

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd



## Optimalizace metody pro testování viability u vlasovky slezové

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.  
Konzultantka: Mgr. Linh Thuy Nguyen

Hradec Králové 2021

Bc. Eva Mašátová

## **Poděkování**

Touto formou bych ráda poděkovala své vedoucí práce prof. RNDr. Lence Skálové, Ph.D. za poskytnutí možnosti sepsat tuto práci pod jejím vedením, věcné připomínky k práci a za její vždy milý a vstřícný přístup. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Linh Thuy Nguyen za přátelský přístup při vysvětlení jednotlivých postupů u metod, pomoc při experimentální práci, odborné rady při sepisování celé práce, a především za její nadšení, nekonečnou trpělivost a vždy milý přístup. Veliké poděkování patří Mgr. Martinu Žofkovi, který mi poskytl možnost využít v této práci strojové učení. Nakonec bych také ráda poděkovala prof. RNDr. Jiřímu Lamkovi, CSc., za jeho odborný dohled nad zvířaty při experimentech.

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové

Bc. Eva Mašátová

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

Kandidát: Bc. Eva Mašátová

Školitel: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Linh Thuy Nguyen

Název diplomové práce: Optimalizace metody pro testování viability u vlasovky slezové

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) patří mezi celosvětově rozšířené patogenní hlístice z čeledi Trichostrongylidae parazitující ve slezu malých přežvýkavců, především u ovcí. Nejčastějším projevem hemonchózy je anémie, neprospívání a hubnutí. U mladých zvířat může dojít i k jejich úhynu. Významnou komplikací léčby hemonchózy je rychle se tvořící rezistence vlasovky slezové na podaná léčiva, a to je v posledních letech celosvětový problém.

Tato práce byla zaměřena na testování účinnosti benzimidazolových anthelmintik (tiabendazol a albendazol) u třech kmenů vlasovky slezové, které se liší svojí citlivostí k léčivům. Pracovali jsme s kmeny: *ISE* (Inbred Susceptible Edinburgh) kmen – citlivý, *IRE* (Inbred Resistant Edinburgh) kmen – rezistentní a *WR* (White-River) kmen – multirezistentní.

Ke sledování účinnosti léčiv a ke sledování míry rezistence bylo využito testování líhnutí vajíček (egg hatch test; EHT). Vajíčka jednotlivých kmenů se izolovala z trusu infikovaných ovcí, poté se inkubovala 48 hodin při teplotě 27 °C v roztoku o různých koncentracích anthelmintik. Vylíhlé larvy i nevylíhlá vajíčka byly nejprve spočítány manuálně pod mikroskopem. Potom byla aplikována nová metoda strojového učení pro diagnostiku vajíček a larev vlasovky slezové. Oba postupy vyhodnocování EHT byly porovnávány. Detekce objektů pomocí počítače vykazovala vyšší přesnost u vajíček, avšak byla nižší u larev vzhledem k jejich heterogenním tvarům. Výsledné hodnoty inhibiční koncentrace (inhibitory concentration;  $IC_{50}$ ) jednotlivých kmenů potvrdily nejvyšší účinnost anthelmintik u citlivého kmene *ISE* a nejnižší účinnost u benzimidazol-rezistentního kmene *IRE*.

# ABSTRACT

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Biochemical Sciences

Candidate: Bc. Eva Mašátová

Supervisor: prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

Consultant: Mgr. Linh Thuy Nguyen

Title of diploma thesis: Optimization of the method for viability testing in *Haemonchus contortus*

Barber's pole worm (*Haemonchus contortus*) is one of the most widespread pathogenic nematodes of the Trichostrongylidae family parasitizing in the abomasum of small ruminants, mainly in sheep. The most common symptoms of haemonchosis are anaemia, lack of thriving and weight loss. Young animals can also die. A significant complication in the treatment of haemonchosis is the rapidly developing resistance of the barber's pole worm to the administered drugs, which has become a global problem in recent years.

This work focused on testing the efficacy of benzimidazole anthelmintics (thiabendazole and albendazole) in three strains of barber's pole worm, which differ in their drug sensitivity. We worked with strains: *ISE* (Inbred Susceptible Edinburgh) strain - sensitive, *IRE* (Inbred Resistant Edinburgh) strain - resistant and *WR* (White-River) strain - multi-resistant.

The egg hatch test (EHT) was used to monitor the drug effectiveness and thus to monitor the level of resistance. Eggs from individual strains were isolated from the faeces of infected sheep and incubated for 48 hours at the temperature 27 °C in a solution with different concentrations of anthelmintics. Hatched larvae and non-hatched eggs were firstly counted manually using a microscope. Afterwards, a machine learning method was applied to detect eggs and larvae of the barber's pole worm. The two EHT evaluation procedures were then compared. The machine learning detection showed higher accuracy for eggs, but it performed lower in larvae due to their heterogeneous shapes. The resulting values of the inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of the individual strains confirmed the highest efficacy of the anthelmintics at the susceptible *ISE* strain and the lowest efficacy at the benzimidazole-resistant strain *IRE*.

# Obsah

Úvod.....	8
1. Teoretická část .....	9
1.1 Chov ovcí .....	9
1.1.1 Chov ovcí v České republice .....	9
1.2 Hlístice – významní endoparazité u ovcí .....	10
1.3 Vlasovka slezová ( <i>Haemonchus contortus</i> ) .....	12
1.3.1 Morfologie .....	13
1.3.2 Výskyt.....	13
1.3.3 Životní cyklus .....	13
1.3.4 Hemonchóza .....	15
1.3.5 Léčba.....	15
1.3.6 Léková rezistence .....	18
1.3.7 Diagnostika hemonchózy.....	19
1.4 Strojové učení (machine learning) .....	21
1.4.1 Umělá neuronová síť.....	23
1.4.2 Analýza obrazu, počítačové vidění .....	24
2. Cíl práce.....	28
3. Experimentální část .....	29
3.1 Biologický materiál, technické vybavení, pomůcky, reagensie.....	29
3.1.1 Biologický materiál.....	29
3.1.2 Technické vybavení .....	29
3.1.3 Pracovní pomůcky .....	30
3.1.4 Chemikálie a reagensie .....	30
3.2 Pracovní postupy .....	31
3.2.1 Odběr biologického materiálu .....	31
3.2.2 Izolace vajíček .....	32
3.2.3 Egg hatch test (EHT) -sledování účinku albendazolu a tiabendazolu u jednotlivých kmenů .....	35
3.2.4 Aplikace strojového učení .....	36
3.2.5 Statistická analýza.....	42
4. Výsledky .....	43
4.1 Porovnání líhnutí vajíček třech kmenů ( <i>ISE, IRE, WR</i> ) vlasovky slezové po expozici léčiv (albendazol, tiabendazol) .....	43

4.2	Souhrnné porovnání jednotlivých kmenů vlasovky slezové po expozici léčiv (albendazol, tiabendazol) .....	45
4.3	Srovnání metod EHT a iEHT .....	47
4.4	Deskriptivní analýza ze strojového učení .....	48
5.	Diskuse .....	49
6.	Závěr .....	52
	Použité zkratky .....	53
	Seznam tabulek .....	54
	Seznam obrázků .....	55
	Použitá literatura .....	57

# ÚVOD

Řád *Strongylida* je největší skupina červů, do které řadíme také vlasovku slezovou (*Haemonchus contortus*). Jedná se o jednoho z nejvíce patogenních zástupců této skupiny, zároveň se řadí mezi gastrointestinální nematody (GIN). Výskyt vlasovky slezové je v abomasu ovcí a u dalších malých přežvýkavců, kde způsobuje onemocnění hemonchózu. Jedná se o krev sající hlístici, která je v dospělosti schopná denně spotřebovat až 30  $\mu$ l krve. To má za následek vznik anémií, dále také vznikají edémy a další komplikace. Vlasovka slezová se vyznačuje rychlou reprodukcí. Dospělá samička je schopná produkovat 5000–15000 vajíček denně (Emery a kol., 2016). Celosvětově vlasovka slezová postihuje stovky miliónů hospodářských zvířat.

Pro léčbu hemonchózy se využívají anthelmintika. Bohužel se anthelmintické přípravky u hospodářských zvířat používají v nadměrné míře, což má za následek zvyšující se incidenci rezistence vlasovek vůči těmto léčivům. Proto je právě tento problém velkým tématem v oblasti veterinární parazitologie (Ma a kol., 2020).

Pro odhalení rezistentních kmenů i pro vývoj nových anthelmintik se využívá testování líhnutí vajíček (egg hatch test; EHT). Nevýhodou této jinak jednoduché metody je její pracné vyhodnocení manuálním počítáním pod mikroskopem. Cílem naší práce bylo zjistit, zda by vyhodnocení EHT bylo možno zjednodušit a zpřesnit pomocí strojového učení.

Strojové učení využívá sofistikovaných algoritmů pracujících na rozsáhlých heterogenních sadách dat, které by bylo obtížné nebo nemožné identifikovat i pro dobře vyškolené jednotlivce (Goecks a kol., 2020). Strojové učení by mohlo být přínosem pro zefektivnění a usnadnění diagnostiky rezistence i sledování účinnosti nových anthelmintik u vlasovky slezové.



# 1. Teoretická část

## 1.1 Chov ovcí

Ovce patří mezi oblíbená a často chovaná hospodářská zvířata jak ve světě, tak i v České republice. V porovnání s jinými hospodářskými zvířaty vynikají svou vysokou adaptací v různých klimatických, ale i chovatelských podmínkách. Díky této vlastnosti se ovce vyskytují v nejrůznějších oblastech světa od pouštní a polopouštní oblasti Afriky a Asie až po vysoce produktivní systémy specializované na masná a dojná plemena v Evropě.

V rámci Evropy se podmínky pro chov ovcí výrazně liší. Ve střední a východní Evropě se od roku 1989 chov ovcí velmi snížil z několika důvodů, jako jsou ekonomické změny, nízký genetický potenciál domácích plemen, nedostačující modernizace technologie chovu, výživy a pastvy, zmenšování ploch pastvin, ale také nedostatečné profesní dovednosti pracovníků. Situace v jižních státech Evropy je úplně jiná, a to z důvodu významného ekonomického, environmentálního a sociologického postavení chovatelů ovcí (Krupová a kol., 2015).

### 1.1.1 Chov ovcí v České republice

Na území dnešní České republiky je chov ovcí tradičním odvětvím živočišné výroby již od 17. století. V 19. století byl chov ovcí na vysoké úrovni a díky dosahovaným výsledkům byl proslaven i daleko za hranicemi. V dnešní době už chov ovcí není tak rozšířen jako v ostatních státech Evropy, avšak význam chovu stále spočívá v mnohostranném užitku. Hlavními produkty ovcí jsou maso, mléko, vlna a kůže. Vedle těchto produktů poskytují také lanolin, lůj, střeva, krev, předžaludky, paznehty a rohy. Významnou úlohu mají ovce při použití jako modelové organismy (Tab. 1).

Od roku 1991 se v důsledku změny ekonomiky v České republice také zásadním způsobem změnila podmínky chovu ovcí, a to především potlačením výroby vlny. Větší důraz je kladen na zvýšení plodnosti a masovou užitkovost (Vaněk, 2002).

**Tab. 1: Užítkovost ovčí**

Základní produkty	Vedlejší produkty	Nepřímý užitek
Maso	Lanolin	Modelový organismus
Mléko	Lůj	
Vlna	Střevo	
Kůže	Krev	
Paznehty	Předžaludky	
Rohy	-	

*Zdroj: přejato z Vaněk, 2002, upraveno*

## 1.2 Hlístice – významní endoparazité u ovčí

Parazitární onemocnění ovčí negativně ovlivňuje zdravotní stav zvířete, jelikož způsobuje přímé a nepřímé ztráty. Přímou ztrátou se označuje zvýšený úhyn zvířat a nižší kvalita masa. Jako nepřímá ztráta vlivem invaze parazita je označováno snížení užítkovosti zvířete, negativní vliv na reprodukci a zvýšení citlivosti k jiným infekčním i neinfekčním onemocněním. V našich chovech patří mezi nejčastější parazity ovčí střevní hlístice (Horák, 2012). Parazitární onemocnění způsobené gastrointestinálními hlísticemi u ovčí se stává jedním ze závažných globálních problémů pro chovatele domácích přežvýkavců (Baltrušis a kol., 2020; Silva a kol., 2020).

Hlístice patří mezi helminty, což je velmi rozmanitá skupina živočichů – červů. Jsou to mnohobuněční eukaryotní bezobratlí živočichové s trubicovitými či zploštělými těly vykazujícími bilaterální symetrii. Mnoho zástupců žije volně ve vodním nebo suchozemském prostředí, avšak většina parazituje v jiných organismech. Mezi helminty zařazujeme zástupce kmenů Trematoda, Cestoda, Monogena, Nematoda, Acanthocephala a další. Definitivní klasifikace je podle vnější a vnitřní morfologie stádií vajec, larev a dospělých červů (Castro, 1996; O'Donoghue, 2010; Volf a Horák, 2007).

Hlístice (Nematoda) jsou jednou z nejvíce zastoupenou a rozšířenou skupinou živočichů, do které je zařazeno velké množství volně žijících druhů a okolo 20 tisíc druhů parazitů. Hlístice parazitují jak u rostlin, tak u bezobratlých živočichů a obratlovců včetně člověka. Obratlovců jsou nejčastěji zasaženi parazity v trávicím traktu, ale mohou mít parazity i v krevním nebo lymfatickém oběhu, dýchací či nervové soustavě, kůži atd.

Hlístice dorůstají od mikroskopických rozměrů až do několika decimetrů (vzácně metrů). Tvar těla je protáhlý, často nitkovitý, válcovitý nebo vřetenovitý s kruhovým

průřezem. Povrch těla je tvořen kutikulou, jejíž syntéza probíhá v buňkách hypodermis (epidermis), ty jsou součástí subkutikulárního epitelu na povrchu těla mezi kutikulou a svalstvem. Kutikula je složena z několika vrstev, od povrchu epi-, exo-, mezo- a endokutikula, a podvrstev jedinečně uspořádaných pro jednotlivé skupiny hlístic. Velmi často se povrch těla rozděluje do jednotlivých článků, z nichž vystupují možné výběžky ve tvaru trnů, papil, hřebenů, ocasních křídel atd. Takové útvary mohou sloužit jako přichytný aparát, případně jako kopulační orgán u samců. Tyto útvary významně pomáhají rozeznat jednotlivé taxonomické druhy. Kutikula má využití jak pro oporu těla (vnější kostra), pohyb, výměnu látek s okolím, tak i pro interakci parazita s hostitelem.

Tělní dutina obsahuje tekutinu, která reguluje tělní turgor, podílí se na rozvodu a skladování živin, obsahuje coelomocyty a fagocyty zodpovědné za obrannou a exkreční funkci. Exkreční systém je různorodý pro každou skupinu hlístic.

Nervovou soustavu tvoří hltanový prstenec, ze kterého vybíhají nervové větve přidružené k hlavovým mechanosensorickým a chemosenzorickým papilám. Dále z hlavového prstence vybíhají dorsální, ventrální, submediální či laterální nervové provazce.

Svalová soustava je podpovrchová a je složena z podélných svalů mezi výběžky hypodermis. Specializované svalové buňky jsou spojené s trávicí a pohlavní soustavou.

Trávicí soustava bývá dobře vyvinuta společně s ústní dutinou, která je přizpůsobena pro potravu daného jedince. Potravou pro parazitické hlístice může být krev, tělní tekutiny, trávenina z trávicího traktu hostitele, buněčná drť tkání nebo rostlinné buňky. Ústní dutina může být různých tvarů, velikostí, může obsahovat zuby nebo lišty. Potrava je z ústní dutiny posouvána osvaleným hltanem do trávicího traktu, který u samic končí análním otvorem. U samců ústí trávicí trakt do kloaky společně s pohlavní soustavou.

Hlístice mají často výrazný pohlavní dimorfismus a samice bývají větší než samci. U samců se pohlavní soustava skládá z jednotrubcovitého varlete, semenného váčku a chámovodu. Kopulační orgány tvoří jehlicovité nebo tyčinkovité spikuly různé délky, spikulární váček oddělující spikuly a tvořící gubernakulum a struktura telamon, která směřuje spikuly správným směrem. Významným taxonomickým znakem samců některých hlístic je kopulační burza tvořená třemi laloky. U samic se pohlavní soustava skládá z trubicovitých vaječníků, na každý z nich navazuje vejcovod a děloha. Vagina je společná pro všechny jednotlivé dělohy. Charakteristickým taxonomickým znakem

je umístění svalnaté vulvy na těle samice. Hlístice jsou především gonochoristé, avšak u některých druhů se v souvislosti se střídáním generací objevují i jiné typy rozmnožování. K vývoji dospělých červů dochází přes larvální stádia L1-L4 (Volf a Horák, 2007).

Nejvýznamnějším zástupcem GIN je vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) parazitující ve slezu ovcí. Další zástupci původců onemocnění jsou uvedeni v Tab. 2. Parazité mají vláskovitý či nitkovitý tvar a dorůstají délky 1–5 cm.

**Tab. 2: Přehled parazitů u ovcí (střevo a slez)**

Parazit	Místo infekce	Parazit	Místo infekce
<i>Haemonchus contortus</i>	Slez	<i>Trichostrongylus vitrinus</i>	Tenké střevo
<i>Ostertagia circumcincta</i>		<i>Trichostrongylus rugatus</i>	
<i>Chabertia ovina</i>	Tlusté a slepé střevo	<i>Trichostrongylus culumbriformis</i>	
<i>Oesophagostomum columbianum</i>		<i>Nematodirus battus</i>	
<i>Trichuris ovis</i>		<i>Nematodirus filicollis</i>	
		<i>Bunostomum trigonocephalum</i>	

Zdroj: přejato z Horák, 2012; upraveno

### 1.3 Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*)

*Haemonchus contortus* infikuje především malé přežvýkavce, jako jsou ovce a kozy, ale také dobytek. Onemocnění způsobené *H. contortus* se nazývá hemonchóza a je jedním z nejdůležitějších parazitárních onemocnění u ovcí. Hlístice *H. contortus* parazitují především v žaludku (abomasum). *H. contortus* je jeden z ekonomicky nejvýznamnějších parazitů přežvýkavců, a to z důvodu ztráty hmotnosti zvířat, tudíž i snížení jejich produktivity. U mladých zvířat častěji způsobuje nemoci a náhlý úhyn (Nguyen a kol., 2019; Junquera, 2017; Kellerová a kol., 2020).

