



*Sveriges lantbruksuniversitet*  
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

# Utveckling av spolmaskägg från häst, utsatta för stigande koncentrationer av bensimidazol

Isabelle Sjögren

Uppsala

2012

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

ISSN 1652-8697  
*Examensarbete 2012:42*



# Utveckling av spolmaskägg från häst, utsatta för stigande koncentrationer av bensimidazol

Isabelle Sjögren

*Handledare: Johan Höglund, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, avdelningen för parasitologi*

*Biträdande handledare: Eva Tydén, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, avdelningen för parasitologi*

*Examinator: Jonas Tallkvist Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, avdelningen för farmakologi och toxikologi*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2012  
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap  
Kurskod: EX0234, Nivå X, 30hp*

*Nyckelord: anthelmintika, bensimidazol, häst, parascaris equorum, spolmask, LDA*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>  
ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2012:42*



## INNEHÅLLSFÖRECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary .....	2
Inledning .....	3
Anthelmintika .....	3
Bensimidazolens verkningsmekanismer .....	4
Verkningsmekanismer vid bensimidazolresistens .....	5
FECRT .....	5
LDA .....	5
Material och metoder .....	6
Resultat .....	7
Diskussion.....	10
Tack .....	11
Litteraturförteckning .....	12
Appendix.....	14

## **SAMMANFATTNING**

I Sverige och övriga världen ses en ökad resistensutveckling mot anthelmintika hos ett flertal parasiter. Spolmasken, *Parascaris equorum*, är en av hästens vanligaste parasiter. För diagnos av läkemedelsresistens hos hästens spolmask används idag FECRT-metoden (faecal egg count reduction test). Detta trots att metoden varken är utvecklad eller validerad för detta ändamål. Det finns dock ingen annan metod att tillgå. Syftet med denna studie var att undersöka möjligheterna till att utveckla och anpassa en alternativ *in vitro*-test till FECRT, "larval development assay" (LDA).

Spolmaskägg från ett svenskt stuteri tillhandahölls och dessa utsattes för stigande koncentrationer av thiabendazol (TBZ), tillhörande anthelmintikagruppen bensimidazoler. Efter 8 dagars inkubering *in vitro* studerades äggen i mikroskop och delades in i två grupper; avdödade och levande. Det visade sig att endast 28 % av äggen som utsatts för den högsta koncentrationen, 5,5 µg/ml, hade avdödats. I det följande försöket ökades koncentrationerna av TBZ, och vid 10 µg/ml hade 50 % av äggen avdödats. Försöket är det första i sitt slag och visar att metoden skulle kunna fungera efter ytterligare metodutvecklingsarbete. Dock kunde vissa problem noteras, framför allt att TBZ fälldes ut vid höga koncentrationer ( $\geq 20$  µg/ml) på grund av substansens dåliga löslighet i vatten. Metoden behöver alltså vidareutvecklas och förfinas. Det återstår även att flera försök utförs med spolmaskägg från andra stuterier.

## SUMMARY

In Sweden and the rest of the world there is an increased resistance to anthelmintics in several parasites. *Parascaris equorum* is one of the most common parasites in horses. Today, the FECRT (faecal egg count reduction test) method is used for detection of *Parascaris equorum* infection. This method is not developed and validated for the control of *P. equorum* in horses. However, there is nothing else available. The purpose of this study was to explore possibilities for developing and adapting an alternative *in vitro*-method to FECRT, the "larval development assay" (LDA).

Eggs from *P. equorum*, collected from infected foals on a Swedish stud farm, were supplied and these were exposed to increasing concentrations of TBZ. After 8 days of incubation *in vitro*, the eggs were studied under a microscope and were divided into two groups; killed and alive. It turned out that only 28 % of the eggs exposed to the highest concentration, 5.5 mg/ml, were killed. In the following experiment, the concentrations of TBZ were increased, and at 10 mg/ml 50 % of the eggs had been killed. The current trial is the first of its kind and shows that the method is promising. However, some problems were noted, particularly that the TBZ precipitated at high concentrations ( $\geq 20 \mu\text{g/ml}$ ) due to the compound's poor solubility in water. The method needs to be further developed and additional studies with eggs from *P. equorum* collected from other stud farms are also required.

## INLEDNING

I Sverige och övriga världen ses en ökad resistensutveckling mot anthelmintika hos många av de parasiter som utgör ett hot hos hästar. En av de vanligaste orsakerna till parasitinfektion hos yngre hästar är spolmasken, *Parascaris equorum*. En svensk studie som utfördes 2009 visade på en prevalens på 48 % hos hästar yngre än 1 år (Osterman-Lind och Christensson, 2009). Denna mask förekommer alltså framför allt hos föl och unghästar, därefter utvecklas immunitet och vid fyra års ålder är infektionen ovanligt förekommande (Osterman-Lind och Christensson, 2009).

