

DOI 10.7251/VETJSR19022281

UDK 636.2/3.084:[636.09:615.33]

*Прегледни научни рад***ЗНАЧАЈ ДИФЕРЕНЦИЈАЛНЕ ДИЈАГНОСТИКЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ И РЕЗИЛИЈЕНЦИЈЕ КОД ПРЕЖИВАРА ******Тамара ИЛИЋ^{1*}, Зоран КУЛИШИЋ¹, Дарко ДЕСПОТОВИЋ², Бојан ГАЈИЋ¹,
Даница БОГУНОВИЋ¹, Санда ДИМИТРИЈЕВИЋ¹**

¹ Катедра за паразитологију, Факултет ветеринарске медицине Универзитета у Београду, Србија
² ЈУ Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“, Бања Лука, Република Српска

* Кореспондентни аутор: Проф. др Тамара Илић: tamaradilic@gmail.com

Кратак садржај: Контрола гастроинтестиналних паразита у различитим системима узгоја преживара заснивана је на вакцинацији, хемотерапији, побољшању квалитета менаџмента стада и коришћењу генетских потенцијала домаћина. Широм света доминира стратегија контроле хелмината заснована на честој употреби антихелминтика, која се сматра неодрживом, с обзиром на појаву све већег броја и врста паразита који су отпорни на лекове. Развој резистенције на све три групе антихелминтика широког спектра (никотински антихелминтици, бензимидазоли и макролидни лактони) и повећана брига за здравље потрошача условљене појавом резидуа примичењених лијекова у храни, додатно компликују контролу ових нематода. У циљу смањења брзине појаве резистенције на антихелминтике код гастроинтестиналних нематода малих преживара и организације процеса одрживог интегрисаног управљања паразитима, глобално је прихваћен принцип циљаног селективног третмана. Спровођење ове стратегије је тек недавно постало изводљиво, са развојем и практичном применом система који служи за клиничку процјену анемије код малих преживара оболелих од хемонхозе. Поред тога, краткотрајне промене телесне тежине и одређивање телесне кондиције могу бити показатељи ендопаразитоза, што омогућава брзу идентификацију животиња које ће вероватно имати користи од третмана. Добијени резултати квантитативне копролошке дијагностике и резултати процене анемије су критеријуми који омогућавају диференцијалну дијагностику између здравих и резилијентних животиња и лакшу дијагностику резистенције паразита. С обзиром на то да резилијентне животиње играју важну улогу у контаминацији пашњака, разумљив је клиничко-паразитолошки значај њиховог правовременог откривања.

Кључне речи: преживари, резистенција, антихелминтици, резилијенција, дијагностички параметри

** Рад је реализован у оквиру Пројеката број ТР31084, број 173001, број Ш 46002 и Број ТР31088, које финансира Министарство просвете и науке Републике Србије.

Илић и сар:

Значај диференцијалне дијагностике резистенције и резилијенције код преживара

УВОД

Паразитски гастроентеритис је економски најзначајније обољење пашних животиња, чија се контрола у последњих пет деценија заснивала углавном на организацији напасања и употреби антихелминтика. Системи управљања напасањем су углавном непрактични и скупи, док је учестала употреба антихелминтика довела до проблема повећане резистенције паразита на антипаразитике, нарочито код малих преживара (Várady и сар., 2011). Појава резистенције уочена је широм света у све три групе антихелминтика широког спектра - никотинских антихелминтика (имидазотиазоли и тетрахидропиримидини), бензимидазола и макролидних лактона, који се користе у овчарству за сузбијање инфекција проузрокованих стронгилидима (Coles и сар., 2006, Vidyashankar и сар., 2012, Salgado и Santos, 2016). Смањена ефикасност антихелминтика у комбинацији са жељом да се редукује употреба хемикалија у производним системима стимулисала је потрагу за алтернативним и одрживим могућностима контроле паразита, што је резултирало појавом нових класа антихелминтика на тржишту (деривати аминокетонитрила и спироиндоли) (McManus и сар., 2014).

Развој резистентних линија хелмината је еволуцијска карактеристика и базира се на унутарпопулацијској селекцији паразита, који носе алеле одговорне за резистенцију на хемијске компоненте из лека. Дужа употреба истог антипаразитета, или средстава који имају сличан механизам деловања, има за последицу стварање резистенције на лек код паразита. Једном успостављена резистенција може да потраје више година (Jackson и Coop, 2000), или нестаје под утицајем селекције и генетичког дрефта, који делују тако што враћају осетљивост у популацију (Петричевић и сар., 2007).

Пошто је проблем резистенције веома актуелан, постоје покушаји да се њен развој стави под контролу и да се процес успори на различите начине. Испитивања током периода од 20 година указују да је најбољи начин одлагања процеса селекције резистентних гена код паразита употреба комбинованих препарата – микстура са две и више различитих хемијских активних супстанци, док се као друга опција препоручује ротација лекова из различитих хемијских група, која се до сада користила за избегавање толеранција (Лалошевић и сар., 2009).

Једна од могућности за повећање ефикасности лекова је ускраћивање хране пре пероралне апликације антихелминтика. На овај начин се смањује количина хране у дигестивном тракту животиње и пружа више времена за апсорпцију и дистрибуцију лековите супстанце (Jackson и Coop, 2000). Важно је формирати групе оваца приближно исте телесне масе где свакој овци треба дати дозу која одговара највећој јединки у групи. Овакав приступ осигурава да свака животиња у групи добије пуну дозу лека, јер је најштетније субдозирати третиране јединке (Лалошевић и сар., 2009).

Појам резилијенције се спомиње у великом броју истраживачких студија, али се његова дефиниција разликује. Према Doeschl-Wilson и сар. (2012), резилијенција је способност животиње да одржава добру кондицију и уобичајен степен активности док је инфицирана паразитима, без обзира на ниво оптерећења присутним патогенима. Према појединим ауторима, резилијенција се односи на способност домаћина/животиње да преживи и остане продуктивна упркос паразитском изазову којем је изложена (Bishop, 2012). У литератури постоји још једна дефиниција овог термина, према којој резилијенција представља способност домаћина да толерише присутне паразите без

испољавања икаквих клиничких симптома обољења (Gupia и сар., 2013). *Bishop и Morris* (2007) дефинишу резилијенцију као способност адаптације животиња на инфекцију различитим узрочницима паразитске етиологије из окружења. Према *Storey* (2015), резилијенција представља прилагодљивост променама и поседовање капацитета за успешну адаптацију при суочавању са паразитском инфекцијом, као стицање све веће и шире компетенције за реаговање на стрес. Сматра се да је ова дефиниција најкомплетнија.

Пошто су резистенција и резилијенција наследне особине, важна је тачна и прав-

овремена дефиниција сваког параметра који помаже у процесу узгојне селекције животиња, које показују ове особине. За доказивање животиња које испољавају резилијенцију при суочавању са хелминтским изазовом, или код којих паразити испољавају резистенцију на антихелминтике, неопходни су резултати бројања присутних јаја хелмината у фецесу испитиваних животиња (FEC – Fecal Egg Count), процена клиничке анемије на основу вредности запремине еритроцита (packed cell volume – PCV) применом FAMACHA (FAffa MAlan CHArt) теста (*Malan и Van Wyk*, 1992) и параметри везани за телесну кондицију (*Storey*, 2015).

ДИЈАГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ БРОЈАЊА ЈАЈА У ФЕЦЕСУ (FEC – FECAL EGG COUNT)

За процену ефикасности антихелминтика у преживара, детекцију резистенције на антихелминтике и доказивање резилијенције, Светска асоцијација за унапређење ветеринарске паразитологије (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology - WAAVP) препоручује *McMaster* методу (*Coles и сар.*, 1992, *Storey*, 2015). То је стандардна и најчешће коришћена конвенционална метода квантитативне копролошке дијагностике у ветеринарској паразитологији. Служи за одређивање степена ендопаразитских инфекција, а заснована је на бројању паразитских елемената у јединици масе фецеса (EPG – Eggs Per Gram, OPG – Oocysts Per Gram, CPG - Cysts Per Gram и LPG – Larvae Per Gram). Осетљивост методе је од 10 до 100 паразитских елемената у 1 g фецеса (*Pereckiene и сар.*, 2010).

