

Slutrapport – Den svenska delen i projektet - Gastrointestinale nematoder hos hest. Anthelmintikaresitens og kartlegging av kontrolltiltak mot parasittinfeksjoner

Eva Tydén och Johan Höglund

Bakgrund

Hästens rundmask, *Parascaris equorum*, anses vara den mest patogena parasiten hos föl och ettårningar världen över. Infektionen orsakar snuva, hosta och nedsatt tillväxt och kan till och med leda till döden på grund av maskarna tränger igenom tunntarmen (Cribb et al, 2006).

Resistensutveckling mot avmaskningsmedel (anthelmintika) är ett växande problem inom veterinärmedicinen och utgör ett hot mot djurvälståndet så väl nationellt som internationellt (Kaplan, 2004). Under de senaste decennierna har *P. equorum* infektion hos föl behandlats med makrocycliska laktoner, **ML** (ex. ivermektin), benzimidazoler, **BZ** (ex. fenbendazol) och tetrahydropyrimidiner (ex. pyrantel). Sedan 2002 har utebliven effekt vid behandling av *P. equorum* infektion med **ML** rapporterats i flera länder runt om i världen som till exempel i, Holland, Kanada, USA, Danmark, Sverige, Italien och Finland (Boersema et al, 2002; Slocombe et al, 2007; Craig et al, 2007; Schougaard et al, 2007; Lindgren et al, 2008; Veronesi et al, 2010, Näreaho, et al, 2011). En allmän oro för parasitsjukdomar hos häst har lett till ett överutnyttjande av avmaskningsmedel, vilket i sin tur har resulterat i en resistensutveckling. På grund av hotet om ökande resistensutveckling beslutade Läkemedelsverket (år 2007) att avmaskningsmedel endast får förskrivas av en legitimerad veterinär. För att undvika selektion av resistenta parasiter rekommenderas att avmaskningsmedel ur olika substansgrupper används växelvis. Den praktiska konsekvensen är att fenbendazol (Axilur[®]) och pyrantel (Banminth[®]) är de enda återstående substanserna som idag har god effekt mot spolmaskinfektion i Sverige. Det finns rapporter från USA om multiresistenta spolmaskpopulationer mot både **ML** och pyrantel (Reinemeyer et al, 2010). I det fallet återstår endast substanser ur **BZ**-gruppen kvar att använda.

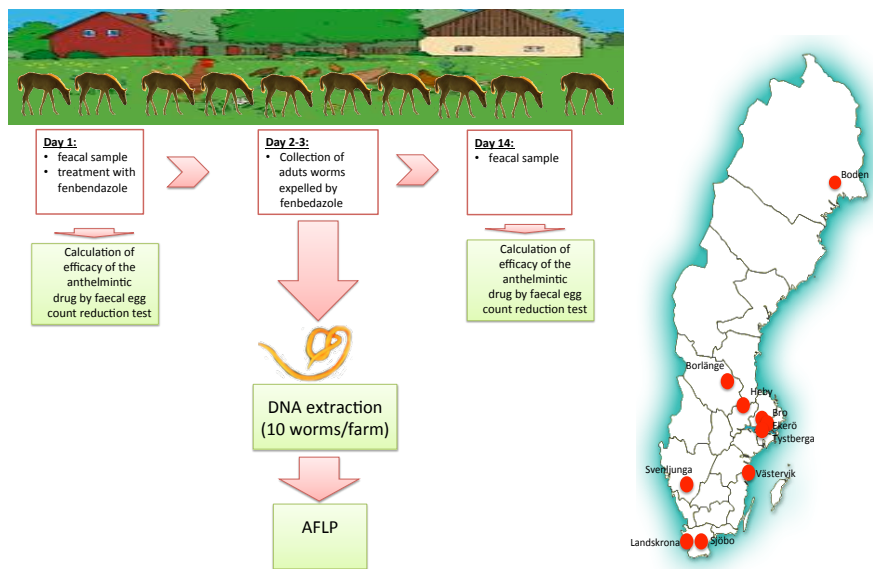
Lite är fortfarande känt om hur resistens mot avmaskningsmedel uppstår och hur gener som ger resistens sprids inom parasitpopulationer. Molekylärbioologiska tekniker är ett värdefullt verktyg för att kunna genomföra detaljerade genetiska undersökningar. Genetik inom grupper av djur/växter kallas populationsgenetik. Kunskap om populationsgenetik är viktig för att förstå hur de gener som ger resistens, sprids inom och mellan olika populationer. Huvudsyftet med den här studien var att studera populationsgenetik hos den svenska spolmaskstammen med hjälp av en DNA fingerprinting teknik (AFLP). Vi fann en väldigt låg genetisk variation inom den svenska spolmaskstammen. Därför utökade vi den populationsgenetiska studien även med spolmaskisolat från USA, Tyskland, Norge, Brasilien och Island.

