



Fodertillskott med rosvampen *Duddingtonia flagrans* (BioWorma®) som komplement till avmaskning hos häst

*The predatory fungus Duddingtonia flagrans given as a feed additive
(BioWorma®) as a tool for parasite control in horses*

Elinor Asp Tauni

Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet
Uppsala 2021



Fodertillskott med rosvampen *Duddingtonia flagrans* (BioWorma®) som komplement till avmaskning hos häst

The predatory fungus Duddingtonia flagrans given as a feed additive (BioWorma®) as a tool for parasite control in horses

Elinor Asp Tauni

Handledare: Eva Tydén, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Grandi Giulio, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: A2E

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: EX0869

Program/utbildning: Veterinärprogrammet

Kursansvarig inst.: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2021

Nyckelord: BioWorma®, Duddingtonia flagrans, rosvamp, parasiter, blodmask, häst

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Enheten för parasitologi

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Fulltexten kommer dock i samband med att dokumentet laddas upp arkiveras digitalt.

Om ni är fler än en person som skrivit arbetet så gäller krysset för alla författare, ni behöver alltså vara överens. Läs om SLU:s publiceringsavtal här: <https://www.slu.se/site/bibliotek/publicera-och-analysera/registrera-och-publicera/avtal-for-publicering/>.

☒ JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

☐ NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.

Sammanfattning

BioWorma® är ett kommersiellt tillgängligt fodertillskott som innehåller sporer från rosvampen *Duddingtonia flagrans*. Det beskrivs som en biologisk form av parasitkontroll och skulle kunna användas som ett komplement till avmaskning, ett behov som finns då resistensutveckling hos hästens små blodmaskar är ett ökande problem. *D. flagrans* har visat lovande resultat i ett flertal studier på olika djurslag och kan minska antalet infektiösa larver från parasitära nematoder (såsom hästens blodmaskar) på betet genom att bilda ett adhesivt nät i träcken som fångar nematodlarverna. Syftet med studien är att undersöka BioWorma®s effektivitet att förhindra strongylida larvers migration till betet och bedöma dess användbarhet som parasitkontroll i nordiska förhållanden.

Studien utfördes i två omgångar, en på sommaren och en på hösten, med odling av träck på laboratorium samt experimentell infektion av en parasitfri gräsyta. Försökshästarna delades in i en kontrollgrupp och en grupp som fick BioWorma® i en dos på 3×10^4 sporer/kg/dag i 6 dagar på sommaren och dubbel dos på hösten. Under laboratorieförhållande utfördes en odling av träcken innan och efter giva av BioWorma® och andelen migrerande larver per ägg beräknades. Den experimentella infektionen av gräsytan utfördes genom att placera ut tre träckhögar à 1,2 kg från varje häst i kontroll- och BioWorma®-grupp. Gräsprover samlades sedan runt högarna en gång i månaden och antalet infektiösa larver (L3) beräknades (L3/kgTS gräs). Väderdata för studieperioden erhöles från SMHI och sammanställdes. Effekten av BioWorma® bedömdes genom att jämföra antal migrerande larver hos kontroll och BioWorma®-grupp. På hösten utfördes även en odling på agarplatta för *D. flagrans* från träck och BioWorma®.

I denna studie kunde ingen effekt av BioWorma® visas vid rekommenderad angiven dos i studien gjord på sommaren. Vid dubbel dos sågs en signifikant effekt vid odling på laboratorium med en 63,7 % reducering av migrerade larver. Dock sågs ingen effekt på fält, vilket kan bero på att nordiska väderförhållanden på hösten är för kalla för tillräcklig tillväxt av svampen. Värt att notera är att *D. flagrans* ej kunde påvisas i träcken vid odling på agarplatta med ljusmikroskopisk undersökning.

Nyckelord: häst, blodmask, BioWorma®, *Duddingtonia flagrans*, parasitkontroll

Abstract

BioWorma® is a commercially available feed supplement that contains spores from the nematode-trapping microfungus *Duddingtonia flagrans*. It is described as a biological form of parasite control and could be used as a complement to deworming, an existing need as the development of resistance among the small strongyles of the horse is an increasing problem. *D. flagrans* has shown promising results in several studies in different animal species, and can reduce the number of infectious larvae from parasitic nematodes (such as the strongyles of the horse) on pasture by producing an adhesive net in the faeces that trap nematodes. The purpose of the study is to investigate BioWorma®'s effectiveness in preventing the migration of equine strongylid nematode larvae to the pasture and to assess its usefulness as a parasite control in Nordic conditions.

The study was carried out in two rounds, one during summer and one in autumn. The horses included in the study were divided into a control group and a group that received BioWorma® in a dose of 3×10^4 spores/kg/day for 6 consecutive days in the summer study and a double dose in autumn. Before and after ingestion of BioWorma®, a culture of the faeces from each horse was performed in laboratory conditions, and the proportion of migrating larvae per egg was calculated. Secondly, an experimental infection of a parasite-free pasture was performed by placing three faecal pats of 1.2 kg from each horse on the pasture. Grass samples were then collected around the faecal pats once a month and the number of infectious larvae (L3) was calculated (L3/kgDM grass). Weather data for the study period were obtained from SMHI and compiled. The effect of BioWorma® was assessed by comparing the number of migrating larvae in the control and BioWorma® group. In autumn, a cultivation was also carried out on an agar dish for *D. flagrans* from feces and the feed supplement BioWorma®.

In this study, no effect of BioWorma® could be shown at the recommended dosage. At double dosage, a significant effect was seen in faecal cultures with a 63.7 % reduction of migrated larvae. However, no effect was seen in the field trial at double dosage, which may be due to the fact that Nordic weather conditions in autumn are too cold for sufficient growth of the fungus. It is worth noting that light microscopic examination of cultures from faeces on agar plates could not detect *D. flagrans*.

Keywords: horse, strongyles, BioWorma®, *Duddingtonia flagrans*, parasite control

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	9
Figurförteckning	10
Förkortningar	11
1. Inledning	13
2. Litteraturöversikt	14
2.1. Blodmaskar hos häst	14
2.1.1. Livscykel	14
2.1.2. Sjukdomsbeskrivning	16
2.1.3. Överlevnad på betet	17
2.1.4. Resistensläge	18
2.1.5. Parasitkontroll	18
2.2. <i>Duddingtonia flagrans</i>	19
2.2.1. Effekt på infektiösa larver hos häst	19
2.2.2. Yttre påverkan	20
2.2.3. BioWorma®	20
3. Material och metod	22
3.1. Studiedesign	22
3.1.1. Urval och uppdelning av hästar	23
3.1.2. Dos BioWorma®	23
3.2. Analyser och odling på labb	23
3.2.1. Träckprov EPG	23
3.2.2. Odling av larver	23
3.2.3. Odling av <i>Duddingtonia flagrans</i>	23
3.3. Experimentell infektion gräsyta	24
3.3.1. L3 gräsprover	24
3.4. Väderdata	24
3.5. Statistisk analys	24
4. Resultat	26
4.1. L3 gräsprover	26
4.2. Migration av L3 i laboratoriemiljö	27

4.3.	Odling av <i>Duddingtonia flagrans</i>	28
4.4.	Väderanalys.....	28
5.	Diskussion.....	30
5.1.	Yttre faktorer	30
5.2.	Dos	31
5.3.	Användbarhet	33
5.4.	Studiedesign	34
5.5.	Konklusion	34
	Referenser.....	36
	Populärvetenskaplig sammanfattning	41

Tabellförteckning

Tabell 1. Sammanställning av gräsprover sommar.....	26
Tabell 2. Sammanställning av gräsprover höst.....	27

Figurförteckning

Figur 1. Livscykel strongylida nematoder	15
Figur 2. Översiktlig studiedesign.....	22
Figur 3. Sammanställning gräsprover sommar och höst.....	26
Figur 4. Procentuell migration L3.....	28
Figur 5. Klamydospor (t.v.) och konidium (t.h.)	28
Figur 6. Graf över väderdata sommar	29
Figur 7. Graf över väderdata höst	29

Förkortningar

EPG	Eggs per gram
ERP	Egg reapperance period
FEC	Fecal egg count
FECRT	Fecal egg count reduction test
L3	Infektiösa larver (stadie 3 i utveckling)
SVA	Sveriges Veterinärmedicinska Anstalt

1. Inledning

Strongylida nematoder, så kallade blodmaskar, tillhör hästens vanligaste parasiter. De kan översiktligt delas in i små och stora blodmaskar (Taylor *et al.* 2007). De små blodmaskarna är vanligt förekommande hos större delen av Sveriges hästuppopulation. De har låg patogenicitet men kan i enstaka fall orsaka allvarlig sjukdom (Love *et al.* 1999). Den stora blodmasken *Strongylus vulgaris* har en lägre prevalens men en högre patogenicitet (Taylor *et al.* 2007) och kan genom skador i kärl orsaka infarkter i tarmavsnitt med koliksymtom och peritonit som följd (Nielsen *et al.* 2016; Pihl *et al.* 2018).

En kraftig användning av avmaskningsmedel för att minska prevalensen av *S. vulgaris* från 60-talet och framåt ledde till en resistensutveckling hos de små blodmaskarna (Kaplan 2002). För att minska resistensutvecklingen har en mer restriktiv riktad avmaskningsstrategi införts där hästar avmaskas först efter att en måttlig äggsurkiljning setts vid träckprov, eller där *S. vulgaris* påvisats (SVA 2020a). Dock har en ökning av prevalensen av *S. vulgaris* observerats sen den mer riktade strategin infördes, främst på gårdar som ej odlar för *S. vulgaris* (Tydén *et al.* 2019). Alternativa metoder som beteshygien och betesplanering framhävs som en viktig del i kampen mot hästens parasiter (SVA 2020b). Då många stall endast har hästar som betesdjur samt har en hög hästdensitet kan inte alla råd och strategier implementeras. Det finns då ett behov för ytterligare metoder.

Duddingtonia flagrans är en naturligt förekommande rosvamp som fagocyterar på nematoder. Dess sporer passerar hästens magtarmkanal intakta och när träcken kommer ut på betet och svampen börjar växa kan den bilda ett klistrigt nät. Nätet fångar larver och hindrar de infektiösa larverna att migrera ut på betet. *D. flagrans* kan på så sätt reducera parasitsmitta på betet och minska infektion/re-infektion av hästar (Larsen 2000).

BioWorma®® är ett kommersiellt tillgängligt fodertillskott som innehåller sporer från *D. flagrans*. Det beskrivs som en biologisk form av parasitkontroll och skulle kunna användas som ett komplement till avmaskning (IAHP 2020b). Syftet med studien är att undersöka BioWorma®s effektivitet att förhindra strongylida nematoders migration till betet och bedöma dess användbarhet som parasitkontroll i nordiska förhållanden.

