

Lampaiden *Haemonchus contortus* Suomessa

Eläinlääketieteen lisensiaatin tutkielma

Raisa Kiimamaa

Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto

Tuotantoeläinten terveyden- ja sairaanhoito

Eläinlääketieteellinen tiedekunta

Helsingin yliopisto

2013

Tiedekunta - Fakultet – Faculty Eläinlääketieteellinen tiedekunta		Osasto - Avdelning – Department Kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto	
Tekijä - Författare – Author Raisa Kiimamaa			
Työn nimi- Arbetets titel – Title Lampaiden <i>Haemonchus contortus</i> Suomessa			
Oppiaine - Läroämne – Subject Tuotantoeläinten terveyden- ja sairaanhoito			
Työn laji - Arbetets art – Level Lisensiaatin tutkielma	Aika - Datum – Month and year Marraskuu 2011 – Marraskuu 2013	Sivumäärä- Sidoantal – Number of pages 42	
Tiivistelmä - Referat – Abstract <p><i>Haemonchus contortus</i> –loinen aiheuttaa lammastalousmaissa taloudellisia tappioita hidastamalla lampaiden kasvua ja vakavissa tartunnoissa aiheuttaen lampaiden kuolemia. Loinen on ennen ollut tunnustettu ongelma vain lämpimissä maissa, missä lämmin ilmasto mahdollistaa sen elämänsyklin. Aiemmin ajateltiin, ettei <i>H. contortus</i> selviä pohjoisten maiden talvesta. Viime vuosina Ruotsissa ja Norjassa on tutkittu loisen esiintymistä ja sitä on löydetty molemmista maista. Suomesta loista on löydetty Eviran suorittamissa raadonavauksissa ja lisäksi yksittäisiä klinisiä tapauksia on havaittu. Suomessa ei ole tehty laajempaa esiintyvyystudkimusta aiheesta.</p> <p>Suomessa ei ole ollut sopivaa menetelmää <i>H. contortus</i> -tartunnan havaitsemiseen ulostenäytteestä. <i>H. contortus</i> -munat ovat vaikeasti erotettavista muista Trichostrongyloidea-tyyppisistä munista perinteisesti ulostenäytteiden tutkimiseen käytetyllä McMaster – menetelmällä. Tutkimuksessa pystyttiin laboratoriomenetelmä Jurasekin ym. 2010 artikkelin perusteella <i>H. contortus</i> –tartunnan määrittämiseksi. Menetelmä perustuu maapähkinälektiiniin sitoutumiseen <i>H. contortus</i>- munien pintarakenteisiin. Lektiniin liitetyn fluoresenssimolekyylin avulla <i>H. contortus</i> -munat fluoresoivat näytettä tutkittaessa fluoresenssimikroskoopin avulla. Muihin Trichostrongyloidea-tyyppisiin muniin maapähkinälektiini ei sitoudu.</p> <p>Lektiniin värjäysmenetelmänä toimi <i>H. contortus</i> –tartunnan määrittämiseen. Se on helppo ja nopea suorittaa, eikä vaadi perinteisesti käytettyyn toukkien tunnistamiseen tarvittavaa kokemusta. Ongelmana menetelmän suhteen on positiivisen kontrollin puuttuminen ja se, etteivät näytteet säily pitkiä aikoja määrityskelpoisina. Perinteisesti käytetyllä tunnistusmenetelmällä on tosin samat heikkoudet kuin lektiinivärjäyksellä.</p> <p>Tutkimuksessa tutkittiin ulostenäytteitä kuudelta lammastilalta Etelä-Suomesta. Näytteitä oli yhteensä 103. Näytteet tutkittiin ensiksi McMaster-menetelmällä ja siinä Trichostrongyloidea-tyyppisten munien suhteen positiivisille näytteille suoritettiin lektiinivärjäys. Lektiniinivärjäyksessä yhteensä 9 näytettä kahdelta eri lammastilalta osoittautui positiiviseksi <i>H. contortuksen</i> suhteen. Tämä oli 8,7 % tutkituista näytteistä. Tulos osoittaa, että Suomessakin esiintyy <i>H. contortusta</i>, joten olisi hyvä suorittaa tulevaisuudessa laajempi esiintyvyystudkimus. <i>H. contortuksen</i> taloudellinen merkitys Suomen lammastalouteen ja loislääkeresistenssin esiintyminen Suomessa <i>H. contortuksella</i> olisi myös hyvä tulevaisuudessa tutkia.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords Lammastalous, <i>Haemonchus contortus</i> , juoksuusmahaloinen, lektiinivärjäys			
Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited Viikin kampuskirjasto			
Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) – Instruktor och ledare – Director and Supervisor(s) Timo Soveri, Eeva Mustonen			