Det andra syftet med den här studien var att analysera effekten av fenbendazol (Axilur[®]) vid behandling spolmaskinfektion vid 11 stuterier i Sverige. För att följa upp tidigare rapporter om resistens mot makrocycliska laktoner (**ML**) valde vi ut tre stuterier där en grupp om 10 föl först behandlades med ivermektin (Ivomec[®]).

Material och metoder

Studie design

Etiskt tillstånd med diarienummer (C 203/10) beviljades för studien. Elva stuterier från norr till söder deltog i studien. Studien började med att träckprov samlades in mellan oktober-december för analys av spolmaskägg, varefter de avmaskades med fenbendazol (Axilur[®]) enligt doseringen som anges i FASS[®] vet (Figur 1). Två till tre dagar efter behandling med Axilur[®] stöttes de döda vuxna spolmaskarna ut via träcken som skickades omgående till vårt laboratorium för framrening av DNA till den populationsgenetiska studien. Ett uppföljande träckprov togs 14 dagar efter behandling för att analysera effekten av Axilur[®]. Vid tre stuterier där effekten av ML studerades behandlades hästarna först med ivermektin (Ivomec[®]) och därefter med Axilur[®]. Ett isolat från Tyskland med 10 vuxna maskar skickades till vårt laboratorium och ingick som ett referensprov i den populationsgenetiska studien.



Figur 1. En schematisk bild över studieupplägget till höger och till vänster lokaliseringen för stuterierna som deltog i studien.

I den utökade populationsgenetiska studien ingick även vuxna maskar från USA, Norge, Brasilien och Island. Ett av isolaten från USA kom från en besättning som aldrig blivit avmaskade med **ML** (ML-naiv).

AFLP

Sammanlagt 194 maskar ingick i den populationsgenetiska studien (Tabell 1). Vi använde oss av DNA fingerprinting metoden Amplified Length Polymorphism (AFLP) enligt Applied Biosystems Växt Mapping Protocol. AFLP är en PCR baserad metod som ger ett unikt genetiska fingeravtryck för varje individ. Fördelen med AFLP är att ingen kännedom om den genetiska koden behövs för att kunna använda tekniken. Det var en förutsättning för den här studien eftersom genomet hos spolmaskens till stora delar fortfarande är okänt. Först genereras ett individuellt genetiskt fingeravtryck genom att varje masks DNA klyvs med restriktionsenzymerna MseI och EcoRI. Därefter fästes adaptrar på MseI och EcoRI-klyvningsprodukterna och en preselektiv PCR körs med primrar som binder in till adaptorerna. Efter den preselektiva PCRen körs en selektiv PCR och slutligen analyseras DNA fragmenten i en Genetic Analyzer (ABI PRISM[®]3100).