Примена ове процедуре до сада је описана код великих и малих преживара, коња, свиња, месоједа, птица, кунића, мишева, корњача, лемура и људи (*Bondarenko и сар.*, 2009). *Vadlejch и сар.* (2011) су упоређивали осетљивост и поузданост три модификоване

технике по *Мек Мастеру* са циљем да утврде која је модификација методе најпогоднија за рутинске паразитолошке прегледе и дијагностичке процјене у ветеринарској клиничкој пракси (Табела 1).

Показало се да је концентрисана *McMaster* метода (*Roepstorff и Nansen*, 1998) најосјетљивија и најпоузданија за откривање јаја хелмината. Ова метода је брза, користи највећу количину фецеса (4g), има ниску вредност границе детекције (20 EPG), а захваљујући центрифугирању фекална суспензија је довољно чиста за микроскопирање.

Модификација према *Зајичеку* (1978) треба да обезбеди боље резултате због ниског корекционог фактора, два поступка центрифугирања и најнижег односа разређења. Међутим, низак однос разређења има за последицу присуство велике количине нечистоћа у испитиваној суспензији, што значајно отежава поступак прегледа препарата у коме паразитски елементи могу бити маскирати или замењени псеудопаразитским честицама из фецеса, чиме се повећава непоузданост ове процедуре. Ова

Илић и сар:

Значај диференцијалне дијагностике резистенције и резилијенције код преживара

метода има средњу вредност границе детекције и примјењива је са прецизношћу резултата од 100 EPG (Vadlejch и сар., 2011).

Трећи упоредни метод према Wetzel-у (1951) је најједноставнији, али даје најлошији резултат. Ниска осетљивост и поузда-

ност ове методе највероватније је узрокована високим корекционим фактором и одсуством корака центрифугирања. Ова метода има високу вредност границе детекције и пружа прецизне резултате од 200 EPG (Vadlejch и сар., 2011).

Табела 1. Упоредне вредности параметара модификованих McMaster техника (Vadlejch и сар., 2011)

Параметри	Модификације технике по McMaster-у		
	Wetzel (1951)	Zajiček (1978)	Roepstorff и Nansen (1998)
Количина фецеса (g)	2	1	4
Врста флотационог раствора	NaCl	MgSO ₄ +Na ₂ S ₂ O ₃	NaCl + глюкоза
Специфична тежина раствора	1,200	1,280	1,300
Центрифугирање (RPM ¹)	-	2000	1200
Центрифугирање (RCF ²)	-	479	172
Време центрифугирања (min)	-	2	5
Време флотације у коморици (min)	2-3	5	3-5
Број коморица у предметници по McMaster-у	3	2	2
Мултипликациони (корекциони) фактор	67	33	20

¹RPM (Revolutions Per Minute) – број обртаја у минути

²RCF (Relative Centrifugal Force) – релативна центрифугална сила

Код различитих врста преживара, постоје извесна ограничења FEC поступка која битно утичу на тумачење, интерпретацију и поузданост добијених резултата. Код одраслих говеда, то су: 1) ограничена дијагностичка вриједност, везана за степен инфек-

ције који обично није у корелацији са оптерећењем хелминтима; 2) ниске FEC вредности, што код говеда захтева флотационе технике већег степена осетљивости него за овце; 3) ограничена клиничка вредност за *Nematodirus* spp., пошто највећу

штету проузрокују незрели стадијуми ових нематода пре почетка полагања јаја и 4) клиничка форма парамфистомозе, која је обично узрокована великим бројем незрелих паразита у миграцији, услед чега број јаја у измету може бити низак или нула (Rollinson, 2013).

Код хемонхозе и трихостронгилодозе малих преживара, FEC је у изразитој корелацији са оптерећењем животиња хелминтима. У случајевима полипаразит-

изма, када релативно висока производња јаја *H. contortus* може маскирати нижу производњу јаја неких других врста (*T. colubriformis* и *T. circumcincta*), FEC има ограничену дијагностичку вредност (Roeber и сар., 2013). Зато се на основу броја јаја које су положили различите врсте гастроинтестиналних нематода (ГИН), могу дати само оријентационе процене интензитета инфекције и одлучивати о томе да ли ће и када животиње бити третиране (Табела 2).

Табела 2. Одређивање степена инфекције са ГИН за младе животиње (Kahn, 2005)

Паразит	Степен инфекције (EPGF – Eggs Per Gram Faeces)		
	Низак	Умерен	Висок
ГОВЕДА			
Мешана инфекција	50–200	200–800	800+
<i>Haemonchus</i> spp.	200	200–600	600+
<i>Trichostrongylus</i> spp.	50–100	100–400	400+
<i>Cooperia</i> spp.	200–300	300–2500	2500+
ОВЦЕ			
Мешана инфекција	50–800	800–1200	1200+
<i>Haemonchus</i> spp.	100–2000	2000–7000	7000+
<i>Trichostrongylus</i> spp.	100–500	500–2000	2000+
<i>Nematodirus</i> spp.	50–100	100–600	600+
<i>Oesophagostomum</i> spp.	100–800	800–1600	1600+

Познато је да се од антипаразитета очекује висока ефикасност у теренским условима. Антиектопаразитици треба да имају апсолутну ефикасност, док се од антихелминтика очекује око 95% ефикасности, с обзиром на то да је пожељно да се мали број паразита одржава у телу као стимуланс за развој имунолошког одговора

домаћина (Димитријевић, 1999). Код пашних животиња увек постоји мешана инфекција већим бројем различитих врста гастроинтестиналних нематода. Неке од њих омогућавају развој природног имунитета, тако да се на основу резултата FEC-а одлучује да ли је третман животиње неопходан.

Илић и сар:

Значај диференцијалне дијагностике резистенције и резилијенције код преживара

Табела 3. Тумачење појаве клиничке форме обољења код говеда на основу EPG (Love и Hutchinson, 2007)

Врста паразита	Број јаја/1g фецеса (EPG)
<i>Haemonchus</i>	200
<i>Trichostrongylus</i>	50
<i>Ostertagia</i>	150
<i>Oesophagostomum</i>	100
<i>Cooperia</i>	500
<i>Fasciola</i>	50

Ово је веома важно јер је неопходно одржавати равнотежу између створеног имунитета (његов развој стимулише присуство малог броја хелмината у животињи) и очувања производних способности (на њихово смањење утиче исти тај број

хелмината, који проузрокује субклиничку форму обољења). Добијени резултати EPG-а могу бити изузетно корисни и за тумачење клиничке форме извесних хелминтоза код великих и малих преживара (Табела 3).

ДИЈАГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ТЕСТА РЕДУКЦИЈЕ БРОЈА ФЕКАЛНИХ ЈАЈА (FECRT–FECAL EGG COUNT REDUCTION TEST)

Тест редукције броја јаја у фецесу (Fecal Egg Count Reduction Test – FECRT) је установљен почетком деведесетих година двадесетог века (Coles и сар., 1992) и представља метод избора за праћење ефикасности антихелминтика код преживара (Dobson и сар., 2011). Тренутно је једини тест који може да детектује отпорност свих врста нематода, код свих врста домаћина (McKenna, 2013) и служи за израчунавање смањења броја јаја у фецесу, упоређивањем средњих вредности FEC-а пре третмана и после обављеног третмана (Wang и сар., 2017).

Према Светској асоцијацији за унапређење ветеринарске паразитологије (WAAVP), постоје смернице за извођење и

израчунавање стандардног FECRT-а (Coles и сар., 1992, 2006), које су побољшане препорукама од стране Leveske и сар. (2017). У складу са тим смерницама, препоручују се: величина узорка (≥ 10 или ≥ 15 животиња по групи за третман, а свако излучивање најмање 150 EPG), метода FEC (McMaster), статистичка анализа (FECRT заснован на аритметичкој средини групног FEC-а након примене лека) и критеријуми који дефинишу смањену ефикасност лека (FECRT $< 90\%$ или FECRT $< 95\%$, резистенција се проглашава ако је смањење броја јаја у фецесу мање од 95% , а доња граница ефикасности лека је мања од 90%) (Dobson и сар., 2011; Vidyashankar и сар., 2012).

