



Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

# Mekanismer bakom bensimidazolresistens

*Monika Domberg*



---

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2011: 19

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2011

---





Sveriges lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

## Mekanismer bakom bensimidazolresistens

Mechanisms of benzimidazole resistance

*Monika Domberg*

**Handledare:**

Johan Höglund, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap  
Eva Tydén, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Examinator:**

Mona Fredriksson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Nivå:** Grund, G2E

**Utgivningsort:** SLU Uppsala

**Utgivningsår:** 2011

**Omslagsbild:** Sylvia Duckworth

**Serienamn, delnr:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2011: 19  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

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

**Nyckelord:** Anthelmintikaresistens, mekanismer, bensimidazol, tubulin, *Haemonchus contortus*, cyathostomer.

**Key words:** Anthelmintic resistance, mechanisms, benzimidazole, tubulin, *Haemonchus contortus*, cyathostomins.



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING .....	1
SUMMARY .....	2
INLEDNING .....	3
MATERIAL OCH METODER .....	3
LITTERATURÖVERSIKT .....	3
Benzimidazol .....	3
Hur utbredd är resistensen? .....	4
Resistensmekanismer hos <i>Haemonchus contortus</i> .....	4
<i>Genetiska förändringar och polymorfism</i> .....	4
<i>Mutation i kodon 200</i> .....	6
<i>Mutation i andra kodoner</i> .....	6
<i>P-glykoproteiner</i> .....	7
Resistensmekanismer hos hästens cyathostomer .....	7
<i>Betydelsen av mutation i kodon 200</i> .....	7
<i>Mutation i kodon 167</i> .....	8
DISKUSSION .....	8
LITTERATURFÖRTECKNING .....	11

## SAMMANFATTNING

Anthelmintikagruppen bensimidazoler (BZ) har använts på många djurslag sedan början av 1960-talet. BZ verkar genom att hindra  $\alpha\beta$ -tubulin dimerer att bygga på mikrotubuli. Cellernas cytoskelett bryts då ner vilket hämmar många viktiga funktioner som exempelvis förmågan till celledelningar. Att BZ är lågt toxiska mot värdjuret har gjort dem populära, men den frekventa användningen har lett till resistensutveckling hos många nematodararter. De nematoder där resistensen är mest utbredd är *Haemonchus contortus* hos får och inom gruppen cyathostomer hos häst. Det finns i dagsläget allt färre besättningar där BZ har tillräcklig effekt mot dessa parasiter. För att motverka fortsatt resistensutveckling behövs mer kunskap om de underliggande mekanismerna. I denna litteraturgenomgång har nuvarande kunskap om resistensmekanismerna mot BZ hos *H. contortus* och cyathostomerna sammanställts för att ge en överblick av vad vi vet idag. Mekanismerna bakom resistensen hos *H. contortus* är de mest studerade och där har en mutation i kodon 200 i  $\beta$ -tubulin isotyp 1-genen visats vara korrelerad till resistensen. Mutationen, F200Y, gör att tyrosin uttrycks istället för fenylalanin vilket minskar antalet bindningar mellan tubulin och BZ. Hos maskar som saknar mutationen i kodon 200 har istället en mutation i kodon 167 eller 198 upptäckts och även dessa anses vara kopplade till resistensen hos *H. contortus*. Hos hästens cyathostomer är inte kopplingen mellan mutationen F200Y och resistensen lika stark som hos *H. contortus* och det har visats att resistent isolat kan sakna denna mutation. Samma substitution som setts i kodon 200 har här setts i kodon 167 så att den då kodat för tyrosin istället för fenylalanin och detta verkar vara kopplat till fenbendazolresistens. Även om framsteg har gjorts inom området så krävs mer forskning för att helt förstå mekanismerna bakom resistensen mot bensimidazoler.

## SUMMARY

The benzimidazole (BZ) anthelmintics have since the early 1960's been used in a lot of different species for treatment of gastrointestinal parasites. They inhibit the dimer of  $\alpha\beta$ -tubulin to attach to microtubules which cause depolymerisation of the microtubules and the cytoskeleton is degraded. This affects many essential functions in the cell, resulting in death of the parasite. The low toxicity of BZ to the host made them popular but frequent use has led to resistance in many nematode species. The resistance is most widespread among *Haemonchus contortus* in sheep and cyathostomins in horses. Nowadays, there are no farms where benzimidazole is still acceptably effective against the above mentioned nematodes. Knowledge about the underlying mechanisms of resistance is needed to develop effective anthelmintic drugs. In this literature review the present knowledge about the mechanisms of BZ-resistance in *H. contortus* and the cyathostomins have been compiled to give an overview of what we know today. The resistance mechanisms are most studied in *H. contortus* where a mutation in codon 200 in the  $\beta$ -tubulin isotype 1 gene has been shown to be strongly correlated to the resistance. This mutation, F200Y, leads to an expression of tyrosine instead of phenylalanine which is considered to decrease the number of bonds between BZ and  $\beta$ -tubulin. In worms that lack the mutation in codon 200, mutations in codon 167 or 198 have been identified and these are also considered to be correlated to the resistance. The link between the mutation F200Y and resistance is not as strong in the cyathostomins as in *H. contortus* and it has been shown that some resistant isolates even lack this mutation. The same substitution, which has been seen in codon 200, has instead been detected in codon 167 and this seems to be correlated to fenbendazole resistance in the cyathostomins. Although great insights have been gained more research is needed to fully understand the underlying mechanisms of resistance.