Table 1. Kod för de olika *Parascaris* isolaten, geografisk lokalisering, insamlings sätt, antal maskar och hästras.

kod	kontinent	Geografisk lokalisering	insamlingsmetod	Antal maskar	hästras
S1	Europa	Sverige, Boden	Utstött med fenbendazol, träckprov	10	halvblod
S2	Europa	Sverige, Borlänge	Utstött med fenbendazol, träckprov	10	travare
S3	Europa	Sverige, Heby	Utstött med fenbendazol, träckprov	10	halvblod
S4	Europa	Sverige, Bro	Utstött med fenbendazol, träckprov	10	halvblod
S5	Europa	Sverige, Ekerö	Utstött med fenbendazol, träckprov	10	travare
S6	Europa	Sverige, Tystberga	Utstött med fenbendazol, träckprov	10	halvblod
S7	Europa	Sverige, Västervik	Utstött med fenbendazol, träckprov	10	halvblod
S8	Europa	Sverige, Västervik	Utstött med fenbendazol, träckprov	10	halvblod
S9	Europa	Sverige, Landskrona	Utstött med fenbendazol, träckprov	10	travare
S10	Europa	Sverige, Svenljunga	Utstött med fenbendazol, träckprov	10	travare
S11	Europa	Sverige, Sjöbo	Utstött med fenbendazol, träckprov	10	halvblod
G	Europa	Tyskland	Insamlat på slakteri	10	halvblod
I1	Europa	Island, Hvolsvöllur	Insamlat på slakteri	9	Islandshäst
I2	Europa	Island, Hella	Insamlat på slakteri	9	Islandshäst
I3	Europa	Island, Hvolsvöllur	Insamlat på slakteri	9	Islandshäst
N1	Europa	Norge, Vestfold	Utstött med fenbendazol, träckprov	11	halvblod
N2	Europa	Norge	Utstött med fenbendazol, träckprov	10	halvblod
B	S. Amerika	Brasilien	Insamlat på slakteri	6	Ej känt
U1	N. Amerika	USA, Kentucky	Insamlat under obduktion	10	blandras light breed
U2	N. Amerika	USA, Kentucky	Insamlat under obduktion	10	fullblod

Dataanalys

Variationen och den genetiska strukturen hos de erhållna DNA fragmenten som genererades med AFLP analyserades med olika populationsgenetiska parametrar genom att använda diverse populationsgenetiska statistikprogram. De parametrar som analyserades var genetisk mångfald (Hj, Ht, Hs), ett index för sällsynta genetiska markörer (rarity) populationsstrukturen (Fst), mutationshastigheten ($4N\mu$) och flödet av gener mellan populationer (Nm).

Effekt av fenbendazol (Axilur[®]) och ivermektin (Ivomec[®])

Samtliga träckprov analyserades med en kvantitativ flotationsmetod enligt McMaster och med

en minsta detektionsnivå på 50 epg (Anon, 1986). För att räkna ut effekten av avmaskningsmedel användes ”faecal egg count reduction-testet” (FECRT). Det är en *in vivo*-metod där antalet ägg per gram träck skattas dels före avmaskning, dels 14 dagar efter utförd avmaskning. Hos hästar tolkas en minskning av äggutskiljning på $\geq 90\%$ (95 % hos övriga djurslag) som fullgod effekt hos de avmaskningsmedel som används. Metoden är utvärderad och standardiserad för kontroll av läkemedelsresistens mot cyathostomer hos häst (Coles et al., 1992).

Resultat

Populationsgenetik hos den svenska spolmaskstammen

Den genetiska mångfalden (H_j) var låg bland de 11 svenska isolaten. Varje isolat representerades av 10 maskar per stuteri och hade ett värde som varierade mellan H_j 0,09-0,16 (tabell 2). Vidare analys visade att antalet sällsynta genetiska markörer (rarity) matchades förväntningarna (tabell 2). Värt att notera var att två svenska isolat hade ett större antal sällsynta markörer (2,8 och 2,1; tabell 2) och tre isolaten hade ett mindre antal (0,5-0,3; tabell 2) sällsynta markörer än förväntat. Sammantaget visar resultaten att det finns liten genetisk variation hos svenska spolmaskar. Även isolatet från Tyskland, som användes som referensprov, uppvisade låg genetisk mångfald och med ett färre antal sällsynta markörer än förväntat (tabell 2).