Významným rysem tohoto parazitárního druhu je schopnost rychle se tvořící rezistence na podávaná léčiva během relativně krátké doby (Baltrušis a kol., 2020).

Imunitní odpověď hostitele hraje významnou roli v ochraně proti GIN. Některá plemena ovcí jsou k *H. contortus* přirozeně odolná, a to díky imunitním reakcím hostitele, které mění morfologii či fyziologii parazita a dále zabraňují opětovné infekci usmrcením vyvíjejících se červů nebo eliminací invazivních larev (např. australské plemeno Merino) (Lalramhluna a kol., 2020).

### 1.3.1 Morfologie

*H. contortus* je hlístice (nematoda) pojmenovaná podle válcovitého či nitkovitého (vlasovitého) tvaru s pokožkou složenou ze tří vrstev tvořených kolagenem a dalšími sloučeninami. Vnější vrstva je tvořená epidermis. Kutikula je ochrannou vrstvou. Jelikož se jedná o krev sajícího parazita, má *H. contortus* obecně načervenalou barvu.

Je možné pozorovat nápadný pohlavní dimorfismus. Dospělé samice mají délku 18–30 mm a mohou produkovat více než 5000 vajíček denně. Výrazným rysem jsou ovinuté vaječníky světlé barvy okolo do červena zbarvených střev, vytvářejí typické pruhování. Samec je většinou tenčí a kratší délky (10–20 mm) než samice. Vyniká výrazně vyvinutou kopulační burzou, která obsahuje asymetrický hřbetní lalok a hřbetní paprsek ve tvaru Y (Dědková, 2015).

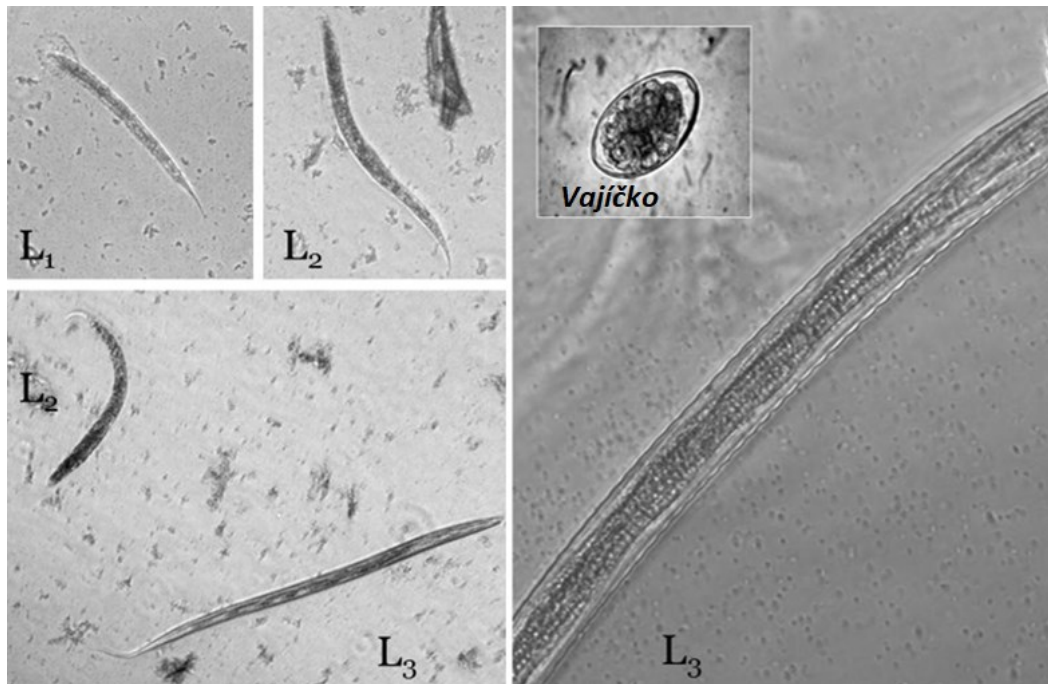
Svalová soustava je šikmo uspořádána v pásech podél stěny těla. Specializovaný vylučovací systém je uspořádán do tří vývodných kanálů tvaru H (Sendow, 2003; Scheuerle, 2009).

### 1.3.2 Výskyt

*H. contortus* je nejvíce patogenní v tropických a subtropických oblastech. Vysoké srážky v kombinaci s vysokou teplotou způsobují vyšší líhnutí vajíček, tím i vyšší kontaminaci pastviny. Možnost infekce GIN ovlivňují faktory – vlhkost a teplota v okolí, chování hostitele na pastvě, množství a kvalita pastviny. Další faktory, které mohou ovlivnit intenzitu infekce, jsou pohlaví, věk, druh, plemeno a stavba těla hostitele (Mushonga a kol., 2018).

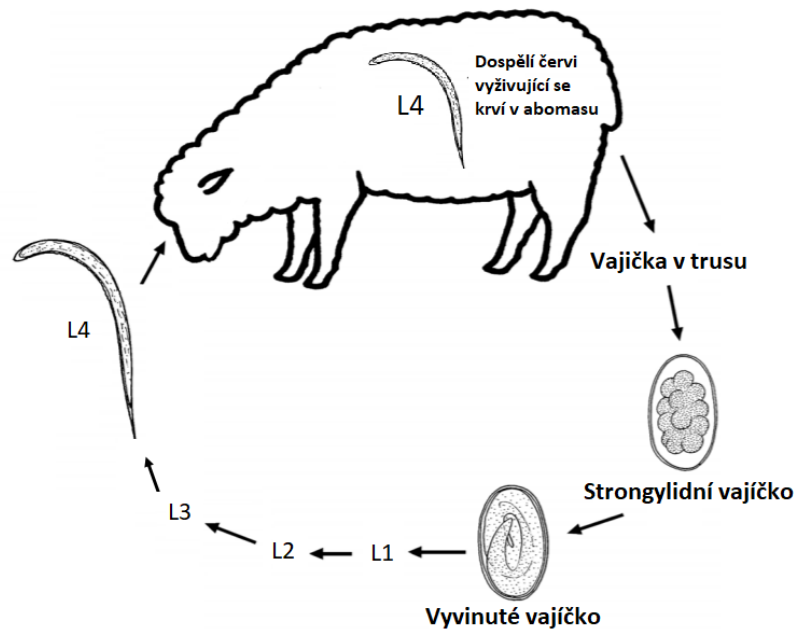
### 1.3.3 Životní cyklus

Životní cyklus vlasovky slezové je přímý a u všech druhů podobný. Jedná se o snadný přenos mezi hospodářskými zvířaty. Dospělí červi žijí v abomasu. Samice červů kladou vajíčka, která se dostanou do životního prostředí stolicí. V závislosti na vlhkosti a teple prostředí dochází k líhnutí larev (L1) z vajíček na pastvině. Volně žijící larvy se postupně vyvíjí do druhého (L2) a třetího (L3) infekčního stupně. Vysoce infekční larvy L3 jsou pozřeny ovce společně s potravou na pastvě. V organismu hostitele se larvy dostanou do gastrointestinálního systému, kde se vyvíjí do stádia L4, naposledy se vyvíjí pohlavní rysy jednotlivých červů. Stádia L1–L3 mohou přežít až několik měsíců na pastvách (Scheuerle, 2009; Sangster a kol., 2018).



**Obr. 1: Jednotlivá stádia *H. contortus***

Zdroj: přejato z pracovních postupů – katedra biochemických věd, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, upraveno



**Obr. 2: Životní cyklus *H. contortus***

Zdroj: přejato z <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/haemonchus-contortus>, upraveno

### 1.3.4 Hemonchóza

Hemonchóza je nejdůležitější parazitóza způsobená GIN. Postižená jsou častěji oproti dospělým ovčím jehňata ve věku 6–10 týdnů. Přenos je v případě původce *H. contortus* bez mezihostitele, jelikož z vajíček v trusu ovcí se líhnou larvy, které jsou schopné pohybu ve vnějším prostředí. Ve vajíčku, které má vlastnost zvýšené rezistence v podmínkách vnějšího prostředí, jako je vysoká či nízká teplota, dozrávají larvy do infekčního stádia L3. V důsledku rezistence je vajíčko schopné vydržet na pastvě až 1 rok. Pro stimulaci uvolnění larev z vajíčka je potřeba delšího intervalu nízkých teplot s postupujícím zvýšením teploty na 10 °C. Jehňata se snadněji nakazí po skončení kolostrální imunity, kterou získala od bahnic. Období pro invazi jehňat je u nás nejčastěji v květnu a červnu, ale není zcela výjimečné i u starších jehňat (Horák, 2012).

Klinickým projevem je náhlá tvorba akutního zánětu střev s akutním průjemem, ztráta přijímání potravy a dehydratace. Hemonchóza se nejčastěji projevuje v akutní formě s rychlostí nástupu závislé na počtu přítomných infekčních larev. Pro ovce akutně infikované *H. contortus* jsou v důsledku anémie typické bledé sliznice (zejména u spojivek, normálně zbarvených do červeno-růžové barvy), tmavě zbarvené výkaly, slabost, otoky. Bez dostatečné léčby může docházet k hypoproteinémii a z důvodu ztráty krve až k ventrálnímu edému. Při chronické formě se může projevit snížená chuť k jídlu, ztráta váhy a anémie. Hemonchóza se v rámci stáda projevuje v několika stupních. Ve značné míře je geneticky podmíněna, ale významný vliv má také nutriční stav jednotlivce, proto není obvyklé, že by docházelo ve stádu ke stejným projevům onemocnění (Besier, 2016; Horák, 2012; Mushonga a kol., 2018).

### 1.3.5 Léčba

Kontrola nad infekcí vlasovkou slezovou je do značné míry založena na preventivním nebo terapeutickém použití anthelmintik (Tab. 3). Většinou jsou stáda ovcí ošetřována dvakrát nebo vícekrát ročně. Na jaře, kdy začíná období pastvy, a na konci léta, kdy je kontaminace pastvy larvami vysoká a také zvířata jsou vysoce infikována dospělými červy. Další léčba se provádí při projevu klinických příznaků (Scheuerle, 2009).

### 1.3.5.1 Benzimidazoly

Aktuálně využívané látky z této skupiny anthelmintik albendazol, tiabendazol, fenbendazol, oxfendazol a mebendazol jsou na trhu od konce 70. let 20. století. Zástupci benzimidazolů působí na hlístice na buněčné úrovni inhibicí polymerace mikrotubulů, která nakonec způsobí buněčnou smrt.

### 1.3.5.2 Imidazothiazoly/tetrahydropyrimidiny

Druhá skupina širokospektrých anthelmintik byla syntetizována na konci 60. let minulého století a nejčastějším zástupcem je levamisol. Jeho použití je především u malých přežvýkavců. V některých zemích se také využívá pro léčbu u ovcí morantel. Obecně platí, že *H. contortus* je, i přes zvýšenou rezistenci ostatních hlístů, stále citlivý při použití levamisolu více než u jiných léčiv. Tato skupina léčiv působí jako nikotinový agonista proti acetylcholinovým receptorům.

### 1.3.5.3 Organofosfáty

Mezi organofosfátová anthelmintika se řadí naftalofos, trichlorfon a pyraclyfos. Jelikož jde o organofosfáty, inhibují aktivitu acetylcholinesterázy, a proto jsou potencionálně toxické jak pro savce, tak pro cílové parazity. Důležitá je zde opatrnost při použití. U *H. contortus* bylo popsáno málo případů rezistence u této skupiny léčiv. Tato skupina není všeobecně dostupná, avšak může být užitečná v případě rezistence k ostatním skupinám.

### 1.3.5.4 Makrocyclické laktony

Makrocyclické laktony se používají od 80. let minulého století. Řadíme mezi ně ivermektin, milbemycin a moxidektin. Tyto látky působí proti většině druhů a proti všem stádiím hlístic. Hlavním mechanismem účinku je narušení nervového přenosu působením glutamátů řízených chloridových kanálů. U *H. contortus* je rozšířena rezistence k ivermektinu.

### 1.3.5.5 Salicylanilidy a substituované fenoly

Zástupci této skupiny klosantel, rafoxanid, disofenol a nitroxynil působí inhibicí energetického metabolismu, a to inaktivací oxidativní fosforylace. Klosantel a disofenol mají prodlouženou dobu účinku na několik týdnů po podání.



### 1.3.5.6 Aminoacetonitrilové deriváty

Jediným zástupcem, představeným koncem roku 2000 jako nejnovější typ anthelmintika, je monepantel. Jedinečný mechanismus účinku spočívá v inhibici nikotinového acetylcholinového receptoru. I v případě monepantelu byly hlášeny výskyty rezistentních populací *H. contortus*.

### 1.3.5.7 Spiroindoly

Zástupcem této skupiny je derquantel, který není samostatně plně funkční, vyrábí se v kombinaci s abamektinem. Derquantel je cholinergní nikotinový antagonist (Besier a kol., 2016).

**Tab. 3: Přehled léčiv u *H. contortus***

Hostitel	Parazit	Třída léků
Ovce	<i>Haemonchus contortus</i>	Aminoacetonitrily (AA) Benzimidazoly (BZ) Makrocyclické laktony (ML) Salicylanilidy (SA) Tetrahydropyrimidiny (TI)

Zdroj: Nguyen a kol., 2019

### 1.3.5.8 Kombinovaná anthelmintika

Kromě jednotlivých zástupců výše uvedených skupin anthelmintik se také vyrábějí různé kombinace těchto léčiv, avšak v některých státech nejsou akceptovány. K dispozici mohou být různé směsi benzimidazolů, levamisolu, makrocyclických laktonů, klosantelu a organofosfátů. Hlavním účelem těchto kombinací je zajištění vyšší účinnosti proti rezistentním hlístům k jedné či více složkám kombinace či výhoda snížení selekce na anthelmintickou rezistenci (AR). Tyto kombinace jsou nyní základem pro rutinní použití.

Vznik rezistence u kombinovaných anthelmintik je méně častý oproti jednotlivým složkám, avšak jsou již zaznamenány případy výskytu rezistence u *H. contortus* k několika různým skupinám (Besier a kol., 2016).

### 1.3.6 Léková rezistence

Parazitičtí červi způsobují po celém světě velikou zátěž pro lidi a zvířata. Léčba helmintóz se stává méně účinnou z důvodu vzniku rezistence k jednomu či více léčivům.

Ke vzniku rezistence dochází, když parazit přežije léčbu anthelmintiky a přenese geny spojené s rezistencí na své potomky. S další selekcí a reprodukcí se tyto geny v populaci parazita zvyšují. Pravidelné či nadměrné užívání těchto léčiv přispívá ke zvýšené selekci v následujících generacích hlístů. *H. contortus* má vysokou genetickou rozmanitost, a proto dochází k rychlému výběru rezistentních jedinců. U mnoha druhů hlístic je pozorován vývoj rezistence vůči více třídám léčiv, ba dokonce extrémní případ u *H. contortus*, kdy byla hlášena rezistence vůči každé třídě léčiv (Sangster a kol., 2018; Nguyen a kol., 2019).

Jako alternativní způsob kontroly parazitů u hospodářských zvířat se používají i nechemické metody – výživa či vakcinace. Ty jsou šetrnější k životnímu prostředí a mohou také snížit závislost na používání léčiv. Avšak žádná z těchto metod není natolik účinná, aby se obešla bez doplnění anthelmintik. Tato fakta jasně naznačují, že je nezbytný objev nových chemických léčiv s odlišným mechanismem účinku proti rezistentním parazitům hospodářských zvířat (Nguyen a kol., 2019).

První zpráva o AR u *H. contortus*, a to konkrétně na benzimidazoly, je z roku 1964. Po 10 letech byla rezistence pravidelně zjištěna u většiny parazitů ovcí. Jelikož se u těchto hlístic vyvinula rezistence jako první, znalosti o rezistenci jsou zkoumány právě na nich.

Zatím jediným popsáním molekulárním mechanismem rezistence je na benzimidazoly a to polymorfismus jednoho nukleotidu (SNP) v izotypu tubulinu 1 u *H. contortus*. Jedná se o příklad fenotypu, který představuje sníženou vazbu na tubulin, a genotyp představující možnou genetickou změnu ve vazebném místě pro benzimidazoly (Nguyen a kol., 2019; Sangster a kol., 2018).

Biotransformace benzimidazolových přípravků u vlasovky slezové se podle studie Kellerová a kol., 2020 dělí dle citlivosti jednotlivých izolátů na tři kmeny.

### 1.3.7 Diagnostika hemonchózy

V souvislosti s volbou správné léčby a vyvarování se vzniku rezistence k anthelmintikům je jednoznačně zásadní správná identifikace jednotlivých druhů parazitů. Znalosti týkající se epidemiologie parazitárních gastroenteritid jsou nezbytné pro vytvoření udržitelných strategií pro kontrolu přítomných parazitů (Amarante, 2011).

Přítomnost *H. contortus* u divokých nebo domácích přežvýkavců lze detekovat mikroskopickou identifikací vajíček nebo kultivovaných larev. Je to metoda levná a poměrně spolehlivá, avšak vyžaduje personál s odbornými znalostmi. Kvůli větší časové náročnosti není tato metoda dále vhodná pro rutinní použití. Podle účelu identifikace je potřebné vybrat vhodnou metodu z hlediska náročnosti na provedení, času a účinnosti. Diagnostika podobných stádií parazitických červů na základě morfologických rozdílů může být obtížná, proto je mnohdy vhodnější využití molekulárních technologií.

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je jednou z molekulárních metod založených na vyšetření deoxyribonukleové kyseliny (DNA) parazita. Pomocí kvantitativní polymerázové reakce (qPCR) lze určit množství produktu PCR v reálném čase. Tato metoda má potenciál ve vyšší citlivosti (oproti mikroskopii), automatizaci a úspoře času. Jako další molekulární metodu lze zmínit izotermickou amplifikaci zprostředkovanou smyčkou (LAMP), která amplifikuje cílový segment DNA pomocí čtyř různých primerů jedinečně navržených pro rozpoznání šesti odlišných zón na cílovém genu. qPCR a LAMP mají potenciál zlepšit diagnostické schopnosti a lépe pochopit, zda dochází ke křížovému přenosu háráték mezi divokými a domácími přežvýkavci a zda je to významný faktor pro vývoj rezistence u chovů hospodářských zvířat (Ljungström a kol., 2018; Gill a Hadian., 2020; Maddocks a Jenkins, 2017).

