

H1147027- Benzimidazolresistens hos hästens spolmask

Eva Tydén

institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap vid Sveriges lantbruks universitet

1. Bakgrund

Resistensutveckling mot avmaskningsmedel (anthelmintika) är ett växande problem inom veterinärmedicinen och utgör en fara för djurskyddet såväl nationellt som internationellt. Anthelmintikaresistens (**AR**) definieras som förmågan hos parasiter att överleva behandlingen med en normalt dödlig dos av anthelmintika. Behovet att förbättra vår förståelse om faktorer bakom **AR** är därför uppenbart för att utveckla strategier för effektiva kontrollprogram.

Hästens spolmask, *Parascaris equorum*, är den mest patogena parasiten hos föl och ettåringar över hela världen. I Sverige har prevalensen uppmätts till 48 % hos föl med en medianålder på 6,5 månad. Infektionen kan orsaka förkylningssymtom, hosta och försämrad tillväxt. I värsta fall kan infektionen vara dödlig genom att spolmasken obstruerar eller penetrerar tunntarmen. Honorna har en hög fertilitet och kan utsöndra över en miljon ägg per dag. Äggen är mycket tåliga då de har ett tjockt skal vilket gör att de kan vara infektiösa i fem till tio år i miljön.

Under de senaste decennierna har *P. equorum* infektion hos föl behandlats med makrocykliska laktoner, **ML** (ivermektin och moxidectin), benzimidazoler, **BZ** (fenbendazol) och tetrahydropyrimidiner (pyrantel). Sedan 2002 har resistens mot **ML** hos *P. equorum* rapporterats i flera länder så som Holland (Boersema et al, 2002), Kanada (Slocombe et al, 2007), USA (Craig et al, 2007), Danmark (Schougaard et al, 2007), Sverige (Lindgren et al, 2008) och Italien (Veronesi et al, 2010). Oro för parasit sjukdomar hos häst har lett till ett överutnyttjande av avmaskningsmedel, vilket i sin tur har resulterat i en resistensutveckling. Läkemedelsverket beslöt därför 2007 att avmaskningsmedel endast får förskrivas av en legitimerad veterinär. I allmänhet avmaskas föl flera gånger mot spolmask från 8 veckors ålder. Den praktiska konsekvensen av spolmaskens resistensutveckling mot **ML** är att fenbendazol (Axilur[®]) eller pyrantel (Banminth[®]/Fyrantel[®]) är de enda återstående substanserna. Substanserna har idag en god effekt mot spolmaskinfektioner i Sverige, men 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. Emellertid är det fler betesburna parasiter, som har utvecklat läkemedelsresistens mot **BZ**, däribland hästens blodmask (Osterman-Lind et al, 2007). Hos hästens blodmask råder ett omvänt resistensförhållande jämfört med spolmasken. Effekten är god för **ML**, men resistens är beskrivet för **BZ** (Traversa et al, 2009). Sviktande effekt är även rapporterad för pyrantel (Osterman-Lind et al, 2007).

I Sverige förekommer även **BZ**-resistens hos andra parasiter, t ex *Haemonchous contortus* hos får (Höglund et al, 2009). Hos de hittills undersökta parasiterna har mekanismen varit den samma för resistensutveckling mot gruppen av substanser inom **BZ**. Det har visat sig att en punktmutation kan uppstå på tre olika ställen på β -tubulin genen (kodon 167, 198 och 200) så att en aminosyra byts ut från tyrosin till fenylalanin. Detta får till följd att **BZ** hindras från att binda in till β -tubulin och därmed förhindras inte celldelningen, som annars leder till förlamning och död av parasiten. Mekanismen bakom hur resistens mot **ML** uppstår är ännu inte helt klarlagd men det finns studier som visar att olika membranpumpar uppregleras och på så sätt pumpas **ML** ut ur parasiten. Koncentrationen av substansen

minskar intracellulärt och därmed avtar eller uteblir effekten (James et al, 2009). Även om **AR** är ett hot både inom veterinärmedicinen och humanmedicinen är kunskapen om hur **AR** uppstår alltför bristfällig.

Referenser

Boersema, et al (2002) The Veterinary Record, 150, 279-281; Craig et al (2007) Journal of Equine Veterinary Science, 27, 67-71; Höglund et al (2009) Veterinary Parasitology, 161, 60-68; Lindgren et al (2008) Veterinary Parasitology, 151, 337-343; Osterman-Lind et al (2007) Veterinary Research Communication, 31, 53-65; Reinemeyer et al (2010) Veterinary Parasitology, 171, 111-115; Schougaard et al (2007) Veterinary Record, 160, 439-440. Slocombe, et al (2007) Veterinary Parasitology, 145, 371-376; Traversa et al (2009) Parasites and Vectors, 1-7. Veronesi et al (2010) Veterinary Parasitology, 172, 164-167.

