



Slutrapport: Stiftelsen lantbruksforskning Dnr H0550089

Förekomst av resistens mot avmaskningsmedel (anthelmintika) hos parasitiska rundmaskar (nematoder) hos får

(Prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep)

Johan Höglund, Sektionen för Parasitologi, Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap (BVF), SLU & Katarina Gustafsson, Fårhälsovården (SvDHV)

Bakgrund

Vid betesgång exponeras får för ett stort antal inälvsmaskar som nedsätter deras hälsa och produktivitet. De vanligaste arterna under svenska förhållanden är mag-tarmmaskarna *Teladorsagia circumcincta* och *Trichostrongylus* spp. Senare års studier har även visat att stora löpmagsmasken *Haemonchus contortus*, som är en blodsugande parasit, är på stark frammarsch och att den förekommer i cirka 30% av landets besättningar (7, 12).

Parasitangrepp är ett stort problem hos får på bete. Betesburna parasiter måste därför kontrolleras, vilket vanligtvis sker med hjälp av avmaskningsmedel i kombination med olika beteshygieniska åtgärder (15). Trots ett mångårigt och intensivt sökande efter alternativ till avmaskning har det visat sig vara svårt att utöva effektiv parasitkontroll hos får utan tillgång till effektiva avmaskningsmedel. Denna situation hotas naturligtvis när maskarna utvecklar motståndskraft (resistens) mot läkemedlen, vilket under senare år har rapporterats från allt fler länder med en mycket omfattande fårproduktion (1, 2, 3, 8, 13, 14, 16).

För att motverka resistensutveckling är det viktigt att kunna övervaka utvecklingen så att problemet upptäcks i tid. Det är nu 15 år sedan som det genomfördes en systematisk undersökning av resistensläget i Sverige (10). Det bedömdes därför som angeläget att genomföra en ny kartläggning av resistensläget för att därmed kunna förbättra rådgivningen till djurägarna.

Syftet med projektet var att uppdatera kunskapen om resistensläget hos fårets inälvsmaskar med en så kallad Faecal Egg Count Reduction Test (FECRT). Arbetet har bedrivits i nära samverkan mellan Fårhälsovården (SvDHV), Vidilab och parasitologisk expertis vid Institutionen för Biomedicin och Veterinär Folkhälsovetenskap (BVF), Sveriges lantbruksuniversitet (SLU).

Material och metoder

Läkemedelsresistens kontrolleras vanligtvis genom att mäta behandlingseffekten hos avmaskningsmedlen med en så kallad Faecal Egg Count Reduction Test (FECRT) (4). Principen för FECRT är att man analyserar äggutskiljningen i träckprover från cirka 10 lamm med McMaster metod såväl före som cirka en vecka efter avmaskning. Därefter uttrycks reduktionen i äggutskiljning som en procentsats, varvid en behandlingseffekt som är $\leq 95\%$ och med ett nedre konfidensintervall på $\leq 90\%$, tolkas som att den testade maskpopulationen uppvisar resistens. I denna studie undersöktes effekten av albendazol (Valbazen®) som är en bensimidazol och av ivermektin (Ivomec®) som hör till substansgruppen makrocycliska laktoner. Idag finns bara fem avmaskningsmedel registrerade för användning till får i Sverige, och samtliga tillhör dessa två substansgrupper; bensimidazoler respektive makrocycliska laktoner (5). Vidare inkuberades parasitäggen och efter odling av larverna artbestämde maskarna genom att studera morfologin hos det infektiösa stadiet (L3).

Larvklureorna användes också som templat för två molekylära tester. Med den ena testen undersöktes allelfrekvensen av en punktmutation i beta-tubulin genen hos maskarna som är förknippad med resistens (6, 11). Den andra testen var en artspecifik PCR-metod för detektion av *Haemonchus* (17).