2. Litteraturöversikt

2.1. Blodmaskar hos häst

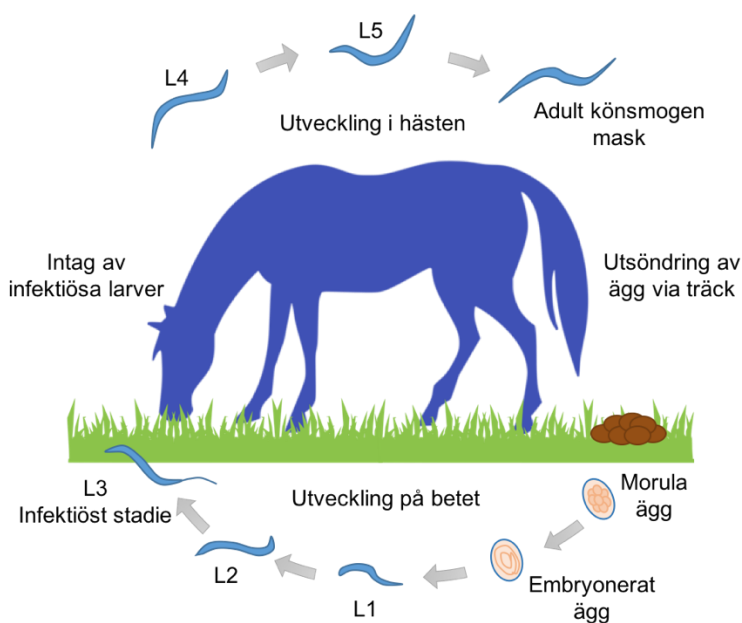
Blodmaskar hos häst är nematoder (rundmaskar) som tillhör familjen Strongylidae. De delas vanligen in i stora (subfamilj Strongylinae) och små blodmaskar (subfamilj Cyathostominae) (Taylor *et al.* 2007).

Små blodmaskar tillhör hästens vanligaste parasiter med en prevalens på nära 100 % (Bellaw & Nielsen, 2020). De omfattar ett fyrtiotal arter där 15 är vanligt förekommande. De stora blodmaskarna består även de av flera arter där *Strongylus vulgaris* beskrivs som den mest patogena (Taylor *et al.* 2007) och ofta är den som syftas på när stor blodmask nämns. På grund av utbredd avmaskning från 70-talet och framåt hade *S. vulgaris* låg prevalens i Sverige, men sedan utbredda resistensproblem hos små blodmaskar ledde till en mer restriktiv avmaskningsstrategi, samt krav på recept för avmaskningsmedel infördes 2007 har prevalensen av *S. vulgaris* ökat i Sverige (Tydén *et al.* 2019). Tydén *et al.* (2019) fann en prevalens på 61 % på gårdsnivå och 28 % på individuell nivå, där gårdar som endast utförde träckprovsanalys för närvaro av ägg (FEC) hade högre prevalens. Hedberg-Alm *et al.* (2020) visade även en hög exponering för *S. vulgaris* med en seroprevalens på 62,2 % hos svenska hästar i en fall-kontrollstudie utförd 2017. I Danmark där liknande avmaskningsstrategi införts har man sett en ökad prevalens på gårdar som avmaskar selektivt jämfört med de gårdar som avmaskade alla hästar regelbundet (Nielsen *et al.* 2012).

2.1.1. Livscykel

Stora och små blodmaskar har en mycket liknande livscykel där skillnaden ligger i maskarnas migration i hästens kropp. Båda innefattar en direkt livscykel med exkretion av parasitägg i träcken som sedan kläcks när miljövariabler såsom temperatur, fukt och syresättning är passande (Figur 1). På betet utvecklas larverna i tre stadier; L1, L2 och slutligen det infektiösa stadiet L3. L1 och L2 föder sig på organiskt material i omgivningen medan L3 utvecklas innanför höljet på L2 vilket ger en ökad motståndskraft mot miljöfaktorer, men också innebär att den ej kan inta föda (Nielsen & Reinemeyer 2018).

L3-larver migrerar sedan ut i gräset som omger träckhögarna och infekterar hästen när den betar. I hästen lämnar den sitt hölje och penetrerar grovtarmens slemhinna. De små blodmaskarna bildar en cysta och stannar i tarmens mukosa medan den stora blodmasken *S. vulgaris* startar en migration i hästens kropp. *S. vulgaris* utvecklas efter penetrationen av grovtarmens mukosa till L4 och migrerar sedan via arterioler upp till kraniala tarmkrössets artär. Vandrigen tar ca 2 veckor. En del larver kan fortsätta sin migration ända upp till aortas rot vid vänstra kammaren och man har funnit migrerande L4 i flera av aortas avgående kärl (Nielsen & Reinemeyer 2018). Vid predilektionsstället i kraniala tarmkrösroten sker en vidare utveckling under ca 4 månader till L5. Detta stadium återvänder sedan till grovtarmen via artärerna. I grovtarmen bildas ärtstora noduli i submukosan där larverna undergår sin sista utvecklingsfas och sedan frigörs som adulta parasiter. De adulta maskarna parar sig och honorna kläcker ägg som via träcken kommer ut på betet (Nielsen & Reinemeyer 2018). Vandrigen i kärlen ger en lång prepatensperiod på 5,5–7 månader (Taylor *et al.* 2007).



Figur 1. Livscykel strongylida nematoder. Ägg utsöndras i hästens träck och utvecklas sedan till det infektiösa stadiet L3 på betet. L3 larver infekterar hästar vid intag av gräs. I hästen sker en vidare utveckling till adult stadiet. Beroende på art kan L4- och L5-larver migrera i hästens kropp. Adulta köns mogna larver parar sig i grovtarmens lumen och honorna exkreterar ägg. Illustration gjord av författaren utifrån bild av hästen (<https://svgsilh.com/3f51b5/image/359611.html>), tillgänglig via CC0 1.0 (Creative Commons — CC0 1.0 Universal).

Alla arter av små blodmaskar har nästintill identisk livscykel där det finns små skillnader i vart i tarmen och hur djupt i mukosan de bildar sin cysta. I cystan utvecklas de från L3 till L4. En del maskar kan gå i dvala och stanna som encysterade L3 i 1–2 år. När larven nått sitt fjärde utvecklingsstadium brister cystan och den vidare utvecklingen till L5 sker i tarmens lumen. I tarmens lumen utvecklas sedan L5 till

en adult köns mogen mask. Adulta maskar återfinns vanligen i cecum, eller ventrala och dorsala colon. I sitt encystrerade stadie är maskarna mycket motståndskraftiga mot avmaskningsmedel och inget avmaskningsschema eller dos har nått 100 % effekt (Nielsen & Reinemeyer 2018). Prepatensperioden för små blodmaskar är 2-3 månader (Taylor *et al.* 2007). Skillnaden i prepatensperiod gör att äggutsöndringen skiljer sig mellan arterna. Mirck (1981) fann att de små blodmaskarna utsöndrar mest ägg på sensommar/höst medan de stora blodmaskarna har högst äggutsöndring på våren.

2.1.2. Sjukdomsbeskrivning

Små blodmaskar är hästens vanligaste parasiter och många hästar är helt symptomfria trots en hög parasitbörda. Parasiterna kan dock orsaka en inflammatorisk reaktion i colon och cecum där de kliniska symptom som ses främst är avmagring, men även diarré, subkutana ödem och kolik. Larverna anses mest patogena när cystorna brister och frigör L5 till tarmens lumen, men också vid sin penetration av tarmens mukosa (Love *et al.* 1999). I sällsynta allvarliga fall kan hästar drabbas av *larval cyathostominos*, en sjukdom som orsakas av att en mängd cystor brister samtidigt och skadar tarmens slemhinna. Hästarna får en plötslig diarré följt av avmagring och i vissa fall död. De främsta biokemiska och hematologiska fynden är hypoalbuminemi och neutrofil. Det är främst yngre hästar (<5 år) som drabbas. I Europa har man sett en säsongsbundenhet till senvinter/vår, men sjukdomen kan även drabba äldre hästar under hela året (Giles *et al.* 1985). Det finns indikationer på att *larval cyathostominos* oftare drabbar nyligen avmaskade hästar, med första kliniska symptom inom två veckor efter avmaskning (Reid *et al.* 1995).

Den stora blodmasken *Strongylus vulgaris* ansågs tidigare vara den främsta orsaken till kolik, men är idag mer sammankopplad med kolik orsakad av icke-strangulerande infarkter i tarmen och peritonit (Nielsen *et al.* 2016; Pihl *et al.* 2018). Vandringen i kärlen orsakar inflammation och skador på endotelet vilket leder till ökad trombbildning (Duncan & Pirie 1975). Tromberna kan orsaka ischemi och icke-strangulerande infarkter i tarmavsnitt med kolik som främsta symptom (Nielsen *et al.* 2016). Infarkterna orsakar i många fall en septisk peritonit och har hög mortalitet (Pihl *et al.* 2018). Hedberg-Alm *et al.* (2020) fann i en fall-kontroll studie en signifikant högre seroprevalens för *S. vulgaris* hos hästar med peritonit jämfört med andra orsaker till kolik samt hos kontrollhästar. Två av hästarna hade vid obduktion infarkter i tarmavsnitt orsakade av *S. vulgaris*. Resterande 8 hästar blev bra på behandling och fick diagnosen idiopatisk peritonit. Att ställa diagnosen är svårt utan obduktion och då *S. vulgaris* sjukdomsframkallande vandring i kärlen sker under larvstadierna finns inga ägg att påvisa i träcken. Hästarna var även negativa vid PCR undersökning av träcken och hade alltså bara ett positivt ELISA-test för *S. vulgaris* (Hedberg-Alm *et al.* 2020). Det finns beskrivet att en förtjockning av kra-

niala tarmkrösroten kan kännas rektalt hos drabbade djur, men veterinärer i en retrospektiv fallstudie av Pihl *et al.* (2018) hade ej identifierat detta fenomen. Pihl *et al.* (2018) menar därför att det finns belägg för undersökning med transrektalt ultraljud på hästar med peritonit då förändringarna kan vara för små för att kännas rektalt. En tidig diagnos hos hästar med peritonit orsakad av en icke-strangulerande infarkt kan vara avgörande då de svarar dåligt på endast medicinsk behandling (Pihl *et al.* 2018).

2.1.3. Överlevnad på betet

Klimatet påverkar både utvecklingshastigheten, överlevnad och larvernans infektionsmöjlighet. I sitt infektiösa L3 stadie är larverna som mest motståndskraftiga och klarar både varma och kalla klimat (Nielsen *et al.* 2007). I laboratoriestudier har man visat att strongylida larver kläcks och utvecklas till sitt infektiösa stadie i temperaturer mellan 10 och 35°C (Mfitlodze & Hutchinson 1987). Utvecklingshastigheten från ägg till L3 påverkas främst av temperaturen där den vid lägre temperaturer tar 15-24 dagar och vid 35°C endast tar tre dagar, men även fukt påverkar (Mfitlodze & Hutchinson 1987). Mfitlodze & Hutchinson (1987) fann att utvecklingen stannar av vid lägre fuktighet än 15-20 %. De såg även kortare överlevnad hos L3 i fuktig miljö jämfört med L3 i torka vid högre temperaturer, troligen för att de använder upp sin energireserv snabbare.