Spolmasken har en direkt livscykel, vilket innebär att vuxna maskhonor, som lever i hästens tunntarm, producerar parasitägg som utskiljs med hästens träck. Äggen utvecklas externt utanför hästen och när förhållandena är optimala, vid en temperatur på ca 20°C, nås det infektiiva L<sub>3</sub>-stadiet efter 10-14 dagar. Hästar får i sig infektiiva parasitägg via munnen när de betar varefter de kläcks i tunntarmen. Efter ca 48 timmar har larverna penetrerat tarmslemhinnan, tagit sig ut i blodbanan och vidare till levern. Efter ytterligare ca 2 veckor har larverna nått till lungorna varefter de migrerar åter till mag- och tarmkanalen via bronkerna och luftstrupen. Åter i tunntarmen mognar larverna och blir vuxna honor och hanar som parar sig och lägger nya ägg. Prepatensperioden, den tid det tar från det att hästen får i sig äggen till att nya ägg produceras, är ca 10 veckor (Urquhart et al., 1996).

## Anthelmintika

Enligt Fass® vet. (2012), finns indikation mot spolmask på häst hos följande tre olika substansgrupper;

- Bensimidazolderivat (BZ), avdödar såväl adulta som larvala stadier. Substansen verkar genom att binda in till  $\beta$ -tubulin och därmed inhiberas polymeriseringen av  $\alpha$ - och  $\beta$ -tubuli i parasiten. Detta leder till att funktioner som är beroende av mikrotubuli, till exempel celledelning, rörelseförmåga och näringsupptag slås ut. Exempel på substanser inom gruppen är fenbendazol, febantel och albendazol (Lacey et al., 1994, Rang och Dales, 2007). Thiabendazol (TBZ), tillhör också gruppen och används oftast som en modellsubstans i olika studier. Till exempel vid användande av det kommersiella testet Drenchrite®, en "Larval development assay"-metod (Lacey et al., 1990; Kaplan och Tandon, 2004).
- Tetrahydropyrimidiner, avdödar adulta stadier. Den neuromuskulära transmissionen påverkas av denna acetylcholinagonist som stimulerar de kolinerga neuronerna, vilket gör att maskarna avdödas genom en spastisk paralis. Exempel på substanser är olika pyrantelderivat (PYR) (Plumb, 2008).



- Makrocycliska laktoner, avdödar L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub> och adulta stadier. Binder till GABA och glutamatreglerande kloridjonkanaler, vilket leder till en hyperpolarisering av parasitens muskler och nervceller och därmed en dödlig spastisk paralyt (Rang och Dales, 2007). Exempel på substanser inom gruppen är ivermektin och moxidectin.

Studier av bland annat Boersema et al., 2002; Hearn et al., 2003; Lindgren et al., 2008 och Näreaho et al., 2011 har visat att makrocycliska laktoner har en sviktande/utebliven effekt vid behandling av spolmaskinfektioner hos hästar. Det finns även studier från Kentucky och Texas i USA, som visar på en resistensutveckling mot PYR (Craig et al., 2007, Lyons et al., 2008). I Sverige rekommenderar SVA att BZ eller PYR ska numera alltid användas vid avmaskning mot spolmask (SVA online ”Avmaskning av häst”, [2011-11-17]).

Det är av stor vikt att de preparat som fortfarande är potenta används på ett korrekt sätt och att det finns metoder för att kontrollera resistensutveckling. En ökad resistensutveckling hos parasiten leder till att infektionen inte går att motverka profylaktiskt. *P. equorum* är en mycket vanlig och överlevnadsduglig parasit och flertalet föl infekteras främst av de parasiter som utvecklats hos föregående generation föl (Lindgren et al., 2008). Symtomen som orsakas av parasiten, är till en början hosta och näsflöde, till följd av larvernans migration från lungorna via luftstrupen till mag- och tarmkanalen (Hilary et al., 1978). Andra symtom är anorexi, viktnedgång, depression och tarmobstruktion som vid kraftig infektionsbörda, det vill säga med stort antal maskar i tarmen, kan vara fatal (Hilary et al., 1978, Hedenby, 2010).

Sedan 2007 är avmaskningsmedel avsedda för behandling av hästar receptbelagda enligt LVFS 2006:11, kap 7 (läkemedelsverket online ”LVFS 2006:11” [2011-11-17]). Detta innebär att veterinärer bör ha tillgång till verktyg som kan ge kunskap om resistensläget hos parasiterna i en besättning så att en adekvat utvärdering av respektive hästs behov av avmaskningsmedel och rutiner kan ges till hästägaren.

