

# Urea för kontroll av hästens små blodmaskar

Effekter på kläckning och larvutveckling

## Fighting small strongyles with urea

Effects on egg hatching and larval development



*Karin Klensmeden*

*Uppsala*

*2020*



# Urea för kontroll av hästens små blodmaskar

## Effekter på kläckning och larvutveckling

# Fighting small strongyles with urea

## Effects on egg hatching and larval development

*Karin Klensmeden*

**Handledare:** *Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

**Examinator:** *Giulio Grandi, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0869

**Kursansvarig institution:** *Institutionen för kliniska vetenskaper*

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2020

**Elektronisk publicering:** <https://stud.epsilon.slu.se>

**Omslagsillustration:** *Fotografi taget av Karin Klensmeden*

**Illustrationer och figurer:** *Karin Klensmeden*

**Nyckelord:** *blodmask, häst, parasiter, urea, strongylider, ägg, kläckning*

**Key words:** *Strongyles, horse, parasites, urea, egg, hatching*

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
**Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap



## SAMMANFATTNING

Små blodmaskar, cyathostominer, är en grupp av endoparasiter som förekommer hos så gott som alla hästar. Vanligtvis orsakar detta inte några symptom, men i vissa fall kan det leda till kolik, avmagring, och diarréer, ibland med dödlig utgång. Blodmaskar har en direkt livscykel, där äggen kommer ut på betet i träcken. Där kläcks de och utvecklas till L3-larver, som hästen sedan får i sig när den betar. Kontrollen av blodmaskar har hittills främst byggts på administration av avmaskningsmedel, vilket resulterat i att resistens mot flera avmaskningsmedel påvisats. Därför undersöks nu metoder för att angripa de frilevande stadierna. Ett fåtal tidigare studier har visat att urea verkar hämmande på kläckning och utveckling av bl.a. *Trichostrongylus colubriformis* hos får och nematoder hos häst, samt minskad rörlighet hos L3-larver av *Haemonchus contortus*. I detta arbete undersöks effekten av urea på kläckning och larvodling av små blodmaskar.

I försök A undersöktes ureas effekt på kläckning, genom att en lösning av framrenade strongylidägg blandades med urealösning till koncentrationer av 0 %, 6 %, 12 % respektive 18 % urea och inkuberades i 25 °C i två dygn, innan antalet larver och okläckta ägg i respektive brunn räknades. Resultatet visar att andelen kläckta ägg minskade med ökande ureakoncentrationer. I kontrollerna kläcktes i medeltal 76,5 % av äggen, att jämföra med 36,1 %, 24,8 % respektive 0,6 % kläckning i 6 %, 12 % respektive 18 % urealösningar.

I försök B undersöktes ureas effekt på larvodling. 50 g träck blandades med 10 g vermikulit och 50 ml vätska bestående av kranvatten blandat med urea till koncentrationer på 0 %, 6 %, 12 % respektive 18 %. Efter 12–14 dagars inkubation skördades och räknades de L3-larver som vandrat ut på fatet. Inga L3-larver vandrade ut på fatet vid skörd från odlingarna som var exponerade för urea, att jämföra med i medeltal 81 789 L3-larver per odling i kontrollerna.

Dessa resultat ligger i linje med vad som tidigare påvisats. Urea hämmar kläckning av ägg samt utveckling till larvstadie 3 *in vitro*. Försöken utfördes dock med direkt exponering för urea under konstant temperatur (25 °C respektive rumstemperatur) och i begränsat luftutrymme. Det skiljer sig därmed väsentligt från förhållanden i fält, där ägg och tidiga larvstadier ligger skyddade inuti träckhögar, och väder och vind kan interferera med ureabehandlingen. Alltför höga doser urea kan inte heller användas på betet av miljöskäl.

## SUMMARY

Small strongyles are a group of parasites infecting nearly all grazing horses. Most horses do not show any clinical signs of infection, but in some cases signs such as unthriftiness, colic, and/or diarrhea, sometimes fatal, can be encountered. Strongyles have a direct life cycle where eggs are shedded on pasture by infected horses, hatch, and develop to the infectious L3 larvae which in their turn are ingested by the grazing horse.

The control of strongyles have been heavily relying on administration of anthelmintics. However, resistance against several anthelmintic drugs is an emerging problem. Thus methods targeting the free-living stages of strongyles are under investigation. A small number of studies have found urea to inhibit egg hatching and larval development of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep and horse nematodes, and reduced motility in *Haemonchus contortus* L3 larvae. This assay investigates the effect of urea on hatching and larval development of small strongyles in the horse.

Trial A evaluated the effect of urea on egg hatching. Small strongyle eggs were mixed with tap water and urea to concentrations of 0%, 6%, 12% and 18% urea, respectively. The number of unhatched eggs and larvae were counted after a two-day incubation in 25 °C. The percentage of hatched larvae declined from 76.5% in the controls to 36.1%, 24.8% and 0.6% in solutions of 6%, 12% and 18% urea.

Trial B was a larval development assay. Samples consisted of 50 g horse manure, 10 g vermiculite and 50 ml tap water mixed with urea to concentrations of 0%, 6%, 12% or 18%. After a 12–14 day incubation L3 larvae were recovered and counted. In this assay, no L3 larvae were recovered from any of the samples exposed to urea. Conversely, a mean of 81 789 larvae were recovered from each control.

These results are in line with what has been shown in previous studies. Urea inhibits egg hatching and larval development of small strongyles. These designs were conducted with direct exposure to the eggs with urea in constant temperature (25 °C and room temperature, respectively), and in containers with limited airflow. This composes a substantial disparity from field conditions, where eggs and larvae are protected within heaps of manure and weather conditions may interfere with urea treatment. It is also unknown whether a possibly effective dose falls within the guidelines set to avoid over-fertilization.

# INNEHÅLL

INLEDNING .....	1
LITTERATURÖVERSIKT .....	2
<i>Små blodmaskar</i> .....	2
<i>Livscykel</i> .....	2
<i>Klinisk betydelse</i> .....	2
<i>Frilevande stadier</i> .....	3
<i>Avmaskning och resistens</i> .....	3
<i>Alternativa åtgärder</i> .....	4
<i>Kvävegödsel och nematoder</i> .....	5
MATERIAL OCH METODER .....	6
<i>Insamling av träck</i> .....	6
<i>Räkning av ägg</i> .....	6
<i>Framrening av ägg</i> .....	6
<i>Försök A – Ureas effekt på kläckning av blodmaskägg</i> .....	7
<i>Försök B – Ureas effekt på larvodling</i> .....	7
<i>Statistik</i> .....	9
RESULTAT .....	10
<i>Försök A – Ureas effekt på kläckning av blodmaskägg</i> .....	10
<i>Försök B – Ureas effekt på larvodling</i> .....	12
DISKUSSION .....	14
<i>Försök A</i> .....	14
<i>Försök B</i> .....	14
<i>Kan detta tillämpas i praktiken?</i> .....	15
<i>Potentiella bieffekter</i> .....	16
<i>Konklusion</i> .....	16
POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING .....	16
<i>Små blodmaskar</i> .....	17
<i>Hur minskar vi smittan?</i> .....	17
<i>Försök A</i> .....	17
<i>Försök B</i> .....	18
<i>Kan detta användas i praktiken?</i> .....	18
REFERENSER .....	19





## INLEDNING

Hästens vanligaste parasiter är de små blodmaskarna (små strongylider). Dessa förekommer i varierande grad i tarmen hos nästan alla hästar. Vanligtvis ger detta inga symptom, men vid kraftig infektion kan drabbade hästar uppvisa nedsatt allmäntillstånd, avmagring, kolik och diarré.

Blodmaskäggen kläcks på betet. Där genomgår larverna sina första utvecklingsstadier innan de uppnår det infektiösa L3-stadiet. Hästen smittas av L3-larver när den betar på infekterad betesmark. L3-larver är hårdiga och kan övervintra på betet.

Historiskt har kontrollen av blodmaskar till stor del byggts på avmaskning av hästarna, vilket har resulterat i att de små blodmaskarna har utvecklat resistens mot flera avmaskningsmedel. För att motverka ytterligare resistensutveckling behöver därför andra metoder utvecklas för att hålla nere smittrycket. En tänkbar sådan är att angripa ägg och frilevande larvstadier på betet.

Flera studier (Howell *et al.*, 1999; Bennett, 2017; Cairns *et al.*, 2017) har visat att kvävehaltiga gödningsmedel såsom urea har en negativ påverkan på kläckning och larvöverlevnad för endoparasiter av flera djurslag. I detta arbete undersöks hur hästens små blodmaskar påverkas av exponering med urea *in vitro*.