Vid kall väderlek sker ingen kläckning, utan äggen väntar till mer gynnsamma förhållanden. Äggen kan embryonera vid temperaturer ner till 4°C men kläcks ej (Rupasinghe & Ogbourne 1978). Äggens motståndskraft skiljer sig beroende på om de embryonerat eller ej, där oembryonerade ägg tål kyla bättre (Nielsen *et al.* 2007). Kuzmina *et al.* (2006) fann dock att alla ägg, L1 och L2 dog ut under vintern, något som de tror berodde på ett sporadiskt snötäcke och alternerande frysning och tining av träckhögar. Mängden snö kan påverka då ett bestående snötäcke gynnar larven genom en jämnare temperatur (Nielsen *et al.* 2007). Kuzmina *et al.* (2006) fann att det främst är larver som befinner sig i träcken som klarar att övervintra, med högst överlevnad i träckhögar utplacerade på hösten.

Larvernans migration till betet är som störst vid varm och fuktig väderlek, men detta förkortar larvens levnadstid i gräset (Hutchinson *et al.* 1989). Fukt och framförallt regn ökar migrationen från träck till gräs, vid torka sker mycket liten migration (Couto *et al.* 2011). Studier har visat en ökad motståndskraft mot torka så länge larverna är kvar i träckbollen, men minskad migration gör att mängden i gräset sänks kraftigt och därmed även risken för infektion (Nielsen *et al.* 2007).

Under våren dör övervintrade larver gradvis ut, och i juni är mängden L3 på betet låg (Mirck 1981). Lindberg (1976) visade att övervintrade larver helt dött ut i september i svenska förhållanden. Kuzmina *et al.* (2006) fann att mycket få infektiösa larver kunde överleva mer än 12 månader på betet.

2.1.4. Resistensläge

Avmaskningsmedel mot strongylida nematoder kan delas in i tre grupper; bensimidazoler (fenbendazol), tetrahydropyromidiner (pyrantel) och makrocycliska laktoner (ivermektin, moxidectin). Hos små blodmaskar har man sett en resistens mot bensimidazoler som är spridd över stora delar av världen (Kaplan 2002). Resistens mot pyrantel har även den börjat breda ut sig och tecken på resistens mot makrocycliska laktoner har setts i olika länder (Peregrine *et al.* 2014). Nielsen *et al.* (2020). fann exempelvis resistens för ivermektin hos unghästar i USA som importerats från Irland. I Sverige har man funnit att resistens förekommer mot pyrantel, men effekten anses fortfarande acceptabel. Studien kunde inte heller se någon betydande reversering av resistensen mot bensimidazoler, trots att produkten använts mycket lite sedan slutet av 90-talet. Ingen resistens mot ivermektin kunde hittas (Lind *et al.* 2007). Hos *S. vulgaris* finns ingen resistens beskriven.

För att undersöka resistensläge används vanligtvis ett "Fecal egg count reduction test" (FECRT) där man beräknar en procentuell minskning av antal ägg i träcken efter avmaskning (Coles *et al.* 2006). Kaplan & Vidyashankar (2012) belyser dock brister i användandet av metoden, främst för att upptäcka tidiga tecken på resistensutveckling. Sangster (1999) menar att en förkortad "egg reappearance period" (ERP) kan vara de första tecknen på resistens hos makrocycliska laktoner. Studier i USA, Brasilien och Tyskland har visat att ERP hos cyathostomer sänkts från 8 veckor till 4 veckor efter behandling med ivermektin (Kaplan & Vidyashankar 2012).

Då resistens sprids inom en population genom selektion av parasiter där en resistent genmutation uppkommit, anses parasiters refugia vara en viktig aspekt i resistensutveckling. Refugian är de parasiter som ej exponeras för avmaskningsmedel. Hos gastrointestinala nematoder är detta främst de frilevande stadierna, men hos exempelvis cyathostomer även de encystrade larverna i tarmens mukosa. Genom att behålla en population som är mottaglig för avmaskningsmedlet minskar selektionstrycket för resistens i populationen (Van Wyk 2001). Nielsen *et al.* (2019) har i en datasimulering jämfört olika behandlingsstrategier mot cyathostomer med ivermektin i olika klimat med hänsyn till dess refugia. De fann att tidpunkt för avmaskning samt en riktad selektiv avmaskning verkar vara det som sänker hastigheten för resistensutveckling mest i kalla klimat (Nielsen *et al.* 2019).

2.1.5. Parasitkontroll

Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) har framställt avmaskningsrutiner för blodmask, med målet att hålla smittan av små blodmaskar på en låg nivå och eliminera den stora blodmasken *S. vulgaris* utan att gynna resistensutveckling. De rekommenderar träckprovsanalys i april-maj varje år. Då äggen inte går att skilja morfologiskt, rekommenderas specifik PCR eller att odla för att påvisa *S. vulgaris*. Det är särskilt viktigt på hästar vars träckprov visar låg äggutskiljning (eggs per gram,

EPG) eftersom dessa hästar inte behandlas om de är negativa för *S. vulgaris*. Avmaskning ska utföras på hästar med måttlig-riklig äggurskiljning, vanligtvis används ett gränsvärde på 200 EPG, och/eller vid förekomst av *S. vulgaris* (SVA 2020a). Då resistens finns beskrivet för makrocycliska laktoner och pyrantel, vilka är de substansgrupper som används idag, rekommenderas ett uppföljande träckprov 14 dagar efter behandling. Om det finns ägg i träcken då kan det vara tecken på resistensutveckling (SVA 2020a).

Den riktade avmaskningen bör kombineras med betesplanering och beteshygien. SVA rekommenderar bland annat växel- eller sambetning med andra djurslag, att vila betet ett år eller första halvan av betessäsongen, plöja och betesputsa (SVA 2020b).

2.2. *Duddingtonia flagrans*

Duddingtonia flagrans är en naturligt förekommande rosvamp, så kallad nematofag, som via bildandet av ett adhesivt nät fysiskt kan fånga nematoder. Arten finns i stora delar av världen och har isolerats från betesmark (Ahren *et al.* 2004) samt från träck av häst, får och nöt (Larsen 2000).

Idén att använda sig av rosvampar som biologisk kontroll av gastrointestinala nematoder började redan på 1930-talet. Sedan dess har ett flertal studier utförda på nöt, får, häst och gris visat lovande resultat (Larsen 2000). Under 90-talet fick man upp ögonen för *D. flagrans* då den förutom sitt nät även producerar tjockväggiga vilande sporer, klamydosporer, som har visats ha förmåga att passera magtarmkanalen intakta på häst, får, nöt, gris (Larsen 2000) och get (Campos *et al.* 2009). När träcken kommer ut på betet gror sporererna och när svampen sedan växer kan den bilda ett tredimensionellt adhesivt nät på sina hyfer (Braga & de Araújo 2014). Genom att fånga parasitlarver minskar mängden som migrerar ut på betet vilket leder till en reducerad infektion/re-infektion av betesdjuren (Larsen *et al.* 1996). Det finns inga tecken på negativ påverkan på jordnematoder, utan svampen anses främst hålla sig till träckhögar (Yeates *et al.* 2002).

2.2.1. Effekt på infektiösa larver hos häst

För att testa *D. flagrans* effekt har man gjort studier på sporer både innan och efter passage genom hästens magtarmkanal. Parasiterna som studerats är olika strongylida arter, främst de små blodmaskarna. Studier har utförts både i labbmiljö, experimentella studier samt på fält (Larsen 2000).

Larsen *et al.* (1995) visade att svampens klamydosporer kan passera hästens magtarmkanal intakta samt därefter växa i träcken och minska utveckling till infektiösa larver i labbmiljö med 90–99 %. I en senare fältstudie av Larsen *et al.* (1996) fick hästar infekterade med strongylida parasiter behandling med sporer av *D.*

flagrans och en obehandlad kontrollgrupp infektera parasitfria beten. Ingen skillnad i äggutsöndring kunde ses mellan grupperna, men antal infektiösa larver var kraftigt sänkt både vid odling i labb och vid analys av gräsprover från beten. De visade även en minskad infektion hos föl som gick på betet där hästar behandlade med *D. flagrans* infekterat marken, jämfört med en kontrollgrupp. Fölen hade minskad utsöndring av ägg och vid obduktion sågs färre larver i mukosan samt färre skador från parasiternas migration. Man kunde dock ej se någon skillnad i antal adulta små blodmaskar i tarmens lumen (Larsen *et al.* 1996).

D. flagrans kan minska migrationen av L3 från träcken till omgivande gräs med upp till 98 %. Det är främst vid regn man kan se skillnad i effekt då parasitlarvernans migration under torka är kraftigt minskad (Fernández *et al.* 1997). Paz-Silva *et al.* (2011) spred klamydosporer direkt på träckhögar och fann att dess närvaro minskade antalet utvecklade infektiösa larver (L3) i träckhögen med 94 %. Studier har visat en skillnad i effekt beroende på dos. Bird & Herd (1995) fann i en *in vitro* studie att en högre koncentration sporer per ägg resulterade i en högre effekt och Larsen *et al.* (1995) fann en positiv korrelation mellan dos och reduktion av L3.

2.2.2. Yttre påverkan

D. flagrans tillväxt och fångsteffektivitet påverkas av dels av klimatfaktorer som temperatur och fukt, men främst av mängden infektiösa larver i miljön. En ökad densitet av larver stimulerar svampen att producera fångstnät (Morgan *et al.* 1997; Grønvold *et al.* 1999). *D. flagrans* har snabbast tillväxt vid temperaturer mellan 25-33°C (Morgan *et al.* 1997) och det är vid liknande temperaturer man uppnått högst fångsteffekt (Morgan *et al.* 1997; Grønvold *et al.* 1999; Buske *et al.* 2013). Fernández *et al.* (1999) fann en övre gräns vid 35°C där svampens tillväxt stannade av och dess effekt att minska larvmängd kraftigt sänktes. Vid 10°C är svampens reaktion långsam och tillväxt av fångstnät startade 4 dagar efter närvaro av infektiösa larver, men nätens hållbarhet var längre än vid högre temperaturer, troligen beroende på minskad bakteriell nedbrytning (Grønvold *et al.* 1999).

D. flagrans växer snabbast i en fuktig miljö, men har visat tillväxt även i torr träck. Svampen är ljuskänslig och kräver syre för att växa. Den överlever åtminstone tre veckor i anaerob miljö, men har då en reducerad förmåga att bilda nät när syre tillförs (Grønvold *et al.* 1999).

