



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Detektionsmetoder för anthelmintikaresistens med fokus på användbarheten hos askarider

Mikael Nylund

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2010: 49

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2010



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Detektionsmetoder för anthelmintikaresistens med fokus på användbarheten hos askarider

Detection methods for anthelmintic resistance with focus on the applicability in ascarides

Mikael Nylund

Handledare:

Johan Höglund, SLU, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, Sektionen för parasitologi

Examinator:

Désirée S. Jansson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: VM0068

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2010

Omslagsbild: -

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2010: 49
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Detektionsmetoder för maskmedelsresistens hos nematoder med applicerbarhet till spolmaskarter

Key words: Detection methods for anthelmintic resistance in nematodes with adaptability to ascarides

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	1
Inledning.....	3
Frågeställningar	3
Material & metoder	3
Litteraturoversikt	3
Aktuella detektionsmetoder för anthelmintikaresistens enligt WAAVP	3
Studier in vivo	4
FECRT	4
Kontrollerat test.....	5
Studier in vitro.....	6
Larval development assay (LDA)	6
Egg hatch assay (EHA)	6
Molekylärdiagnostik och möjliga mekanismer	7
Metoder användbara för askarider.....	7
Anpassningar av befintliga diagnosmetoder till askarider	8
Standardiserade test.....	8
Egg reappearance period (ERP)	9
Matematiska beräkningsmodeller.....	9
Diskussion	9
Litteraturförteckning	11

SAMMANFATTNING

Läkemedelsresistens är ett växande globalt problem. Inte minst bland parasiter hos våra djur har rapporter om utebliven effekt av läkemedel ökat. Pålitliga detektionsmetoder av anthelmintikaresistens hos nematoder är viktig för att åtgärder ska kunna sättas in i ett tidigt skede för att djurvälstånd och produktion ej ska försämrats. Detta kräver standardiserade och beprövade detektionsmetoder. De metoder som används idag för flertalet nematoder är ursprungligen framtagna och anpassade för strongylider hos får. Metoderna är indelade i 1) *in vivo* test som "faecal egg count reduction test" (FECRT) och "kontrollerat test", 2) *in vitro* test som "egg hatch assay" (EHA), "larval development assay" (LDA) och 3) "molekylära tester". Genomgående saknas standardiserade och validerade metoder för detektion av anthelmintikaresistens hos askarider. Trots detta används FECRT som anses vara den "gyllene standarden" vid tester för anthelmintikaresistens, rutinmässigt även för askarider. Den här litteraturstudien beskriver metoder som är beprövade för nematoder och framför även bristen på standardiserade riktlinjer för FECRT, då det utförs på askarider. Dessutom diskuteras möjligheterna till anpassningar för utförandet av FECRT för att användas på askarider. Det finns sammantaget ett stort behov av mer forskning inom området.

SUMMARY

Drug resistance is an increasing global problem that needs to be taken seriously. In particular for the treatment of parasites in livestock there are reports of inadequate treatment results. Reliable methods for the detection of resistance in an early stage, is important in order to maintain good animal welfare and production. This requires standardized and proven methods. The methods in use today are originally developed for strongylides in sheep. They can be divided into.

1) *in vivo* tests, represented by "faecal egg count reduction test" (FECRT) and "controlled test", 2) *in vitro* tests as "egg hatch assay" (EHA), "immature development assay" (LDA) and 3) "molecular tests".

In ascarids, validated methods to detect drug resistance are not yet developed today and guidelines are missing. Despite this fact, FECRT are used routinely and is considered the "golden standard" for detection of anthelmintic resistance also in ascarids. This review summarizes the methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes. It also identifies the need for validated guidelines for FECRT in order to detect drug resistance in ascarids and discuss possible adjustments in the execution of the tests in this purpose. Overall, there is a great need for more research in this field.

INLEDNING

Anthelmintikaresistens definieras enligt Prichard et al. (1980) som när det i en population finns fler maskindivider som tolererar doser av ett läkemedel än i en normalpopulation av samma art och när fenomenet är ärftligt. Hos nematoder finns endast ett fåtal detektionsmetoder av anthelmintikaresistens beskrivna och testade. De är framför allt framtagna för strongylider hos idisslare samt hos häst. Riktlinjer för hur de skall utföras ges ut av World Association for the Advancement of Veterinary parasitology (WAAVP). Däremot finns det idag ingen validerad metod beskriven för askarider (spolmaskar). Trots detta finns konstaterad utebliven behandlingseffekt med ivermektin dokumenterad hos hästens spolmask (Boersema et al., 2002).