Syftet är att fastställa vilken koncentration av urea som krävs för att hämma kläckning av strongylida ägg, samt att undersöka hur framodling till L3-larver påverkas av olika ureakoncentrationer. Detta skulle potentiellt kunna användas för att minska parasitsmitta på betet, vilket i så fall skulle ge ett minskat behov av avmaskningsmedel och därmed minskad resistensutveckling.

## LITTERATURÖVERSIKT

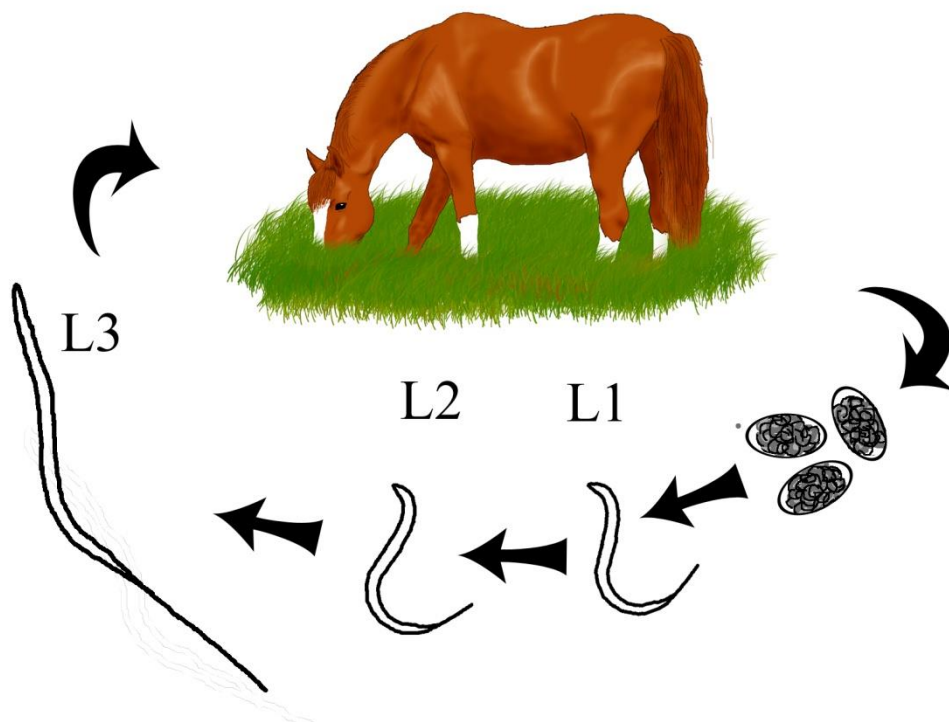
### Små blodmaskar

Hästens små blodmaskar, *Cyathostominae*, utgörs av ett 50-tal arter varav tio är allmänt förekommande. De små blodmaskarna förekommer hos nästan alla hästar, men parasitbördan är ofta högre hos unga hästar (SVA, 2018a). Det är inte ovanligt att hitta mer än tio arter i en enskild häst (ESCCAP, 2019). Små blodmaskar tillhör familjen *Strongylidae*. Till denna familj räknas även de stora blodmaskarna, *Strongylinae*. Strongyliderna ingår i sin tur i stammen nematoder, rundmaskar (Nielsen *et al.*, 2013).

### Livscykel

Blodmaskarna har en direkt livscykel, utan mellanvärdar. Ägg från de könsmogna maskarna kommer ut med träcken på betet och kläcks där till L1-larver. Larverna utvecklas vidare till L2-stadie och därefter till infektiösa L3-larver som hästen får i sig när den betar (figur 1).

Små blodmaskars L3-larver invaderar mucosan i framför allt caecum och ventrala colon, där de encystreras och utvecklas till L4-larver. L4-larverna tar sig sedan ut i tarmlumen, där de utvecklas till fullvuxna maskar. Utvecklingen från infekterande L3-larv till reproducerande mask tar ca 5-6 veckor. Larverna kan dock även gå in i ett vilostadium när de kapslats in i tarmväggen (s.k. inhiberade larver) och kan förbli vilande i flera år (Nielsen *et al.*, 2013).



Figur 1. Livscykel för små blodmaskar.

### Klinisk betydelse

Infektion med liten blodmask ger i de flesta fall inga symptom. I de fall kliniska tecken ses är de ofta ospecifika i form av dålig tillväxt, viktnedgång, nedsatt prestation, raggig päls och kolik (Uhlinger, 1990; Peregrine *et al.*, 2014; SVA, 2018a). Historiskt har små blodmaskar ofta

förekommit i blandinfektion med de mer patogena stora blodmaskarna, vilket gjort de små blodmaskarnas bidrag till klinisk sjukdom svårbedömd (Love *et al.*, 1999).

Ibland ses allvarlig sjukdom associerat till massutträde av larver från tarmmucosan (larval cyathostominos). Larval cyathostominos kan visa sig som akut eller kronisk diarré, avmagring, feber, och/eller ventrala ödem, och har ibland dödlig utgång. I Europa ses denna åkomma framför allt under vårvintern, vanligast hos unga hästar (Love *et al.*, 1999; Lyons *et al.*, 2000).

### **Frilevande stadier**

Utvecklingen av blodmasklarver på betet påverkas av yttre omständigheter. Kläckning av ägg sker från ca 8 °C och uppåt men mest gynnsamt för kläckning och utveckling är temperaturer runt 20–30 °C. Tiden för utveckling från ägg till L3-larv kan under laboratoriemässiga förhållanden med konstant gynnsam temperatur vara så kort som 48 timmar. Under fältmässiga förhållanden liknande svensk sommar är den dock ungefär 2–4 veckor (Rupasinghe & Ogbourne, 1978; Mfitlodze & Hutchinson, 1987; Ramsey *et al.*, 2004; Kuzmina *et al.*, 2006).

L1- och L2-larver lever i träckhögen där de äter organiskt material och bakterier. När larven utvecklas till L3 behåller den kutikulan från L2-stadiet och omsluts helt av denna (Reinemeyer, 1986). Den infektiösa L3-larvens extra kutikula skyddar larven från uttorkning, men hindrar den också från att äta (Nielsen *et al.*, 2013). Till skillnad från tidigare larvstadier gynnas L3-larven av en låg temperatur. Det tros bero på att larverna förbränner sina energidepåer snabbare vid varmare temperaturer vilket ger en kortare överlevnad. Fukt och regn underlättar för L3-larven att vandra ut på betet från träckhögen, men överlevnaden av L3 är god även i påtagligt torra träckbollar. L3-larven är också tålig mot frost och kan överleva vintern på betet. Ett skyddande snötäcke, konstant temperatur och skyddet av hela träckbollar är gynnsamt för överlevnaden, medan fluktuationer mellan frost och töväder påverkar larverna negativt (Nielsen *et al.*, 2007).

### **Avmaskning och resistens**

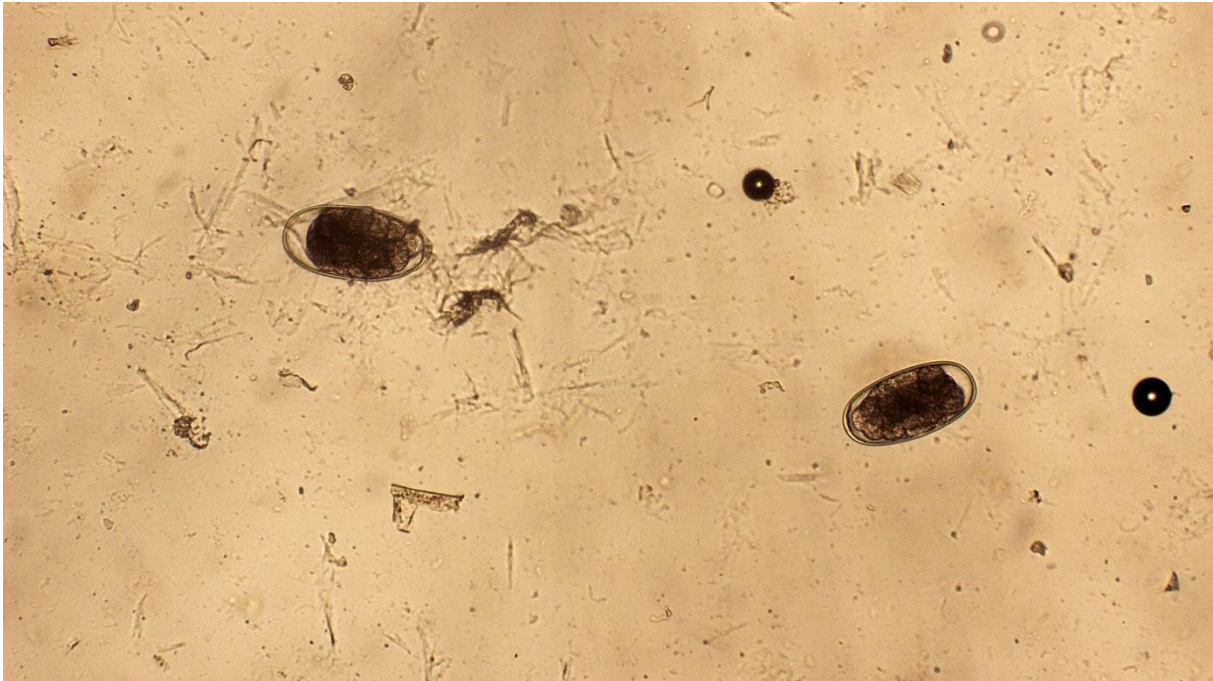
För avmaskning av häst används läkemedel av typerna benzimidazoler, pyrantel, samt makrocycliska laktoner. Dock är resistens mot benzimidazoler vanligt hos små blodmaskar. Resistens mot pyrantel har tidigare förekommit i USA där pyrantel givits i foder, men på senare tid har en ökad förekomst av pyrantelresistens hos små blodmaskar rapporterats även från Europa. Några studier tyder på förekomst av resistens mot makrocycliska laktoner på flera håll i Europa (Geurden *et al.*, 2014; Peregrine *et al.*, 2014). I Sverige påvisade Lind *et al.* (2007) resistens mot fenbendazol (benzimidazol) på 72 % av undersökta gårdar. I samma studie sågs även i ett fåtal fall nedsatt effekt av pyrantel. Ingen resistens mot ivermektin (makrocycliska laktoner) kunde påvisas.

