

СРПСКО ВЕТЕРИНАРСКО ДРУШТВО
SERBIAN VETERINARY ASSOCIATION



ЗБОРНИК РАДОВА И КРАТКИХ САДРЖАЈА

31. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ



10-13. септембра 2020. године

ИЗДАВАЧ
СРПСКО ВЕТЕРИНАРСКО ДРУШТВО

ГЛАВНИ И ОДГОВОРНИ УРЕДНИК
Проф. др Милорад Мириловић

ТЕХНИЧКИ УРЕДНИК
др Бранислав Вејновић

РЕЦЕНЗЕНТ
Проф. др Владимир Нешић

ШТАМПА
Научна КМД, Београд

ТИРАЖ
500 примерака

Београд, септембар 2020. године

ОРГАНИЗАТОР / ORGANIZER:
СРПСКО ВЕТЕРИНАРСКО ДРУШТВО

СУОРГАНИЗАТОР / CO-ORGANIZER:
ФАКУЛТЕТ ВЕТЕРИНАРСКЕ МЕДИЦИНЕ, БЕОГРАД
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ НОВИ САД,
ДЕПАРТАМАН ЗА ВЕТЕРИНАРСКУ МЕДИЦИНУ

ПОКРОВИТЕЉ / PATRON:
МИНИСТАРСТВО ПОЉОПРИВРЕДЕ,
ШУМАРСТВА И ВОДОПРИВРЕДЕ
УПРАВА ЗА ВЕТЕРИНУ
ВЕТЕРИНАРСКА КОМОРА СРБИЈЕ

АДРЕСА ОРГАНИЗАТОРА / ADDRESS:
Српско ветеринарско друштво
Булевар ослобођења бр. 18, Београд
тел/фах: 011/2685-187
www.svd.rs
svd1890@gmail.com

Председник СВД-а / President of SVA:
Проф. др Милорад Мириловић

ОРГАНИЗАЦИОНИ ОДБОР / ORGANIZATIONAL COMMITTEE:

Председник / President: Милорад Мириловић
Потпредседници / Vice-presidents: Владимир Нешић и
Миодраг Рајковић
Технички секретар / Technical secretary: Катарина Вуловић
Маркетинг менаџер / Marketing manager: Небојша Алексић
Техничка подршка / Technical support: Др Бранислав Вејновић

ПОЧАСНИ ОДБОР / HONORARY COMMITTEE:

Бранислав Недимовић, Емина Милакара, Недељко Тица, Иван Бошњак, Марко Цинцовић, Мишо Коларевић, Саша Бошковић, Ненад Будимовић, Ратко Ралевић.

ПРОГРАМСКИ ОДБОР / PROGRAMME COMMITTEE:

Радмила Марковић (председник), Данијела Кировски, Тамаш Петровић, Бојан Тохол, Слободанка Вакањац, Неђељко Карабасил, Иван Вујанац, Владимир Магаш, Миланко Шеклер, Драго Недић

СЕКРЕТАРИЈАТ / SECRETARIAT:

Слободан Станојевић, Иван Милош, Миодраг Бошковић, Маријана Вучинић, Милутин Симовић, Зоран Рашић, Милан Ђорђевић, Предраг Масловарић, Зоран Јевтић, Зоран Кнежевић, Војислав Арсенијевић, Љубинко Штерић, Драгутин Смољановић, Бојан Блонд, Весна Ђорђевић, Добрила Јакић-Димић, Сава Лазић, Бранислава Белић, Милош Петровић, Милица Лазић, Ласло Матковић, Дарко Бошњак, Петар Миловић, Миодраг Николић, Никола Милутиновић, Славица Куша Јелесијевић, Ласло Матковић, Гордана Жугић, Јасна Стевановић, Жељко Сладојевић.

ПРЕГЛЕД НАЈВАЖНИЈИХ МЕТОДА ЗА ИСПИТИВАЊЕ ЕФИКАСНОСТИ
АНТИХЕЛМИНТИКА И ДЕТЕКЦИЈУ АНТИХЕЛМИНТИЧКЕ РЕЗИСТЕНЦИЈЕ

Филип Штрбац^{1*}, Коста Петровић², Драгица Стојановић³

¹Филип Штрбац, ДВМ, Департман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду, Србија.