Tabell 2. Visar värden för genetisk mångfald (H_j) och sällsynta markörer (rarity) från de 11 isolaten i Sverige och 1 isolat från Tyskland

Pop	Lokalisation	Antal maskar	Genetisk mångfald (H_j)	Rarity *	
1	Boden	10	0.11	0.5	small
2	Borlänge	10	0.15	2.1	large
3	Heby	10	0.09	0.7	ns
4	Bro	10	0.10	0.5	small
5	Ekerö	10	0.12	0.7	ns
6	Tystberga	10	0.09	0.6	ns
7	Västervik	10	0.10	0.3	small
8	Västervik	10	0.14	1.0	ns
9	Landskrona	10	0.16	2.8	small
10	Svenljunga	10	0.11	0.8	large
11	Sjöbo	10	0.10	0.8	ns
12	Tyskland	10	0.07	0.4	small

* ns, ej signifikant skild än förväntat, large, större antal markörer än förväntat, small, färre markörer än förväntat.

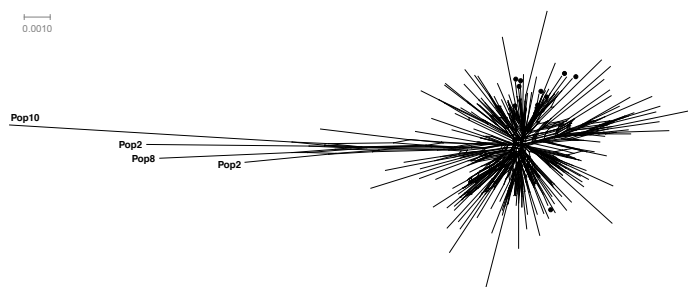
Även den totala genetiska mångfalden (H_t), den genomsnittliga mångfalden (H_s) och populationsstrukturen (F_{st}) var låg hos den svenska populationen av spolmaskar (tabell 3). Den låga populationsstrukturen (F_{st} värdet) anger att det fanns nästan lika stor variation mellan maskar på en gård som det mellan maskar insamlade från hästar från olika stall/stuterier. Mutationshastighet ($4N\mu$) i spolmaskgenomet var också låg, samtidigt som genflödet (Nm) mellan olika isolat var hög (tabell 3). Detta indikerar att den låga genetiska mångfalden kan vara en följd av en låg mutationshastighet och/eller i kombination med ett flyttande av maskar mellan olika gårdar/besättningar vilket indikerar ett stort utbyte av genetiskt material mellan maskar ur olika isolat.

Tabell 3. Medelvärden för genetisk mångfald, populationsstruktur, mutationshastighet samt genflöde

	Genetisk mångfald (Ht/Hs)*	Population struktur (Fst)	mutations hastighet (4Nμ)	genflöde (Nm)
Alla	0,11/0,11	0,03	0,09	7,8

* Den totala genetiska mångfalden (Ht) och den genomsnittliga totala genetiska mångfalden (Hs)

Den svaga genetiska strukturen mellan populationer åskådliggörs bäst i ett fylogenetiskt nätverk (figur 2). Detta nätverk illustrerar med önskvärd tydlighet avsaknad av genetisk struktur hos de maskar från de 11 svenska isolaten och inkluderar även de tyska maskarna. Fyra maskar skiljde sig från resten av gruppen (Pop10, Pop2, Pop2, Pop8, Figur 2). Tre av dessa maskar tillhörde de två isolaten som visade ett större antal sällsynta markörer (tabell 2), vilket skulle kunna förklara deras separation från resten av gruppen.



Figur 2. Ett fylogenetiskt nätverk som visar det genetiska sambandet mellan spolmaskarna. Varje förgrening representerar en enskild mask. Fyra maskar visade sig vara separerade från resten av gruppen och är markerade med populations nummer (ex pop 10). Maskarna som kommer från det tyska isolatet är markerade med en cirkel.

Populationsgenetik hos den globala spolmaskstammen

Den genetiska mångfalden var låg med ett H_j som varierade 0,04-0,12 och med ett genomsnitt på 0,08 (tabell 3).