För att fördröja utvecklingen av resistens spelar parasiterna i *refugium* en viktig roll. Refugian utgörs av larver på betet, encystrade larver som ej påverkas av avmaskningen, samt parasiter i hästar som ej avmaskas. Parasiter som inte exponeras för anthelmintika selekteras inte heller för resistens, och bidrar därmed till att bromsa resistensutvecklingen i en parasitpopulation (van Wyk, 2001; Kaplan & Nielsen, 2010).

Målet med avmaskning mot små blodmaskar är inte att helt utrota dem. I stället strävar man efter att hålla smittrycket på en låg nivå. Olika hästar är olika benägna att urskilja mycket ägg och därmed bidra till betessmitta. Det uppskattas att det är 20 % av hästarna som står för 80–

90 % av äggutskiljningen. SVA rekommenderar att man tar träckprov varje vår för att identifiera och avmaska de hästar som utskiljer mer än 200 EPG (ägg per gram träck) (SVA, 2018b; SVA, 2019). Genom att tillämpa selektiv avmaskning och behandla de individer som urskiljer mer än 200 EPG kan den totala äggurskiljningen i en grupp hästar sänkas med 96 %, samtidigt som mer än hälften av hästarna inte alls exponeras för avmaskningsmedel (Kaplan & Nielsen, 2010).

Då äggen från de små och de mer patogena stora blodmaskarna ej kan skiljas åt morfologiskt (figur 2) bör även larvodling utföras. Om stor blodmask påträffas rekommenderas avmaskning, oavsett mängd ägg i träcken (SVA, 2018b).



Figur 2. *Strongylida* ägg. Det går ej att morfologiskt skilja på ägg från stora och små blodmaskar.

### Alternativa åtgärder

Förutom farmakologisk behandling av värdjuret kan blodmasksmittan även hållas nere genom att vidta åtgärder mot de frilevande larvstadierna. Detta syftar till att hålla smittrycket på betet lågt. En metod för detta är att avlägsna ägg och tidiga larvstadierna innan de hunnit migrera ut på betet genom att mocka beteshagarna. En studie av Corbett *et al.* (2014) visade en minskad äggurskiljning i träcken hos åsnor på beten som mockades två gånger i veckan jämfört med omockat bete. Att smittrycket på betet minskar av mockning bekräftas av två examensarbeten (Thorolfsson Rainamo, 2018; Wilderoth, 2019). Dessa visade på minskad förekomst av larver på beten som mockades två gånger per vecka jämfört med beten som inte mockades.

SVA rekommenderar, förutom mockning av hagarna, att skilja på sommar- och vinterhagar. Tillräckligt stora arealer och tillräckligt med bete minskar risken att hästen betar nära träckhögar och därmed utsätts för parasiter. Unga hästar som är extra känsliga ska helst släppas på beten med låg eller obefintlig parasitbörda. Att låta betet vila från hästar gör att parasiterna hinner dö ut. Om möjlighet finns är det mest effektiva att låta betet vila ett helt år, men även att enbart låta betet vila under vår och försommar kan göra att många av de parasiter som finns kvar sedan föregående säsong hinner försvinna. Det går också att sam- eller växelbeta med

nötkreatur eller får för att minska smittrycket från respektive arts parasiter, samt få ett bättre betesutnyttjande (SVA, 2018c).

En ny metod för att angripa ägg och frilevande larvstadier är att utnyttja parasitdödande mikrosvampar, till exempel *Duddingtonia flagrans*. Svampsporer kan ges oralt och ympas därmed in i träckhögarna. Då dessa mikrosvampar fångar och dödar nematodlarver på betet motverkar detta att de betande djuren återinfekteras (Grønvold *et al.*, 1993; Hernández *et al.*, 2016). *Duddingtonia flagrans* är godkänd i Australien sedan 2018 (APVMA, 2018).

### **Kvävegödsel och nematoder**

Redan på 1960-talet föreslog Cameron & Gibbs (1966) att kvävehaltiga gödselmedel skulle kunna påverka parasiter, efter ett försök då lamm som gick på gödslad mark med hög djurtäthet hade mindre förekomst av *Trichostrongylus* *ssp.* jämfört med lamm på ogödslad mark med lägre djurtäthet. I denna studie sågs dock ingen effekt på andra endoparasiter. Det framgår inte av studien vilket/vilka gödningsmedel som använts.

Howell *et al.* (1999) undersökte hur L3-larver av *Haemonchus contortus* påverkades av olika kvävekällor *in vitro*. I denna studie exponerades L3-larver under fyra timmar för urea, ammoniumnitrat, kommersiell kvävehaltig flytgödsel, eller en kombination av urea och ammoniumnitrat. Dessa hade alla en påverkan på antalet orörliga larver; vid exponering med koncentrationer av de olika medlen motsvarande 18 g N/100 ml sågs 75,2–97,2 % orörliga larver. I kontrollerna låg andelen orörliga larver på 0,26–0,52 %.

Även kläckning av strongylidägg kan påverkas av kvävehaltiga gödselmedel. Cairns *et al.* (2017) fann att kläckningen av ägg från *Trichostrongylus colubriformis* hämmades av bl.a. urea. Effekten verkade vara oberoende av pH. Vidare studier av Bennett (2017) visade att liknande effekt kunde ses på nematoder från flera djurslag (bl.a. häst). Här sågs också att kläckning av *T. colubriformis* hämmades i högre grad vid exponering för salt- eller sockerlösningar av samma osmolalitet som 10 % urea. Den hämmande effekten av exponering för urea verkade vara tidsberoende och ej reversibel.

## MATERIAL OCH METODER

### Insamling av träck

Till studien användes färsk träck från tre hästar naturligt infekterade med små blodmaskar. Träcken samlades in från box på morgonen och användes samma dag. Förekomsten av strongylida ägg hos var och en av de tre hästarna kontrollerades vid varje tillfälle enligt metod beskriven nedan.

### Räkning av ägg

Förekomsten av ägg i träcken (EPG, ägg per gram träck) fastställdes genom att 3 g träck blandades med 42 ml kallt kranvatten. Blandningen filtrerades genom en sil med filterstorlek 150  $\mu\text{m}$ . Vätskan hälldes upp i flatbottnat rör som centrifugerades i 1500 RPM (revolutions per minute) i 3 minuter. Supernatanten sögs bort. Röret fylldes sedan upp till tidigare vätskenivå med mättad koksaltlösning. Efter noggrann blandning med pipett fylldes McMasterkammare med vätskan för räkning av ägg (figur 3). Noggrannheten var 1 ägg motsvarande 50 EPG.



Figur 3. Räkning av ägg enligt McMaster.