²Коста Петровић, ДВМ, Пољопривредна школа са домом ученика у Футогу, Нови Сад, Србија

³др Драгица Стојановић, редовни професор, Департман за ветеринарску медицину, Пољопривредни факултет, Универзитет у Новом Саду, Србија

Кратак садржај

Нерационална примена комерцијалних антихелминтика је довела до развоја антихелминтичке резистенције (АР) код многих врста ендопаразита домаћих животиња. То је довело до смањења ефикасности лекова из група бензимидазола, имидазотиазола и макроцикличних лактона и, последично, до великих економских губитака. Због тога је један од најважнијих приоритета модерног сточарства борба против АР, а која укључује примену адекватних *in vitro* и *in vivo* метода за њену детекцију. *In vitro* методе се заснивају на испитивању утицаја различитих концентрација одређене активне супстанце на одређене изоловане стадијуме паразита у лабораторијским условима. Међу њима су најосетљивије и најчешће коришћене методе тзв. *egg hatch assay* (ЕНА) и *larval development assay* (LDA). Са друге стране, *in vivo* методе као што је тзв. *faecal egg count reduction test* (FECRT), подразумевају испитивање утицаја препарата на паразите у самим животињама у теренским условима, где се ефикасност неког лека мери запаженом редукцијом броја одређених паразитских облика након третмана. Свака од наведених метода има своје предности и недостатке, због чега постоје стални напори да се усавршава и стандардизују. У последње време се у контексту детекције АР све више испитују и користе различите молекуларне технике као што су *PCR* и пиросеквенцирање. Такође, важно је напоменути да се *in vitro* и *in vivo* тестови могу користити и за откривање нових супстанци као што су нека природна једињења са антихелминтичким потенцијалом, као и за испитивање њихове ефикасности. Из свега наведеног се може закључити да наведене методе имају вишеструки значај у борби против антихелминтичке резистенције.

Кључне речи: антихелминтичка резистенција, ендопаразити, антихелминтици, *in vitro* методе, *in vivo* методе

Abstract

The irrational use of commercial anthelmintics has led to the development of anthelmintic resistance (AR) in many species of endoparasites commonly found in domestic animals. This has led to a decrease in the efficiency of drugs from the groups of benzimidazoles, imidazothiazoles and macrocyclic lactones and, consequently, to major economic losses. Therefore, one of the most important priorities of modern animal husbandry is to combat AR, which includes the application of adequate *in vitro* and *in vivo* methods for its detection. *In vitro* methods are based on examining the influence of different concentrations of a certain active substance on certain isolated parasitic stages in lab conditions. Among them, the most sensitive and the most common used methods are the egg hatch assay (EHA) and the larval development assay (LDA). On the other hand, *in vivo* methods such as the faecal egg count reduction test (FECRT), examine the effect of drug preparations on parasite-infected animals in field conditions, whereby the efficiency of a drug is measured by the observed reduction in the number of

31. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ, ONLINE

certain parasitic forms *post-treatment*. Each of these methods has its advantages and disadvantages, and efforts are regularly made to improve and standardize them. Recently, in the context of AR detection, various molecular techniques such as PCR and pyrosequencing have been increasingly examined and used. It is also important to note that *in vitro* and *in vivo* tests can also be used to detect new substances such as certain natural compounds with anthelmintic potential, and can be simultaneously used to test their efficiency. From the above-mentioned points, it can be concluded that these methods have multiple significance in combating anthelmintic resistance.

Keywords: anthelmintic resistance, endoparasites, anthelmintics, *in vitro* methods, *in vivo* methods

Увод

Антихелминтици као што су бензимидазоли, имидазотиазоли и макроциклични лактони су дуго времена коришћени као главни метод борбе против различитих хелминтских инфекција домаћих животиња (Mphahlele и сар., 2019; Kaplan, 2020). Међутим, услед њихове нерационалне употребе, дошло је до појаве антихелминтичке резистенције (АР) код многих врста паразита и смањења ефикасности ових лекова (Shalaby, 2013). То је довело до значајних економских губитака узрокованих паразитима, због чега хелминтске инфекције данас представљају један од највећих проблема модерног сточарства (Zeineldin и сар., 2018).

Борба против АР није могућа без, пре свега, адекватних метода за њену детекцију. То подразумева примену различитих *in vitro* и *in vivo* метода, њихово усавршавање и стандардизацију, као и испитивање нових метода као што су различите молекуларне технике (Mphahlele и сар., 2019; Kebede, 2019). На тај се може добити слика присуства и раширености резистенције широм света и у одређеним подручјима, што је неопходно за развој стратегија за њено сузбијање. У последње време се све више спомиње и могућност увођења алтернатива као што је употреба природних, ботаничких антихелминтика (Veerakumari, 2015; Zeineldin и сар., 2018) за чија испитивања ефикасности се могу користити методе које се користе и за детекцију АР.