Sedan länge används faecal egg count reduction test (FECRT) som ”golden standard = gyllene standard” för bedömning av klinisk resistens hos nematoder. Metoden bygger på att man mäter behandlingseffekten genom att påvisa äggutskiljning före och efter avmaskning.

De detektionsmetoder som används för att påvisa nematodägg är relaterade till de olika arternas livscyklar och utvecklingsstadier och möjlighet till anpassning och överlevnad i olika miljöer. Detektionsnivån hos olika metoder varierar och påverkas av antal dagar för parasitens utveckling, uträkningsmodeller, hur lång tid det tar innan äggutskiljning startar efter behandling och hur framtagna data behandlas statistiskt. Även om det i dag finns aktuella studier över prevalensen av anthelmintikaresistens för askarider hos häst finns alltså ett behov av att ta fram validerade metoder.

Frågeställningar

- Vilka riktlinjer finns beskrivna för hur man skall gå tillväga för att utvärdera förekomst av resistens hos nematoder?
- Vilka möjliga detektionsmetoder och tillvägagångssätt kan föreslås för utprovning och validering även för askarider?

MATERIAL & METODER

Web of Knowledge:

”anthelmintic resistance”, methods, detection, nematodes, animals

Pub Med: resistance, anthelmintics, nematodes, animals

LITTERATURÖVERSIKT

Aktuella detektionsmetoder för anthelmintikaresistens enligt WAAVP

De metoder som används för att bedöma om nematoder hos olika djurslag uppvisar läkemedelsresistens finns beskrivna av World Association for Advancement of Veterinary Parasitology, WAAVP.

De är ursprungligen framtagna för detektion av anthelmintikaresistens hos strongylida nematoder hos får. Idag rekommenderas tre metoder och de kan delas in i *in vivo* test och *in vitro* test (Coles et al., 1992).

Till *in vivo* testerna hör dels ”faecal egg count reduction test” (FECRT) och dels ett kontrollerat test. Ett rekommenderat *in vitro* test finns beskrivet av WAAVP, nämligen ”egg hatch test” (EHT).

FECRT kan användas med alla sorters avmaskningsmedel och för alla strongylida nematoder som sprider sina ägg med avföringen. Testet finns beskrivet för idisslare, hästar och grisar (Coles et al., 1992).

Testet mäter graden av effekt hos maskmedel hos naturligt infekterade djur genom att man jämför antalet ägg som utskiljs innan avmaskning och efter behandling. Detta görs genom att först ta ett avföringsprov vid eller strax innan behandling och sedan, beroende på substans, 10-14 dagar därefter. En oavmaskad kontrollgrupp bör ingå i testet men är detta inte möjligt går det att använda äggutskiljningen före avmaskningen som kontroll. Undersökningar har visat att FECRT har sina begränsningar (Pook et al., 2002).

För detektion av anthelmintikaresistens hos parasiter hos katt och hund finns det idag dessvärre inga riktlinjer avseende detektionsmetoder för anthelmintikaresistens beskrivna. Ytterligare ett problem med FECRT är kopplat till testets känslighet då det visat sig att mer än 25 % av parasiterna måste vara resistenta för att resultatet skall anses säkert (Martin et al., 1989).

Ett kontrollerat test där antalet överlevande maskar påvisas efter behandling anses vara den säkraste detektionsmetoden, men den är alltför kostsam och tidsödande för att kunna användas som en rutindiagnostisk metod (Presidente., 1985).

Bland *in vitro* metoderna finns EHT beskriven, som ursprungligen utformades för kontroll av bensimidazolresistens hos strongylida nematodägg hos får. Behovet av färska maskägg och bristen på standardisering för nematoder hos olika djurslag har gjort metoden svåränvänd i fältstudier (Martin et al., 1989).