За извођење FECRT, узорак фецеса се сакупља пре дехелминтизације, одређује се вредност EPG у њему, а након тога се спроводи третман. Узорковање фецеса се понавља 14. дана након обављеног третмана и поново се одређује вредност EPG. Коришћењем специјалне једначине, израчунава се процентуално смањење броја јаја у фецесу за сваку животињу индивидуално. Након тога се израчунава средње смањење за све тестиране јединке, како би се одредило укупно смањење за фарму или стадо. Ова вредност се затим користи за доношење закључака о постојању или одсуству резистенције на лекове (*Kaplan u Nielsen, 2010*). Ако је лек делотворан, ниједан паразит не би требало да преживи лечење дуже од времена потребног за

пражњење црева (обично до 48 часова). Овај временски период се може продужити за онолико дана колико траје привремена супресија полагања јаја (3 дана за имидазо-отиазоле, 8 дана - за бензимидазоле, 14 до 17 дана за макролидне лактоне), тако да се ефикасност појединих група лекова процењује тек по истеку овог периода (*Coles и сар., 2006*).

Ако испитиване животиње имају велики број јаја у фецесу, након чега се обави дехелминтизација, а 10 дана касније FEC показује нулту или изузетно ниску вредност (мање од 5% вредности пре третмана), за ту групу са сигурношћу можемо тврдити да је дехелминтизација успешно обављена (*Coles и сар., 1992*).

ДИЈАГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ „FIVE POINT CHECK“ КЛИНИЧКОГ ПРИСТУПА

Добијене дијагностичке резултате засноване на FEC, потребно је допунити проценом о присуству или одсуству клиничких симптома обољења („Five Point Check“). Овај клинички приступ подразумева праћење пет најчешћих неспецифичних симптома код животиња инфицираних паразитима – анемија слузнице ока, губитак телесне тежине или заостајање у расту и развоју, запрљаност репа и задње регије тела фецесом, субмандибуларни едем и исцедак из носа (*Bath и сар., 2010*). На основу тежине клиничких симптома, врши се одабир животиња које је потребно дехелминтисати. Здравствено стање стада се класификује као: „добро“ (није потребна дехелминтизација), „лоше“ (неопходна је дехелминтизација, уз контролу наредних неколико месеци) и мешовити резултати („неке животиње су добро, неке лоше“ – на основу процене тежине симптома одлучује се које ће животиње бити дехелминтисане) (*Storey, 2015*).

У циљу смањења брзине појаве резистенције на антихелминтике и организације процеса интегрисаног управљања паразитима (*Integrated Parasite Management – IPM*), глобално је прихваћен принцип циљаног селективног третмана (*Targeted Selective Treatment – TST*). Спровођење ове стратегије је постало изводљиво на фармама, тек са развојем и практичном применом *FAMACHA*© система за клиничку процену анемије, проузроковане хематофагом нематодом *Haemonchus contortus* код малих преживара. Принцип *TST*-а се може проширити на друге важне ендопаразите, под условом да је развијени систем практичан, економичан и реално способан да идентификује животиње којима прети опасност од преоптерећености очекиваним ендопаразитима (*Bath u Van Wyk, 2009*).

Кандидати за проширени *TST* систем испољавају неки од пет наведених клиничких симптома, који су послужили као основа за осмишљавање практичног водича

Илић и сар:

Значај диференцијалне дијагностике резистенције и резилијенције код преживара

за сточаре. За међународну, вишејезичну употребу, овај систем је назван Five Point Check© (Пет тачака за проверу), представља даље, практично проширење TST-а и може бити ефикасан допринос у мониторингу присуства ендопаразита код малих преживара. Корисницима омогућава да: (а) брзо процене мале преживаре на присуство знакова паразитоза, (б) направе ефикасне процене здравственог стања својих животиња, (в) идентификују очекиване паразите, (д) одаберу групе антихелминтика за третман (г) користе практичне системе за привремену идентификацију третираних животиња и (д) упознају се са ограничењима тих система (Bath и Van Wyk, 2009).

FAMACHA© систем представља графикон процене тежине паразитске инфекције код преживара и доношење одлуке о лечењу, на основу степена анемије слузнице ока. Клиничка анемија изражена кроз вредност запремине еритроцита, степенује се на скали FAMACHA картице 1–5 и указује на могућност постојања инфекције хематофагом нематодом *H. contortus*, трематодама и цестодама (Ferreira и сар., 2019).

Осим повећаних FAMACHA резултата, разлог за дехелминтизацију могу бити и друге клиничке манифестације код инфицираних животиња. На основу индекса телесне кондиције, који се одређује BCS (Body Condition Score) картицом на скали од 1–5, постоји могућност инфекције *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp. и нодуларним хелминтима (Mahieu и сар., 2007, Agese-García и сар., 2016). Запрљаност репа и задњег дела тела фецесом одређује се DS (Dag Score) картицом на скали 1–5 и показатељ је могућег присуства инфекције нематодама *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Oesophagostomum* spp., *Strongyloides* spp. и кокцидијама (*Eimeria* spp). Постојање назалног исцедка указује на присуство носне мијазе, плућних паразита и

пнеумоније, а степенује се према ND (Nasal Discharge) картици на скали 1–5. Хладни подвичлици едеми се према тежини категоришу на скали 1–5, указују на низак ниво протеина у крви испитиваних животиња и на могућност постојања паразитских инфекција проузрокованих врстом *H. contortus*, трематодама, цестодама и кокцидијама (*Eimeria* spp) (Walker и сар., 2015).

Поред ових пет стандардних клиничких симптома, понекад се изводи и опсервација стања крзна (лош квалитет длаке или абнормално руно), чије се промене класификују на скали 1–5, а могу указивати на присуство инфекције нематодама ((*H. contortus*, *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp.), кокцидијама (*Eimeria* spp) и ектопаразитима (Vanimiseti и сар., 2004, Mahieu и сар., 2007)

Са аспекта диференцијалне дијагностике јединки код којих се испољавају знаци резистенције, односно резилијенције, један од најзначајнијих параметара јесу добијене FAMACHA вредности (Burke и Miller, 2008). Употреба FAMACHA© система омогућава произвођачима малих преживара да донесу одлуке о дехелминтизацији на основу процене нивоа анемије проузроковане нематодом *H. contortus* код оваца и коза (Agese-García и сар., 2016). Овај узрочник је економски најзначајнија ГИН оваца и коза, најчешћи је узрок анемије током сезоне испаше у САД, а у случајевима инфекција високог интензитета проузрокује угинућа.

Картица FAMACHA© је развијена у Јужној Африци, а у САД је уведена од стране америчког конзорцијума за контролу паразита малих преживара (American Consortium for Small Ruminant Parasite Control – ACSRPC). То је један од најуспешнијих дијагностичких индикатора, према коме се боја слузнице очију малих преживара упоређује са 5 категорија боја на контролној

картици боја, које одговарају различитим нивоима анемије. Категорија 1 представља „не анемично“ стање, док категорија 5 представља стање „тешке анемије“ (Martinez-Valladares и сар., 2013). На основу резултата утврђених картицом, идентификују се и селективно дехелминтишу овце и козе са анемијом.

