

Lekooporność nicieni żołądkowo-jelitowych kóz.

Część III. Epidemiologia, diagnostyka i zwalczanie oporności nicieni żołądkowo-jelitowych na leki przeciwo-robacze

Marcin Mickiewicz¹, Michał Czopowicz¹, Agata Moroz¹, Olga Szaluś-Jordanow², Tomasz Nalbert¹, Iwona Markowska-Daniel¹, Jarosław Kaba¹

z Samodzielnego Zakładu Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej¹ oraz Katedry Chorób Małych Zwierząt z Kliniką² Instytutu Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie

Oporność na środki przeciwo-robacze to zdolność pasożytów do przetrwania w obecności dawki leku, która w normalnych warunkach zabija pasożyty tego gatunku na różnych etapach rozwoju larwalnego i w formie dojrzałej (1). Lekooporność pasożytów jest również definiowana jako większa częstotliwość występowania w populacji osobników zdolnych do tolerowania określonych dawek leku niż w normalnej populacji tego samego gatunku i jest cechą dziedziczną (2). Oporność na każdą grupę leków przeciwo-robaczych jest regulowana przez różne geny, co oznacza, że rozwija się na każdą grupę leków indywidualnie. Lekooporność powstaje, gdy w populacji pasożytów pojawią się różnice genetyczne i jednocześnie zachodzi selekcja w kierunku genotypów decydujących o lekooporności. Istnieje kilka różnych pojęć charakteryzujących oporność na środki przeciwo-robacze (2):

- oporność równoległa – występuje, gdy nicienie są odporne na jedną grupę leków przeciwo-robaczych lub leki o tym samym mechanizmie działania; jest to obserwowane w grupie związków benzimidazolowych, chociaż poziom oporności na różne leki z tej grupy może być inny;
- oporność krzyżowa – występuje, gdy nicienie są odporne na środki przeciwo-robacze, które są różne pod względem budowy chemicznej, np. nicienie odporne na lewamizol mogą wykazywać oporność krzyżową na morantel ze względu na podobieństwo mechanizmów działania;
- oporność wielolekowa – występuje, gdy nicienie są odporne na co najmniej dwie główne grupy środków przeciwo-robaczych o różnych mechanizmach działania;
- oporność wielogatunkowa – występuje, gdy różne gatunki nicieni stają się odporne na jedną lub więcej grup leków przeciwo-robaczych.

W skrajnych przypadkach może wystąpić jednocześnie oporność wielogatunkowa i wielolekowa. Wszystkie te pojęcia nie opisują oczywiście w pełni skomplikowanej natury oporności. Są stale zmieniane i uzupełniane w oparciu o najnowsze wyniki badań, w tym z zakresu biologii molekularnej i genomiki (3).

Historia rozwoju lekooporności nicieni żołądkowo-jelitowych małych przeżuwaczy

Pierwsze doniesienia o oporności na środki przeciwo-robacze dotyczyły stosowania u owiec leku fenotiazyny w późnych latach 50. i wczesnych 60. XX wieku (4).

Resistance to anthelmintics in gastro-intestinal nematodes in goats. Part III. Epidemiology, diagnostics and control of anthelmintic resistance in gastro-intestinal nematodes

Mickiewicz M.¹, Czopowicz M.¹, Moroz A.¹, Szaluś-Jordanow O.², Nalbert T.¹, Markowska-Daniel I.¹, Kaba J.¹, Division of Veterinary Epidemiology and Economics¹, Department of Small Animal Diseases with Clinic², Institute of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences-SGGW

Parasitic infections, especially those caused by gastrointestinal nematodes, are one of the main factors responsible for economic losses in small ruminant farming around the world, including Poland. Their control is based on the use of anthelmintics belonging to three chemical groups: benzimidazoles, imidazothiazoles/tetrahydropyrimidines (especially levamisole) and macrocyclic lactones (ivermectins/milbemycins). The downside of the widespread use of medicinal products is the emergence of drug-resistant parasite strains. Emerging anthelmintic resistance is currently one of the most important issues in both human and veterinary medicine. Therefore, treatment of parasitic diseases is very difficult or almost impossible and contributes to substantial financial losses in small ruminant farming. The currently available methods for detection of anthelmintic resistance can be grouped into three categories: a) in vivo methods, mainly represented by the faecal egg count reduction test (FECRT) or the controlled efficacy test; b) in vitro methods, particularly the egg hatch test (EHT) and the larval development test (LDT) and c) molecular biology techniques. The establishment of parasite control measures based on pasture and farm management with reduction of exclusive reliance upon chemical treatment and prophylaxis will be essential for on farm anthelmintic resistance handling in the future. Veterinarians in Poland ought to realize that the multidrug resistance to anthelmintics in goats poses a real threat and individualised treatment schemes should be developed.

Keywords: anthelmintics resistance, benzimidazoles, gastrointestinal nematodes, goats, macrocyclic lactones, levamisole.

W 1961 r. wprowadzono tiabendazol jako pierwszy środek przeciwko pasożytom, który łączył skuteczne działanie nicieniobójcze o szerokim spektrum działania z niską toksycnością. Szybka akceptacja i powszechne stosowanie tiabendazolu, a następnie innych środków przeciwo-robaczych z grupy benzimidazoli, zapoczątkowało stosowanie tych środków na szeroką skalę. Jednak w ciągu kilku kolejnych lat wykryto oporność na tiabendazol, po raz pierwszy u owiec u nicieni *Haemonchus contortus* (5, 6). Następnie pojawiły się doniesienia o oporności na benzimidazole u innych gatunków nicieni żołądkowo-jelitowych występujących

u małych przeżuwaczy, takich jak *Teladorsagia circumcincta* i *Trichostrongylus colubriformis*. Liczne publikacje dotyczące pojawiania się oporności nicieni żołądkowo-jelitowych doprowadziły do badań nad rozpowszechnieniem tego zjawiska. Wykazały one, że do połowy lat 70. XX wieku oporność wielu gatunków nicieni na leki z grupy benzimidazoli stała się powszechna zarówno u owiec, kóz, jak i koni na całym świecie. Ten sam mechanizm powtórzył się w późnych latach 70. i 80. XX wieku po wprowadzeniu nowszych klas leków przeciwbaczących, takich jak imidazotiazole/tetrahydropirymidyny i awermektyny/milbemecyny. Na początku lat 80. po raz pierwszy pojawiły się doniesienia o nicieniach wielolekoopornych (2, 7, 8, 9, 10, 11). Pierwszą publikację o wystąpieniu oporności nicieni *T. circumcincta* i *T. colubriformis* na monepantel u kóz i owiec pojawiły się już w 2013 r. w Nowej Zelandii, zaledwie trzy lata po wprowadzeniu leku na rynek (12).

Obecnie oporność wielolekowa (dla wszystkich trzech głównych klas środków przeciwbaczących) nicieni *H. contortus*, *T. circumcincta* i *T. colubriformis* została udokumentowana na całym świecie. Powszechność oporności w przypadku nicienia *H. contortus* stanowi teraz zagrożenie dla chowu i hodowli małych przeżuwaczy szczególnie w Ameryce Południowej (13, 14, 15), Republice Południowej Afryki (16), Azji (17, 18), południowo-wschodnich regionach Stanów Zjednoczonych (19, 20, 21, 22) oraz Australii i Nowej Zelandii (23, 24, 25). Niedawne analizy przeprowadzone w Europie wskazują, że problem oporności na środki przeciwbaczące, choć poważny, nie osiągnął jeszcze poziomu kryzysowego obserwowanego w niektórych tropikalnych rejonach świata (26, 27).

Epidemiologia lekooporności nicieni żołądkowo-jelitowych u kóz

Powszechnie uważa się, że lekooporność na całym świecie występuje częściej u pasożytów kóz niż owiec (28). W większości krajów europejskich ostatnie doniesienia o oporności na środki przeciwbaczące dotyczą głównie przypadków oporności na benzimidazole lub lewamizol oraz rosnącej liczby przypadków oporności na makrocykliczne laktony, głównie iwermektynę (27). Częstość występowania lekooporności,

właśnie na leki z grupy benzimidazoli, wydaje się być bardzo wysoka w niektórych krajach europejskich (26, 27). We Francji badania wykazały, że częstość występowania oporności na benzimidazole waha się od 70 do 100% (29, 30). Bardzo podobne wyniki uzyskano niedawno w badaniach stad kóz na Słowacji (28). We Włoszech oporność na leki z grupy benzimidazoli potwierdzono w 40% badanych stad kóz (31).

Dane dotyczące częstości występowania oporności na lewamizol u kóz w Europie są ograniczone. Opisy przypadków takiej lekooporności opublikowano w Danii (32), Francji (29, 30) i Wielkiej Brytanii (33).

Częstość występowania oporności na leki z grupy makrocyklicznych laktonów u kóz różni się w poszczególnych krajach europejskich od 0% w Norwegii (34), przez 20% we Włoszech (31) do 100% w niektórych regionach Szwajcarii (35).

Oporność wielolekowa u nicieni żołądkowo-jelitowych u kóz w Europie nie jest rozpowszechniona (26, 27). Jak dotąd odnotowano tylko kilka przypadków w Danii (32), Francji (29), Szwajcarii (36) i Wielkiej Brytanii (37).

Wiele badań wykazało istnienie lekooporności na wszystkie trzy grupy leków przeciwbaczących w stadach kóz w krajach pozaeuropejskich, takich jak Stany Zjednoczone (21, 22), Brazylia (38), Kuba (39), Kenia (40), Republika Południowej Afryki (41), Uganda (42), Etiopia (43), Malezja (44, 45), Indie (46, 47, 48), Pakistan (49), Australia (50) i Nowa Zelandia (51, 52).