Antalet sällsynta markörer (rarity) matchade förväntningarna (baserat på antalet och fördelningen av rörliga markörer i en slumpvis population) (tabell 3). Dock fanns det några avvikelser och det var i fyra isolat (två svenska, ett norskt och ett nordamerikanskt) som uppvisade ett större antal sällsynta markörer än förväntat (tabell 3). Därtill hade sex isolaten, varav två isländska, tre svenska och det tyska isolatet, färre antal sällsynta markörer än förväntat (tabell 3).

Den totala genetiska mångfalden (H_t) och den genomsnittliga mångfalden (H_s) var låga i den globala populationen (tabell 4). Den genetiska strukturen (F_{st}) var också låg, men den var samtidigt betydligt högre i analysen med alla isolat jämfört med den analys som enbart var baserad på de svenska isolaten (tabell 4). Värt att notera är att F_{st} värdet bland de svenska isolaten var nära noll vilket indikerar att det var nästan lika stor genetisk variation bland maskarna från samma ställe som från samtliga gårdarna. Populationens mutationshastighet (4Nμ) hos den globala populationen av spolmaskar var låg. Den genetiska driften mellan isolat (Nm) var måttlig, men var sju gånger högre hos de svenska isolaten jämfört med den globala spolmaskpopulationen (tabell 4).

Tabell 3. Värden för genetisk mångfald (H_j) och sällsynta markörer (rarity)

kod	Kontinent	Genetisk mångfald (H_j)	Rarity	*
S1	Europa	0.08	0.5	small
S2	Europa	0.11	2.0	large
S3	Europa	0.06	0.7	ns
S4	Europa	0.08	0.6	ns
S5	Europa	0.09	0.9	ns
S6	Europa	0.11	0.6	small
S7	Europa	0.06	0.3	small
S8	Europa	0.09	1.2	ns
S9	Europa	0.08	0.7	ns
S10	Europa	0.12	2.5	large
S11	Europa	0.07	0.8	ns
G	Europa	0.05	0.3	small
I1	Europa	0.09	0.3	small
I2	Europa	0.08	0.4	small
I3	Europa	0.10	0.5	small
N1	Europa	0.09	1.2	ns
N2	Europa	0.04	1.4	large
B	S. Amerika	0.07	0.6	ns
U1	N. Amerika	0.1	1.7	large
U2	N. Amerika	0.1	1.1	ns
medel		0.08		

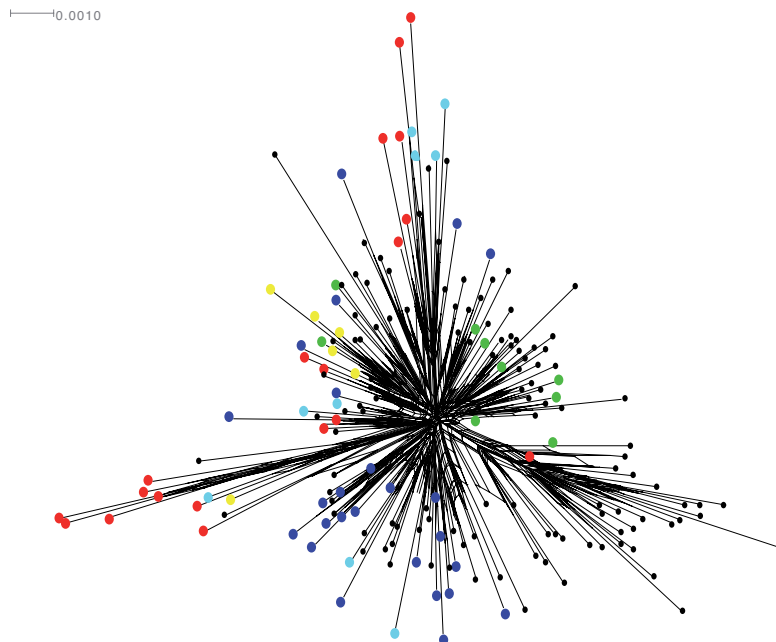
* ns, ej signifikant skild än förväntat, large, större antal markörer än förväntat, small, färre markörer än förväntat.