## INLEDNING

Anthelmintikaresistensen blir allt mer utbredd och i många delar av världen är det ett allvarligt problem, speciellt hos parasitiska nematoder hos små idisslare. Anthelmintika har använts rutinmässigt mot gastrointestinala parasiter under många årtionden och felanvändning, till exempel underdosering, har selekterat fram resistenta arter. Ett av de äldsta kända resistensproblemen finns beskrivet hos *Haemonchus contortus*, den stora löpmagsmasken hos får, där resistensen mot preparat inom gruppen benzimidazoler (BZ) är utbredd. Även bland de små blodmaskarna, cyathostomerna, som är bland de viktigaste sjukdomsframkallande parasiterna hos vuxna hästar, är BZ-resistensen hög. Kunskap om mekanismerna bakom resistensen kan hjälpa forskarna att utveckla effektiva anthelmintika samt hjälpa veterinärer att ordinera rätt typ av BZ efter resistensbedömning. Syftet med denna kandidatuppsats är att titta närmare på mekanismerna bakom BZ-resistensen hos ovan nämnda nematoder. Vad vet vi egentligen om de bakomliggande orsakerna till resistensen?

## MATERIAL OCH METODER

Sökning efter artiklar har gjorts i databaserna Web of Knowledge, PubMed, Scopus och Google Scholar. De sökord som huvudsakligen använts är *anthelmintic resistance*, *benzimidazole resistance*, *mechanism*, *tubulin*, *Haemonchus contortus*, *cyathostomins*, *horse\** och *sheep\** i olika kombinationer. Artiklar hittades även via referenslistor i intressanta originalartiklar och reviews och via databasernas funktion som rekommenderar relaterade artiklar. Utöver artiklar så har lärobok i veterinärmedicinsk parasitologi och Fass Vet. använts.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Benzimidazol

BZ är en grupp bredspektrumverkande anthelmintika där flera olika substanser ingår, bland annat fenbendazol, albendazol, tiabendazol, mebendazol och oxibendazol. De används framförallt för behandling vid gastrointestinala nematodinfektioner (Taylor et al., 2007). I Sverige finns albendazol (Valbazen vet.), fenbendazol (Axilur vet.), oxfendazol (Systemex vet.) och flubendazol (Verminator vet. och Flubenol vet.) registrerade för veterinärmedicinskt bruk (Fass Vet., 2011).

BZ anses ha effekt på parasiter genom att de binder till tubulin och därmed hindrar uppbyggnaden av mikrotubuli. Den hämmande effekten sker genom att dimerer av  $\alpha$ - och  $\beta$ -tubulin inte kan bygga på mikrotubuli i den ena änden medan degraderingen fortsätter i den andra. Detta leder till att mikrotubuli till sist bryts ned. Mikrotubuli är en del av cellens cytoskelett och är essentiellt för den eukaryota cellens normala funktioner såsom till exempel celledelning varför nedbrytning leder till att parasiten slutligen dör. BZ är lågt toxiska för däggdjur och studier har visat att de BZ som används har betydligt högre affinitet för nematodtubulin än tubulin från mammala celler (Lacey, 1994).



Det finns flera former av  $\beta$ -tubulin och hos *H. contortus* har två isotyper identifierats; isotyp 1 och 2. De två isotyperna skiljer sig i karboxylterminalen (Geary, 1992). Hos cyathostomer däremot kunde inte flera isotyper av  $\beta$ -tubulin påvisas när  $\beta$ -tubulingenen studerades av Pape et al. (2002). Senare fann dock Clark et al. (2004) en  $\beta$ -tubulin isotyp 2 hos två vanliga cyathostomarter, *Cylicocyclus nassatus* och *Cyathostomum catinatum*. De visade att de isolerade isotyp 2-sekvenserna var 96 % respektive 95 % lika isotyp 2-sekvenserna från *Trichostrongylus colubriformis*, *Cooperia oncophora* och *H. contortus*. Båda isotyp 2-sekvenserna innehöll den isotyps specifika karboxylterminalen som tidigare beskrivits hos nematoder.