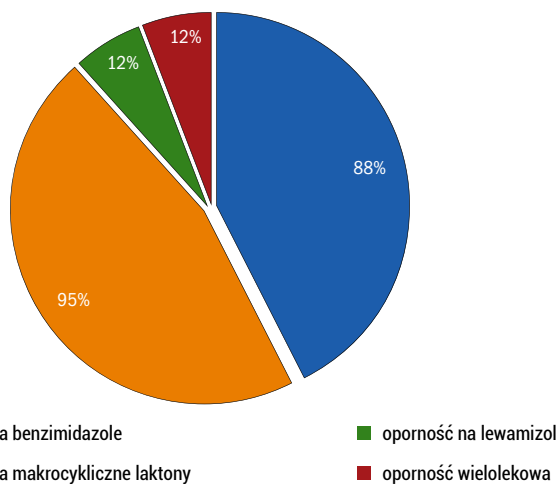
Dane dotyczące lekooporności nicieni żołądkowo-jelitowych w polskiej populacji małych przeżuwaczy są tylko fragmentaryczne. W ciągu ostatnich dwóch dekad odnotowano sporadyczne przypadki oporności na leki z grupy benzimidazoli u owiec, bydła, koni i świń (53, 54, 55). Wyniki badań przeprowadzonych przez Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej SGGW w latach 2017–2018 wykazały występowanie oporności na leki z grupy benzimidazoli (56), makrocyklicznych laktonów (57), imidazotiazoli (lewamizol) oraz oporności wielolekowej u kóz w Polsce (58). Następnie obszerne badania przeglądowe przeprowadzone przez Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej SGGW w 42 stadach kóz w Polsce w 2019 r. wykazały wysoką prevalencję oporności nicieni żołądkowo-jelitowych na leki z grupy benzimidazoli (88% stad kóz) i makrocyklicznych laktonów (95% stad kóz) oraz sporadycznie występującą oporność na lewamizol (12% stad kóz). Oporność wielolekową obejmującą wszystkie trzy grupy leków przeciwbaczących stwierdzono w 12% przebadanych stad (59; ryc. 1).

Czynniki sprzyjające rozwojowi lekooporności nicieni żołądkowo-jelitowych u kóz

Wood i Bishop (61, 62) sklasyfikowali cztery czynniki, które wpływają na tempo rozwoju i rozprzestrzeniania się oporności na insektycydy w populacjach stawonogów:

- genetyczne, w tym współczynnik mutacji i względna dominacja cechy,
- reprodukcyjne, w tym liczba pokoleń rocznie i wahania wielkości populacji,

Ryc. 1. Lekooporność nicieni żołądkowo-jelitowych w stadach kóz w Polsce (59)



- c) behawioralne i ekologiczne, w tym migracja gatunków szkodników i ich zdolność do unikania pestycydów,
 d) funkcjonalne, w tym odsetek narażonej populacji i trwałość środka chemicznego.

W przypadku rozwoju oporności nicieni żołądkowo-jelitowych na środki przeciwwrobacze czynniki a, b i d są bardzo istotne i zostały dokładnie zbadane (61, 62).

Wielokrotne poddawanie populacji pasożytów kontaktowi z tymi samymi lekami przeciwwrobaczymi powoduje selekcję osobników, które mają wrodzoną lub nabytą oporność na te leki (63). Lekooporność na daną substancję czynną lub całą grupę chemiczną jest dziedziczona przez przekazywanie opornych alleli kolejnym pokoleniom nicieni. Nawet mutacje punktowe mogą zmienić strukturę białek, co może prowadzić do zmniejszenia wrażliwości na określoną substancję i może to umożliwić przeżycie opornej części populacji pasożytów (64). Leczenie staje się nieskuteczne, gdy zwiększa się odsetek genów opornych, a tym samym zmniejsza się częstotliwość występowania w populacji alleli genów warunkujących wrażliwość na dany lek (2, 65). Rozwojowi oporności na środki przeciwwrobacze sprzyja zbyt częste stosowanie tych samych substancji i stosowanie ich w заниżonych dawkach (29, 66). Ponadto może wystąpić oporność równoległa na inne związki z tej samej grupy chemicznej o podobnym mechanizmie działania (2).

Mechanizmy warunkujące lekooporność u nicieni żołądkowo-jelitowych

Oporność na środki przeciwwrobacze pojawia się, gdy w trakcie ciągłego stosowania leku zmniejsza się wrażliwość populacji nicieni. Przy pierwszym kontakcie z lekiem gen lub geny oporności mogą już istnieć w populacjach poszczególnych gatunków nicieni. Dziedziczenie wpływa na tempo rozwoju oporności, przy czym oporność kodowana przez geny dominujące rozwija się szybciej niż ta kodowana przez geny recesywne (67). Geny oporności mogą występować z niską częstotliwością w populacji (przedadaptacyjnie) nawet przed pierwszym kontaktem z lekiem lub powstać później w wyniku mutacji i mogą również przedostać się do populacji z nowymi osobnikami poprzez migrację lub przepływ genów (68). Wraz z dalszym rozwojem oporności w populacji pasożytów w kolejnych pokoleniach dominujący genotyp zmienia się z podatnej populacji z rzadkimi heterozygotami poprzez fazę pośrednią do fazy końcowej, w której oporność utrwała się w populacji. Jeśli geny oporności są dominujące, heterozygoty i homozygoty przetrwają leczenie przeciwwrobacze, co może spowodować szybkie rozprzestrzenianie się oporności w danej populacji nicieni (2, 62).

Mechanizm oporności na leki z grupy benzimidazoli

Benzimidazole to grupa substancji przeciwwrobaczych o szerokim spektrum aktywności przeciwwrobaczej, które mają ten sam mechanizm działania.

Wiadomo, że hamują one polimeryzację dimerów α -i β -tubuliny do mikrotubul (69), co prowadzi do zakłóceń w tworzeniu cytoszkieletu, wrzeczona mitotycznego i transportu wewnątrzkomórkowego. Skutkuje to zaburzeniem metabolizmu pasożyta, a zwłaszcza zahamowaniem wychwytu glukozy i transportu wewnątrzkomórkowego, prowadząc do śmierci pasożyta (70).

Spośród obecnie dostępnych leków przeciwwrobaczych mechanizm oporności na benzimidazole był intensywnie badany w ostatnich dziesięcioleciach. Najpierw zidentyfikowano w teście przesiewowym *in vitro* z użyciem nicieni *Caenorhabditis elegans* mutację polegającą na utracie funkcji przez gen *ben-1*. Wszystkim mutantom, które pomyślnie rozwijały się w obecności benomylu, brakowało funkcjonalnego genu *ben-1*, który koduje β -tubulinę u *C. elegans* (71). Pierwszy polimorfizm pojedynczego nukleotydu korelujący z opornością na benzimidazole stwierdzono w kodonie F200Y (TTC do TAC) izotypu 1 β -tubuliny u *H. contortus*. Prowadzi to do ekspresji tyrozyny zamiast fenyloalaniny (72, 73). Ponadto stwierdzono, że dwa dodatkowe kodony, kodon F167Y (TTC do TAC; 74) i kodon E198A (GAA do GCA; 75) są związane z opornością na benzimidazole. Jak dotąd te trzy mutacje w genie β -tubuliny izotypu 1 zostały opisane dla różnych nicieni pasożytniczych występujących u przeżuwaczy, takich jak *H. contortus*, *T. circumcincta*, *T. colubriformis*, *Ostertagia ostertagi* i *Cooperia oncophora* (76).

Mechanizm oporności na lewamizol

Tempo rozwoju oporności na lewamizol wydaje się być zwykle wolniejsze u nicieni z gatunku *H. contortus*, w przypadku, którego lek ten pozostaje skuteczny nawet wobec izolatów opornych na benzimidazole i makrocycliczne laktany. Wczesne prace w latach 80. sugerowały, że oporność *T. colubriformis* na lewamizol może być warunkowany przez pojedynczy gen dominujący (77). Dalsze badania wykazały, że oporność *T. colubriformis* na lewamizol była powodowana przez pojedynczy gen recesywny związany z płcią (78). Z kolei inne badania wykazały, że oporność *H. contortus* na lewamizol wynika z recesywnej, autosomalnej cechy niezwiązanej z płcią (79). Sangster i wsp. (1998) zasugerowali, że oporność *H. contortus* na lewamizol nie jest cechą całkowicie recesywną i jest prawdopodobne, że obejmuje więcej niż jeden gen. Wcześniejsze badania nad rozwojem oporności na lewamizol u nicieni z gatunku *H. contortus* również sugerowały dziedziczenie wielogenowe (81). Lewamizol wiąże się z nikotynowymi receptorami acetylocholino, ale jak dotąd fizjologiczne i farmakologiczne podstawy oporności pozostają niejasne.

Mechanizm oporności na makrocycliczne laktany

W kilku badaniach wykazano, że oporność na ivermektynę u *H. contortus* jest dziedziczona jako cecha autosomalna dominująca. Jednakże zaobserwowano różnice między larwami i dorosłymi osobnikami, ponieważ u dorosłych pasożytów na oporność miała

również wpływ płęć (79, 82). Wyniki nowszych badań genetycznych sugerują jednak, że oporność na makrocykliczne laktony ma charakter wielogenowy. Badania terenowe prowadzone w populacji *T. colubriformis* u kóz wykazały, że dziedziczenie oporności na iwermektynę było częściowo dominującą cechą i prawdopodobnie nie było warunkowane przez pojedynczy gen (83, 84). Molekularne badania genetyczne szczepów *H. contortus* opornych na makrocykliczne laktony wykazały różnice w transporcie transbłonowym przebiegającym przy udziale glikoproteiny P (85). Działanie glikoproteiny P polega na zmniejszaniu stężenia toksycznych związków, takich jak leki z grupy makrocyklicznych laktonów w tkankach nicieni. Drogemüller i wsp. (2004) podali, że powtarzane leczenie iwermektyną prowadziło do selekcji określonych alleli kodujących glikoproteinę P u nicieni *H. contortus* i *Onchocerca volvulus*. Ponadto zasugerowano, że działanie makrocyklicznych laktonów może selekcjonować polimorfizm pojedynczego nukleotydu w kodonach β -tubuliny 1 związanych z opornością na benzimidazole (87, 88). W konsekwencji oporność na te dwie grupy leków wydaje się być wzajemnie powiązana, a częste stosowanie makrocyklicznych laktonów może stymulować rozwój oporności na benzimidazole (89).