2.2.3. BioWorma®

Länge fanns ingen kommersiellt tillgänglig produkt som innehåller *D. flagrans*. Idag finns BioWorma® som är ett fodertillskott producerat av International Animal Health Product Pty Ltd. Tillskottet är godkänt för användning i Australien, Nya Zeeland och USA och är under utredning för den europeiska marknaden (IAHP 2020a). BioWorma® innehåller 500 000 klamydosporer/gram av *Duddingtonia*

flagrans IAH 1297 och ges i formen av ett gråbrunt mjöl. Det är framtaget för nöt, häst, får, get och övriga betande djur såsom hjort, alpacka och zoo-djur. Dosen har beräknats till 6 g/100 kg/dag motsvarande 3×10^4 sporer/kg/dag (IAHP 2020a). En dos som är lägre än ett flertal andra studier som annars ligger runt 5×10^5 sporer/kg/dag (Canhão-Dias *et al.* 2020). Det finns inga karenstider för kött eller mjölk tillagda (IAHP 2020a) och produkten har enligt företaget konstaterats säker för djur och människor genom toxikologiska studier och studier med överdos (IAHP 2020b). European Food Safety Authority (EFSA) kunde ej fastställa säkerheten för konsument av produkter från djuret, då de saknar studier på sekundära metaboliter, men ser samtidigt inga tecken på oro från idag tillgängliga studier. De anser även att tillgängliga studier på överdos hos djuren är bristfälliga (Bampidis *et al.* 2020).

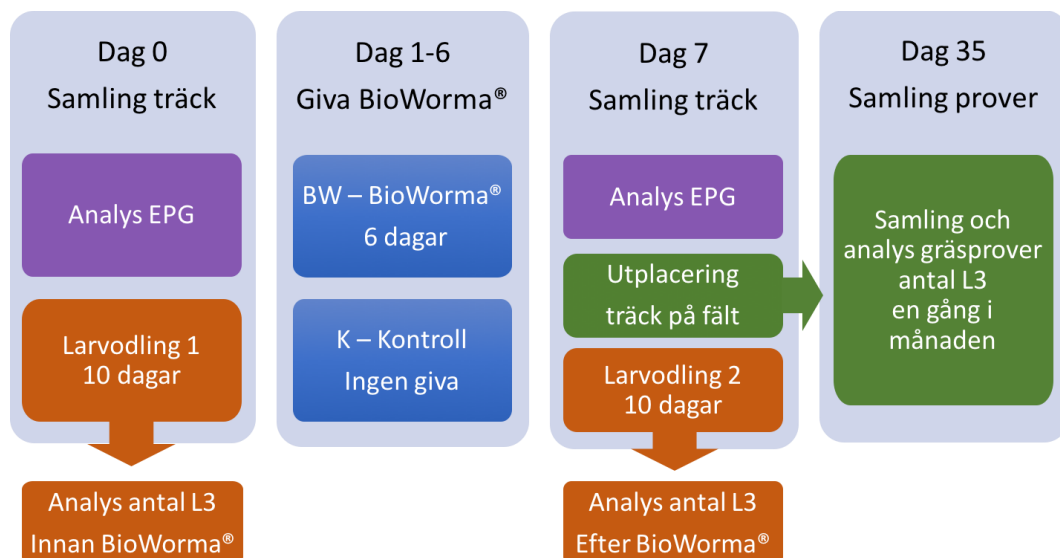
Produkten rekommenderas att ges till betande djur under perioder där klimatförhållanden tillåter parasitär utveckling och migration, vid temperaturer över 5°C. Djuren ska gärna vara avmaskade och flyttas till ett bete med låg parasitbörda (IAHP 2020a). Då svampen är naturligt förekommande kan man ej se några risker för miljön (Bampidis *et al.* 2020). Inga negativa effekter har setts på jordnematoder eller mikroartropoder (IAHP 2020a). Healey *et al.* (2018b) har testat BioWorma®s effekt i fältstudier hos häst, nöt, får och get i olika klimat i Australien. De kunde visa en minskad mängd L3 i gräs runt träck med 53–99 % hos behandlade djur jämför med kontroller.

3. Material och metod

3.1. Studiedesign

Studien utfördes i två omgångar, en på sommaren i juni till september, och en under hösten i september till november. Studierna utfördes på parasitfri mark tillhörande Åby Gård utanför Knivsta.

Hästar naturligt infekterade med strongyloida parasiter (små och stora blodmaskar) delades in i två grupper; en grupp som fick BioWorma® och en kontrollgrupp som ej fick tillskott. Effekten av BioWorma® mättes sedan dels genom att mäta reducering av antal migrerade L3 efter larvodling av träck på laboratorium, samt genom att experimentellt infektera en gräsyta genom att placera ut träckhögar och mäta reducering av L3 i omgivande gräs från BioWorma®-grupp (BW) jämfört med kontrollgrupp (K). På hösten utfördes även en odling för *D. flagrans* på träck och fodertillskottet. För översiktlig studiedesign, se Figur 2.



Figur 2. Översiktlig studiedesign. På sommaren placerades fem träckhögar ut även vid första samlingen för att öka antal kontroller. På hösten utfördes även en odling för *D. flagrans*

3.1.1. Urval och uppdelning av hästar

Via SVA:s parasitkontroll kontaktades tre stall med hästar naturligt infekterade med strongylida parasiter i närheten av Uppsala. Hästarna delades in i två grupper, en grupp som utfodrades med BioWorma® (BW) och en grupp utan fodertillskott, kontrollgrupp (K). Studien genomfördes på sommaren och på hösten. Under sommaren deltog 15 hästar fördelade på tre olika stall varav träck från sju hästar utgjorde kontrollgrupp. På hösten deltog sex hästar från ett stall varav tre hästar ingick i kontrollgrupp. Kontroller valdes ut med en spridning av EPG för att få jämförbara grupper. Alla hästar i studien var vuxna friska hästar i åldrarna (5-15 år) med en uppskattad vikt på 500-600 kg.

3.1.2. Dos BioWorma®

Studiehästarna fick BioWorma® en gång per dag i sex dagar innan samling av träck. Dosen på våren var beräknad enligt BioWorma®s rekommendation för 600 kg häst till 36 gram motsvarande 3×10^4 sporer/kg/dag. På hösten fick hästarna dubbel dos á 72 gram 6×10^4 sporer/kg/dag.

3.2. Analyser och odling på labb

3.2.1. Träckprov EPG

EPG för samtliga hästar beräknades i starten av försöket innan giva av BioWorma® samt vid samling/utplacering av träck. Analys gjordes genom modifierad McMaster teknik med detektionskänslighet på 50 ägg per gram (Coles *et al.* 1992). För extra noggrannhet gjordes det i tre omgångar och ett medelvärde beräknades.

3.2.2. Odling av larver

Odling av larver från varje individ utfördes vid start av försöket samt vid samling/utplacering av träck. Detta skedde genom odling av dubletter med 20 gram träck utblandad med vermikulit enligt metod beskriven av Larsen *et al.* (1996). Proven inkuberades i rumstemperatur i 10 dagar och analyserades sedan för antal L3 med omvänd petriskål metod där larver tilläts migrera under 24 h (Redman 2020). Resultatet presenteras som procentuell andel migrerade larver per ägg enligt formel; $Migration \% = \text{antal } L3 \text{ g}^{-1} / \text{medelvärde EPG} \times 100$.

3.2.3. Odling av *Duddingtonia flagrans*

För att säkerställa att svampsporer passerat igenom magtarmkanalen gjordes på hösten en odling för *Duddingtonia flagrans*. Som provmaterial användes burkarna

med träck använda för larvodling efter att dessa prover samlats. En 10 µl loop dop-pades tio gånger och materialet ströks först ut på en agarplatta med 2 % Difco bacto agar med klortetracyklin (0,02 %). Plattorna inkuberades i 25°C i 10 dagar. På grund av sparsam växt ströks material från plattorna på Saboura-agarplattor med kloramfenikol (%) och inkuberades i 25°C i ytterligare 10 dagar. Svamp från odlingarna undersöktes med ljusmikroskop med 20x förstoring och klamydosporer och konidier jämfördes med bilder från Youssar *et al.* (2019).

3.3. Experimentell infektion gräsyta

Samtliga hästar stod inne en natt på box och träck samlades på morgonen dag 7 i försöket. Träck från varje häst placerades i 2–3 högar á 2,2 kg med 1,5 meters mellanrum på en parasitfri gräsyta där inga hästar betat tidigare. På våren placerades träcken ut 3/6 (tre kontrollhögar placerades ut tidigare 29/5) och på hösten 30/10 2020. Medelvärde av EPG hos de utplacerade träckhögarna hade ingen statistiskt signifikant skillnad, men var högre i BioWorma®-gruppen på sommaren (K: 720, BW: 1096) och något högre i kontrollgruppen på hösten (K: 433,3, BW: 322,2).

3.3.1. L3 gräsprover

Insamling av prover skedde en gång i månaden på förmiddagen med start 4 veckor efter utplacering av träck. 10 tusar gräs klipptes nära mark i område 10–20 cm runt vardera träckhög. Prover från samma häst poolades och antal L3 analyserades med Baermanns trattmetod enligt (Lok 2007). Gräset torkades i 10–14 dagar för att beräkna torrsvikt. Resultatet justerades enligt torrsvikt och presenteras som antal L3/kg gräs.

3.4. Väderdata

Väderdata i studien är hämtade från SMHI. Nederbörds mängd per dygn erhöles från Vassunda väderstation (SMHI 2020a) 2 km från gräsytan. Max, min och medellufttemperatur erhöles från Uppsala Aut väderstation (SMHI 2020b) 15 km från gräsytan.

3.5. Statistisk analys

Data sammanställdes med Microsoft Excel för Mac version 15.30. Den statistiska analysen utfördes med programvaran GraphPad Prism 9 för MacOS version 9.0.0. All data transformerades med log(x) innan analys. För att testa skillnaden mellan

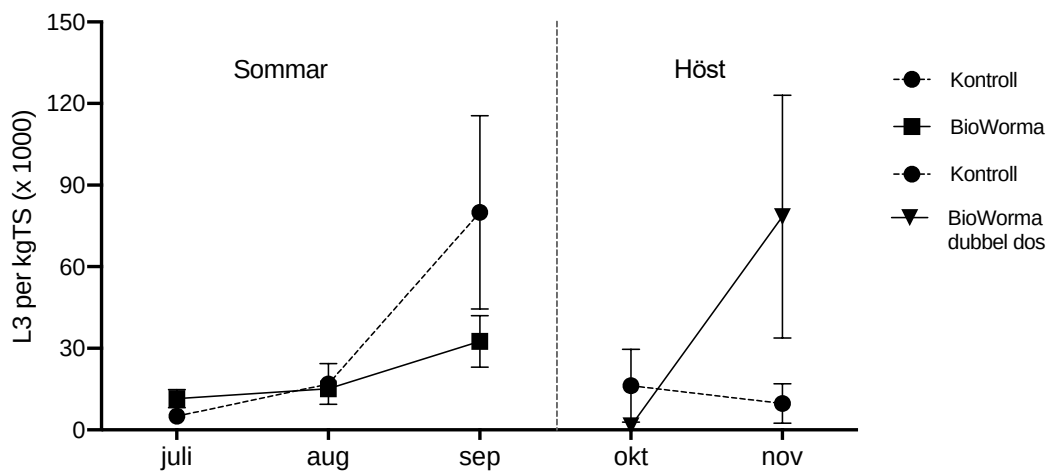
kontrollgrupp och BioWorma®-grupp avseende antal L3 i gräsprover ($L3\text{ kg}^{-1}$) användes t-test med Welch korrektion och en två-vägs ANOVA. Testen jämförde grupperna för varje samlingstillfälle samt för det totala antalet över hela samlingsperioden. Medelvärde och standardfel beräknades för varje grupp vid alla samlings-tillfällen samt det totala antalet för varje grupp.