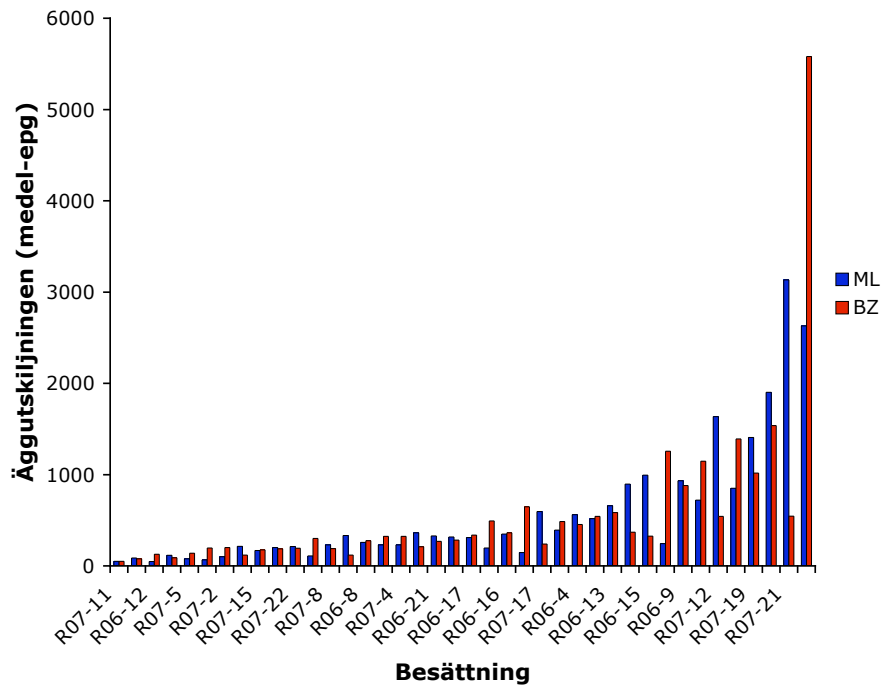
Resultat

Äggutskiljningen i de olika grupperna varierade stort mellan 13 och 5580 epg (Figur 1). Både *Teladorsagia* och *Trichostrongylus* identifierades i samtliga larvklureor, medan *Haemonchus* fanns i cirka 30% (Figur 2). I 41 (91%) av de 45 grupper som avmaskades med albendazol var träckproverna negativa (antalet ägg per gram träck var ≤ 50 epg) hos alla lamm 1-2 veckor efter avmaskning. I de resterande grupperna fanns det dock flera lamm som utskiljde ägg i träcken även vid återbesöket. Reduktionen i dessa fyra grupper varierade mellan 81% och 99%. Enligt de statistiska beräkningarna var det frågan om resistens bara i två (4%) av lammgrupperna. Det var i dessa fall så många som 14 av 15 respektive 5 av 8 lamm som utskiljde ägg trots tidigare avmaskning (Tabell 1).

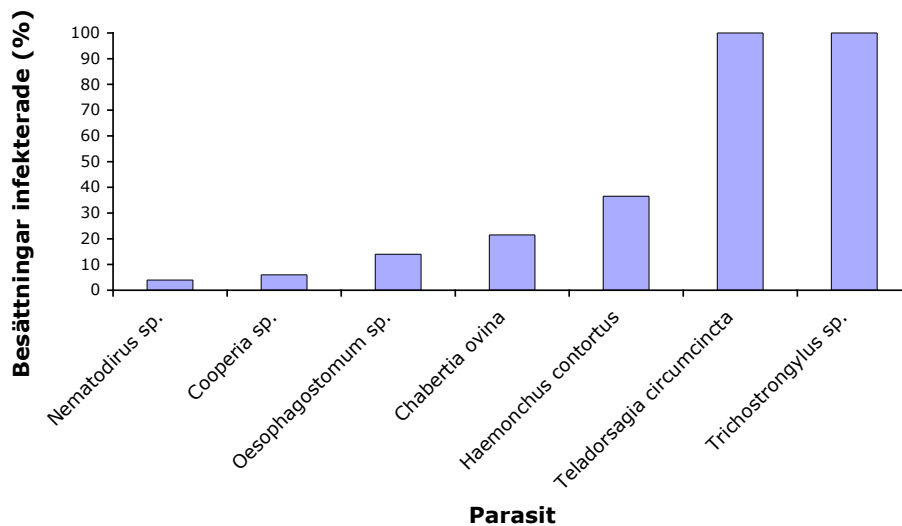
På motsvarande sätt var 43 (95%) av samtliga grupper negativa efter avmaskning med ivermektin. I de två fall där ägg noterades efter avmaskning rörde det sig bara om ett respektive två lamm i varje grupp som utskiljde ägg (Tabell 1).