### **Hur utbredd är resistensen?**

Den allra första bensimidazolen, tiabendazol, lanserades 1961, men bara några år därefter rapporterades de första fallen av minskad effekt vid behandling med rekommenderad dosering mot *H. contortus* hos får (Conway, 1964). Motsvarande rapporter för cyathostomer hos häst kom 1965 (Kaplan, 2004).

Sedan dess är det visat hos både får, getter och hästar att resistensen är så hög hos flera trichostrongylider (det vill säga nematoder hos idisslare) liksom hos cyathostomer att det idag endast finns ett fåtal besättningar där BZ fortfarande har en acceptabelt hög effekt. I flera länder, särskilt på södra halvklotet, finns det exempel på trichostrongylider som är resistenta mot alla klasser anthelmintika. Detta hotar produktion med små idisslare i vissa regioner av Sydafrika, Malaysia, Sydamerika och sydöstra USA (Kaplan, 2004). Resistensen har länge varit låg hos nötkreatur men det har under senare år kommit allt fler rapporter om BZ-resistens även hos detta djurslag i Argentina, USA, Nya Zeeland och Brasilien. De nematoder som nämnts mest frekvent i dessa rapporter är *Cooperia spp.*, *Haemonchus spp.* och *Ostertagia spp.* (Sutherland & Leathwick, 2010).

### **Resistensmekanismer hos *Haemonchus contortus***

Resistensmekanismerna hos *H. contortus* hos får är bland de mest och bäst undersökta. En studie av Lubega och Prichard (1991) visade att BZ-känsliga maskar band mer BZ-substans per mg maskprotein än BZ-resistenta och att bindningar med hög affinitet minskade hos resistenta isolat. Detta anses vara det första beviset på att BZ-resistens hos *H. contortus* är associerat med en förändring hos  $\beta$ -tubulin.

### **Genetiska förändringar och polymorfism**

Roos et al. (1990) undersökte BZ-känsliga och -resistenta isolat av *H. contortus* från olika geografiska områden med en rad olika metoder. Det visade sig att de känsliga isolaten hade ett lägre ED<sub>50</sub> i en så kallad "egg-hatch test" (EHT) och högre bindning mellan L3-proteiner och mebendazol än de resistenta isolaten. De känsliga isolaten visade 2-6 DNA-fragment vid RFLP-analys (restriction fragment length polymorphism) med  $\alpha$ - och  $\beta$ -tubulin prober vilket även de resistenta gjorde med  $\alpha$ -tubulinproben. De resistenta isolaten visade däremot endast 1-2 DNA-fragment med  $\beta$ -tubulinproben vilket är färre fragment än vad de känsliga isolaten uppvisade. Ingen koppling av BZ-känslighet eller -resistens med  $\alpha$ -tubulin kunde dock ses. I

studien gjordes även ett *in vitro*-experiment med ett BZ-känsligt isolat som hade selekterats fram i laboratorium innan BZ släpptes på marknaden. Experimentet visade att individerna från detta isolat efter endast två selektionssteg, med ökande doser av tiabendazol, blev resistent.

I samma studie utförde Roos et al. (1990) en DNA-analys av vuxna hanar vilken visade att antalet DNA-fragment som reagerade med  $\beta$ -tubulin proben varierade inom det BZ-känsliga isolatet från ett till fyra. Det selekterade isolatet visade däremot bara upp ett specifikt fragment. Detta fragment sågs dock även hos vissa individer i det känsliga isolatet, i kombination med andra fragment, vilket enligt författarna tyder på att de alleler som ger BZ-resistens fanns hos *H. contortus* redan innan substanserna började användas, vilket i sig skulle kunna förklara den mycket snabba selektionen för resistens som noterats i fält.

Samma BZ-känsliga isolat av *H. contortus* (isolerat innan BZ kom ut på marknaden) användes även i en studie av Kwa et al. (1993) för att undersöka om tidigare förvärvad resistens hos ett isolat ökade vid fortsatta selektionssteg. Isolatet hade när studien startade genomgått två selektionssteg och två ytterligare genomfördes med ökande doser tiabendazol vilket resulterade i ökande resistens för varje selektionssteg. RFLP analysen visade att alleler som kodar för  $\beta$ -tubulin isotyp 2 inte var detekterbara hos det mest selekterade isolatet. Dessutom utfördes en analys av åtta resistent och två känsliga isolat från olika geografiska områden för att utreda betydelsen av förlust av isotyp 2-gener hos resistent populationer från fältet. Det visade sig, även i detta försök, att isolatet med högst resistens saknade eller endast hade ett lågt antal isotyp 2-alleler. Forskarnas slutsats av studien blev att resistensutvecklingen sannolikt består av flera mekanismer varav förändringar i  $\beta$ -tubulingenen endast är en förklaring. Vid låggradig resistens sker selektion av vissa alleler som kodar för isotyp 1 medan vid selektion för högre resistensnivåer slås de individer ut som bär på isotyp 2-alleler från populationen. I slutändan blir de som enbart bär på alleler för isotyp 1 kvar. Både individer utan isotyp 2-alleler och individer med de speciella isotyp 1-allelerna antas finnas normalt i populationen då det studerade isolatet inte har exponerats för BZ tidigare.