### **Bensimidazolens verkningsmekanismer**

BZ verkar, som tidigare nämnts, genom att förhindra uppbyggnaden av mikrotubuli då det binder till  $\beta$ -tubulin. Normalt sker en konstant uppbyggnad och nedbrytning av mikrotubulis byggstenar, dimerer av  $\alpha$ - och  $\beta$ -tubulin. Mikrotubuli är i sin tur byggstenar i cytoskelettet. Dessa har en essentiell roll då de medverkar vid intracellulära transporter, celledelning och cellens rörelse i eukaryota celler. När BZ binder till  $\beta$ -tubulin förhindras uppbyggnaden av mikrotubuli och dessa förkortas med följderna att dess funktioner uteblir och parasiten dör (Lacey et al., 1994).

## Verkningsmekanismer vid bensimidazolresistens

Resistens mot BZ preparat är en utbredd företeelse bland många olika nematoder, framför allt hos små idisslare (får och get), men även bland de små blodmaskarna, cyathostomerna, som drabbar hästar. Verkningsmekanismen anses vara gemensam och associerad med förändringar i  $\beta$ -tubulins gener, som leder till att affiniteten för BZ minskar eller uteblir (Prichard, 1994). Flera studier har gjorts på *Haemonchus contortus*, den stora löpmagsmasken hos får. Studierna har visat att det är främst en mutation hos en nukleotid i kodon 200 i  $\beta$ -tubulin isotyp 1 som förknippas med läkemedelsresistens mot BZ preparat. Detta innebär att genen uttrycker aminosyran fenylalanin istället för tyrosin. (Kwa et al., 1994, Höglund et al., 2009). Detta medför att strukturen förändras hos proteinet vilket förhindrar att BZ fäster till sitt bindningsställe (Kwa et al., 1994). Vad gäller cyathostomerna hos häst har man även hos dessa studerat förändringar i kodon 200 i  $\beta$ -tubulingenen. Mutationen har hittats men det har inte varit möjligt att bevisa med samma entydighet som hos *H. contortus*, att detta är orsaken till resistens mot denna typ av avmaskningsmedel. Troligtvis spelar flera andra faktorer än just denna även in (Pape et al., 2003, Drogemuller et al., 2004).

## FECRT

I praktiken används idag främst det så kallade ”faecal egg count reduction-testet” (FECRT) för att kontrollera resistensutveckling mot anthelmintika hos hästarnas parasiter (Coles et al., 1992). Det är en *in vivo*-metod där antalet ägg per gram träck skattas före och, beroende på preparat, 7-14 dagar efter avmaskning. Hos häst anses att en minskning av äggutskiljning på >90 % (95 % hos övriga djurslag) tyder på fullgod effekt hos de avmaskningsmedel som används. Metoden är utvärderad och standardiserad för kontroll av läkemedelsresistens mot cyathostomer hos häst, (Coles et al., 1992). Även om denna metod ännu inte är validerad för *P. equorum* är det för närvarande den enda tillgängliga metod som finns att tillgå (Reinemeyer, 2009). FECRT är dock relativt kostsamt och tidskrävande då ett stort antal hästar måste provtas och undersökas vid flera upprepade tillfällen (Kaplan och Tandon, 2004). Provsvaren kan även feltolkas då äggutskiljningen ofta varierar från dag till dag (Clayton, 1986). Metoden anses även vara relativt okänslig och enligt Martin et al (1989), krävs det att de resistenta parasiterna uppgår till 25 % för att den ska ge utslag med FECRT.

## LDA

Syftet med denna studie var att undersöka möjligheterna till att utveckla och anpassa en alternativ *in vitro*-metod till FECRT, ”larval development assay” (LDA). Metoden utvecklades ursprungligen för trichostrongylider hos får av Commonwealth Scientific Industrial Research Organization (CSIRO) i Australien (Lacey et al., 1990, Hubert et al., 1992). Detta test finns i dag tillgänglig som ett kommersiellt test, Drenchrite<sup>®</sup> och med vilket det är möjligt att vid ett och samma analystillfälle mäta förekomst av anthelmintikaresistens både mot BZ, levamisol,

och avermektiner samt hos en kombination av BZ och levamisol. Drenchrite<sup>®</sup> används framför allt i Australien för resistensundersökning av nematoder hos små idisslare. Varianter på testet har även använts i forskningssammanhang för att undersöka resistens hos cyathostomer hos häst (Ihler och Bjorn, 1996; Kaplan och Tandon, 2004; Osterman-Lind et al., 2005). Dock saknas det studier där man har kunnat etablera gränsvärden för att fastställa när resistens är indikerat. När cyathostomer har testats med en liknande metod, ”egg hatch assay” (EHA), har man uppmätt ett LD<sub>50</sub>-värde på 0,1 µg/ml vilket föreslagits som ett rimligt gränsvärde (Withlock et al., 1980).