Med den molekylära testen kunde vi se att allelfrekvensen för bensimidazolresistens varierade mellan 0-100%, samtidigt som den var 100% i de två isolat som uppvisade klinisk

resistens med FECRT. Samtliga dessa kulturer innehöll *Haemonchus* och i flera fall hittades även larver i kulturerna efter avmaskning. Mer oroväckande var att vi såg att ytterligare 3 besättningar hade en allelfrekvens $\geq 95\%$, vilket bekräftar att FECRT är en trubbig metod.



Figur 1. Äggutskiljningen uttryckt som antal ägg per gram träck (epg) i lammgrupperna före avmaskning. Som synes varierade medel-epg stort mellan 13 och 5580 epg.



Figur 2. Andelen besättningar som var infekterade med olika arter inälvsmaskar baserat på morfologisk undersökning av cirka 100 infektiösa tredjestadielarver (L3) i kulturer före avmaskning.

Vidare såg vi att samtliga larvkulturer, utom en, där *Haemonchus* identifieras morfologisk var även positiva med den artspecifika PCR-metoden. Den molekylära metoden var dock känsligare än den morfologiska analysen eftersom det hittades ytterligare 5 positiva prover som var negativa vid den mikroskopiska undersökningen av larver i kulturer (Tabell 2).

Tabell 1. Äggreduktionen i de lammgrupper där det fanns äggpositiva djur även 1-2 veckor efter avmaskning. Reduktionen beräknades på två sätt

Besättning	Antal äggpositiva Före avmaskning (efter)	% Reduktion \pm 95% konfidensintervall (CI)	
		1)	2)
Makrocyclisk lakton-grupp			
1 = Res	13 (2)	91 (75-104)	92 (56-98)
4 = Res	11 (1)	93 (75-104)	94 (43-99)
7	14 (1)	98 (94-104)	98 (86-100)
24	12 (2)	99 (99-104)	100 (98-100)
Bensimidazol-grupp			
24	15 (5)	99 (97-104)	99 (96-100)
33 = Res	15 (14)	81 (66-92)	82 (65-91)
36	11 (3)	97 (93-104)	98 (90-99)
39 = Res	8 (5)	94 (66-104)	94 (66-99)

Tabell 2. Jämförelse av antalet larvkulturer ($n=81$) där den stora löpmagsmasken *Haemonchus contortus* påvisades med en artspecifik-PCR metod, respektive genom att med mikroskopisk analys morfologiskt identifiera infektiösa tredjestadielarver (L3). Detektionsnivån för PCR metoden var $\geq 3\%$, medan sensitiviteten och specificiteten för PCR metoden beräknades till 97 % respektive 90

		"Gold-standard" Morfologisk analys	
		Positivt svar	Negativt svar
Artspecifik-PCR metod	Positivt svar	31	5
	Negativt svar	1	44

För den som är mer intresserad av resultaten kommer de att publiceras i sin helhet i *Veterinary Parasitology* under 2009 (5).