2. Frågeställning

Syftet med det här projektet har varit att kartlägga resistensutvecklingen hos hästens spolmask mot benzimidazolderivat (**BZ**). Resistens mot avmaskningsmedel (anthelmintika) är ett växande och allvarligt hot mot djurhälsan. Genom EU direktivet 2001/82/EG blev anthelmintika receptbelagda oktober 2007 i Sverige. I nuläget är därför en restriktiv användning av de medel som finns tillgängliga nödvändig och effektiva kontrollprogram av **resistensläget behöver utvecklas** för att bromsa utvecklingen av **AR**. Kunskapsläget är dessvärre bristfälligt hur resistensen uppstår. Det övergripande målet med detta projekt har därför varit att på ett tidigt stadium detektera resistens mot **BZ** genom att utveckla en ny *in vitro* screening metod och att kartlägga bakgrunds nivåer av kända punktmutationer i β -tubulin genen, som är den bakomliggande orsaken till utvecklingen av **BZ**-resistens hos andra maskar.

3. Material och metoder

3.1 Effekt av benzimidazol faecal egg count reduction-test (FECRT)

Effekten av avmaskning med benzimidazol studerades 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 före avmaskning och 14 dagar efter avmaskning. Totalt studerades effekten av benzimidazol vid 11 gårdar i Sverige.

3.2 Exponeringsstudie dos-effekt samband för tiabendazol (modellsubstans för benzimidazol)

Spolmaskägg från sju olika gårdar renades fram från träck och tvättades med Milton-2 lösning (natriumhypoklorit 2 % (v/v) i natriumklorid 16,5 %).



Figur 1 Visar hur exponering av tiabendazol studeras under utveckling från ägg till larvstadium 3.

Ägg inkuberades (≈ 100 ägg/brunn) i stigande koncentrationer av tiabendazol (TBZ) från 0 -500 μM löst i DMSO (0,5%). Normalt utvecklas hästens spolmaskägg från ett encelligt ägg till en fullt utvecklad larv (L3) på 5 dagar vid 25°C. Ägg som inte utvecklats till L3 under 5 dagar bedöms som döda. Dataprogrammet WinNonlin 4.0.1 användes för analys av data. Data plottades först i ett diagram för att få en överblick. Sedan beräknades EC_{50}^1 genom att använda Hills slope, se ekvation nedan. (för utförlig metodbeskrivning se Tydén et al Biochemical and Molecular Parasitology 205, (2016) 22-28)

$$E = E_0 + \frac{E_{\max} \cdot C^n}{EC_{50}^n + C^n}$$

3.3 Isolering och sekvensering av β -tubulin isotyp 1 och 2

cDNA syntetiserades från RNA som renats fram från vuxna spolmaskar. Därefter designades primrar utifrån en konserverad sekvens i β -tubulin genen hos sex närbesläktade rundmaskar. En speciell PCR-metodik med degenererade primrar, nested PCR och RACE-PCR användes för att möjliggöra amplifiering av okända gener. De amplifierade PCR-produkten klonades, sekvenserades och analyserades med MacClade version 4.08. Släktskapet hos β -tubulin generna hos hästens spolmask studerades med ett fylogenetiskt träd baserat på 87 andra β -tubulin gener hos andra rundmaskar (för utförlig metodbeskrivning se Tydén et al Biochemical and Molecular Parasitology 190, (2013) 38-42.)

3.4 Kartläggning av mutationer i β -tubulin 1 och 2 som orsakar resistens

Tre punktmutationer i β -tubulin genen är sedan tidigare kända hos andra maskar att orsaka resistens mot benzimidazol. Dessa tre punkt mutationer finns i kodon 167, 198 och 200. Primrar designades för att amplifiera sekvens mellan kodon 167-200 för respektive isotyp. Med hjälp av ny sekvenseringsteknik, Illumina-sekvensering, kan vi på ett storskaligt vis ta reda på om dessa mutationer finns representerade. DNA renades fram från spolmasklarver i pooler om 1000. Därefter kördes en specialdesignad PCR med få cykler för att undvika att en och samma individ blir överrepresenterad. Innan Illumina-sekvensering är PCR amplifieringarna från larvpoolerna om 1000 till 100 000 larver. Totalt screenades 100 000 individuella larver. Bioinformatikanalyserna genomfördes i samarbete med teknologiplattformen för SNP&SEQ vid Uppsala Universitet. (För utförlig metodbeskrivning se Tydén et al Parasites & Vectors (2014) 7:410)