För att testa skillnaden mellan EPG i utplacerade träckhögar samt den procentuella andelen utvecklade L3 efter odling mellan kontroller och BioWorma®-grupp användes t-test. Signifikansnivån för samtliga tester sattes till $P < 0,05$.

4. Resultat

4.1. L3 gräsprover

Statistisk analys visade ingen signifikant skillnad mellan antal L3 larver i gräsprover i kontrollgruppen jämfört med BioWorma®-gruppen vid signifikansvärde $P < 0,05$ varken på sommar eller höst (Figur 3). I båda studieomgångarna sågs en ökad migration vid det sista samlingstillfället. På sommaren hade kontrollgruppen högst medelvärde vid sista samlingen (Tabell 1), medan det på hösten istället var BioWorma®-gruppen som hade högst medelvärde vid sista samlingen (Tabell 2).



Figur 3. Medelvärde och standardfel för gräsprover insamlade sommar och höst.

Tabell 1. Sammanställning av medelvärde L3 $\pm$ standardfel i gräsprover sommar. Presenteras som L3 kgTS⁻¹

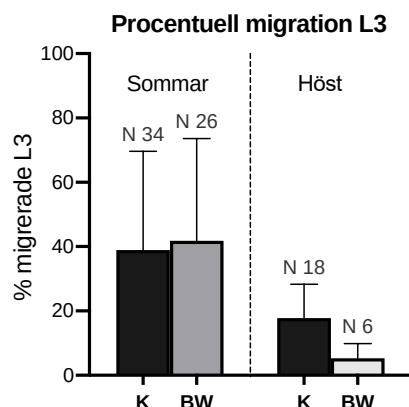
Medelvärde av L3 kgTS ⁻¹ $\pm$ SE i gräsprover sommar					
Grupp	An-tal	Juli	Aug	Sep	Totalt
Kontroll	7	5085.4	16845.2	79994.0	33975.0
		± 1355.3	± 7488.6	± 35547.7	± 13647.0
BioWorma®	13	11444.3	15118.3	32540.0	19701.0
		± 3325.4	± 2572.9	± 9445.3	± 3672.0

Tabell 2. Sammanställning av medelvärde L3 $\pm$ standardfel i gräsprover höst. Presenteras som L3 kgTS⁻¹

Medelvärde av L3 kgTS ⁻¹ $\pm$ SE i gräsprover höst				
Grupp	An-tal	Okt	Nov	Totalt
Kontroll	3	16195.2 $\pm$ 13450.3	9697.0 $\pm$ 7300.4	12946.0 $\pm$ 6997.0
BioWorma®	3	1527.7 $\pm$ 502.2	78420.9 $\pm$ 44590.9	39974.0 $\pm$ 26331.0

4.2. Migration av L3 i laboratoriemiljö

Under laboratorieförhållande utfördes en odling av träcken innan och efter giva av BioWorma® och en procentuell andel av de utvecklade L3, som migrerat från odlingarna ut i petriskålen, per ägg beräknades. På sommaren sågs ingen signifikant reducering av migrerande L3 från odlingarna mellan kontroller och BioWorma®. På hösten (dubbel dos BioWorma®) var det en signifikant skillnad ($P = 0,0003$) mellan kontroller och BioWorma® (Figur 4). Skillnaden var även signifikant om man endast jämförde odlingar från kontrollgrupp och BioWorma®-grupp vid tidpunkt för utplacering av träcken ($P = 0,0228$). I BioWorma®-gruppen sågs då 63,7 % lägre migration av larver ((Kontroll medel – BioWorma® medel) / Kontroll medel $\times$ 100). Vid den dubbla dosen som undersöktes på hösten varierade den procentuella migrationen av L3 i BioWorma®-gruppen mellan 1,9 och 14,3 % med ett medelvärde på 5,3 %. På sommaren där ingen signifikant skillnad kunde ses mellan grupperna varierade migrationsprocenten stort med ett minimumvärde på 2,3 % och ett maximalt värde på 112,7 % i BioWorma®-gruppen.



Figur 4. Medelvärde med standardavvikelse av den procentuella migrationen av L3 från ägg efter odling på labb sommar och höst. På hösten fick hästarna dubbel dos BioWorma®. K – Kontroll, BW – BioWorma®, N – antal prover. I kontrollgrupp inkluderas odlingar från hästar i BioWorma®-gruppen innan start av BioWorma®-giva. Odlingar från varje häst utfördes i dubletter.

4.3. Odling av *Duddingtonia flagrans*

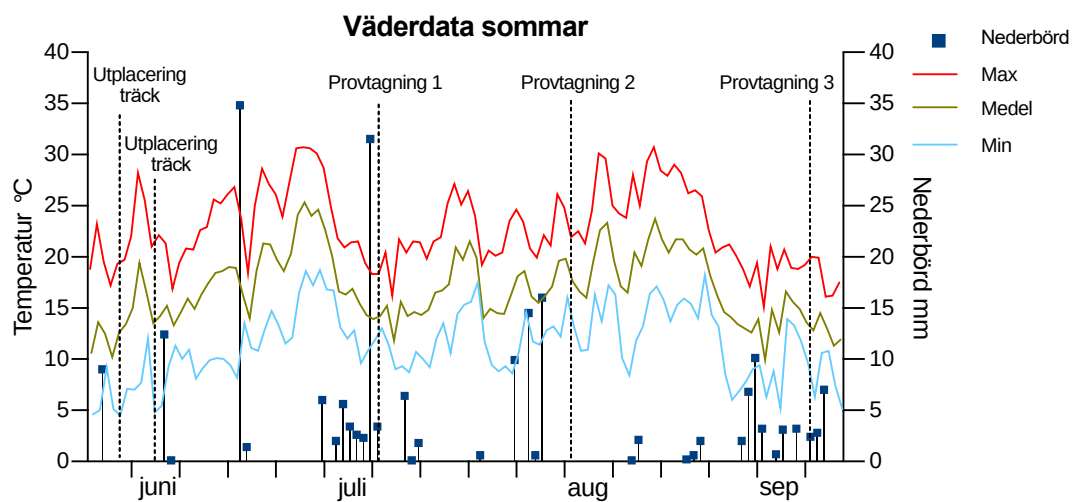
I odling från utstryk av fodertillskottet uppblandat i vatten återfanns både konidier och klamydosporer liknande *D. flagrans* (Figur 5). Makroskopiskt kunde även en svampväxt liknande *D. flagrans* identifieras tillsammans med annan blandflora. I odlingar från hästar som fått BioWorma® kunde ej dessa strukturer identifieras utan endast mycel med blandat utseende. Hos en av individerna var mycelet liknande det som sågs i utstryk från fodertillskottet, men inga strukturer för att identifiera *D. flagrans* hittades. Makroskopiskt kunde ej ett liknande utseende ses hos något av odlingarna från hästarnas träck.



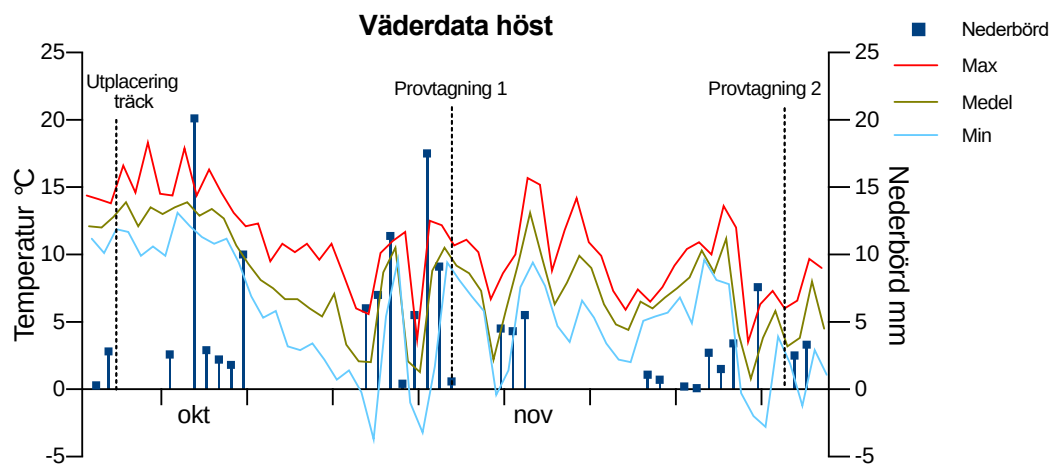
Figur 5. Klamydospor (t.v.) och konidium (t.h.) från odling av BioWorma® på agarplatta.

4.4. Väderanalys

Under sommarförsöket var den lägsta uppmätta temperaturen 4,5°C och maximala temperaturen 30,7°C (figur 6). Under höstens försök inträffade minusgrader innan första och andra samlingen av prover med en lägsta temperatur på -3,7°C (figur 7).



Figur 6. Graf över väderdata sommar. Nederbörds mängd mm/dygn, max-, min- och medeltemperatur. Träckhögar placerades ut 2020-05-29 (5 kontroller) och 2020-06-03 (resterande kontroller samt BioWorma®). Prover samlades tre gånger; 2020-07-06, 2020-08-03 och 2020-09-07



Figur 7. Graf över väderdata höst. Nederbörds mängd mm/dygn, max-, min- och medeltemperatur. Träckhögar placerades ut 2020-09-30. Prover samlades två gånger; 2020-10-27 och 2020-11-23

5. Diskussion

BioWorma® är ett fodertillskott innehållande sporer från rosvampen *Duddingtonia flagrans*, med syfte att minska migration av infektiösa larver från träckhögar till betesmark. Syftet med studien var att utvärdera effekten av BioWorma® för strongylida nematoder hos häst och bedöma dess användbarhet i nordiska förhållanden. Effekten av BioWorma® utvärderades både under naturliga väderförhållande på en experimentellt infekterad gräsyta och i laboratoriemiljö. En gräsyta infekterades experimentellt med träck innehållande ägg av strongylid art från hästar som fått BioWorma® och kontroller utan tillskott. BioWorma® visade ingen signifikant reduktion av migrerande strongylida larver på bete varken på sommaren vid rekommenderad dos 3×10^4 sporer/kg/dag eller på hösten vid dos 6×10^4 sporer/kg/dag. Vid analys av reduktion av migrerande larver under laboratorieförhållande sågs en signifikant reduktion av L3 vid dos 6×10^4 sporer/kg/dag men ingen signifikant reduktion vid dos 3×10^4 sporer/kg/dag. Det är dock viktigt att påpeka att det ingick endast 6 hästar i försöket på hösten jämfört med 15 hästar i försöket på sommaren.