Uppskattningar av likheten av varje nematod till övriga medlemmar av samma isolat (reallocation) var låg både på global- och på nationell nivå (tabell 4). Ändå avvisades testet för neutral evolution (neutralitet) i nästan hälften av fallen (tabell 4), vilket tyder på att parning inte är helt slumpmässig.

Tabell 4. En jämförelse av medelvärden för genetisk mångfald, populations struktur, mutationshastighet, genflöde, reallocation och neutralitet mellan olika spolmaskisolat.

	Genetisk mångfald (Ht/Hs)	Populations struktur (Fst)	Population mutations hastighet (4Nμ)	Genetisk drift (Nm)	Re-allocation	Neutralitet	Geografiskt test
Globalt	0,10/0,08	0,2	0,07	1,0	41%	66%	p=0,014
Sve	0,09/0,08	0,03	0,07	7,1	34%	58%	p=0,120

Det geografiska testet av genetisk likhet mellan de globala isolaten (tabell 4) visade inte några tydliga mönster vilket tyder på att olika kontinenter inte tycks utgöra några starka barriärer för den genetiska strukturen hos denna parasit. Den svaga genetiska strukturen visas i ett fylogenetiskt nätverk (figur 3). Detta nätverk illustrerar tydligt den svaga globala strukturen mellan isolat samt den avsevärda inom och mellan populationen variationen mellan alla isolat.



Figur 3. Ett fylogenetiskt nätverk som visar det genetiska sambandet mellan spolmaskarna. Varje förgrening representerar en enskild mask. Maskarna från USA är markerade en röd cirkel, maskarna från Island med en grön cirkel, maskarna från Tyskland med en ljusblå cirkel och maskarna från Brasilien med en gul cirkel, Maskarna från Sverige är markerade med en svart liten cirkel.

Behandling av fenbendazol (Axilur[®]) och ivermektin (Ivomec[®])

Behandling av spolmasksmitta med fenbendazol (Axilur[®]) visade sig ha full effekt (100 %) mot spolmask vid samtliga de 11 svenska stuterier som deltog i studien (Tabell 5). Däremot hade behandling med ivermektin (Ivomec[®]) inte fullgod effekt, utan den var endast 45-60 % (Tabell 6). Att spolmasken har utvecklat resistens mot ivermektin stämmer väl överens med tidigare studier.

Tabell 5: Effekt av fenbendazol (Axilur[®])

Stuteri	Lokalisation	Grupp medel EPG* dag 0	Grupp medel EPG dag 14	Max EPG dag 0	FECR**
1	Boden	3070	0	7450	100%
2	Borlänge	140	0	450	100%
3	Heby	1580	0	3250	100%
4	Bro	55	0	200	100%
5	Ekerö	950	0	2500	100%
6	Tystberga	100	0	550	100%
7	Västervik	275	0	500	100%
8	Västervik	950	0	1250	100%
9	Landskrona	250	0	550	100%
10	Svenljunga	1070	0	2200	100%
11	Sjöbo	970	0	1150	100%

* EPG, eggs per gram faeces, ** FECR= $(1-(EPG_{d14}/EPG_{d0})) \times 100$

Tabell 6: Effekt av ivermektin (Ivomec[®])

Stuteri	Grupp medel EPG* dag 0	Grupp medel EPG dag 14	Max EPG dag 0	Max EPG Dag 14	FECR**
1	1070	370	3300	850	65%
2	250	150	300	200	40%
3	1100	500	2500	700	55%

* EPG, eggs per gram faeces, ** FECR= $(1-(EPG_{d14}/EPG_{d0})) \times 100$

Diskussion

Det viktigaste resultatet från den populationsgenetiska studien är att endast obetydliga genetiska skillnader förekommer mellan kontinenter och avsaknaden av samband mellan genetisk struktur och geografiska avstånd. Sammantaget pekar detta på att kontinenter inte är starka barriärer för den genetiska strukturen hos den globala *P. equorum* populationen. Ett annat betydelsefullt resultat från den här studien är att fenbendazol (Axilur[®]) fortfarande har en fullständig effekt för behandling av spolmaskinfektion hos föl och unghästar i Sverige.