Jednou z alternativních strategií pro kontrolu AR je cílená léčba (targeted treatments – TT), při které se léčí celá skupina zvířat podle závažnosti infekce. Druhou strategií je cílená selektivní léčba (targeted selective treatment – TST), při níž jsou léčena jednotlivá zvířata, u kterých byly zjištěny prahové hodnoty u jednotlivých ukazatelů. Stanovují se klinické příznaky hemonchózy, pokles produktivity, skóre stavu těla (body condition score – BCS), počet vajíček v trusu (faecal egg count – FEC) nebo přírůstek hmotnosti.

Systém FAMACHA© vznikl k diagnostice anémie u zvířat postižených hemonchózou a používá se spolu s TST. U FAMACHA© se hodnotí barva oční sliznice

podle standardizované sady pěti barev. Barva oční sliznice se odvíjí dle hodnot hematokritu (Ht) a označuje se F1–F5, kdy se v případě skóre F4–F5 zvířatům nasazuje anthelmintická léčba. V případě F3 skóre se zvířata podrobí dalším vyšetřením pro případné nasazení léčby. Cílem těchto metod je snížení frekvence anthelmintické léčby a tím snížení rizika vzniku rezistence k těmto látkám (Cintra a kol., 2018; Calvete a kol., 2020).



**Obr. 3: FAMACHA© test**

*Zdroj: přejato z*

*[https://www.researchgate.net/publication/315628684\\_HAEMONCHUS\\_CONTORTUS\\_AND\\_OVINE\\_HOST\\_A\\_RETROSPECTIVE\\_REVIEW/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/315628684_HAEMONCHUS_CONTORTUS_AND_OVINE_HOST_A_RETROSPECTIVE_REVIEW/figures?lo=1), upraveno*

### **1.3.7.1 Sledování rezistence u vlasovky slezové**

Rezistence na anthelmintické sloučeniny u GIN ovcí je v současné době kosmopolitní a druhy rezistentní k jednomu či více léčivům jsou běžné po celém světě. Informace o AR v evropských zemích jsou známy hlavně u benzimidazolů (BZ), občasné hlášení rezistence na levamisol a v ojedinělých případech na makrocyclické laktony (ML) (M. Dolinská a kol., 2014). Efektivní sledování rezistence je důležité pro udržení vysoké účinnosti aktuálně dostupných léčiv a pro zabránění dalšímu vývoji rezistence. To je důležité především v oblastech, kde je stále malý podíl rezistentních

populací, a proto je zásadní mít k dispozici dostatečně citlivé metody pro detekci rezistence.

K monitorování AR u vlasovky slezové se nejčastěji využívá sledování líhnutí vajíček a vývoj larev. Pro terénní screening rezistence se považuje za nejvhodnější test redukce počtu vajíček v trusu, avšak jeho náročnost na čas, práci a náklady z něho dělá značně nepraktickou metodu pro větší výzkumy. Testy líhnutí vajíček (EHT) a testy vývoje larev (larval development test; LDT) jsou vhodné pro detekci rezistence na BZ a LDT také na levamisol. Potenciál těchto testů je snížen při provedení, kdy dochází ke snížené citlivosti při výskytu <25 % rezistentních jedinců v dané populaci. Pro zvýšení citlivosti testů se doporučují rozlišovací dávky, které zabraňují líhnutí vajíček, anebo přítomnost 99 % citlivých vajíček vyvíjejících se na larvy L3 v LDT (Varády a kol., 2007).

## **1.4 Strojové učení (machine learning)**

Strojové učení je odvětví informatiky, které má obecně za cíl umožnit počítačům „učit se“ bez přímého programování. Tím se liší od „umělé inteligence“, která je často používána záměnou za strojové učení, avšak liší se svým odkazem „myslícího stroje“ či automatizovaným rozhodováním. Počátky odvětví strojového učení sahají do 50. let, a to konkrétně do roku 1959, kdy Arthur Samuel, tehdejší významný počítačový vědec, užil poprvé pojem strojového učení. V současné době toto odvětví klade důraz na praktické využití, zejména na predikci a optimalizaci. Počítače se „učí“ pomocí zlepšování výkonu u úkolů prostřednictvím „zkušeností“. Taková „zkušenost“ prakticky znamená přizpůsobení se přijatým datům, neexistuje jasná hranice mezi strojovým učením a statistickými přístupy. Obecně se jedná o algoritmy, které přijímají vstupní data, aplikují počítačovou analýzu k předpovědi výstupních hodnot v přijatelném rozsahu přesnosti, identifikují vzorce a trendy v datech, nakonec se poučí z předchozích zkušeností. Strojové učení se obecně zaměřuje na velké datové soubory.

Strojové učení zahrnuje různé výpočetní metody, kterými mohou stroje vytvářet přesný datový model podle toho, jak dobře model podporuje daný úkol. Modelem se rozumí funkční reprezentace datové sady (reprezentace libovolného mapování, které je možné znázornit tak, aby vázalo části datové sady na konkrétní hodnotu na konkrétní měřící stupnici).

Rozlišujeme dva typy učení – kontrolované a bez dozoru. U kontrolovaného učení (supervizované učení) je počítač vybaven funkcemi souvisejícími s cíli učení (např. rizikové faktory u pacientů) a požadovanými opatřeními k dosažení výsledku (např. diagnóza) s cílem identifikovat vazby mezi těmito soubory dat. Pro představu se uvádí jednoduchý příklad tréninku u rozlišení mezi jablky, pomeranči a citrony. Funkce jako barva, velikost, tvar a hmotnost každého druhu ovoce je do algoritmu přidávána, ten se postupně učí kombinaci těchto vlastností rozlišovat. Na základě tohoto učení by při podání „neoznačeného“ ovoce měl být model schopen předpovědět, o jaký druh ovoce se jedná.

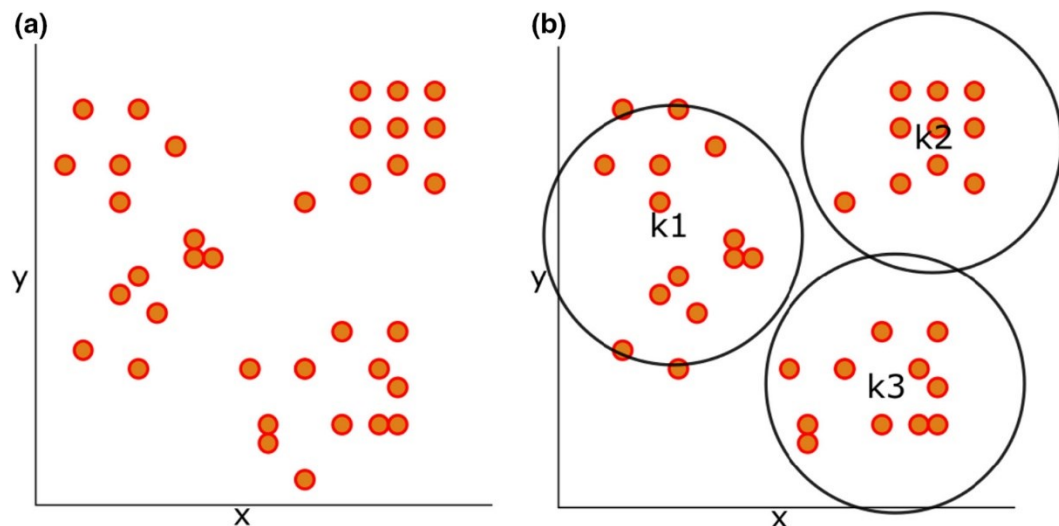
Učení bez dozoru, při kterém je počítač vybaven nezařazenými datovými záznamy, aby rozpoznal a určil, zda jsou přítomny nějaké latentní vzory. Na rozdíl od kontrolovaného učení, které se zabývá klasifikací a regresí. Učení bez dozoru se učí shlukováním a snižováním dimenze.

Klastrování označuje identifikaci skupin v datech. To znamená, že algoritmus poskytuje data, analyzuje je a určuje v nich případné podobnosti. To umožňuje seskupení podobných subjektů (Obr č. 4).

Většina modelů strojového učení popsaných v lékařské literatuře podporuje funkční mapování mezi souborem hodnot, nejčastěji spojených s jedním klinickým případem a jedinou kategorií. Soubory dat popisující různé případy tzv. funkce na ose „x“, které již odborníci spojili se „správnými“ hodnotami zaznamenanými na ose „y“. Datoví vědci programují stroje pro optimalizaci daného modelu (to znamená zvýšení přesnosti předpovídání hodnot na ose „y“ na základě neznámé funkce na ose „x“ převzaté z cílové populace) autonomním a interaktivním vyladěním jeho parametrů. Proces, který stroje aplikují na část dostupných dat (tréninková data) bez přímého programování, je označován jako strojové učení. Opakováním takových procesů se optimalizují parametry modelu získáváním počtu chyb na základě počtu opakování. Dále se taková data použijí na testovacích datech, která se liší od dat tréninkových, a to z důvodu zjištění, zda je model připravený pro konkrétní praktický cíl.

Běžně používanou technikou pro plné využití dat ve fázi optimalizace a vyhodnocení je k-násobná křížová validace, která vyžaduje náhodné rozdělení dostupných dat do několika podmnožin. Každá podmnožina je pak využita jako testovací sada, zatímco ostatní se využívají k tréninku. Průměrný výkon modelu lze na neviditelných datech odhadnout přesněji. Ve skutečnosti strojové učení vyžaduje důkladnou práci odborníků v činnostech zvyšujících účinnost celého procesu,

do kterého zahrnujeme shromažďování přesných a reprezentativních dat, výběr funkcí pro optimalizaci modelu a umění je transformovat pro usnadnění procesu. Mezi nejčastější modelové rodiny pro konkrétní cíle jsou podpora vektorových strojů (support vector machines – SVMs), náhodný les, Bayesovské klasifikátory nebo umělé neuronové sítě. Složitost modelu lze charakterizovat podle počtu použitých funkcí, typu modelu a počtu jeho parametrů.

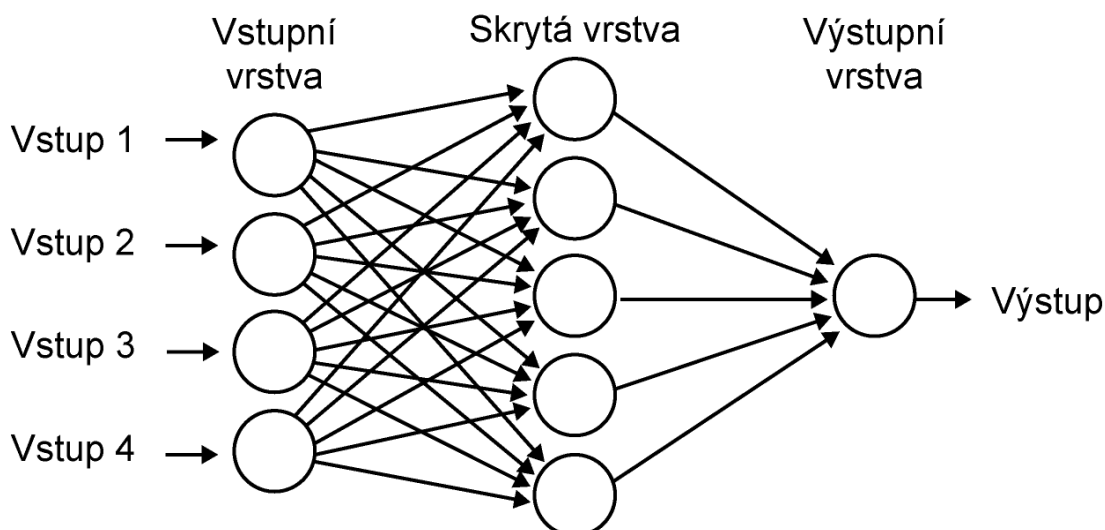


**Obr. 4: Klastrovaný algoritmus K-means (nejjednodušší algoritmus pro učení bez dozoru), podle kterého jsou data seskupena do skupin na základě podobnosti**

Zdroj: přejato z <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/joim.12822>

### 1.4.1 Umělá neuronová síť

Umělá neuronová síť (artificial neural network – ANN) je inspirována signalizačním chováním neuronů v biologických neuronových sítích. K analýze složitých interakcí mezi skupinou měřitelných proměnných za účelem předpovědi výsledku se používají struktury ANN, které jsou složené z populace neuronů propojených složitými signálními cestami. V podstatě by se dalo říct, že ANN mají vrstvy „neuronů“ spojených „axony“, a tak jsou seskupeny do vstupní vrstvy, do jedné nebo více středních vrstev a do výstupní vrstvy. Neurony ve vstupní a výstupní vrstvě odpovídají nezávislým a závislým proměnným. Neurony sousedních vrstev komunikují prostřednictvím aktivačních funkcí, které převádějí součet vstupů na neuronu na výstup. Podle typu aktivační funkce může být výstup dichotomický nebo spojitý (Cabitza a Banfi, 2018; Bi a kol., 2019; Handelman a kol., 2018).



**Obr. 5: Schéma neuronové sítě**

*Zdroj: přejato z <https://portal.matematickabiologie.cz/index.php?pg=analiza-a-hodnoceni-biologickych-dat--umela-inteligence--neuronove-site-jednotlivy-neuron--uvod-do-neuronovych-siti--koncept-umele-neuronove-site>*

### 1.4.2 Analýza obrazu, počítačové vidění

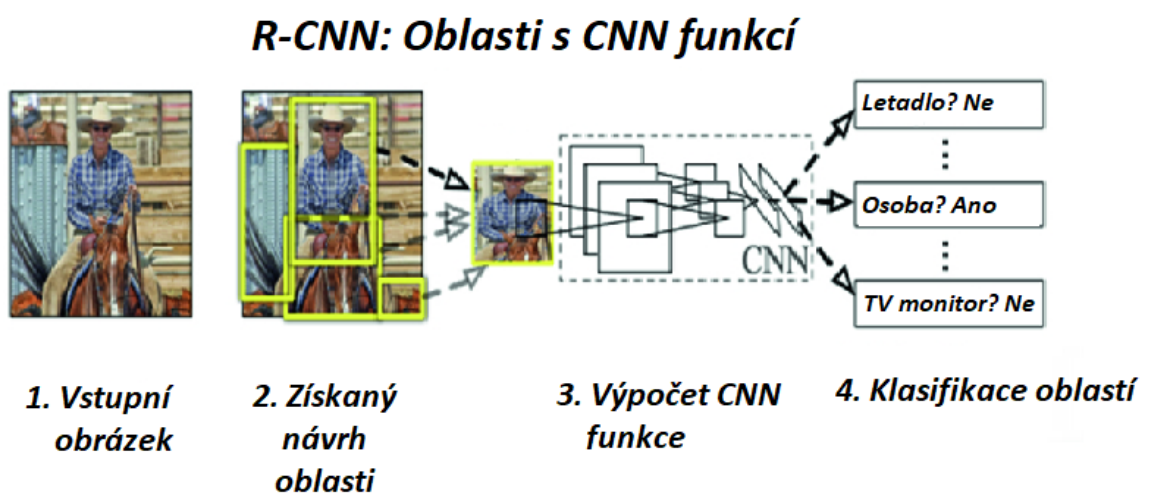
Jednou z oblastí umělé inteligence je doména počítačového vidění. Smyslem této oblasti je vnímat svět umělou inteligencí podobným způsobem jako je vnímání u lidí, a dokonce u toho využít i více znalostí pro celou řadu úkolů. Pokroky v počítačovém vidění v rámci technologie hlubokého učení byly vytvořeny a zdokonaleny díky konkrétnímu algoritmu – konvoluční neuronová síť (convolutional neural network; CNN).

CNN je algoritmus hlubokého učení inspirovaný biologickými procesy sloužící ke zkoumání vizuálních obrazů. Ve vstupním obraze se přiřadí význam a na takovém základě musí být algoritmus schopen rozlišit jeden obraz od druhého. Architektura CNN je analogická s architekturou propojení neuronů v lidském mozku. Jednotlivé neurony reagují na podněty pouze v omezené oblasti zorného pole nazývané recepční pole. Soubor těchto polí se překrývá a pokryje celé vizuální pole. CNN umí úspěšně zachytit prostorové a časové závislosti v obraze pomocí příslušných filtrů. V poslední době techniky CNN pokročily na regionální CNN (region based convolutional neural network; R-CNN) především v oblasti detekce objektů, kategorizace obrázků nebo segmentace obrazu. CNN identifikuje pouze třídu objektu bez umístění objektu v obrázku. Ještě větším problémem je u CNN více objektů v obraze, a to kvůli zvýšené



interferenci. Výhodou u R-CNN je selektivní vyhledávání cílové oblasti v obraze a ve spojení s CNN danou oblast kategorizuje jako popředí a pozadí. V současné době je R-CNN nejlepší detektor na bázi CNN, protože identifikuje polohu objektu v obraze, a to i v případě výskytu většího počtu objektů.

Z mnoha důvodů se R-CNN upravil pro další modifikace algoritmů, díky kterým se proces detekce a klasifikace objektů zrychlil a zpřesnil. Jedná se např. o rychlý R-CNN (fast R-CNN), rychlejší R-CNN (faster R-CNN), detektor jednoho snímku (single shot detector; SSD), maska R-CNN atd. (Saha, 2018; Bharati a Pramanik, 2020).



Obr. 6: Architektura R-CNN

Zdroj: přežato z [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-9042-5\\_56](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-13-9042-5_56), upraveno

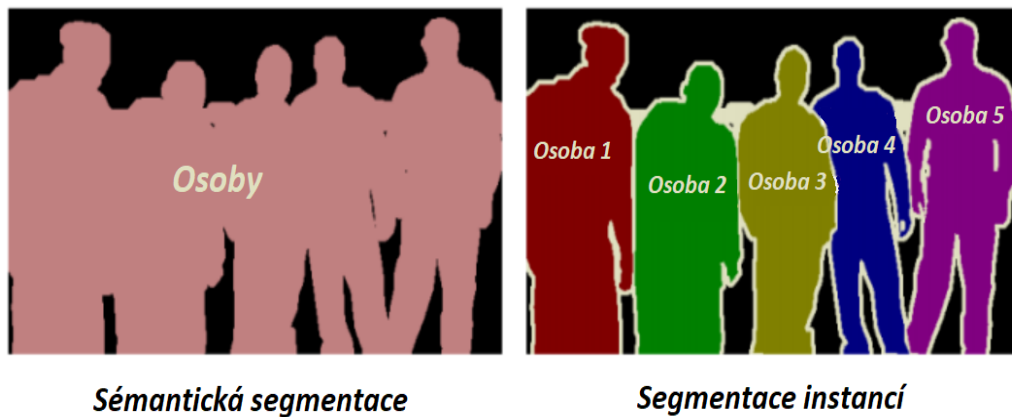
### 1.4.2.1 MASK R-CNN

V rámci rozsáhlého rozvoje v oblasti počítačového vidění dochází k řadě nejmodernějších úkonů včetně klasifikace a detekce objektů, sémantické segmentaci atd. Detekce objektů a výsledky sémantické segmentace se velmi rychle zlepšily během krátké doby, a to především díky vysoce výkonným systémům – fast/faster R-CNN a plně konvoluční neuronové síti (fully convolutional network; FCN).

