. A. 2016. Species composition of larvae cultured after anthelmintic treatment indicates reduced moxidectin susceptibility of immature *Cylicocyclus* species in horses. *Veterinary parasitology*. 227. 77-84.
- Kooyman, F. N. J., van Doorn, D. C. K., Geurden, T., Wagenaar, J. A. 2016. Semi-quantitative differentiation of cyathostomin larval cultures by reverse line blot. *Veterinary parasitology*. 216. 59-65.
- Lindsay, D. S., Steinberg, H., Dubielzig, R. R., Semrad, S. D., Konkle, D. M., Miller, P. E., Blagburn, B. L. 1996. Central nervous system neosporosis in a foal. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 8 (4). 507-510.
- Locatelli-Dittrich, R., Dittrich, J. R., Richartz, R. R. T. B. 2006. Investigation of *Neospora* sp. and *Toxoplasma gondii* antibodies in mares and in precolostral foals from Parana State, Southern Brazil. *Veterinary parasitology*. 135 (3). 215-221.
- Love, S., Duncan, J. L. 1992. The development of naturally acquired cyathostome infection in ponies. *Veterinary Parasitology*. 44(1-2). 127-142.
- Love, S., Murphy, D, Mellor, D. 1999. Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary parasitology*. 85(2). 113-122.

- Lynsdale, C. L., dos Santos, D. J. F., Hayward, A. D., Mar, K. U., Htut, W., Aung, H. H. Lummaa, V. 2015. A standardised faecal collection protocol for intestinal helminth egg counts in Asian elephants, *Elephas maximus*. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 4(3). 307-315.
- Lyons, E. T., Kuzmina, T. A., Tolliver, S. C., Collins, S. S. 2011. Observations on development of natural infection and species composition of small strongyles in young equids in Kentucky. *Parasitology research*. 109(6). 1529-1535.
- Lyons, E. T., Tolliver, S. C., Collins, S. S. 2009. Probable reason why small strongyle EPG counts are returning “early” after ivermectin treatment of horses on a farm in Central Kentucky. *Parasitology research*. 104(3). 569-574.
- Lyons, E. T., Tolliver, S. C., Drudge, J., Swerczek, T. W., Crowe, M. W. 1983. Parasites in Kentucky Thoroughbreds at necropsy: emphasis on stomach worms and tapeworms. *American journal of veterinary research*. 44(5). 839-844.
- Martínez-Valladares, M., Geurden, T., Bartram, D. J., Martínez-Pérez, J. M., Robles-Pérez, D., Bohórquez, A. Rojo-Vázquez, F. A. 2015. Resistance of gastrointestinal nematodes to the most commonly used anthelmintics in sheep, cattle and horses in Spain. *Veterinary parasitology*. 211(3). 228-233.
- Marsh, A. E., Barr, B. C., Madigan, J., Lakritz, J., Conrad, P. A. 1996. Sequence analysis and polymerase chain reaction amplification of small subunit ribosomal DNA from *Sarcocystis neurona*. *American Journal of Veterinary Research*. 57 (7). 975-981.
- Martuzzi, F., Catalano, A. L., Sussi, C. 2001. Characteristics of horse meat consumption and production in Italy. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria*. 21. 213-233.
- McKenna, P. B. 1998. The effect of previous cold storage on the subsequent recovery of infective third stage nematode larvae from sheep faeces. *Veterinary parasitology*. 80(2). 167-172.

- Meana, A., Pato, N. F., Martín, R., Mateos, A., Pérez-García, J., Luzón, M. 2005. Epidemiological studies on equine cestodes in central Spain: infection pattern and population dynamics. *Veterinary parasitology*. 130(3). 233-240.
- Mfitilodze, M. W., Hutchinson, G. W. 1990. Prevalence and abundance of equine strongyles (Nematoda: Strongyloidea) in tropical Australia. *The Journal of parasitology*. 487-494.
- Monahan, C. M., Chapman, M. R., Taylor, H. W., French, D. D., Klei, T. R. 1998. Experimental cyathostome challenge of ponies maintained with or without benefit of daily pyrantel tartrate feed additive: Comparison of parasite burdens, immunity and colonic pathology. *Veterinary parasitology*. 74(2). 229-241.
- Mughini, G. L., Usai, F., Stancampiano, L. 2011. Strongylosis in horses slaughtered in Italy for meat production: Epidemiology, influence of the horse origin and evidence of parasite self-regulation. *Veterinary parasitology*. 179. 167-174.
- Nielsen, M. K. (2015). Equine tapeworm infections: Disease, diagnosis and control. *Equine Veterinary Education*.
- Nielsen, M. K., Donoghue, E. M., Stephens, M. L., Stowe, C. J., Donecker, J. M., Fenger, C. K. 2015. An ultrasonographic scoring method for transabdominal monitoring of ascarid burdens in foals. *Equine veterinary journal*.
- Nielsen, M. K., Jacobsen, S., Olsen, S. N., Bousquet, E., Pihl, T. 2016. Nonstrangulating intestinal infarction associated with *Strongylus vulgaris* in referred Danish equine cases. *Equine Veterinary Journal*. 48(3). 376-379.
- Nielsen, M. K., Kaplan, R. M., Thamsborg, S. M., Monrad, J., Olsen, S. N. 2007. Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles: implications for worm control strategies and managing anthelmintic resistance. *The Veterinary Journal*. 174(1). 23-32.