3.5 β -tubulin 1 och 2 genuttryck hos i olika utvecklingsstadier hos spolmask samt efter exponering av tiabendazol

Idag vet man inte vilken av β -tubulin isotyperna som BZ binder in till och utövar sin anthelmintiska effekt hos hästens spolmask. Genuttryck för de båda isotyperna studerades i olika utvecklingsstadier, ägg, larvstadium 3 och vuxen spolmask. Vi studerade även genuttrycket under embryogenesen (utveckling från ägg till larvstadium 3). Genuttryck av för β -tubulin 1 och 2 studerades vid sju tidsintervall, 0h, 6h, 24h, 72h, 96h och 120h (Figur 6).

Genuttrycket för β -tubulin isotyp 1 och 2 studerades också efter exponering av stigande koncentrationer av tiabendazol. Efter varje avslutat dos-effektsamband (från studien 3.1) isolerades RNA fram från varje pool om 100 spolmask larver (L3). (För utförlig metodbeskrivning se Tydén et al Biochemical and Molecular Parasitology 205, (2016) 22-28).

4. Resultat

4.1 Effekt av benzimidazol genom faecal egg count reduction-test (FECRT)

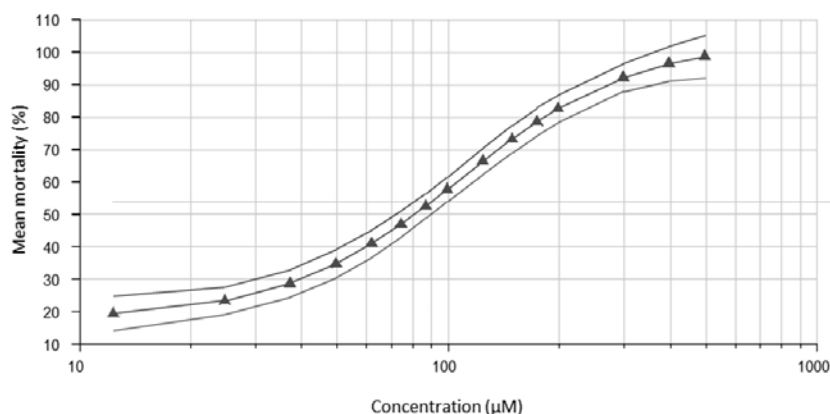
Behandling av spolmasksmitta med fenbendazol (Axilur), en substans inom benzimidazolgruppen som är godkänd till häst i Sverige, visade sig fortfarande ha full effekt (100 %) vid de 11 stuterierna som deltog i studien (Tabell 1).

Tabell 1. Effekt av fenbendazol (Axilur)

Stuteri	Lokalisation	Grupp medel EPG* dag 0	Grupp medel EPG dag 14	FECR**
1	Boden	3070	0	100%
2	Borlänge	140	0	100%
3	Heby	1580	0	100%
4	Bro	55	0	100%
5	Ekerö	950	0	100%
6	Tystberga	100	0	100%
7	Västervik	275	0	100%
8	Västervik	950	0	100%
9	Landskrona	250	0	100%
10	Svenljunga	1070	0	100%
11	Sjöbo	970	0	100%

4.2 Dos-effekt samband för tiabendazol

Ett sätt att mäta ett läkemedels effektivitet är genom ett EC₅₀-värde (effective concentration) i ett dos effekt-samband. I det här fallet är den effektiva dosen som avdödar 50 % av individerna (EC₅₀) på 55 µM. (Figur 2). Ägg som inte utvecklas till en larv bedöms som döda, se Figur 3 Resultaten visade att det finns små skillnader mellan de EC₅₀-värden mellan gårdar (Tabell 2).



Figur 2. Dos-effekt samband 0,5% DMSO i 25°C. Det är ett medelvärde från sju stuterier. fem olika stuterier.



Figur 3 visar hur höga koncentrationer av tiabendazol stör celldelningen genom att orsaka missbildningar eller bromsa embryogenesen i ett tidigt stadium.