Studier in vivo

FECRT

FECRT anses vara den ”gyllene standarden” vid detektion av anthelmintikaresistans inom veterinärmedicinsk parasitologi. Metoden är den mest beprövade av de tre metoder som rekommenderas och finns beskriven av WAAVP. Metoden bygger i grunden på att det finns tillgång till kontroll- och fallgrupper som bör bestå av cirka 10-15 djur vardera och där varje djur bör utskilja fler än 100-150 ägg per gram träck (epg) för att kunna ingå i studien (Coles et al., 2006). Äggutskiljningen utförs vanligtvis med McMaster-metoden, som är en kvantitativ metod, där antalet ägg anges per gram träck. Äggantalet mäts dels en gång innan avmaskning, dels en andra gång 10-14 dagar efter avmaskningen. En minskning av äggutskiljning med ≤ 90 % hos undersökt nematodart tyder på resistens mot testat maskmedel. För får gäller FECRT ≤ 95 % och med ett nedre konfidensintervall (LCL) på ≤ 90 % (Coles et al., 1992). Att få ihop en tillräckligt stor grupp att studera är ofta ett problem i små besättningar. Det kan då bli nödvändigt att avstå från en oavmaskad kontrollgrupp och istället använda äggutskiljningen innan avmaskning som kontroll. Pook et al. (2002) använde i sin studie på små blodmaskar (cyathostominae) hos häst, en gruppstorlek med minst fyra djur i både fall- och

kontrollgrupperna. Det finns dock ingen standardiserad gruppstorlek för FECRT angiven för andra djurslag än små idisslare vid test på strongylider där en gruppstorlek på minst tio djur rekommenderas. Olika modifierade FECR metoder har testats för att komma tillrätta med problematiken med den låga detektionsnivån hos testet i små besättningar. Variationen i äggutskiljning kan vara stor mellan olika djur i en grupp vilket försvårar analysen och speciellt när små grupper undersöks. I studien av Pook et al. (2002) gjordes jämförelser av FECR med tre olika beräkningsmetoder:

- 1) den traditionella WAAVP metoden med en oavmaskad kontrollgrupp (Coles et al., 1992),
- 2) WAAVP metoden utan en ren kontrollgrupp,
- 3) i grunden som WAAVP metoden, men där man korrigerade äggreduceringen för fluktuationer i kontrollgruppen vid olika provtagningstillfällen (Martin et al. 1989). Studien av Pook et al. (2002) visar att vid undersökning av små besättningar är metod två det bästa alternativet för att detektera resistens. Färre avföringsprover behöver tas och konfidensintervallet blir snävare än med metod tre. Beräknat med ett gränsvärde för äggreduceringen på 90 % blev dock säkerheten för metod två lägre än hos metod ett och färre fall av resistens hittades. Studien visar på att metoderna som validerats av WAAVP behöver förbättras och utvärderas även för andra djurslag än små idisslare.

I studien av Pook et al. (2002) diskuteras om bevisad maskmedelseffekt skulle kunna ligga till grund för ett variabelt gränsvärde och ett lägsta konfidensintervall vid analysen av äggreduktionen hos häst. Med en högre bevisad effekt av maskmedlet skulle i så fall ett högre gränsvärde för äggreduktionen och en högre gräns för det lägre konfidensintervallet kunna användas då testet används för parasiter hos olika djurslag.

Om det var möjligt att variera brytpunktsvärdet inklusive konfidensintervallet, för varje testat maskmedel, kunde vi få mer specifika och sensitiva testresultat vid analyser av olika resistenstest.

Idag har WAAVP riktlinjer för användandet av konfidensintervall och ett gränsvärde för äggreduktionen på 95 % för strongylider hos får, medan motsvarande gränsvärde hos häst är 90 %. Problemet med avsaknad av fastställda standarder för gränsvärden gällande äggutskiljningen och ett lägsta konfidensintervall tas upp på ett bra sätt i en review av Kaplan (2002).