Detekce objektů vytvoří rámeček kolem jednotlivých tříd (objektů) v obraze, tím se získá sada souřadnic ohraničujících rámečků. Segmentace instancí je náročná, jelikož vyžaduje správnou detekci všech objektů v obraze a zároveň vyžaduje

segmentovat každou instanci. Jedná se o přirozený další krok detekce objektu v přechodu od hrubého rozpoznávání instancí na úrovni pole k přesné klasifikaci na úrovni pixelů. Jedná se o kombinaci prvků počítačového vidění pro detekci objektů, kde se klasifikují jednotlivé objekty a zároveň se každý lokalizuje pomocí ohraničeného rámečku a prvků sémantické segmentace. V segmentaci je cílem zařadit každý pixel do pevné sady kategorií bez rozlišování instancí objektů.

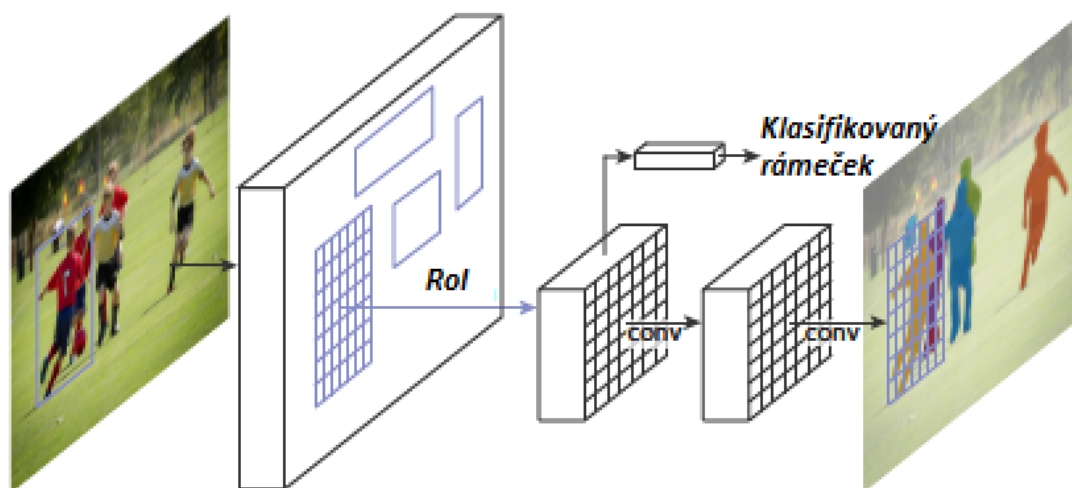
Obraz je souborem pixelů a jeho rozdělení do různých částí tzv. segmentů se využije pro přesnější zpracování obrazu. Pomocí segmentace obrazu se seskupují dohromady pixely s podobnými atributy. Vzniká „pixelová maska“ každé třídy v obraze, a proto přináší mnohem více podrobnějších informací.



**Obr. 7: Rozdíly v segmentaci obrazu**

*Zdroj: přejato z [https://www.analyticsvidhya.com/blog/2019/04/introduction-image-segmentation-techniques-python/?utm\\_source=blog&utm\\_medium=computer-vision-implementing-mask-r-cnn-image-segmentation](https://www.analyticsvidhya.com/blog/2019/04/introduction-image-segmentation-techniques-python/?utm_source=blog&utm_medium=computer-vision-implementing-mask-r-cnn-image-segmentation), upraveno*

Metoda „mask“ R-CNN je rozšířením pro „faster“ R-CNN, která ji rozšiřuje přidáním větve pro předpověď segmentačních masek v každé cílové oblasti (region of interest; RoI). Nová větev je paralelní s již existující větví pro klasifikaci a regresi ohraničujícího rámečku (Huang a kol., 2019; He a kol., 2017; Sharma, 2019).



**Obr. 8: Mask R-CNN segmentace instancí**

*Zdroj: přijato z [https://openaccess.thecvf.com/content\\_ICCV\\_2017/papers/He\\_Mask\\_R-CNN\\_ICCV\\_2017\\_paper.pdf](https://openaccess.thecvf.com/content_ICCV_2017/papers/He_Mask_R-CNN_ICCV_2017_paper.pdf), upraveno*

## 2. Cíl práce

Cílem této práce bylo

- sledování účinnosti vybraných benzimidazolových anthelmintik u tří kmenů vlasovky slezové pomocí metody EHT
- optimalizovat metodu EHT za pomoci strojového učení

Dílčí úkoly pak byly následující:

- nákaza ovcí vlasovkou slezovou (kmeny *ISE*, *IRE*, *WR*)
- odběr trusu nakažených ovcí
- izolace vajíček (kmen *ISE*, *IRE*, *WR*) z trusu ovcí
- mikroskopické hodnocení účinku anthelmintik u jednotlivých kmenů
- anotace mikroskopických obrázků pomocí programu „VGG image annotator“ (VIA)
- porovnání výsledků manuálního a počítačového vyhodnocení EHT

## 3. Experimentální část

### 3.1 Biologický materiál, technické vybavení, pomůcky, reagentie

#### 3.1.1 Biologický materiál

Pro tuto práci byla použita vajíčka vlasovky slezové (*Haemonchus contortus*) izolovaná z trusu ovcí. Ovce byly nakaženy citlivým kmenem *ISE* (Inbred Susceptible Edinburgh, MHco3) a rezistentními kmeny. Jednalo se o jihoafrický multirezistentní kmen *WR* (White-River) a kmen *IRE* (Inbred Resistant Edinburgh, MHco5) (Vokřál a kol., 2012, Yilmaz a kol., 2017). Zvířata byla ustájena v akreditovaných stájích v Zemědělské společnosti Býšť v krytých boxech s pravidelným přísunem čerstvé vody a potravy. Po celou dobu experimentu byla zvířata kontrolována pomocí FAMACHA© testu a pod odborným dohledem prof. RNDr. Jiřího Lamky, CSc. Bylo s nimi zacházeno dle postupů schválených etickou komisí Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy, podle protokolu MŠMT-25908/2014-9. Veškeré experimenty proběhly v souladu se zákonem č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání ve znění pozdějších předpisů.

#### 3.1.2 Technické vybavení

- Analytické váhy – Sartorius
- Automatické pipety – Eppendorf
- Centrifuga – Eppendorf, Centrifuge 5810R
- Inkubátor – Binder
- Inverzní mikroskop
- Magnetická míchačka
- Mikroskop s kamerovým systémem – Nikon Eclipse Ti
- Plotýnka
- Program pro anotaci VGG image annotator (VIA)
- Vortex – BioSan

### 3.1.3 Pracovní pomůcky

Laboratorní sklo, pinzeta, plastové mikrozkušavky Eppendorf, stojany na zkumavky a mikrozkušavky, sterilní pipetovací špičky, lžička, fotografické misky, stříčky, rukavice, sací papír, kónické zkumavky s víčkem, síta, 96-jamkové titrační destičky, háčky na záclony, leukoplast, sáčky na exkrementy, nůžky, buničina.

### 3.1.4 Chemikálie a reagenty

- Redestilovaná voda (ddH<sub>2</sub>O)
- Destilovaná voda (dH<sub>2</sub>O)
- Dimethyl sulfoxid (DMSO) – Sigma-Aldrich
- Sacharózový flotační roztok
- Tiabendazol – Sigma-Aldrich
- Albendazol – Sigma-Aldrich
- Lugolův roztok

## 3.2 Pracovní postupy

### 3.2.1 Odběr biologického materiálu



**Obr. 9: Ukázka ochrany proti kontaminaci močí**

*Zdroj: Vlastní fotografie*

Zdravá jehňata ve věku 6 měsíců byla perorálně infikována počtem 8 000 infekčních larev třetího vývojového stádia (L3). U jednotlivých jehňat se pečlivě zaznamenal podaný kmen. Čtyři týdny po infekci (p.i.) se jednotlivcům nasadily sáčky obepínající pouze řitní otvor pro odchycení stolice, a to z důvodu ochrany proti kontaminaci močí, která působí ovicidně. Sáčky se pevně připevnilly k vlně pomocí háčků na záclony a po 24 hodinách se odebraly a nasadily nové. Tento postup se opakoval po dobu 7 dní.



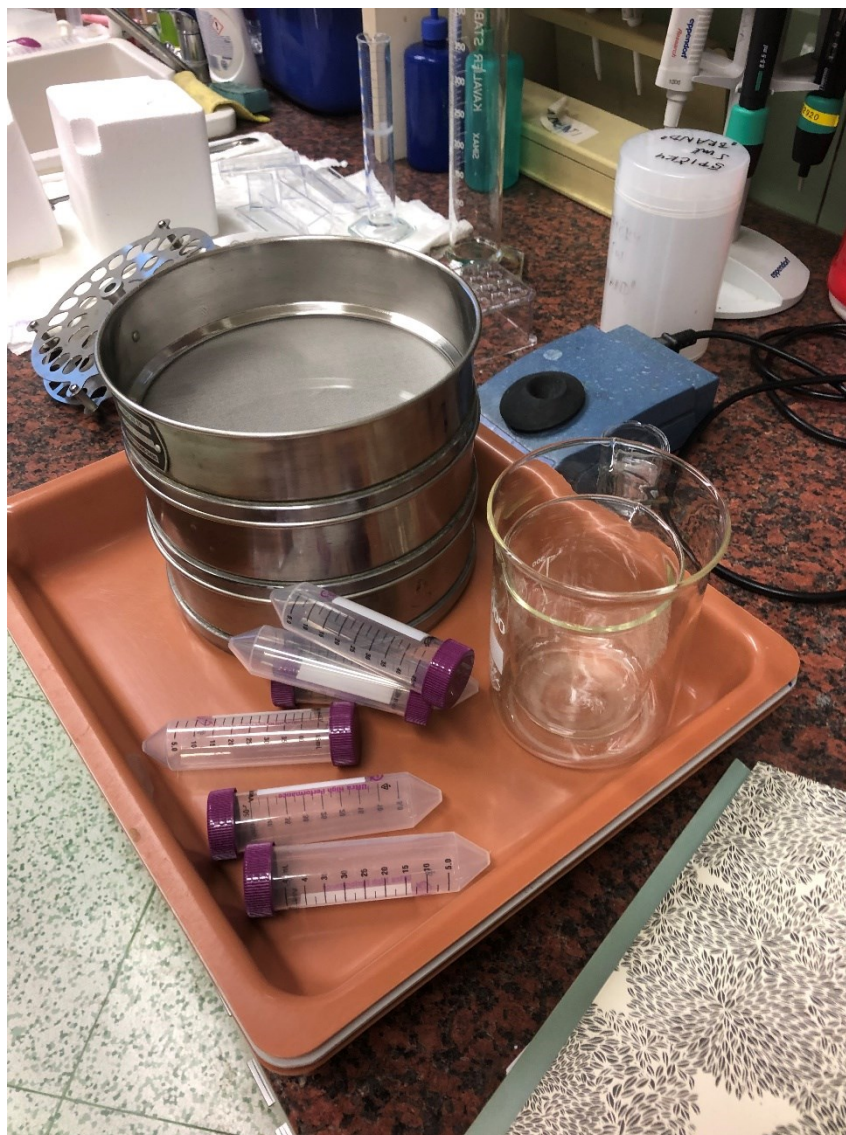
**Obr. 10: Ukázka nasazených sáčků u jehňat**

*Zdroj: Vlastní fotografie*

### **3.2.2 Izolace vajíček**

K izolaci vajíček ovčího trusu byla použita tři síta o rozměrech vnitřních ok 250, 100 a 25  $\mu\text{m}$ . Odebraný trus byl zalitý studenou kohoutkovou vodou v kádince a ponechám v digestoři po dobu nejméně 1 hodiny. Rozmočený trus se ručně rozmělnil a nalil na předem navlhčené síto s oky o rozměru 250  $\mu\text{m}$ . Pod síty byly položeny fotografické misky pro zachycení filtrátu ze sít. Manipulace se síty zahrnovala jemné ruční pasírování pomocí krouživých pohybů sítím. Propasírovaný trus přes síto se ještě několikrát promyl malým množstvím vody. Poté se filtrát přelil na síto s oky o rozměru 100  $\mu\text{m}$ . Opakoval se postup promývání malým množstvím vody a jemným ručním pasírováním. Filtrát se opět přelil na poslední síto s oky o rozměru 25  $\mu\text{m}$  a několikrát promyl vodou. Pomocí stříčky naplněné vodou se pečlivě omyl povrch celého síta a fotografické misky (stěny, záhyby, spodní část síta), aby nedošlo ke zbytečné ztrátě vajíček přichycených k povrchu, a slil se do kádinky. Takto vznikl filtrát s vajíčky *H. contortus* z trusu ovcí.



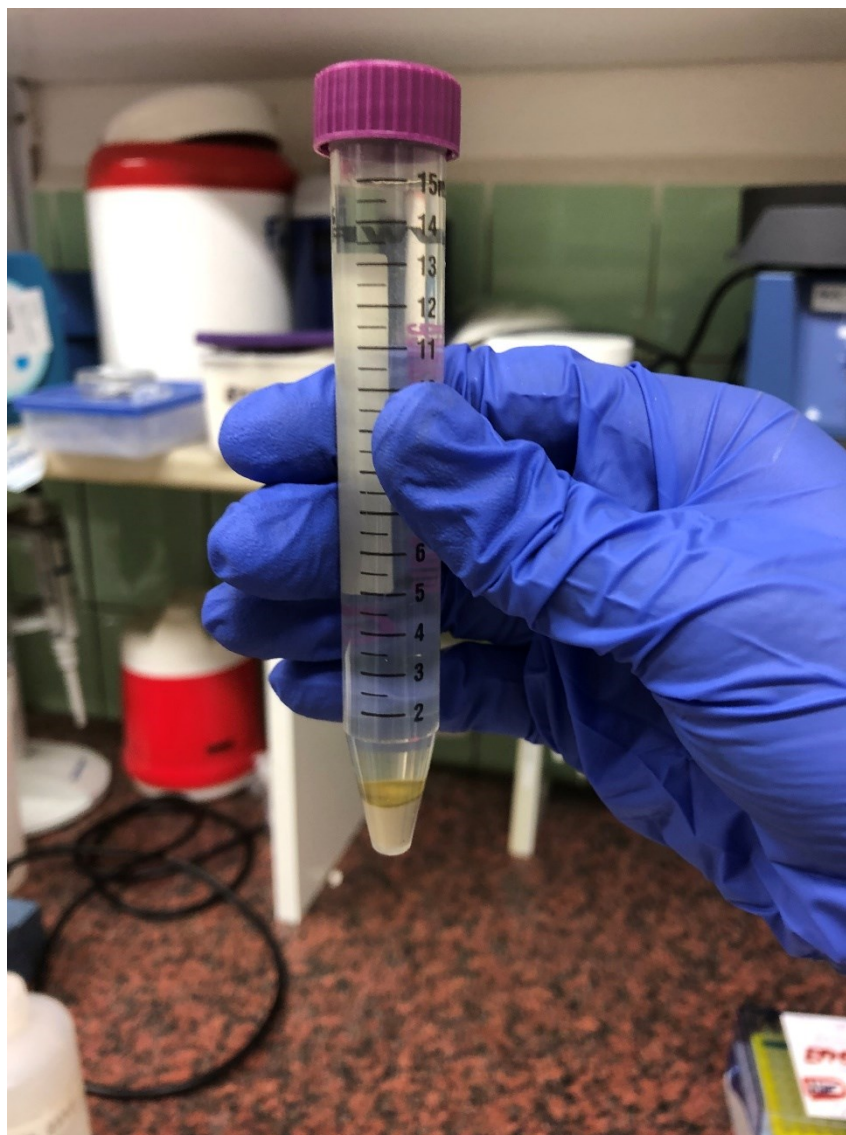


**Obr. 11: Pomůcky pro izolaci vajíček z ovčího trusu**

*Zdroj: Vlastní fotografie*

Získaný filtrát byl rozdělen do kónických zkumavek o objemu 50 ml, uzavřený víčkem a stočený v centrifuze (1600 rpm, 3 minuty). Po centrifugaci se odlil jedním tahem supernatant a ke zbylému sedimentu se přidal flotační roztok (čistý nasycený sacharózový roztok o hustotě  $1,27 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) do  $\frac{3}{4}$  zkumavky. Poté se promíchal flotační roztok se sedimentem pomocí kovové tyčinky a doplnil po rysku zkumavky. Pomocí překlpení se ještě jednou obsah zkumavky promíchal a nechal stočit v centrifuze (1000 rpm, 3 minuty). Po stočení se na povrchu vytvořil světlý povlak obsahující vajíčka, který se odebral (cca 3 ml) pipetou o objemu 1 ml do nové kónické zkumavky o objemu 15 ml a doplnil flotačním roztokem. Poté se opět zamíchal a nechal stočit v centrifuze (1000 rpm, 3 minuty). Tento krok byl opakován dle potřeby pro přečištění

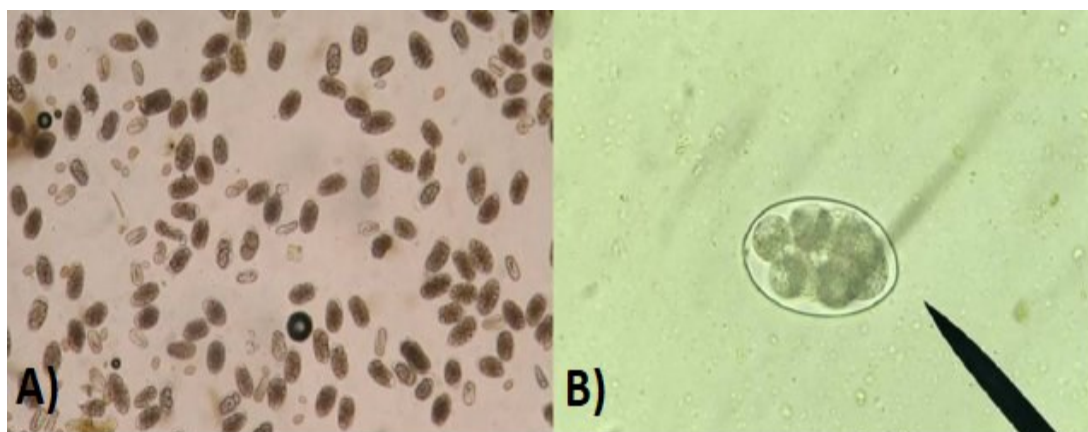
vajíček. Po dostatečném pročištění vajíček (cca 3–4x) se opět odebral světlý povrch (cca 2 ml) do nové zkumavky o objemu 15 ml. Současně se smyla do stejné zkumavky vajíčka zachycená ve víčku redestilovanou vodou. Zkumavka se doplnila vodou a nechala stočit v centrifuze (1600 rpm, 3 minuty). Po vylití supernatantu jedním tahem se přidalo trochu vody k sedimentu a zkumavky obsahující stejná vajíčka (*ISE*, *IRE*, *WR*) se slily do jedné zkumavky. Poté se zkumavka doplnila vodou a stočila v centrifuze (1600 rpm, 3 minuty). Po odlití supernatantu se k vajíčkům přidalo potřebné množství (cca 2 ml) studené vody z kohoutku a promíchalo se pomocí kovové tyčinky.