Skillnader hos  $\beta$ -tubulingener hos både BZ-känsliga och – resistent isolat av *H. contortus* undersöktes även av Beech et al. (1994). De visade att de känsliga isolaten hade en stor variation av alleler i båda lokus (isotyp 1 och 2), medan de resistent isolaten hade en betydligt lägre variation och med en ökad frekvens av vissa specifika alleler. I detta fall hade de resistent isolaten selekterats med två olika BZ, cambendazol och tiabendazol, men liknande förändringar i allelfrekvens hade skett i båda lokus oavsett preparat. En allel som representerar en deletion av åtminstone delar av isotyp 2-lokus minskade i frekvens hos resistent individer, vilket enligt författarna borde tyda på att den är kopplad till BZ-känslighet och inte BZ-resistens. Denna forskningsgrupp påstår att de har bevis på att  $\beta$ -tubulin isotyp 1 och 2 representerar specifika lokus och att specifika alleler hos isotyp 1 och isotyp 2 lokus är inblandade i BZ-resistensen. De anser även att de har visat att de alleler som är starkast kopplade till resistensen fanns i *H. contortus*-populationer redan innan BZ började användas.

### **Mutation i kodon 200**

Efter flera studier där skillnader i genomet hos BZ-känsliga och -resistenta isolat hade studerats var det möjligt att mer detaljerat beskriva vad resistensen orsakas av. Exempelvis Kwa et al. (1994) visade på ett tydligt samband mellan BZ-resistens och en mutation hos en enda nukleotid i kodon 200 i  $\beta$ -tubulin isotyp 1-genen som leder till att tyrosin uttrycks istället för fenylalanin (F200Y). Exakt samma mutation i kodon 200 förekom hos alla ditintills testade isolat av *H. contortus* oavsett geografiskt ursprung. Genom att använda den frilevande nematoden *Caenorhabditis elegans* som modell studerade Kwa et al. (1995) mekanismerna för BZ-resistens hos *H. contortus*. De injicerade alleler som kodade för fenylalanin respektive tyrosin i kodon 200 från *H. contortus* i *C. elegans* och undersökte sedan känsligheten hos de genmodifierade individerna. Resultatet blev att de såg en ökad känslighet för BZ hos de genmodifierade individerna med fenylalanin vilket ytterligare styrker att mutationen F200Y i  $\beta$ -tubulin isotyp 1-genen är inblandad i BZ-resistensen hos *H. contortus*.

Robinson et al. (2004) har försökt ta reda på vad det är som ger minskat antal bindningar mellan BZ och tubulin hos resistenta maskar och har därför studerat  $\alpha\beta$ -tubulin dimerens struktur. Atomstrukturen för dimeren visar att position 200 och andra positioner som anses vara korrelerade till BZ-resistens bildar ett kluster som är inbäddat i proteinet och som därmed skyddas. För att BZ ska kunna binda till den del som forskarna anser är bindningsstället så måste proteinet öppnas, och en teori för hur detta sker är att sidokedjor på de ytliga aminosyrorna flyttas varefter BZ kan komma in i proteinet. En teori om hur mutationen i kodon 200 påverkar bindningarna är att tyrosin, istället för fenylalanin, i position 200 kan bilda en vätebindning med serin i position 165 tack vare sin sidokedja. Denna vätebindning hindrar då BZ från att nå bindningsstället.

Höglund et al. (2009) gjorde en studie i Sverige där de undersökte resistensläget i fårbesättningar. 1330 faecesprov togs från 90 flockar på 45 gårdar och behandlingseffekten mättes med FECRT. Två molekylära tester, PCR för att identifiera *H. contortus* och pyrosekvensering för att mäta frekvensen av mutationen F200Y i  $\beta$ -tubulingenen, utfördes också. De nematoder som påträffades till störst andel i proverna var *Teladorsagia* och *Trichostrongylus* men *H. contortus* hittades i 37 % av flockarna. Två av flockarna visades vara kliniskt BZ-resistenta enligt FECRT och de hade 100 % frekvens av mutationen F200Y. I kontrast till detta var allelfrekvensen av mutationen även hög (> 81 %) hos två flockar där ingen klinisk resistens kunde detekteras med FECRT.