Kontrollerat test

Testet är ursprungligen framtaget av läkemedelstillverkare för att kontrollera effekten av olika anthelmintika på maskar som finns hos värddjuret. I likhet med FECRT är det en beprövad metod med etablerade riktlinjer enligt WAAVP (Jacobs et al., 1994). Även detta test genomförs med fall- och kontrollgrupper. Till skillnad från FECRT används ursprungligen oinfekterade parasitnaiva djur som sedan infekteras experimentellt med larver av den nematodart som skall undersökas. Maskmedlet testas därefter i doser av halv, enkel och dubbel dos för full effekt. Vid obduktion av djuren räknas och artbestäms alla parasiter i digestionskanalen. Testet är dock kostsamt, tidsödande och dessutom omöjligt att använda vid fältundersökningar. Då detta test bygger på att djuren obduceras är det inte användbart som en

rutinmetod på privata djur. Testets sensitivitet är dock hög och resistens anses konfirmerad om fler än 10 % av parasiterna i den avmaskade gruppen överlever behandlingen. Metoden används rutinmässigt inom läkemedelsindustrin men har även i vissa studier använts för att konfirmera resultat från FECRT och EHT och där man i fält sett tecken på att resistens föreligger (Presidente. 1985).

Studier in vitro

Här har jag valt redovisa tre metoder. Det är dels ”larval development assay” (LDA) som beskrevs för första gången av Hubert och Kerbouf (1992) dels ”egg hatch assay” (EHA) beskriven av LeJambre (1976) och även molekylärdiagnostik. De två först nämnda testerna bygger på att man *in vitro* exponerar nematodäggen för stigande koncentrationer av maskmedel i ett medium, dvs. vätska eller agar. Därefter beräknas letaldosen (LD50), dvs. den koncentration av läkemedel då 50 % av äggen eller larverna dör eller inte utvecklas. Med kännedom om olika arters LD50 kan man på så sätt få en uppfattning om ett isolat av en viss parasit uppvisar resistens. Molekylärdiagnostik som används idag görs via studier av mutationer som uppstår i maskgenom vilka är kopplade till mekanismer där maskmedlet har sin bindningsplats.

Av dessa tre metoder är i dag ingen användbar för detektion av resistens hos spolmask (askarider). De är dock validerade och utvärderade för ett flertal strongylidarter och viktiga verktyg vid testning av dessa nematoder.

Larval development assay (LDA)

Metoden finns i flera utföranden. En LDA-metod är ”microagar larval development test” (MALDT) (Coles et al. 2006). MALDT är i dagsläget endast tillförlitligt för strongylider hos får och hästar, vid testning av bensimidazoler och levamisol. En annan vidareutvecklad metod är Drenchrite® som i princip är ett LDA test, men som tagits fram för kommersiellt bruk. Med Drenchrite® går det att detektera anthelmintikaresistens för fyra olika anthelmintika; bensimidazoler (BZ), levamisol (LEV), avermektiner och en kombination av BZ och LEV (Lacey et al., 1991). Testet är i första hand framtaget för detektion av resistent strongylider hos små idisslare (dvs. får och get), för vilka det visat sig fungera tillfredställande. Drenchrite®-tekniken har även testats för resistensdetektion hos cyathostominer hos häst i olika försök. Detta dessvärre med sämre framgång och det kan därmed inte rekommenderas vid undersökningar för cyathostominer (Tandon & Kaplan., 2004). Även Osterman-Lind et al. (2005) har visat att LDA-testet inte var ett lika pålitligt verktyg som FECRT vid diagnos av klinisk resistens hos cyathostominer.

Egg hatch assay (EHA)

Äggkläckningsmetoden är ett test som beskrevs för första gången av LeJambre (1976). Denna *in vitro* metod är framtagen för att upptäcka BZ resistens hos olika strongylidarter. Äggen inkuberas i stigande koncentrationer av en BZ lösning. Om mindre än 50 % av äggen kläcks vid en benzimidazolkoncentration på 0.05ug per ml, dvs. letaldosen $LD_{50} \geq 0.05 \text{ug BZ/ml}$, tyder det på att resistens föreligger. Testet har dessvärre endast visat sig fungera hos nematoder vars ägg kläcks inom en vecka från det äggutsöndringen hos adult mask skett

(Obendorf et al., 1986) och det är ännu inte klarlagt om det kan användas för askarider som utvecklas inuti ägget.