Larver av olika spolmaskar (ascarider) som exempelvis *P. equorum*, kläcks ur äggskalet först i värdjurets tarm. Detta skiljer dem från exempelvis cyathostomer, liksom övriga strongyloida nematoder som lämnar ägget redan som L<sub>1</sub>-larver. Hos dessa arter utvecklas följaktligen larverna i det fria till infektionsdugliga L<sub>3</sub>-larver och de kan på så sätt tas upp av hästen när den betar (Urquhart et al., 1996). Det innebär att dessa parasiters allra tidigaste larvstadier inte omges av ett skyddande äggskal som hos spolmasken.

Även hos den frilevande nematoden, *Caenorhabditis elegans*, vars genom är kartlagt och som på grund av detta ofta används som modellorganism i genetiska studier, har högre gränsvärden än hos olika trichostrongyloider noterats. Exempelvis i en studie av Simpkin och Coles, (1981) låg den minsta effektiva dos som indikerade en aktiv avdödning av *C. elegans* mellan 0,5-10µg/ml för en rad olika substanser inom gruppen BZ. Detta trots att *C. elegans* är mer närbesläktad med strongyloiderna, än med ascariderna (Holden-Dye och Walker, 2007). Det neuromuskulära systemet hos *C. elegans* är dock mycket likt det man finner hos ascarider (Angstedt et al., 1989).

En fördel med LDA som standardiserad metod för detektion av anthelmintikaresistens, är att den är mer kostnadseffektiv än FECRT. Det krävs exempelvis inte dyrbar upprepad testning som med FECRT metoden och i samma LDA test kan flera avmaskningspreparat kontrolleras parallellt. Metoden kräver dessutom inga sofistikerade instrument eller tillgång till ett stort antal djur, som i FECRT (Kaplan och Tandon, 2004).

## **MATERIAL OCH METODER**

Ägg som tidigare extraherats från häststallövning genomgick en reningsfas genom att de tillsattes till mjölkror (10 ml), med cirka 8 ml ägg i vardera 2 rör. Rören centrifugerades i 3 min på 1500 varv/min, (Thermo Scientific IEC CL30). Överflödigt vätska sögs bort och därefter tillsattes Miltons tvättlösning (2 % natriumhypoklorit [NaClO] i 16,5 % natriumklorid [NaCl]). Rören centrifugerades i 6 min på 1500 varv/min. Natriumhypokloriten hade då tvättat bort höljet kring äggen, och natriumkloridlösningen gjorde att äggen floterade till vätskeytan i

röret. Därefter pipetterades 1 ml av äggen över till nya mjölkkrör, som fylldes med 7 ml destillerat vatten. Rören centrifugerades i 3 min på 1500 varv/min, vattnet sögs bort och nytt destillerat vatten tillsattes. Denna process upprepades fem gånger för att tvätta bort rester av Miltons lösning. Efter att det destillerade vattnet sugits bort efter den sista centrifugeringen tillsattes 500 µl destillerat vatten till äggsuspensionen. För att räkna antalet ägg applicerades 10 µl äggsuspension på ett objektglas och antalet ägg räknades i mikroskop (Olympus BX40). Genom att räkna antalet ägg i tre delprover från suspensionen gavs en uppskattning att denna innehöll  $\approx 500$  ägg/10 µl. Flertalet av äggen bedömdes också vid detta tillfälle vara i samma utvecklingsfas.

En stocklösning A blandades genom att ta  $\approx 50$  mg thiabendazol (TBZ) som löstes upp i samma antal ml dimetylsulfoxid (DMSO) [(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO] vilket gav en koncentration på 10 mg/ml TBZ. Utifrån stocklösning A bereddades stocklösning B genom att ta 1 ml stocklösning A och tillsätta 9 ml DMSO, med en slutlig koncentration på 1 mg/ml TBZ. I exponeringsförsöken användes ELISA-plattor med 24 brunnar. Första steget var att tillsätta 1978 µl destillerat vatten till varje brunn. Därefter tillsattes 12 µl i olika koncentrationer av TBZ+DMSO utifrån stocklösning A och B. Spädning utfördes med DMSO. Till sist tillfördes 10 µl äggsuspension till varje brunn (se appendix). Samma koncentration applicerades i två brunnar på ELISA-plattan. I båda försöken utgjorde DMSO 0,6 % av den totala volymen.