Циљ овог рада јесте да се кроз представљање и кратак опис наведених метода укаже на њихов вишеструки значај у борби против антихелминтичке резистенције и подстакну нова истраживања на овом пољу.

In vitro методе

Међу најпознатијим и најчешће коришћеним *in vitro* методама је тзв. *egg hatch assay* (ЕНА), који испитује овицидни ефекат неког лека, односно проценат инхибиције ембрионације и излегања јаја (Alvarez-Sánchez и сар., 2002; Verguusee и сар., 2008). Овај тест је један од стандардизованих тестова за откривање резистенције препоручен од стране светске асоцијације за унапређење ветеринарске паразитологије (WAAVP), а примарно је развијен у сврху детекције резистенције на бензимидазоле код трихостронгилида (Verguusee и сар., 2008; Kebede, 2019). Укратко, тест се врши на следећи начин: након узимања свежих узорака фецеса од животиња и изолације јаја, праве се водени раствори јаја и различитих растућих концентрација активне супстанце изражених у μg или mg/mL , при чему је број јаја као и укупни волумен сваког раствора исти. Након инкубације од 48h на 27°C, излегла и неизлегла јаја се броје под микроскопом и рачуна се проценат инхибисаних од укупног броја јаја при свакој концентрацији лека (Coles и сар., 2006; von Samson-Himmelstjerna и сар., 2009; Mphahlele и сар., 2019).

С озбиром да се користе раствори растућих концентрација лека, ЕНА је погодан за одређивање дозно-зависне криве, као и параметара као што су EC_{50} и EC_{95} (концентрације које инхибишу 50% односно 95% јаја) на основу којих се пореде изолати и процењује присуство резистенције (Mphahlele и сар., 2019). Приликом спровођења овог теста у циљу детекције резистенције на бензимидазоле користи се тиабендазол у различитим концентрацијама, при чему је индикатор присуства резистенције EC_{50} већи од 0,1 μg тиабендазола по mL (Coles и сар., 2006; von Samson-Himmelstjerna и сар., 2009). Због свега наведеног, ЕНА се са успехом користи за откривање резистенције код гастроинтестиналних нематода оваца, коза, крава, коња, свиња и

31. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ, ONLINE

људи (von Samson-Himmelstjerna i sar., 2009). Такође, развијен је и *EHA* за детекцију AP на албендазол код великог метиља оваца (Robles-Perez и sar., 2014; Ceballos и sar., 2019).

Недостаци *EHA* укључују потешкоће приликом детектовања нижих нивоа резистенције (испод 25%) и високу ефикасност само код врста хелмината код којих се јаја брзо излегу, због чега је заправо најнефективнији код људских хелмината (Vergruysee и sar., 2008; Kebede, 2019). Такође, због смањења осетљивости на бензимидазоле током ембрионације, узорци морају бити свежи и обрађени што пре могуће како би се добили прецизни подаци, мада овај проблем може бити решен чувањем узорака фецеса на 4°C током 72h или у анаеробним условима до 7 дана (Álvarez-Sánchez и sar., 2002). И поред наведених недостатака, *egg hatch assay* се сматра брзим и поузданим и представља један од најчешће успешно коришћених тестова у детекцији AP.

Основа тзв. *larval development assay (LDA)* теста јесте испитивање инхибиторног утицаја различитих концентрација антихелминтика на развој јаја нематода до трећег ларвеног стадијума (L₃), при чему се може користити течни или чврсти нутритивни медијум (Álvarez-Sánchez и sar., 2002). Према Kebede (2019), *LDA* је једини *in vitro* тест који омогућава детекцију резистенције на све групе антихелминтика без обзира на њихов механизам дејства, при чему његови резултати успешно одражавају *in vivo* ефикасност. Детектује присуство резистенције већ када је 10% популације паразита резистентно, не захтева свежа јаја али је потребно више времена за његово извођење у поређењу са *EHA* тестом (Álvarez-Sánchez и sar., 2002; Vergruysee и sar., 2008).