- Nielsen, M. K., Reist, M., Kaplan, R. M., Pfister, K., Van Doorn, D. C. K., Becher, A. 2014. Equine parasite control under prescription-only conditions in Denmark—Awareness, knowledge, perception, and strategies applied. *Veterinary parasitology*. 204(1). 64-72.
- Nielsen, M. K., Scare, J., Gravatte, H. S., Bellaw, J. L., Prado, J. C., Reinemeyer, C. R. 2015. Changes in serum *Strongylus vulgaris*-specific antibody concentrations in response to anthelmintic treatment of experimentally infected foals. *Frontiers in Veterinary Science*. 2.
- Nielsen, M. K., von Samson-Himmelstjerna, G., Pfister, K. 2016. The appropriate antiparasitic treatment: Coping with emerging threats from old adversaries. *Equine Veterinary Journal*. 48(3). 374-375.
- Nilsson, O., Ljungström, B. L., Höglund, J., Lundquist, H., Ugglå, A. 1994. *Anoplocephala perfoliata* in horses in Sweden: prevalence, infection levels and intestinal lesions. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 36(3). 319-328.
- Ogborne, C. P. 1976. The prevalence, relative abundance and site distribution of nematodes of the subfamily Cyathostominae in horses killed in Britain. *Journal of Helminthology*. 50(03). 203-214.
- Owen, R. H., Jagger, D. W., Quan-Taylor, R. 1988. Prevalence of *Anoplocephala perfoliata* in horses and ponies in Clwyd, Powys and adjacent English marches. *Veterinary record*. 123(22). 562-563.
- Parry, J. M., Fisher, M. A., Grimshaw, W. T., Jacobs, D. E. 1993. Anthelmintic dosing intervals for horses: comparison of three chemical groups. *Veterinary Record*. 133(14). 346-347.
- Peregrine, A. S., Molento, M. B., Kaplan, R. M., Nielsen, M. K. 2014. Anthelmintic resistance in important parasites of horses: does it really matter?. *Veterinary parasitology*. 201(1). 1-8.

- Pearson, G. R., Davies, L. W., White, A. L., O'Brien, J. K. 1993. Pathological lesions associated with *Anoplocephala perfoliata* at the ileo-caecal junction of horses. *The Veterinary Record*. 132(8). 179-182.
- Perryman, L. E., McGuire, T. C., Torbeck, R. L. 1980. Ontogeny of lymphocyte function in the equine fetus. *American journal of veterinary research*. 41 (8). 1197-1200.
- Reed, S. M., Furr, M., Howe, D. K., Johnson, A. L., MacKay, R. J., Morrow, J. K., Pusterla, N., Witonsky, S. 2016. Equine Protozoal Myeloencephalitis: An Updated Consensus Statement with a Focus on Parasite Biology, Diagnosis, Treatment and Prevention. *Journal Of Veterinary Internal Medicine*. 30(2). 491-502.
- Reinemeyer, C. R., Rohrbach, B. W. 1990. A survey of equine parasite control practices in Tennessee. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 196(5). 712-716.
- Reinemeyer, C. R., Smith, S. A., Gabel, A. A., Herd, R. P. 1984. The prevalence and intensity of internal parasites of horses in the USA. *Veterinary parasitology*. 15(1). 75-83.
- Rehbein, S., Visser, M., Winter, R. 2013. Prevalence, intensity and seasonality of gastrointestinal parasites in abattoir horses in Germany. *Parasitology research*. 112(1). 407-413.
- Ricci, M., Sabatini, A. 1992. Parasitic helminths of the cecum and colon of equidae in Italy. *Parassitologia*. 34(1-3). 53-60.
- Rinaldi, L., Coles, G. C., Maurelli, M. P., Musella, V., Cringoli, G. 2011. Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Veterinary parasitology*. 177(3). 345-352.
- Rosanowski, S. M., Scott, I., Sells, P. D., Rogers, C. W., Bolwell, C. F., 2016. Cross-sectional survey of parasite control practices on Thoroughbred and Standardbred training yards in New Zealand. *Equine Veterinary Journal*. 48(3). 387-393.