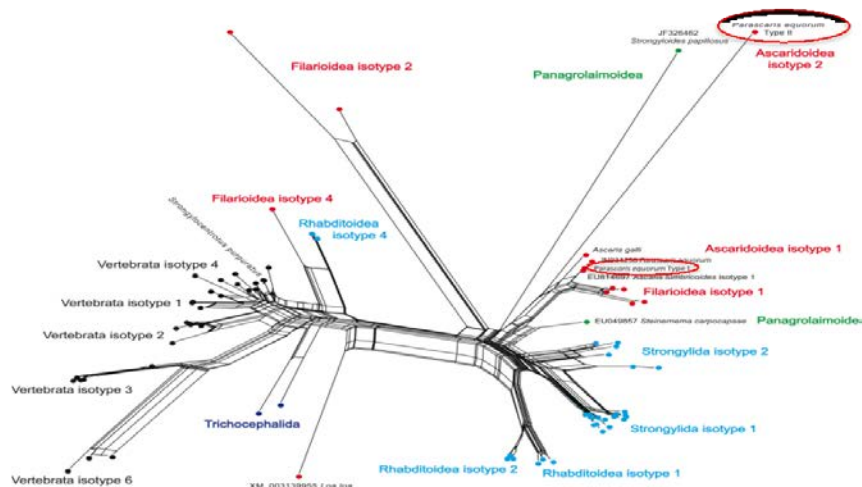
Tabell 2. Visar EC₅₀ värden från exponeringar i 0,5 % DMSO Ägg insamlade från totalt sju besättningar.

Stuteri	EC ₅₀ (µM) 0,5% DMSO
Skråmsta	55
Skellefteå	107
Skurup	112
SVA*	60
Uttran	95
Askö	80
Brättefors	73

* Tyvärr vet vi inte den geografiska lokaliseringen från ägg som insamlats genom kontakt med SVA.

4.3 Sekvensering av spolmaskens β-tubulin gener

De tidigare okända generna för β-tubulin genen för isotyp 1 och isotyp 2 hos hästens spolmask har isolerats och sekvenserat. De nya gensekvenserna är publicerade i genbank med id-nummer KC713797 och KC713798. En fylogenetisk analys av samtliga kända β-tubulin isotyper visade att nematoder (rundmaskar) har en större mångfald bland sina β-tubulin gener än vad som kan ses hos vertebrater (ryggradsdjur) (Figur 4). Dessutom olika β-tubulin isotyper hos nematoder är organiserade enligt ett mer komplext mönster hos nematoder än hos vertebrater. I det fylogenetiska nätverket återfinns den ena isotypen från hästens spolmask tillsammans med övriga kända isotyp 1-sekvenser från spolmaskar hos andra djurslag, medan den andra sekvensen återfinns på en separat utvecklingslinje. Vi drar därför slutsatsen att detta är en ny icke tidigare beskriven isotyp 2.



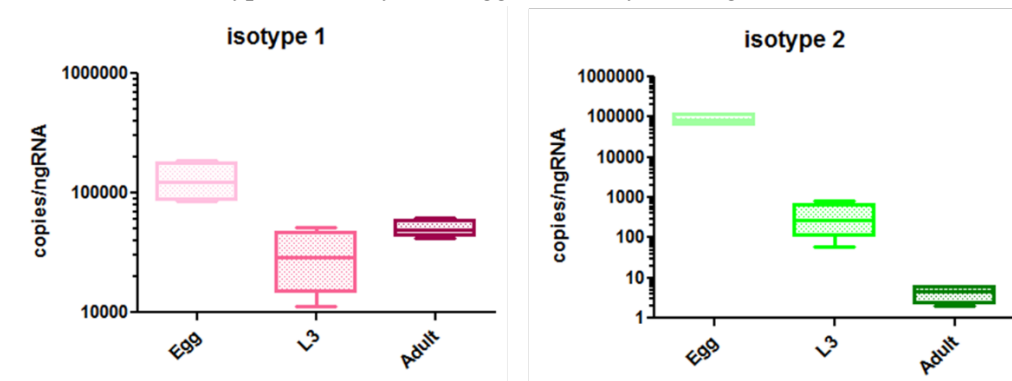
Figur 4. Ett fylogenetiskt nätverk av 87 β -tubulin sekvenser. De taxonomiska grupperna är namngivna enligt GenBank Taxonomy. Färgerna representerar de olika kladerna inom nematoder klad I = blå, klad III = röd, klad IV = grön, och klad V = ljusblå.

4.4 Screening av polymorfism i spolmaskens β -tubulin gener

I den här studien har de redan tidigare beskrivna punktmutationerna i β -tubulin genen som orsakar resistens mot benzimidazoler hos andra maskar undersökts hos hästens spolmask. Punktmutationerna TAC och GAC som ändrar uttryck av aminosyra återfanns inte i kodon 167, 198 eller 200 trots att 100 000 individuella larver screenades.