### Framrening av ägg

Träck finfördelades och blandades med vatten till flytande konsistens. Detta filtrerades i två omgångar, först genom en sil med filterstorlek 1,4 mm, därefter genom 150  $\mu\text{m}$ . Den filtrerade vätskan tappades upp på 50 ml falconrör. Dessa centrifugerades sedan så att äggen ansamlades i botten av röret. Supernatanten sögs bort. Rören fylldes sedan upp med mättad koksaltlösning och blandades noga. Därefter centrifugerades de igen så att äggen flöt upp till ytan. Förekomst av ägg i ytskiktet bekräftades i mikroskop. De översta 10 ml i varje provrör fördes sedan över till nya rör. Här blandades ägglösningen med kranvatten i förhållandet 1:1. Ytterligare en

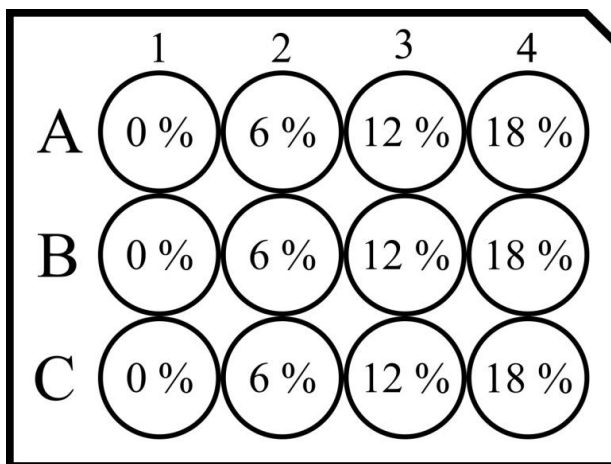


centrifugering utfördes. Supernatanten sögs bort så att den ägginnehållande bottensatsen samt vätska upp till ca 5 ml återstod i rören. Dessa sammanfördes sedan till ett rör. För att minska salthalten i ägglösningen tvättades äggen genom att röret fylldes upp med kranvatten och centrifugerades. Därefter sögs supernatanten bort och röret fylldes igen med nytt vatten. Totalt tvättades äggen på detta vis 3 gånger. Samtliga centrifugeringar skedde med 1500 RPM i 3 minuter.

Koncentrationen av ägg i lösningen fastställdes genom att efter noggrann blandning av lösningen räkna äggförekomst i 3 droppar à 10 µl, varpå ett medelvärde räknades ut. Lösningen späddes eller koncentrerades till en koncentration av 8–12 ägg per 10 µl.

### Försök A – Ureas effekt på kläckning av blodmaskägg

Till detta försök renades ägg fram enligt beskrivning ovan. Urea löstes i kranvatten till koncentrationerna 7,5 %, 15 %, samt 22,5 %. Dessa urealösningar förvarades i kylskåp under försökets gång. Kallt kranvatten användes som kontroll. I 12-brunnsplatta tillsattes 100 µl ägglösning samt 400 µl urealösning eller kontroll per brunn. Detta gav en total ureakoncentration på 0 %, 6 %, 12 % respektive 18 % i brunnarna. Plattan inkuberades 2 dygn i 25 °C. Vid avläsning räknades antalet ägg respektive antalet larver och därmed kläckningsratio per brunn. Delvis kläckta ägg exkluderades. Detta försök upprepades 4 gånger. Vid varje omgång användes två 12-brunnsplattor enligt figur 4 nedan. Detta gav totalt 24 brunnar per koncentration.



Figur 4. Ägg blandades med olika urealösningar i en 12-brunnsplatta.

### Försök B – Ureas effekt på larvodling

Träck från de tre hästarna blandades samman och finfördelades. Förekomsten av nematodägg räknades 3 gånger enligt ovanstående metod, och ett medelvärde räknades ut.

Därefter sattes larvodlingar som fick inkubera i rumstemperatur i 12–14 dagar. Till varje odling blandades 50 g träck, 10 g vermikulit och 50 ml vätska. Som vätska användes urea granula löst i kranvatten till en koncentration av 6 %, 12 %, eller 18 %. Rent kranvatten användes som kontroll. Odlingarna gjordes i plastburkar med lock. För att åstadkomma ett visst luftutbyte hade locken antingen hål, eller sattes på glänt. Vid varje försök sattes burkarna med odlingarna att inkubera i en fuktkammare i form av en plastback med ca 1–2 cm vatten på botten samt lock (figur 5).



Figur 5. Larvodlingar under inkubering i fuktkammare. På denna bild är locket avtaget.

Efter inkubering fylldes behållarna med larvodlingarna upp till brädden med ljummet kranvatten, täcktes med glasfat och vändes upp och ner. Faten fylldes på med 30 ml kranvatten. Odlingarna fick sedan stå ett dygn i rumstemperatur för att låta kläckta larver migrera ut på faten (figur 6).



Figur 6. Odlingar förbereds för skörd av larver.

Larver skördades genom att vätskan från respektive fat pipetterades över i 50 ml falconrör (figur 7). Dessa centrifugerades i 1500 RPM under 3 minuter så att larverna ansamlades i botten. Supernatanten sögs bort till dess att 10–20 ml återstod. Larverna i röret avdödades med 1–2 droppar jodlösning. Innehållet i varje rör blandades sedan noga och överfördes till McMasterkammare (150  $\mu$ l) där antal larver räknades. Antal skördade larver per odling uppskattades genom följande:



$$\text{Antal larver per odling} = \frac{\text{antal larver per 0,15 ml} \times \text{antal ml i provröret}}{0,15}$$



Figur 7. Vätska med skördade larver från odlingarna.

Detta försök upprepades 4 gånger. Vid varje omgång sattes 3 larvodlingar per koncentration.

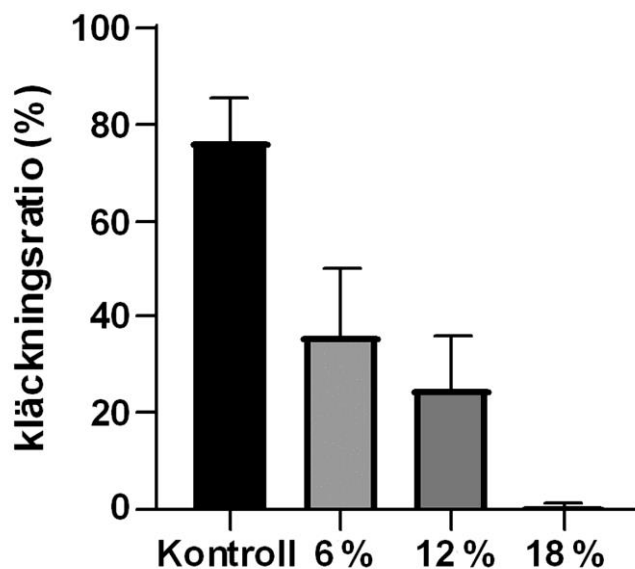
### Statistik

Statistik analyserades i Grafpad prism 8. Resultaten från försök A analyserades med one-way ANOVA; Kruskal-Wallis test, linjär trend, Tukey's multiple comparisons test, samt Dunnett's multiple comparisons test. Försök B analyserades med one-way ANOVA; Kruskal-Wallis test, linjär trend med Brown-Forsythe test och Bartlett's test, samt Dunn's multiple comparisons test.

## RESULTAT

Hästarna som bidrog med träck till studien urskilde under försökets gång strongylida ägg i nivåer varierande från 200 EPG till 2300 EPG. Den sammanblandade träcken som användes till såväl framrening av ägg som larvodlingar innehöll 1733, 1267, 1583, respektive 1533 EPG vid respektive replikation av försöken.

### Försök A – Ureas effekt på kläckning av blodmaskägg

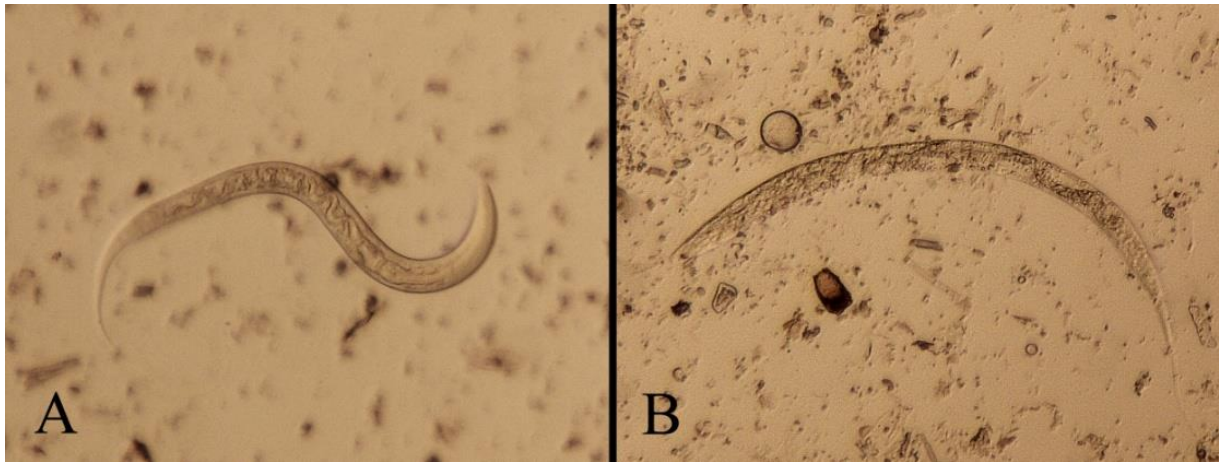


Figur 8. Kläckningsratio vid olika ureakoncentrationer jämfört med kontroll.