- Silva, A. V. M., Costa, H. M. A., Santos, H. A., Carvalho, R. O. 1999. Cyathostominae (Nematoda) parasites of *Equus caballus* in some Brazilian states. *Veterinary parasitology*. 86(1). 15-21.
- Slocombe, J. O., McCraw, B. M., Pennock, P. W., Ducharme, N., Baird, J. D. 1987. *Strongylus vulgaris* in the tunica media of arteries of ponies and treatment with ivermectin. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 51(2). 232.
- Stancampiano, L., Gras, L. M., Poglayen, G. 2010. Spatial niche competition among helminth parasites in horse's large intestine. *Veterinary parasitology*. 170(1). 88-95.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., Wall, R. L. (2007). *Veterinary Parasitology*. Blackwell Publishing.
- Tenter, A. M. 1995. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. *International journal for parasitology*. 25 (11). 1311-1330.
- Tolliver, S. C., Lyons, E. T., Drudge, J. H. 1987. Prevalence of internal parasites in horses in critical tests of activity of parasiticides over a 28-year period (1956–1983) in Kentucky. *Veterinary parasitology*. 23(3-4). 273-284.
- Tomczuk, K., Kostro, K., Grzybek, M., Szczepaniak, K., Studzińska, M., Demkowska-Kutrzepa, M., Roczeń-Karczmarz, M. 2015. Seasonal changes of diagnostic potential in the detection of *Anoplocephala perfoliata* equine infections in the climate of Central Europe. *Parasitology research*. 114(2). 767-772.
- Traversa, D., Iorio, R., Klei, T. R., Kharchenko, V. A., Gawor, J., Otranto, D., Sparagano, O. A. 2007. New method for simultaneous species-specific identification of equine strongyles (Nematoda, Strongylida) by reverse line blot hybridization. *Journal of clinical microbiology*. 45(9). 2937-2942.
- van Doorn, D. C. K., Ploeger, H. W., Eysker, M., Geurden, T., Wagenaar, J. A., Kooyman, F. N. J. 2014. *Cylicocyclus* species predominate during shortened egg reappearance period in

horses after treatment with ivermectin and moxidectin. *Veterinary parasitology*. 206(3). 246-252.

Vardeleon, D., Marsh, A. E., Thorne, J. G., Loch, W., Young, R., Johnson, P. J. 2001. Prevalence of *Neosporahughesi* and *Sarcocystis neurona* antibodies in horses from various geographical locations. *Veterinary Parasitology*. 95 (2). 273-282.

von Samson-Himmelstjerna, G., Fritzen, B., Demeler, J., Schürmann, S., Rohn, K., Schnieder, T., Epe, C. 2007. Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. *Veterinary parasitology*. 144(1). 74-80.

Weclawski, U., Heitlinger, E. G., Baust, T., Klar, B., Petney, T., San Han, Y., Taraschewski, H. 2013. Evolutionary divergence of the swim bladder nematode *Anguillicola crassus* after colonization of a novel host, *Anguilla anguilla*. *BMC evolutionary biology*. 13(1). 78.

Williams, R. H., Morley, E. K., Hughes, J. M., Duncanson, P., Terry, R. S., Smith, J. E., Hide, G. 2005. High levels of congenital transmission of *Toxoplasma gondii* in longitudinal and cross-sectional studies on sheep farms provides evidence of vertical transmission in ovine hosts. *Parasitology*. 130 (3). 301-307.

Williamson, R. M. C., Gasser, R. B., Middleton, D., Beveridge, I. 1997. The distribution of *Anoplocephala perfoliata* in the intestine of the horse and associated pathological changes. *Veterinary parasitology*. 73(3-4). 225-241.

Wilson, L., Rhodes, A. P., Dodunski, G. 2015. Parasite management extension—challenging traditional practice through adoption of a systems approach. *New Zealand veterinary journal*. 63(6). 292-300.