### **Mutation i andra kodoner**

Utöver kodon 200 föreslår Ghisi et al. (2007) att även mutationer i kodon 198 i  $\beta$ -tubulingenen är korrelerade till BZ-resistens hos *H. contortus*. De visade att 90 % av de resistenta isolat från Sydafrika och Australien som inte uppvisade mutation i kodon 200 istället hade en mutation i kodon 198 (E198A), som ledde till att alanin uttrycktes istället för glutamat. Mutationen hittades inte hos BZ-känsliga isolat eller isolat med mutationen F200Y. Som slutsats föreslog de att även kodon 198 bör ingå i tester som görs för att undersöka resistensläget hos *H. contortus* på fält. Denna upptäckt stärks av Rufener et al. (2009) som

selektade fram resistent *H. contortus in vitro* och därefter såg att nukleotiderna som kodar för glutamat i kodon 198 i isotyp 1, och delvis även isotyp 2, försvann från genpoolen vid användning av tiabendazol. Hos de överlevande, resistent, maskarna fanns istället nukleotiderna som kodar för alanin i kodon 198.

Silvestre och Cabaret (2002) undersökte dessutom om en mutation i kodon 167 hos  $\beta$ -tubulin isotyp 1 har någon inverkan på BZ-resistens hos olika trichostrongylider från fältet. De såg att mutationen F167Y, som leder till att fenylalanin byts ut mot tyrosin, bara hittades hos tre av 29 resistent franska fältisolat, varav två var *H. contortus* och ett *Teladorsagia circumcincta*. Ingen av dessa maskar var muterade i kodon 200. Forskarna menar att mutationen F200Y i  $\beta$ -tubulin isotyp 1-genen är den mest betydande genetiska mekanism som leder till BZ-resistens i fält men att mutationen F167Y kan spela en roll vid avsaknad av F200Y.

### ***P-glykoproteiner***

P-glykoprotein (P-gp) är ett transportprotein som sitter i cellmembranet hos i princip alla organismer och hos *H. contortus* är det framförallt kopplat till resistens mot ivermektin. För att undersöka om mutationer i den gen som kodar för P-gp är korrelerat till BZ-resistens gjorde Blackhall et al. (2008) en studie där de med hjälp av RFLP jämförde P-gp-gener från ett känsligt *H. contortus* isolat med ett resistent isolat. De resistent maskarna hade selekterats fram från det känsliga isolatet med cambendazol under tio generationer. Signifikanta skillnader sågs i allelfrekvens i genen som kodar för P-gp mellan isolaten och särskilt en allel ökade kraftigt i frekvens hos det resistent isolatet. Förändringen i allelfrekvens antogs leda till mekanismer som minskar mängden substans som når målet, till exempel genom ökat uttryck av P-gp i maskens intestinala celler. Detta anses även kunna bidra till BZ-resistensen hos *H. contortus* även om det bara är en del av mekanismen.

## **Resistensmekanismer hos hästens cyathostomer**

### ***Betydelsen av mutation i kodon 200***

Även hos hästens små blodmaskar finns det en studie där polymorfism i kodon 200 i  $\beta$ -tubulingenen hos BZ-känsliga respektive -resistent isolat undersöktes (Pape et al., 2003). Studien visade att antalet homozygot känsliga individer (TTC/TTC), det vill säga individer som helt saknade mutationen, minskade medan heterozygota individer (TTC/TAC), individer med mutationen på den ena kromosomen, ökade efter selektion med fenbendazol. Inom den resistent populationen ökade den fenotypiska resistensen med ökande antal selektionssteg (undersökt med EHT och faecal egg count reduction test, FECRT) men de homozygota känsliga individerna minskade inte så mycket som väntat. Eftersom den heterozygota andelen ökade samtidigt som andelen homozygota individer var fortsatt hög drar författarna slutsatsen att mutationen i kodon 200 inte kan vara den enda orsaken till BZ-resistens hos cyathostomer.

Även Drogemuller et al. (2004) visade att i en population som uppvisar en hög grad av fenotypisk resistens ändå innehåller en majoritet av individer som är homozygoter (TTC/TTC). Hos denna grupp av parasiter leder alltså ökande BZ-användning med högre

doser inte till ett totalt byte till den resistenta TAC-allelen. Rollen för mutation i kodon 200 i mekanismen bakom BZ-resistensen är därmed oklar.