De riktlinjer som rekommenderas av WAAVP har genom åren modifierats ett flertal gånger (Taylor et al., 2002). Exempelvis Coles (2005) föreslår att man i EHA endast skall använda sig av letaldosen av BZ. Om ägg överlever denna dos tyder det på att de är resistenta. På så sätt minskar arbetsinsatsen och användbarheten i fältstudier ökar, där många prover i regel måste undersökas. Genom ett internationellt samarbete har man tagit fram ett standardiserat protokoll för EHA som möjliggör att resultaten från olika laboratorier kan jämföras med varandra (von Samson-Himmelstjerna et al., 2009).

Flera jämförande studier har gjorts mellan FECRT, LDA och EHA för att kunna värdera användbarheten och säkerheten hos respektive test hos olika nematodarter från olika djurslag. FECRT är ofta den metod som har använts som riktmärke eller den ”gyllene standarden” vid dessa jämförelser.

Molekylärdiagnostik och möjliga mekanismer

Idag är de molekylära mekanismerna för resistens bäst beskrivna för bensimidazoler. Bensimidazoler förhindrar bildningen av mikrotubulin vilket stoppar celledelningar vilket i sin tur stör maskarnas tillväxt. Den viktigaste och mest studerade förändringen vid BZ-resistens är en punktmutation i nukleotidposition 200 hos betatubulingenen, som utgör själva bindningsstället för bensimidazoler (Kwa et al., 1994). Uppkomst av resistens sker i de fall betatubulingenens uttryck förändras till följd av denna mutation. Mutationen i den gen som satts i samband med BZ resistens finns beskriven hos flera strongylida nematoder. En sammanställning av Wolstenholme et al (2004) visar dock att fler gener än just denna är involverade vid uppkomst av resistens. En annan gen som framförallt studerats är *pgp*-genen som kodar för ett membranbundet glykoprotein som är involverat i uttransporten av maskmedel över cellmembranet.

Vid molekylärdiagnostik av kodon 200 mutationen extraheras mask-DNA varefter man med PCR-metodiken uttrycker gen- och allelfrekvensen hos mutationen ifråga. Användbarheten hos molekylärdiagnostiken är fortfarande begränsad till *Haemonchus contortus* hos får. Den sträcker sig idag till att vara behjälplig med att hitta resistenta maskar om utskiljningen av ägg är låg och kan då ge ett mer rättvisande svar än FECRT (Höglund et al., 2009).

Metoder användbara för askarider

Vid studier för kontroll av läkemedelsresistens hos spolmaskar, har utebliven effekt av makrocycliska laktoner tills idag endast konstaterats hos hästens spolmask *Parascaris equorum*, såväl i Sverige som i andra delar av världen (Boersema et al., 2002; von Samson-Himmelstjerna et al., 2007; Lindgren et al., 2008; Osterman-Lind & Christensson., 2009). Enligt dessa studier fungerar däremot både bensimidazoler och pyrantel fortfarande tillfredsställande. I de allra flesta fall uppmättes fullgod behandlingseffekt och

äggutskiljningen minskade med 90-100 %. Vilket uppmättes mha FECRT som utfördes 7-21 dagar efter utförd avmaskning.

FECRT är den enda gängse metod som tills idag har använts för kontroll av effekten hos maskmedel på askarider. För hästar har modifierade metoder av den grundläggande metoden av Coles et al (1992) gjorts och i många studier har man tillämpat en utvecklad metod utan särskilda kontrollgrupper (Pook et al., 2002; Åman., 2008). FECRT är dock ännu inte validerad för askarider men anses trots detta fungera tillfredställande med vissa tillkortakommanden som låg sensitivitet.

I en studie på hundens spolmask *Toxocara canis* kontrollerades effekten av den makrocycliska laktonen eprinomectin (Kozan et al. 2007). I försöket ingick 20 hundar som samtliga var naturligt infekterade med *T. canis*. Hundarna delades in i fall- respektive kontrollgrupper, varefter försöket utfördes med FECRT-metoden enligt WAAVP's riktlinjer för detektion av anthelmintikaresistens hos strongylida nematoder för får och häst. Effekten av maskmedlet var i samtliga fall 100 %, vilket indikerar avsaknad av resistens.

Anpassningar av befintliga diagnosmetoder till askarider

För att bättre kunna dra nytta av de befintliga detektionsmetoderna måste man även ha en förståelse hur resistens uppkommer, samt hur den kan hittas, övervakas och fördröjas.