Wykrywanie lekooporności nicieni żołądkowo-jelitowych u kóz

Podejrzenie występowania lekooporności u pasożytów zwierząt gospodarskich pojawia się w przypadku, gdy stan kliniczny zwierzęcia nie ulegnie poprawie po leczeniu środkami przeciworobaczymi. Często jednak wynika to z błędów w stosowaniu leku, np. zbyt niskiej dawki, niedokładnej ocena masy ciała, wadliwego sprzętu do podawania leków lub jego nieprawidłowego używania. Te czynniki należy najpierw wziąć pod uwagę przed rozważeniem występowania lekooporności.

Dostępne obecnie metody wykrywania lekooporności nicieni żołądkowo-jelitowych można podzielić na trzy kategorie:

- metody *in vivo*, reprezentowane głównie przez test redukcji liczby jaj w kale lub test skuteczności z grupą kontrolną,
- metody *in vitro*, w szczególności test wykluwania jaj i test rozwoju larw,
- techniki biologii molekularnej, w tym głównie PCR i pirosekwencjonowanie.



Ryc. 2. Metoda McMastera używana w celu oszacowania zmiany w liczbie jaj wytwarzanych przez pasożyty przed i po leczeniu

Metody *in vivo*

Teoretycznym „złotym standardem” w diagnostyce oporności na środki przeciworobacze jest test skuteczności z grupą kontrolną. Metoda polega na policzeniu całkowitej liczby żywych i zabitych robaków obecnych w każdym zwierzęciu po leczeniu, jednak jest to możliwe tylko poprzez uśmiercenie zwierząt. W warunkach terenowych wykonanie tego testu jest nierealne ze względu na dobrostan zwierząt, jak również ze względów ekonomicznych (90).

Bardziej praktyczną metodą, zalecaną również jako „złoty standard” przez World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP), jest test redukcji liczby jaj w kale (fecal egg count reduction test, FECRT; 91, 92). Test ten stał się podstawowym sposobem diagnozowania oporności na środki przeciworobacze w warunkach terenowych. Nie wymaga uśmiercania zwierząt doświadczalnych ani stosowania skomplikowanego sprzętu. Metoda ta oszacowuje zmiany w liczbie jaj wytwarzanych przez pasożyty przed- i po leczeniu (ryc. 2) oraz dostarcza danych na temat procentowego zmniejszenia skuteczności danego środka przeciworobacze (93). Wytyczne WAAVP zalecają użycie minimum 10 zwierząt w każdej grupie leczonej, ale istnieją dowody, że grupa licząca co najmniej sześć zwierząt jest wystarczająca (90). W metodzie tej zaleca się wykorzystanie nieleczonej grupy kontrolnej do monitorowania zmian w liczbie jaj nicieni, które mogą wystąpić w okresie badania, a które nie wynikają z zastosowanego leczenia. Oporność jest definiowana jako obecna, gdy redukcja liczby jaj w kale wynosi <95% i dolna granica przedziału ufności dla tej wielkości wynosi <90% (91, 92).

Określenie liczby i wyglądu jaj nicieni z rodziny Trichostrongylidae nie pozwala na identyfikację gatunków pasożytów. Do tego niezbędne jest przeprowadzenie hodowli larw z próbek kału pochodzących zarówno od grupy leczonej, jak i kontrolnej. Daje to możliwość określenia gatunków nicieni opornych na badane środki przeciworobacze (92, 94).

W teście redukcji liczby jaj w kale ważny jest czas, w którym pobierana jest próbka kału po leczeniu. Jeśli próbki zostaną pobrane zbyt późno, pasożyty połknięte po zastosowaniu leczenia mogą mieć czas na dojrzwienie i mogą same zacząć produkować jaja. Jest to szczególnie istotne w przypadku pasożytów z krótkimi okresami prepatentnymi, np. nicieni z rodzaju *Cooperia*. Próbkę kału, należy pobrać nie później niż 14–17 dni po zastosowaniu leczenia (91, 92). Odwrotnie, jeśli próbki są pobierane zbyt szybko po podaniu leku, wówczas zjawisko zahamowania wytwarzania jaj może prowadzić do przeszacowania skuteczności leku. Dzieje się tak, gdy środek hamuje wytwarzanie jaj przez samice nicieni, ale ich nie zabija. To zahamowanie produkcji jaj jest zwykle tymczasowe (95).

Zależnie od badanego leku czas pobrania próbek po leczeniu wynosi:

- lewamizol – 3–7 dni,
- benzimidazole – 8–10 dni,
- makrocykliczne laktony – 14–17 dni,
- wszystkie grupy leków badane w tym samym momencie i w tym samym stadzie – 14 dni.

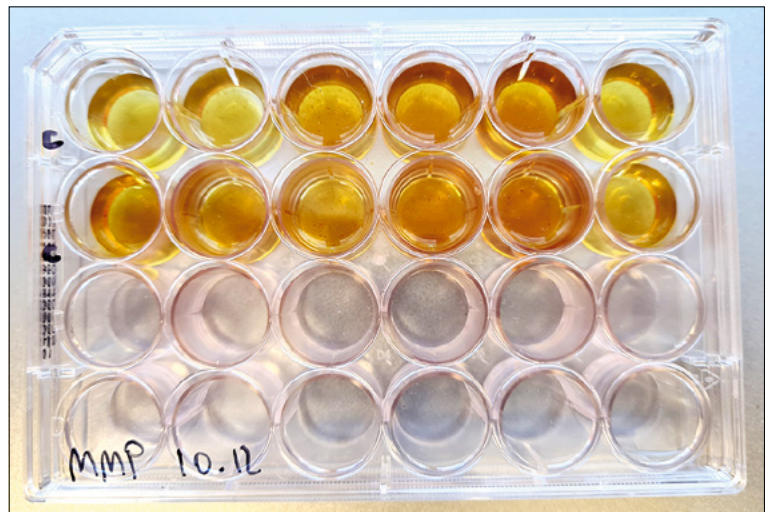
Wstępne wykrycie lekooporności na środki przeciwoznaczające w warunkach terenowych może obejmować wykonanie zarówno testu redukcji liczby jaj w kale, jak i testu skuteczności z grupą kontrolną (96, 97, 98). W celu potwierdzenia występowania i oszacowania stopnia oporności przeprowadzane są oba testy, ponieważ sam test redukcji liczby jaj w kale może nie być wystarczający. Test redukcji liczby jaj w kale ma szereg ograniczeń. Próbkę kału pobranego od tego samego zwierzęcia nawet w niewielkim odstępie czasu mogą się znacznie różnić zawartością jaj, a co się z tym wiąże, liczba jaj nie odzwierciedla wprost liczby obecnych w przewodzie pokarmowym dorosłych pasożytów. Również gatunki nicieni rozwijają się w niejednakowy sposób podczas hodowli. Wszystko to wpływa na trafność tego testu (28, 98). Wyniki ostatnich badań wskazują również, że test redukcji liczby jaj w kale może nie być w stanie wykryć w stadzie lekooporności na wczesnych etapach jej rozwoju (99).

Metody *in vitro*

Na przestrzeni lat opracowano kilka testów *in vitro* służących do wykrywania lekooporności nicieni żołądkowo-jelitowych, ale tylko dwa z nich – test wykluwania jaj i test rozwoju larw (w płynie albo agarze) są szeroko stosowane w diagnostyce parazytologicznej i badaniach naukowych (91, 92, 100, 101). Oba testy mają zalety i wady w stosowaniu do badań terenowych lekooporności nicieni żołądkowo-jelitowych.

Test wykluwania jaj (egg hatch test, EHT; **ryc. 3**) był stosowany w licznych badaniach terenowych oporności nicieni żołądkowo-jelitowych na benzimidazole u owiec i kóz (28, 102, 103). Jest zalecany przez WAAPV jako test *in vitro* do wykrywania oporności nicieni żołądkowo-jelitowych na benzimidazole u przeżuwaczy (92).