I detta försök visas hur exponering för urea påverkar kläckningsratio hos blodmaskäggen (figur 8). Kontrollerna uppvisade i medeltal en kläckningsratio på 76,5 %. I 6 % urealösning sjönk kläckningsration till 36,1 %. Ökande ureakoncentrationer på 12 % och 18 % gav en kläckningsratio på 24,8 % respektive 0,6 %. Tukey's multiple comparisons test visade signifikant skillnad mellan samtliga grupper. Signifikansen för skillnaden mellan 6 % och 12 % var  $p = 0,0011$ , för skillnaden mellan övriga grupper var  $p < 0,0001$ . Det ska hållas i åtanke att försöket ej var blindat, vilket medför risk för att konfirmationsbias påverkat resultatet i räkningen.

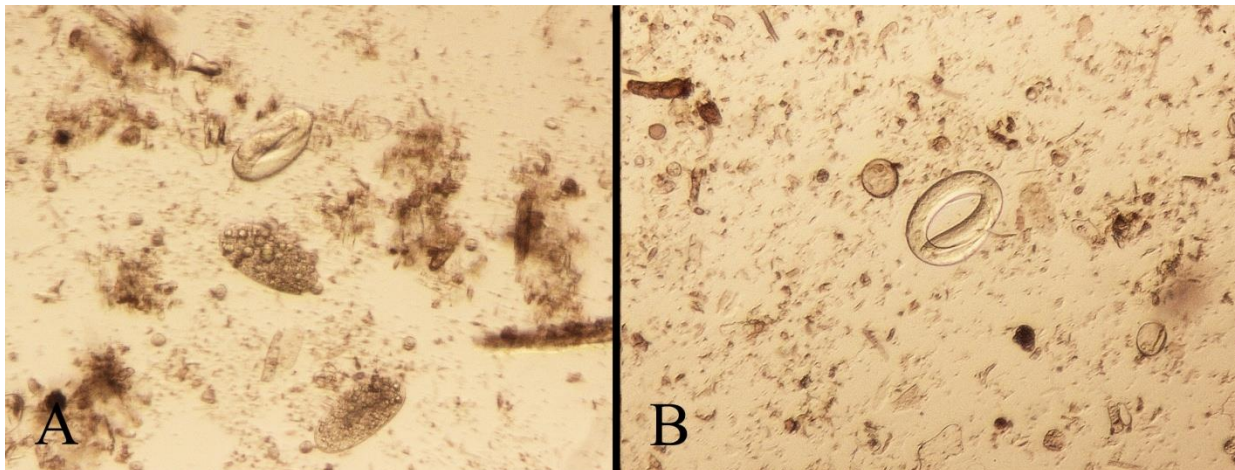
Värt att notera är att merparten av de kläckta larverna i kontrollerna levde och var mycket aktiva. I 6 % urealösning sågs en mindre mängd levande larver, både inuti ägg och kläckta. Vid 12 % och 18 % urealösning sågs inga livstecken alls.

Antalet räknade ägg och larver per brunn varierade mellan 53–120, i medeltal 82. Som kläckta larver räknades levande och döda strongylidlarver som fullständigt lämnat ägget (figur 9).



Figur 9. Levande (A) respektive död, degenererad (B) strongylidlarv. Notera den karaktäristiska svansen.

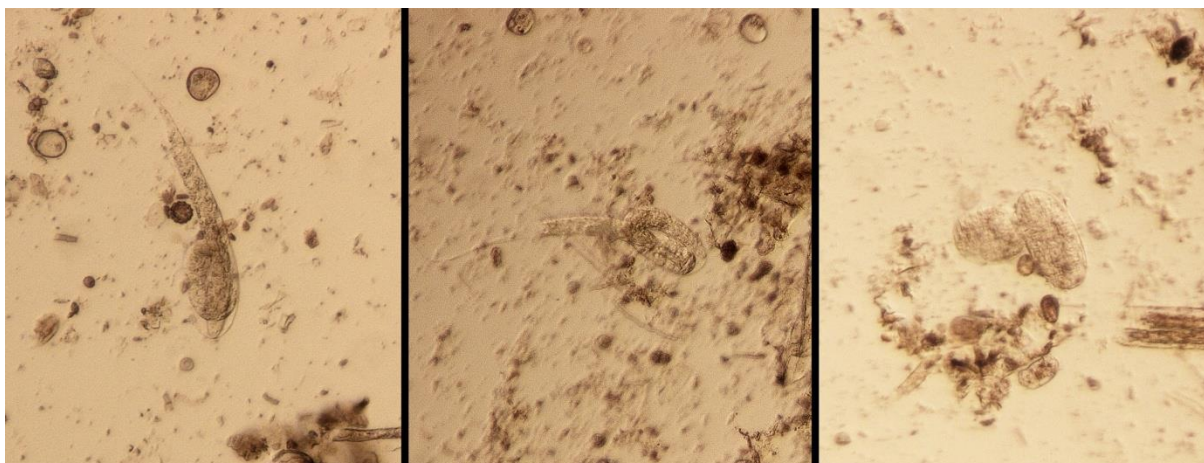
Som okläckta ägg räknades ägg med innehåll, oavsett om innehållet i fråga var en degenererad massa eller utvecklad larv. I några brunnar med 6 % urealösning sågs larver hoprullade över en större yta än ett normalt strongylidägg. Inget äggskal kunde urskiljas runt dessa, men då de rörde sig inom ett mycket begränsat, äggformat utrymme räknades dessa ändå som okläckta ägg (figur 10).



Figur 10. I (A) ses 3 okläckta ägg. Det övre ägget innehåller en välutvecklad larv. I de två nedre ser innehållet degenererat ut med en del gasbubblor. (B) visar en larv med begränsat rörelseutrymme, troligtvis inuti ett ägg.

Delvis kläckta larver och synbart trasiga ägg exkluderades helt. Ingen av dessa visade några livstecken. Det går inte att avgöra huruvida dessa representerar ägg som ej kunnat kläckas normalt, eller larver som dött då de exponerats för en ogynnsam miljö utanför ägget (figur 11).





Figur 11. Delvis kläckta larver och trasiga ägg exkluderades från resultatet.

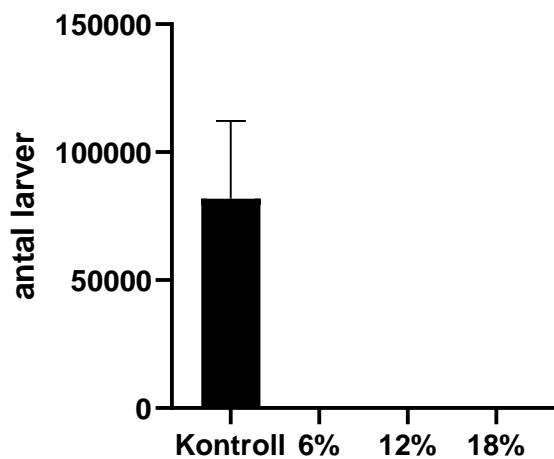
### Försök B – Ureas effekt på larvodling

I detta försök uppskattas mängden larver som kläckts, utvecklats till L3-stadium och migrerat ut på glasfatet. Endast en grov uppskattning av antal larver per odling fås, då larverna räknas i McMasterkammare (figur 12), men ej ligger i samma skärpeplan som kammarens begränsningslinjer. Det medför en viss godtycklighet i bedömningen av vilka larver som ligger inom de 150  $\mu$ l som beräkningen baseras på, samt en påtaglig risk för att de larver som ligger mellan två fält räknas dubbelt eller inte alls.

Detta till trots sågs en slående skillnad mellan kontrollerna och de övriga odlingarna; i medeltal uppskattades en skörd av 81 789 L3-larver från varje kontroll. I larvodlingarna med tillskott av 6 %, 12 % och 18 % urealösning skördades inga L3-larver alls (figur 13). Larverna som skördades från kontrollerna var mycket livliga. Inga stora blodmaskar identifierades.



Figur 12. Kontroll (A) jämfört med odling exponerad för urea (B).