I det första försöket med stock B testades äggens utvecklingsförmåga i stigande koncentrationer av TBZ, från 0 µg/ml till 5,5 µg/ml. I det andra försöket med stock A utsattes äggen för koncentrationer av TBZ från 0-55 µg/ml. I båda försöken inkuberades ELISA-plattorna vid 25°C i 8 dygn. Efter inkubationstiden räknades  $\approx 100$  ägg/brunn. Dessa delades upp i två kategorier; levande och avdödade. I gruppen avdödade ingick även ägg där larven var icke fullständigt utvecklade.

## RESULTAT

Äggen bedömdes utifrån utvecklingsstatus vid avläsningstillfället. Ägg som ansågs tillhöra gruppen levande hade under försökets gång utvecklats till infektiöst stadium, det vill säga, med en färdigutvecklad motil larv (se bild 1). Ägg som inte utvecklats alls, eller som bara utvecklades delvis placerades i gruppen avdödade (se bild 2). Dessa ägg kunde ha delat sig enstaka gånger och antal delningar kunde då visuellt ses. Deras utveckling kunde i vissa fall ha pågått under en längre tid innan de avdödates och de var då utvecklade med en form som påminde om en levande larv, men ofta med avvikelser som till exempel en cellanhopning i ena ändan. Ägg med sådana icke viabla larver ansågs också vara avdödade (se bild 1). Det visade sig att äggen i kontrollbrunnarna utan tillsatts av TBZ utvecklades i hög utsträckning. Både i försök 1 och 2 var mellan 95-97 % fullt utvecklade.

Då varje koncentration av TBZ tillsatts i två brunnar räknades medelvärdet av de två resultaten ut. Värdet användes för att kontrollera vid vilken koncentration som mortaliteten hos äggen uppgick till 50 %.

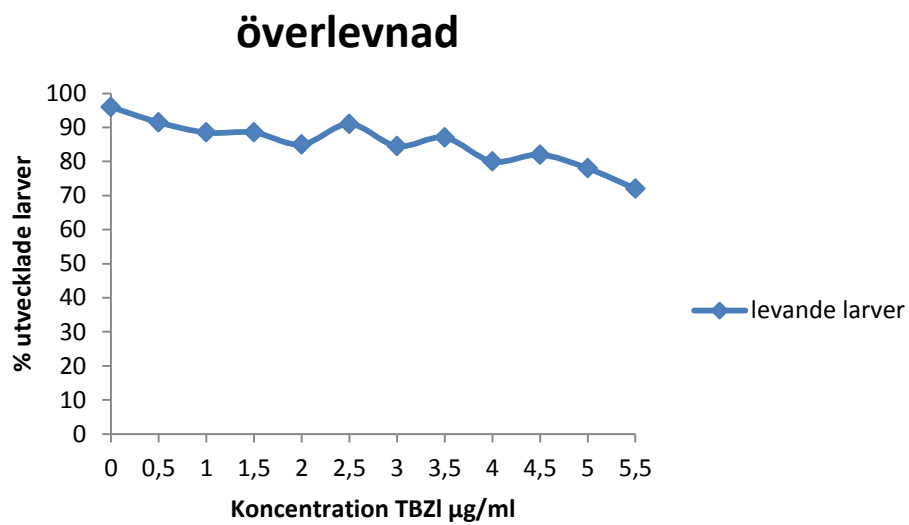
I försök 1 observerades en något ökad dödlighet i takt med stigande koncentrationer av TBZ. Dock uppgick aldrig mortaliteten till 50 % i det första försöket (se figur 1). Vid den högsta koncentrationen (5,5 µg/ml) i försök 1 avdödades endast 28 % av äggen. I försök 2, där koncentrationerna ökades upp till 55 µg/ml, kunde däremot en nivå av 50 % dödlighet registreras när larverna utsattes för 10 µg/ml (se figur 2).



*Bild 1. Spolmaskägg med fullt utvecklade och motila larver. Längst upp till höger ses ett ägg med en icke-motil larv med avvikande utseende, denna grupperas som avdödad. Förstoring 40x.*

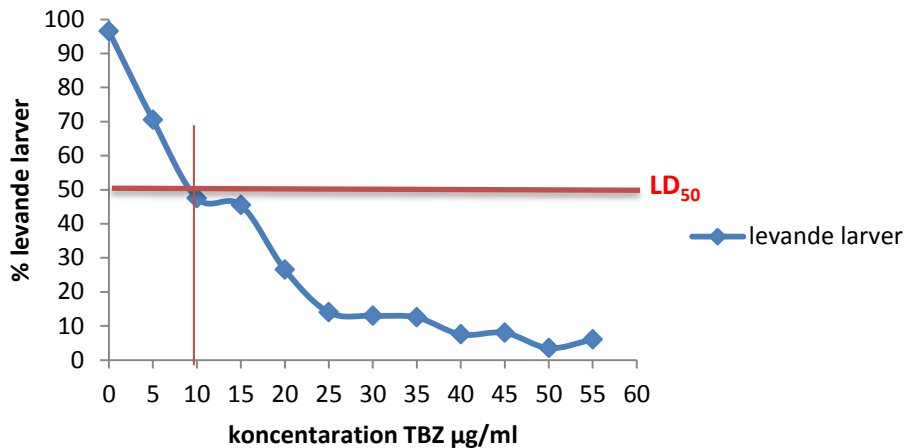


Bild 2. Bilden visar ett outvecklat ägg, två ägg där delvis utveckling har skett och ett ägg där en fullständigt utvecklad larv ses. Förstoring 40x.