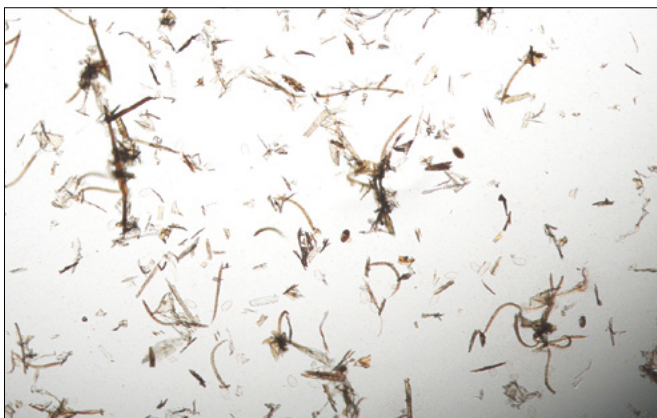
W teście wykluwania jaj nierozwinięte jaja są uzyskiwane ze świeżych lub przechowywanych w warunkach beztlenowych próbek kału, które są inkubowane w kolejno rosnących stężeniach środków przeciwoznaczających. Wszystkie jaja i larwy liczy się w każdym stężeniu i uznaje za martwe, niewyklute lub wyklute larwy stadium pierwszego (L1; **ryc. 4 i 5**). Na tej podstawie oblicza się odsetek wyklutych jaj, korygując go o naturalną śmiertelność, która ma miejsce w próbkach



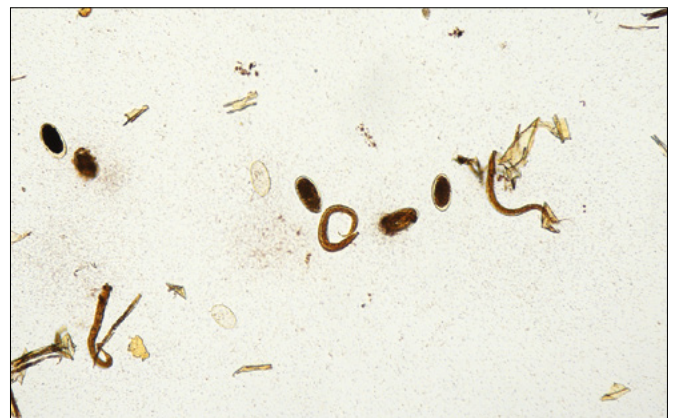
Ryc. 3. Test wykluwania jaj

kontrolnych (inkubowanych bez środka przeciwoznaczającego). Analizę statystyczną wykonuje się z zastosowaniem regresji logistycznej lub metodą logarytmiczno-probitową (104). W ten sposób określa się stężenie leku wymagane do zahamowania wyklucia 50% jaj nicieni (ED_{50} , dawka wywołująca pożądany efekt terapeutyczny w połowie badanej populacji; 91, 92). Stosując test wykluwania jaj u owiec i kóz, lewamizol należy dodać na krótki czas (na godzinę) przed rozpoczęciem procesu wykluwania larw. Wymaga to subiektywnej oceny, kiedy wykluwanie się zaczyna (jaja stają się przezroczyste i larwy można zobaczyć aktywnie poruszające się w otocze jaja). Precyzyjne wyznaczenie tego momentu w praktyce jest trudne (105, 106). Zaletą testu wykluwania jaj jest możliwość stosowania, nawet jeśli liczba jaj w kale jest niska. Jaja muszą być jednak nierozwinięte. W przeszłości podkreślano problemy techniczne w wykonaniu testu i jego standaryzacji (sposób przechowywania próbek kału po pobraniu, kolejność ich przygotowania, sposób przygotowania roztworów leku), co prowadziło do obniżenia odzwierciedlenia testu (107). W ostatnim czasie von Samson-Himmelstjerna i wsp. (108) opracowali wspólny protokół przygotowania próbek i wykonania testu, co przyczyniło się do wyeliminowania tych problemów.

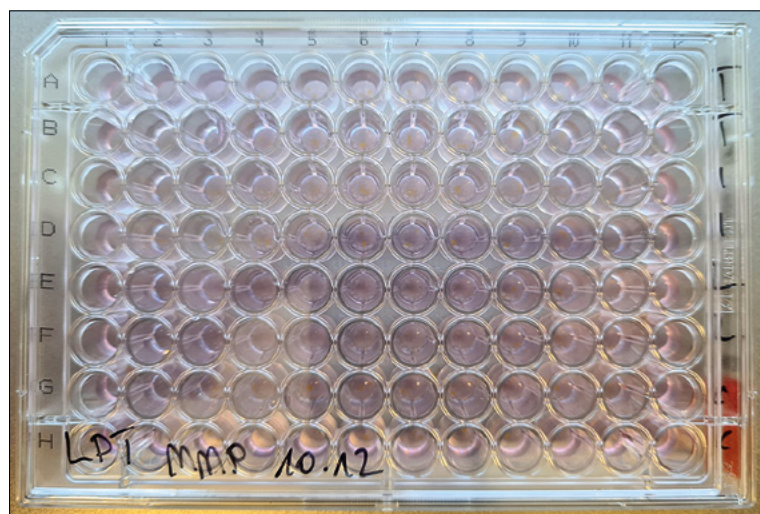
Test rozwoju larw (larval development test, LDT; **ryc. 6**) został po raz pierwszy opisany we wczesnych



Ryc. 4. Zahamowane w rozwoju jaja wrażliwe na tiabendazol i obecne larwy stadium L1 w teście wykluwania jaj (pow. 5×)



Ryc. 5. Zahamowane w rozwoju jaja wrażliwe na tiabendazol i obecne larwy stadium L1 w teście wykluwania jaj (pow. 10×)



Ryc. 6. Test rozwoju larw

latach 80. (109, 110), a następnie ulepszony (92, 111, 112). Obecnie jest powszechnie stosowany do wykrywania oporności nicieni żołądkowo-jelitowych (*H. contortus*, *T. colubriformis* i *T. circumcincta*) u owiec i kóz na benzimidazole, lewamizol i makrocykliczne laktony (92).

Test rozwoju larw jest wykonywany w dwóch wersjach. Różnią się one formą wykorzystywanej do inkubacji pożywki. Może ona być płynna (112) lub stała (agarozowa; 111). Zasada, na której opiera się test, jest w obu wersjach identyczna. Jaja nicieni uzyskuje się ze zbiorczej próbki kału i umieszcza w dołkach zawierających pożywkę (w agarze lub wodzie destylowanej) z seryjnie wzrastającymi stężeniami leku. Jaja inkubuje się w cieplarni przez siedem dni do larw stadium L3. Następnie pod mikroskopem zlicza się jaja i larwy wszystkich stadiów (L1/L2/L3; ryc. 7 i 8) obecne w dołkach zawierających lek (grupa doświadczalna) oraz bez leku (grupa kontrolna) i na podstawie tych danych wylicza się wartość stężenia środka przeciwoznaczającego, przy którym rozwój larw stadium L3 jest zahamowany u 50% osobników (LC_{50} ; stężenie śmiertelne) oraz wykreśla się krzywą zależności pomiędzy dawką a obserwowanym efektem (113). Rozwój larw inwazyjnych stadium trzeciego (L3) w stężeniach leku, które powinny być dla nich bójcze, świadczy o obecności osobników opornych. Larwy stadium L3 we wszystkich dołkach identyfikuje

się do poziomu gatunku lub rodzaju za pomocą charakterystycznych cech morfologicznych, zgodnie z procedurą opisaną przez van Wyk i Mayhew (2013).

Metoda ta jest odpowiednia do badania lekooporności na benzimidazole i lewamizol, ale nie potwierdziła trafności w badaniach makrocyklicznych laktonów (112). W przypadku oporności na iwermektyne test ten okazał się nieprzydatny, zwłaszcza u nicieni z gatunku *T. circumcincta*. Po modyfikacjach metodyki, a szczególnie zastosowaniu iwermektyny w postaci aglikonu, uważa się obecnie, że może być stosowany także do wykrywania oporności na makrocykliczne laktony (111, 114, 115).

Test rozwoju larw stanowi alternatywę dla pracochłonnych testów *in vivo* i umożliwia badanie oporności na wszystkie grupy leków przeciwoznaczających jednocześnie, niezależnie od wielkości stada (21). W wersji z pożywką złożoną z agaru jest jedynym testem diagnostycznym *in vitro* do wykrywania lekooporności, który został skomercjalizowany i jest dostępny na rynku jako DrenchRite® (116).

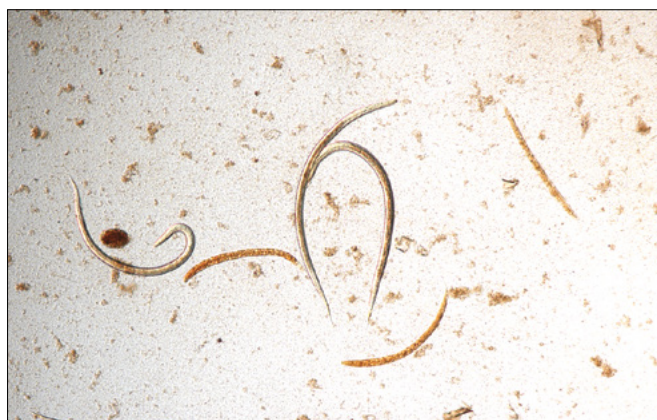
Zarówno test wykluwania jaj, jak i rozwoju larw, mają jednak ograniczenia. Ich czułość jest często niewystarczająca. Ma to miejsce w przypadku, gdy oporność dotyczy mniej niż 25% populacji pasożytów (117). Na czułość wpływa także zaobserwowane zjawisko dobowego wahania wartości dawki skutecznej (ED_{50}) oraz stężenia śmiertelnego (LC_{50}) w okresie prepatentnym (118, 119). Te wady testów można przezwyciężyć wyznaczając dawkę różnicującą (dawka, która zabija lub hamuje rozwój 99% populacji pasożytów; 92). To działanie pozwala na zwiększenie czułości testu i wykazanie obecności nawet niewielkiego odsetka opornych pasożytów w populacji, co ma miejsce na wczesnym etapie rozwoju oporności. Stosowanie dawki różnicującej jest mniej czasochłonne i pozwala na wiarygodne oszacowanie częstości występowania alleli odpowiedzialnych za lekooporności, nawet jeśli ich prevalencja jest poniżej 10%. Jest to metoda, która sprawdziła się także w warunkach terenowych (99, 120).