Figur 13. Diagram över skördade L3-larver i kontroll jämfört med odlingar exponerade för urealösningar.

## DISKUSSION

Syftet med detta arbete var att fastställa vilken koncentration av urea som krävs för att hämma kläckning av hästens strongylida ägg, samt att undersöka hur framodling till L3-larver påverkas av olika ureakoncentrationer. Det har gjorts genom två delstudier som diskuteras nedan.

### Försök A

I försök A ses en dosberoende hämmande effekt på kläckning av strongylida ägg vid exponering för urea, där en ureakoncentration på 18 % nästan fullständigt hämmar kläckningen. Det noteras också en skillnad i larvöverlevnad, där larverna i kontrollerna generellt var mycket livliga. Ett antal larver visar livstecken i 6 % urealösning, medan inget sådant kan ses i 12 % eller 18 %. Utifrån detta kan man tänka sig två principiella verkningsmekanismer; antingen att äggen inte kläcks då dess invånare dött, eller att äggskallets strukturella egenskaper påverkats så att kläckning försvåras.

Observationerna av ett antal fullt utvecklade, rörliga larver som ser ut att befinna sig inuti ägg utan att kunna ta sig ur det kan indikera att urea åtminstone delvis påverkar själva äggskallet. Detta observerades enbart i ett fåtal av 6 %-brunnarna, och är således ett alldeles för litet underlag för att dra några säkra slutsatser. Liknande observationer gjordes dock av Bennett (2017) som beskriver förekomsten av utvecklade larver inuti de okläckta äggen vid 2 % och 5 % urea, men sjunkande med ökande ureanivåer.

I försöket av Bennett (2017) med nematodägg från häst uppvisades genomgående en högre kläckningsratio än i försök A. Exponering för 2 % och 5 % urealösning skiljde sig i detta försök inte från kontrollen (89 % kläckning). Vid exponering för 10 % respektive 20 % sjönk kläckningsration till 42 % respektive 16 %. Detta ska jämföras med att exponering för 18 % urea i försök A gav en kläckningsratio på endast 0,6 %. Det är möjligt att skillnader i framrening och tvättning av äggen påverkat kläckningsdugligheten, där Bennett (2017) efter flotation i mättad saltlösning sköljde äggen under rinnande vatten i 20 minuter. Det är också möjligt att artsammansättningen i försöken skiljer sig åt, då identifikation på artnivå av små blodmaskar ej utförts och larvskörden i Bennetts försök förutom *Cyathostomum spp* dessutom påvisade 15,6 % *Strongoloides westeri*.

### Försök B

I försök B påvisas enbart de larver som under 12–14 dagar kläckts, utvecklats till L3 och förflyttat sig ut på fatet där de skördas. Här ses att även en så låg koncentration som 6 % urealösning utblandad i lika mängd träck fullständigt förhindrar skörd av L3-larver. Detta ska jämföras med försök A, där 36 % av äggen kläcktes i 6 % urealösning. Flera av de kläckta larverna var vid liv i 6 %-lösningen då försök A avlästes efter två dygn. Det är därför intressant att inte en enda L3-larv kunde skördas vid de exponerade odlingarna i försök B. Detta trots att den totala ureakoncentrationen i odlingen var markant lägre än i försök A, då urealösningen i varje given koncentration här blandas med träck och vermiculit.

Detta kan tolkas som att ureas effekt på larver är tidsberoende. Larven utvecklas i ägget, kläcks och kan vara vid liv när försök A läses av, men överlever inte de 12–14 dagar som användes vid odlingarna. En annan möjlig tolkning är att det även är andra utvecklingssteg, dvs. från L1 till L2 eller från L2 till L3, som hämmas. Utifrån detta försök kan det inte avgöras hur stor, om någon, effekt urea har på de senare larvstadierna.

## Kan detta tillämpas i praktiken?

Huruvida applikation av urea på betet kan begränsa blodmasksmitta i praktiken kan inte besvaras i detta arbete. I försök A och B utsattes äggen för direktkontakt med urea, då urealösningarna blandades noga med ägglösning respektive finfördelad träck. Bennett (2017) studerade dock topikal applicering av urealösning, sprayad över 250 g homogeniserad hästräck spridd över en 30x21 cm bricka. I denna studie sågs att vid applicering av 200 kg N/ha eller mer sjönk antalet skördade larver med över 99 %. Detta motsvarar 2,75 g urea per 250 g träck, en betydligt lägre dos än i larvodlingarna i försök B. Där var lägsta dosen 50 ml 6 % urealösning per 50 g träck, vilket motsvarar 3 g urea per 50 g träck. I samma studie sågs dock att applikation av en låg dos urea, motsvarande 40 kg N/ha, gav upphov till en signifikant ökning av antalet skördade larver. Mekanismerna bakom detta är inte kända, men författaren föreslår att en låg dos kväve skulle kunna verka som proteinkälla för nematoder och mikroorganismer och på så vis göra klimatet i odlingen mer gynnsamt (Bennett, 2017).

*In vitro*-försök med finfördelad träck kan dock ej direkt jämföras med ägg och larver som ligger skyddade inuti intakta träckhögar. Träckbollar föreslås kunna fungera som reservoar och intermittent släppa ut L3-larver på betet (Nielsen *et al.*, 2007). Följaktligen bör ett medel för att begränsa betessmitta kunna avdöda/inaktivera L3-larver, och/eller tränga in i träcken för att där påverka de ännu ej kläckta äggen och tidiga larvstadier. I försök B kan effekten av urea på redan utvecklade L3-larver inte avgöras. Ett par studier tyder dock på att urea skulle kunna fungera även sett till dessa aspekter; L3-larver av *Haemonchus contortus* har visats påverkas negativt av kvävehaltiga gödselmedel (Howell *et al.*, 1999), och träckpellets från får som behandlats topikalt med 200 l/ha Flow-fert N (20 % urea) uppvisade en minskning av antalet skördade *Trichostrongylus colubriformis*-larver med 97 % (Cairns *et al.*, 2017). Å andra sidan fann Cabaret & Mangeon (1994) ingen effekt alls av urea vid applikation av 300 kg/ha på L3-larver av *Teladorsagia circumcincta*.

I försöken av Cairns *et al.* (2017), liksom hos Bennett (2017) och denna undersöknings försök B, har dock inkubationen av träck skett i någon typ av behållare med begränsat luftutbyte. Detta innebär att den ammoniak som bildas från tillsatt urea kvarhålls, och luftmiljön som omger larvodlingen får därmed mycket högre koncentration av ammoniak än vad som kan förväntas vid spridning av urea på betesmarker i det fria. Hur stor inverkan luftmiljön har på den uppvisade reduktionen av skördade larver är inte känt.

En annan påtaglig skillnad mellan dessa *in vitro*-försök och tillämpning i fält är temperatur. Larvodlingarna i försök B inkuberades i rumstemperatur (ca 20 °C) medan Cairns *et al.* (2017) och Bennett (2017) inkuberade sina odlingar i 26 °C. Detta ska jämföras med att meteorologisk sommar i Sverige infaller då dygnsmedeltemperaturen varaktigt är över 10 °C (SMHI, 2019). Att temperatur spelar roll för ammoniakbaserad inaktivering av *Ascaris suum*-ägg såg Nordin *et al.* (2009). I denna studie förkortades tiden för inaktivering av ägg fem gånger vid en temperatur av 34 °C jämfört med 24 °C i avföring behandlad med urea, vid samma ammoniakhalt och pH. I de obehandlade kontrollerna inaktiverades endast 7 % av äggen vid den högre temperaturen. Temperaturens påverkan föreslås här bero på att äggskallets lipidlager blir mer genomsläppligt vid högre temperaturer (Wharton, 1980).

Skillnader i temperatur innebär alltså ytterligare en faktor som kan bidra till att effekten som påvisats *in vitro* inte kan anses representativ för fältmässiga förhållanden. Det föreligger också en risk att regn späder ut eller sköljer bort behandlingen vid applikation av urea i fält.

## Potentiella bieffekter

Vid kvävegivor högre än optimum för grödan ökar urlakningen (Jordbruksverket, 2018). Kvävenedfall leder till försurning och övergödning, vilket skadar växt- och djurliv samt hotar den biologiska mångfalden (Naturvårdsverket, 2019). Det är därför inte lämpligt att sprida mer kvävehaltiga gödningsmedel än vad växtligheten på platsen faktiskt kan utnyttja. För betesvall rekommenderar Jordbruksverket 0–35 kg N/ha och avbetning, beroende på sammansättning av växtlighet på vallen. Total kvävegiva på betet ska helst inte överstiga 150 kg N/ha och år (Jordbruksverket, 2018). Detta ska jämföras med att Bennett (2017) fann att behandling med 40 kg N/ha ökade skörden av larver från hästräck, medan 200 kg N/ha nästan helt tillintetgjorde den. Försök B var inte utformat för att undersöka kg N/ha, men lägsta dosen urea per gram träck var högre än i Bennetts försök med 200 kg N/ha. Detta innebär att även den lägsta dos som visats ha god effekt på hästens strongylider *in vitro* ligger över Jordbruksverkets rekommendationer för årlig gödsling av betesmark. Det är dock inte omöjligt att effektiv hämning av larvutveckling kan uppnås med doser under 150 kg N/ha; detta är inte tillräckligt undersökt.