Иако постоји неколико варијација, постоје два главна начина за извођење *LDA*. Први начин подразумева да се, након узимања узорака фецеса и изолације јаја, направљене суспензије јаја инкубирају у условима повећане влажности 48h на 27°C, након чега се у суспензије додају растуће концентрације испитиваног лека. После нове инкубације од 5 дана, L₃ се броје у свакој суспензији како би се утврдило преживљавање ларви у различитим концентрацијама и израчунавају се параметри као што је LC₅₀ (концентрација која инхибише развој 50% ларви). Други начин извођења *LDA* представља заправо тзв. *micro-agar larval development assay (MALDA)*, где се основни раствори лекова припремају њиховим растварањем у диметил-сулфоксиду (DMCO) а затим разблажују у дестилованој води. Изолована јаја се, заједно са наведеним растворима растућих концентрација лека, као и културним медијумом који садржи екстракте квасца и растворе соли, инкубирају током 7 дана након чега се под микроскопом броје неизлегла јаја и L₁-L₃ ларве (Mphahlele и sar., 2019).

Да би се повећала сензитивност и *EHA* и *LDA* теста и смањио број потребних концентрација лека, препоручује се коришћење доза разграничења (EC₉₉ односно LC₉₉), уз помоћ којих је могуће открити релативно ниски проценат резистентних јаја и ларви у популацији (2-3%) (Coles и sar., 2006; Mphahlele и sar., 2019). Наиме, ови тестови полазе од чињенице да је потребна већа концентрација лека за инхибицију код резистентних паразита у односу на осетљиве (Álvarez-Sánchez и sar., 2002). Због тога, проценат јаја која се излегу (*EHA*), односно ларви које се развију до L₃ стадијума (*LDA*) при дози разграничења заправо указује на проценат резистентних јаја и ларви у популацији (Coles и sar., 2006). Тако је, на пример, предложена LC₉₉ приликом извођења *LDA* код овчијих нематода за тиабендазол 0,02 µg/mL, а левамизол 0,5 µg/mL (Coles и sar., 2006; Mphahlele и sar., 2019). На овај начин се брже и једноставније може доћи до потребних података.

Остали тестови укључују и тзв. *larval paralysis and motility assay*, тест који се користи за испитивање присуства резистенције на левамизол и морантел. Овај тест разликује резистентне и осетљиве сојеве паразита проценом удела L₃ у тоничној парализи после инкубације са растућим концентрацијама ових лекова. Иако је овај тест репродуцибилан и релативно лаган за извођење, тумачење резултата може бити компликовано с обзиром да се антихелминтик не сме додати у суспензију прерано (ларве нису довољно развијене) као ни прекасно (лек нема ефекта). У литературним наводима се спомињу и други тестови као што су тзв. *adult development assay*, где се *H. contortus* узгаја до адултног облика у фази полагања јаја, као и тзв. *tubulin binding assay*. Ови тестови се могу користити за детекцију резистенције на бензимидазоле, иако још увек служе преваходно за истраживачке сврхе (Kebede, 2019).

In vivo методе

Међу овим методама је свакако најпознатија и најчешће примењивана тзв. *faecal egg count reduction test (FECRT)*, која се уједно сматра и главном методом за детекцију антихелминтичке резистенције код нематода значајних за ветеринарску медицину, а применљива је код оваца, коза, говеда, коња и свиња (Coles и сар., 2006; Kebede, 2019; Mphahlele и сар., 2019). *FECRT* је применљив за испитивање ефикасности практично свих антихелминтика доступних данас. Постоји више начина извођења ове методе, али се принцип своди на узимање узорака фецеса од одређене популације животиња која може бити природни или вештачки инфицирана и бројање јаја паразита (тзв. *faecal egg count – FEC*). Након тога следе третмани животиња испитиваном активном супстанцом и контролом, и после одређеног времена у зависности од лека који се испитује, узорци фецеса се узимају поново и броје се јаја паразита. Ефикасност лека се потом мери израчунавом редукијом броја јаја након третмана, односно под утицајем лека. Према упуству *WAAVP*, проценат редукије испод 90% указује на присуство резистенције, док је код гастроинтестиналних нематода оваца гранична вредност 95% (Mphahlele и сар., 2019).