Metody biologii molekularnej

Najczęściej stosowane techniki biologii molekularnej służące do wykrywania lekooporności obejmują konwencjonalną metodę PCR (96, 121), PCR w czasie



Ryc. 7. Zahamowane w rozwoju jaja oraz larwy stadium L1–L3 w tęście rozwoju larw (pow. 5×)



Ryc. 8. Zahamowane w rozwoju jaja oraz larwy stadium L1–L3 w tęście rozwoju larw (pow. 10×)

rzeczywistym (real-time PCR; 64) oraz pirosekwencjonowanie (108, 122, 123). Wszystkie wymienione metody opierają się na wykrywaniu polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w pozycji F167Y (od TTC do TAC), E198A (od GAA do GCA) i F200Y (od TTC do TAC) w genie β -tubuliny izotypu 1 u nicieni *H. contortus*, *T. colubriformis* i *T. circumcincta* (68, 73, 75). Opisało kilka sekwencji haplotypów genu β -tubuliny izotypu 1 u *H. contortus*, *T. colubriformis* i *T. circumcincta* (np. GeneBank numer dostępu M76493; M76491). Zalecane pirosekwencjonowanie jest możliwością oszacowania częstości występowania określonych alleli w DNA wyizolowanym z próbek. Jeśli jest to zbiorcza próbka kału, to uzyskane wyniki dobrze odzwierciedlają sytuację panującą w rzeczywistości w danym stadzie (124). Największą przeszkodą w powszechnym stosowaniu metod biologii molekularnej w badaniach naukowych i diagnostyce lekooporności nicieni żołądkowo-jelitowych jest niedostateczna wiedza dotycząca molekularnych podstaw mechanizmów oporności na lewamizol oraz makrocykliczne laktony. Spośród obecnie dostępnych leków przeciwo-baczych jedynie mechanizm oporności na benzimidazole został dokładnie poznany, w związku z czym możliwe było opracowanie testów wykorzystujących techniki biologii molekularnej do wykrywania oporności jedynie na tę grupę leków (125).

Zwalczanie oraz zapobieganie lekooporności nicieni żołądkowo-jelitowych

Oporność na leki z grupy benzimidazoli wydaje się być nieodwracalnym procesem. Liczne badania przeprowadzone w różnych ośrodkach naukowych wielokrotnie wykazały, że oporność fenotypowa na leki z grupy benzimidazoli pozostaje na wysokim poziomie przez wiele lat po zaprzestaniu ich stosowania (126, 127, 128). Wyniki ostatnich badań przeprowadzonych w Nowej Zelandii wskazują natomiast, że istnieje możliwość częściowego powrotu do stanu wrażliwości, ale jedynie na lewamizol i iwermektynę (129).

Leki przeciwo-bacze są nadal najbardziej powszechnym środkiem stosowanym w zwalczaniu nicieni żołądkowo-jelitowych u kóz i owiec. Jednak powinny być stosowane właściwie i jedynie jako jeden z elementów szerokiego planu zwalczania i zapobiegania szerzeniu się inwazji pasożytniczych (130). Podając leki, wykorzystuje się dwie strategię: leczenie celowe i ukierunkowane leczenie wybiórcze (selektywne).

Leczenie celowe polega na podawaniu leków całej grupie zwierząt w najbardziej odpowiednim okresie. Jest to najpopularniejszą strategię zwalczania pasożytów u kóz w Europie. Lek podaje się zwierzętom przed rozpoczęciem sezonu pastwiskowego i po jego zakończeniu. Stosując ten schemat, właściciele stad unikają zanieczyszczenia pastwisk wiosną i problemów zdrowotnych spowodowanych przez nicienie żołądkowo-jelitowe zimą (131).

Ukierunkowane leczenie wybiórcze stosowane jest jedynie w grupie wybranych zwierząt. Są to zwierzęta wykazujące objawy kliniczne choroby lub charakteryzujące się zmniejszoną wydajnością (132, 133).

Strategia ta wymaga umiejętności identyfikacji w stadzie zwierząt, które wymagają leczenia. W tym celu wykorzystuje się zarówno wskaźniki parazytologiczne (liczbę jaj wydalanych w kale), patofizjologiczne (ocena kondycji, obecność biegunki lub niedokrwistości), jak i produkcyjne (przyrost masy ciała, produkcja mleka). Wartości tych wskaźników decydują o konieczności wdrożenia leczenia przeciwo-baczego (134).

Najbardziej obiecująca wydaje się być strategia leczenia, oparta na koncepcji „refugium” (ostoja). Strategia ta zdecydowanie spowalnia szerzenie się lekooporności w stadzie (130). Tempo narastania lekooporności jest ściśle związane z odsetkiem populacji pasożytów, które są narażone na działanie środków przeciwo-baczych. Aby je spowolnić, trzeba odpowiedni odsetek populacji pasożytów utrzymywać w warunkach braku kontaktu z lekiem. Takie subpopulacje pasożytów określane są mianem „ostoi” (135). Pojęcie „ostoi” zostało po raz pierwszy zdefiniowane przez ekologów jako lokalne środowisko, które uniknęło regionalnych zmian ekologicznych, a tym samym zapewnia siedlisko zagrożonym gatunkom. Utrzymanie w całej populacji pasożytów „ostoi” składających się z robaków niemających kontaktu z lekami decyduje o utrzymaniu w populacji alleli warunkujących wrażliwość na dany lek. Pasożyty pozostające w „ostojach” mogą w okresie pastwiskowym krzyżować się z osobnikami opornymi i w ten sposób powodować nie tylko zachowanie, ale także szerzenie się w populacji pasożytów genotypów lekowrażliwych (130, 133).

Podsumowanie

W naszej strefie klimatycznej inwazje powodowane przez nicienie żołądkowo-jelitowe z rodziny Trichostrongylidae są jednym z najważniejszych problemów zdrowotnych w stadach kóz. Ich zwalczanie opiera się głównie na stosowaniu leków przeciwo-baczych należących do trzech grup chemicznych: benzimidazoli, imidazotiazoli/tetrahydroksypiryrimidyn oraz makrocyklicznych laktonów (awermektyny/milbemycyny). Minusem powszechnego stosowania produktów leczniczych jest pojawienie się lekoopornych szczepów pasożytów. Pojawiająca się lekooporność jest obecnie jednym z najważniejszych problemów zarówno w medycynie, jak i weterynarii. Z tego powodu skuteczne leczenie chorób pasożytniczych staje się coraz trudniejsze lub prawie niemożliwe i przyczynia się do znacznych strat finansowych w hodowli małych przeżuwaczy na całym świecie. Badania przeglądowe przeprowadzone przez Samodzielny Zakład Epidemiologii i Ekonomiki Weterynaryjnej SGGW w stadach kóz w Polsce wykazały, że lekooporność nicieni żołądkowo-jelitowych jest ważnym problemem klinicznym także w Polsce. Wyniki badań wskazują, że lekooporność nicieni-żołądkowych na leki z grupy benzimidazoli i makrocyklicznych laktonów występuje powszechnie u kóz w Polsce. Natomiast oporność na lewamizol jest sporadyczna. Wdrożenie środków kontroli inwazji pasożytniczych opartych na zarządzaniu stadem oraz pastwiskiem, z ograniczeniem wyłącznej zależności od

leczenia chemicznego, będzie miało zasadnicze znaczenie w zwalczaniu narastania oporności w stadach kóz. Lekarze weterynarii w swojej codziennej praktyce powinni stosować leki przeciworobacze świadomie, uwzględniając różnice gatunkowe w dawkowaniu pomiędzy bydłem, owcami i kozami oraz jedynie zgodnie w wynikami wcześniej przeprowadzonych badań parazytologicznych.