En ytterligare aspekt att ha i åtanke vid eventuell implementering av ureabehandling på bete är refugians påverkan på utvecklingen av anthelmintikaresistens. Syftet med behandlingen är att minska parasitbördan på betet genom att angripa de frilevande stadierna, vilket därmed minskar antalet larver i refugium. Nielsen *et al.* (2007) menar att avmaskning bör undvikas vid tidpunkter då refugian är liten, för att minska selektionen för resistent gener i parasitpopulationen. Följaktligen kräver tidpunkterna för eventuell behandling med urea respektive anthelmintika viss eftertanke, om dessa i framtiden ska kombineras.

## Konklusion

Exponering för urea har visats ha en hämmande effekt på kläckning och utveckling av strongylidlarver *in vitro*. Exponering för 6 % urealösning ger en signifikant reduktion av antalet kläckta ägg, och i 18 % urealösning kläcktes endast 0,6 % av äggen. Vid larvodling skördades inga larver alls från odlingar exponerade för urea. Många frågetecken återstår dock att rätta ut innan vi vet om betesbehandling med urea är tillämpligt i det förebyggande arbetet mot parasiter. Följaktligen krävs vidare studier i fält för att ta reda på effekten av urea a) vid topikal applicering på träckhögar, b) i icke slutna utrymmen, c) på de L3-larver som redan vandrat ut på betet vid applicering, och d) vid varierande temperatur och väderlek. Det måste också fastställas om en eventuell verksam dos är förenlig med god miljöhänsyn.



## POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Hästens små blodmaskar är en grupp mycket vanliga parasiter som ibland orsakar problem för hästens hälsa. I detta arbete undersöks hur behandling med urea påverkar kläckning och utveckling av de frilevande larvstadierna.

### Små blodmaskar

Små blodmaskar är hästens vanligaste parasiter, och så gott som alla betande hästar bär på dessa i varierande grad. Smittan sprids på betet genom att ägg kommer ut i avföringen från infekterade hästar. När äggen kläckts utvecklas larverna på betet i flera stadier, som kallas för L1, L2 och L3. L3 är det stadium som infekterar den betande hästen. Utvecklingen från ägg till L3-larv gynnas av värme, och om det är för kallt kläcks äggen inte alls. Vid normal sommartemperatur tar utvecklingen ca 2–4 veckor. När larven väl utvecklats till L3-stadiet klarar den både torka och kyla, och kan överleva en hel vinter på betet.

När L3-larven ätits upp av hästen kapslar den in sig i grovtarmens vägg, där den utvecklas vidare till L4-larv. Denna utveckling tar vanligtvis några veckor, men det är också möjligt för larverna att gå in i ett vilostadie och stanna i tarmväggen i flera år. Larverna tar sig sedan ut i tarmen igen och utvecklas till fullvuxna maskar som lägger nya ägg. Vanligtvis orsakar infektion med liten blodmask inte några symptom, men i vissa fall kan det leda till kolik, avmagring, och diarréer, ibland med dödlig utgång. Allvarliga diarréer uppträder framför allt i samband med att många L4-larver tar sig ut ur tarmväggen samtidigt. Detta kallas larval cyathostominos, och ses framför allt hos unga hästar på vårvintern.

### Hur minskar vi smittan?

Historiskt har kontrollen av små blodmaskar främst byggts på användning av avmaskningsmedel. Detta har dock inneburit att resistens mot flera avmaskningsmedel uppstått hos de små blodmaskarna. För att bromsa resistensutvecklingen är det viktigt att inte avmaska i onödan. Forskning har visat att det i en grupp hästar vanligen är ca 20 % av hästarna som står för 80 % av den totala äggutskiljningen. Rekommendationen från SVA (Statens veterinärmedicinska anstalt) är därför att ta träckprov varje år, och avmaska endast de hästar som faktiskt utsöndrar mycket parasitägg.

Ett annat sätt att minska blodmasksmitta hos häst är att försöka hålla smittrycket på betet lågt. Det finns flera olika metoder för detta. Det går t.ex. att mocka hagarna flera gånger i veckan, så att larver inte hinner utvecklas och vandra ut på betet. Ett annat sätt att minska parasitbördan på betet är att sam- eller växelbeta med andra djurslag.

Några studier har visat att gödningsmedel som innehåller kväve, t.ex. urea, kan hämma kläckningen av maskägg och utvecklingen av larver hos flera olika parasiter på flera djurslag. I detta arbete undersöks hur kläckning och larvutveckling hos hästens små blodmaskar påverkas av att exponeras för urea.

### Försök A

I försök A undersöktes ureas effekt på kläckning av blodmaskägg. Till detta försök renades ägg fram ur träck från naturligt infekterade hästar. Äggen blandades sedan med olika urealösningar till koncentrationer av 0 %, 6 %, 12 % och 18 % urea. Detta sattes i ett 25 °C varmt värmeskåp i två dygn. Därefter undersöktes de olika proverna i mikroskop för att räkna hur många ägg

respektive kläckta larver det fanns i varje prov. I detta försök sågs att ju mindre urea det var i proverna, desto fler larver kläcktes. I kontrollerna där det inte var tillsatt någon urea alls kläcktes i medeltal 76,5 % av äggen. I proverna med 6 % och 12 % urea kläcktes 36,1 % respektive 24,8 % av äggen, och i 18 % urealösning var det endast 0,6 % av äggen som kläckts. I det här försöket sågs även att de larver som kläckts i 12 % och 18 % urealösning var döda, medan nästan alla larver i kontrollerna levde. I 6 % var en del larver döda och en del levande.

## **Försök B**

I försök B undersöktes ureas effekt på larvodling. I det här försöket blandades hästträck med urealösningar, bestående av urea granula och vatten, i koncentrationer på 0 %, 6 %, 12 % eller 18 % urea. Odlingarna fick stå i rumstemperatur i 12–14 dygn så att äggen i dem skulle hinna kläckas och utvecklas till L3-stadiet. I det här försöket sågs att från de odlingar där träcken blandades med kranvatten skördades i medeltal 81 789 L3-larver per odling. Från de odlingar som blandats med 6 %, 12 % eller 18 % urealösning skördades inte en enda L3-larv. Det betyder att även om en del ägg kläckts i 6 % och 12 % urea, så klarar sig inte larverna tillräckligt bra för att utvecklas till L3-stadie.

## **Kan detta användas i praktiken?**

Dessa försök visar att både kläckning av ägg och överlevnad av larver hos små blodmaskar påverkas negativt av urea. Resultaten överensstämmer med vad andra författare påvisat i tidigare försök. Det är dock inte säkert att behandling med urea skulle fungera lika bra på betet som i de här laboratorieförsöken. I de här försöken har urealösningarna blandats noga med parasitägg respektive träck, men i en beteshage ligger äggen och de tidiga larvstadierna skyddade inuti träckhögar. Skulle urea sprayas på betet kanske den inte har så stor effekt på dessa ägg och larver. Dessutom har larvodlingarna i det här försöket utförts i slutna behållare, där den ammoniak som bildas hålls kvar. Vi vet inte hur stor påverkan luftmiljön har på resultatet. En annan skillnad är att de här försöken utförts under jämna och ganska höga temperaturer, jämfört med vad som är normalt på sommaren i Sverige. Det är inte säkert att det fungerar lika bra om temperaturen är lägre. Vi vet inte heller vad som händer om regn späder ut eller sköljer bort ureabehandlingen. Det är också viktigt att tänka på miljöaspekterna; vid höga doser kvävegödsel läcker mycket ut i miljön. Ska övergödning undvikas går det alltså inte att sprida hur mycket urea som helst på betet.

Sammanfattningsvis har urea potential att hämma utvecklingen av de frilevande stadierna av hästens små blodmaskar. Mer forskning behövs dock för att komma fram till om ureabehandling på betet fungerar i praktiken, och i så fall om den dos som krävs är tillräckligt låg för att inte orsaka övergödning.