Ефикасност, једноставност и брзина *FECRT*-а зависи од технике која се примењује за бројање јаја, од којих се најчешће користе *McMaster*, *Cornell-Wisconsin* или *FLOTAC* (Leveck и сар., 2012). У новије време је развијена и техника *mini-FLOTAC* (Cringoli и сар., 2017), која заправо представља унапређену *FLOTAC* технику у смислу веће практичности јер је погодна за испитивање великог броја узорака у кратком временском периоду, а притом је веома поуздана, тачна и лака за извођење. Недостатак *FECRT*-а је што се, слично као код *EHA*, резистенција тешко може детектовати уколико је присутно више од 25% резистентних паразита, а детектован број јаја не одговара увек степену инфекције адултима. Процедура може бити компликована с обзиром да захтева велики број животиња, па није погодна за мања стада. Ипак, главна предност *FECRT*-а је могућност верног приказа присуства и раширености резистенције с обзиром да се спроводи на самим животињама, због чега је овај тест са успехом коришћен за откривање резистенције у многим земљама света (Mphahlele и сар., 2019).

Од свих поменутих тестова, тзв. *controlled efficacy test (CET)* се сматра најпоузданијим тестом за испитивање антихелминтичке резистенције, а заснован је на квантификацији степена заражености (оптерећења) хелминтима након жртвовања животиња претходно третираних антихелминтицима. Овај тест је користан за процену ефикасности антихелминтика против различитих развојних стадијума паразита кроз жртвовање животиња у одређено време након инфекције, а може бити значајан и у потврди резултата *FECRT*-а. *CET* је веома осетљив уколико се антихелминтици примењују у одговарајућим дозама, али је доста скуп и захтеван, што спречава његову ширу примену за рутинску детекцију АР. Због тога су развијени различити модели који подразумевају коришћење лабораторијских животиња уместо фармских, као и смернице помоћу којих се у том случају процењује антихелминтичка активност (Álvarez-Sánchez и сар., 2002).

Поменуте *in vitro* и *in vivo* методе, пре свих *EHA*, *LDA* и *FECRT*, су своју примену нашле и у испитивању ефикасности нових активних супстанци, као што су различити ботанички антихелминтици. Тако су се са успехом користиле за испитивање ефикасности етарских уља и других продуката различитих биљака као што су *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Mentha x piperita*, *Eucalyptus staigeriana*, *Lippia sidoides*, *Artemisia lancea*, *Cymbopogon martinii* и многе друге (Veerakumari, 2015; Andre и сар., 2018). Ови производи су показали ефикасност против различитих паразита домаћих животиња, најчешће против гастроинтестиналних нематода оваца. ЕНА је коришћен и у нашем истраживању где је испитиван и доказан овицидан ефекат етарског уља клеке (*Juniperus communis* L.) против *Haemonchus*, *Trichostrongylus*, *Teladorsagia* и *Chabertia* нематода оваца (Štrbac и сар., 2020). При свему томе, у оваквим истраживањима се могу користити и комбинације описаних метода, која уз испитивања тосичности могу пружити реалну слику ефекта примене неке активне супстанце.

Молекуларне методе

Истраживања су показала да различите молекуларне технике имају већу осетљивост и специфичност у поређењу са традиционалним методама заснованим пре свега на микроскопској и/или имунолошкој детекцији (Mphahlele и сар., 2019). При томе, најчешће помињане технике су *AS-*

PCR, RT-PCR и пиросеквенцирање. Тако су наведени тестови са успехом коришћени за потврду присуства резистентних популација гастроинтестиналних нематода оваца на албендазол и ивермектин (Mondragón-Ancelmo и сар., 2019). Са друге стране, коришћењем RFLP (енг. *restriction fragment length polymorphism*) технике која користи варијације у хомологим ДНК сенквенцама, утврђено је да постоје различити алели отпорни на бензимидазоле код различитих резистентних сојева *H. contortus*, због чега може бити погодна за разликовање резистентних и осетљивих сојева овог паразита (Mphahlele и сар., 2019). Од осталих метода испитују се и проточна цитометрија, различите генске пробе, фреквенције алела, транс-мембранске функционалне анализе и др. Међутим, већина ових метода се још увек користи само за истраживачке сврхе (Kebede, 2019).

Закључак

Наведене методе, међу којима пре свих *EHA*, *LDA* и *FECRT*, играју веома значајну улогу у првом и основном кораку у борби против антихелминтичке резистенције, а то је откривање њеног присуства и степена раширености, како са географског, тако и са аспекта врста и сојева паразита који су резистентни и активних супстанци на које су резистентни. На основу тога се могу направити јасне смернице и формулисати стратегија успоравања ширења и сузбијања АР, а самим тим и смањења економских губитака. Поред тога, наведене методе се могу користити и за откривање и испитивање ефикасности нових, будућих антихелминтичких агенаса због чега могу имати кључну улогу и у решавању проблема антихелминтичке резистенције.