Селективна дехелминтизација смањује употребу лекова и успорава развој резистенције на антихелминтике код ГИН. Такође може помоћи у доношењу селективних одлука о узгоју, тако што ће идентифи-

иковати оне животиње које су најосетљивије на инфекцију црвеним паразитима, односно резилијентне јединке (Rizzon Cintra и сар., 2018). FAMACHA© се примењује само у случајевима где је главни узрочник клиничке болести *H. contortus*. Пре извођења теста, треба имати у виду да извесна стања (обољења ока, стимулуси из околине и системска обољења) проузрокују црвенило слузнице ока и на тај начин могу прикрити анемију. Спорни могу да буду и други узроци анемије, али су они ретки у поређењу са инфекцијом ГИН током сезоне испаше (Ferreira и сар., 2019)

ЗАКЉУЧАК

Пошто су адаптиране на присутне паразите, резилијентне животиње представљају неидентификоване изворе паразитске инфекције, који се могу дуго одржати вршећи континуирану реконтаминацију пашњака. Бивају идентификовани тек спровођењем квантитативне копролошке дијагностике и одређивањем вредности FEC-а за сваку јединку индивидуално. Резилијентне животиње имају доследно ниске вредности FEC -а и ниске FAMACHA резултате, углавном су добре телесне кондиције и не показују варијације у телесној тежини. Добијене вредности FEC-а обично указују да су сумњиве (резилијентне) животиње носиоци много већег броја паразита него што би се очекивало анализом и проценом добијеном на основу других клиничких

параметара. Ове јединке није потребно дехелминтисати или ретко захтевају дехелминтизацију, у поређењу са другим животињама из стада које показују клиничке знаке обољења и након дехелминтизације, услед резистенције паразита. Животиње инфициране великим бројем резистентних ендопаразита показују високе FEC вредности, високе FAMACHA резултате и лошије су телесне кондиције уз приметне варијације у телесној тежини и након третмана. Краткотрајне промене телесне тежине, могу бити показатељи паразитоза, што омогућава брзу идентификацију животиња које ће вероватно имати користи од третмана. Без информација о FEC-у, не може се са сигурношћу знати да ли је уочена особина резистенција или резилијенција.

ЛИТЕРАТУРА

1. Arece-García J., López-Leyva Y., González-Garduño R., Torres-Hernández G., Rojo-Rubio R., Marie-Magdeleine C. (2016): *Effect of selective anthelmintic treatments on health and production parameters in Pelibuey ewes during lactation*. Trop Anim Health Prod 48 (2): 283–287.
2. Bath F.G., Van Wyk A.J. (2009): *The Five Point Check© for targeted selective treatment of internal parasites in small ruminants*. Small Ruminant Res 86 (1): 6–13.
3. Bath G.F., Wyk J.A., Malan F.S. (2010): *Targeted selective treatment of sheep using the Five Point Check©*. J Common Vet Assoc 26: 29–32.
4. Bishop S.C. (2012): *A consideration of resistance and tolerance for ruminant nematode infections*. Front Genet 3: 168.
5. Bishop S.C., Morris C.A. (2007): *Genetics of disease resistance in sheep and goats*. Small Rumin Res 70 (1): 48–59.
6. Bondarenko I.G., Kinčeková J., Várady M., Königová A., Kuchta M., Koňáková G. (2009): *Use of modified McMaster method for the diagnosis of intestinal helminth infections and estimating parasitic egg load in human faecal samples in non-endemic areas*. Helminthologia, 46: 62–64.
7. Burke J.M., Miller E.J. (2008): *Use of FAMACHA system to evaluate gastrointestinal nematode resistance/ resilience in offspring of stud rams*. Vet Parasitol 153: 85–92.
8. Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A., Waller P.J. (1992): *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance*. Vet Parasitol 44 (1-2): 35–44.
9. Coles G.C., Jackson F., Pomroy W.E., Prichard R.K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M.A., Vercruyse J. (2006): *The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance*. Vet Parasitol 136 (3-4): 167–185.
10. Dimitrijević S. (1999): *Diagnostika parazitskih bolesti*. Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu, „Jovan“, Beograd, str. 132.
11. Dobson R., Jackson F., Levecke B., Besier B., Kaplan R., Sangster N., Vercruyse J. (2011): *WAAVP guidelines for faecal egg count reduction tests (FECRT)*. *Proceedings: 23rd International conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology: Towards good management practices in parasitic control*. Buenos Aires, Argentina.
12. Doeschl-Wilson A.B., Villanueva B., Kyriazakis I. (2012): *The first step toward genetic selection for host tolerance to infectious pathogens: obtaining the tolerance phenotype through group estimates*. Front Genet 3: 265.
13. Gunia M., Phocas F., Gourdine J.L., Bijma P., Mandonnet N. (2013): *Simulated selection responses for breeding programs including resistance and resilience to parasites in Creole goats*. J Anim Sci 91 (2): 572–581.
14. Ferreira B.J., Santos Sotomaior C., Diógenes C.A., Bezerra S., da Silva E.W., Morais Leite H.J.G., Rufino de Sousa E.J., de Fátima França Biz J., Evangelista Façanha A.D. (2019): *Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in tropical hair sheep*. Trop Anim Health Prod Published online 05 March 2019. doi.org/10.1007/s11250-019-01861-x

15. Jackson F., Coop R.L. (2000): *The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes*. Parasitol 120 Suppl (7): S95–107.
16. Kahn M.C. (2005): *Merck Veterinary manual*. (9th Ed.) Whitehouse Station, N.J., Great Britain: Merck & Co., pp. 262–265.
17. Kaplan R.M., Nielsen M.K. (2010): *An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60s anymore*. Equine Vet Educ 22: 306–316.
18. Lalošević V., Jarak M., Đurić S., Simin S. (2009): *Biološka kontrola helminata*. Letopis naučnih radova 33 (1): 118–125.
19. Levecke B., Kaplan M.R., Thamsborg M.S., Torgerson R.P., Vercruyse J., Dobson J.R. (2018): *How to improve the standardization and the diagnostic performance of the fecal egg count reduction test?* Vet Parasitol 253: 71–78.
20. Love S., Hutchinson G. (2007): *Worm Test for livestock and guide to egg counts*. Profitable and sustainable primary industries, Primefact 480 (Replace agnote dai - 308), pp. 1–5.
21. Malan F.S., Van Wyk J.A. (1992): *The packed cell volume and color of the conjunctivae as aids for monitoring Haemonchus contortus infestations in sheep*. In: Biennial National Veterinary Congress, Grahamstown, South African Veterinary Association, 1, p. 139.
22. Martínez-Valladares M., Martínez-Pérez J.M., Robles-Pérez D., CorderoPérez C., McMahon C., Bartley D.J., Edgar H.W.J., Ellison S.E., Barley J.P., Malone F.E., Hanna R.E.B., Brennan G.P., Fairweather I. (2013): *Anthelmintic resistance in Northern Ireland (I): Prevalence of resistance in ovine gastrointestinal nematodes, as determined through faecal egg count reduction testing*. Vet Parasitol 195 (1-2): 122–130.
23. Mahieu M., Arquet R., Kandassamy T., Mandonnet N., Hoste H. (2007): *Evaluation of targeted drenching using famacha method in Creole goat: Reduction of anthelmintic use, and effects on kid production and pasture contamination*. Vet Parasitol 146: 135–147.
24. McKenna P.B. (2013): *Are multiple pre-treatment groups necessary or unwarranted in faecal egg count reduction tests in sheep?* Vet Parasitol 196 (3-4): 433–437.
25. McManus C., do Prado Paim T., de Melo C.B., Brasil B.S., Paiva S.R. (2014): *Selection methods for resistance to and tolerance of helminths in livestock*. Parasite 21: 56.
26. Pereckiene A., Petkevicius S., Vysniauskas A. (2010): *Comparative evaluation of efficiency of traditional McMaster chamber and newly designed chamber for the enumeration of nematode eggs*. Acta Vet Scand 52 (Suppl 1): S20.
27. Petričević M.S., Ilić T., Dimitrijević S. (2007): *Savremeni modeli i perspektiva kontrole parazitskih bolesti*. Vet Glasnik 61 (5-6): 337–350.
28. Rizzon Cintra C.M., Ollhoff D., Sotomaior S.C. (2018): *Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in growing lambs*. Vet Parasitol 251: 106–111.
29. Rollinson D. (2013): *Advances in parasitology*. First Edition, Elsevier Ltd, London, UK, pp. 292–294.
30. Roeber F., Jex A.J., Gasser R.B. (2013): *Chapter Four - Next Generation Molecular Diagnostic Tools for Gastrointestinal Nematodes of Livestock, with an Emphasis on Small Ruminants: A Turning Point?* Adv Parasitol 83: 267–333.
31. Roepstorff A., Nansen P. (1998): *Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine*. FAO Animal Health Manual, Rome; No 3, 47–55.