Figur 1. I försök 1 kunde en ökad dödlighet registreras, men vid den högsta koncentrationen av TBZ, 5,5  $\mu\text{g/ml}$ , var det endast 28 % av äggen som hade avdöats.

## överlevnad



Figur 2. I försök 2, avdödades 50% av spolmaskäggen vid en koncentration på 10 µg/ml TBZ.

## DISKUSSION

Det höga antalet ägg med fullt utvecklade larver i kontrollbrunnarna med rent vatten visar på att det var en miljö som inte hämmade deras utveckling nämnvärt. Detta tyder på en optimal miljö som överensstämmer med vad som finns beskrivet sedan tidigare i litteraturen och som säger att äggens utveckling i naturen, under bra förutsättningar, normalt tar ca 10-14 dagar vid 20-25 °C (Urquhart et al., 1996).

Den uppmätta LD<sub>50</sub>-koncentrationen för *P. equorum* var kraftigt högre än vad som noterats i andra/tidigare studier där andra nematodägg utsatts för TBZ på ett liknande vis som i denna studie. Exempelvis har man i försök med cyathostomer (hästens små blodmaskar) visat att gränsvärdet hos isolat som är mottagliga för BZ ligger runt 0,1 µl/mg. Utvecklingen hos dessa parasiter skiljer sig dock markant från spolmasken vars larver utvecklas inuti äggskalet, som till skillnad från cyathostomerna kläckts på betet (Urquhart et al., 1996). En jämförelse i koncentration för LD<sub>50</sub> är därmed inte direkt jämförbar eftersom det inte kan uteslutas att olikheter exempelvis i äggskalets beskaffenhet påverkar den faktiska dos av läkemedlet som i själva verket tas upp. Att det finns stora olikheter mellan olika arter, illustreras även av att resultat från studier med den frilevande modellorganismen *Caenorhabditis elegans*, som visar att den minsta effektiva dos av TBZ som resulterade i en avdödning låg på 2,5 µg/ml, (Simpkin och Coles, 1981).

I försök 2 användes istället koncentrationsintervall som ökade i steg om 5 µg/ml. Det är därmed omöjligt att exakt avgöra vilken effekt substansen hade vid koncentrationer mellan 5 - 10 µg/ml. Det man kan säga är att vid 10 µg/ml

avdödades 50 % av äggen, men detta skulle naturligtvis också kunna ske vid en något lägre koncentration vilket motiverar ytterligare studier med tätare intervall.

I det högre dosintervall, vid koncentrationer över 25 µg/ml, sågs en lång svans, där äggen inte hade avdödats. Detta trots kraftigt ökande koncentrationer ibland med över 20 µg/ml. Detta skulle kunna tolkas som ett tecken på resistent parasiter då resistensmekanismen för BZ hos många parasitiska nematoder anses bero på en minskad affinitet eller avsaknad av affinitet för β-tubulin (Prichard, 1994). Troligare är dock att det berodde på den fällning som noterades och som sannolikt innebar att koncentrationerna var lägre än beräknat, speciellt vid de allra högsta koncentrationerna. BZ har generellt sett en låg löslighet i vatten (Plumb, 2008) och man tvingas därför att lösa ut det i DMSO innan det tillsätts till vatten. Dessvärre visade det sig att BZ återfällades efter tillsatsen till vattnet i brunnarna och särskilt vid de allra högsta koncentrationerna, > 20 µg/ml. En trolig följd var därmed att substansen inte kunde utöva maximal effekt och tolkningen av resultatet försvårades avsevärt.

I denna studie hade alla ägg sitt ursprung från infekterade föl från ett och samma stuteri, vilket inte avspeglar den variation som sannolikt återfinns när man undersöker parasitisolat från fler besättningar. Att inte ha några resultat att kunna jämföra med är naturligtvis en stor begränsning i denna studie som alltså är unik i sitt slag. Vi kan därför inte i dagsläget avgöra om dessa ägg beter sig normalt eller om det finns eventuella avvikelser hos spolmaskägg från andra hästbesättningar. Det är därför viktigt att utföra samma typ av undersökning med ägg från olika stuterier där man under olika lång tid och i olika utsträckning behandlat sina spolmaskinfekterade föl med BZ-preparat.