**Obr. 12: Sediment s vajíčky usazený na dně zkumavky po centrifugaci**

*Zdroj: Vlastní fotografie*

Ze získaných promíchaných suspenzí vajíček se ze středu zkumavky odebralo 5 x 10  $\mu$ l. Na podložní sklíčko se vytvořilo 5 kapek, ve kterých se pod mikroskopem pozorovala a počítala vajíčka. Po sečtení vajíček ve všech kapkách se vypočítal průměr a výsledek se přepočítal na 1 ml suspenze a podle celkového objemu suspenze se získal celkový počet vajíček.



**Obr. 13: Vajíčka *H. contortus* pod mikroskopem, zvětšení A) 10x; B) 20x**

Zdroj: přejato z

[https://www.researchgate.net/publication/318764487\\_Muerte\\_subita\\_por\\_alotrofagia\\_y\\_hemoncosis\\_en\\_una\\_cabra\\_Capra\\_aegagrus\\_hircus\\_del\\_departamento\\_de\\_cordoba\\_Colombia/figures?lo=1](https://www.researchgate.net/publication/318764487_Muerte_subita_por_alotrofagia_y_hemoncosis_en_una_cabra_Capra_aegagrus_hircus_del_departamento_de_cordoba_Colombia/figures?lo=1), upraveno

### **3.2.2.1 Příprava flotačního sacharóзовého roztoku**

Do veliké kádinky (cca 1000 ml) se přidalo zhruba 1 kg cukru krystal a 700–750 ml redestilované vody. Na magnetické míchačce se za pomoci míchadla nechal roztok mísit zhruba 30 minut. Po rozpuštění cukru se pomocí stupnice na hustoměru sledovala hustota, která měla mít hodnotu 1,27 g.cm<sup>-3</sup>. V případě potřeby se přisypal další cukr a nechal se promísit do požadované hodnoty. Vzniklý roztok byl rozdělen do uzavíratelných nádob pečlivě popsanych a přelepených páskou pro ochranu proti vylití. Nádoby byly uloženy do chladicí místnosti o teplotě 10 °C.

### **3.2.3 Egg hatch test (EHT) -sledování účinku albendazolu a tiabendazolu u jednotlivých kmenů**

EHT byl použit pro porovnání účinnosti benzimidazolových anthelmintik tiabendazolu (TBZ) a albendazolu (ABZ) u tří kmenů vlasovky slezové. Porovnávala se schopnost vajíček jednotlivých kmenů vyvíjet se do larev L1 v různých koncentracích těchto léčiv.

Test se prováděl v triplicátech na 96-jamkové destičce. Pro rozpuštění léčiv byl použit DMSO, a to nejprve na tvorbu zásobního roztoku o koncentraci 2 mM a jeho následné ředění (vždy 1:1) do dalších zásobních roztoků. Výsledné koncentrace v jednotlivých jamkách se získaly přidáním 199  $\mu$ l vodného roztoku s vajíčky, což bylo zhruba 60 vajíček/200  $\mu$ l v 1 jamce. Výsledné koncentrace léčiv v roztoku s vajíčky byly 0,039; 0,078; 0,156; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10  $\mu$ M a kontrola byla 0,5 % DMSO. Vajíčka se nechala inkubovat 48 hodin při teplotě 27 °C, poté se přidalo 10  $\mu$ l 1 % vodného Lugolova roztoku do každé jamky pro ukončení testu. V jednotlivých koncentracích a kontrolách se spočítal počet nevylihnutých vajíček a počet larev v prvním stádiu (L1) pod inverzním mikroskopem při zvětšení 40x. Za pomoci logaritmicko-koncentračního modelu se vypočítala hodnota  $IC_{50}$  (taková koncentrace, která zabrání líhnutí 50 % přítomných vajíček). Experiment byl nezávisle zopakován třikrát.

### **3.2.4 Aplikace strojového učení**

#### **3.2.4.1 Vylepšený EHT (improved egg hatch test; iEHT)**

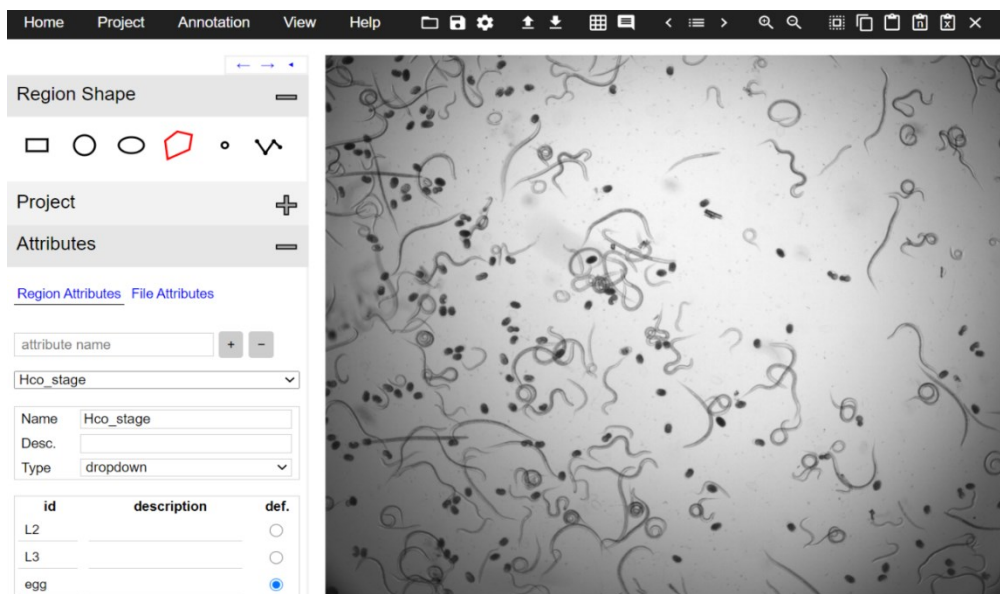
Po inkubaci 48 hodin při teplotě 27 °C ve výše uvedených koncentracích léčiv se 96-jamková destička vyfotila pomocí mikroskopu s kamerovým systémem. Vzniklé snímky se použily pro anotaci vajíček a larev v programu VGG image annotator (VIA) version 2.0.8. Tento program pracoval v internetovém prohlížeči.



**Obr. 14: Mikroskop s kamerovým systémem Nikon Eclipse Ti**

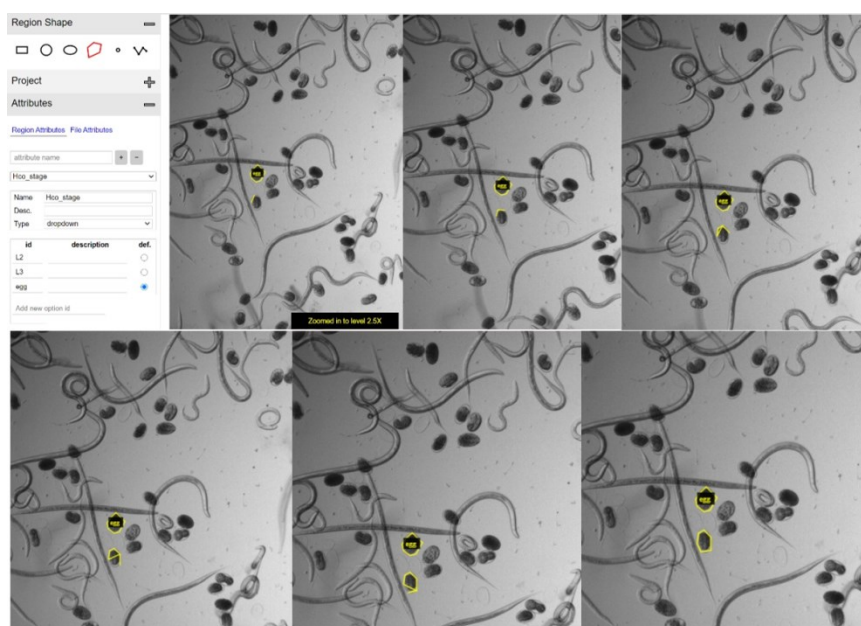
*Zdroj: Vlastní fotografie*

Na snímcích se označovala vajíčka a larvy pomocí funkce mnohoúhelníku. Pomocí této funkce se co nejpřesněji rozmístily body ohraničující daný útvar pro účel strojového učení rozpoznat jednotlivá stádia. Rozpoznávaná stádia *H. contortus* byla vajíčko (egg), druhé (L2) a třetí (L3) larvální stádium. V ojedinělých případech se na snímcích vyskytovala první (L1) larvální stádia, která se řadila spolu s larvami L2, a to kvůli minimálním morfologickým rozdílům, ale především pro jejich nevýznamnost pro tuto fázi strojového učení.



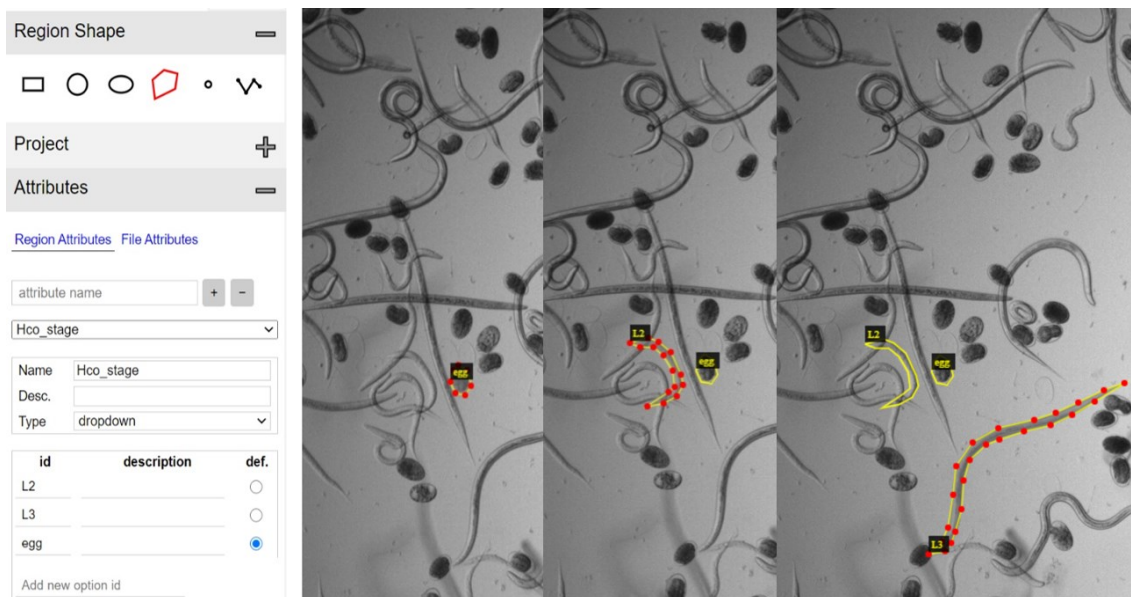
**Obr. 15: Snímek vytvořený pomocí mikroskopu Nikon Eclipse Ti s kamerovým systémem, otevřený v programu VIA. Jedná se o snímek jedné jamky na 96-jamkové destičce**

*Zdroj: Vlastní obrázek*



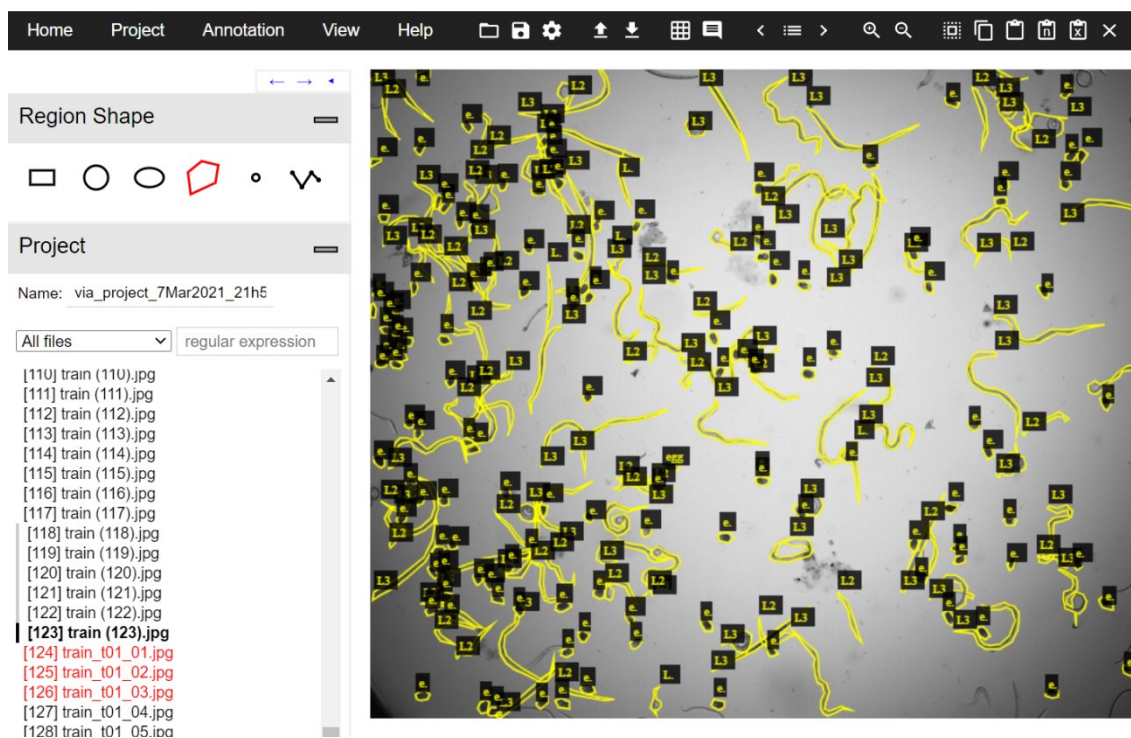
**Obr. 16: Označení vajíčka (egg) pomocí funkce ohraničení-mnohoúhelník**

*Zdroj: Vlastní obrázek*



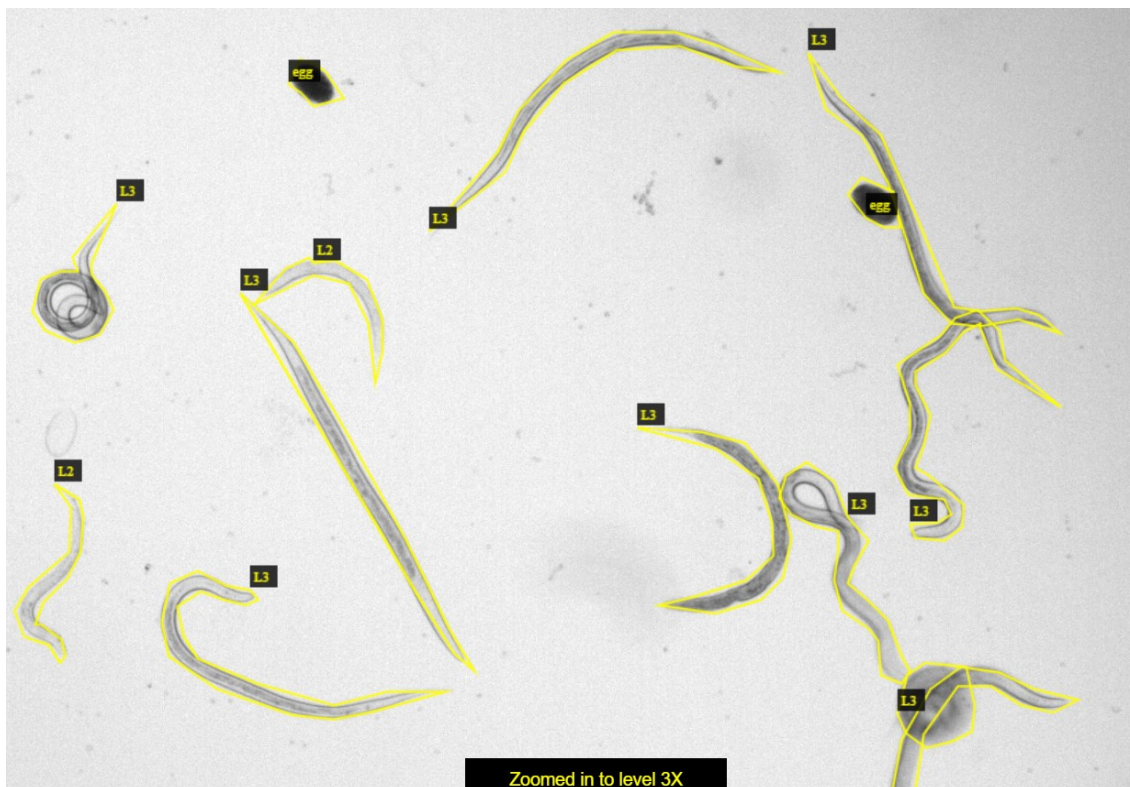
Obr. 17: Rozložení bodů u označovaných stádií *H. contortus*