Diskussion

Resultaten från denna studie visar att avmaskning, såväl med ivermektin som med albendazol, fungerade planerligt och att den släckte äggutskiljningen i merparten av de undersökta lammgrupperna. Vid en jämförelse med motsvarande situation i flera andra länder är

resistensläget vad gäller fårets inälvsmaskar fortfarande att betrakta som mycket gott i Sverige.

Det finns sedan tidigare rapporter om bensimidazolresistenta *H. contortus* i landet (10). Även om föreliggande undersökning var mycket mer omfattande än den tidigare studien för 15 år sedan, tyder dessa nya resultat på att resistensläget är stabilt och att det inte har förvärrats under senare tid. Däremot noterades höga allelfrekvenser av den mutation som är förknippad med bensimidazol-resistens hos maskar, i fler lammgrupper än vad som avslöjades med FECRT. Detta understryker än en gång att FECRT är en okänslig metod för att avgöra om en besättning är infekterad med resistent maskar eller ej (9), i synnerhet när det som i denna studie endast var frågan om en art (*Haemonchus*) bland flera andra.

Det finns således behov av att etablera alternativa och mer förfinade diagnostiska metoder för att lättare och mer effektivt kunna övervaka resistensläget i svenska fårbesättningar. Resultat av denna studie visar att den molekylära diagnostik som användes här, och som alltså mäter förekomsten av en punktmutation i beta-tubulin genen hos maskarna, är en känsligare metod och därför är ett bra komplement till FECRT. Dessvärre är denna mutation sannolikt bara en av flera verkningsmekanismer som ligger bakom maskarnas resistensutveckling. Det finns därmed behov av att ytterligare fördjupa och intensifiera dessa studier, inte minst när det gäller spårning av resistens mot ivermektin, där det i dagsläget saknas tillförlitliga dylika genetiska markörer.

Även det faktum att vi hittade fler besättningar som var infekterade med *Haemonchus* med den artspecifika PCR-metoden jämfört med vad som gjordes genom morfologisk artbestämning, har stor praktisk betydelse. Detta är betydelsefullt eftersom valet av avmaskningsmedel påverkas om *Haemonchus* finns i besättningen.

När det gäller ivermektin anser vi att det finns andra förklaringar än resistens som orsak till den nedsatta behandlingseffekten i två besättningar. Endast tre djur var äggpositiva efter avmaskningen, och dessutom var antalet ägg i träcken lågt före behandling, vilket gör det svårt att säkerställa förekomst av resistens med FECRT. Med denna bakgrund bör man i stället överväga förklaringar som t ex att enstaka djur inte svalt dosen, även om resistens naturligtvis inte helt kan uteslutas.