Piśmiennictwo

- Fleming S.A., Craig T., Kaplan R.M., Miller J.E., Navarre C., Rings M.: Anthelmintic resistance of gastrointestinal parasites in small ruminants. *J. Vet. Intern. Med.* 2006, **20**, 435–444.
- Prichard R.K., Hall C.A., Kelly J.D., Martin I.C., Donald A.D.: The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Aust. Vet. J.* 1980, **56**, 239–251.
- Gilleard J.S.: Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics. *Int. J. Parasitol.* 2006, **36**, 1227–1239.
- Drudge J.H., Leland S.E. Jr, Wyant Z.N.: Strain variation in the response of sheep nematodes to the action of phenothiazine. II. Studies on pure infections of *Haemonchus contortus*. *Am. J. Vet. Res.* 1957, **18**, 317–325.
- Drudge J.H., Szanto J., Wyant Z.N., Elam G.: Field studies on parasite control in sheep: comparison of thiabendazole, ruelene, and phenothiazine. *Am. J. Vet. Res.* 1964, **25**, 1512–1518.
- Conway D.P.: Variance in the effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 1964, **25**, 844–846.
- Sangster N.C., Whitlock H.V., Russ I.G., Gunawan M., Griffin D.L., Kelly J.D.: *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* resistant to levamisole, morantel tartrate and thiabendazole: occurrence of field strains. *Res. Vet. Sci.* 1979, **27**, 106–110.
- Coles G.C.: Strategies for control of anthelmintic-resistant nematodes of ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988, **192**, 330–334.
- Waller P.J., Dobson R.J., Obendorf D.L., Gillham R.J.: Resistance of *Trichostrongylus colubriformis* to levamisole and morantel: differences in relation to selection history. *Vet. Parasitol.* 1986, **21**, 255–263.
- van Wyk J.A., Malan F.S.: Resistance of field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, radoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Vet. Rec.* 1988, **123**, 226–228.
- Taylor M.A., Hunt K.R.: Anthelmintic drug resistance in the UK. *Vet. Rec.* 1989, **125**, 143–147.
- Scott I., Pomroy W.E., Kenyon P.R., Smith G., Adlington B., Moss A.: Lack of efficacy of monepantel against *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. Parasitol.* 2013, **198**, 166–171.
- Waller P.J., Echevarria F., Eddi C., Maciel S., Nari A., Hansen J.W.: Anthelmintic resistance of nematodes in sheep flocks in South America. *Vet. Rec.* 1995, **136**, 620.
- Verissimo C.J., Nicura S.C., Alberti A.L., Rodrigues C.F., Barbosa C.M., Chiebao D.P., Cardoso D., da Silva G.S., Pereira J.R., Margatho L.F., da Costa R.L., Nardon R.F., Ueno T.E., Curci V.C., Molento M.B.: Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from São Paulo state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 2012, **87**, 209–216.
- Oliveira P.A., Riet-Correa B., Estima-Silva P., Coelho A.C.B., Santos B.L.D., Costa M.A.P., Ruas J.L., Schild A.L.: Multiple anthelmintic resistance in Southern Brazil sheep flocks. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 2017, **26**, 427–432.
- van Wyk J.A., Stenson M.O., Van der Merwe J.S., Vorster R.J., Viljoen P.G.: Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1999, **66**(4): 273–284.
- Chandrawathani P., Waller P.J., Adnan M., Höglund J.: Evolution of high-level, multiple anthelmintic resistance on a sheep farm in Malaysia. *Trop. Anim. Health Prod.* 2003, **35**(1): 17–25.
- Chandrawathani P., Yusoff N., Wan L.C., Ham A., Waller P.J.: Total anthelmintic failure to control nematode parasites of small ruminants on government breeding farms in Sabah, East Malaysia. *Vet. Res. Commun.* 2004, **28**(6): 479–489.
- Terrill T.H., Kaplan R.M., Larsen M., Samples O.M., Miller J.E., Geleye S.: Anthelmintic resistance on goat farms in Georgia: efficacy of anthelmintics against gastrointestinal nematodes in two selected goat herds. *Vet. Parasitol.* 2001, **97**: 261–268.
- Mortenson L.L., Williamson L.H., Terrill T.H., Kircher R.A., Larsen M., Kaplan R.M.: Evaluation of prevalence and clinical implications of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2003, **223**(4): 495–500.
- Crook E.K., O'Brien D.J., Howell S.B., Storey B.E., Whitley N.C., Burke J.M., Kaplan R.M.: Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the mid-Atlantic region and comparison of in vivo and in vitro detection methods. *Small Rum. Res.* 2016, **143**: 89–96.
- Howell S.B., Burke J.M., Miller J.E., Terrill T.H., Valencia E., Williams M.J., Williamson L.H., Zajac A.M., Kaplan R.M.: Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the south-eastern United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2008, **233**: 1913–1919.
- Playford M.C., Smith A.N., Love S., Besier R.B., Kluver P., Bailey J.N.: Prevalence and severity of anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in Australia (2009–2012). *Aust. Vet. J.* 2014, **92**(12): 464–471.
- Lamb J., Elliott T., Chambers M., Chick B.: Broad spectrum anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in Northern NSW of Aust. *Vet. Parasitol.* 2017, **241**: 48–51.
- Preston S., Piedrafita D., Sandeman M., Cotton S.: The current status of anthelmintic resistance in a temperate region of Australia; implications for small ruminant farm management. *Vet. Parasitol. Reg. Stud. Rep.* 2019, **17**: 100313.
- Rose Vineer H., Rinaldi L., Bosco A., Mavrot F., de Waal T., Skuce P., Charlier J., Torgerson P.R., Hertzberg H., Hendrickx G., Vercruyssen J., Morgan E.R.: Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. *Vet. Rec.* 2015, **176**(21): 546.
- Rose Vineer H., Morgan E.R., Hertzberg H., Bartley D.J., Bosco A., Charlier J., Chartier C., Claerebout E., de Waal T., Hendrickx G., Hinney B., Höglund J., Ježek J., Kašný M., Keane O.M., Martínez-Valladares M., Mateus T.L., McIntyre J., Mickiewicz M., Munoz A.M., Phythian C.J., Ploeger H.W., Rataj A.V., Skuce P.J., Simin S., Sotiraki S., Spinu M., Stuenkel S., Thamsborg S.M., Vadlejš J., Varady M., von Samson-Himmelstjerna G., Rinaldi L.: Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: creation and meta-analysis of an open database. *Parasite.* 2020, **27**: 69.
- Babják M., Königová A., Urda Dolinská M., Vadlejš J., Várady M.: Anthelmintic resistance in goat herds—In vivo versus in vitro detection methods. *Vet. Parasitol.* 2018, **254**: 10–14.
- Chartier C., Soubirac F., Pors I., Silvestre A., Hubert J., Couquet C., Cabaret J.: Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of dairy goats under extensive management conditions in southwestern France. *J. Helminthol.* 2001, **75**(4): 325–330.
- Paraud C., Kulo A., Pors I., Chartier C.: Resistance of goat nematodes to multiple anthelmintics on a farm in France. *Vet. Rec.* 2009, **164**(18): 563–564.
- Zanzani S.A., Gazzonis A.L., Di Cerbo A., Varady M., Manfredi M.T.: Gastrointestinal nematodes of dairy goats, anthelmintic resistance and practices of parasite control in Northern Italy. *BMC Vet. Res.* 2014, **10**: 114.
- Maingi N., Björn H., Thamsborg S.M., Bøgh H.O., Nansen P.: A survey of anthelmintic resistance in nematode parasites of goats in Denmark. *Vet. Parasitol.* 1996, **66**: 53–66.
- Hong C., Hunt K.R., Coles G.C.: Occurrence of anthelmintic resistant nematodes on sheep farms in England and goat farms in England and Wales. *Vet. Rec.* 1996, **139**: 83–86.
- Domke A.V., Chartier C., Gjerde B., Höglund J., Leine N., Vatn S., Stuenkel S.: Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats in Norway. *Parasitol. Res.* 2012, **111**(1): 185–193.
- Murri S., Knubben-Schweizer G., Torgerson P., Hertzberg H.: Frequency of eprinomectin resistance in gastrointestinal nematodes of goats in canton Berne, Switzerland. *Vet. Parasitol.* 2014, **203**(1–2): 114–119.
- Schnyder M., Torgerson P.R., Schönmann M., Kohler L., Hertzberg H.: Multiple anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* isolated from South African Boer goats in Switzerland. *Vet. Parasitol.* 2005, **128**(3–4): 285–290.
- Jackson F., Jackson E., Coop R.L.: Evidence of multiple anthelmintic resistance in a strain of *Teladorsagia circumcincta* (*Ostertagia circumcincta*) isolated from goats in Scotland. *Res. Vet. Sci.* 1992, **53**(3): 371–374.
- Waller P.J., Echevarria F., Eddi C., Maciel S., Nari A., Hansen J.W.: The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: general overview. *Vet. Parasitol.* 1996 Apr, **62**(3–4): 181–187.
- Arece-García J., López-Leyva Y., Olmedo-Juárez A., Ramírez-Vargas G., Reyes-Guerrero D., López-Arellano M.E., De Givès P.M., Várady M., Rojo-Rubio R., González-Garduño R.: First report of multiple anthelmintic resistance in goat farm in Cuba. *Helminthologia.* 2017, **54**: 358–362.
- Vattaa A.F., Lindberg A.L.: Managing anthelmintic resistance in small ruminant livestock of resource-poor farmers in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 2006, **77**(1): 2–8.
- Bakunzi F.R., Nkomo L.K., Motsei L.E., Ndou R.V., Nyirenda M.: A survey on anthelmintic resistance in nematode parasites of communally grazed sheep and goats in a rural area of North West Province, Republic of South Africa. *Life Sci.* 2013, **10**: 391–393.
- Nabukenya I., Rubaire-Akiiki C., Olila D., Muhangi D., Höglund J.: Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats and evaluation of FAMACHA diagnostic marker in Uganda. *Vet. Parasitol.* 2014, **205**(3–4): 666–675.
- Wakayo B.U., Dewo T.F.: Anthelmintic Resistance of Gastrointestinal Parasites in Small Ruminants: A Review of the Case of Ethiopia. *J. Vet. Sci. Technol.* 2015, **S10**: 001.