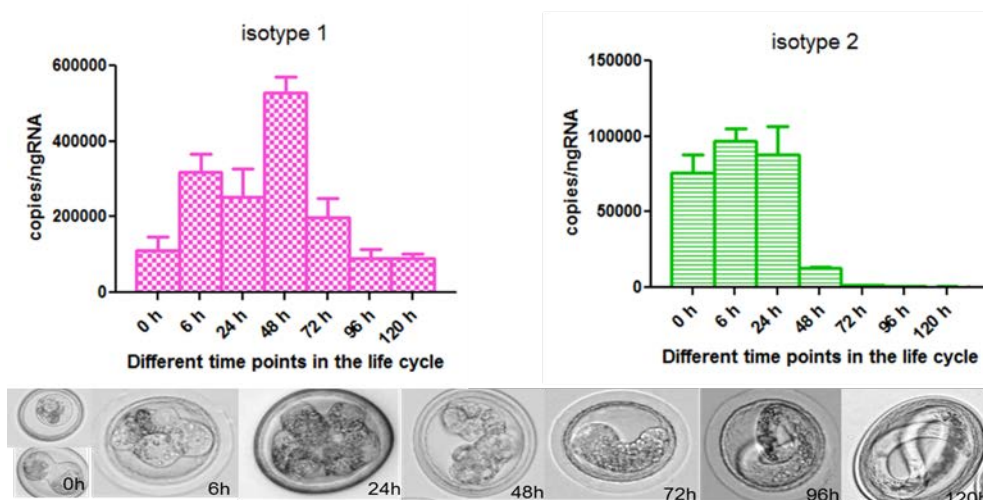
4.5 β -tubulin genuttryck i olika stadier i utveckling ägg, larv och vuxen samt efter exponering av tiabendazole

Genuttryck av isotyp 1 och 2 skiljer sig i de olika utvecklingsstadierna hos hästens spolmask. Genen för isotyp 1 är uttryckt i alla tre olika livsstadier; ägg larv och vuxen. Isotyp 2 däremot visar ett annat mönster. Den isotypen är uttryckt i ägg och i mycket låga nivåer hos vuxna maskar (Figur 5).



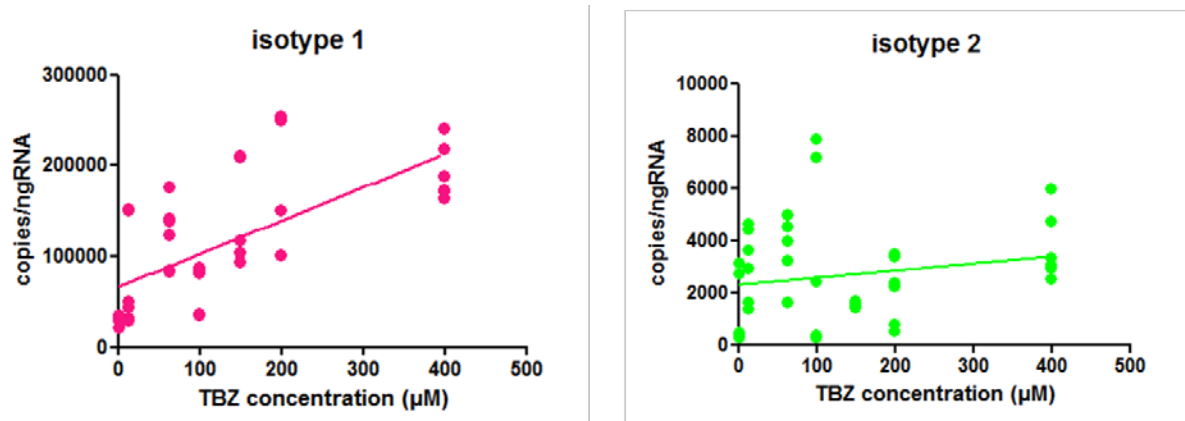
Figur 5. Visar genuttryck av isotyp 1 och isotyp 2 i olika livsstadier hos spolmask.

Även under embryogenesen förändras genuttrycket av isotyp 1 och 2 markant. Genen för isotyp 2 uttrycktes endast tidigt under embryogenesen, under de 24 första timmarna, och verkar sedan stängas av. Ett annat mönster observerades för isotyp 1. Den genen är uttryckt hela tiden men med ett stigande uttryck mellan 0-48 timmar för att sedan avta något (Figur 6).



Figur 6. Visar genuttryck av isotyp 1 och 2 i olika utvecklingsstadier; 0h, 6h, 24h, 72h, 96h och 120h under embryogenesen.

Vidare visade resultaten att genuttrycket för isotyp 1 påverkades efter exponering av tiabendazol men inte uttrycket för isotyp 2 (Figur 8).