Referenser

1. Bartley, D.J., Donnan, A.L., Jackson, E., Sargison, N., Mitchell, G.B.B., Jackson, F., 2006, A small scale survey of ivermectin resistance in sheep nematodes using the faecal egg count reduction test on samples collected from Scottish sheep. *Vet Parasitol.* 137, 112-118.
2. Chandrawathani, P., Waller, P.J., Adnan, M., Höglund, J., 2003, Evolution of high-level, multiple anthelmintic resistance on a sheep farm in Malaysia. *Trop Anim Health Prod.* 35, 17-25.
3. Chartier, C., Pors, I., Hubert, J., Rocheteau, D., Benoit, C., Bernard, N., 1998, Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in Western France. *Vet Parasitol.* 29, 33-41.
4. Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., Samson-Himmelstjerna, G.v., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruysse, J., 2006, The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol.* 136, 167-185.
5. 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 results from the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the beta-tubulin gene. *Vet Parasitol.* (in press).
6. Kwa, M.S., Veenstra, J.G., Roos, M.H., 1994, Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol Biochem Parasitol.* 63, 299-303.
7. Lindqvist, Å., Ljungström, B.L., Nilsson, O., Waller, P.J. 2001. The dynamics, prevalence and impact of nematode parasite infections in organically raised sheep in Sweden. *Acta Vet Scand.* 42, 377-389.
8. Love, S., 2007, Drench resistance and sheep worm control. *Primefact* 478, 1-5.
9. Martin, P.J., Anderson N., Jarret R.G., 1989. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction test and *in vitro* assays. *Aust Vet J.* 66, 236-240.
10. Nilsson, O., Rudby-Martin, L., Schwan O. 1993. Benzimidazol-resistenta *Haemonchus contortus* påvisade hos får i Sverige. *Sv Vet Tidn.* 45, 303-307.
11. Samson-Himmelstjerna, G.v., Walsh, T.K., Donnan, A.A., Carrière, S., Jackson, F., Skuce, P.J., Rohn K., Wolstenholme, A.J. 2009. Molecular detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* as a tool for routine field diagnosis. *Parasitol.* (in press)
12. Troell, K. & Höglund, J. (2004), Aktuell *Haemonchus* forskning. *SUF-bladet*, 1, 6-9.
13. Van Wyk, J.A., Stenson, M.O., Van der Merwe, J.S., Vorster, R.J., Viljoen, P.G., 1999, Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Ond J Vet Res.* 66, 273-284.
14. Waghorn, T.S., Leathwick, D.M., Rhodes, A.P., Lawrence, K.E., Jackson, R., Pomroy, W.E., West, D.M., Moffat, J.R., 2006, Prevalence of anthelmintic resistance of new Zealand sheep farms. *N Z Vet J.* 54, 271-277.
15. Waller, P.J. 1999. International approaches to the concept of integrated control of nematode parasites of livestock. *Int J Parasitol.* 29: 155-164.

16. Waller, P.J., Echevarria, F., Eddi, C., Maciel, S., Nari, A., Hansen, J.W., 1996, The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in southern Latin America: general overview. *Vet Parasitol.* 62, 181-187.
17. Wimmer, B., Craig, B.H., Pilkington, J.G., Pemberton, J.M., 2004, Non-invasive assessment of parasitic nematode species diversity in wild Soay sheep using molecular markers. *Int J Parasitol.* 34, 625-631.

Erkännaden

Ett varmt tack riktas till fårhälsoveterinärerna L, Rudby-Martin, U. König, O. Swan och E. Lööf som hjälp till med fältprovtagningen, och personal vid Vidilab, Enköping som utförde merparaten av laboratorieanalyserna.

Publikationer och övrig resultatförmedling till näringen

- Gustafsson, K. & Höglund, J. & Waller, P (2006). Fungerar våra avmaskningsmedel? *Fårhälsonytt*, 1, 14-15.
- Gustafsson, K. & Höglund, J. (2006). Fungerar våra avmaskningsmedel? Undersökning pågår. *Fårhälsonytt*, 2, 20-21.
- Gustafsson, K. & Höglund, J. (2008). Fungerar våra avmaskningsmedel? Tretusen prover senare vet vi mycket mer. *Fårhälsonytt*, 1, 13.
- Gustafsson, K. & Höglund, J. (2008). Resultat från resistensprojektet - mycket goda nyheter men med en brasklapp. *Djurhälsonytt* (under tryckning)
- Höglund, J., Gustafsson, K., Donnan, A., Skuce, P. The prevalence of anthelmintic resistance in Swedish sheep flocks, *Proceedings from the XV Brazilian Congress of Veterinary Parasitology*, 14-18 September, 2008.
- 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 results from the faecal egg count reduction test and resistant allele frequencies of the beta-tubulin gene. *Veterinary Parasitology* (in press).

Resultaten från projektet har dessutom kommunicerats vid SvDHSV:s Vårkonferens 2009, samt till landets fårägare vid muntliga kontakter i det dagliga rådgivningsarbetet och vid föreläsningar för veterinärer, rådgivare, veterinär- och agronomstudenter.