44. Dorny P., Claerebout E., Vercruyse J., Sani R., Jalila A.: Anthelmintic resistance in goats in peninsular Malaysia. *Vet. Parasitol.* 1994; **55(4)**: 327–342.
45. Basripuzi H.B., Sani R.A., Ariff O.M.: Anthelmintic resistance in selected goat farms in Kelantan. *Mal. J. Anim. Sci.* 2012; **15**: 47–56.
46. Singh S., Yadav C.L.: A survey of anthelmintic resistance by nematodes on three sheep and two goat farms in Hisar (India). *Vet. Res. Commun.* 1997; **21(6)**: 447–451.
47. Singh R., Bal M.S., Singla L.D., Kaur P.: Detection of anthelmintic resistance in sheep and goat against fenbendazole by faecal egg count reduction test. *J. Parasit. Dis.* 2017; **41(2)**: 463–466.
48. Manikkavasagan I., Binosundar S.T., Raman M.: Survey on anthelmintic resistance to gastrointestinal nematodes in unorganized goat farms of Tamil Nadu. *J. Parasit. Dis.* 2015; **39(2)**: 258–261.
49. Jabbar A., Iqbal Z., Saddiqi H.A., Babar W., Saeed M.: Prevalence of multiple anthelmintic resistant gastrointestinal nematodes in dairy goats in a desolated tract (Pakistan). *Parasitol. Res.* 2008; **103(1)**: 29–35.
50. Veale P.I.: Resistance to macrocyclic lactones in nematodes of goats. *Aust. Vet. J.* 2002; **80(5)**: 303–304.
51. Kettle P.R., Vlassoff A., Reid T.C., Horton C.T.: A survey of nematode control measures used by milking goat farmers and of anthelmintic resistance on their farms. *N. Z. Vet. J.* 1983; **31(8)**: 139–143.
52. Watson T.G., Hosking B.C.: Evidence for multiple anthelmintic resistance in two nematode parasite genera on a Saanen goat dairy. *N. Z. Vet. J.* 1990; **38(2)**: 50–53.
53. Balicka-Ramisz A., Ramisz A., Malecki J., Supera K.: Case of the resistance of the gastrointestinal nematodes to fenbendazole in sheep. *Mag. Wet.* 1997; **6**: 442–443.
54. Balicka-Ramisz A.K., Ramisz A.Z.: Benzimidazoles resistance in nematode parasites in domesticated animals in north-west part of Poland. *Electron. J. Pol. Agric. Univ.* 1999; **2**: 2.
55. Kowal J., Wyrobisz A., Nosal P., Kucharski M., Kaczor U., Skalska M., Sendor P.: Benzimidazole resistance in the ovine *Haemonchus contortus* from southern Poland – coproscopical and molecular findings. *Ann. Parasitol.* 2016; **62(2)**: 119–123.
56. Mickiewicz M., Czopowicz M., Górski P., Kaba J.: The first reported case of resistance of gastrointestinal nematodes to benzimidazole anthelmintic in goats in Poland. *Ann. Parasitol.* 2017; **63**: 317–322.
57. Mickiewicz M., Czopowicz M., Moroz A., Szaluś-Jordanow O., Górski P., Várady M., Königová A., Spinu M., Lefkaditis M., Kaba J.: Development of resistance to eprinomectin in gastrointestinal nematodes in a goat herd with pre-existing resistance to benzimidazoles. *Pol. J. Vet. Sci.* 2019; **22**: 753–760.
58. Mickiewicz M., Czopowicz M., Kawecka-Grochocka E., Moroz A., Szaluś-Jordanow O., Várady M., Königová A., Spinu M., Górski P., Bagnicka E., Kaba J.: The first report of multidrug resistance in gastrointestinal nematodes in goat population in Poland. *BMC Vet. Res.* 2020; **16**: 270.
59. Mickiewicz M., Czopowicz M., Moroz A., Potârniche A.V., Szaluś-Jordanow O., Spinu M., Górski P., Markowska-Daniel I., Várady M., Kaba J.: Prevalence of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes in Polish goat herds assessed by the larval development test. *BMC Vet. Res.* 2021; **17(1)**: 19.
60. Wood R.J., Bishop J.A.: Insecticide resistance: populations and evolution, pp. 97–127. W: J.A. Bishop and L.M. Cook (eds.), *Genetic consequences of man-made change*. Academic Press, New York 1981.
61. Sykes A.R., McFarlane R.G., FAMILTON A.S.: Parasites, immunity and anthelmintic resistance. W: Speedy, A.W. (Ed.), *Progress in Sheep and Goat Research*. CAB International, Wallingford Oxon, UK, 1992: 179–191.
62. Sargison N.D., Jackson F., Bartley D.J., Wilson D.J., Stenhouse L.J., Penny C.D.: Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland. *Vet. Parasitol.* 2007; **145(1–2)**: 65–76.
63. Michel J.F.: Strategies for the use of anthelmintics in livestock and their implications for the development of drug resistance. *Parasitology*. 1985; **90(Pt 4)**: 621–628.
64. Walsh T.K., Donnan A.A., Jackson F., Skuce P., Wolstenholme A.J.: Detection and measurement of benzimidazole resistance alleles in *Haemonchus contortus* using real-time PCR with locked nucleic acid Taqman probes. *Vet. Parasitol.* 2007; **144(3–4)**: 304–312.
65. Sangster N.C., Rickard J.M., Hennessy D.R., Steel J.W., Collins G.H.: Disposition of oxfendazole in goats and efficacy compared with sheep. *Res. Vet. Sci.* 1991; **51(3)**: 258–263.
66. Chartier C., Etter E., Hoste H., Pors I., Mallereau M.P., Broqua C., Mallet S., Koch C., Massé A.: Effects of the initial level of milk production and of the dietary protein intake on the course of natural nematode infection in dairy goats. *Vet. Parasitol.* 2000; **92(1)**: 1–13.
67. Barger I.A.: Models as a guide to sustainable worm control. W: *Sustainable control of internal parasites in ruminants: Animal industries workshop*, 1997: 203–213.
68. Silvestre A., Cabaret J.: Mutation in position 167 of isotype 1 beta-tubulin gene of *Trichostrongylid* nematodes: role in benzimidazole resistance? *Mol. Biochem. Parasitol.* 2002; **120(2)**: 297–300.
69. Sangster N.C., Prichard R.K., Lacey E.: Tubulin and benzimidazole-resistance in *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). *J. Parasitol.* 1985; **71(5)**: 645–651.
70. Lacey E.: The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int. J. Parasitol.* 1988; **18(7)**: 885–936.
71. Driscoll M., Dean E., Reilly E., Bergholz E., Chalfie M.: Genetic and molecular analysis of a *Caenorhabditis elegans* beta-tubulin that conveys benzimidazole sensitivity. *J. Cell Biol.* 1989; **109(6 Pt 1)**: 2993–3003.
72. Kwa M.S., Veenstra J.G., Roos M.H.: Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1994; **63(2)**: 299–303.
73. Kwa M.S., Veenstra J.G., Van Dijk M., Roos M.H.: Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 1995; **246(4)**: 500–510.
74. Prichard R.: Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends Parasitol.* 2001; **17(9)**: 445–453.
75. Ghisi M., Kaminsky R., Mäser P.: Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.* 2007; **144(3–4)**: 313–320.
76. von Samson-Himmelstjerna G., Blackhall W.J., McCarthy J.S., Skuce P.J.: Single nucleotide polymorphism (SNP) markers for benzimidazole resistance in veterinary nematodes. *Parasitology*. 2007; **134(Pt 8)**: 1077–1086.
77. Waller P.J.: Resistance to anthelmintics and the implications for animal production (Chapter 1). Ed, *Resistance in nematodes to anthelmintic drugs*. 1985, 1–11.
78. Martin P.J., McKenzie J.A.: Levamisole resistance in *Trichostrongylus colubriformis*: a sex-linked recessive character. *Int. J. Parasitol.* 1990; **20(7)**: 867–872.
79. Dobson R.J., LeJambre L., Gill J.H.: Management of anthelmintic resistance: inheritance of resistance and selection with persistent drugs. *Int. J. Parasitol.* 1996; **26(8–9)**: 993–1000.
80. Sangster N.C., Redwin J.M., Bjorn H.: Inheritance of levamisole and benzimidazole resistance in an isolate of *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 1998; **28(3)**: 503–510.
81. Sangster N.C., Rickard J.M., Hennessy D.R., Steel J.W., Collins G.H.: Disposition of oxfendazole in goats and efficacy compared with sheep. *Res. Vet. Sci.* 1991; **51(3)**: 258–263.
82. Le Jambre L.F., Gill J.H., Lenane I.J., Baker P.: Inheritance of avermectin resistance in *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 2000; **30(1)**: 105–111.
83. Gill J.H., Lacey E.: Avermectin/milbemycin resistance in trichostrongyloid nematodes. *Int. J. Parasitol.* 1998; **28(6)**: 863–877.
84. Gopal R.M., Pomroy W.E., West D.M.: Resistance of field isolates of *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* to ivermectin. *Int. J. Parasitol.* 1999; **29(5)**: 781–786.
85. Njue A.I., Hayashi J., Kinne L., Feng X.P., Prichard R.K.: Mutations in the extracellular domains of glutamate-gated chloride channel alpha3 and beta subunits from ivermectin-resistant *Cooperia oncophora* affect agonist sensitivity. *J. Neurochem.* 2004; **89(5)**: 1137–1147.
86. Drogemuller M., Failing K., Schnieder T., von Samson-Himmelstjerna G.: Effect of repeated benzimidazole treatments with increasing dosages on the phenotype of resistance and the beta-tubulin codon 200 genotype distribution in a benzimidazole-resistant cyathostomin population. *Vet. Parasitol.* 2004; **123(3–4)**: 201–213.
87. de Lourdes Mottier M., Prichard R.K.: Genetic analysis of a relationship between macrocyclic lactone and benzimidazole anthelmintic selection on *Haemonchus contortus*. *Pharmacogenet Genomics*. 2008; **18(2)**: 129–140.
88. Williamson S.M., Storey B., Howell S., Harper K.M., Kaplan R.M., Wolstenholme A.J.: Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol.* 2011; **180(2)**: 99–105.
89. Eng J.K.L., Blackhall W.J., Osei-Atweneboana M.Y., Bourguinat C., Galazzo D., Beech R.N., Unnasch T.R., Awadzi K., Lubega G.W. & Prichard R.K.: Ivermectin selection on beta-tubulin: Evidence in *Onchocerca volvulus* and *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2006; **150**: 229–235.
90. Wood I.B., Amaral N.K., Bairden K., Duncan J.L., Kassai T., Malone J.B. Jr, Pankavich J.A., Reinecke R.K., Slocombe O., Taylor S.M., Vercruyse J.: World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet. Parasitol.* 1995; **58(3)**: 181–213.
91. Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A., Waller P.J.: World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 1992; **44(1–2)**: 35–44.