I en studie av Coles (2005) beskrivs detta på ett bra sätt. Hur fort resistens sprids och uppkommer bland maskar beror på andelen oselekerade maskar i *refugia*, dvs. den del av maskpopulationen som finns i den omgivande miljön vid behandlingstillfället. Hur stor olikheten inom genomet är hos samma maskart är en annan viktig faktor. Mutationen kan ha skett på receptorer som påverkar maskmedlets verkan och till vilken grad anlaget uttrycks beror även på om anlaget är dominant eller recessivt.

Kunskapen om hur tillförlitliga och sensitiva testmetoderna är och hur stora provgrupper som behövs är viktigt vid val av detektionsmetod, dataanalys och fastställande av gränsvärden. Övervakningen av förekomst och spridning av resistent maskpopulationer sker lämpligast med kontinuerliga prevalensstudier och befintlig kunskap i hur spridningen kan fördröjas.

Standardiserade test

Validering av FECRT för askarider är viktigt för att förbättra säkerheten vid utförandet. Det behöver även utarbetas en bättre standard kring hur analyserna skall genomföras och bearbetas statistiskt hos olika djurslag.

Exempelvis så är beräkningen av antal ägg som utskiljs med träcken avgörande för vilka djur som ska ingå i studien. I studier med på *P. equorum* (Åman., 2008; Osterman-Lind & Christensson., 2009) användes en varierad skala, för förekomst av ägg, på 100-200 epg för att få ingå i studier, medan Reinemeyer (2009) föreslår ett minimikriterium på ≥ 200 epg för att få ingå i studier på *P. equorum*.

Även hur förekomsten av spolmaskinfektion bedöms är av betydelse. Normalt sker räkning av spolmaskägg med McMaster-metoden. Tex använder SVA metoden men bedömer resultaten av förekomst av ägg enligt en 3-gradig skala; lindrig <500, måttlig ≥ 500 och kraftig ≥ 1500 epg (Åman., 2008). Denna grova indelning är inte så lyckad och med en standardisering av testet eller med ett mer sensitivt test skulle analysvaret kunna bli mer exakt.

FECPAK, t.ex., som har lanserats som en ny äggräkningsmetod för strongylida ägg, anses mer sensitiv än McMaster-metoden och finns som ett kommersiellt kit. I metoden används mer träck än vid McMaster-räkningen och ingen centrifugering behövs, vilket är fördelaktigt i fält (Presland et al., 2005).

Egg reappearance period (ERP)

I en studie av von Samson-Himmelstjerna et al. (2007) beskrivs ERP som ett möjligt verktyg för att detektera resistens då man såg en uppgång av äggutskiljningen redan fem veckor efter avmaskning hos cyathostominer som normalt haft en ERP på minst nio veckor.

ERP bestäms av prepatensperioden för olika maskarter. Tiden från avmaskning tills det att äggutskiljningen ökar, varierar mellan maskarter och ibland även hos olika djurslag. Vid angivelse av ERP bör man vara uppmärksam på att detektionsnivån för antalet ägg varierar mellan olika studier.

Matematiska beräkningsmodeller

En ökad sensitivitet och säkerhet vid användandet av FECRT kan även uppnås genom att data från försök och tester analyseras med andra matematiska tekniker än de som vanligtvis används idag. FECRT kan antingen beräknas genom att använda det aritmetiska eller det geometriska medelvärdet. Även beräkningen av spridningen kring medelvärdet kan beräknas på olika sätt. Exempelvis, i Torgerson et al. (2005) sker beräkningen med en ”binomial negativ statistik modell” för att kunna detektera anthelmintikaresistens med ökad säkerhet.

DISKUSSION

En tidig upptäckt av resistens hos en maskpopulation är viktig så att lämplig behandling ska kunna sättas in snabbt vilket möjliggör ett effektivare arbete för att förhindra spridningen av resistent populationer än vad som annars är möjligt.

En grundförutsättning för att kunna bedriva en effektiv övervakning av anthelmintikaresistens är att prevalensstudier utförs av dels förekomst av maskinfektioner och dels på resistensstatus hos maskar i olika djurpopulationer.