Resultatet i den här studien skiljer sig från studien av BioWorma® av Healey *et al.* (2018b) där en signifikant reduktion mellan 53 till 97 % av larvmigration till gräset sågs i försök på häst i olika säsonger och platser i Australien. Värt att notera är att det finns en intressekonflikt i studien av Healey *et al.* (2018b) då huvudförfattarna arbetar för företaget som producerar BioWorma®.

5.1. Yttre faktorer

Under fältförsöket, när yttre faktorer påverkat proverna, sågs ingen signifikant skillnad i antalet migrerande larver runt träckhögar. Det var till och med en ökad mängd migrerade larver runt träckhögar med BioWorma® som placerades ut på hösten.

Väderförhållanden under sommaren bedöms vara gynnsamma både för larvers migration och tillväxt av *D. flagrans*. Fernández *et al.* (1999) visade en övre gräns där 35°C stoppade svampens tillväxt och kraftigt sänkte dess effekt att minska antalet migrerande larver. Maxtemperaturen under det här försöket var 30,7°C, enligt mätningar från väderstationen, vilket inträffade i juni och augusti. Det kan dock inte uteslutas att temperaturer övergick 35°C i träckhögar då de var placerade i direkt

solljus. Augusti var den torraste perioden, med som längst 12 dagar utan regn i början på månaden. I övrigt var nederbörden spridd över sommaren.

Under fältförsöket på hösten var det kallare och medeltemperaturen sjönk under 5°C flera dagar både i oktober och november, vilket troligtvis påverkat svampen negativt med en mer långsam tillväxt. Grønvold *et al.* (1999) såg en långsam tillväxt av *D. flagrans* redan vid 10°C och Fernández *et al.* (1999) visade låg effektivitet hos svampen vid konstanta temperaturer runt 5–10°C. 20 dagar efter utplacering av träckhögar på hösten uppmättes minusgrader vilket troligen har negativ påverkan på *D. flagrans* effekt. I ett försök med getter, uppmätte Healey *et al.* (2018b) endast 8 % reduktion av migrerade larver till gräs efter att prover utsatts för minusgrader, en minskad effekt jämfört med andra försök utan minusgrader. BioWorma® rekommenderar endast användning av produkten vid temperaturer över 5 grader (IAHP 2020a). Innan provinsamling i oktober inträffade kraftigt skyfall med 17,5 mm och 9,1 mm nederbörd påföljande dag, vilket förstörde träckhögarnas struktur och som kan medfört en ökad mekanisk spridning av larver.

I en experimentell studie av (Grønvold *et al.* 1999) försvann *D. flagrans* nät efter 9 dagar, med snabbare destruktion vid 30°C jämfört med 20°C. De förklarar detta med att en hög mikrobiell aktivitet bryter ner nät och hyfer. Då den mikrobiella aktiviteten i träckhögar är stor vore det intressant att undersöka hur länge svampens nät är effektivt vid fältförhållanden. Teoretiskt skulle effekten kunna minska då kläckningen och utveckling till L3 går långsammare på fält än vid odling av larver på labb, och svampens nät vid tidpunkten för migration kan ha försvagats. Studien av Healey *et al.* (2018b) varade i 8 veckor, en tidsperiod där endast måttlig migration sågs i sommarens försök. Kraftig migration sågs först i september, 13 veckor efter utplacering av träck.

5.2. Dos

Många studier har visat en positiv korrelation mellan dos och effekt, och studien av Healey *et al.* (2018b) avviker med en lägre dos (3×10^4 sporer/kg/dag) jämfört med andra studier där doser mellan 1.5×10^5 och 5×10^6 sporer/kg används (Canhão-Dias *et al.* 2020). Larsen *et al.* (1995) såg ingen effekt vid giva av 10^5 sporer/kg/dag. Hernández *et al.* (2016) använde en mer liknande låg dos på $1,25 \times 10^4$ sporer/kg/dag i sin studie, men hade då kombinerat det med sporer från den ovidala svampen *Mucor circinelloides* och effekten kan därmed inte jämföras helt. Bird & Herd (1995) mätte istället dos-effekt genom att ange dos som en koncentration av antal sporer per ägg. De fann ingen effekt vid 1 spor per ägg utan först vid 10 sporer per ägg och mest effekt vid 100 sporer per ägg. Studien utfördes på labb och att översätta koncentrationen till en giva av antal sporer/kg/dag är inte möjligt, men resultatet visar en positiv dos-effekt korrelation.

I BioWorma® används dock ett annat isolat av *D. flagrans*, IAH 1297, jämfört med andra studier. Healey *et al.* (2018a) menar att skillnaden i effektiv dos kan bero på två saker. Dels att isolatet visat snabbare tillväxt och högre effektivitet än andra jämförda isolat (opublicerade data), samt att produktionen av klamydosporer för BioWorma® maximerar hållbarheten. Silva *et al.* (2013) jämförde två olika isolat av *D. flagrans* (AC001 och CG772) där CG772 visade bättre resultat, men vid statistisk undersökning var skillnaden i effekt ej signifikant. I denna studie sågs en effekt av BioWorma® i laboratoriemiljö vid dubbel dos (6×10^4 sporer/kg/dag). Ingen reduktion i antal L3 i gräs på fält kunde ses, men väderförhållanden var ej gynnsamma för svampen under höstens försök och effekten kan därmed ej bestämmas vid den dosen. Detta höjer frågan om rekommenderad dos på 3×10^4 sporer/kg/dag är för låg. Att ge en dos på 10^5 eller 10^6 sporer/kg/dag av BioWorma® skulle innebära 100 g respektive 1 kg för en 500 kg häst. Maxgivan i denna studie var 72 g/dag. Enstaka hästar visade tveksamhet till fodertillskottet vid första givan, men vande sig vid det under studiens gång. Två hästar som fick 36 g/dag var tveksamma hela studieperioden, men åt vid utblandning med smakligt kraftfoder. Att öka daglig dos är därför begränsat vid nuvarande koncentration och sammansättning av BioWorma®.

Odling av utstryk från fodertillskottet visade tydliga strukturer som artades till *D. flagrans*, men inget försök för att bestämma antal sporer i fodertillskottet utfördes. Det finns därför en möjlighet att antal sporer var lägre än angivet, något som sågs i 3 av 6 batcher i EFSA's undersökning (Bampidis *et al.* 2020). BioWorma® anger en koncentration på 5×10^5 klamydosporer/g medan EFSA's undersökning visade en variation mellan $2,2 \times 10^5$ och 17×10^5 klamydosporer/g (Bampidis *et al.* 2020). Eftersom inga identifierbara strukturer från *D. flagrans* återfanns i odling efter passage genom magtarmkanalen kan det ej helt konfirmeras att svampen befunnit sig i träcken. Klamydosporens förmåga att passera magtarmkanalen har bevisats i ett flertal studier (Larsen *et al.* 1995; Silva *et al.* 2013). Konfirmering i denna studie utfördes endast med ljusmikroskop och en analys med genomsekvensering hade kunnat ge ett mer precist resultat. Möjligheten finns även att sporer missats vid provtagning och utstryk. I en studie av (Hernández *et al.* 2018) blandades 5 g träck med 40 ml vatten och silades i 150 µm. 15 ml lösning centrifugerades i 5 min i 1500 rpm och mikroskopisk undersökning för klamydosporer gjordes på det utspädda sedimentet. Det är en möjlig metod om försöket upprepas då odling ej behövs. Larsen *et al.* (1995) påvisade *D. flagrans* i träcken 24-48h efter giva med 10^5 sporer/kg och tiden ökade vid ökad dos. I denna studie fick hästarna cirka 6×10^4 sporer/kg/dag (uppskattad vikt på hästar) på hösten, vilket teoretiskt sett kan innebära att sporena är närvarande en kortare tid, men eftersom samling av träck skedde inom 24h efter sista giva bör detta ej påverkat.

Hästarna i studien ägdes av privatpersoner och fodertillskottet gavs därmed av deras ägare. För att öka tillförlitligheten blev ägarna tilldelade uppmätta påsar med

daglig dos, samt en tabell att fylla i med tidpunkt för givan, men det finns fortfarande möjlighet att de kan ha missat giva utan att det rapporterats.

5.3. Användbarhet

Då det finns tecken på ökad prevalens av *S. vulgaris* i Sverige (Tydén *et al.* 2019) samt resistens hos små blodmaskar sprids i världen (Peregrine *et al.* 2014) finns ett behov för ett biologiskt alternativ/komplement till avmaskning. En svensk studie av (Hedberg-Alm *et al.* 2020) visade att få hästägare använde sig av alternativa metoder för att hålla nere smittrycket på betet. Majoriteten (64 %) använde sig av skilda vinter och sommarhagar men endast ett fåtal hade blandad eller alternerande betning med andra djurslag (9,8 %). Att mocka hagen, som har beskrivits som ett effektivt sätt att minska parasitbördan (Corbett *et al.* 2014), utfördes av 46,2 % av hästägarna, men endast 7,1 % mockade minst två gånger i veckan och 65,3 % gjorde det mer sällan än en gång i veckan (Hedberg-Alm *et al.* 2020). Studien visade även brister i användandet av träckprovsanalys, där nästan en tredjedel (29 %) ej analyserade träcken och få använde sig av utökade tester för specifika parasiter exempelvis *S. vulgaris* (Hedberg-Alm *et al.* 2020). Att utbilda och sprida information till hästägare om beteshygien och träckprovsanalys är därför en viktig del i kampen mot parasiter.

Canhão-Dias *et al.* (2020) utförde en systematisk review av studier på olika rosvampars effekt på gastrointestinala parasiter hos olika djurslag publicerade 2006 och framåt. *D. flagrans* var den mest studerade svampen (81,1 % av studier), och visade god effekt även i kombination med andra larvicida eller ovicida rosvampar som i studie av Hernández *et al.* (2016). Studierna inkluderade skiljer sig kraftig i studiedesign med olika doser, dosintervall, djurslag och metod att bedöma effekt. Av de 53 studier (7 med *D. flagrans* på häst) som inkluderades var det 9 (17 %) som inte visade någon signifikant effekt jämfört med kontrollgrupp, majoriteten utförda på får (Canhão-Dias *et al.* 2020).