Figur 7 visar genuttryck av isotyp 1 och isotyp 2 efter exponering av stigande koncentrationer av tiabendazol.

6. Diskussion

Sedan 2000-talet finns det flera rapporter från bland annat Sverige, Europa och USA om en utbredd resistens mot läkemedelsgruppen makrocycliska laktoner (**ML**) hos hästens spolmask. Det finns också rapporter från USA om **multiresistenta** spolmaskpopulationer mot både **ML** och **pyrantel**. I det läget återstår endast benzimidazolerna (**BZ**) som behandlingsalternativ. Flera andra betesburna parasiter har emellertid utvecklat läkemedelsresistens mot **BZ** och däribland hästens blodmask. Vår arbetshypotes i det här projektet har varit att punktmutationer associerade med **BZ-resistens** i genen som kodar för β -tubulin, är lågt förekommande hos hästens spolmask i svenska hästbesättningar och därmed en riskpotential för utvecklandet av resistens.

Vi har tidigare visat att den globala spolmaskstammen är genetiskt lika och att kontinenter inte verkar vara starka hinder för den genetiska strukturen. Detta skulle kunna förklara den snabba spridningen av resistens mot **ML** hos spolmasken. I det här projektet har vi identifierat och sekvenserat β -tubulin isotyp 1 och 2, vilka är målgener för **BZ**. Ett fylogenetisk nätverk, baserat på 87 β -tubulin **BZ-sekvenser**, visades att en ovanligt stor mångfald i arrangemanget av dessa gener hos rundmaskar. Vidare undersökte vi förekomsten av punktmutationer i **BZ-generna**, som är kända för att orsaka resistens hos andra maskar. Med hjälp av djupsekvensering (Illumina Hi-seq) har vi screenat **100 000 spolmasklarver** för punktmutationer som är associerade med **BZ-resistens**. Trots det stora antal individer som screenats kunde vi inte återfinna någon av dessa mutationer. Våra resultat tyder på att mekanismer för hur resistens utvecklas inte kan generaliseras mellan taxonomiska grupper utan är förmodligen artspecifika.

Idag vet man inte vilken av β -tubulin isotyperna som **BZ** binder in till och utövar sin anthelmintiska effekt hos hästens spolmask. Vi studerade genuttryck av **isotyp 1** och **2** under embryogenesen och i olika livsstadier hos spolmask. Våra resultat pekar på att dessa två isotyper har olika betydelse under embryogenesen samt i parasitens livsstadium. **Isotyp 2** uttrycks framförallt under embryogenesens första 24 timmarna och i väldigt låga nivåer hos vuxna maskar. Genen för **isotyp 1** uttrycks i alla livsstadier från ägg till vuxen mask och återfinns genom hela embryogenesen. Det tyder på att **isotyp 1** med största sannolikhet är målmolekyl för **BZ**.

Effekten av **BZ** mot spolmask undersöktes på 11 stuterier med en så kallat fecal egg count reduction test (FECRT). Testet går ut på att antalet parasitägg räknas innan avmaskning och sedan 14 dagar efter avmaskning. Våra resultat visar att effekten av **BZ** (Axilur) är 100%. För närvarandet finns det alltså **inget som tyder på begynnande resistens mot BZ i Sverige**. Vi har också utvecklat en *in vitro* metod för att studera dos-effektsamband för tiabendazol (TBZ som är en substans ur BZ-gruppen). Vi observerade små skillnader i EC₅₀ mellan de olika stuterierna. Vi vet inte i dagsläget om det har någon klinisk relevans. En intressant iakttagelse är att det krävs betydligt högre koncentrationer av tiabendazol för avdödande av spolmasken jämfört med andra maskar. Hästens små blodmaskar (*Cyathostominae*) avdödas t.ex. vid 0,06 µg/ml, men 100 gånger högre dos krävs för att avdöda spolmasken. Blodmaskarna är därmed känsligare för **TBZ** än spolmasken. Orsaken bakom den observerade skillnaden i känslighet mot **BZ** mellan spolmask och blodmask vet vi inte. Avsikten med den här *in vitro* metoden är att den i ett senare skede kan sättas upp på rutindiagnostiska laboratorier för att kunna erbjuda hästnäringen screening av resistensläget mot **BZ** baserat på referensvärdet för ED₅₀ från denna studie.