32. Salgado J.A., Santos C.P. (2016): *Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil*. Rev Bras Parasitol Vet 25 (1): 3–17.
33. Storey B. (2015): *Fecal Egg Counts: Uses and Limitations*. W4, What Works With Worms Congress, May, Pretoria, South Africa, pp. 1–9.
34. Vadlejch J., Petrtyl M., Zaichenko I., Čadková Z. (2011): *Which McMaster egg counting technique is the most reliable?* Parasitol Res 109: 1387–1394.
35. Vanimisetti H.B., Greiner S.P., Zajac A.M., Notter D.R. (2004): *Performance of hair sheep composite breeds: resistance of lambs to Haemonchus contortus*. J Anim Sci 82 (2): 595–604.
36. Várady M., Papadopoulos E., Dolinská M., Konigová A. (2011): *Anthelmintic resistance in parasites of small ruminants: Sheep versus goats*. Helminthologia 48 (3):137–144.
37. Vidyashankar A.N., Hanlon B.M., Kaplan R.M. (2012): *Statistical and biological considerations in evaluating drug efficacy in equine strongyle parasites using fecal egg count data*. Vet Parasitol 185: 45–56.
38. Walker J.G., Ofithile M., Tavolaro F.M., Van Wyk J.A., Evans K., Morgan E.R. (2015): *Mixed methods evaluation of targeted selective anthelmintic treatment by resource-poor smallholder goat farmers in Botswana*. Vet Parasitol 214 (1-2): 80–88.
39. Wang C., Torgerson R.P., Höglund J., Furrer R. (2017): *Zero-inflated hierarchical models for faecal egg counts to assess anthelmintic efficacy*. Vet Parasitol 235: 20–28.
40. Wetzell E. (1951): *Verbesserte McMaster-Kammer zum Auszählen von Wurmeiern*. Tierärztl Umsch 6: 209–210.
41. Zajíček D. (1978): *Comparision of the efficiency of two quantitative ovoskopic methods*. Vet Med 23: 275–280.

Рад примљен: 13.10.2019.
Рад прихваћен: 01.12.2019.

DOI 10.7251/VETJEN1902240I

UDK 636.2/3.084:[636.09:615.33]

*Review scientific paper***THE IMPORTANCE OF DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF RESISTANCE AND RESILIENCE IN RUMINANTS******Tamara ILIĆ^{1*}, Zoran KULIŠIĆ¹, Darko DESPOTOVIĆ², Bojan GAJIĆ¹,
Danica BOGUNOVIĆ¹, Sanda DIMITRIJEVIĆ¹**¹Department for Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine University of Belgrade, Serbia²Public Veterinary Institute of Republic of Srpska "Dr. Vaso Butozan", Banja Luka, Republic of Srpska

*Corresponding author: Prof. dr Tamara Ilić: tamaradilic@gmail.com

Abstract: Control of the gastrointestinal parasites in different systems of ruminant breeding is based on vaccination, chemotherapy, improved herd management and use of genetic potentials of host animals. Strategy of the helminths control based on frequent anthelmintics usage is dominant among the world, although it is considered unsustainable due to the appearance of increased number and species of parasites that are resistance to drugs. Development of resistance on all three groups of broad-spectrum anthelmintics (nicotinic anthelmintics, benzimidazoles and macrolides lactones) as well as increased care for consumers health caused by appearance of used drugs residues in food, additionally complicate overall nematode control. With the aim to decrease appearance of anthelmintics resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants and in order to organize process of sustainable integrated parasite management, principle of targeted selective treatment is globally accepted. Implementing of this strategy has only recently become feasible, with development and practical use of systems that serve for clinical assessment of anemia in small ruminants which suffer from hemochosis. Besides that, short term changes in body weight and body condition scoring may be indicators of diseases caused by endoparasites, as it can provide rapid identification of animals that will probably have benefits from therapy. Obtained results of quantitative coprological diagnostic tests and results for anemia assessment are criteria that provide differential diagnosis between healthy and resilient animals and easier diseases diagnostic. Since resilient animals play important role in pasture contamination, the significance of their detection is understandable.

Key words: ruminants, resistance, anthelmintics, resilience, diagnostic parameters

** This study is part of the projects TR 31084, 173001, III 46002 and TR 31088, funded by Ministry of Education, Science and Technical Development of the Republic of Serbia.

INTRODUCTION

Parasitic gastroenteritis is economically the most important disease of grazing animals, which is mainly controlled, during last five decades, by adequate organization of grazing and anthelmintics usage. Grazing management systems are mainly impractical and expensive, whilst the frequent use of anthelmintics has led to problems related to increased resistance of parasites to antiparasitic drugs, especially in young ruminants (Várady et al., 2011). Appearance of resistance was observed among the world in all three broad-spectrum anthelmintics – nicotinic anthelmintics (imidazothiazole and tetrahydropyrimidine), benzimidazoles and macrolides lactones, that are used in sheep breeding for suppression of infections cause by strongyloidiasis (Coles et al., 2006, Vidyashankar et al., 2012, *Salgado and Santos*, 2016). Decreased efficiency of anthelmintics combined with attempt to reduce chemical usage in production systems have stimulated search for alternative and sustainable options for parasite control and have resulted in appearance of new classes of anthelmintics on market (amino-acetonitrile derivate and spiroindoles) (McManus et al., 2014).

Development of resistant helminth strains is an evolutionary characteristic based on intra-population selection of those parasites that carry alleles responsible for resistance on chemical components from drug. Long-lasting usage of the same antiparasitic drug, or agents that have similar mechanism of drug action, lead to the appearance of parasite resistance on drug. Once established, resistance may last several years (*Jackson and Coop*, 2000), or disappear as a result of selection and genetic drift, which act in a way to bring back sensibility in population (Petričević et al., 2007).

Since the problem of resistance is very actual, much effort have been made to control its development and to slow down the process by using different approaches. Research during last

20 years indicates that the best way to prolong the process of selection of resistant genes in parasites is the usage of combined different preparations – mixtures with two or more different chemical active substances. The other recommendation is to rotate drugs from different chemical groups that have been used for avoiding a tolerance (Lalošević et al., 2009).

One of the possibilities to increase drug efficiency is food deprivation before peroral application of anthelmintics. Thus, the amount of food is reduced in digestive tract allowing more time for absorption and distribution of medicinal substances (*Jackson and Coop*, 2000). It is important to form sheep groups with similar body weight and to give each sheep dosage that is sufficient for largest sheep in the group. This approach ensures that each animal in the group receive sufficient drug dosage, since subdosing of animals is the most harmful (Lalošević et al., 2009).

The term resilience appears in many different research studies, although its definition differs. According to Doeschl-Wilson et al. (2012), resilience is capability of an animal to maintain a good condition and usual level of activity, while being infected by parasites, no matter the level of load created by the present pathogens. According to some authors, resilience is connected to capability of host/animal to survive and stay productive no matter the parasite challenge it's exposed to (Bishop, 2012). There is one more definition in the literature for this term, according to which resilience represents ability of the host to tolerate existing parasites without showing any clinical signs of diseases (Gunia et al., 2013). *Bishop and Morris* (2007) define resilience as ability of the animals to adapt to infection with different causes of parasitological ethiology from environment. According to Storey (2015), resilience represents adaptability to changes and owning capacity for successful adaptation, when facing parasitic

infection, as gaining more and wider competences for stress reaction.

Since resistance and resilience are hereditary characteristics, accurate and timely definition of each parameter that helps process of animal breeding selection is important, shown by these traits. For confirmation of animals that show resilience when facing with helminth challenge, or in

which parasites are anthelmintics resistant, counting of helminth eggs number present in feces of examined animals is necessary (FEC - Fecal Egg Count), as well as estimation of clinical anemia based on erythrocyte volumen value (packed cell volume - PCV) using FAMACHA (FAffa MAlan CHArt) test (*Malan and Van Wyk*, 1992) and parameters related to body condition (Storey, 2015).