Det är viktigt att kunna utläsa om genetisk betingad resistens föreligger eller om bristande eller helt utebliven behandlingseffekt har andra orsaker som exempelvis ett stort läkemedelsupptag, dåligt utförd avmaskning, förekomst av tarmpassanter eller dylikt.

Med kunskapen från prevalensstudier kan orsakerna till resistens undersökas och utredas. Möjliga orsaker kan t.ex. vara brister i djurhållningen eller att rådgivningen för maskmedelsanvändning inte har efterlevts.

Kännedom om frekvensen av resistent maskar i populationer, antalet parasiter i *refugia*, möjlighet för resistent stammars överlevnad i normalfaunan och om resistensen består av ett dominant eller recessivt anlag hos masken, hjälper också till då studier av prevalens och resistens skall genomföras (Coles., 2005).

Efter att ha utrett orsakerna kan rätt strategi utformas för att fördröja spridningen av resistent isolat. Exempel på sådana strategier är att ordna karantän för nya djur i en besättning eller att upprätthålla en *refugia* av oselektade frilevande stadier av parasiten i miljön (Coles., 2005). Det är också viktigt att de som konsulteras eller är rådgivande vid en maskinfektion, är uppmärksamma på vilka varningssignalerna är och har en tillräcklig kunskap om maskarnas prepatens, ERP, förväntad verkningsgrad för maskmedlet och hur resultatet från testet ska analyseras.

De genetiska mekanismerna för resistens är fortfarande i stort sett okända hos askarider och behöver utredas ytterligare. Resistensen hos maskar kan uppkomma genom olika förändringar i maskgenomet som leder till att bindningsstället för maskmedlet förändras. Resistens kan även uppstå till följd av ändrad metabolism eller transport av maskmedlet (Wolstenholme et al., 2004).

Mot bakgrund av de studier som gjorts för detektion av resistens för olika maskmedel och maskarter, framträder det tydligt hur bristfälligt uppbyggda riktlinjerna är för många detektionsmetoder liksom att avsaknaden av anpassning till olika maskarter är stor. För studier av askarider saknas exempelvis stöd i de riktlinjer som presenteras av WAAVP (Coles et al 1992). Det finns därmed inga vedertagna riktlinjer för att bedöma om anthelmintikaresistens verkligen förekommer hos spolmaskar som infekterar våra sällskapsdjur. Inte heller hos häst är metoderna systematiskt utprovade för askarider.

Av de fåtal studier som trots allt gjorts på askarider framgår det med all önskvärd tydlighet att FECRT behöver utvärderas vidare och att riktlinjer för hur metoden skall användas bör upprättas för fler djurslag. De gränsvärden som används för FECRT i askaridstudier idag, med ett gränsvärde på 90-95 %, och valet att använda eller vara utan ett konfidensintervall är ej hållbart i längden.

De förbättringar man möjligen direkt skulle kunna göra för tester på askarider skulle kunna vara att äggräkningar utförs med fler upprepningar än vad som anses tillräckligt idag för att utreda om tiden för ERP förkortats efter avmaskningen vilket indikerar föreliggande resistens (von Samson-Himmelstjerna et al., 2007).

Det vore också intressant att genomföra ett FECRT för askarider där man jämför utfallet med ett känsligare test och McMaster-metoden. FECPAK verkar lovande men det skulle först kräva testning och validering för askarider (Presland et al., 2005).