Zdroj: Vlastní obrázek



Obr. 18: Snímek s označením všech stádií

Zdroj: Vlastní obrázek



**Obr. 19: Porovnání velikosti larev L2 a L3. V mnohých případech došlo k překryvu více larev, avšak pro označení jednotlivců to pro strojové učení nečinilo komplikace**

*Zdroj: Vlastní obrázek*



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	image_name	hco_stage	instance_number	y	x	equivalent_diameter	perimeter	area	major_axis_length	minor_axis_length	filled_area
2	test (1).jpg	L3	1	429,4185356	483,2059697	87,86879195	689,9787514	6064	193,3085269	74,3575258	6064
3	test (1).jpg	L3	2	170,3557038	1229,867912	97,68792345	368,8355698	7495	120,8904462	83,9948319	7495
4	test (1).jpg	L3	3	533,0597938	848,4639175	74,54992027	443,0376259	4365	116,2903938	65,14973024	4365
5	test (1).jpg	L3	4	458,0554117	833,1429311	70,12311403	237,8233785	3862	73,45561596	67,51947422	3862
6	test (1).jpg	L3	5	960,4379418	609,7418716	94,9046708	561,2802666	7074	139,5146059	95,47790734	7074
7	test (1).jpg	L3	6	1083,821383	1029,42374	100,2544411	633,0142853	7894	163,4168859	106,2022068	7894
8	test (1).jpg	L3	7	1476,52805	1308,355472	100,809415	848,5006127	7950	226,0331142	97,02221795	7950
9	test (1).jpg	L3	8	1562,852975	1167,863534	87,84390551	712,4701295	6033	241,6378174	67,48442993	6033
10	test (1).jpg	L3	9	1835,880441	657,0939608	91,14063194	832,4701295	6524	296,4325385	141,7152199	6524
11	test (1).jpg	L3	10	1384,843249	1727,083744	100,4003858	914,0458146	7917	265,6128984	83,16329377	7917
12	test (1).jpg	L3	11	1306,990748	1801,117994	97,44650083	827,5594872	7458	251,5296865	124,1481373	7458
13	test (1).jpg	L3	12	1419,548435	1779,793485	77,33308569	289,1492783	4697	92,40504455	67,38467316	4697
14	test (1).jpg	egg	13	1528,927966	1114,372175	42,46065467	155,2314934	1416	55,44814617	33,26227557	1416
15	test (1).jpg	egg	14	1440,787115	1232,563025	42,64019313	148,1604256	1428	49,78566388	37,11145456	1428
16	test (1).jpg	egg	15	1405,369538	1249,185601	55,31360254	191,509668	2403	65,86978351	46,85322331	2403
17	test (1).jpg	egg	16	1295,431563	1327,861083	49,92998126	176,0954544	1958	61,01012309	41,30793414	1958
18	test (1).jpg	egg	17	482,3159269	1147,713446	44,16563124	146,2253967	1532	50,5822913	38,85591586	1532
19	test (1).jpg	egg	18	332,3262887	1629,825258	49,69994685	169,7106781	1940	58,67233849	42,3935388	1940
20	test (1).jpg	egg	19	1289,641951	1484,09352	43,65821341	158,3259018	1497	58,03063804	33,31116953	1497
21	test (1).jpg	egg	20	940,337599	1873,117002	45,70980303	156,2253967	1641	54,51892903	38,53434121	1641
22	test (1).jpg	egg	21	1158,514339	2000,633416	45,19155042	156,6396103	1604	53,20724898	38,84366412	1604
23	test (1).jpg	egg	22	1423,739192	2233,978738	42,38562253	150,0243866	1411	55,93020571	32,3310855	1411
24	test (1).jpg	egg	23	1629,270062	2002,162551	49,75115752	172,2253967	1944	62,42353573	40,03384032	1944
25	test (1).jpg	L3	24	2023,194416	1038,101523	86,74586854	323,5573952	5910	93,09483417	82,24994373	5910
26	test (1).jpg	egg	25	571,921981	2139,522388	43,32153147	148,6690476	1474	54,78063706	34,50824536	1474
27	test (1).jpg	egg	26	740,7710643	2264,998891	47,92623643	159,6396103	1804	53,8454511	42,98988652	1804
28	test (1).jpg	egg	27	635,4261939	2369,258321	41,94778958	142,1248917	1382	48,26293185	36,67111212	1382
29	test (1).jpg	egg	28	619,0977742	2334,011129	40,02168596	136,0832611	1258	46,11508997	35,30161177	1258
30	test (1).jpg	egg	29	593,019103	2378,11711	39,15329375	138,1837662	1204	51,16410113	30,24643271	1204
31	test (1).jpg	egg	30	151,6509665	2159,232687	42,87840835	148,645707	1444	53,9502569	34,52167817	1444

Obr. 20: Ukázka výstupu dat v programu Microsoft Excel 2016

*image\_name*-název obrázku, ze kterého je červ/vajíčko (egg),

*hco\_stage*-stádium *H. contortus* vajíčko / L2 / L3

*x*-středobod objektu (červa/vajíčka) na ose x

*y*-středobod objektu na ose y

*equivalent\_diameter*-poloměr objektu

*perimeter*-obvod objektu pixelech [px]

*area*-označená plocha objektu v pixelech [px]

*major\_axis\_length*-nejdelší přímka, která lze objektem proložit [px]

*minor\_axis\_length*-délka kolmé přímky na *major\_axis* [px]

*filled\_area*-označená plocha [px], která zahrnuje např. i mezeru označenou v objektu

Zdroj: Vlastní obrázek

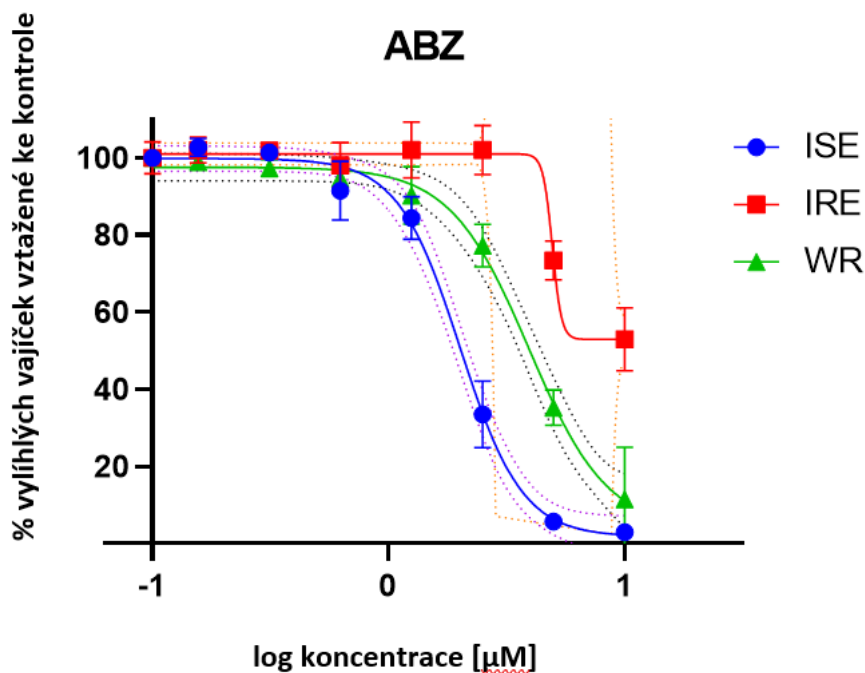
### 3.2.5 Statistická analýza

Vypočítané hodnoty a hodnoty z programu VIA byly zpracovány pomocí programu Microsoft Excel, kde se spočítalo procentuální zastoupení vylíhlých larev. Získaná hodnota sloužila k výpočtu vztaženému ke kontrole, která neobsahovala anthelmintikum. Získaná data se dále zpracovala v programu GraphPad Prism 9.0.2, pomocí funkce Sigmoidal 4PL byly vypočítány hodnoty  $IC_{50}$  pro zhodnocení účinnosti anthelmintik na líhnutí vajíček. Pro srovnání statisticky signifikantního rozdílu mezi  $IC_{50}$  jednotlivých kmenů (*ISE*, *IRE*, *WR*) se použila funkce one-way ANOVA. Pro zhodnocení účinnosti strojového učení se využila funkce T-TEST s hladinou významnosti  $P < 0,05$ .

## 4. Výsledky

### 4.1 Porovnání líhnutí vajíček třech kmenů (*ISE*, *IRE*, *WR*) vlasovky slezové po expozici léčiv (albendazol, tiabendazol)

Obr. 21 znázorňuje účinnost léčiva albendazol po inkubaci 48 hodin u tří kmenů vlasovky slezové – *ISE* (citlivý kmen), *IRE* (rezistentní kmen) a *WR* (multirezistentní kmen). Hodnota  $IC_{50}$  (Tab. 4) byla u každého kmene různá. Nejnižší hodnota byla u kmene *ISE* ( $IC_{50}=2,01 \mu\text{M}$ ). Naopak u kmene *IRE* byla hodnota nejvyšší ( $IC_{50}=4,93 \mu\text{M}$ ), a to více jak dvojnásobná v porovnání s *ISE* kmenem. Body na křivce znázorňují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku.

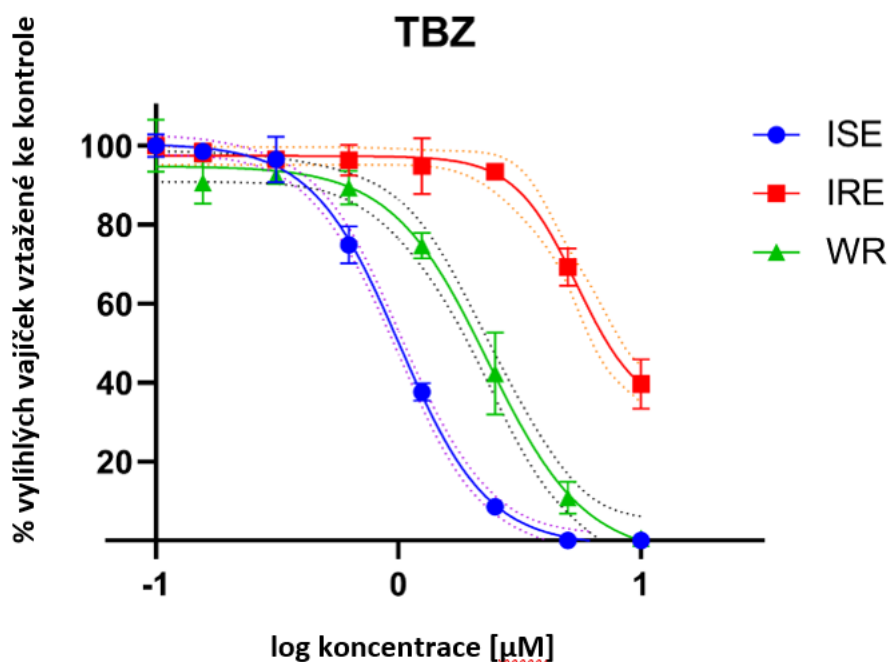


Obr. 21: Porovnání účinnosti léčiva albendazol (ABZ) u třech kmenů vlasovky slezové

Tab. 4: Hodnota  $IC_{50}$  [ $\mu\text{M}$ ] po expozici léčiva albendazol

Hodnota $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]			
ABZ	<i>ISE</i>	<i>IRE</i>	<i>WR</i>
	2,01	4,93	3,92

Obr. 22 znázorňuje vliv léčiva tiabendazol po inkubaci 48 hodin u tří kmenů vlasovky slezové – *ISE* (citlivý kmen), *IRE* (rezistentní kmen) a *WR* (multirezistentní kmen). Hodnota  $IC_{50}$  (Tab. 5) byla u každého kmene různá. Nejnížší hodnota byla u kmene *ISE* ( $IC_{50} = 1,01 \mu\text{M}$ ). Naopak u kmene *IRE* byla hodnota nejvyšší ( $IC_{50} = 5,43 \mu\text{M}$ ), téměř pětinašobná v porovnání s *ISE* kmenem. Body na křivce znázorňují průměr  $\pm$  směrodatnou odchylku.



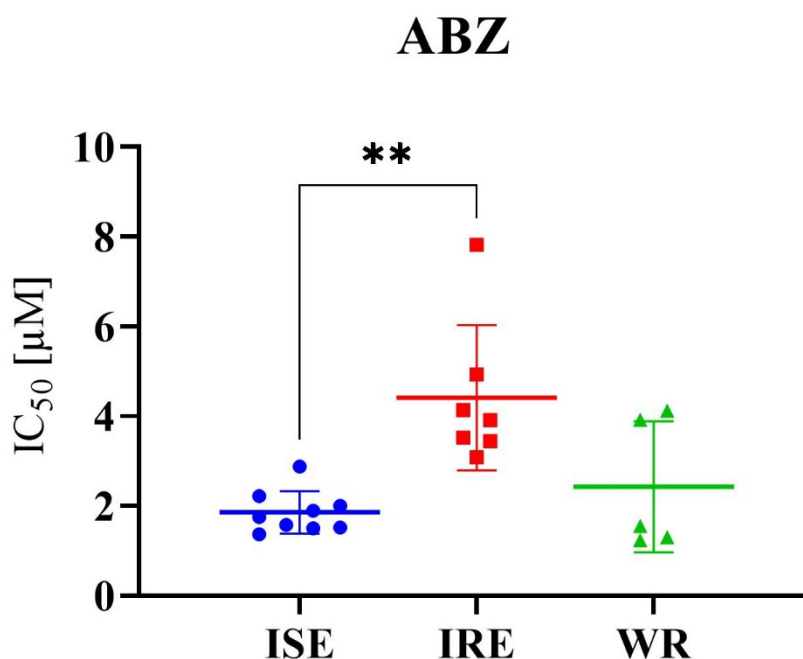
Obr. 22: Porovnání účinnosti léčiva tiabendazol (TBZ) u třech kmenů vlasovky slezové

Tab. 5: Hodnota  $IC_{50}$  [ $\mu\text{M}$ ] po expozici léčiva tiabendazol

Hodnota $IC_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]			
TBZ	<i>ISE</i>	<i>IRE</i>	<i>WR</i>
	1,01	5,43	2,34

## 4.2 Souhrnné porovnání jednotlivých kmenů vlasovky slezové po expozici léčiv (albendazol, tiabendazol)

Na Obr. 23 jsou znázorněny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu M$ ] (Tab. 6) ze všech měření tří nezávislých experimentů po expozici léčiva albendazol (ABZ). Hodnota  $IC_{50}$  u kmene *ISE* je  $1,86 \pm 0,44 \mu M$ , což poukazuje na vyšší citlivost oproti kmenu *IRE* se signifikantní změnou  $P < 0,05$ . Mezi kmeny *WR* a *ISE* není statisticky významný rozdíl v hodnotách  $IC_{50}$ . Počet bodů u jednotlivých kmenů znázorňuje počet provedených EHT – *ISE* (9 měření), *IRE* (7 měření), *WR* (5 měření).

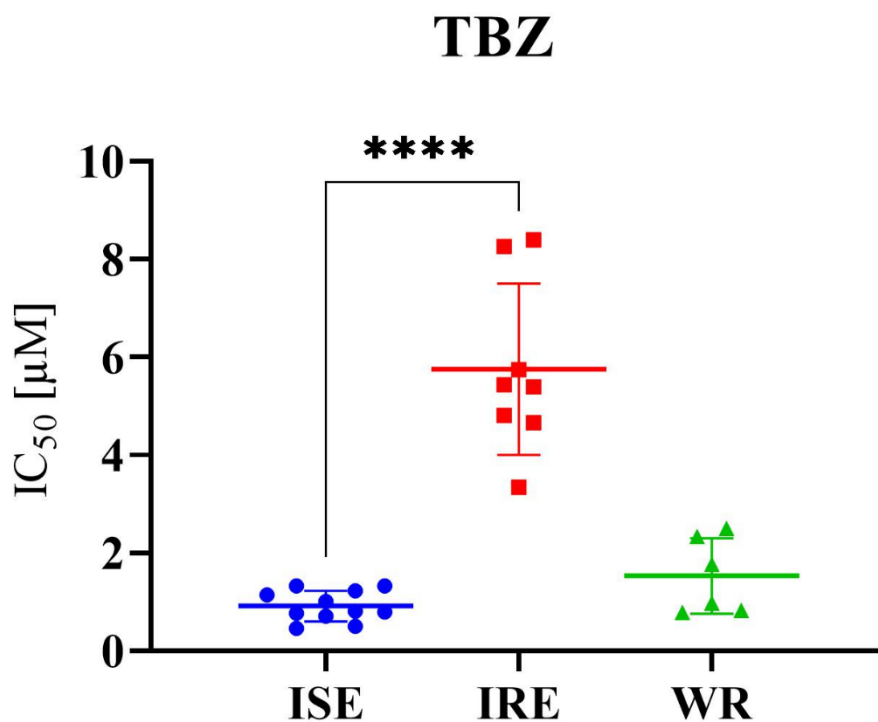


Obr. 23: Souhrnné porovnání jednotlivých kmenů vlasovky slezové po expozici léčiva albendazol (ABZ); \* signifikantní změna ( $P < 0,05$ )

Tab. 6: Souhrnné hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu M$ ] u jednotlivých kmenů po expozici léčiva albendazol

Hodnota $IC_{50}$ [ $\mu M$ ]			
ABZ	<i>ISE</i>	<i>IRE</i>	<i>WR</i>
	$1,86 \pm 0,44$	$4,41 \pm 1,50$	$2,43 \pm 1,31$

Na Obr. 24 jsou znázorněny hodnoty  $IC_{50}$  [ $\mu M$ ] (Tab. 7) ze všech měření tří nezávislých experimentů po expozici léčiva tiabendazol (TBZ). Hodnota  $IC_{50}$  u kmene *ISE* je  $0,92 \pm 0,30 \mu M$ , což poukazuje na vyšší citlivost oproti kmenu *IRE* se signifikantní změnou  $P < 0,05$ . Mezi kmeny *WR* a *ISE* není statisticky významný rozdíl v hodnotách  $IC_{50}$ . Počet bodů u jednotlivých kmenů znázorňuje počet provedených EHT – *ISE* (11 měření), *IRE* (8 měření), *WR* (6 měření).