## REFERENSER

- APVMA (2018). *Public Chemical Registration Information System Search - portal.apvma.gov.au*.  
[https://portal.apvma.gov.au/pubcris?p\\_auth=6LWHHs6f&p\\_p\\_id=pubcrisportlet\\_WAR\\_pubcrisportlet&p\\_p\\_lifecycle=1&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_pos=2&p\\_p\\_col\\_count=4&\\_pubcrisportlet\\_WAR\\_pubcrisportlet\\_id=82647&\\_pubcrisportlet\\_WAR\\_pubcrisportlet\\_javax.portlet.action=viewProduct](https://portal.apvma.gov.au/pubcris?p_auth=6LWHHs6f&p_p_id=pubcrisportlet_WAR_pubcrisportlet&p_p_lifecycle=1&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_pos=2&p_p_col_count=4&_pubcrisportlet_WAR_pubcrisportlet_id=82647&_pubcrisportlet_WAR_pubcrisportlet_javax.portlet.action=viewProduct) [2019-11-14]
- Bennett, J. (2017). *The ability of nitrogen fertiliser to break the lifecycle of gastro-intestinal nematodes*. Diss. Christchurch: Lincoln University
- Cabaret, J. & Mangeon, N. (1994). Fertilizers on pastures in relation to infestation of goats with strongyles, small lungworms and *Moniezia*. *Small Ruminant Research*, 13(3):269–276.
- Cairns, J., McAnulty, R.W., & Greer, A.W. (2017). Potential anthelmintic effect of urea. *New Zealand Society of Animal Production*, 77:110-113.
- Cameron, C.D.T. & Gibbs, H.C. (1966). Effects of stocking rate and flock management on internal parasitism in lambs. *Canadian Journal of Animal Science*, 46(2):121–124.
- ESCCAP (2019). *A guide to the treatment and control of equine gastrointestinal parasite infections*  
[https://www.esccap.org/uploads/docs/rtjqmu6t\\_0796\\_ESCCAP\\_Guideline\\_GL8\\_v7\\_1p.pdf](https://www.esccap.org/uploads/docs/rtjqmu6t_0796_ESCCAP_Guideline_GL8_v7_1p.pdf)  
[2019-12-10]
- Geurden, T., van Doorn, D., Claerebout, E., Kooyman, F., De Keersmaecker, S., Vercruyssen, J., Besognet, B., Vanimisetti, B., di Regalbono, A.F., Beraldo, P., Di Cesare, A. & Traversa, D. (2014). Decreased strongyle egg re-appearance period after treatment with ivermectin and moxidectin in horses in Belgium, Italy and The Netherlands. *Veterinary Parasitology*, 204(3):291–296.
- Grønvold, J., Wolstrup, J., Nansen, P., Henriksen, S.A., Larsen, M. & Bresciani, J. (1993). Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-trapping fungi: a survey of Danish studies. *Veterinary Parasitology*, 48(1–4):311–325.
- Hernández, J.Á., Arroyo, F.L., Suárez, J., Cazapal-Monteiro, C.F., Romasanta, Á., López-Arellano, M.E., Pedreira, J., de Carvalho, L.M.M., Sánchez-Andrade, R., Arias, M.S., de Gives, P.M. & Paz-Silva, A. (2016). Feeding horses with industrially manufactured pellets with fungal spores to promote nematode integrated control. *Veterinary Parasitology*, 229:37–44.
- Howell, J.M., Luginbuhl, J.-M., Grice, M.J., Anderson, K.L., Arasu, P. & Flowers, J.R. (1999). Control of gastrointestinal parasite larvae of ruminant using nitrogen fertilizer, limestone and sodium hypochlorite solutions. *Small Ruminant Research*, 32(3):197–204.
- Jordbruksverket (2018). *Rekommendationer för gödsling och kalkning 2019*.  
[https://www2.jordbruksverket.se/download/18.47f1061167704c09faaa019/1543994500651/jo18\\_18v2.pdf](https://www2.jordbruksverket.se/download/18.47f1061167704c09faaa019/1543994500651/jo18_18v2.pdf) [2019-12-01]
- Kaplan, R.M. & Nielsen, M.K. (2010). An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60s anymore. *Equine Veterinary Education*, 22(6):306–316.
- Kuzmina, T.A., Kuzmin, Y.I. & Kharchenko, V.A. (2006). Field study on the survival, migration and overwintering of infective larvae of horse strongyles on pasture in central Ukraine. *Veterinary Parasitology*, 141(3):264–272.
- Lind, E.O., Kuzmina, T., Ugglå, A., Waller, P.J. & Höglund, J. (2007). A field study on the effect of some anthelmintics on cyathostomins of horses in Sweden. *Veterinary Research Communications*, 31(1):53–65.

- Love, S., Murphy, D. & Mellor, D. (1999). Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary Parasitology*, 85(2):113–122.
- Lyons, E.T., Drudge, J.H. & Tolliver, S.C. (2000). Larval cyathostomiasis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 16(3):501–513.
- Mfitilodze, M.W. & Hutchinson, G.W. (1987). Development and survival of free-living stages of equine strongyles under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology*, 23(1–2):121–133.
- Naturvårdsverket (2019). *Utsläpp i siffror - Kväve (N-tot)*.  
<https://utslappisiffror.naturvardsverket.se/Amnen/Organiska-amnen/Kvave/> [2019-12-01]
- Nielsen, M.K., Kaplan, R.M., Thamsborg, S.M., Monrad, J. & Olsen, S.N. (2007). Climatic influences on development and survival of free-living stages of equine strongyles: Implications for worm control strategies and managing anthelmintic resistance. *The Veterinary Journal*, 174(1):23–32.
- Nielsen, M. K., Reinemeyer, C. R., & Sellon, D. C. (2013) Nematodes. I: Sellon, D.C. & Long, M.T. (red.). *Equine infectious diseases*. Second edition. St. Louis, Missouri: Saunders/Elsevier.
- Nordin, A., Nyberg, K. & Vinnerås, B. (2009). Inactivation of ascaris eggs in source-separated urine and feces by ammonia at ambient temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3):662–667.
- Peregrine, A.S., Molento, M.B., Kaplan, R.M. & Nielsen, M.K. (2014). Anthelmintic resistance in important parasites of horses: Does it really matter? *Veterinary Parasitology*, 201(1):1–8.
- Ramsey, Y.H., Christley, R.M., Matthews, J.B., Hodgkinson, J.E., McGoldrick, J. & Love, S. (2004). Seasonal development of Cyathostominae larvae on pasture in a northern temperate region of the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*, 119(4):307–318.
- Reinemeyer, C.R. (1986). Small strongyles: Recent advances. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 2(2):281–312.
- Rupasinghe, D. & Ogbourne, C.P. (1978). Laboratory studies on the effect of temperature on the development of the free-living stages of some strongylid nematodes of the horse. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 55(3):249–253.
- SMHI (2019) *Sommar*. <https://www.smhi.se/kunskapsbanken/meteorologi/sommar-1.1084> [2019-11-29]
- SVA (2018a). *Invärtes parasiter (endoparasiter)* Tillgänglig:  
<https://www.sva.se/djurhalsa/hast/parasiter-hos-hast/invartes-parasiter-endoparasiter-hast> [2019-11-01]
- SVA (2018b). *Avmaskning av häst*. Tillgänglig: <https://www.sva.se/djurhalsa/hast/parasiter-hos-hast/avmaskning-av-hast> [2019-09-18]
- SVA (2018c). *Minska parasitsmitta i hagarna-Betesplanering och andra metoder*. Tillgänglig:  
<https://www.sva.se/djurhalsa/hast/parasiter-hos-hast/minska-parasitsmitta-i-hagarna-betesplanering-och-andra-metoder-hast> [2019-09-18]
- SVA (2019) *Parasiter i träckprov från häst*. Tillgänglig: <https://www.sva.se/analyser-och-produkter/analyser-av-djur-och-foder/hast/parasiter-i-trackprov-hast> [2019-11-10]
- Thorolfsson Rainamo, H. (2018) *Mockning som beteshygienisk åtgärd för parasitbekämpning hos häst*. Sveriges lantbruksuniversitet. Hippologprogrammet (Examensarbete på kandidatnivå 2018-K81)
- Uhlinger, C. (1990). Effects of three anthelmintic schedules on the incidence of colic in horses. *Equine Veterinary Journal*, vol. 22 (4), ss. 251–254

- van Wyk, J.A. (2001). Refugia--overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, vol. 68 (1), ss. 55–67
- Wharton, D. (1980). Nematode egg-shells. *Parasitology*, vol. 81 (2), ss. 447–463
- Wilderoth, H. (2019). *Förebyggande åtgärder för bekämpning av blodmask*. Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet (Examensarbete i veterinärmedicin)