Литература

1. Álvarez-Sánchez MA, Mainar-Jaime RC, Pérez García J, Rojo-Vázquez FÁ, 2002, A review of the methods for the detection of anthelmintic resistance, *Revista Ibérica de Parasitología*, 62, 1-2, 51-59.
2. André WPP, Ribeiro WLC, de Oliveira LMB, Macedo ITF, Rondon FCR, Bevilacqua CML, 2018, Essential oils and their bioactive compounds in the control of gastrointestinal nematodes of small ruminants, *Acta Scientiae Veterinari*, 46, 1522, 1-14.
3. Ceballos L, Canton G, Pruzzo C, Sanabria R, Moreno L, Sanchis J et al., 2019, The egg hatch test: a useful tool for albendazole resistance diagnosis in *Fasciola hepatica*, *Veterinary Parasitology*, 271, 2019, 7-13.
4. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A et al., 2006, The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance, *Veterinary Parasitology*, 136, 2006, 167-185.
5. Cringoli G, Maurelli MP, Levecke B, Bosco A, Vercruyse J, Utzinger J et al., 2017, The mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals, *Nature Protocols*, 12, 9, 1723-1732.
6. Levecke B, Rinaldi L, Charlier J, Maurelli MP, Bosco A, Vercruyse J et al., 2012, The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods, *Veterinary Parasitology*, 188, 1-2, 194-199.
7. Kaplan RM, 2020, Biology, epidemiology, diagnosis and management of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of livestock, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 36, 1, 17-30.
8. Kebede A, 2019, Review on anthelmintic drug resistance nematodes and its methods of detection in Ethiopia, *Journal of Veterinary Medicine and Animal Sciences*, 2, 1, 1013.
9. Mondragón-Ancelmo J, Olmedo-Juárez A, Reyes-Guerrero DE, Ramírez-Vargas G, Ariza-Román AE, López-Arellano ME et al., 2019, Detection of gastrointestinal nematode populations resistant to albendazole and ivermectin in sheep, *Animals*, 9, 10, 775.
10. Mphahlele M, Molefe N, Tsotetsi-Khambule A, Oriol T, 2019, Anthelmintic resistance in livestock, In Book: *Helminthiasis, Omolade Olayinka Okwa*, IntechOpen, Dostupno na: <https://www.intechopen.com/books/helminthiasis/anthelmintic-resistance-in-livestock>.
11. Robles-Perez D, Martínez-Perey JM, Rojo-Vazquez FA, Martínez-Valladares M, 2014, Development of an egg hatch assay for the detection of anthelmintic resistance to albendazole in *Fasciola hepatica* isolated from sheep, *Veterinary Parasitology*, 203, 1-2, 217-221.
12. Shalaby HA, 2013, Anthelmintics resistance: how to overcome it?, *Iranian Journal of Parasitology*, 8, 1, 18-32.
13. Štrbac F, Bosco A, Amadesi A, Rinaldi L, Stojanović D, Simin N et al., 2020, In vitro ovicidal effect of common juniper (*Juniperus communis* L.) essential oil on sheep gastrointestinal nematodes, *Veterinarski pregled*, 1, 1, 152-159.
14. Veerakumari L, 2015, Botanical anthelmintics, *Asian Journal of Science and Technology*, 6, 10, 1881-1894.
15. Vercruyse J, Albonico M, Behnke J, Kotze A, McCarthy J, Prichard R et al., 2008, Monitoring anthelmintic efficacy for soil transmitted helminths (STH), Working group on

31. САВЕТОВАЊЕ ВЕТЕРИНАРА СРБИЈЕ, ONLINE

Soil-transmitted helminthiasis, WHO, dostupno na: <https://www.who.int/>. **16.** von Samson-Himmelstjerna G, Coles GC, Jackson F, Bauer C, Borgsteede F, Cirak VY et al. 2009, Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes, *Parasitology Research*, 105, 3, 825-834. **17.** Zeineldin M, Abdelmegeid M, Barakat R, Ghanem M, 2018, A review: herbal medicine as an effective therapeutic approach for treating digestive disorders in small ruminants, *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 56, 1, 33-44