Idag är BioWorma® det enda kommersiellt tillgängliga fodertillskottet innehållande *D. flagrans* och har ännu inte blivit godkänt för användning inom EU. Om ett fodertillskott med bevisad effekt lanseras i Sverige är det troligt att effekten ej håller i sig hela hösten. Eftersom migration av infektiösa larver syntes ända in i november och vid temperaturer lägre än de där *D. flagrans* anses ha effekt, är det också klart att beteshygieniska metoder kommer vara indicerat även vid användning av *D. flagrans*. Tillverkaren av BioWorma® rekommenderar att avmaska djuren innan påbörjad giva för bästa effekt, vilket ej gjordes i denna studie då Sveriges restriktiva avmaskningsstrategi medför att endast hästar med medel till hög parasitbörda avmaskas.

5.4. Studiedesign

Vid en upprepning av studien skulle giva av placebo samt att blinda studien öka tillförlitligheten. Dock är bedömningen och analysen kvantitativ och att studien ej var blindad bör ej ha påverkat slutresultatet. Under sommarens försök hade studien brister genom att kontrollgruppen var betydligt mindre vilket justerades delvis genom att träck från 5 hästar i BioWorma®-gruppen placerades ut innan påbörjad giva och därmed låg på fältet 1 vecka längre. I studien av Healey *et al.* (2018b) utgjorde samtliga kontroller träck från hästar innan giva av BioWorma®. Det positiva med den metoden är att kontrollgrupp och BioWorma® grupp utgörs av samma population, även om EPG kan skilja sig då utsöndringen varierar över tid hos hästarna (Paz-Silva *et al.* 2011). Det negativa är att träckhögar från kontrollgrupp placeras på provytan tidigare vilket kan påverka resultatet om väderförhållanden som exempelvis kraftiga skyfall uppstår.

I proverna sågs en mycket hög variation mellan antal larver mellan provtagningarna. Alla träckhögar utsattes för samma väderförhållanden (förutom 5 kontrollhögar som placerats ut en vecka tidigare), men hade på sommarens försök EPG som varierade mellan 125 och 2325 samt på hösten 66,7 och 866,7. Gräsproverna samlades i 10 tussar i en cirkel runt tre träckhögar som poolades för varje individ. Då man ej kan anta att larverna är jämt spridda runt träckhögen finns en risk för ett något missvisande resultat, även om det jämnas ut genom att poola tre prover. I studien av Healey *et al.* (2018b) klipptes allt gräs runt om och under träckhögen i arean av en 40 cm cirkel vilket ger ett mer exakt resultat. Denna metod kräver därmed lika många högar från varje individ som antal provtillfällen.

I odlingen på labb kunde även där ses en hög variation i migrationen mellan kontrollproverna. Den procentuella migrationen beräknades med ett medelvärde av EPG från träcken, där individuella skillnader mellan triplikaten kunde vara mer än fördubblade. På hösten sågs överlag en lägre procentuell utveckling än väntat med variationer mellan 4,4–39,7 % i kontrollgruppen. Liknande siffror sågs i Bird & Herds (1995) studie med variation mellan 2,9–30,0 %.

5.5. Konklusion

I denna studie kunde ingen effekt av BioWorma® visas vid rekommenderad angiven dos. Vid dubbel dos sågs en signifikant effekt vid odling på labb med en reduktion av migrerande larver med 63,7 %. Dock sågs ingen effekt på fält, vilket kan bero på att nordiska väderförhållanden på hösten är för kalla för tillräcklig tillväxt av svampen. Värt att notera är att *D. flagrans* ej kunde påvisas i träcken efter odling på agarplatta med ljusmikroskopisk undersökning. Det kan därför ej uteslutas att effekten på hösten var slumpartad, trots sin statistiska signifikans.

Vidare studier rekommenderas för att dels konstatera passage av klamydosporer från fodertillskottet då det ej kunde fastställas i studien. Tidigare publicerad forskning samt resultat från denna studie visar tecken på att dosen kan vara för låg för optimal effekt. Eftersom resultatet skiljer sig från tidigare utförd studie på BioWorma® finns belägg för att upprepa försöket för att utesluta att resultatet berodde på en dålig batch av fodertillskottet.

Trots att ingen effekt kunde visas av detta fodertillskott vid rekommenderad angiven dos är användningen av rosvamp som komplement till avmaskning ett intressant ämne för fortsatt forskning, även på andra djurslag än häst.

Inga potentiella intressekonflikter för resultatet kan redovisas hos de medverkande i studien.

Referenser

- Ahren, D., Faedo, M., Rajashekar, B. & Tunlid, A. (2004). Low genetic diversity among isolates of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*: evidence for recent worldwide dispersion from a single common ancestor. *Mycological Research*, 108 (10), 1205–1214.
- Bampidis, V., Azimonti, G., Bastos, M. de L., Christensen, H., Dusemund, B., Durjava, M.K., Kouba, M., López-Alonso, M., Puente, S.L., Marcon, F., Mayo, B., Pechová, A., Petkova, M., Ramos, F., Sanz, Y., Villa, R.E., Woutersen, R., Chesson, A., Coccicelli, P.S., Rychen, G., Wallace, J., Galobart, J., Innocenti, M.L., Brozzi, R. & Saarela, M. (2020). Safety and efficacy of BioWorma® (Duddingtonia flagrans NCIMB 30336) as a feed additive for all grazing animals. *EFSA Journal*, 18 (7), e06208.
- Bellaw, J.L. & Nielsen, M.K. (2020). Meta-analysis of cyathostomin species-specific prevalence and relative abundance in domestic horses from 1975–2020: emphasis on geographical region and specimen collection method. *Parasites & Vectors*, 13(1), 509.
- Bird, J. & Herd, R.P. (1995). In vitro assessment of two species of nematophagous fungi (*Arthrobotrys oligospora* and *Arthrobotrys flagrans*) to control the development of infective cyathostome larvae from naturally infected horses. *Veterinary Parasitology*, 56 (1), 181–187.
- Braga, F.R. & de Araújo, J.V. (2014). Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98 (1), 71–82.
- Buske, R., Santurio, J.M., de Oliveira, C.V., Bianchini, L.A., da Silva, J.H.S. & de la Rue, M.L. (2013). In vitro influence of temperature on the biological control activity of the fungus *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasitology Research*, 112 (2), 473–478.
- Campos, A.K., Araújo, J.V., Guimarães, M.P. & Dias, A.S. (2009). Resistance of different fungal structures of *Duddingtonia flagrans* to the digestive process and predatory ability on larvae of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in goat feces. *Parasitology Research*, 105 (4), 913.
- Canhão-Dias, M., Paz-Silva, A. & Madeira de Carvalho, L.M. (2020). The efficacy of predatory fungi on the control of gastrointestinal parasites in domestic and wild animals—A systematic review. *Veterinary Parasitology*, 283, 109173.
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A. & Waller, P.J. (1992). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44 (1), 35–44.

- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A. & Vercruysse, J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136 (3), 167–185.
- Corbett, C.J., Love, S., Moore, A., Burden, F.A., Matthews, J.B. & Denwood, M.J. (2014). The effectiveness of faecal removal methods of pasture management to control the cyathostomin burden of donkeys. *Parasites & Vectors*, 7 (1), 48.
- Couto, M.C.M., Quinelato, S., Cordeiro, F.C., Sampaio, I.B.M. & Rodrigues, M.L.A. (2011). Migratory dynamics of cyathostomin larvae in a Bermuda grass pasture in South America. *Veterinária Medicina*, 56 (4), 168–172.
- Duncan, J.L. & Pirie, H.M. (1975). The pathogenesis of single experimental infections with *Strongylus vulgaris* in foals. *Research in Veterinary Science*, 18 (1), 82–93.
- Fernández, A.S., Larsen, M., Nansen, P., Grønvold, J., Henriksen, S.A. & Wolstrup, J. (1997). Effect of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* on the free-living stages of horse parasitic nematodes: a plot study. *Veterinary Parasitology*, 73 (3), 257–266.
- Fernández, A.S., Larsen, M., Wolstrup, J., Grønvold, J., Nansen, P. & Bjørn, H. (1999). Growth rate and trapping efficacy of nematode-trapping fungi under constant and fluctuating temperatures. *Parasitology Research*, 85 (8), 661–668.
- Giles, C.J., Urquhart, K.A. & Longstaffe, J.A. (1985). Larval cyathostomiasis (immature trichonema-induced enteropathy): A report of 15 clinical cases. *Equine Veterinary Journal*, 17 (3), 196–201.
- Grønvold, J., Wolstrup, J., Nansen, P., Larsen, M., Henriksen, S.A., Bjørn, H., Kirchheiner, K., Lassen, K., Rawat, H. & Kristiansen, H.L. (1999). Biotic and abiotic factors influencing growth rate and production of traps by the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* when induced by *Cooperia oncophora* larvae. *Journal of Helminthology*, 73 (2), 129–136.
- Healey, K., Lawlor, C., Knox, M.R., Chambers, M. & Lamb, J. (2018a). Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Tracer studies in sheep. *Veterinary Parasitology*, 253, 48–54.
- Healey, K., Lawlor, C., Knox, M.R., Chambers, M., Lamb, J. & Groves, P. (2018b). Field evaluation of *Duddingtonia flagrans* IAH 1297 for the reduction of worm burden in grazing animals: Pasture larval studies in horses, cattle and goats. *Veterinary Parasitology*, 258, 124–132.
- Hedberg-Alm, Y., Penell, J., Riihimäki, M., Osterman-Lind, E., Nielsen, M.K. & Tyden, E. (2020). Parasite occurrence and parasite management in Swedish horses presenting with gastrointestinal disease - A case-control study. *Animals*, 10 (4), 638.
- 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.
- Hernández, J.Á., Sánchez-Andrade, R., Cazapal-Monteiro, C.F., Arroyo, F.L., Sanchís, J.M., Paz-Silva, A. & Arias, M.S. (2018). A combined effort to avoid strongyle infection in horses in an oceanic climate region: rotational grazing and parasiticidal fungi. *Parasites & Vectors*, 11 (1), 240.