### **Mutation i kodon 167**

$\beta$ -tubulin isotyp 1 och isotyp 2 hos BZ-känsliga och -resistenta cyathostomer undersöktes även av Hodgkinson et al. (2008). Studien innefattade känsliga isolat samt isolat som antingen var resistenta mot fenbendazol (FBZ) eller oxibendazol (OBZ). Resultatet visade på skillnader både i kodon 167 och 200 på  $\beta$ -tubulin isotyp 1-genen. Statistiskt signifikanta skillnader fanns i båda kodonerna mellan fenbendazolresistenta och -känsliga populationer, men med den största skillnaden i kodon 167. Med undantag från en maskindivid så ledde mutationerna i kodon 167 och 200 till ett byte från fenylalanin till tyrosin. När det OBZ-resistenta isolatet jämfördes med det FBZ-känsliga upptäcktes en signifikant skillnad enbart på kodon 200. Statistiskt signifikanta skillnader mellan kodonerna sågs vid jämförelse av de FBZ-resistenta och OBZ-resistenta isolaten. Detta kan tyda på att selektion för resistens med olika substanser sker på olika sätt. Ingen polymorfism hittades mellan de jämförda isotyp 2-sekvenserna från olika isolat varför författarna drog slutsatsen att enbart isotyp 1 är kopplad till BZ-resistens hos cyathostomer. Slutsatsen från studien var att mutation F167Y föreslås vara en primär mekanism för FBZ-resistens hos fältpopulationer av cyathostomer. Att den OBZ-resistenta populationen hade mutation F200Y, och inte F167Y, påpekades kunna vara en anledning till att OBZ har visats vara effektivt på populationer som är resistenta mot andra BZ.

## **DISKUSSION**

Från den litteraturgenomgång som gjorts kan jag konstatera att de mest utredda resistensmekanismerna är de hos *H. contortus*. Det är också denna nematod som det finns mest forskning kring vilket är föga förvånande då det var hos *H. contortus* hos får som de första tecknen på resistens upptäcktes för 50 år sedan.

Allmänt accepterat verkar vara att antalet bindningar mellan  $\beta$ -tubulin och BZ minskar i resistenta isolat av *H. contortus* (Roos et al., 1990; Lubega & Prichard, 1991), men den exakta mekanismen är fortfarande i vissa delar oklar. Resistenta isolat har dock i allmänhet en lägre, eller ingen, polymorfism i  $\beta$ -tubulingenen. Vid Southern blot analys för  $\beta$ -tubulin sågs enbart ett DNA-fragment hos de resistenta isolaten medan de känsliga uppvisade heterogenitet både vad gäller antal och frekvens av genfragment (Roos et al., 1990). Vilken typ av BZ som använts för selektion verkar inte göra någon skillnad, då liknande minskning i variation och ökande frekvens av vissa alleler ses oberoende av substans (Beech et al., 1994).

I flera studier menar författarna att de har bevis för att de alleler som ger resistens hos *H. contortus* fanns i populationen redan innan BZ kom ut på marknaden och började användas (Roos et al., 1990; Kwa et al., 1993; Beech et al., 1994). Detta har visats genom att använda isolat som isolerats på laboratorium innan BZ lanserades och att därefter i flera steg selektera resistenta isolat. Att allelerna redan fanns i populationen skulle kunna vara en förklaring till att resistensen uppkom så snabbt ute på fältet som den gjorde. I flera studier har selekterade isolat från en känslig stam jämförts med det ursprungliga känsliga isolatet vilket bör ge en

mer rättvisande bild av resistensmekanismerna då det är den direkta påverkan från anthelmintikan och mutationer från den ursprungliga genotypen som ses.

Det verkar vara enbart  $\beta$ -tubulin isotyp 1, och inte isotyp 2, som är korrelerad till resistensen hos *H. contortus*. Kwa et al. (1993) visade att vid låggradig resistens selekteras vissa isotyp 1-alleler fram och vid höggradig resistens slås individer med isotyp 2-alleler ut så att det till slut blir individer med enbart alleler som kodar för isotyp 1 kvar. I motsats till detta visade däremot Beech et al. (2004) att en allel som representerar en deletion av isotyp 2-lokus minskade i frekvens hos resistent individer vilket ledde dem till slutsatsen att avsaknad av isotyp 2-alleler snarare är kopplat till BZ-känslighet än  $\beta$ -resistens. Den starkaste kopplingen till resistens finns hos en mutation i kodon 200 i  $\beta$ -tubulin isotyp 1-genen. En nukleotid, T, byts ut till A och istället för fenylalanin kodar kodonen för tyrosin (Kwa et al., 1993). Detta verkar vara allmänt vedertaget och denna mutation kan anses vara en betydande del av resistensmekanismen. Dock finns även studier där mutationer i andra kodon (167 och 198) diskuteras men då är det hos maskar som saknar mutationen i kodon 200 (Silvestre & Cabaret, 2002; Ghisi et al., 2007). Höglund et al. (2009) gjorde en studie i Sverige där de uppmätte höga allelfrekvenser av mutationen F200Y i  $\beta$ -tubulingenen med hjälp av pyrosekvensering utan att kunna påvisa resistens med FECRT. De kunde dock visa att de prover som visade klinisk resistens hade 100 % allelfrekvens av mutationen F200Y. Detta är intressant då det visar att även om frekvensen alleler för mutationen F200Y var hög så var parasiterna mottagliga för ett oralt administrerat preparat med albendazol. Det som skulle vara intressant att studera är om dessa maskar har någon annan mutation som gör att de är fortsatt känsliga trots mutationen F200Y. Alla de tre upptäckta mutationernas betydelse och utbredning i populationer i fält vore det intressant att se fler studier på för att förstå sambandet mellan dem och resistens och känslighet för BZ.