DIAGNOSTIC VALUE OF FECAL EGG COUNTING (FEC - FECAL EGG COUNT)

For assessment of anthelmintics efficiency in ruminants, detection of anthelmintics resistance and resilience proving, World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) recommends McMaster method (Coles et al., 1992, Storey, 2015). That is standard and most often used conventional method of quantitative coprological diagnostic in veterinary parasitology. It serves for determination of the endoparasitic infection degree and is based on counting of number of parasitic elements in fecal weigh unit (EPG - Eggs Per Gram, OPG - Oocysts Per Gram, CPG - Cysts Per Gram and LPG - Larvae Per Gram). Sensitivity of method is from 10 to 100 parasitic elements in 1 g of feces (Pereckiene et al., 2010).

Application of this procedure, until now, have been described in large and small ruminants, horses, pigs, canines, birds, rabbits, mice, turtles, lemurs and human (Bondarenko et al., 2009). Vadlejch et al. (2011) compared sensitivity and reliability of three modified McMaster techniques with the aim to estimate which modification is most suitable for routine parasitological examinations and diagnostic assessments in veterinary clinical practice (Table 1).

It was shown that the concentration McMaster method (*Roepstorff and Nansen*,

1998) is most sensitive and most reliable for helminth egg detection. This method is fast, use largest quantity of feces (4g), have low limit of detection (20 EPG), and, thanks to centrifugation, fecal suspension is clear enough for microscopy.

Modification made by Zajčėk (1978) should provide better results due to lower correction factor, two procedures of centrifugation and lowest dilution ratio. Nevertheless, low dilution ratio consequently lead to presence of large amount of impurity in examined substance. This makes the process of preparation examination significantly difficult, in which parasitic elements may be camouflaged or wrongly detect as fecal pseudoparasitical particles, thus increasing a unreliableness of this procedure. This method has middle limit detection value and is applicable with result accuracy of 100 EPG (Vadlejch et al., 2011).

Third comparable method, according to Wetzel (1951), is the simplest but with worst result. Low sensitivity and reliability of this method is most probably caused by high correction factor and absence of centrifugation. This method has high limit of detection value and gives precise results at 200 EPG (Vadlejch et al., 2011).

Table 1. Comparative parameter values of modified McMaster techniques (Vadlejch et al., 2011)

Parameters	Modified McMaster techniques		
	Wetzel (1951)	Zajiček (1978)	Roepstorff and Nansen (1998)
The amount of feces (g)	2	1	4
Type of flotation solution	NaCl	MgSO ₄ +Na ₂ S ₂ O ₃	NaCl + glucose
Specific weight of solution	1.200	1.280	1.300
Centrifugation (RPM ¹)	-	2000	1200
Centrifugation (RCF ²)	-	479	172
Time of centrifugation (min)	-	2	5
Time of flotation in chamber (min)	2-3	5	3-5
Number of chambers in McMaster object	3	2	2
Multiplicative (corrective) factor	67	33	20

¹RPM - Revolutions Per Minute

²RCF - Relative Centrifugal Force

In different ruminant species there are certain limits of FEC procedure that may significantly impact the explication, interpretation and reliability of obtained results. In adult cattle those are: 1) limited diagnostic value, linked to infection degree that is usually not correlated with helminthes load; 2) low FEC values, that requires more sensitive flotation techniques in cattle than in sheep; 3) limited clinical value for *Nematodirus* spp., since the most damage is caused by immature stadiums of this nematode before starting laying eggs and 4) clinical form of paramphimatisis, that is usually caused by numerous immature parasites in migration, leading to absence or low number of eggs in feces (Rollinson, 2013).

In hemonchosis and trichostrongilidosis of small ruminants, FEC is in high correlation with helminth load of animals. In the case of polyparasitisms, when relatively high production of *H. Contortus* eggs may camouflage lower production of eggs by some other species (*T. colubriformis* and *T. circumcineta*), FEC has limited diagnostic values (Roerber et al., 2013). Because of that, only approximate assessment of infection intensity and decision when animals should be treated can be obtained based on numbers of eggs laid by different gastrointestinal nematode (GIN) species (Table 2).

Table 2. Determination of rate of infection with GIN for young animals (Kahn, 2005)

Parasite	Infection rate (EPGF - Eggs Per Gram Feces)		
	Low	Moderate	High
CATTLE			
Mixed infection	50-200	200-800	800+
<i>Haemonchus</i> spp.	200	200-600	600+
<i>Trichostrongylus</i> spp.	50-100	100-400	400+
<i>Cooperia</i> spp.	200-300	300-2500	2500+
SHEEP			
Mixed infection	50-800	800-1200	1200+
<i>Haemonchus</i> spp.	100-2000	2000-7000	7000+
<i>Trichostrongylus</i> spp.	100-500	500-2000	2000+
<i>Nematodirus</i> spp.	50-100	100-600	600+
<i>Oesophagostomum</i> spp.	100-800	800-1600	1600+

It is known that high efficiency is expected from antiparasitics on field. Antiectoparasitics should have absolute efficiency, while it is expected to be around 95% in anthelmintics, since it is favorable to maintain small number of parasites in the body as a stimulus of immunological

response of the host (Dimitrijević, 1999). In grazing animals there is always mixed infection with higher number of different gastrointestinal nematoda species. Some of them provide development of natural immunity, so that it can be decided if treatment of animal is necessary on the basis of FEC results.

Table 3. Interpretation of clinical form appearance in cattle based on EPG*(Love and Hutchinson, 2007)*

Parasite species	Egg number/1g feces (EPG)
<i>Haemonchus</i>	200
<i>Trichostrongylus</i>	50
<i>Ostertagia</i>	150
<i>Oesophagostomum</i>	100
<i>Cooperia</i>	500
<i>Fasciola</i>	50

Ilić et al:

The importance of differential diagnosis of resistance and resilience in ruminants

This is very important, since it is necessary to maintain balance between induced immunity (its development is stimulated by small number of helminth in animal) and productive capability (its decrease is affected by the same number

of helminths, that cause subclinical form of disease). Obtained EPG results might be very useful for interpretation of clinical form of some helminthosis in large and small ruminants (Table 3).

DIAGNOSTIC VALUE OF FECAL EGG COUNT REDUCTION TEST (FECRT)

Fecal Egg Count Reduction Test (FECRT) is established in early 90's (Coles et al., 1992) and represents a method of choice for monitoring anthelmintics efficiency in ruminants (Dobson et al., 2011). Currently, it is the unique test that may detect resistance of all types of nematoda species in all host species (McKenna, 2013) and serve for calculation of egg count reduction in feces, by comparing mean values of FEC before treatment and after obtained treatment (Wang et al., 2017).

According to World Association for the Advancement in Veterinary Parasitology (WAAVP), there are guidelines for performing and calculating standard FECRT (Coles et al., 1992, 2006), which are improved by recommendations made by Levecke et al. (2017). In accordance with those guidelines, recommendations are: size of sample (≥ 10 or ≥ 15 animals per group for treatment, and each excretion at least 150 EPG), FEC method (McMaster), statistical analysis (FECRT based n arithmetical mean of grouped FEC after drug application) and criteria which define decreased drug efficiency (FECRT $< 90\%$ or FECRT $< 95\%$, resistance is declared if the fecal egg count reduction is lower than 95%, and the lowest limit of drug efficiency is lower than 90%) (Dobson et al., 2011; Vidyashankar et al., 2012).

For performing FECRT, sample of feces is collected before dehelmintisation and EPG value is determined in it, followed by treatment. Sampling of feces is repeated 14 days after obtaining treatment and value of EPG is determined again. By using special equation, percentage decrease of eggs count in feces is calculated individually. Thereafter, average decrease for all test animals is calculated, in order to calculate overall decrease for farm or herd. This value is subsequently used for obtaining calculation related to existence or absence of drug resistance (Kaplan and Nielsen, 2010). If the drug is effective, no parasite should survive treatment longer than the time needed for gut emptying (usually up to 48 hours). This period of time may be prolonged for as many days as temporary suppression of eggs laying lasts (3 days – for imidazole, 8 days – for benzimidazoles, 14 to 17 days – for macrolides lactones), so that efficiency of certain drug groups is estimated only after expiration of this period (Coles et al., 2006).