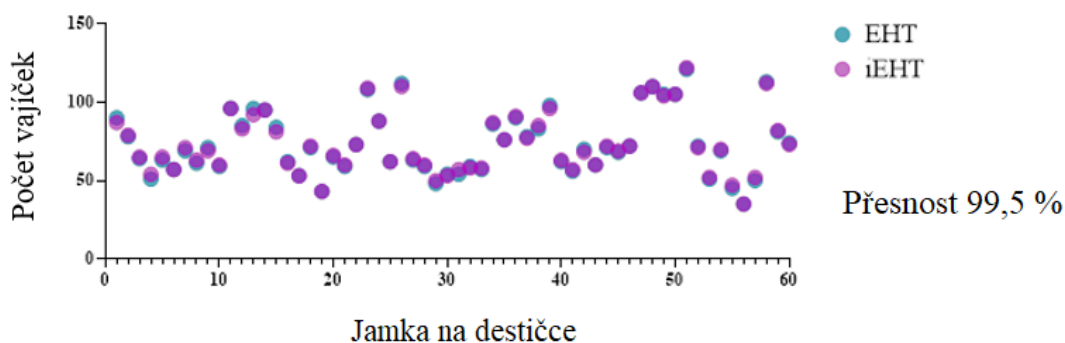
Obr. 24: Souhrnné porovnání jednotlivých kmenů vlasovky slezové po expozici léčiva tiabendazol (TBZ); \* signifikantní změna ( $P < 0,05$ )

Tab. 7: Souhrnné hodnoty  $IC_{50}$  u jednotlivých kmenů po expozici léčiva tiabendazol

Hodnota $IC_{50}$ [ $\mu M$ ]			
TBZ	<i>ISE</i>	<i>IRE</i>	<i>WR</i>
	$0,92 \pm 0,30$	$5,76 \pm 1,64$	$1,53 \pm 0,71$

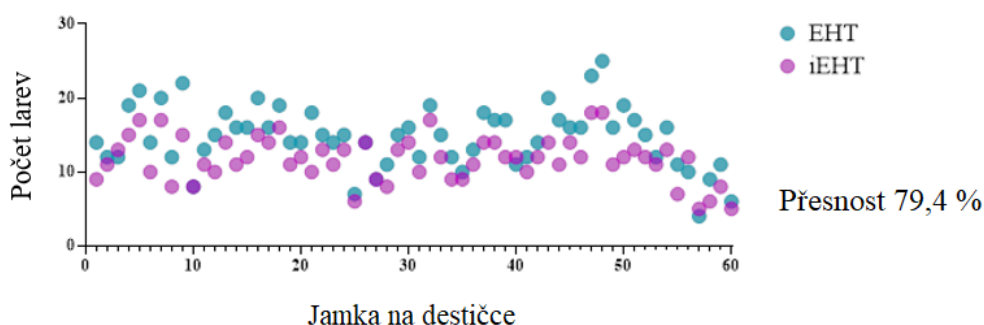
### 4.3 Srovnání metod EHT a iEHT

Obr. 25 znázorňuje porovnání výsledků testu líhnutí vajíček (egg hatch test; EHT) po expozici léčiv (albendazol, tiabendazol) a vylepšeného iEHT o strojové učení (improved egg hatch test; iEHT) u vajíček vlasovky slezové. Z grafu lze vidět shodu obou metod s přesností 99,5 %.



**Obr. 25: Porovnání účinnosti metod EHT a iEHT v počtu vajíček vlasovky slezové**

Obr. 26 znázorňuje porovnání výsledků testu líhnutí vajíček (egg hatch test; EHT) po expozici léčiv (albendazol, tiabendazol) a vylepšeného iEHT o strojové učení (improved egg hatch test; iEHT) u larev vlasovky slezové. Z grafu je patrná shoda obou metod s přesností 79,4 %, kde iEHT poukazuje spíše na nižší počty larev oproti EHT.



**Obr. 26: Porovnání účinnosti metod EHT a iEHT v počtu larev vlasovky slezové**

## 4.4 Deskriptivní analýza ze strojového učení

V Tab. 8 a 9 jsou znázorněny průměrné hodnoty  $\pm$  směrodatné odchylky obvodů a ploch vajíček a larev vlasovky slezové, získané pomocí programu VIA. Jedná se o dvě sady hodnot – trénovací a testovací sada. Mezi trénovací a testovací sadou nebyl pozorován signifikantní rozdíl. Z Tab. 8 a 9 je patrný vyšší rozptyl hodnot obvodů a ploch u larev oproti vajíčkům.

**Tab. 8: Trénovací sada – průměr hodnot obvodů a ploch u vajíček a larev vlasovky slezové**

	<b>Celkový počet (n)</b>	<b>Průměrný obvod v pixelech [px]</b>	<b>Průměrná plocha v pixelech [px]</b>
<b>Vajíčko</b>	3385	133,11 $\pm$ 27,03	1128,41 $\pm$ 275,56
<b>L2</b>	1591	388,23 $\pm$ 72,91	1625 $\pm$ 483,84
<b>L3</b>	1820	668,17 $\pm$ 214,39	4973,95 $\pm$ 1335,85

**Tab. 9: Testovací sada – průměr hodnot obvodů a ploch u vajíček a larev vlasovky slezové**

	<b>Celkový počet (n)</b>	<b>Průměrný obvod v pixelech [px]</b>	<b>Průměrná plocha v pixelech [px]</b>
<b>Vajíčko</b>	2488	132,36 $\pm$ 11,38	1148,42 $\pm$ 195,58
<b>L2</b>	558	373,61 $\pm$ 77,53	2137,39 $\pm$ 596,42
<b>L3</b>	539	661,1 $\pm$ 216,39	5143,16 $\pm$ 1420,65



## 5. Diskuse

Vlasovka slezová (*Haemonchus contortus*) je významný patogen u malých přežvýkavců, především u ovcí. Díky jeho vhodným vlastnostem, mezi které patří především vysoká plodnost, ideální velikost dospělců a snadné nakažení a udržování infekce v rádech tisíců červů v hostitelích, se stal hojně využívaným experimentálním organismem. Zajímavá a často studovaná schopnost vlasovky slezové je rychlá tvorba rezistence, a to ke všem hlavním třídám anthelmintik (Šormová, 2020).

Rezistence k anthelmintikům mezi parazity ovcí se vyskytuje již po čtyři desetiletí. Ve většině zemí se anthelmintická rezistence vyskytuje ve zvýšené míře k benzimidazolům. Účinné monitorování rezistence je velmi důležité pro udržení vysoké účinnosti dostupných léčiv, čímž dochází k zabránění další selekce rezistence, zejména tam, kde se vyskytuje pouze v malé části populace červů. To je možné v případě dostatečně citlivých metod pro detekci anthelmintické rezistence (Varády a kol., 2007).

Jedním z cílů této práce bylo sledování účinnosti benzimidazolových anthelmintik – albendazolu a tiabendazolu u vajíček vlasovky slezové v různých koncentracích a následné pozorování jejich vývoje v další stádia pomocí EHT. Nejprve bylo nutné infikovat ovce třemi kmeny vlasovky slezové (*ISE*, *IRE*, *WR*). Důležitým a zcela zásadním krokem celého experimentu byl kvalitní odběr biologického materiálu, exkrementů. Jelikož se jednalo o samice jehňat, byl odběr limitován ze dvou důvodů. Exkrementy nesměly být kontaminovány močí a muselo být zcela jasné, o jaký kmen se jedná. Z toho vyplývá, že odběr komplikovalo anatomické postavení ústí vylučovací a trávicí soustavy, a proto jsme pro odběr zvolili sáčkovou metodu. Díky odběru exkrementů do sáčků správně připevněných na jednotlivé označené ovce nemohlo dojít k záměně kmenů.

Z trusu byla izolována vajíčka a ta byla následně použita na testování účinku albendazolu a tiabendazolu u vlasovek ze tří kmenů *ISE*, *IRE* a *WR*. Vajíčka byla inkubována v roztoku s koncentrací léčiv 0,039; 0,078; 0,156; 0,313; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10  $\mu\text{M}$ . Po 48 hodinách byly vylíhlé larvy a vajíčka počítány pod mikroskopem. Z výsledků byly určeny hodnoty  $\text{IC}_{50}$ . Nejmenší hodnoty pro obě léčiva byly zaznamenány u citlivého kmene *ISE*. Naopak nejvyšší hodnoty  $\text{IC}_{50}$  byly u rezistentního kmene *IRE*. Multirezistentní kmen *WR* podle hodnoty  $\text{IC}_{50}$  u obou léčiv nevykazoval takovou rezistenci jako kmen *IRE*. To potvrdilo náš předpoklad

(Kellerová a kol., 2020), že kmen *IRE* je rezistentní hlavně na benzimidazoly, zatímco u kmene *WR* byla popsána rezistence na ivermektin a jiná anthelmintika.

Nakažení ovcí a následné experimenty s vajíčky byly provedeny dvakrát v půlročním rozmezí. Celkový počet měření byl následující: *ABZ – ISE* (9 měření), *IRE* (7 měření), *WR* (5 měření); *TBZ – ISE* (11 měření), *IRE* (8 měření), *WR* (6 měření). U jednoho experimentu chyběly nakažené ovce kmenem *WR*, a proto bylo u tohoto kmenu provedeno méně měření. V některých případech se stávalo, že odběrový sáček odpadl anebo se do sáčku dostala moč, která působí na vajíčka ovicidně. Tyto faktory také ovlivnily počty a úspěšnost měření. U všech měření EHT se opět potvrdila nejvyšší citlivost k použitým léčivům u kmene *ISE* a nejnižší u kmene *IRE*. Obr. 23 a 24 znázorňuje statisticky významnou změnu v citlivosti kmene *IRE* vůči *ISE* s hladinou významnosti  $P < 0,05$ . Mezi kmeny *WR* a *ISE* není statisticky významný rozdíl v hodnotách  $IC_{50}$  kvůli nižší rezistenci kmenu *WR* oproti *IRE* k benzimidazolovým přípravkům.

Hlavním cílem této práce bylo optimalizovat metodu EHT pomocí strojového učení. Pro strojové učení se využil program VGG image annotator (VIA). Jedná se o jednoduchý software pro manuální anotaci obrázků, ale také zvuku a videa. Tento software je vyvíjen vizuální geometrickou skupinou (visual geometry group-VGG) a povolen licencí BSD, která umožňuje jeho využití v jakémkoli akademickém projektu nebo pro komerční aplikaci. VIA umožňuje člověku, který anotuje, definovat a popsat prostorové oblasti v obraze. Anotace lze poté exportovat ve formátu prostého textu JSON či CSV a díky tomu je možné zpracovat je dalšími softwarovými nástroji (Dutta a Zeisserman, 2019).

Strojové učení probíhalo ve dvou fázích. První trénovací fáze zahrnovala anotaci, ve které bylo manuálně anotováno 6 796 objektů. Objekty zahrnovaly vajíčka (3385), larvy L2 (1591) a larvy L3 (1820) vlasovky slezové. Snímky pro anotaci se pořídily pomocí mikroskopu s kamerovým systémem (Nikon Eclipse). Druhá testovací fáze zahrnovala samotné strojové učení na základě trénovací fáze. Výsledky ze strojového učení se porovnávaly s výsledky EHT a ukázaly (viz Obr. 25 a 26) vyšší přesnost strojového určení u vajíček (99,5 %) na rozdíl od larev (79,4 %). V ohledu na vysokou heterogenitu tvaru larev můžeme brát tyto výsledky za optimální.

Podle anotovaných snímků v programu VIA se získala data o hodnotách obvodů a ploch jednotlivých objektů v pixelech [px]. Je možné pozorovat (Tab. 8 a 9) vyšší rozptyl průměrných hodnot obvodů a ploch u larev oproti vajíčkům. To nám také

poukazuje na náročnost rozpoznávání larev oproti vajíčkům u strojového učení z hlediska heterogenity tvarů.

Do budoucna by strojové učení mohlo usnadnit hodnocení EHT a díky tomu zefektivnit a zrychlit diagnostiku případné hemonchózy způsobené vlasovkou slezovou (*Haemonchus contortus*). Tato práce poskytla podklady pro další využití strojového učení například v oblasti určení motility vlasovky slezové.

## 6. Závěr

V rámci diplomové práce

- byly ovce nakaženy vlasovkou slezovou (kmeny *ISE*, *IRE*, *WR*)
- byl sbírán trus nakažených ovcí
- z trusu ovcí byla izolována vajíčka (kmen *ISE*, *IRE*, *WR*)
- byla testována účinnost anthelmintik albendazolu a tiabendazolu u vlasovky slezové pomocí EHT s mikroskopickým vyhodnocením
- byla provedena anotace mikroskopických obrázků pomocí programu „VGG image annotator“(VIA)
- výsledky získané manuálním vyhodnocením EHT a počítačovým vyhodnocením (iEHT) byly zhodnoceny a porovnány
- iEHT v porovnání s EHT vykazoval přesnost vyšší u vajíček, avšak nižší u larev vzhledem k jejich heterogenním tvarům

Závěrem lze konstatovat, že strojové učení je vhodnou optimalizací EHT a takto vylepšený iEHT může být využit pro zjednodušené a efektivnější monitorování rezistentních kmenů i pro vývoj nových potenciálních anthelmintik.

## POUŽITÉ ZKRATKY

Zkratka	Význam zkratky	Český význam zkratky
ABZ	<i>albendazole</i>	albendazol
ANN	<i>artificial neural network</i>	umělá neuronová síť
AR	<i>anthelmintic resistance</i>	anthelmintická rezistence
BCS	<i>body condition score</i>	skóre stavu těla
CNN	<i>convolutional neural network</i>	konvoluční neuronová síť
dH <sub>2</sub> O	<i>distilled water</i>	destilovaná voda
ddH <sub>2</sub> O	<i>double-distilled water</i>	redestilovaná voda
DMSO	<i>dimethylsulfoxid</i>	dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	deoxyribonukleové kyseliny
EHT	<i>egg hatch test</i>	test líhnutí vajíček
fast R-CNN	<i>fast R-CNN</i>	rychlý R-CNN
faster R-CNN	<i>faster R-CNN</i>	rychlejší R-CNN
FCN	<i>fully convolutional network</i>	plně konvoluční neuronová síť
FEC	<i>faecal egg count</i>	počet vajíček v trusu
GIN	<i>gastrointestinal nematode</i>	gastrointestinální hlístice
Ht	<i>hematocrit</i>	hematokrit
iEHT	<i>improved egg hatch test</i>	vylepšený egg hatch test
IRE	<i>Inbred resistant Edinburgh</i>	rezistentní kmen vlasovky slezové
ISE	<i>Inbred susceptible Edinburgh</i>	citlivý kmen vlasovky slezové
LAMP	loop-mediated isothermal amplification	smýčkově zprostředkovaná izotermická amplifikace
IC <sub>50</sub>	inhibitory concentration 50	inhibiční koncentrace 50
LDT	larval development test	test vývoje larev
MASK R-CNN	<i>mask R-CNN</i>	maska R-CNN
P	<i>p-value</i>	hladina významnosti
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	polymerázová řetězová reakce
p.i.	<i>post infection</i>	po infekci
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i>	kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RoI	<i>region of interest</i>	cílová oblast
R-CNN	<i>region based convolutional neural network</i>	regionální CNN
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>	polymorfismus jednoho nukleotidu
SSD	<i>single shot detector</i>	detektor jednoho snímku
SVMs	<i>support vector machines</i>	podpora vektorových strojů
TBZ	<i>thiabendazole</i>	tiabendazol
TST	<i>targeted selective treatment</i>	cílená selektivní léčba
TT	<i>targeted treatments</i>	cílená léčba
VIA	<i>VGG image annotator</i>	-
WR	<i>white-river</i>	multirezistentní kmen vlasovky slezové

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Užítkovost ovčí.....	10
Tab. 2: Přehled parazitů u ovčí (střevo a slez).....	12
Tab. 3: Přehled léčiv u <i>H. contortus</i> .....	17
Tab. 4: Hodnota IC <sub>50</sub> [μM] po expozici léčiva albendazol .....	43
Tab. 5: Hodnota IC <sub>50</sub> [μM] po expozici léčiva tiabendazol .....	44
Tab. 6: Souhrnné hodnoty IC <sub>50</sub> [μM] u jednotlivých kmenů po expozici léčiva albendazol .....	45
Tab. 7: Souhrnné hodnoty IC <sub>50</sub> u jednotlivých kmenů po expozici léčiva tiabendazol ..	46
Tab. 8: Trénovací sada – průměr hodnot obvodů a ploch u vajíček a larev vlasovky slezové .....	48
Tab. 9: Testovací sada – průměr hodnot obvodů a ploch u vajíček a larev vlasovky slezové .....	48

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Jednotlivá stádia <i>H. contortus</i> .....	14
Obr. 2: Životní cyklus <i>H. contortus</i> .....	14
Obr. 3: FAMACHA© test .....	20
Obr. 4: Klastrovaný algoritmus K-means (nejjednodušší algoritmus pro učení bez dozoru), podle kterého jsou data seskupena do skupin na základě podobnosti.....	23
Obr. 5: Schéma neuronové sítě .....	24
Obr. 6: Architektura R-CNN .....	25
Obr. 7: Rozdíly v segmentaci obrazu.....	26
Obr. 8: Mask R-CNN segmentace instancí.....	27
Obr. 9: Ukázka ochrany proti kontaminaci močí.....	31
Obr. 10: Ukázka nasazených sáčků u jehňat.....	32
Obr. 11: Pomůcky pro izolaci vajíček z ovčího trusu.....	33
Obr. 12: Sediment s vajíčky usazený na dně zkumavky po centrifugaci .....	34
Obr. 13: Vajíčka <i>H. contortus</i> pod mikroskopem, zvětšení A) 10x; B) 20x .....	35
Obr. 14: Mikroskop s kamerovým systémem Nikon Eclipse Ti.....	37
Obr. 15: Snímek vytvořený pomocí mikroskopu Nikon Eclipse Ti s kamerovým systémem, otevřený v programu VIA. Jedná se o snímek jedné jamky na 96-jamkové destičce.....	38
Obr. 16: Označení vajíčka (egg) pomocí funkce ohraničení-mnohoúhelník.....	38
Obr. 17: Rozložení bodů u označovaných stádií <i>H. contortus</i> .....	39
Obr. 18: Snímek s označením všech stádií .....	39
Obr. 19: Porovnání velikosti larev L2 a L3. V mnohých případech došlo k překryvu více larev, avšak pro označení jednotlivců to pro strojové učení nečinilo komplikace .....	40
Obr. 20: Ukázka výstupu dat v programu Microsoft Excel 2016.....	41
Obr. 21: Porovnání účinnosti léčiva albendazol (ABZ) u třech kmenů vlasovky slezové .....	43
Obr. 22: Porovnání účinnosti léčiva tiabendazol (TBZ) u třech kmenů vlasovky slezové .....	44
Obr. 23: Souhrnné porovnání jednotlivých kmenů vlasovky slezové po expozici léčiva albendazol (ABZ); * signifikantní změna ( $P < 0,05$ ).....	45
Obr. 24: Souhrnné porovnání jednotlivých kmenů vlasovky slezové po expozici léčiva tiabendazol (TBZ); * signifikantní změna ( $P < 0,05$ ).....	46