Värt att notera från den globala populationgenetiska studien var att de isländska isolaten inte skiljde sig nämnvärt från övriga isolat trots den långa restriktionen (mer än 700 år) av import av hästar till landet och därmed avsaknaden av genflöde mellan maskar av olika ursprung. Likaså var det också förvånande att det spolmaskisolat som kom från en ML-naiv besättning i Kentucky var mer eller mindre identiskt med spolmaskisolat från övriga delar av världen. Trots det att maskarna i detta isolat kom från en besättning av hästar som aldrig blivit avmaskade med ML och det var vår förhoppning att detta skulle avspglas i AFLP-mönstret. Detta tyder på att den intensiva behandlingen av avmaskningsmedel sedan 60-talet inte har påverkat AFLP-mönstret hos *P. equorum* populationen, vilket är i linje med en liknade AFLP-analys av fårets stora löpmagmask, *Haemonchus contortus*. Inte heller hos denna mask kunde någon förändring i AFLP-mönster efter avmaskning påvisas (Otsen et al., 2001).

Ur ett historiskt perspektiv kan man spekulera i att populationsstrukturen hos *P. equorum* var genetiskt homogen redan för 1000 år sedan på grund av den utbredda transporten av hästar inom Europa (vilket möjliggjorde en effektiv blandning av parasiten genpool) före införandet av hästar till Island under 1000-talet och efter återinförandet av hästar till Amerika i slutet av 1400-talet. Därefter har genflöde dominerat i *P. equorum* populationen. Detta har resulterat i att den svaga genetiska strukturen har bestått och att ingen lokal anpassning mellan isolat har skett under de senaste 1000 åren.

AFLP resultaten visade också att den genetiska mångfalden var låg både hos den globala populationen och hos den svenska populationen. En låg genetisk mångfald hos olika *P. equorum* isolaten visar på en brist av genetisk variation bland maskarna såväl på global som nationell nivå. Dessutom var värdet för total genetisk mångfald låg i alla globala isolat och i de svenska isolaten. Den totala genetiska mångfalden har också rapporterats som låg hos grisens spolmask *Ascaris suum* liksom hos hönans spolmask *Ascaridia galli* (Nejsum et al., 2005; Höglund et al., 2012). Sammanfattningsvis tyder detta på att en låg genetisk mångfald verkar vara ett allmänt drag i ascaroida nematoder.

Förekomsten av *P. equorum* infektion hos föl är känd för att vara hög på många gårdar (t.ex. Austin et al, 1990; Osterman och Christensson, 2009). Det är dessutom vanligt att många föl flyttas mellan olika gårdar tillsammans med stoet under betes- och betäcknings-säsongen. Detta sker alltså under en kritisk period under året då fölen är infekterade varvid risken för att de sprider spolmaskägg och utbyter gener mellan de olika spolmaskpopulationerna som finns på de olika gårdarna. Att smittade föl flyttas mellan olika gårdar tycks följaktligen spela en roll för det höga flödet av gener som sågs hos den svenska spolmaskstammen i denna studie. Mobiliteten hos infekterade individer i kombination med det höga flödet av gener hos spolmask populationen indikerar att om resistens mot ett läkemedel uppstår på en gård kan spridningen av resistensgener ske snabbt inom den globala spolmaskpopulationen. Det ensidiga selektionstrycket som spolmaskar utsätts för i dagsläget med fenbendazol (Axilur[®]) är i sig illavarslande, då man i andra sammanhang, fram för allt hos fårets parasiter, har sett att detta ofta har lett till en effektiv selektion av läkemedelsresistens.