Sammantaget har det här projektet utvecklat **två** metoder för tidig detektion av **BZ-resistens** hos hästens spolmask. Vi har dels utvärderat ett **molekylärt test** för punktmutationer i β-tubulin genen och som lämpar sig för som screening och dels definierat ett **referensvärde *in vitro*** för mottagliga spolmaskar. Ett stigande värde kan det vara ett mått på resistensutveckling. Verktyg för tidig detektion av en begynnande resistens är nödvändig för att i tid kunna motverka att resistent spolmaskar sprids. Vi har visat att effekten av **BZ** (Axilur) är **100%** och att det för närvarandet **inte** finns tecken på begynnande resistens mot **BZ** i Sverige. Resistensutvecklingen måste oavsett hållas under uppsikt och sökandet efter resistensgener hos hästens spolmask bör därför fortsätta. Det skulle vara förödande för den unga hästens välfärd om spolmasken utvecklar resistens mot ytterligare ett avmaskningsmedel.

7. Publikationer

1. **Vetenskaplig publikation:** E. Tydén, A. Engström, D.A. Morrison, J. Höglund. Sequencing of the β-tubulin genes in ascarid nematodes. *Biochemical and Molecular Parasitology* 190, (2013) 38-42. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685113000704>
2. **Vetenskaplig publikation:** E. Tydén, J. Dahlberg, O. Karlberg, J. Höglund. Deep Amplicon Sequencing of Preselected Isolates of *Parascaris equorum* in β-tubulin Codons Associated with Benzimidazole Resistance in Other Nematodes. *Parasites & Vectors* (2014) 7:410. <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/1756-3305-7-410>
3. **Vetenskaplig publikation:** E Tydén, M Skarin, M Andersson-Franko, M Sjöblom, J Höglund Differential expression of β-tubulin isotypes in different life stages of *Parascaris spp* after exposure to thiabendazole. *Biochemical and Molecular Parasitology* 205, (2016) 22-28. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685116300123>
4. **Konferensbidrag:** World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) DIFFERENTIAL EXPRESSION OF β –TUBLIN ISOTYPE 1 AND 2 IN THE EQUINE ROUNDWORM PARASCARIS SP, hösten 2015, Liverpool
5. **Konferensbidrag:** Baltic Society for Parasitology (SBSP) DIFFERENTIAL EXPRESSION OF β –TUBLIN ISOTYPE 1 AND 2 IN THE EQUINE ROUNDWORM PARASCARIS SP, våren 2015, Uppsala
6. **Populärvetenskapligt seminarium och abstrakt:** Hippocampus Resistensläget hos hästens parasiter, Hösten 2016 <https://www.slu.se/fakulteter/vh/om-fakulteten/namnder-och-kommitteer/kommitteer/vh-fakultetens-kommitte-for-hastfragor/hippocampusdagen-2016-program/>

7. **Populärvetenskapligt seminarium och abstrakt: LÄKEMEDELSRESISTENS HOS HÄSTENS PARASITER** abstrakt på SLUs och UDS socialamedier Öppet hus universitetets Djursjukhuset <https://www.slu.se/ew-nyheter/2016/11/oppet-hus-pa-uds/>
8. **Populärvetenskapligt seminarium och abstrakt: Framtidens djurhälsa och djurvälstånd Mutation för benzimidazol-resistens hittades inte hos hästens spolmask** Forskningsnyheter nr 8 2014 <http://www.slu.se/benzimidazolresistens>
9. **Studentarbete** Moa Skarin “Gene expression of β -tubulin in *Parascaris equorum* exposed to thiabendazole” Masterarbete i infektionsbiologi (30hp)
10. **Studentarbete** Matilda Sjöblom “In vitro studies for evaluation of dosage-effect relationships for benzimidazoles in *Parascaris equorum*” Masterarbete inom apotekarprogramet (30hp)
11. **Studentarbete** Elinor Bertholtz “Gene expression and mutations in P-glycoprotein 11 and 16 in the horse nematode *Parascaris equorum*” Masterarbete i infektionsbiologi (30hp)

12. Slutsats om nyttan för hästnäringen

Sammantaget har det här projektet utvecklat **två** metoder för tidig detektion av **benzimidazolresistens** hos hästens spolmask. För det första har vi tagit fram ett **molekylärt test** för screening av punktmutationer, som man vet orsakar resistans hos andra parasitära maskar. För det andra har vi arbetat fram ett **referensvärde** (ED_{50}) *in vitro* för mottagliga spolmaskar. Om detta värde stiger kan det vara ett mått på resistensutveckling. Verktyg för tidig detektion av en begynnande resistens är nödvändig för att i tid kunna motverka att resistens sprids. Vi har visat att effekten av **benzimidazol** (Axilur) är **100%**. För närvarandet finns det alltså **ingen** signal på begynnande resistens mot **benzimidazol** i Sverige, men resistensutvecklingen måste hållas under uppsikt så att hästnäringen inte står utan effektiva läkemedel mot spolmaskinfektion.