92. Coles G.C., Jackson F., Pomroy W.E., Prichard R.K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M.A., Vercruyse J.: The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 2006; **136**(3–4): 167–185.
93. Presidente P.J.A., Anderson N., Waller P.J.: Methods for detection of resistance to anthelmintics. W: 'Attwood' Institute Veterinary Research, Department of Agriculture Rural Affairs, Mickelham Road, Westmeadows, Vic. 3047, Australia, editor/s. *Resistance in nematodes to anthelmintic drugs*. New South Wales, Australia: CSIRO, Division of Animal Health Wool Corporation, Australia: 1985: 13–27.
94. van Wyk J.A., Mayhew E.: Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. *Onderstepoort J. Vet Res.* 2013; **80**(1): 539.
95. McKenna P.B.: Anthelmintic treatment and the suppression of egg production in gastro-intestinal nematodes of sheep and cattle: fact or fallacy? *N. Z. Vet. J.* 1997; **45**(5): 173–177.
96. Njue A.I., Prichard R.K.: Cloning two full-length beta-tubulin isotype cDNAs from *Cooperia oncophora*, and screening for benzimidazole resistance-associated mutations in two isolates. *Parasitology*. 2003; **127**(Pt 6): 579–588.
97. Vickers M., Venning M., McKenna P.B., Mariadass B.: Resistance to macrocyclic lactone anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* in sheep in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 2001 Jun; **49**(3): 101–105.
98. Vidyashankar A.N., Kaplan R.M., Chan S.: Statistical approach to measure the efficacy of anthelmintic treatment on horse farms. *Parasitology*. 2007; **134**(Pt.14): 2027–2039.
99. Königová A., Urda Dolinská M., Babják M., von Samson-Himmelstjerna G., Komáromyová M., Várady M.: Experimental evidence for the lack of sensitivity of in vivo faecal egg count reduction testing for the detection of early development of benzimidazole resistance. *Parasitol. Res.* 2021; **120**(1): 153–159.
100. Várady M., Corba J., Letková V., Kováč G.: Comparison of two versions of larval development test to detect anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 2009; **160**(3–4): 267–271.
101. Várady M., Biorn H., Nansen P.: In vitro characterization of anthelmintic susceptibility of field isolates of the pig nodular parasite *Oesophagostomum* spp., susceptible or resistant to various anthelmintics. *Int. J. Parasitol.* 1996; **26**(7): 733–740.
102. Dolinská M., Ivanišinová O., Königová A., Várady M.: Anthelmintic resistance in sheep gastrointestinal nematodes in Slovakia detected by in-vitro methods. *BMC Vet. Res.* 2014; **10**: 233.
103. Kupčinskas T., Stadienė I., Šarkūnas M., Riškevičienė V., Várady M., Höglund J., Petkevičius S.: Prevalence of anthelmintic resistance on Lithuanian sheep farms assessed by in vitro methods. *Acta Vet. Scand.* 2015; **57**: 88.
104. Boersem J.H.: Possibilities and limitations in the detection of anthelmintic resistance. W: *Facts and reflections IV. Resistance of parasites to anthelmintics. A workshop in the C.E.C. animal pathology programme held at the Central Veterinary Institute, Lelystad*, 1982: 207–215.
105. Dobson R.J., Donald A.D., Waller P.J., Snowdon K.L.: An egg-hatch assay for resistance to levamisole in trichostrongyloid nematode parasites. *Vet. Parasitol.* 1986; **19**(1–2): 77–84.
106. Várady M., Corba J.: Comparison of six in vitro tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. *Vet. Parasitol.* 1999; **80**(3): 239–249.
107. Hunt K.R., Taylor M.A.: Use of the egg hatch assay on sheep faecal samples for the detection of benzimidazole resistant nematodes. *Vet. Rec.* 1989; **125**(7): 153–154.
108. von Samson-Himmelstjerna G., Coles G.C., Jackson F., Bauer C., Borgsteede F., Cirak V.Y., Demeler J., Donnan A., Dorny P., Epe C., Harder A., Höglund J., Kaminsky R., Kerboeuf D., Küttler U., Papadopoulos E., Posedi J., Small J., Várady M., Vercruyse J., Wirtherle N.: Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitol. Res.* 2009; **105**(3): 825–834.
109. Coles G.C.: Strategies for control of anthelmintic-resistant nematodes of ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1988; **192**(3): 330–334.
110. Ibarra O.F., Jenkins D.C.: The relevance of in vitro anthelmintic screening tests employing the free-living stages of trichostrongyloid nematodes. *J. Helminthol.* 1984; **58**(2): 107–112.
111. Gill J.H., Redwin J.M., van Wyk J.A., Lacey E.: Ivermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus*—effects of ivermectin resistance. *Int. J. Parasitol.* 1995; **25**(4): 463–470.
112. Hubert J., Kerboeuf D.: A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Vet. Rec.* 1992; **130**(20): 442–446.
113. Dobson R.J., Griffiths D.A., Donald A.D., Waller P.J.: A genetic model describing the evolution of levamisole resistance in *Trichostrongylus colubriformis*, a nematode parasite of sheep. *IMA J. Math. Appl. Med. Biol.* 1987; **4**(4): 279–293.
114. Dolinská M., Königová A., Várady M.: Is the micro-agar larval development test reliable enough to detect ivermectin resistance? *Parasitol. Res.* 2012; **111**(5): 2201–2204.
115. Dolinská M., Königová A., Letková V., Molnár L., Várady M.: Detection of ivermectin resistance by a larval development test—back to the past or a step forward? *Vet. Parasitol.* 2013; **198**(1–2): 154–158.
116. Anonymous. Drenchrite[®], Larval Development Assay Standard Operating Procedures, Horizon Technology Pty Ltd, Roseville, NSW, Australia, 1996.
117. Martin P.J., Anderson N., Jarrett R.G.: Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. *Aust. Vet. J.* 1989; **66**(8): 236–240.
118. Borgsteede F.H., Couwenberg T.: Changes in LC₅₀ in an in vitro egg development assay during the patent period of *Haemonchus contortus* in sheep. *Res. Vet. Sci.* 1987; **42**(3): 413–414.
119. Hubert J., Kerboeuf D.: A new method for culture of larvae used in diagnosis of ruminant gastrointestinal strongylosis: comparison with fecal cultures. *Can. J. Comp. Med.* 1984; **48**(1): 63–71.
120. Cudeková P., Várady M., Dolinská M., Königová A.: Phenotypic and genotypic characterisation of benzimidazole susceptible and resistant isolates of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.* 2010; **172**(1–2): 155–159.
121. Silvestre A., Humbert J.F.: A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites. *Exp. Parasitol.* 2000; **95**(4): 271–276.
122. Höglund J., Gustafsson K., Ljungström B.L., Engström A., Donnan A., Skuce P.: Anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks based on a comparison of the results from the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the beta-tubulin gene. *Vet. Parasitol.* 2009; **161**(1–2): 60–68.
123. Demeler J., Krüger N., Krücken J., von der Heyden V.C., Ramünke S., Küttler U., Miltsch S., López Cepeda M., Knox M., Vercruyse J., Geldhof P., Harder A., von Samson-Himmelstjerna G.: Phylogenetic characterization of β -tubulins and development of pyrosequencing assays for benzimidazole resistance in cattle nematodes. *PLoS One*. 2013; **8**(8): e70212.
124. Ramünke S., Melville L., Rinaldi L., Hertzberg H., de Waal T., von Samson-Himmelstjerna G., Cringoli G., Mavrot F., Skuce P., Krücken J., Demeler J.: Benzimidazole resistance survey for *Haemonchus*, *Teladorsagia* and *Trichostrongylus* in three European countries using pyrosequencing including the development of new assays for *Trichostrongylus*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 2016; **6**(3): 230–240.
125. Kotze A.C., Prichard R.K.: Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. *Adv Parasitol.* 2016; **93**: 397–428.
126. Hall C.A., Ritchie L., Kelly J.D.: Effect of removing anthelmintic selection pressure on the benzimidazole resistance status of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Res. Vet. Sci.* 1982; **33**(1): 54–57.
127. Herd R.P., Streitel R.H., McClure K.E., Parker C.F.: Control of hypobiotic and benzimidazole-resistant nematodes of sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1984; **184**(6): 726–730.
128. Borgsteede F.H., Duyn S.P.: Lack of reversion of a benzimidazole resistant strain of *Haemonchus contortus* after six years of levamisole usage. *Res. Vet. Sci.* 1989; **47**(2): 270–272.
129. Leathwick D.M., Ganesh S., Waghorn T.S.: Evidence for reversion towards anthelmintic susceptibility in *Teladorsagia circumcincta* in response to resistance management programmes. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 2015; **5**(1): 9–15.
130. van Wyk J.A.: Refugia—overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 2001; **68**(1): 55–67.
131. Greer A.W., Van Wyk J.A., Hamie J.C., Byaruhanga C., Kenyon F.: Refugia-based strategies for parasite control in livestock. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2020; **36**(1): 31–43.
132. Besier R.B.: Targeted treatment strategies for sustainable worm control in small ruminants. *Trop. Biomed.* 2008; **25**(1 Suppl): 9–17.
133. Kenyon F., Greer A.W., Coles G.C., Cringoli G., Papadopoulos E., Cabaret J., Berrag B., Várady M., Van Wyk J.A., Thomas E., Vercruyse J., Jackson F.: The role of targeted selective treatments in the development of refugia-based approaches to the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants. *Vet. Parasitol.* 2009; **164**(1): 3–11.
134. Kenyon F., Jackson F.: Targeted flock/herd and individual ruminant treatment approaches. *Vet. Parasitol.* 2012; **186**(1–2): 10–17.
135. Martin P.J., Le Jambre L.F., Claxton J.H.: The impact of refugia on the development of thiabendazole resistance in *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 1981; **11**(1): 35–41.