Sammanfattningsvis är det viktigt att veta hur den genetiska strukturen ser ut i en population eftersom man då kan analysera hur en population svarat på ett selektionstryck, såsom vid frekvent och ensidig användningen av ett anthelmintika. Resultaten från denna studie visar att den globala *P. equorum* populationen är mer eller mindre genetiskt homogen. Detta är förmodligen ett resultat av de omfattande förflyttningar även av smittade hästar som sannolikt skett både inom Europa och före införandet av hästar till Island och USA. Faran med en homogen population är att potentiella resistensgener kan spridas snabbt.

Referenser

- Austin, S.M., DiPietro, J.A., Foreman, J.H., Baker, G.J., Todd, K.S.J. 1990. *Parascaris equorum* infections in horses. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. 12, 1110-1119.
- Boersema, J.H., Eysker, M., Nas, J.W. 2002. Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones. Vet. Rec. 150, 279-281.
- 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. J. Equine Vet. Sci. 27, 67-71.
- Cribb N.C., Cote N.M., Boure L.P., Peregrine A.S. 2006. Acute small intestinal obstruction associated with *Parascaris equorum* infection in young horses: 25 cases (1985-2004). N. Z. V. J. 54, 338-343.
- Höglund, J., Morrison, D. A., Engström, A., Nejsum, P., Jansson, D. S. 2012. Population genetic structure of *Ascaridia galli* re-emerging in non-caged laying hens. Parasite Vector. 5, 97.

- Lindgren, K., Ljungvall, Ö., Nilsson, O., Ljungström, B.L., Lindahl C., Höglund, J. 2008. *Parascaris equorum* in foals and in their environment on a Swedish stud farm, with notes on treatment failure of ivermectin. *Vet. Parasitol.* 151, 337-343.
- Nejsum, P., Frydenberg, J., Roepstorff, A., Parker, E. 2005. Population structure in *Ascaris suum* (Nematoda) among domestic swine in Denmark as measured by whole genome DNA fingerprint. *Hereditas*, 142, 7-14.
- 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. *Vet Par*, 182, 372-377.
- Osterman-Lind, E., Christensson, D. (2009) Anthelmintic efficacy on *Parascaris equorum* in foals on Swedish studs. *Acta Vet Scand*, 1-4.
- Otsen, M., Hoekstra, R., Plas, M.E., Buntjera, J.B., Lenstra, J.A., Roos, M.H. 2001. Amplified fragment length polymorphism analysis of genetic diversity of *Haemonchus contortus* during selection for drug resistance. *Int. J. Parasitol.* 31, 1138-1143.
- Reinemeyer, C., Prado, J., Nichols, E., Marchiondo, A. (2010) Efficacy of pyrantel pamoate against a macrocyclic lactone-resistant isolate of *Parascaris equorum* in horses. *Vet Par*, 171, 111-115.
- Schougaard, H., Nielsen, M.K. 2007. Apparent ivermectin resistance of *Parascaris equorum* in foals in Denmark. *Vet. Rec.* 160, 439-440.
- Slocombe, J.O.D., de Gannes R.V., Lake, M.C. 2007. Macrocyclic lactone-resistant *Parascaris equorum* on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate. *Vet. Parasitol.* 145, 371-376.
- Veronesi, F., Moretta, I., Moretti, A., Fioretti D.P., Genchi, C. 2009. Field effectiveness of pyrantel and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment in Italian horse farms. *Vet. Parasitol.* 161, 138-141.

Publikationer

- Tydén E., Morrison, D., Engström, A., Janssen, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Höglund, J.- oral presentation – "Population Genetics of *Parascaris Equorum* Based on AFLP Marker Technique" Konferensbidrag (abstrakt och muntlig presentation) World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Buenos Aires 2010.
- Tydén E., Morrison, D., Engström, A., Janssen, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Höglund, J. Population Genetics of *Parascaris Equorum* Based on AFLP Marker Technique. Population genetics of *Parascaris equorum* based on DNA fingerprinting. *Infection, Genetics and Evolution* 13 (2013) 236–241.