Det är vidare viktigt att kontinuerligt undersöka effekten av våra avmaskningsmedel eftersom det inte finns något som pekar på att resistensen är reversibel utan ”**en gång resistent alltid resistent**”. Sökandet efter resistensgener hos hästens spolmask måste fortsätta. Det skulle vara förödande för den unga hästens välfärd om spolmasken utvecklar resistens mot ytterligare ett avmaskningsmedel

13. Resultatförmedlingsplan till näringen

Tabellen visar hur resultat har förmedlats med svart text och planerad förmedling röd text

Kommunikationskanal	Motiv för val av kommunikationskanal och huvudsakliga mottagare	Tidsplan för förväntad och leverans av del- och slutresultat
Seminarium	Vidilab & SVA - diagnostiklaboratorium	delresultat hösten 2013 slutresultat hösten 2016
Seminarium (Hippocampus)	Veterinärer, forskare, lärare, intresserade från näringen	Hösten 2016
Seminarium öppet hus UDS (universitetets djursjukhuset)	Allmänheten, hästägare	Hösten 2016
Svensk vetenskaplig artikel	Svensk veterinärtidning/ veterinärer	Sammanfattning slut resultat våren 2017
Framtidens djurhälsa-djurvälstånd	Bred sändlista SLU sociala medier	Hösten 2014
Internationell vetenskaplig artikel (3 st – se publilla)	forskare	Biochemical and Molecular Parasitology, Parasite & Vector
Internationell konferens WAAVP	forskare och veterinärer	SBSP våren 2016

Vi har även haft möte med projektets referensperson Bitte Ljungström, VD vid Vidilab.

Summary in English

The horse roundworm, *Parascaris equorum*, is the most pathogenic parasite of foals and yearlings. There are several reports of resistance of *P. equorum* to macrocyclic lactones (eg Ivermectin) and the drug of choice is presently benzimidazole (Axilur). A better knowledge of the mechanisms behind resistance is required in order to develop sustainable systems for managing ascarid infections. This project has improved the knowledge of drug resistance in the horse roundworm.

The goals of this project is **firstly** to develop an *in vitro* test for prediction an incipient development of resistance to benzimidazole and **secondly** to identify the presence of mutations in the beta-tubulin gene that cause this resistance.

We have shown that benzimidazole treatment still is 100% effective for treatment of roundworm infections in foals in Sweden. In addition, an *in vitro* assay for dose-response relationship of the model substance thiabendazole in the equine roundworm was developed. This ED₅₀ value of 55 µM can be used in the future as a reference value for susceptibility of benzimidazoles. An increase of ED₅₀ could be the first sign of emerging resistance.

Our molecular research has earlier shown that the global *P. equorum* population is genetically similar and that continents do not appear to be strong barriers for the genetic structure of this parasite using the genetic mapping technique AFLP. This could explain the fast spread of drug resistance in the global population of *P. equorum*. In this project have we identified and sequenced β-tubulin isotype 1 and 2, the drug target genes for benzimidazoles. A phylogenetic network, based on 87 β-tubulin sequences, showed that there is an unusually large diversity in the arrangement of these genes in Nematoda. Further on we used deep amplicon sequencing with Illumina/HiSeq for mass screening of single nucleotide polymorphism (SNP) that are known to be responsible for resistance in other parasitic nematodes. Surprisingly, no SNP was observed despite sequencing of >100 000 individual worms.

Moreover gene expression of β-tubulin isotype 1 and 2 was studied at different life stages of *P. equorum*. An obvious differential expression profile was observed for isotype 1 and 2 at various life stages. Isotype 1 was expressed in all phases; eggs, larvae and adult worms. Isotype 2 was only observed at high levels during the early phase of the embryogenesis and thereafter subsequently almost turned off to very low expression levels. This assume that isotype 1 is most likely the target for benzimidazoles in *P. equorum*.

This project has resulted in three scientific publications and our major conclusions from these studies are that there is a potential risk for a rapid spread of drug resistance genes in *P. equorum*, but that the mechanism of benzimidazoles-resistance is probably species specific and under the control of other genes than in the nematodes of ruminants. Thus, the take home message is that mechanism of drug resistance cannot be generalized from one taxonomic group to another within nematodes. Obviously, drug resistance to one anthelmintic drug class in one nematode species is caused by mutations in the drug target gene, whereas the same mutation does not seem to cause resistance in other distantly related species. If this issue is not taken seriously to reduce development of resistance we may run out of effective drugs for treatment of ascarid infections in horse. The search for potential genetic markers for resistance has to continue.