P-gp har visats spela stor roll i resistensen mot ivermektin hos *H. contortus* och dess inverkan på BZ-resistensen har diskuterats. De resultat som publicerats tyder på att det sker selektion av vissa P-gp-alleler vid selektion för BZ-resistens. Detta skulle till exempel kunna ge ett ökat uttryck av P-gp i tarmen hos parasiten vilket skulle minska upptaget, och därmed effekten av, BZ. Studien använde dock bara en typ av BZ och enbart tre isolat så fler, mer omfattande studier krävs för att utreda P-gps eventuella roll för BZ-resistensen.

Studier av cyathostomer tycks ha utgått från tidigare studier av *H. contortus* och därmed har polymorfism i kodon 200 i  $\beta$ -tubulingenen undersökts i flera studier. Mutationen F200Y i  $\beta$ -tubulin isotyp 1-genen verkar dock inte vara den huvudsakliga resistensmekanismen då homozygota känsliga individer inte minskar så mycket hos resistent isolat av cyathostomer som hos *H. contortus* (Pape et al., 2003). Fenotypisk resistens har i två studier undersökts både med EHT och FECRT och trots att dessa isolat var höggradigt resistent innehöll de en stor andel individer som var homozygot känsliga i kodon 200 (Pape et al., 2003; Drogemuller et al., 2004). Detta talar för att även andra mekanismer spelar stor roll i resistens mot BZ hos dessa nematoder. En mekanism som visats vara betydelsefull är mutationen F167Y (Hodgkinson et al., 2008) men denna forskningsgrupp såg även att selektion med olika preparat verkade ske på olika sätt. Både mutation F200Y och F167Y verkar alltså vara

associerade med BZ-resistens hos cyathostomer. För att komma närmare svaret på frågan om resistensmekanismerna hos cyathostomer så behövs mer forskning.

Andra mekanismer än genetiska förändringar är också viktiga vid resistensutveckling. Anthelmintikans farmakologiska egenskaper så som farmakodynamik och farmakokinetik, djurslagsskillnader i metabolism och receptoruttryck kan också påverka. Till exempel kan underdosering bero på att en för låg dos administreras, att djurets metabolism är hög eller för långsam (Sangster & Gill, 1999). Hos getter har anthelmintika visats ha väldigt låg biotillgänglighet vilket skulle kunna vara en anledning till att resistensen har blivit så utbredd hos detta djurslag då det gör att för låga nivåer når parasiterna via blodet (Kaplan, 2004). Det finns många teorier om hur resistens uppstår och tyvärr ryms inte alla i denna kandidatuppsats. Viktigt att komma ihåg är att de genetiska mekanismer som upptäcks bara är en liten del av helheten och det krävs mer forskning för att verkligen komma underfund med mekanismerna bakom resistensen. Ett problem som finns vid forskning på *H. contortus* är att det inte finns några inavlade stammar att använda. När fältisolat från olika länder jämförs så kan man inte vara säker på att genetiska förändringar beror på selektion med BZ och inte bara att populationer i olika länder har olika genotyp naturligt. Det är viktigt att använda selekterade isolat från det känsliga isolatet vid jämförelser för att utesluta sådana risker.