Det är också viktigt att i mer detalj studera läkemedelsupptaget och verkningsmekanismen hos BZ vid behandling av *P. equorum*, inte minst som vi genom denna studie noterade att olika parasiter påverkas i olika hög grad av TBZ. Det vore exempelvis intressant att undersöka om de verkningsmekanismer som finns beskrivna för *H. contortus* överensstämmer med de hos *Parascaris*. Denna kunskap är viktig för att kunna utveckla väl fungerande rutinmetoder och som kan användas för att övervaka resistensläget.

## **TACK**

Jag vill tacka min handledare, professor Johan Höglund, för hans tålamod och all den konstruktiva kritik han bidragit med under arbetets gång. Riktar även ett tack till Michael Eklund, bibliotekarie på Veterinärbiblioteket, KC, för all hjälp vid insamling av litteratur.



## LITTERATURFÖRTECKNING

- Angstadt. J.D., Donmoyer. J.E. Stretton. A.O. (1989). Retrovesicular ganglion of the nematode *Ascaris*. *The Journal of Comparative Neurology*, 284, 374-388.
- Boersema, J. H., Eysker, M., Nas, J. W. M. (2002). Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones. *Veterinary record*, (220), 150:279-281.
- Clayton. H.M. (1986). Life cycle *Parascaris*. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 2, 313-328.
- Coles. G. C., Bauer. C., Borgsteede. F.H., 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, 35-44.
- Craig. T.M., Diamond. P.L., Ferwerda. N.S., Thompson. J.A. (2007). Evidence of ivermectin resistance by *Parascaris equorum* on a Texas horse farm. *Journal of Equine Veterinary Science*. 27, 67-71.
- Drogemuller. M., Failing. K., Schnieder. T., von Samson-Himmelstjerna. G. (2004). Effekt 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.
- Fass® Vet. 2012. (2012). *LIF*. 61-62, 64, 143, 158, 656.
- Hearn, F. P. D., Peregrine, A. S. (2003). Identification of foals infected with *Parascaris equorum* apparently resistant to ivermectin. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 223 (4), 482-485.
- Hedenby. J. (2010). Spolmaskassocierad kolik hos häst. Examensarbete för kandidatexamen, Nr. 2010:6, Veterinärprogrammet. Uppsala, Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap.
- Hilary. M., Clayton. James. L. Duncan. (1978). Clinical signs associated with *Parascaris equorum* infection in worm-free pony foals and yearlings. *Veterinary Parasitology*. 4, 69-78.
- Holden-Dye. L. and Walker. R.J. Anthelmintic drugs (November 02, 2007), WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.143.1, <http://www.wormbook.org>.
- Hubert. J., Kerbouef. D. (1992). A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Veterinary Record*, 20, 442-446.
- Höglund. J., Gustafsson. K., Ljungström. B-L., Engström. A., Donnan. A., Skuce. P. (2009). Anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks based on a comparison of the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the  $\beta$ -tubulin gene. *Veterinary Parasitology*, 161, 60-68.
- Ihler. C.F., Bjorn. H. (1996). Use of two in vitro methods for the detection of benzimidazole resistance in equine small strongyles (*Cyathostoma* spp.). *Veterinary Parasitology*, 65, 117-125.
- Kaplan. R. M., Tandon. R., (2004). Evaluation of a larval development assay (DrenchRite®) for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Veterinary Parasitology*, 121, 125-142.
- Kwa. M.S.G., Veenstra. J.G., Roos. M.H. (1994). Benzimidazole resistance in *Haemoncus contortus* is correlated with conserved mutation in amino acid 200 in  $\beta$ -tubulin isotype 1. *Molecular and biochemical parasitology*, 63, 299-303.