If examined animals have large egg number in feces, after which dehelmintization is obtained, and 10 days after FEC shows zero or very low value (lower than 5% of value before treatment), for that group can be claimed certainly that dehelmintisation is successfully obtained (Coles et al., 1992).

DIAGNOSTIC VALUE „FIVE POINT CHECK“ CLINICAL APPROACH

Obtained diagnostic FEC based results have to be complement with assessment related to presence or absence of clinical signs of diseases („Five Point Check“). This clinical approach

means monitoring of five most common nonspecific symptoms in animals infected by parasites – anemia of mucus membrane of eye, body

weight lost or growth and development retardation, fecal dirtiness of tail and posterior body region, submandibular edema and runny nose (Bath et al., 2010). Based on clinical symptoms severity, selection of animals that should undergo process of dehelminthisation is done. Herd health status is classified as: „good“ (no need for dehelminthisation), „bad“ (necessarily of dehelminthisation, with control during several fallowing months) and mixed results („some animals are good, some are bad“ - according to estimated symptoms severity, it is decided which animals will undergo dehelminthisation process) (Storey, 2015).

With the aim to slow down the onset of the anthelmintics resistance and organization of Integrated Parasite Management (IPM), the principle of Targeted Selective Treatment (TST) is globally accepted. Implementation of this strategy has become workable on farms only with development and practical application of FAMACHA© system for clinical estimation of anemia caused by hematophagous nematode *Haemonchus contortus* in small ruminants. Principle of TST can be expanded on other important ectoparasites, under condition that developed system is practical, economical and realistically capable to identify animals that are under risk of overloading by expected endoparasites (Bath and Van Wyk, 2009).

Candidates for expanded TST system manifest one of five listed clinical symptoms that served as bases for designing of practical guide for breeders. For international, multilingual usage, this system is called Five Point Check©, and represent practical expansion of TST and may be effective contribution in monitoring of endoparasite presence in small ruminants. It let users to: (a) make rapid estimation of parasitosis signs in small ruminants, (b) make effective estimation of health status of own animals, (c) identify expected parasites, (d) select anthelmintic groups for treatment (e) use practical systems for temporary identification of treated animals

and (f) familiarize with limits of the system (Bath and Van Wyk, 2009).

FAMACHA© system presents figure of the estimation of severity of parasite infection in ruminants and making decisions about healing, based on anemia degree of mucous membrane. Clinical anemia is represented through erythrocyte volume, and is ranged from 1 to 5 on the scale of FAMACHA card and it indicates the infection by haematophage nematode *H. contortus*, trematodes and cestodes (Ferreira et al., 2019).

Besides increased FAMACHA results, the cause for delemintisation might also be other clinical manifestations in infected animas. Based on body condition index, which is determined by BCS (Body Condition Score) by card on scale from 1 to 5, there is possibility of infection by *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp. and nodular helminths (Mahieu et al., 2007, Arece-Garcia et al., 2016). Dirtiness of tail and posterior body region with feces is determined by DS (Dag Score) card with 1 to 5 scale and is indicator of possible presence of infection by nematodes *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Oesophagostomum* spp., *Strongyloides* spp. and coccidia (*Eimeria* spp). Existance of nasal discharge indicates the presence of nasal miasa, pulmonal parasites and pneumonia, and is scaled by ND (Nasal Discharge) card on scale 1-5. Cold submandibular edema is, according to severity, catogorised on 1 to 5 scale, and indicates the low blood protein level in examined animals and on possibility of parasite infection caused by *H. Contortus* species, trematodes, cestodes and coccidia (*Eimeria* spp) (Walker et al., 2015).

Besides these five standard clinical symptoms, sometimes observation of condition of the fur is performed (low hair quality or abnormal fleece), which changes are classified on scale from 1 to 5, and may indicate the presence of nematode infection (*H. contortus*, *Teladorsagia* spp., *Trichostrongylus* spp.), coccidia (*Eimeria* spp) and ectoparasites (Vanimisetti et al., 2004; Mahieu et al., 2007)

Ilić et al:

The importance of differential diagnosis of resistance and resilience in ruminants

From the aspect of differential diagnosis of animals that show signs of resistance, i.e. resilience, some of the most important parameters are obtained FAMACHA values (Burke and Miller, 2008). Usage of FAMACHA© system provides small ruminants breeders to make decisions related to dehelminthisation based on assessment of anemia rate caused by *H. contortus* in sheep and goats (Arece-Garcia et al., 2016). This causative agent is economically most important GIN in sheep and goats, is most common cause of anemia during pasture season in USA, and in the cases of infections of high intensity causes death.

FAMACHA© card is developed in South Africa, and is imported in USA by American Consortium for Small Ruminant Parasite Control (ACSRPC). That is one of the most successful diagnostic indicators, according to which the color of eye mucous membrane is compared with 5 categories of color on control panel with colors that match the different anemia rates. Category 1 is "non anemic" state, while category 5 represent the state of "severe anemia"

(Martinez-Valladares et al., 2013). Based on results determined by card, sheep and goats with anemia are identified and exposed to selective dehelminthisation.

Selective dehelminthisation reduces the drug usage and slows down the development of anthelminths resistance in GIN. It can also help in making selective decisions related to breeding, in a way that it will identify those animals that are most sensitive to gut parasite infection, i.e. resilient animals (Rizzon Cintra et al., 2018). FAMACHA© is applied only in a cases where main causative agent of clinical disease is *H. contortus*. Before performing the test, it should be taken in consideration that some stages (eye diseases environmental stimulus and systemic diseases) cause reddish of eye mucous membrane and thus may camouflage anemia. Questionable may also be the other causes of anemia, but they are rare comparing to GIN infection during pasture season (Ferreira et al., 2019).

CONCLUSION

Since they are adapted to present parasites, resilient animals present non-identified sources of parasite infections, which can be maintained for a long period and obtained continual recontamination of pasture. They can be identified only just with implementation of quantitative coprological diagnostic and performing FEC values for each individual respectively. Resilient animal has consistently low FEC levels and low FAMACHA results, mainly are in good body condition and do not show variations in body weight. Obtained FEC values usually indicate that suspicious (resilient) animals are carriers of much higher number of parasites than it can be expected by analysis and estimation obtained on other clinical parameters. These animals should

not be dehelminthed, or should be rarely dehelminthed, compared to the other herd animals which show clinical signs of diseases also after dehelminthisation, due to parasite resistance. Animals infected by large number of resistant endoparasites show high FEC values, high FAMACHA results and have poorer body condition with significant body weight variations also after treatment. Short term changes in body weights, may be indicators of parasitosis, and this may provide rapid identification of animals that will probably have benefits from treatment. Without FEC information, it cannot be certainly defined if observed noted characteristic is resistance or resilience.