Att mekanismerna bakom resistensen skiljer sig mellan de undersökta nematoderna och mellan olika BZ är väldigt intressant och ett område värt att forska mer på. Mutationen i kodon 200 i  $\beta$ -tubulin isotyp 1-genen är hos de resistent isolaten av både *H. contortus* och cyathostomerna något gemensamt men betydelsen av mutationen verkar variera. Om detaljer i resistensmekanismen kan redas ut så kan behandlingar och nya anthelmintika utvecklas för att fortsatt kunna behandla gastrointestinala infektioner med framgång. Det är även viktigt att ha kunskap om resistensmekanismer och veta vilka genetiska förändringar som sker för att kunna göra tillförlitliga test för att mäta resistens i en population.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Beech, R.N., Prichard, R.K. & Scott, M.E. (1994). Genetic variability of the  $\beta$ -tubulin genes in benzimidazole-susceptible and – resistant strains of *Haemonchus contortus*. *Genetics*, 138, 103-110.
- Blackhall, W.J., Prichard, R.K. & Beech, R.N. (2008). P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. *Veterinary parasitology*, 152, 101-107.
- Clark, H.J., Kaplan, R.M., Matthews, J.B. & Hodgkinson, J.E. (2005). Isolation and characterization of a beta tubulin isotype 2 gene from two species of cyathostomin. *International journal of parasitology*, 35, 349-358.
- Conway, D.P. (1964). Variance in the effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. *American journal of veterinary research*, 25, 844-845.
- Drogemuller, M., Failing, K., Schnieder, T. & von Samson-Himmelstjerna, G. (2004). Effect of repeated benzimidazole treatments with increasing dosages on the phenotype of resistance and the beta-tubulin codon 200 genotype distribution in a benzimidazole-resistant cyathostomin population. *Veterinary parasitology*, 123, 201-213.
- Drogemuller, M., Schnieder, T. & von Samson-Himmelstjerna, G. (2004). Beta-tubulin complementary DNA sequence variations observed between cyathostomins from benzimidazole-susceptible and –resistant populations. *The journal of parasitology*, 90 (4), 868-870.
- Geary, T.G., Nulf, N.C., Favreau, A.M., Tang, L., Prichard, R.K., Hatzenbuehler, N.T., Shes, M.H., Alexander, S.J. & Klein, R.D. (1992). Three  $\beta$ -tubulin cDNAs from the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular and biochemical parasitology*, 50, 295-306.
- Ghisi, M., Kaminsky, R. & Mäser, P. (2007). Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Veterinary parasitology*, 144, 313-320.
- Hodgkinson, J.E., Clark, H.J., Kaplan, R.M., Lake, S.L. & Matthews, J.B. (2008). The role of polymorphisms at  $\beta$  tubulin isotype 1 codons 167 and 200 in benzimidazole resistance in cyathostomins. *International journal of parasitology*, 38, 1149-1160.
- Höglund, J., Gustafsson, K., Ljungström, B., Engström, A., Donnan, A. & Skuce, P. (2009). Anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks based on a comparison of the results from faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the  $\beta$ -tubulin gene. *Veterinary parasitology*, 161, 60-68.
- Kaplan, R.M. (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *TRENDS in parasitology*, 20, 10, 477-481.
- Kwa, M.S.G., Kooyman, F.N.J., Boersema, J.H. & Roos, M.H. (1993). Effect of selection for benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* on  $\beta$ -tubulin isotype 1 and isotype 2 genes. *Biochemical and biophysical research communications*, 191, 2, 413-419.
- Kwa, M.S.G., Veenstra, J.G. & Roos, M.H. (1994). Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with conserved mutation at amino acid 200 in  $\beta$ -tubulin isotype 1. *Molecular and biochemical parasitology*, 63, 299-303.
- Kwa, M.S.G., Veenstra, J.G., van Dijk, M. & Roos, M.H. (1995). B-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of molecular biology*, 246, 500-510.



- Lacey, E., Gill, J.H. (1994). Biochemistry of benzimidazole resistance. *Acta Tropica*, 56, 245-262.
- Läkemedelsindustriföreningens service AB. FASS om djurläkemedel. [online]. Tillgänglig: <http://www.fass.se/LIF/home/index.jsp?UserTypeID=1>. [2010-03-10].
- Pape, M., Posedi, J., Failing, K., Schnieder, T. & von Samson-Himmelstjerna, G. (2003). Analysis of the beta-tubulin codon 200 genotype distribution in a benzimidazole-susceptible and – resistant cyathostome population. *Parasitology*, 127, 53-59.
- Pape, M., Schnieder, T. & von Samson-Himmelstjerna, G. (2002). Investigation of diversity and isotypes of the beta-tubulin cDNA in several small strongyle (cyathostominae) species. *Journal of parasitology*, 88 (4), 673-677.
- Robinson, M.W., McFerran, N., Trudgett, A., Hoey, L. & Fairweather, I. (2004). A possible model of benzimidazole binding to  $\beta$ -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *Journal of molecular graphics and modeling*, 23, 275-284.
- Roos, M.H., Boersema, J.H., Borgsteede, F.H.M., Cornelissen, J., Taylor, M. & Ruitenber, E.J. (1990). Molecular analysis of selection for benzimidazole resistance in the sheep parasite *Haemonchus contortus*. *Molecular and biochemical parasitology*, 43, 77-88.
- Rufener, L., Kaminsky, R. & Mäser, P. (2009). In vitro selection of *Haemonchus contortus* for benzimidazole resistance reveals a mutation at amino acid 198 of  $\beta$ -tubulin. *Molecular and biochemical parasitology*, 168, 120-122.
- Sutherland, I.A., Leathwick, D.M. (2010). Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue?. *Trends in parasitology*, doi: 10.1016/j.pt.2010.11.008
- Silvestre, A., Cabaret, J. (2002). Mutation in position 167 of isotype 1  $\beta$ -tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance?. *Molecular and biochemical parasitology*, 120, 297-300.
- Taylor, M.A., Coop, R.L. & Wall, R.L. (2007). *Veterinary Parasitology*. 3. uppl. Oxford. Blackwell Publishing Ltd. Kap. 14.