- Lacey. E., Redwin. J.M., Gill. J.H., DeMargheriti. V.M., Waller. P.J., (1990). A larval development assay for the simultaneous detection of broad spectrum anthelmintic resistance. In: Boray, J.C.- Martin. P.J., Roush. R.T. (Eds.), Resistance of parasites to antiparasitic drugs. MSD AGVET, Rathway, New Jersey, 177-184.
- Lacey. E., Gill. J.H. (1994). Biochemistry of benzimidazole resistance. *Acta Tropica*, 56, 245-262.
- Lindgren. K., Ljungvall. Ö., Nilsson. O., Ljungström. B., Lindahl. C. & Höglund. J. (2008). *Parascaris equorum* in foals and in the environment on a Swedish stud farm, thelminticwith notes on treatment failure of ivermectin. *Veterinary Parasitology*. 151, 337-343.
- Lyons. E.T., Tolliver. S.C., Ionita. M., Collins. S.S. (2008). Evaluation of parasiticidal activity of fenbendazole, ivermectin, oxibendazole and pyrantel pamoate in horse foals with emphasis on ascarids (*Parascaris equorum*) in field studies on five farms in Central Kentucky in 2007. *Parasitology Research*. 103, 287-291.
- Läkemedelsverket online. [www.lakemedelsverket.se/upload/lvfs/LVFS-2006-11.pdf](http://www.lakemedelsverket.se/upload/lvfs/LVFS-2006-11.pdf) [20011-11-17].
- Martin. P.J., Anderson. N., Jarrett. R.G. (1998). Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. *Australian Veterinary Journal*, 66, 236-240.
- Näreaho. A., Vainio. K., Oksanen. A. (2011). Impaired efficacy of ivermectin against *Parascaris equorum*, and both ivermectin and pyrantel against strongyle infections in trotter foals in Finland. *Veterinary Parsitology*, 182, 372-377.
- Osterman Lind. E., Uggla. A., Waller. P., Höglund. J. (2005). Larval development assay for detection of anthelmintic resistance in cyathostomines of Swedish horses. *Veterinary Parasitology*, 128, 261-269
- Osterman Lind, E., Christensson, D. (2009). Anthelmintic efficacy on *Parascaris equorum* in foals on Swedish studs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 49, 25.
- Pape. M., Posedi. J., Failing. K., Schnieder. T., von Samson-Himmelstjerna. G. (2003). Analysis of the beta-tubulin codon 200 genotyp distribution in a benzimidazole-susceptible and – resistant cyathostome population. *Parasitology*, 127, 53-59.
- Plumb. D. C. (2008). *Plumbs Veterinary Drug Handbook*. 6<sup>th</sup> ed. Blackwell Publishing. 787, 868.
- Prichard. R. (1994). Anthelmintic resistance. *Veterinary Parasitology*, 54, 259-268.
- Rang. H.P., Dale. M.M., Ritter. J.M., Flower. R.J. (2007). Rang and Dales Pharmacology. 6<sup>th</sup> ed. Churchill Livingstone, Elsevier.712-717.
- Reinemeyer. C.R. (2009). Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*. *Parasites & Vectors*, 2.
- Simpkin K.G., Coles G.C. (1981). The ise of *Caenorhabditis elegans* for anthelmintic screening. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 31, 66-69
- SVA online “Avmaskning av häst”. [www.sva.se/sv/djurhalsa1/Hast/parasiter-hos-hast/Amaskning-av-hast/](http://www.sva.se/sv/djurhalsa1/Hast/parasiter-hos-hast/Amaskning-av-hast/) [2011-11-17].
- Urqhart, G., Armour, J., Dunn, A. M. & Jennings F. W. (1996). *Veterinary Parasitology*, 2 ed. Blackwell Science Ltd.
- Withlock. H.W., Kelly. J.D., Porter. C.J., Griffin. D.L., Martin. I.C.A. (1980). In vitro field screening for anthelmintic resistance in strongyles of sheep and horses. *Veterinary Parasitology*, 7, 215-232.

## APPENDIX

TBZ ( $\mu\text{g/ml}$ )	vatten ( $\mu\text{l}$ )	stock B ( $\mu\text{l}$ )	DMSO ( $\mu\text{l}$ )	ägg ( $\mu\text{l}$ )
0	1978	0	12	10
0,5	1978	1	11	10
1	1978	2	10	10
1,5	1978	3	9	10
2	1978	4	8	10
2	1978	5	7	10
3	1978	6	6	10
3,5	1978	7	5	10
4	1978	8	4	10
4,5	1978	9	3	10
5	1978	10	2	10
5,5	1978	11	1	10

Figur 1. Försök 1 med koncentrationer av TBZ mellan 0-5,5  $\mu\text{g/ml}$ . Protokoll för de olika mängderna av destillerat vatten, stocklösning TBZ+ DMSO, DMSO för spädning och äggsuspension i försök 1.

TBZ ( $\mu\text{g/ml}$ )	vatten ( $\mu\text{l}$ )	stock A ( $\mu\text{l}$ )	DMSO ( $\mu\text{l}$ )	ägg ( $\mu\text{l}$ )
0	1978	0	12	10
5	1978	1	11	10
10	1978	2	10	10
15	1978	3	9	10
20	1978	4	8	10
25	1978	5	7	10
30	1978	6	6	10
35	1978	7	5	10
40	1978	8	4	10
45	1978	9	3	10
50	1978	10	2	10
55	1978	11	1	10

Figur 2. Protokoll för de olika mängderna av destillerat vatten TBZ+ DMSO, DMSO för spädning och äggsuspension i försök 2 med koncentrationer av TBZ mellan 0-55  $\mu\text{g/ml}$ .