REFERENCES

1. Arece-García J., López-Leyva Y., González-Garduño R., Torres-Hernández G., Rojo-Rubio R., Marie-Magdeleine C. (2016): *Effect of selective anthelmintic treatments on health and production parameters in Pelibuey ewes during lactation*. Trop Anim Health Prod 48 (2): 283-287.
2. Bath F.G., Van Wyk A.J. (2009): *The Five Point Check© for targeted selective treatment of internal parasites in small ruminants*. Small Ruminant Res 86 (1): 6–13.
3. Bath G.F., Wyk J.A., Malan F.S. (2010): *Targeted selective treatment of sheep using the Five Point Check©*. J Common Vet Assoc 26: 29–32.
4. Bishop S.C. (2012): *A consideration of resistance and tolerance for ruminant nematode infections*. Front Genet 3: 168.
5. Bishop S.C., Morris C.A. (2007): *Genetics of disease resistance in sheep and goats*. Small Rumin Res 70 (1): 48–59.
6. Bondarenko I.G., Kinčeková J., Várady M., Königová A., Kuchta M., Koňáková G. (2009): *Use of modified McMaster method for the diagnosis of intestinal helminth infections and estimating parasitic egg load in human faecal samples in non-endemic areas*. Helminthologia, 46: 62–64.
7. Burke J.M., Miller E.J. (2008): *Use of FAMACHA system to evaluate gastrointestinal nematode resistance/ resilience in offspring of stud rams*. Vet Parasitol 153: 85–92.
8. Coles G.C., Bauer C., Borgsteede F.H.M., Geerts S., Klei T.R., Taylor M.A., Waller P.J. (1992): *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance*. Vet Parasitol 44 (1–2): 35–44.
9. Coles G.C., Jackson F., Pomroy W.E., Prichard R.K., von Samson-Himmelstjerna G., Silvestre A., Taylor M.A., Vercruyse J. (2006): *The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance*. Vet Parasitol 136 (3–4): 167–185.
10. Dimitrijević S. (1999): *Dijagnostika parazitskih bolesti*. Fakultet veterinarske medicine Univerzitet u Beogradu, „Jovan“, Beograd, str. 132.
11. Dobson R., Jackson F., Levecke B., Besier B., Kaplan R., Sangster N., Vercruyse J. (2011): *WAAVP guidelines for faecal egg count reduction tests (FECRT)*. *Proceedings: 23rd International conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology: Towards good management practices in parasitic control*. Buenos Aires, Argentina.
12. Doeschl-Wilson A.B., Villanueva B., Kyriazakis I. (2012): *The first step toward genetic selection for host tolerance to infectious pathogens: obtaining the tolerance phenotype through group estimates*. Front Genet 3: 265.
13. Gunia M., Phocas F., Gourdine J.L., Bijma P., Mandonnet N. (2013): *Simulated selection responses for breeding programs including resistance and resilience to parasites in Creole goats*. J Anim Sci 91 (2): 572–581.
14. Ferreira B.J., Santos Sotomaior C., Diógenes C.A., Bezerra S., da Silva E.W., Morais Leite H.J.G., Rufino de Sousa E.J., de Fátima França Biz J., Evangelista Façanha A.D. (2019): *Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in tropical hair sheep*. Trop Anim Health Prod Published online 05 March 2019. doi.org/10.1007/s11250-019-01861-x

15. Jackson F., Coop R.L. (2000): *The development of anthelmintic resistance in sheep nematodes*. Parasitol 120 Suppl (7): S95–107.
16. Kahn M.C. (2005): *Merck Veterinary manual*. (9th Ed.) Whitehouse Station, N.J., Great Britain: Merck & Co., pp. 262–265.
17. Kaplan R.M., Nielsen M.K. (2010): *An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60s anymore*. Equine Vet Educ 22: 306–316.
18. Lalošević V., Jarak M., Đurić S., Simin S. (2009): *Biološka kontrola helminata*. Letopis naučnih radova 33 (1): 118–125.
19. Levecke B., Kaplan M.R., Thamsborg M.S., Torgerson R.P., Vercruyse J., Dobson J.R. (2018): *How to improve the standardization and the diagnostic performance of the fecal egg count reduction test?* Vet Parasitol 253: 71–78.
20. Love S., Hutchinson G. (2007): *Worm Test for livestock and guide to egg counts*. Profitable and sustainable primary industries, Primefact 480 (Replace agnote dai - 308), pp. 1–5.
21. Malan F.S., Van Wyk J.A. (1992): *The packed cell volume and color of the conjunctivae as aids for monitoring Haemonchus contortus infestations in sheep*. In: Biennial National Veterinary Congress, Grahamstown, South African Veterinary Association, 1, p. 139.
22. Martínez-Valladares M., Martínez-Pérez J.M., Robles-Pérez D., CorderoPérez C., McMahon C., Bartley D.J., Edgar H.W.J., Ellison S.E., Barley J.P., Malone F.E., Hanna R.E.B., Brennan G.P., Fairweather I. (2013): *Anthelmintic resistance in Northern Ireland (I): Prevalence of resistance in ovine gastrointestinal nematodes, as determined through faecal egg count reduction testing*. Vet Parasitol 195 (1–2): 122–130.
23. Mahieu M., Arquet R., Kandassamy T., Mandonnet N., Hoste H. (2007): *Evaluation of targeted drenching using famacha method in Creole goat: Reduction of anthelmintic use, and effects on kid production and pasture contamination*. Vet Parasitol 146: 135–147.
24. McKenna P.B. (2013): *Are multiple pre-treatment groups necessary or unwarranted in faecal egg count reduction tests in sheep?* Vet Parasitol 196 (3–4): 433–437.
25. McManus C., do Prado Paim T., de Melo C.B., Brasil B.S., Paiva S.R. (2014): *Selection methods for resistance to and tolerance of helminths in livestock*. Parasite 21: 56.
26. Pereckiene A., Petkevicius S., Vysniauskas A. (2010): *Comparative evaluation of efficiency of traditional McMaster chamber and newly designed chamber for the enumeration of nematode eggs*. Acta Vet Scand 52 (Suppl 1): S20.
27. Petričević M.S., Ilić T., Dimitrijević S. (2007): *Savremeni modeli i perspektiva kontrole parazitskih bolesti*. Vet Glasnik 61 (5–6): 337–350.
28. Rizzon Cintra C.M., Ollhoff D., Sotomaior S.C. (2018): *Sensitivity and specificity of the FAMACHA© system in growing lambs*. Vet Parasitol 251: 106–111.
29. Rollinson D. (2013): *Advances in parasitology*. First Edition, Elsevier Ltd, London, UK, pp. 292–294.
30. Roeber F., Jex A.J., Gasser R.B. (2013): *Chapter Four - Next Generation Molecular Diagnostic Tools for Gastrointestinal Nematodes of Livestock, with an Emphasis on Small Ruminants: A Turning Point?* Adv Parasitol 83: 267–333.
31. Roepstorff A., Nansen P. (1998): *Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine*. FAO Animal Health Manual, Rome; No 3, 47–55.

32. Salgado J.A., Santos C.P. (2016): *Overview of anthelmintic resistance of gastrointestinal nematodes of small ruminants in Brazil*. Rev Bras Parasitol Vet 25 (1): 3–17.
33. Storey B. (2015): *Fecal Egg Counts: Uses and Limitations*. W4, What Works With Worms Congress, May, Pretoria, South Africa, pp. 1–9.
34. Vadlejch J., Petrtyl M., Zaichenko I., Čadková Z. (2011): *Which McMaster egg counting technique is the most reliable?* Parasitol Res 109: 1387–1394.
35. Vanimisetti H.B., Greiner S.P., Zajac A.M., Notter D.R. (2004): *Performance of hair sheep composite breeds: resistance of lambs to Haemonchus contortus*. J Anim Sci 82 (2): 595–604.
36. Várady M., Papadopoulos E., Dolinská M., Konigová A. (2011): *Anthelmintic resistance in parasites of small ruminants: Sheep versus goats*. Helminthologia 48 (3):137–144.
37. Vidyashankar A.N., Hanlon B.M., Kaplan R.M. (2012): *Statistical and biological considerations in evaluating drug efficacy in equine strongyle parasites using fecal egg count data*. Vet Parasitol 185: 45–56.
38. Walker J.G., Ofithile M., Tavolaro F.M., Van Wyk J.A., Evans K., Morgan E.R. (2015): *Mixed methods evaluation of targeted selective anthelmintic treatment by resource-poor smallholder goat farmers in Botswana*. Vet Parasitol 214 (1-2): 80–88.
39. Wang C., Torgerson R.P., Höglund J., Furrer R. (2017): *Zero-inflated hierarchical models for faecal egg counts to assess anthelmintic efficacy*. Vet Parasitol 235: 20–28.
40. Wetzell E. (1951): *Verbesserte McMaster-Kammer zum Auszählen von Wurmeiern*. Tierärztl Umsch 6: 209–210.
41. Zajíček D. (1978): *Comparision of the efficiency of two quantitative ovoskopic methods*. Vet Med 23: 275–280.

Article received: 13.10.2019.

Article accepted: 01.12.2019.