Obr. 25: Porovnání účinnosti metod EHT a iEHT v počtu vajíček vlasovky slezové.... 47

Obr. 26: Porovnání účinnosti metod EHT a iEHT v počtu larev vlasovky slezové ..... 47



## POUŽITÁ LITERATURA

AMARANTE, Alessandro Francisco Talamini do. Why is it important to correctly identify *Haemonchus species*? *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* [online]. 2011, **20**(4), 263-268 [cit. 2021-8-11]. ISSN 1984-2961. Dostupné z: doi:10.1590/S1984-29612011000400002

BALTRUŠIS, Paulius, Michaela KOMÁROMYOVÁ, Marián VÁRADY, Georg VON SAMSON-HIMMELSTJERNA a Johan HÖGLUND. Assessment of the F200Y mutation frequency in the  $\beta$  tubulin gene of *Haemonchus contortus* following the exposure to a discriminating concentration of thiabendazole in the egg hatch test. *Experimental Parasitology* [online]. 2020, **217** [cit. 2021-8-11]. ISSN 00144894. Dostupné z: doi:10.1016/j.exppara.2020.107957

BESIER, R.B., L.P. KAHN, N.D. SARGISON a J.A. VAN WYK. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends* [online]. Elsevier, 2016, 2016., 181-238 [cit. 2021-8-11]. Advances in Parasitology. ISBN 9780128103951. Dostupné z: doi:10.1016/bs.apar.2016.02.024

BESIER, R.B., L.P. KAHN, N.D. SARGISON a J.A. VAN WYK. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends* [online]. Elsevier, 2016, 2016, s. 181-238 [cit. 2021-8-11]. Advances in Parasitology. ISBN 9780128103951. Dostupné z: doi:10.1016/bs.apar.2016.02.024

BHARATI, Puja a Ankita PRAMANIK. Deep Learning Techniques—R-CNN to Mask R-CNN: A Survey. *Computational Intelligence in Pattern Recognition* [online]. Singapore: Springer Singapore, 2020, 2020-08-18., 657-668 [cit. 2021-8-11]. Advances in Intelligent Systems and Computing. ISBN 978-981-13-9041-8. Dostupné z: doi:10.1007/978-981-13-9042-5\_56

BI, Qifang, Katherine E GOODMAN, Joshua KAMINSKY a Justin LESSLER. What is Machine Learning? A Primer for the Epidemiologist. *American Journal of Epidemiology* [online]. 2019 [cit. 2021-8-11]. ISSN 0002-9262. Dostupné z: doi:10.1093/aje/kwz189

CABITZA, Federico a Giuseppe BANFI. Machine learning in laboratory medicine: waiting for the flood? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* [online]. 2018, **56**(4), 516-524 [cit. 2021-8-11]. ISSN 1437-4331. Dostupné z: doi:10.1515/cclm-2017-0287

CALVETE, Carlos, José M. GONZÁLEZ, Luis M. FERRER, Juan J. RAMOS, Delia LACASTA, Ignacio DELGADO a Joaquín URIARTE. Assessment of targeted selective treatment criteria to control subclinical gastrointestinal nematode infections on sheep farms. *Veterinary Parasitology* [online]. 2020, **277** [cit. 2021-8-11]. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetpar.2019.109018

CASTRO, Gilbert A. Helminths: Structure, Classification, Growth, and Development. *Medical Microbiology. 4th edition.* [online]. University of Texas Medical, 1996 [cit. 2021-8-11]. Dostupné z: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8282/#\\_A4555\\_](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8282/#_A4555_)

CINTRA, Maria Christine Rizzon, Rüdiger Daniel OLLHOFF a Cristina Santos SOTOMAIOR. Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in growing lambs. *Veterinary Parasitology* [online]. 2018, **251**, 106-111 [cit. 2021-8-11]. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetpar.2018.01.005

COSTA-JUNIOR, Livio M., Carolina R. SILVA, Alexandra M.S. SOARES, Alan S. MENEZES, Maria R.L. SILVA, Alessandro F.T. AMARANTE, Erivelton F. COSTA a Luciana M.R. ALENCAR. Assessment of biophysical properties of *Haemonchus contortus* from different life cycle stages with atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* [online]. 2020, **209** [cit. 2021-8-11]. ISSN 03043991. Dostupné z: doi:10.1016/j.ultramic.2019.112862

DĚDKOVÁ, Tereza. *Navození rezistence hlístic na albendazol* [online]. Hradec Králové, 2015 [cit. 2021-8-11]. Dostupné z: [https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/63700/DPTX\\_2013\\_1\\_11160\\_0\\_416432\\_0\\_141096.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/63700/DPTX_2013_1_11160_0_416432_0_141096.pdf?sequence=1&isAllowed=y). Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce Prof. RNDr. Lenka Skálová, Ph.D.

DOLINSKÁ, Michaela, Oksana IVANIŠINOVÁ, Alžbeta KÖNIGOVÁ a Marián VÁRADY. Anthelmintic resistance in sheep gastrointestinal nematodes in Slovakia detected by in-vitro methods. *BMC Veterinary Research* [online]. 2014, **10**(1) [cit. 2021-8-11]. ISSN 1746-6148. Dostupné z: doi:10.1186/s12917-014-0233-4

DOMKE, Atle VM, Christophe CHARTIER, Bjørn GJERDE, Nils LEINE, Synnøve VATN, Olav ØSTERÅS a Snorre STUEN. Worm control practice against gastrointestinal parasites in Norwegian sheep and goat flocks. *Acta Veterinaria Scandinavica* [online]. 2011, **53**(1) [cit. 2021-8-11]. ISSN 1751-0147. Dostupné z: doi:10.1186/1751-0147-53-29

DUTTA, Abhishek a Andrew ZEISSERMAN. *The VIA Annotation Software for Images, Audio and Video* [online]. 2019 [cit. 2021-8-11]. Dostupné z: <https://arxiv.org/abs/1904.10699>

EMERY, David L., Peter W. HUNT a Leo F. LE JAMBRE. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *International Journal for Parasitology* [online]. 2016, **46**(12), 755-769 [cit. 2021-8-11]. ISSN 00207519. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpara.2016.07.001

GILL, Pooria a Arash Hadian AMREE. AS-LAMP: A New and Alternative Method for Genotyping. *Avicenna J Med Biotechnol.* [online]. 2020., 2-8 [cit. 2021-8-11]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32153732/>

GOECKS, Jeremy, Vahid JALILI, Laura M. HEISER a Joe W. GRAY. How Machine Learning Will Transform Biomedicine. *Cell* [online]. 2020, **181**(1), 92-101 [cit. 2021-8-11]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2020.03.022

HANDELMAN, G. S., H. K. KOK, R. V. CHANDRA, A. H. RAZAVI, M. J. LEE a H. ASADI. EDoctor: machine learning and the future of medicine. *Journal of Internal Medicine* [online]. 2018, **284**(6), 603-619 [cit. 2021-8-11]. ISSN 09546820. Dostupné z: doi:10.1111/joim.12822

HE, Kaiming, Georgia GKIOXARI, Ross GIRSHICK a . *Mask R-CNN* [online]. 2017 [cit. 2021-8-11]. Dostupné z: <https://arxiv.org/abs/1703.06870>

HORÁK, František. *Chováme ovce*. Praha: Ve spolupráci se Svazem chovatelů ovcí a koz v ČR vydalo nakl. Brázda, 2012, 286-287. ISBN 978-80-209-0390-7.

HUANG, Zhaojin, Yongchao GONG, Chang HUANG a Xinggang WANG. *Mask Scoring R-CNN* [online]. Huazhong University of Science and Technology, 2019 [cit. 2021-8-11]. Dostupné z: <https://arxiv.org/abs/1903.00241>

JUNQUERA, P. *HAEMONCHUS spp, parasitic roundworms of CATTLE, SHEEP and GOATS. Biology, prevention and control*. [online]. 2017 [cit. 2021-8-11]. Dostupné z: [https://parasitipedia.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2634&Itemid=2912](https://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2634&Itemid=2912)

KELLEROVÁ, Pavlína, Martina NAVRÁTILOVÁ, Linh Thuy NGUYEN, Diana DIMUNOVÁ, Lucie RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, Karolína ŠTĚRBOVÁ, Lenka SKÁLOVÁ a Petra MATOUŠKOVÁ. UDP-Glycosyltransferases and Albendazole Metabolism in the Juvenile Stages of *Haemonchus contortus*. *Frontiers in Physiology* [online]. 2020, **11** [cit. 2021-8-11]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: [doi:10.3389/fphys.2020.594116](https://doi.org/10.3389/fphys.2020.594116)

KELLEROVÁ, Pavlína, Lucie RAISOVÁ STUHLÍKOVÁ, Petra MATOUŠKOVÁ, et al. Sub-lethal doses of albendazole induce drug metabolizing enzymes and increase albendazole deactivation in *Haemonchus contortus* adults. *Veterinary Research* [online]. 2020, **51**(1) [cit. 2021-8-11]. ISSN 1297-9716. Dostupné z: [doi:10.1186/s13567-020-00820-x](https://doi.org/10.1186/s13567-020-00820-x)

KRUPOVÁ, Zuzana, Emil KRUPA a Monika MICHALIČKOVÁ. Ekonomika chovu dojných ovcí: III. Vliv intenzifi kačních faktorů. *Náš chov* [online]. 2015, (3), 48-50 [cit. 2021-8-11]. ISSN 0027–8068.

LALRAMHLUNA, Michael, Gautam BORDOLOI, Soumitra PANDIT, Surajit BAIDYA, Siddharta Narayan JOARDAR, Amlan Kumar PATRA a Ruma JAS. Parasitological and immunological response to *Haemonchus contortus* infection: Comparison between resistant Garole and susceptible Sahabadi sheep. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* [online]. 2020, **22** [cit. 2021-8-11]. ISSN 24059390. Dostupné z: [doi:10.1016/j.vprsr.2020.100477](https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100477)

LJUNGSTRÖM, Sara, Lynsey MELVILLE, Philip John SKUCE a Johan HÖGLUND. Comparison of Four Diagnostic Methods for Detection and Relative Quantification of *Haemonchus contortus* Eggs in Feces Samples. *Frontiers in Veterinary Science* [online]. 2018, 4 [cit. 2021-8-11]. ISSN 2297-1769. Dostupné z: doi:10.3389/fvets.2017.00239

MADDOCKS, Sarah a Rowena JENKINS. Quantitative PCR. *Understanding PCR* [online]. Elsevier, 2017, 2017., 45-52 [cit. 2021-8-11]. ISBN 9780128026830. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802683-0.00004-6

MA, Guangxu, Robin B. GASSER, Tao WANG, Pasi K. KORHONEN a Neil D. YOUNG. Toward integrative ‘omics of the barber’s pole worm and related parasitic nematodes. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. 2020, 85 [cit. 2021-8-11]. ISSN 15671348. Dostupné z: doi:10.1016/j.meegid.2020.104500

MEYERS, P., R. ESPINOSA, C. S. PARR, T. JONES, G. S. HAMMOND a T.A. DEWEY. *Haemonchus contortus*. *The Animal Diversity Web (online)* [online]. 2021 [cit. 2021-8-11]. Dostupné z: [https://animaldiversity.org/accounts/Haemonchus\\_contortus/classification/](https://animaldiversity.org/accounts/Haemonchus_contortus/classification/)

MUSHONGA, Borden, Dismas HABUMUGISHA, Erick KANDIWA, Oscar MADZINGIRA, Alaster SAMKANGE, Basiamisi Ernest SEGWAGWE a Ishmael Festus JAJA. Prevalence of *Haemonchus contortus* Infections in Sheep and Goats in Nyagatare District, Rwanda. *Journal of Veterinary Medicine* [online]. 2018, 2018, 1-9 [cit. 2021-8-11]. ISSN 2356-7708. Dostupné z: doi:10.1155/2018/3602081

NGUYEN, Linh Thuy, Thomas KURZ, Sarah PRESTON, et al. *Phenotypic screening of the ‘Kurz-box’ of chemicals identifies two compounds (BLK127 and HBK4) with anthelmintic activity in vitro against parasitic larval stages of Haemonchus contortus* [online]. 2019, 12(1) [cit. 2021-8-11]. ISSN 1756-3305. Dostupné z: doi:10.1186/s13071-019-3426-7

O’DONOGHUE, Peter. Helminth Parasites. *PARA-SITE* [online]. The University of Queensland, 2010, 2010 [cit. 2021-8-11]. Dostupné z: <https://parasite.org.au/parasite/contents/helminth-intoduction.html>

SAHA, Sumit. A Comprehensive Guide to Convolutional Neural Networks — the ELI5 way. *Towards data science* [online]. 2018 [cit. 2021-8-11]. Dostupné z: <https://towardsdatascience.com/a-comprehensive-guide-to-convolutional-neural-networks-the-eli5-way-3bd2b1164a53>

SALLÉ, G., S. R. DOYLE, J. CORTET, J. CABARET, M. BERRIMAN, N. HOLROYD a J. A. COTTON. The global diversity of *Haemonchus contortus* is shaped by human intervention and climate. *Nature Communications* [online]. 2019, **10**(1) [cit. 2021-8-11]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-019-12695-4

SANGSTER, Nicholas C., Ann COWLING a Robert G. WOODGATE. Ten Events That Defined Anthelmintic Resistance Research. *Trends in Parasitology* [online]. 2018, **34**(7), 553-563 [cit. 2021-8-11]. ISSN 14714922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2018.05.001

SENDOW, Janelin. *Haemonchus contortus*. *Animal Diversity Web* [online]. University of Michigan-Ann Arbor, 2003 [cit. 2021-8-11]. Dostupné z: [https://animaldiversity.org/accounts/Haemonchus\\_contortus/](https://animaldiversity.org/accounts/Haemonchus_contortus/)

SHARMA, Pulkit. Computer Vision Tutorial: A Step-by-Step Introduction to Image Segmentation Techniques (Part 1). *Analytics Vidhya* [online]. 2019 [cit. 2021-8-11]. Dostupné z: [https://www.analyticsvidhya.com/blog/2019/04/introduction-image-segmentation-techniques-python/?utm\\_source=blog&utm\\_medium=computer-vision-implementing-mask-r-cnn-image-segmentation](https://www.analyticsvidhya.com/blog/2019/04/introduction-image-segmentation-techniques-python/?utm_source=blog&utm_medium=computer-vision-implementing-mask-r-cnn-image-segmentation)

SCHÁŇKOVÁ, Štěpánka, Iva LANGOVÁ, Jaroslav VADLEJCH a Ivana JANKOVSKÁ. *Testování účinnosti anthelmintik používaných v chovech ovcí pomocí metod in vivo: uplatněná certifikovaná metodika* [online]. Česká zemědělská univerzita v Praze, 2013 [cit. 2021-8-11]. ISBN 978-80-213-2411-4. Dostupné z: <https://metodiky.agrobiologie.cz/PDF/KZR/TESTOVANI-UCINNOSTI-ANTHELMINTIK-POUZIVANYCH-V-CHOVECH-OVCI-POMOCI-METOD-IN-VIVO.pdf>

SCHEUERLE, Miriam. *ANTHELMINTIC RESISTANCE OF HAEMONCHUS © CONTORTUS AND THE FAMACHA -METHOD AS A TOOL TO DELAY THE*

*DEVELOPMENT OF ANTHELMINTIC RESISTANCE* [online]. München, 2009 [cit. 2021-8-11].

SILVA ROBERTO, Francisca Fernanda da, Gelson DOS SANTOS DIFANTE, Lilian GIOTTO ZAROS, et al. The effect of *Brachiaria brizantha* cultivars on host-parasite-environment interactions in sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes. *PLOS ONE* [online]. 2020, **15**(8) [cit. 2021-8-11]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0238228

ŠORMOVÁ, Renáta. *P-glykoprotein a rezistence na anthelmintika u Haemonchus contortus (vlasovka slezová)* [online]. [cit. 2021-8-12]. Dostupné z: <https://socv2.nidv.cz/archiv42/getWork/hash/1b48ff71-6cfe-11ea-9fea-005056bd6e49>. Středoškolská odborná činnost. Gymnázium Dvůr Králové.

VANĚK, Dušan. *Chov skotu a ovcí: (přednášky pro Bc)*. Praha: Česká zemědělská univerzita, 2002, 145-152. Živočišná výroba (Česká zemědělská univerzita). ISBN 80-866-4211-9.

VÁRADY, M., P. ČUDEKOVÁ a J. ČORBA. In vitro detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus*: Egg hatch test versus larval development test. *Veterinary Parasitology* [online]. 2007, **149**(1-2), 104-110 [cit. 2021-8-11]. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetpar.2007.07.011

VILLARROEL, Aurora. *Internal parasites in sheep and goats* [online]. Oregon State University, 2013 [cit. 2021-8-11]. Dostupné z: <https://agsci.oregonstate.edu/sites/agscid7/files/em9055.pdf>

VOKŘÁL, IVAN, HANA BÁRTÍKOVÁ, LUKÁŠ PRCHAL, et al. The metabolism of flubendazole and the activities of selected biotransformation enzymes in *Haemonchus contortus* strains susceptible and resistant to anthelmintics. *Parasitology* [online]. 2012, **139**(10), 1309-1316 [cit. 2021-8-11]. ISSN 0031-1820. Dostupné z: doi:10.1017/S0031182012000595

VOLF, Petr a Petr HORÁK. *Paraziti a jejich biologie*. Praha: Triton, 2007, 138-217. ISBN 978-80-738-7008-9.

YILMAZ, Esra, Sabrina RAMÜNKE, Janina DEMELER a Jürgen KRÜCKEN.  
Comparison of constitutive and thiabendazole-induced expression of five cytochrome P450 genes in fourth-stage larvae of *Haemonchus contortus* isolates with different drug susceptibility identifies one gene with high constitutive expression in a multi-resistant isolate. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* [online]. 2017, 7(3), 362-369 [cit. 2021-8-11]. ISSN 22113207. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpddr.2017.10.001