- Hutchinson, G.W., Abba, S.A. & Mfitilodze, M.W. (1989). Seasonal translation of equine strongyle infective larvae to herbage in tropical Australia. *Veterinary Parasitology*, 33 (3), 251–263.
- IAHP, I.A.H.P. (2020a). *About BioWorma®®. Usage & efficacy*. <https://www.BioWorma®.com/BioWorma®> [2020-12-11]
- IAHP, I.A.H.P. (2020b). *BioWorma®®. World's first biological control*. <https://www.BioWorma®.com/index.html> [2020-12-11]
- Kaplan, R.M. (2002). Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Veterinary Research*, 33 (5), 491–507.
- Kaplan, R.M. & Vidyashankar, A.N. (2012). An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 186 (1), 70–78.
- 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.
- Larsen, M. (2000). Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology*, 120 (7), 121–131.
- Larsen, M., Nansen, P., Grøndahl, C., Thamsborg, S.M., Grønvold, J., Wolstrup, J., Henriksen, S.A. & Monrad, J. (1996). The capacity of the fungus *Duddingtonia flagrans* to prevent strongyle infections in foals on pasture. *Parasitology*, 113 (1), 1–6.
- Larsen, M., Nansen, P., Henriksen, S.A., Wolstrup, J., Grønvold, J., Zorn, A. & Wedø, E. (1995). Predacious activity of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against cyathostome larvae in faeces after passage through the gastrointestinal tract of horses. *Veterinary Parasitology*, 60 (3), 315–320.
- 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.
- Lindberg, R. (1976). Överlevnad av infektiösa larver av hästens strongylida nematoder i betesgräs. *Svensk Veterinärtidning*, (28), 509–515.
- Lok, J. (2007). *Strongyloides stercoralis*: a model for translational research on parasitic nematode biology. *WormBook*. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.134.1>
- Love, S., Murphy, D. & Mellor, D. (1999). Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary Parasitology*, 85 (2), 113–122.
- Mfitilodze, M.W. & Hutchinson, G.W. (1987). Development and survival of free-living stages of equine strongyles under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology*, 23 (1), 121–133.
- Mirck, M.H. (1981). An investigation into the epidemiology of Strongylidae infections in the horse in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, 3 (2), 98–100.
- Morgan, M., Behnke, J.M., Lucas, J.A. & Peberdy, J.F. (1997). In vitro assessment of the influence of nutrition, temperature and larval density on trapping of the infective larvae of *Heligmosomoides polygyrus* by *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium megalosporum*. *Parasitology*, 115 (3), 303–310.
- Nielsen, M.K., Banahan, M. & Kaplan, R.M. (2020). Importation of macrocyclic lactone resistant cyathostomins on a US thoroughbred farm. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 14, 99–104.

- Nielsen, M.K., Jacobsen, S., Olsen, S.N., Bousquet, E. & Pihl, T. (2016). Nonstrangulating intestinal infarction associated with *Strongylus vulgaris* in referred Danish equine cases. *Equine Veterinary Journal*, 48 (3), 376–379.
- 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. (2018). *Handbook of Equine Parasite Control*. Newark, United States: John Wiley & Sons, Incorporated. <http://ebookcentral.proquest.com/lib/slub-ebooks/detail.action?docID=5334161>
- Nielsen, M.K., Sauermann, C.W. & Leathwick, D.M. (2019). The effect of climate, season, and treatment intensity on anthelmintic resistance in cyathostomins: A modelling exercise. *Veterinary Parasitology*, 269, 7–12.
- Nielsen, M.K., Vidyashankar, A.N., Olsen, S.N., Monrad, J. & Thamsborg, S.M. (2012). *Strongylus vulgaris* associated with usage of selective therapy on Danish horse farms - Is it reemerging? *Veterinary Parasitology*, 189 (2), 260–266.
- Paz-Silva, A., Francisco, I., Valero-Coss, R.O., Cortiñas, F.J., Sánchez, J.A., Francisco, R., Arias, M., Suárez, J.L., López-Arellano, M.E., Sánchez-Andrade, R. & de Gives, P.M. (2011). Ability of the fungus *Duddingtonia flagrans* to adapt to the cyathostomin egg-output by spreading chlamydospores. *Veterinary Parasitology*, 179 (1), 277–282.
- 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.
- Pihl, T.H., Nielsen, M.K., Olsen, S.N., Leifsson, P.S. & Jacobsen, S. (2018). Nonstrangulating intestinal infarctions associated with *Strongylus vulgaris*: Clinical presentation and treatment outcomes of 30 horses (2008–2016). *Equine Veterinary Journal*, 50 (4), 474–480. <https://doi.org/10.1111/evj.12779>
- Redman, E. (2020). *Parasite Protocols*. <https://www.nemabiome.ca/parasite.html> [2020-11-11]
- Reid, S.W.J., Mair, T.S., Hillyer, M.H. & Love, S. (1995). Epidemiological risk factors associated with a diagnosis of clinical cyathostomiasis in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 27 (2), 127–130.
- 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.
- Sangster, N.C. (1999). Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins? *Veterinary Parasitology*, 85 (2), 189–204.
- Silva, M.E. da, Araújo, J.V. de, Braga, F.R., Freitas Soares, F.E. de, Rodrigues, D.S., Silva, M.E. da, Araújo, J.V. de, Braga, F.R., Freitas Soares, F.E. de & Rodrigues, D.S. (2013). Control of infective larvae of gastrointestinal nematodes in heifers using different isolates of nematophagous fungi. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22 (1), 78–83.
- SMHI (2020a). *Ladda ner meteorologiska observationer*. <https://www.smhi.se/data/meteorologi/ladda-ner-meteorologiska->

- observationer/#param=precipitation24HourSum,stations=all,stationid=97480 [2020-10-22]
- SMHI (2020b). *Ladda ner meteorologiska observationer | SMHI*.
<https://www.smhi.se/data/meteorologi/ladda-ner-meteorologiska-observationer/#param=airTemperatureMinAndMaxOnceEveryDay,stations=all,stationid=97510> [2020-10-22]
- SVA (2020a). *Avmaskning av häst*. <https://www.sva.se/djurhalsa/djursjukdomar-a-o/avmaskning-av-hast/> [2020-10-06]
- SVA (2020b). *Minska parasitsmitta i hagarna - Betesplanering och andra metoder*.
<https://www.sva.se/sport-och-sallskapsdjur/hast/parasiter-hos-hast/minska-parasitsmitta-i-hagarna-betesplanering-och-andra-metoder/> [2020-10-06]
- Taylor, M.A., Coop, R.L. & Wall, R.L. (2007). *Veterinary Parasitology*. 3rd edition. Blackwell Publishing Ltd.
- Tydén, E., Enemark, H.L., Franko, M.A., Höglund, J. & Osterman-Lind, E. (2019). Prevalence of *Strongylus vulgaris* in horses after ten years of prescription usage of anthelmintics in Sweden. *Veterinary Parasitology*: X, 2, 100013.
- Van Wyk, J.A. (2001). Refugia - Overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68 (1), 55–67.
- Yeates, G.W., Dimander, S.-O., Waller, P.J. & Höglund, J. (2002). Environmental impact on soil nematodes following the use of the ivermectin sustained-release bolus or the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* to control nematode parasites of cattle in Sweden. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A — Animal Science*, 52 (4), 233–242.
- Youssar, L., Wernet, V., Hensel, N., Yu, X., Hildebrand, H.-G., Schreckenberger, B., Kriegler, M., Hetzer, B., Frankino, P., Dillin, A. & Fischer, R. (2019). Intercellular communication is required for trap formation in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *PLOS Genetics*, 15 (3), e1008029.

Populärvetenskaplig sammanfattning

Blodmaskar hos häst är parasiter som lever i hästens mag-tarmkanal och sprids på betet via ägg i träcken. Äggen kläcks och larverna utvecklas och migrerar sedan ut i gräset där hästar infekteras vid betning. De små blodmaskarna finns hos nära 100 % av Sveriges hästar och kan vid hög förekomst orsaka sjukdom. Det finns även stora blodmaskar som kan orsaka kolik och bukhinneinflammation hos häst. Frekvent avmaskning kan leda till resistensutveckling, något man sett sprids hos de små blodmaskarna. Då utvecklingen av nya avmaskningspreparat går långsamt får alternativa metoder för att sänka parasittrycket allt mer relevans.

BioWorma® är ett fodertillskott innehållande sporer från rosvampen *Dudding-tonia flagrans* som kan ges till häst och även andra djurslag. Idag är det inte tillgängligt i EU, men används i exempelvis Australien och USA. Tillverkarna beskriver det som en biologisk form av parasitkontroll, vilket kan användas som ett komplement till avmaskning. *D. flagrans* har visat lovande resultat i ett flertal studier på olika djurslag och kan minska antalet infektiösa larver från parasitära rundmaskar (såsom hästens blodmaskar) på betet genom att bilda ett klistrigt nät i träcken som fångar de infektiösa larverna. Syftet med studien är att undersöka BioWorma®s effektivitet att förhindra strongylida nematoders migration till betet och bedöma dess användbarhet som parasitkontroll i nordiska förhållanden.

Studien utfördes i två omgångar, en på sommaren och en på hösten. Försökshestarna delades in i en kontrollgrupp och en grupp som fick BioWorma® i rekommenderad dos i 6 dagar på sommaren, och dubbel dos på hösten. I laboratorium utfördes en odling av träcken från samtliga hästar innan och efter giva av BioWorma®. Efter 14 dagar, när larverna antas utvecklats till sitt infektiösa stadie, gjordes en samling av larver som lyckats migrera ut från träcken i vattenbad. Antal samlade larver per ägg beräknades. För att testa effekt vid påverkan av svenska väderförhållanden utfördes en experimentell infektion av en tidigare parasit-fri gräsyta. Tre träckhögar à 1,2 kg från varje häst i kontroll- och BioWorma®-grupp placerades ut. Gräsprover samlades sedan runt högarna en gång i månaden och antalet infektiösa larver per kilo gräs beräknades. För att se hur väderförhållanden påverkade sammanställdes temperatur och nederbörd varje dag i mätningar från SMHI. Effekten av BioWorma® bedömdes genom att jämföra antal infektiösa larver i prover från gräs och träckodlingar samlade hos kontroll och BioWorma®-

grupp. På hösten utfördes även en odling på agarplatta för *D. flagrans* från träck och BioWorma® för att säkerställa passage av svampen.

I denna studie kunde ingen effekt av BioWorma® visas vid rekommenderad angiven dos. Vid dubbel dos sågs en signifikant effekt vid odling på laboratorium med en 63,7 % reducering av migrerade larver. Dock sågs ingen effekt på fält, vilket kan bero på att nordiska väderförhållanden på hösten är för kalla för tillräcklig tillväxt av svampen. Väderförhållandena på sommaren bedömdes goda, med temperaturer innanför de gränser *D. flagrans* visat tillväxt.

Dosen av sporer i tillskottet vid rekommenderad angiven dos är betydligt lägre än doser i tidigare publicerade studier, och resultatet från denna studie visar tecken på att dosen kan vara för låg för optimal effekt. *D. flagrans* ej kunde påvisas i träcken vid odling på agarplatta med mikroskopisk undersökning, vilket kan bero på brister i utförandet, eller att dosen är för låg för tillräcklig passage av sporer. Eftersom ingen passage av sporer kunde fastställas kan det inte uteslutas att effekten på hösten var slumpartad, trots sin statistiska signifikans. Eftersom resultatet skiljer sig från tidigare utförd studie på BioWorma® finns belägg för att upprepa försöket för att utesluta att resultatet berodde på en dålig batch av fodertillskottet.

Trots att ingen effekt kunde visas av detta fodertillskott vid rekommenderad angiven dos är användningen av rosvamp som komplement till avmaskning ett intressant ämne för fortsatt forskning, även på andra djurslag än häst.