LITTERATURFÖRTECKNING

- Boersema, JH., Eysker, M., Nas, JWM. (2002). Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones. *Vet Rec*, 150, 279-281.
- Coles, GC; et al. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44, 35-44.
- Coles, GC. (2005). Anthelmintic resistance - looking to the future: a UK perspective. *Research in Veterinary science*, 78 (2), 99-108.
- Coles, GC., Jackson, F., Pomroy, WE., et al. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136 (3-4): 167-185.
- Hubert, J., Kerbouef, D. (1992). A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Parasitology*, 130, 442-446.
- Höglund, J., Lindgren, K., Ljungvall, Ö., Nilsson, O., Ljungström, B-L., Lindahl, C. (2008). *Parascaris equorum* in foals and in their environment on a Swedish stud farm, with notes on treatment failure of ivermectin. *Vet Parasitol*, 151, 337-343.
- Höglund, J., Gustafsson, K., Ljungström, B-L., Engström, A., Donnan, A., Skuce, P. (2009). 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 β -tubulin gene. *Veterinary Parasitology*, 161, 60-68.
- Kaplan, R.M. (2000) Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Vet. Res.* 33, 491-507.
- Kozan, E., Sevimli, FK., Birdane, FM., et al. (2008). Efficacy of eprinomectin against *Toxocara Canis* in dogs. *Parasitology Research*, 102(3), 397-400.
- Kwa, M.S.G., Veenstra, J.G., Roos, M.H. (1994). Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 63, 299-303.
- Le Jambre, L.F. (1976). Egg hatch as an in vitro assay of thiabendazole resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology*, 2, 385-391.
- Lind, EO., Uggla, A., Waller, P., et al (2005). Larval development assay for detection of anthelmintic resistance in cyathostomins of Swedish horses. *Veterinary Parasitology*, 128 (3-4), 261-269.
- Lind, EO., Christensson, D. (2009). Anthelmintic efficacy on *Parascaris equorum* in foals on Swedish studs. *Acta Veterinaria Scandinavia*, 51, 45.
- Lindgren, K., Ljungvall, Ö., Nilsson, O., Ljungström, B-L., Lindahl, C., Höglund, J. (2008). *Parascaris equorum* in foals and in their environment on a Swedish stud farm, with notes on treatment failures of ivermectin. *Veterinary Parasitology*, 151, 337-343.
- Martin, P.J., Anderson, N., Jarrett, R.G. (1989). Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. *Australian Veterinary Journal*, 66, 236-240.

- Obendorf, DL., Parsons, J., Nicholls, J. (1986). An egg development test for the evaluation of benzimidazole resistance in *Nematodirus spathiger*. *Australian Veterinary Journal*, 63(11), 282-383.
- Pook, JF., Power, ML., Sangster, NC., Hodgson, JL., Hodgson, DR. (2002). Evaluation of tests for anthelmintic resistance in cyathostomes. *Veterinary Parasitology*, 106, 331-343.
- Presidente, PJA. (1985). Methods for detection of resistance to anthelmintics. *Resistance in nematodes to anthelmintic drugs*. sid 13-27.
- Presland, SL., Morgan, E.R., Coles, GC. (2005). An improved method for counting nematode eggs in equine faecal samples. *Veterinary Record*, 156, 208-210.
- Prichard, R.K., Hall, C.A., Kelly, J.D., Martin, I.C.A., Donald, A.D. (1980). The problem of anthelmintic resistance in nematodes. *Australian Veterinary Journal*. 56, 239–250.
- Reinemeyer, CR. (2009). Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*. *Parasites & Vectors*, 2, S8.
- Tandon, R; Kaplan, RM. (2004). Evaluation of a larval development assay (DrenchRite®) for the detection of anthelmintic resistance in cyathostomin nematodes of horses. *Veterinary Parasitology*, 121 (1-2), 125-142.
- Taylor, MA; Hunt, KR; Goodyear, KL. (2002). Anthelmintic resistance detection methods. *Veterinary Parasitology*, 103 (3), 183-194.
- Torgerson, PR; Schnyder, M; Hertzberg, H. (2005). Detection of anthelmintic resistance: a comparison of mathematical techniques. *Veterinary Parasitology*, 128 (3-4), 291-298.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Fritzen, B., Demeler, J., et al. (2007). Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms. *Veterinary Parasitology*, 144 (1-2), 74-80.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Coles, GC., Jackson, F., Bauer, C., Borgsteede, F., Cirak, VY., Demeler, J., Donnan, A., Dorny, P., Epe, C., Harder, A., Hoglund, J., Kaminsky, R., Kerboeuf, D., Kuttler, U., Papadopoulos, E., Posedi, J., Small, J., Varady, M., Vercruyssen, J., Whirtherle, N. (2009). Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitology research*, 105 (3), 825-834.
- Wolstenholme, A.J., Fairweather, I., Prichard, R., von Samson-Himmelstjerna, G., Sangster, N. (2004) Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol.* 20, 469–476.
- Åman, A. (2008). *Riktad avmaskning mot spolmask på föl*. Examensarbete veterinärprogrammet. Uppsala. Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap.