

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**REZISTENCE NA ANTHELMINTIKA V CHOVECH
HOSPODAŘSKÝCH ZVÍŘAT**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Lucie Raisová Stuchlíková, Ph.D.

Hradec Králové 2024

Alona Parkhomets

PROHLÁŠENÍ

„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 řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

Alona Parkhomets

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych vyjádřila svou upřímnou vděčnost RNDr. Lucii Raisové Stuchlíkové, Ph.D., za vedení práce, konzultace, trpělivost, cenné rady a připomínky. Navíc bych chtěla poděkovat za vždy příjemný a vstřícný přístup. Také bych chtěla poděkovat svým blízkým za jejich neustálou podporu během této práce.

Obsah

1 ÚVOD	5
2 REZISTENCE	6
2.1 VÝVOJ REZISTENCE	6
2.1.1 <i>Rezistence jako před-adaptivní jev a selekční tlak</i>	6
2.1.2 <i>Frekvence a hromadné podávání anthelmintik</i>	6
2.1.3 <i>Poddávkování</i>	7
2.2 ROLE ENZYMŮ METABOLIZUJÍCÍ XENOBIOTIKA.....	7
2.2.1 <i>XME I. fáze</i>	7
2.2.2 <i>XME II. fáze</i>	8
2.3 ROLE EFLUXNÍCH TRANSPORTÉRŮ.....	9
2.4 ROLE GENETICKÉ VARIABILITY.....	9
2.4.1 <i>Genetický původ rezistence u H. contortus</i>	10
2.5 JINÉ MECHANISMY VZNIKU REZISTENCE.....	11
3 KONTROLA REZISTENCE	12
3.1 KOMBINACE ANTHELMINTIK	12
3.2 SNÍŽENÍ FREKVENCE OŠETŘENÍ A REDUKCE PODÁVÁNÍ ANTHELMINTIK.....	12
3.3 CÍLENÁ LÉČBA	13
3.4 DLOUHODOBĚ PŮSOBÍCÍ ANTHELMINTIKA.....	13
3.5 EPIDEMIOLOGICKÁ TAKTIKA PROTI INFEKČNÍM LARVÁM	13
3.6 IN REFUGIA KONCEPT.....	14
3.7 BREEDING JAKO STRATEGIE KONTROLY GINS.....	14
3.8 VAKCÍNY	15
3.8.1 <i>Imunitní odpověď ovcí na hemonchózu</i>	15
3.8.2 <i>Odolnost a vnímavost hostitele vůči H. contortus</i>	16
3.8.3 <i>Vývoj vakcíny</i>	18
3.8.4 <i>Vakcíny proti helmintům</i>	18
3.8.5 <i>Perspektivy ve vakcinaci (Peptidové epitopové vakcíny)</i>	21
4 METODY DETEKCE REZISTENCE	22
H. CONTORTUS JAKO MODELOVÝ ORGANISMUS	22
4.1 <i>Test snížení počtu vajíček</i>	23
4.2 <i>Test líhnutí vajíček</i>	23
4.3 <i>Test larválního vývoje</i>	24
4.4 <i>Molekulárně diagnostické metody</i>	24
ZÁVĚR	27
SEZNAM ZKRATEK	28
LITERATURA	29
INTERNETOVÉ ZDROJE	34
OBRÁZKY	34

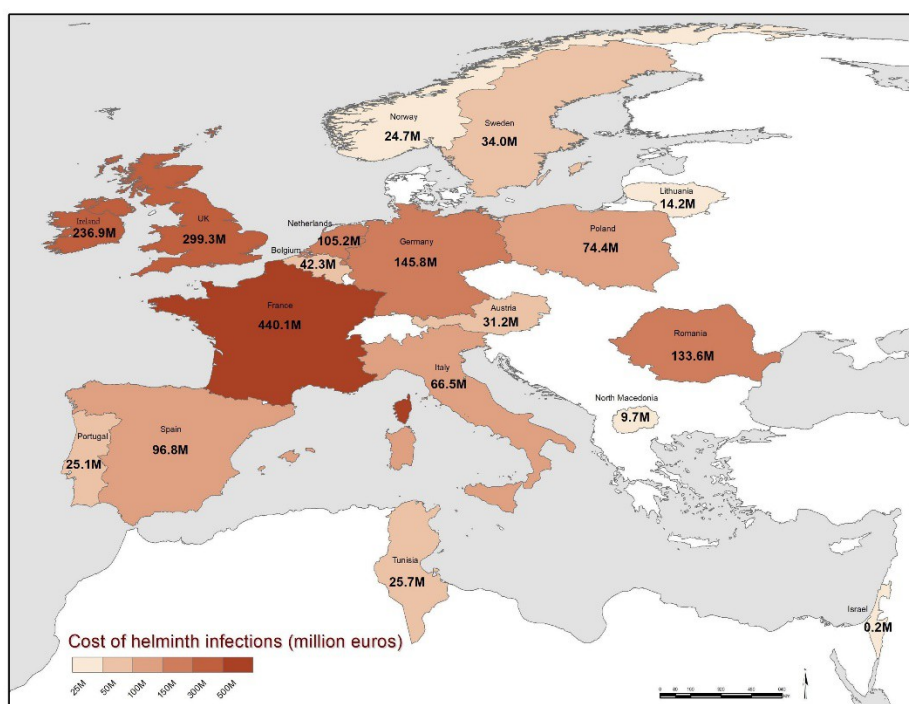
1 Úvod

Anthelmintická rezistence představuje rostoucí problém pro chov hospodářských zvířat, zejména v odvětví malých přežvýkavců. V posledním desetiletí byl v Evropě pozorován významný pokles populace hospodářských zvířat, především u ovcí a koz, který koreluje s nárůstem rezistence vůči anthelmintikům (Eurostat 2023).

Čtyři hlavní široce používané skupiny anthelmintik – benzimidazoly (BZ), imidazothiazoly, makrocyclické laktony (ML) a aminoacetonitrilové deriváty – čelí tomuto problému. Odolnost proti anthelmintikům byla zaznamenána u různých rodů hlístic. Mezi hlavními rody vyskytující se v Evropě patří *Teladorsagia*, *Haemonchus* a *Trichostrongylus* (Papadopoulos 2012).

I když rezistence u hlístic koní a skotu ještě nedosáhla úrovně pozorované jako u malých přežvýkavců, dochází u nich také k jejímu postupnému zvyšování (Kaplan 2004).

Cílem této rešeršní práce je poskytnout shrnutí dostupných informací o anthelmintické rezistenci, včetně mechanismů jejího vzniku a způsobu jejího zkoumání. Výsledky mohou tak přispět k lepšímu pochopení této problematiky. Rozsáhlá část práce je věnována strategiím boje proti rozšíření rezistence, které mohou být klíčem k udržitelnosti chovu hospodářských zvířat a zachování účinnosti stávajících skupin anthelmintik.



Obr. 1. Ekonomické údaje z 18 zemí Evropy ukazující vyčíslení finančních ztrát způsobené helmintorezistencí ve spojení s veterinární péčí (Phys.org 2020).

2 Rezistence

Prichard a kol. (1980) definovali rezistenci jako jev, který se vyskytuje, pokud je v populaci parazitů přítomen vyšší podíl jedinců, kteří jsou schopni tolerovat určité dávky léčiv než v běžné populaci stejného druhu, která je vůči dané dávce léčiva vnímavá.

2.1 Vývoj rezistence

2.1.1 Rezistence jako před-adaptivní jev a selekční tlak

Fenomén anthelmintické rezistence jako před-adaptivního jevu lze vysvětlit tím, že změny v genech propůjčující rezistenci již existují v určitých fenotypech daného druhu (Jackson 1993).

Selekční tlak je postupný proces a probíhá ve třech fázích. Počáteční fáze znamená nízkou frekvenci rezistentních jedinců v populaci. Při pokračující expozici léků následuje prostřední fáze, ve které se zvyšuje frekvence heterozygotních rezistentních jedinců v populaci. Další vývoj rezistence závisí na tom, zda se z této fáze stane převážně homozygotní populace rezistentních jedinců (Jackson 1993). K tomu může přispívat i vysoká plodnost gastrointestinálních hlístic, která umožňuje malým populacím rezistentních červů rychle narůst během krátké doby, zvláště v příznivých klimatických podmínkách (Craig 1993).

Rezistence vůči BZ poskytuje konkrétní příklad, kdy už několik let po zavedení této třídy léčiv na začátku 60. let byla hlášena rezistence u malých přežvýkavců, což naznačuje, že změny v genech propůjčující rezistenci pravděpodobně existovaly v populaci *H. contortus* již dříve, než byly BZ zavedeny na trh (Craig 1993, Roos a kol. 1990).

2.1.2 Frekvence a hromadné podávání anthelmintik

Mezi nejběžnější faktory, jak ukazují mnohé studie, patří frekvence podávání anthelmintik, které je spíše preventivní. Patří sem i podávání léčiva hromadně pro celé stádo nebo používání jednoho typu léčiva, které stejně tak může přispívat k rozvoji anthelmintické rezistence (Falzon a kol. 2014, Jackson & Coop 2000, Papadopoulos 2008).

Jako příklad můžeme uvést relativně novou třídu anthelmintik – aminoacetonitrilové deriváty (monepantel). Původně byl monepantel (MPTL) považován za účinný proti mnoha rezistentním parazitům, avšak rezistence byla potvrzena již po třech letech od jeho zavedení

na trh. Rezistence na MPTL se objevila na ovčí farmě v Nizozemsku v relativně krátkém časovém úseku. Bylo zjištěno, že tato farma měla relativně vysokou frekvenci používání MPTL, která přesahovala doporučenou praxi v holandských podmínkách (Van den Brom a kol. 2015).

2.1.3 Poddávkování

Poddávkování může vést k podobným důsledkům. Podávání nižší dávky, než je potřebná, zvyšuje přežití rezistentních parazitů (Craig 1993).

Kromě toho se nesmí přehlížet ani rozdílná biologická dostupnost mezi jednotlivými hostitelskými druhy zvířat. Např. kozy, s rychlejším metabolismem a potřebou 1,5-2krát vyšší dávky než ovce, jsou často společně chovány s ovci a dostávají stejnou dávku, což vytváří situaci ekvivalentního poddávkování, které tak přispívá k rozvoji rezistence (Jackson & Coop 2000, Papadopoulos 2008).

2.2 Role enzymů metabolizujících xenobiotika

V organismu dochází k transportu a biotransformaci všech cizorodých látek, včetně léků. Enzymy, které metabolizují xenobiotika (XME), hrají klíčovou roli v účinnosti léčiv, neboť mohou přeměnit léky na neaktivní sloučeniny. U helmintů mohou XME fungovat jako ochranný mechanismus, chránící parazity před toxickými účinky anthelmintik, což může přispět k rozvoji rezistence (Matoušková a kol. 2016).

Existují však výrazné mezidruhové rozdíly v metabolismu xenobiotik mezi různými helminty. Studie provedené na různých helmintech ukazují na rozmanitost těchto enzymů a jejich potenciální roli v lékové rezistenci. Nejvíce vyvinutý biotransformační systém mají hlístice, což může vysvětlit rychlý rozvoj rezistence. Výzkum v oblasti metabolických procesů může přinést cenné poznatky o rezistenci vůči anthelmintikům (Matoušková a kol. 2016).

2.2.1 XME I. fáze

Biotransformační enzymy první fáze zvyšují hydrofilnost látky vložení nebo odhalením hydrofilních skupin. Hlavními enzymy jsou cytochromy P450 (CYPs), které metabolizují

různorodou škálu endogenních a exogenních substrátů pomocí oxidázové, peroxidázové a reduktázové aktivity. U helmintů je výrazná genetická variabilita genů CYP, přičemž *H. contortus* má dokonce více genů této rodiny. Oxidace anthelmintik, jako je albendazol, může přispívat k rozvoji lékové rezistence. Studie rovněž naznačují spojitost mezi zvýšenou expresí těchto enzymů a rezistencí u *H. contortus* (Matoušková a kol. 2016).

Méně častá cesta biotransformace je redukce, která je hlavní cestou pro anthelmintika obsahující karbonylové skupiny – flubendazol a mebendazol. U helmintů je zaznamenán významný počet genů kódujících enzymy reduktáz a dehydrogenáz, zejména patřících do skupin dehydrogenáz/reduktáz krátkého řetězce a aldo-ketoreduktáz, které jsou zodpovědné za metabolizaci aldehydů a ketonů. U rezistentních kmenů *H. contortus* byly zaznamenány vyšší aktivity karbonylreduktáz ve srovnání s citlivými kmeny (Matoušková a kol. 2016).

2.2.2 XME II. fáze

Biotransformační enzymy druhé fáze jsou zodpovědné za konjugační reakce s endogenními látkami. Nejrozšířenější superrodinou těchto enzymů jsou glutathion S-transferázy (GSTs). Tyto enzymy jsou multifunkční a hlavní část jejich aktivity spočívá v konjugaci sloučenin s elektrofilními centry na tripeptid glutathion. Hrají významnou roli v detoxikaci látek. U helmintů se podílejí na detoxikaci lipidových hydroperoxidů a karbonylových sloučenin, které vznikají v důsledku oxidačního stresu. Dosud však není jasný mechanismus regulace GSTs v souvislosti s lékovou rezistencí (Matoušková a kol. 2016). Během biochemické analýzy cytosolické formy glutathion S-transferázy z *Echinococcus granulosus* (EgGST), která byla úspěšně produkována jako rekombinantní protein (rEgGST), byla odhalena citlivost enzymu na určité třídy anthelmintik, konkrétně hexachlorofen a rafoxanid. To naznačuje, že rEgGST by mohl hrát roli v mechanismech rezistence parazita vůči těmto anthelmintikům (Harispe a kol. 2010).

UDP-glykosyltransferázy (UGTs) představují další skupinu enzymů zapojenou do metabolismu xenobiotik ve druhé fázi biotransformace. Tyto enzymy katalyzují reakce glukuronidace a glykosylace, čímž zvyšují hydrofilitu lipofilních sloučenin a zlepšují dostupnost pro efluxní transportéry. U organismů *C. elegans* a *H. contortus* byla glykosylace identifikována jako hlavní deaktivující cesta pro benzimidazolová anthelmintika. Několik studií prokázalo význam UGTs v lékové rezistenci, zejména u *H. contortus*, kde byly identifikovány zvýšené hladiny těchto konjugátů s anthelmintiky, zejména s BZ, u rezistentních kmenů. Zapojení do metabolismu xenobiotik ukazuje i studie genomu *H.*

contortus, kde bylo zjištěno, že některé geny jsou vysoce homologní a nacházejí se ve shlucích v malé oblasti genomu, což naznačuje možný vznik opakovanými genovými duplikacemi. UGT geny mohou být specifické pro určité skupiny helmintů a jejich role může být spojena s životním stylem a interakcí s hostitelským prostředím (Matoušková a kol. 2016).

2.3 Role efluxních transportérů

Membránové efluxní transportéry, jako jsou ABC (ATP-binding cassette) transportéry, například multirezistentní P-glykoproteiny (PGP), snižují koncentraci léčiv na cílových místech, což vede ke snížení účinnosti léku a potenciálnímu selhání terapie (Matoušková a kol. 2016, Lespine a kol. 2011).

Hlístice využívají genovou regulaci jako mechanismus vůči toxickému účinku anthelmintik. Tyto transportéry jsou nadměrně exprimovány jako odpověď na léčbu, což vede k rozvoji rezistence na různá anthelmintika, včetně ML, jako je ivermektin (IVM). Výzkum provedený Ardelli a Prichard (2013) prokázal, že *C. elegans* reaguje na anthelmintika prostřednictvím regulace PGP. Nadměrná exprese PGP byla pozorována jak u citlivých, tak také u rezistentních kmenů vystavených IVM. Delece specifických PGP genů vedla ke zvýšené citlivosti na IVM, což ovlivnilo motilitu červů. Výzkum naznačuje, že PGP hraje roli při ochraně *C. elegans* před toxicitou IVM a inhibice PGP zvyšuje náchylnost k IVM. Inhibice těchto efluxních pump může zvýšit účinnost léčby proti parazitům a zvrátit rezistenci (Lespine a kol. 2011).

2.4 Role genetické variability

Nematoda vykazují výraznou genetickou rozmanitost jak mezi různými populacemi, tak i v rámci jedné populace. Jejich genetické složení zahrnuje jak jadernou, tak mitochondriální DNA. Mitochondriální DNA u nematod podléhá vysoké míře mutací, a i jaderná DNA je různorodá. Nematoda využívají posttranslační modifikace, konkrétně alternativního sestřihu mitochondriální DNA, k dosažení fyziologické diverzity a produkci různorodých proteinů z jednoho genu (Prichard 2001).

Vyšší genetická diverzita v populacích nematod znamená větší variabilitu v genotypu mezi jedinci, což vede k rozmanitější odpovědi na anthelmintika. Z toho vyplývá, že

rezistentní alely mohou být přítomny v populaci ve větší míře. Při léčbě anthelmintiky jsou usmrčeny paraziti s citlivým genotypem, avšak jedinci s rezistentními alelami přežijí a mohou tyto alely předat svým potomkům. Tímto způsobem může vyšší genetická diverzita urychlit nárůst rezistence na anthelmintika v dané populaci (Prichard 2001).

2.4.1 Genetický původ rezistence u *H. contortus*

Rezistence u *H. contortus* má složitý genetický původ. Například Levamisol (LEV), který patří mezi nikotin acetylcholinová anthelmintika, působí zvýšením vodivosti membrány a depolarizací otevřením neselektivních iontových kanálů propustných pro Na⁺ a K⁺ (Martin 1997). Pro rezistenci vůči LEV jsou klíčové geny, které kódují kationtové kanály ovládané acetylcholinem. Tato rezistence je recesivní charakteristikou vázanou na pohlaví, pravděpodobně ovlivněnou jediným genem nebo skupinou genů (Craig 1993).

BZ patří mezi anthelmintika, která blokují tvorbu mikrotubulů prostřednictvím inhibice β -tubulinu. Účinky těchto léků se projevují pomaleji než u látek, které fungují jako agonisté neurotransmiteru, a zahrnují postupné vyhladovění hlístic v důsledku poruch střevních buněk a snížené produkce vajíček. BZ rezistence je spojena s mutacemi v izotypu I a izotypu II β -tubulinu (Martin 1997, Prichard 2001).

ML, jako například IVM, ovlivňují neurotransmitter glutamát, zejména zvyšováním vodivosti membrány. Při tomto procesu dochází ke zvýšenému průniku chloridových iontů přes glutamátem řízené chloridové kanály (GluCl), přičemž různé podjednotky GluCl vykazují odlišnou citlivost vůči ML. Tím postupně dochází k paralýze a následné smrti parazita. ML rezistence zahrnuje geny, jako jsou PGP, podjednotky GluCl a podjednotky aniontových kanálů s řízenými aminokyselinami, což naznačuje multigenní základ pro rezistenci (Martin 1997, Prichard 2001).

Nejnovější třída anthelmintik – deriváty aminoacetonitrilu, mezi něž patří MPTL, má také komplexní genetický původ. Způsob účinku MPTL zahrnuje cílení na nikotin acetylcholinové receptory, konkrétně na nematodově specifickou podrodinu degenerinových sodíkových kanálů (DEG-3), jako je například Hco-MPTL-1 u *H. contortus*. Složitost původu rezistence vychází z přítomnosti množství mutací v genu Hco-MPTL-1 u rezistentních izolátů, které způsobují defekty v sestřihu a tím retenci intronů a předčasné stop kodony, což vede k nefunkčním receptorům a způsobuje, že larvy nejsou citlivé na léčivo (Bagnall a kol. 2017). Studie rovněž prokázaly změny v expresi všech členů rodiny DEG-3 u rezistentních

parazitů a ukázaly, že existují alespoň 2 mechanismy rezistence na MPTL u *H. contortus* (Turnbull a kol. 2019).

2.5 Jiné mechanismy vzniku rezistence

Hlavními mutačními mechanismy může být nejen jednonukleotidový polymorfismus (SNP), ale i delece v kódujících oblastech cílových genů. V genomu hlístic byl zaznamenán i výskyt různých typů transpozonů, které potenciálně mohou mít vliv na rezistenci a šířit se migrací od původního zdroje. Transpozony mohou ovlivnit expresi genů spojených s rezistencí například změnou ve vzorci exprese genu v důsledku narušení enhancerových a supresorových elementů, odstraněním regulačních elementů transpozicí jinde v genomu nebo vložením transpozonu do netranslatovaných oblastí, což může ovlivnit stabilitu mRNA (Gilleard 2006).

3 Kontrola rezistence

S narůstajícím problémem rezistence vůči současným třídám anthelmintik u malých přežvýkavců a s omezeným vývojem nových sloučenin z důvodu vysokých nákladů je nezbytné hledat alternativní přístupy k řešení helmintorezistence. Hlavním cílem integrovaného řízení parazitů (IPM) je vývoj preventivních strategií, které mají za cíl oddálit vznik rezistence a prodloužit účinnost existujících skupin anthelmintik. Žádný samotný přístup pravděpodobně nedosáhne plné účinnosti, a proto je nejlepším řešením kombinovat různé metody pro efektivní kontrolu (Knox a kol. 2003, Besier a kol. 2016).

3.1 Kombinace anthelmintik

Je důležité, aby ošetření poskytovalo maximální účinnost a odstraňovalo heterozygotní rezistentní genotypy, čímž se zajistí recesivita rezistentních alel. Zavedení kombinací anthelmintik může přispět k dosažení této maximální účinnosti (Jackson & Coop 2000).

Léčba kombinací anthelmintik se doporučuje při dodržování karanténních opatření, aby se předešlo neúmyslnému zavedení populace parazitů s vyšším stupněm rezistence, společně s nově přivezenými zvířaty (Besier a kol. 2016).

Využití kombinace anthelmintik je dlouhodobě praktikováno a v některých zemích jsou k dispozici přípravky obsahující až čtyři aktivní složky. Nicméně problémem spojeným s pravidelným užíváním těchto kombinovaných léčiv je riziko zhoršení rezistence vůči všem složkám. Z tohoto důvodu se tato praxe vnímá spíše jako preventivní přístup, který by měl být implementován ve spojení s efektivními strategiemi IPM (Besier a kol. 2016).

3.2 Snížení frekvence ošetření a redukce podávání anthelmintik

Jedním z možných přístupů k řešení problému rezistence je oddálení jejího vzniku. Tato strategie vyžaduje modernizaci tradičních přístupů s cílem minimalizovat selekční tlak na parazity. Snížení selekčního tlaku pomůže udržet náchylné alely v populaci (Craig 1993, Jackson & Coop 2000).

Toho je možné dosáhnout snížením frekvence ošetření. Snížení potřeby časté chemoprophylaxe může být dosaženo také například efektivním řízením pastvin. To mimo jiné

zahrnuje odstranění výkalů z pastvin, čímž se sníží výskyt infekčních larev, nebo pastviny mezi jednotlivými obdobími střídat (Craig 1993, Jackson & Coop 2000).

3.3 Cílená léčba

Další možností je cílená léčba jednotlivých nakažených zvířat, což minimalizuje nadměrné používání anthelmintik. Léčena jsou pouze zvířata s viditelnými klinickými příznaky nakažení a nikoli celé stádo (Besier a kol. 2016).

3.4 Dlouhodobě působící anthelmintika

Tyto léky zahrnují sloučeniny s trvalým účinkem díky svým farmakokinetickým vlastnostem a také ty, které vykazují dlouhodobý účinek způsobený specifickým způsobem podání, jako jsou tobolky s pomalým uvolňováním nebo injekce. Tímto způsobem přispívají k oddálení reinfekce (Falzon a kol. 2014, Besier a kol. 2016).

Z jedné strany využívání dlouhodobě působících anthelmintik se snižuje četnost podávání léků, což je zároveň ekonomicky výhodnější. Na druhou stranu to však může přispívat k rozvoji rezistence. Pokud koncentrace léku klesne na subletální úroveň, může dojít k přežívání jak homozygotních, tak heterozygotních rezistentních parazitů u hostitele (Falzon a kol. 2014).

Proto je klíčovým požadavkem vysoká účinnost takového přípravku. Současně by jeho použití mělo být podmíněno zajištěním většího podílu vnímavých parazitů prostřednictvím přístupu „in refugia” (viz 3.6) a mělo by být vyhrazeno především pro citlivější zvířata, např. pro samice během peripartálního období (Falzon a kol. 2014, Besier a kol. 2016).

3.5 Epidemiologická taktika proti infekčním larvám

Strategie vyhýbání se infekčním larvám je založena na epidemiologických údajích o zónách, které naznačují období, po které musí být pasoucí se zvířata vyloučena z pastvy. Pro majitele farem může být také praktičtější řešením střídání ovcí s dobyt看kem, který má odlišnou vnímavost k *H. contortus* (Besier a kol. 2016).

Současný výzkum je zaměřen na biologické technologie, které by mohly doplnit tradiční metody kontroly a tím snížit použití anthelmintik. Studie naznačují, že některé druhy hub, jako například *Duddingtonia flagrans*, mají schopnost ničit larvy nematod, což efektivně snižuje kontaminaci pastvin. Pravidelné podávání těchto hub zvířatům prostřednictvím krmných doplňků by také potenciálně mohlo vést k redukci nakažení (Besier a kol. 2016).

V některých pastevních rostlinách jsou obsaženy bioaktivní látky, zejména kondenzované fenolické sloučeniny taninu. Ty mohou přispívat ke snížení populace nematod buď přímým farmaceutickým účinkem na různé fáze životního cyklu, nebo nepřímým efektem posílení imunitní odpovědi hostitele prostřednictvím schopnosti taninů vázat proteiny. Zatím však není uplatnění těchto technologií v terénu realizováno (Besier a kol. 2016).

Dalším účinným prostředkem ke zvýšení odolnosti u zvířat může být kvalitní výživa doplněna o nutriční aditiva, čímž se může redukovat frekvence použití anthelmintik (Koski & Scott 2003).

3.6 *In refugia* koncept

Přístup je zaměřen na udržení rezervoáru citlivých genů, což vede k ředění všech přítomných rezistentních parazitů. Cílem je zajistit, aby rezistentní paraziti zůstávali v menšině. Tento cíl je dosažen zavedením strategie selektivního ošetření na úrovni jednotlivých vnímavých jedinců nebo na úrovni jednotlivých stád, spíše než prostřednictvím rutinní léčby všech současně. Rozhodnutí o potřebě selektivní cílené léčby lze provádět na základě rychlých diagnostických testů podle klinických příznaků (Falzon a kol. 2014, Besier a kol. 2016).

3.7 Breeding jako strategie kontroly GINs

Některá plemena zvířat prokazují větší odolnost vůči gastrointestinálním hlísticím (GINs) než jiná, což otevírá možnosti genetické selekce jako strategie pro kontrolu GINs. Tento přístup hraje v IPM klíčovou roli (Besier a kol. 2016). Zvýšení podílu odolných jedinců prostřednictvím křížení mezi odolnými a náchylnými plemeny zároveň řeší problém nižší produkce vlny a přírůstku váhy u výsledných plemen (Saddiqi a kol. 2011). Pravděpodobně je nižší produkce způsobena hypersenzitivní reakcí hostitele, která se spouští ve snaze vypudit larvy, což může vést ke gastrointestinálním potížím a ztrátě produkce (Beh & Maddox 1996).

3.8 Vakcíny

3.8.1 Imunitní odpověď ovcí na hemonchózu

Vrozená imunita, představuje první obranný mechanismus organismu, který umožňuje eozinofilům vykonávat cytotoxickou funkci proti larvám v raných stádiích infekce, i když chybí specifické protilátky. Tato reakce zahrnuje aktivaci alternativní dráhy komplementu, což vede k navázání složek C3a a C5a na povrch helmintů. Tyto složky fungují jako chemoatraktanty a přilákají eozinofily a neutrofile k místu infekce ve tkáni (Alba-Hurtado & Muñoz-Guzmán 2013, Meeusen a kol. 2005).

U přežvýkavců obvykle nedochází k účinné eliminaci larev červů během první infekce, a je třeba opakovaných infekcí k dosažení tohoto efektu. Studie také ukázaly, že senzibilizované ovce mohou vykazovat různé reakce na infekci, což se projevuje buď rychlým, nebo zpožděným vypuzením parazitů (Meeusen & Balic 2000, Alba-Hurtado & Muñoz-Guzmán 2013).

„Zpožděné odmítnutí“ může nastat, když se larvy dostanou do svých cílových míst v tkáních, a to je spojeno s výraznými změnami v počtu lymfocytů. Klíčovou roli v této reakci hrají CD4⁺ lymfocyty aktivované v lymfatických uzlinách. Tyto CD4⁺ lymfocyty následně prostřednictvím cytokinů stimulují B lymfocyty k proliferaci a tvorbě specifických protilátek (IgA, IgE). Díky tomu se urychlí reakce eozinofilů a dalších složek imunitního systému na opakovanou infekci, zejména cytokinů typu 2. Za vhodných podmínek mohou eozinofily tyto larvy eliminovat prostřednictvím protilátkou zprostředkovaného lokálního uvolňování toxických látek, jako jsou granulované proteiny a další cytotoxické molekuly (Meeusen & Balic 2000, Balic a kol. 2002).

Naopak u některých citlivých ovcí dojde k „rychlému odmítnutí“ larvy parazitů ještě před tím, než se dostanou do svých cílových míst v tkáních. Tato reakce je podmíněna nahromaděním specificky citlivých intraepiteliálních žírných buněk, které jsou známé jako globulární leukocyty. Tyto buňky jsou aktivovány prostřednictvím IgE protilátek vázaných na jejich povrchu přes vysoko afinitní receptory. Aktivace nastává, když parazitické antigeny interagují s IgE protilátkami na povrchu těchto buněk (Alba-Hurtado & Muñoz-Guzmán 2013, Balic a kol. 2002).

„Rychlé vypuzení“ parazitů je dále podporováno zvýšenou sekrecí leukotrienů a faktorů, které brání migraci larev. Tyto faktory jsou aktivovány větším počtem žírných buněk a globulárních leukocytů, které se nacházejí ve zvýšeném množství ve střevní sliznici imunizovaných ovcí. Tyto ovce také vykazují vysoké koncentrace histaminu ve střevní sliznici, což napomáhá vypuzení parazita tím, že podporuje střevní hypersekreci a hypermotilitu. Histamin dále usnadňuje translokaci plazmatických proteinů, včetně humorálních protilátek, do lumen střeva (Alba-Hurtado & Muñoz-Guzmán 2013).

3.8.2 Odolnost a vnímavost hostitele vůči *H. contortus*

Role adaptivní imunitní odpovědi k *H. contortus* u ovcí

Pro určení odolnosti nebo vnímavosti vůči *H. contortus* hraje klíčovou roli typ adaptivní imunitní odpovědi, která závisí na subtypu pomocných T-lymfocytů a cytokinech, které tyto lymfocyty vylučují (Alba-Hurtado & Muñoz-Guzmán 2013).

Studie Gill a kol. (2000) naznačují, že rezistentní ovce vykazují zvýšenou produkci cytokinu Interleukinu-5 (IL-5) v regionálních lymfatických uzlinách gastrointestinálního traktu, zatímco citlivé ovce produkují více Interferonu-gamma (IFN γ) a mají snížené množství krevních eozinofilů a eozinofilů v tkáních. Z těchto výsledků lze usoudit, že náchylnost k infekci je spojena s odpovědí typu aktivací a diferenciací pomocných T-lymfocytů typu 1 (Th1), která je charakterizována zvýšenou produkcí IFN γ a je spojena s ochranou proti intracelulárním parazitům. Naopak ochrana proti *H. contortus* pravděpodobně souvisí s odpovědí aktivací a diferenciací pomocných T-lymfocytů typu 2 (Th2), která zahrnuje produkci cytokinů Interleukinů 4, 5 a 10 (IL-4, IL-5, IL-10) a je spojena s ochranou proti helmintům a degranulací žírných buněk prostřednictvím navázaných IgE protilátek (Berger 2000).

Další výzkum provedený Adronicos a kol. (2010) analyzoval genovou expresi u ovcí s různou náchylností k infekci parazity, zejména *T. colubriformis* a *H. contortus*. Tato analýza potvrdila rozdílné vzory genové exprese u rezistentních a citlivých zvířat. Mezi klíčové geny spojené s náchylností k infekci patřil *cxcl10*, který je asociován s Th1 imunitní reakcí a byl výrazněji exprimován u citlivých zvířat. Důležité je, že po primární infekci nebyly významné rozdíly v expresi genu *cxcl10* (který reguluje produkci IFN γ) ve sliznici slezu mezi citlivými a rezistentními jehňaty. Nicméně, při následných infekcích se u citlivých jehňat objevila nadměrná exprese tohoto genu, což pravděpodobně narušilo jejich schopnost vytvořit

ochrannou Th2 imunitní odpověď. To naznačuje, že chronická infekce u citlivých zvířat může narušit imunitní reakci a přesměrovat ji směrem k Th1 odpovědi, která je méně účinná proti parazitům.

Věk a reprodukční období ovcí

Podstatným faktorem ovlivňujícím povahu imunitní odpovědi je také věk v době infekce. U jehňat ve věku mladším než šest měsíců bylo pozorováno, že mají nižší počet CD4⁺ lymfocytů a mastocytů ve stěně slezu. Naopak u starších zvířat byl zaznamenán vyšší počet periferních krevních eozinofilů. Mladší zvířata pravděpodobně ještě nemají plně vyvinutou Th2 imunitní reakci, což vede k oslabení imunitní odpovědi proti *H. contortus* (Alba-Hurtado & Muñoz-Guzmán 2013, Saddiqi a kol. 2011, Bethony a kol. 2006).

Během období kolem porodu jsou samice více náchylné k infekcím v důsledku oslabení imunitního systému, což je známo jako 'peripartální relaxace imunity'. Tento adaptivní jev je zodpovědný za následně vyšší kontaminaci pastvin, což vystavuje novorozená jehňata infekci (Saddiqi a kol. 2011).

Vliv pohlavních hormonů

Pokud jde o pohlaví, samci projevují vyšší náchylnost k infekcím GIN než samice. Tato skutečnost je ovlivněna pohlavními steroidními hormony, které způsobují pohlavní rozdíly v přítomnosti antigenů. Estrogeny zvyšují expresi genů hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) třídy II na buňkách prezentujících antigen, zatímco androgeny ji snižují. Estradiol také může modifikovat geny receptoru T-lymfocytu (TCR), zejména zvýšením diverzity V-genu, který je spolu s J-genem odpovědný za variabilní doménu TCR, jež se váže na peptidy prezentované molekulou MHC. Tyto hormony ovlivňují nejen imunitní reakce, ale také mohou modulovat expresi genů specifických pro určité nemoci. V důsledku tak samci přispívají k větší kontaminaci pastvin (Klein 2000, Saddiqi a kol. 2011).

Vliv výživy a suplementace

Odpověď imunitního systému je ovlivněna i kvalitou výživy. Ovce v dobře výživové kondici projevují vyšší odolnost vůči infekcím (Besier a kol. 2016).

Stopové prvky, jako je železo, zinek a molybden, mohou podporovat efektivitu imunitního systému, při jejich nedostatku byly pozorovány defekty. Např. při nedostatku zinku byla zaznamenána snížená schopnost T-lymfocytů proliferovat, produkovat IL-4, a také snížená schopnost buněk prezentujících antigen indukovat tyto procesy (Koski & Scott 2003).

3.8.3 Vývoj vakcíny

Ideální vakcína by měla splňovat několik podmínek, včetně schopnosti být účinnou i u mladých zvířat. Mláďata jsou náchylnější k infekcím kvůli nedostatečné imunitní reakci, zejména pokud jde o neúplně vyvinutou Th2 odpověď, která je klíčová pro jejich odolnost vůči infekcím. Cílem vakcín proti nematodám u přežvýkavců je ochránit mladá zvířata před stresem spojenými s odstavením, včetně nutričního stresu způsobeného nízkou tělesnou hmotností a rychlým růstem. Stres spojený s odstavením vede ke zvýšeným hladinám kortikosteroidů, což může nepříznivě ovlivnit jejich imunitní reakce (Bethony a kol. 2006, Emery a kol. 1993).

Vakcína by měla způsobit aktivaci žírných buněk, zvýšit množství T-buněk v *lamina propria* a zvýšit počet dendritických buněk, které prezentují antigen. Je však důležité si uvědomit, že vakcína, která by indukovala imunitní reakci zprostředkovanou IgE, by mohla vyvolat nežádoucí hypersenzitivní reakce (Bethony a kol. 2006, Emery a kol. 1993).

Cílem očkování není nutně dosažení úplné kontroly a sterilní imunity, ale spíše významné snížení zátěže helminty, aby se snížila celková míra infekce na úrovni hejna/stáda a zabránilo se klinickým onemocněním a produkčním ztrátám. Klasické vakcíny obsahující antigeny, na které imunita reaguje během přirozené infekce, jsou preferovány. Předpokládá se, že zvířata na pastvinách si postupně vyvíjejí přirozenou imunitu při opakovaných infekcích. Sterilní imunita může být z dlouhodobého hlediska nežádoucí, zatímco vakcína, která snižuje závažnost a dopady infekce, umožňuje postupné vytváření přirozené imunity, což může být pro hostitele prospěšné (Bethony a kol. 2006).

3.8.4 Vakcíny proti helmintům

„Ozářené“ vakcíny

Tyto vakcíny jsou už dlouho dostupné a primárně se používaly k řízení parazitární bronchitidy u skotu a ovcí způsobené *Dictyocaulus spp.* V původní vakcíně proti plicním červům u skotu bylo použito rentgenového záření, ale bylo zjištěno, že gama záření je vhodnější díky své rychlosti. Studovalo se také využití ultrafialového světla k oslabení různých druhů parazitů. V případě vakcíny proti *H. contortus* se však nepodařilo dosáhnout dostatečné úrovně ochrany, zejména u zvířat mladších než 7 měsíců. To znamená, že nejohroženější populace,

tedy jehňata mladší jednoho roku, nelze efektivně chránit v oblastech s výskytem hemonchózy, kde by byla vakcína potenciálně prospěšná. Mezi další nevýhody těchto vakcín patří potřeba velkého množství larev, což může být technicky a ekonomicky náročné (Bain 1999).

Rekombinantní vakcína

Rekombinantní vakcína patří mezi syntetické vakcíny. Tyto vakcíny vznikají vložením genu kódujícího potřebný antigen daného patogenního organismu do genetické informace nepatogenního organismu. Tímto způsobem je nepatogenní organismus schopen produkovat tento antigen (Snižková 2015).

Vývoj rekombinantních vakcín je založený na identifikovaných antigenových molekulách parazitů (Bethony a kol. 2006). Předpokládá se, že zejména skryté antigeny exprimované ve střevě krev sajících červů mají potenciál vysoké účinnosti, protože parazit přijímá protilátky hostitele přes krev, kterou se vyživuje. Dále se předpokládá, že helmint nemá žádné únikové mechanismy proti protilátkám vytvořeným hostitelem, které by mohly modulovat imunitní reakce hostitele, neboť přirozeně se imunitní systém hostitele se skrytými antigeny neseťkává (Snižková 2015).

Pozdní larvální stadia *H. contortus* konzumují hostitelskou krev a exprimují určité složky na povrchu střeva, které stimulují protilátkovou odpověď. Stupeň vakcinační imunity koreluje s titrem protilátek a může být pasivně přenesen na „naivní“ ovce pomocí séra. Střevní antigeny, které vyvolávají nejúčinnější ochrannou imunitu, jsou enzymy podílející se na trávení krve. Ty mohou být inhibovány protilátkami a zároveň vytvářet komplex antigen-protilátka, který akumuluje na střevním povrchu a slouží jako bariéra pro absorpci živin. Oba mechanismy vedou k hladovění červa, což vede ke snížení produkce vajíček a k oslabení (Knox a kol. 2003).

Výsledky naznačují, že žádná rekombinantní verze antigenu *H. contortus* dosud neposkytla účinnost srovnatelnou s nativními proteiny. Rozdíl spočívá v tom, že u imunizovaných ovcí nedochází k zabránění usazování nových larev, což je hlavním obranným mechanismem přirozené infekce. Nicméně dochází ke snížení produkce vajíček a ztrátě dospělých samic. Studie ukazují, že antigenová ochrana neinterferuje s rozvojem přirozené imunity, a proto může přetrvávat několik týdnů, dokud ovce nevyvinou přirozenou imunitu (Bethony a kol. 2006, Knox a kol. 2003).

Různá vývojová stádia parazitů komplikují vývoj vakcíny, protože každé stádium nese specifické antigeny a má odlišné mRNA a proteiny. Proto je nezbytné kombinovat antigenní složky z různých stádií (Bethony a kol. 2006).

Povrchové střevní antigeny *H. contortus*

Hlavním identifikovaným antigenem *H. contortus* je H11, což je integrovaný membránový glykoproteinový komplex o velikosti 110 kDa. Tento komplex je exprimován ve střevních mikroklcích parazitických stádií a vyskytuje se v různých izoformách. Je velmi účinným imunogenem u mladých jehňat, různých plemen ovcí a rezistentních červů (Knox a kol. 2003). H11 protein působí jako mikrozomální aminopeptidáza, která je neutralizována po setkání s protilátkou vytvořenou hostitelem, čímž následně brání rozštěpení bílkovin a zastavuje výživu. Zatímco rekombinantní vakcína s tímto antigenem nikdy nebyla komercializovaná (Snižková 2015).

Dalším významným antigenem je H-gal-GP (*Haemonchus galactose-containing glycoprotein complex*), pravděpodobně se podílejí i na trávení krve. Tento antigen tvoří komplex s aspartátovými, cysteinovými a metalo proteázami (Knox a kol. 2003).

Kromě těchto dvou účinných antigenů byly na povrchu mikroklků střevních buněk identifikovány Thiol Sepharose binding proteins (TSBP) s aktivitou cysteinových proteáz. Po vakcinaci pomocí těchto proteinů ochrana korelovala s cirkulujícími hladinami IgG a IgG1, a bylo pozorováno mírné zvýšení slizničních žírných buněk a eozinofilů (Knox a kol. 2003).

Role glykosylací u rekombinantních vakcín

Helminti mají specifické sacharidy, které mohou přispívat k protektivní imunitě stimulované střevními proteiny. V glykoproteinech *H. contortus* byly identifikovány tři rodiny *N*-vázaných glykanů různé složitosti. Konformační epitopy obsahující tyto glykany pravděpodobně ovlivňují imunogenicitu (Knox a kol. 2003).

Je důležité vybrat vhodný expresní systém, protože například během bakteriální exprese protein není glykosylován a může být nesprávně složen. Alternativní systémy, například založené na hmyzích buňkách a kvasinkách, umožňují glykosylaci. Avšak glykosylace v těchto systémech může být odlišná, a reakce organismu jsou indukovány jinými protilátkami než při přirozené infekci. Použití *C. elegans* má výhodu v tom, že posttranslační modifikace jsou velmi podobné parazitickým hlísticím, avšak úroveň exprese je nižší (Knox a kol. 2003).

Paraziti nesající krev

U některých druhů helmintů, kteří nesají krev, není cílení na proteiny na povrchu střeva tak efektivní. *Teladorsagia circumcincta* a *Ostertagia ostertagi* nejsou obligátními konzumenty krve. I když mají ekvivalenty H11, H-gal-GP a TSBP, jejich závislost na aktivitách těchto proteinů může být menší než u *H. contortus* (Knox a kol. 2003). Přirozené antigeny, tj. látky vylučované a sekretované z těla helmintů a jejich povrchové antigeny mohou vyvolat imunitní reakci i proti helmintům, které se neživí krví (Snižková 2015).

3.8.5 Perspektivy ve vakcinaci (Peptidové epitopové vakcíny)

Peptidové epitopové vakcíny jsou syntetické vakcíny, které obsahují 20-30 aminokyselin identifikovaných z efektivních a vhodných epitopů antigenu. Tyto vakcíny byly vyvinuty k překonání nedostatků klasických vakcín, jako je např. nákladná kultivace patogenů. Na rozdíl peptidové vakcíny mají nižší náklady, jsou snadno syntetizovatelné, vysoce standardizované a mají vysokou stabilitu a bezpečnost, protože minimalizují vedlejší účinky tím, že umožňují výběr epitopů bez vysoce reaktogenní složky (Yang & Kim 2015, Moisa & Kolesanova 2010).

Pro kompenzaci jejich nízké molekulové hmotnosti a ochranu před proteázami hostitele potřebují peptidové vakcíny adjuvanty, jako jsou například micely, lipozomy nebo polymerní částice. Tyto adjuvanty zároveň fungují jako zesilovače imunitní odpovědi tím, že mohou nespecificky nebo specificky aktivovat určitá stádia imunitní odpovědi na peptidy. K vývoji takové vakcíny jsou nezbytné znalosti struktury antigenu a mechanismů odpovědi hostitele na tento antigen (Yang & Kim 2015, Moisa & Kolesanova 2010).

U helmintů poskytují peptidové vakcíny možnost konjugace různých peptidů z různých antigenů na jeden nosič, což může vyřešit problém specifických antigenů v různých vývojových stádiích (Snižková, 2015, Bethony a kol. 2006).

Podle dostupných informací stále probíhá výzkum vakcín proti helmintům, včetně vakcín založených na peptidech. Často se výzkum soustředí na identifikaci antigenních determinant krevsajících červů, zejména na jejich trávicí enzymy (Snižková, 2015).

4 Metody detekce rezistence

Pravidelné monitorování a včasné odhalení zátěže tímto parazitem představuje účinný přístup k úspěšnému zvládnutí hemonchózy a prevenci vzniku rezistence. Díky sledování hemonchózy získáváme informace o úrovni zátěže parazitem a účinnosti používaných anthelmintik. Na základě těchto údajů lze optimalizovat léčebný režim tak, aby se minimalizovalo riziko vzniku rezistence. Tímto přístupem přispíváme k udržení účinnosti léčby parazitických infekcí u hospodářských zvířat.

***H. contortus* jako modelový organismus**

H. contortus slouží jako experimentální modelový organismus, protože jeho významný sklon vyvíjet rezistenci na anthelmintika je rychlejší než u mnoho jiných parazitů (Gilleard 2013).

Jeho vysoká genetická diverzita populace je především důsledkem vysoké plodnosti. Dospělé samičky v hostitelském organismu denně produkují několik tisíc vajíček, což způsobuje neustálý přísun obrovského množství genotypů do pastvin. Tato skutečnost zajišťuje základ pro genetické křížení a umožňuje zkoumání reakcí na léčiva u různých genotypů, protože nelze předpokládat přítomnost stejných mutací ve všech populacích rezistentních parazitů na různých místech (Gilleard 2013, Gilleard 2006). To nám umožňuje lépe porozumět dynamice rezistence v různých populacích a geografických oblastech, což je klíčové pro vývoj strategií kontroly rezistence a udržení účinnosti anthelmintik v chovu hospodářských zvířat (Gilleard 2013). Avšak vysoká úroveň variace uvnitř kmenů komplikuje interpretaci vztahů mezi genotypy a fenotypy a ztěžuje vytváření stabilních kmenů pro genetická křížení, kde je požadován pevný genotyp (Gilleard 2006).

Výhoda použití tohoto organismu jako modelu spočívá také v jednoduchém provedení experimentů přímo v hostiteli. Mimo jiné larvální stádia L3 se mohou také dlouhodobě uchovávat v ledničce pro navazující studie. Navíc z jednoho usmrceného hostitele je možné získat velké množství materiálu dospělých jedinců pro další studium (Gilleard 2013, Gilleard 2006).

Pro molekulárně-genetické studie je výhodou relativně velká velikost dospělého, což umožňuje izolaci DNA z jednoho jedince. Tato DNA lze následně využít jako templát pro provedení rozsáhlého spektra genotypizačních testů založených na polymerázové řetězové reakci (PCR) (Gilleard 2006).

Blízký fylogenetický vztah s *Caenorhabditis elegans* umožňuje využití experimentálních dat ze studií při zkoumání *H. contortus*. Kvůli složitosti parazitického životního cyklu jsou nástroje pro studium funkcí genů velmi omezené. Z toho důvodu se *C. elegans* stává úspěšným heterologním systémem pro analýzu funkční exprese genů *H. contortus* (Gilleard 2006).

4.1 Test snížení počtu vajíček

Metoda testu snížení počtu vajíček (FECRT) je aplikovatelná na všechny skupiny anthelmintik, poskytující odhad účinnosti anthelmintika prostřednictvím srovnání počtu vajíček ve stolici zvířat před a po léčbě; délka testovacího období závisí na použité anthelmintické skupině léčiv. Produkce vajíček nemusí vždy spolehlivě korelovat s reálným množstvím parazitů a může být specifická pro druh parazita (Taylor a kol. 2002, Coles a kol. 2006).

Příliš krátký interval mezi ošetřeními může však vést k falešně pozitivním výsledkům v účinnosti léků. Proto se doporučuje odebrat vzorky stolice 10-14 dní po provedené léčbě. Odběr vzorků je prováděn u skupin s minimálně 10 zvířat. Počty vajíček pro každou skupinu jsou převedeny logaritmicky a vyjádřeny jako geometrický průměr (Taylor a kol. 2002).

Metoda FECRT je široce využívána v terénu díky své relativní dostupnosti a univerzálnosti. Nicméně může mít nízkou citlivost. Tento test poskytuje spolehlivé výsledky pouze v případě, že je více než 25 % červů odolných (Taylor a kol. 2002). Má však nevýhodu v detekci rezistence u druhů, které kladou málo vajíček (Papadopoulos a kol. 2012).

4.2 Test líhnutí vajíček

Test líhnutí vajíček (EHT) se využívá k identifikaci rezistence vůči BZ. Princip spočívá v působení na vývojové stádium vajíček v přítomnosti různých koncentrací BZ. Určuje se procento vajíček, ze kterých se nevylíhnou larvy L1 při testovaných koncentracích (Taylor a kol. 2002).

Kvůli klesající citlivosti na thiabendazol, by měla být vajíčka použita do 3 hodin od odběru. Proto může být velkým problémem získání falešně pozitivních výsledků v důsledku vývoje larev z vajíček během transportu do laboratoře. Z tohoto důvodu byly vyvinuty speciální metody uchovávání vajíček, včetně anaerobních podmínek (Taylor a kol. 2002, Coles a kol. 2006).

4.3 Test larválního vývoje

Další dostupné testy umožňují detekci anthelmintické rezistence sledováním účinku léku na růst parazita. Test larválního vývoje (LDT) spočívá v kultivaci larválních stadií prvního stupně až na larvy třetího stupně v přítomnosti tepelně ošetřené lyofilizované *Escherichia coli* jako zdroje potravy a testovaného anthelmintika. Tento test byl úspěšný při detekci rezistence vůči BZ a LEV u *H. contortus* (Coles a kol. 2006).

Jako alternativní živná matrice byl použitý agar s anthelmintikem, což je princip, který se uplatňuje u MALDT – mikroagarového testu larválního vývoje, což je modifikace LDT. Tento test je spolehlivý pro BZ a LEV a využívá mikrotitrační destičku, do které jsou přidána vajíčka nematod, přičemž stáří vajíček není důležitým faktorem (Taylor a kol. 2002, Coles a kol. 2006).

Vyhodnocení MALDT probíhá sledováním reakce na různé koncentrace anthelmintik, což se projevuje změnami v larválním vývoji. K posouzení rezistence lze využít diskriminační dávky nebo tradičnějších metod, jako je stanovení LD50 nebo LD95 (Coles a kol. 2006).

K dispozici je také komerčně dostupný kit pro průzkum anthelmintické rezistence u koní (Coles a kol. 2006).

4.4 Molekulárně diagnostické metody

Molekulární metody jsou výrazně citlivější než tradiční FECRT a nabízejí možnost překonat další nevýhody testů detekce rezistence založených na fenotypových charakteristikách (Papadopoulos a kol. 2012).

Existuje několik metod identifikace genů spojených s rezistencí na anthelmintika u *H. contortus*. Jedním z přístupů je hledání polymorfismu délky restrikčních fragmentů (RFLP), který poskytuje informace o rozdílech v lokusech mezi vnímavými a rezistentními populacemi, vzniklými selekcí léčbou anthelmintikem (Prichard 2001).

Candidate gene studies

Přístup „kandidátního genu“ se opírá o odhad, který gen může být zodpovědný za rezistenci, a následně experimentální ověření pomocí hledání polymorfismu v potenciálních genech. Tento proces zahrnuje porovnání citlivých a rezistentních populací nebo umělou selekci rezistentních kmenů při experimentální infekci (Gilleard 2006).

Přístup „kandidátního genu“ vedl k identifikaci několika mutací ve dvou různých genech β -tubulinu, které přispívají k rezistenci vůči BZ (Gilleard 2006).

Hlavním faktorem rezistence byl objeven izotyp-1 β -tubulinového lokusu, konkrétně substituce fenylyalaninu za tyrosin v pozici P200. To vedlo k vytvoření prvního příkladu molekulárně diagnostických testů rezistence na anthelmintika, zaměřených na detekci tohoto polymorfismu (Gilleard 2006).

Je však důležité podotknout, že tato metoda neukazuje kvantitativní vliv těchto mutací a je především vhodná pro zkoumání rezistence založené na jednoznačně identifikovatelném klíčovém genu, na rozdíl od přístupů, které se zabývají komplexnějšími mechanismy rezistence, jako v případě ML (IVM, moxidektin), kde přístup „kandidátského genu“ nenalezl dominantní gen rezistence (Gilleard 2006).

Například, u *C. elegans* rezistence na IVM je spojená s více geny a lokusy na různé úrovni. Současné mutace genů exprimujících podjednotky GluCl, přitom každá z těchto receptorových podjednotek je zapojena do paralelních drah – *avr-15* je aktivní v hltanovém svalu, zatímco *avr-14* a *glc-1* jsou aktivní v neuronech regulujících hltanové funkce – vedou k extrémně vysoké rezistenci k IVM. Byly také identifikovány další mutace genů nekódujících cíle léků, které přispívají k rezistenci na nízké úrovni (Gilleard 2006).

Z výše uvedeného vyplývá, že tato metoda má omezení při analýze komplexních mechanismů rezistence. Mohou vzniknout potíže při výběru „kandidátních genů“. Dalším nedostatkem je, že v případě, kdy rezistence způsobuje neočekávaný gen, metoda nedokáže identifikovat nové geny. Při zkoumání nesprávných „kandidátních genů“ nepřispívají poskytnutá data k lepšímu porozumění genetiky rezistence, zejména pokud jde o počet genů a jejich vzájemné vazby (Gilleard 2006).

Nové přístupy

Kombinace dopředné genetiky a funkční genomiky umožňuje identifikovat hlavní genetické faktory i bez detailní znalosti molekulární identity těchto genů. Nejdříve se provádí identifikace lokusu, který způsobil rezistenci, a následně specifikace konkrétních genů prostřednictvím genetického mapování. Tento přístup je však závislý na dostupnosti kompletní genomové sekvence a příslušných bioinformatických a genetických zdrojů. Jeho velkou výhodou je, že není nutné spoléhat se na předchozí předpoklady. Vyzývá k rozvoji současných genetických přístupů pro studium rezistence parazitických hlístic, tj. k vytvoření postupů pro genetické mapování a dopředné genetické analýzy, zahrnující určení počtu zapojených lokusů, jejich stupně dominance a příspěvek k fenotypu rezistence (Gilleard 2006).

Znalost genomů by výrazně přispěla k porozumění mechanismu rezistence u komplexních jevů, včetně vložení transpozonu (Gilleard 2006).

Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřila na důležitou problematiku rezistence na anthelmintika, která představuje celosvětově významný problém, zejména ve veterinární medicíně. Také jsem věnovala pozornost nejrozšířenějším faktorům, které se podílejí na jejím vzniku.

V dnešní době se snažíme vyvinout efektivní strategie kontroly rezistence, která se nezaměřuje na vývoj nových tříd anthelmintik, ale spíše na nechemické strategie. A to především proto, že je nutné snížit použití anthelmintik a tím prodloužit účinnost již existujících skupin. V tomto kontextu má vývoj syntetických vakcín, zejména peptidových epitopových, potenciál nahradit současně používaná anthelmintika. Ačkoliv zatím nejsou komerčně dostupné, mnoho vědeckých týmů se zaměřuje právě na tuto problematiku.

Současně se aktivně uplatňují přístupy jako redukce podávání anthelmintik, cílená léčba a epidemiologická taktika řízení pastvin. Jedna z hlavních strategií IPM spočívá v posilování odolnosti zvířat prostřednictvím zlepšování jejich zdravotního stavu a selekce kmenů s vyšší genetickou rezistencí vůči parazitárním infekcím.

Nezbytnou součástí strategií kontroly rezistence na anthelmintika jsou spolehlivé a praktické diagnostické metody – pravidelné sledování parazitárních infekcí a rychlé odhalení rezistence. V současnosti se kladou velké naděje na molekulární metody využívající znalosti celého genomu pro přesnější a objektivnější identifikaci genů, odkud rezistence pochází. Nicméně pravděpodobně v terénu se i nadále budou používat spolehlivé, dostupnější a levnější metody, jako je FECRT, i když má své limity, jako je například citlivost.

Seznam zkratek

BZ	Benzimidazoly
CYPs	Cytochromy P450
DEG-3	Rodina degenerinových sodíkových kanálů specifická pro nematody
EgGST	Glutathion S-transferázy z <i>Echinococcus granulosus</i>
EHA	Test líhnutí vajíček
FECRT	Test snížení počtu vajíček
GINs	Gastrointestinální nematody
GluCls	Glutamátem řízené chloridové kanály
GSTs	Glutathion S-transferázy
H-gal-GP	Haemonchus galactose-containing glycoprotein complex
H11	Integrovaný membránový glykoproteinový komplex o velikosti 110 kDa
IFN γ	Interferon-gamma
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL10	Interleukin-10
IPM	Integrované řízení parazitů
IVM	Ivermektin
LD50	Střední letální dávka
LDT	Test larválního vývoje
LEV	Levamisol
MALDT	Mikroagarový test larválního vývoje
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex
ML	Makrocyclické laktony
MPTL	Monepantel
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PGP	P-glykoproteiny
rEgGST	Rekombinantní EgCST
RFLP	Hledání polymorfismu délky restrikčních fragmentů
SNP	Jednonukleotidový polymorfismus
TCR	Receptor T-lymfocytu
Th1	Typ imunitní odpovědi asociován s aktivací a diferenciací pomocných T lymfocytů typu 1
Th2	Typ imunitní odpovědi asociován s aktivací a diferenciací pomocných T lymfocytů typu 2
TSBP	Thiol Sepharose binding proteins
UGTs	UDP-glukosyltransferázy
XME	Enzymy metabolizující xenobiotika

Literatura

ALBA-HURTADO, Fernando a Marco Antonio MUÑOZ-GUZMÁN, 2013. Immune Responses Associated with Resistance to Haemonchosis in Sheep. *BioMed Research International*. **2013**, 1-11. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2013/162158

ANDRONICOS, Nicholas, Peter HUNT a Ross WINDON, 2010. Expression of genes in gastrointestinal and lymphatic tissues during parasite infection in sheep genetically resistant or susceptible to *Trichostrongylus colubriformis* and *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*. **40**(4), 417-429. ISSN 00207519. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpara.2009.09.007

ARDELLI, Bernadette F. a Roger K. PRICHARD, 2013. Inhibition of P-glycoprotein enhances sensitivity of *Caenorhabditis elegans* to ivermectin. *Veterinary Parasitology*. **191**(3-4), 264-275. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetpar.2012.09.021

BAGNALL, Neil H., Angela RUFFELL, Ali RAZA, Timothy P. ELLIOTT, Jane LAMB, Peter W. HUNT a Andrew C. KOTZE, 2017. Mutations in the *Hco-mptl-1* gene in a field-derived monepantel-resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. **7**(2), 236-240. ISSN 22113207. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpddr.2017.05.001

BAIN, R.K., 1999. Irradiated vaccines for helminth control in livestock. *International Journal for Parasitology*. **29**(1), 185-191. ISSN 00207519. Dostupné z: doi:10.1016/S0020-7519(98)00187-8

BALIC, A., V. M. BOWLES a E. N. T. MEEUSEN, 2002. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunology*. **24**(1), 39-46. ISSN 0141-9838. Dostupné z: doi:10.1046/j.0141-9838.2001.00432.x

BEH, K.J. a J.F. MADDOX, 1996. Prospects for development of genetic markers for resistance to gastrointestinal parasite infection in sheep. *International Journal for Parasitology*. **26**(8-9), 879-897. ISSN 00207519. Dostupné z: doi:10.1016/S0020-7519(96)80060-9

BERGER, A., 2000. Science commentary: Th1 and Th2 responses: what are they? *BMJ*. **321**(7258), 424-424. ISSN 09598138. Dostupné z: doi:10.1136/bmj.321.7258.424

- BESIER, R.B., L.P. KAHN, N.D. SARGISON a J.A. VAN WYK, 2016. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. In: *Haemonchus contortus and Haemonchosis – Past, Present and Future Trends*. Elsevier, s. 181-238. Advances in Parasitology. ISBN 9780128103951. Dostupné z: doi:10.1016/bs.apar.2016.02.024
- BETHONY, J. M., A. LOUKAS, P. J. HOTEZ a D. P. KNOX, 2006. Vaccines against blood-feeding nematodes of humans and livestock. *Parasitology*. **133**(S2), S63-S79. ISSN 0031-1820. Dostupné z: doi:10.1017/S0031182006001818
- COLES, G.C., F. JACKSON, W.E. POMROY, R.K. PRICHARD, G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA, A. SILVESTRE, M.A. TAYLOR a J. VERCRUYSSSE, 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. **136**(3-4), 167-185. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetpar.2005.11.019
- CRAIG, Thomas M., 1993. Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*. **46**(1-4), 121-131. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/0304-4017(93)90053-P
- EMERY, DAVID L., SUSAN J. MCCLURE a BARRY M. WAGLAND, 1993. Production of vaccines against gastrointestinal nematodes of livestock. *Immunology & Cell Biology*. **71**(5), 463-472. ISSN 0818-9641. Dostupné z: doi:10.1038/icb.1993.52
- FALZON, L.C., T.J. O'NEILL, P.I. MENZIES, A.S. PEREGRINE, A. JONES-BITTON, J. VANLEEUVEN a A. MEDEROS, 2014. A systematic review and meta-analysis of factors associated with anthelmintic resistance in sheep. *Preventive Veterinary Medicine*. **117**(2), 388-402. ISSN 01675877. Dostupné z: doi:10.1016/j.prevetmed.2014.07.003
- GILL, H. S., K. ALTMANN, M. L. CROSS a A. J. HUSBAND, 2000. Induction of T helper 1- and T helper 2-type immune responses during *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Immunology*. **99**(3), 458-463. ISSN 0019-2805. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-2567.2000.00974.x
- GILLEARD, JOHN S., 2013. *Haemonchus contortus* as a paradigm and model to study anthelmintic drug resistance. *Parasitology*. **140**(12), 1506-1522. ISSN 0031-1820. Dostupné z: doi:10.1017/S0031182013001145
- GILLEARD, John Stuart, 2006. Understanding anthelmintic resistance: The need for genomics and genetics. *International Journal for Parasitology*. **36**(12), 1227-1239. ISSN 00207519. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpara.2006.06.010

- HARISPE, Laura, Gabriela GARCÍA, Paula ARBILDI, Leticia PASCOVICH, Cora CHALAR, Arnaldo ZAHA, Cecilia FERNANDEZ a Veronica FERNANDEZ, 2010. Biochemical analysis of a recombinant glutathione transferase from the cestode *Echinococcus granulosus*. *Acta Tropica*. **114**(1), 31-36. ISSN 0001706X. Dostupné z: doi:10.1016/j.actatropica.2009.12.003
- JACKSON, F. a R. L. COOP, 2000. The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Parasitology*. **120**(7), 95-107. ISSN 0031-1820. Dostupné z: doi:10.1017/S0031182099005740
- JACKSON, F., 1993. Anthelmintic resistance—The state of play. *British Veterinary Journal*. **149**(2), 123-138. ISSN 00071935. Dostupné z: doi:10.1016/S0007-1935(05)80083-1
- KAPLAN, Ray M., 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends in Parasitology*. **20**(10), 477-481. ISSN 14714922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2004.08.001
- KLEIN, S.L., 2000. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. **24**(6), 627-638. ISSN 01497634. Dostupné z: doi:10.1016/S0149-7634(00)00027-0
- KNOX, David P., Diane L. REDMOND, George F. NEWLANDS, Philip J. SKUCE, Dan PETTIT a W.David SMITH, 2003. The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids. *International Journal for Parasitology*. **33**(11), 1129-1137. ISSN 00207519. Dostupné z: doi:10.1016/S0020-7519(03)00167-X
- KOSKI, Kristine G. a Marilyn E. SCOTT, 2003. Gastrointestinal nematodes, trace elements, and immunity. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*. **16**(4), 237-251. ISSN 0896- 548X. Dostupné z: doi:10.1002/jtra.10043
- LESPINE, Anne, Cécile MÉNEZ, Catherine BOURGUINAT a Roger K. PRICHARD, 2012. P- glycoproteins and other multidrug resistance transporters in the pharmacology of anthelmintics: Prospects for reversing transport-dependent anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. **2**, 58-75. ISSN 22113207. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpddr.2011.10.001
- MARTIN, R.J., 1997. Modes of action of anthelmintic drugs. *The Veterinary Journal*. **154**(1), 11-34. ISSN 10900233. Dostupné z: doi:10.1016/S1090-0233(05)80005-X

- MATOUŠKOVÁ, Petra, Ivan VOKŘÁL, Jiří LAMKA a Lenka SKÁLOVÁ, 2016. The Role of Xenobiotic- Metabolizing Enzymes in Anthelmintic Deactivation and Resistance in Helminths. *Trends in Parasitology*. **32**(6), 481-491. ISSN 14714922. Dostupné z: doi:10.1016/j.pt.2016.02.004
- MEEUSEN, E.N.T a A BALIC, 2000. Do Eosinophils have a Role in the Killing of Helminth Parasites? *Parasitology Today*. **16**(3), 95-101. ISSN 01694758. Dostupné z: doi:10.1016/S0169-4758(99)0160- -5
- MEEUSEN, Els N.T., Adam BALIC a Vernon BOWLES, 2005. Cells, cytokines and other molecules associated with rejection of gastrointestinal nematode parasites. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **108**(1-2), 121-125. ISSN 01652427. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetimm.2005.07.002
- MOISA, A. A. a E. F. KOLESANOVA, 2010. Synthetic peptide vaccines. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*. **4**(4), 321-332. ISSN 1990-7508. Dostupné z: doi:10.1134/S1990750810040025
- PAPADOPOULOS, E., 2008. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Ruminant Research*. **76**(1-2), 99-103. ISSN 09214488. Dostupné z: doi:10.1016/j.smallrumres.2007.12.012
- PAPADOPOULOS, E., E. GALLIDIS a S. PTOCHOS, 2012. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. *Veterinary Parasitology*. **189**(1), 85-88. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetpar.2012.03.036
- PRICHARD, R. K., C. A. HALL, J. D. KELLY, I. C. A. MARTIN a A. D. DONALD, 1980. THE PROBLEM OF ANTHELMINTIC RESISTANCE IN NEMATODES. *Australian Veterinary Journal*. **56**(5), 239-250. ISSN 0005-0423. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-0813.1980.tb15983.x
- PRICHARD, Roger K., 2001. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends in Parasitology*. **17**(9), 445-453. ISSN 14714922. Dostupné z: doi:10.1016/S1471-4922(01)01983-3
- ROOS, Marleen H., Jaap H. BOERSEMA, Fred H.M. BORGSTEEDE, Jan CORNELISSEN, Mike TAYLOR a E. JOOST RUITENBERG, 1990. Molecular analysis of selection for benzimidazole resistance in the sheep parasite *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **43**(1), 77-88. ISSN 01666851. Dostupné z: doi:10.1016/0166-6851(90)90132-6

SADDIQI, Hafiz A., Abdul JABBAR, Muhammad SARWAR, Zafar IQBAL, Ghulam MUHAMMAD, Mahrun NISA a Aasif SHAHZAD, 2011. Small ruminant resistance against gastrointestinal nematodes: a case of *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research*. **109**(6), 1483-1500. ISSN 0932- 0113. Dostupné z: doi:10.1007/s00436-011-2576-0

SNÍŽKOVÁ, Karolína. *Možnosti vakcinace v boji proti parazitárním onemocněním*. Bakalářská práce. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta. 2015. Dostupné z: <https://is.muni.cz/th/qvayw/>.

TAYLOR, M.A., K.R. HUNT a K.L. GOODYEAR, 2002. Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*. **103**(3), 183-194. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/S0304- 4017(01)00604-5

TURNBULL, Frank, Eileen DEVANEY, Alison A. MORRISON, Roz LAING a Dave J. BARTLEY, 2019. Genotypic characterisation of monepantel resistance in historical and newly derived field strains of *Teladorsagia circumcincta*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. **11**, 59-69. ISSN 22113207. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpddr.2019.10.002

VAN DEN BROM, R., L. MOLL, C. KAPPERT a P. VELLEMA, 2015. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Veterinary Parasitology*. **209**(3-4), 278-280. ISSN 03044017. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetpar.2015.02.026

YANG, Hyun a Dong Seok KIM, 2015. Peptide Immunotherapy in Vaccine Development. In: *Peptide and Protein Vaccines*. Elsevier, s. 1-14. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. ISBN 9780128028278. Dostupné z: doi:10.1016/bs.apcsb.2015.03.001

Internetové zdroje

EUROSTAT, 2023. *EU livestock population continued to decline in 2022* [online]. [cit. 2023-11-06]. Dostupné z: <https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/w/ddn-20230322-1#email>

Obrázky

Obr. 1: PHYS.ORG, 2020. *Drug resistant parasites cost European livestock industry millions each year* [online]. [cit. 2024-05-06]. Dostupné z: <https://phys.org/news/2020-07-drug-resistant-parasites-european-livestock.html>