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO	5
2 KIRJALLISUUSKATSAUS.....	7
2.1 <i>Haemonchus contortus</i>	7
2.1.1 Elinkierto	7
2.1.2 Patogeneesi	9
2.1.3 Kliiniset oireet, diagnoosi ja patologia	11
2.2 <i>Haemonchus contortus</i> Suomessa ja Pohjoismaissa	12
2.3 <i>Haemonchus contortus</i> -tartunnan hallinta- ja hoito	12
2.3.1 Lääkitseminen.....	13
2.3.1.1 Lääkitseminen Suomessa	15
2.3.2 Lääkeaineresistenssi ja sen vaikutusmekanismit	15
2.3.2.1. Suositeltavat lääkitsemistavat resistenssin ehkäisemiseksi.....	17
2.3.3 Tartunnan hallintakeinot ja ehkäiseminen	20
2.3.4. Rokotus.....	22
2.4 <i>Haemonchus contortus</i> -loisen määrittäminen.....	24
2.4.1 Ulosteen erottelulaskenta ja toukkamuotojen määrittäminen	24
2.4.2 Maapähkinälektiinivärijäys.....	25
2.4.3 Polymeraasiketjumenetelmä.....	26
2.4.4 FAMACHA	27
2.4.5 Ulosteen veritesti.....	28
3 AINEISTO JA MENETELMÄ.....	30
3.1 Näytteiden kerääminen	30
3.2 <i>Haemonchus contortus</i> -loisen määrittäminen ulostenäytteistä	31

3.2.1 McMaster	31
3.2.2 Lektinivärjäys	32
4 TULOKSET	33
5 POHDINTA	37
6. VIITTEET.....	40

1 JOHDANTO

Haemonchus contortus on juoksutusmahaan kiinnittyvä sukkulamatonoinen, joka käyttää ravinnokseen verta ja aiheuttaa siten lampailla anemiaa ja vakavissa tapauksissa kuoleman (Taylor ym. 2007). *H. contortus* on ollut perinteisesti trooppisten ja subtrooppisten maiden ongelma, missä se aiheuttaa taloudellisia kustannuksia lammastaloudelle, mutta on levinnyt myös pohjoisiin maihin (Taylor ym. 2007). Ruotsissa ja Norjassa tehdyissä tutkimuksissa on löydetty *H. contortus* -tartuntoja (Lindqvist ym. 2001, Domke ym. 2012). Suomessa ei ole tehty esiintyvyydestä *H. contortus* -loisen suhteen, mutta Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran patologisissa tutkimuksissa on löytynyt tartunnan saaneita eläimiä ja lisäksi *H. contortus* -tartunnasta on kirjoitettu pari tapausraporttia (Manninen & Oksanen 2010, Evira 2010).

Loistartuntoja on viime vuosikymmeninä perinteisesti pyritty hallitsemaan lääkityksellä, mutta nykyään loisilla on lisääntyvä määrin vastustuskykyä eli resistenssiä loislääkkeitä vastaan (Bath ym.2001). Tämän takia loistartuntojen hallintaan on jälleen otettu muitakin keinoja, kuten laidunkierto, riskiryhmien eristäminen ja lääkitsemisen keskittäminen riskiryhmiin sekä karanteeni tilalle tuotaville uusille eläimille (Bath ym. 2001). Myös kohdennettu lääkitys on tärkeä keino loislääkeresistenssiä vastustaessa (Hoste ym. 2002). Kohdennetussa lääkityksessä loislääkitys toteutetaan vain, jos eläimen ulostenäytteessä on merkkejä eläimen hyvinvointia haittaavasta loistartunnasta (Hoste ym. 2002). *H. contortusta* vastaan on yritetty kehittää rokotetta, mutta toimivaa ja taloudellisesti järkevää rokotetta ei ole onnistuttu kehittämään (Newton & Meeusen 2003).

Haemonchus ontortus -tartunnan määrittämistä hankaloittaa määritysmenetelmän puuttuminen Suomessa. Loistartunta määritetään perinteisesti McMaster-menetelmän avulla, jossa lasketaan loisten munat grammassa ulostetta ja tunnistetaan munat

(Hansen & Perry, 1994). Ongelmana tässä menetelmässä *H. contortuksen* suhteen on, että sen muna muistuttaa huomattavasti muita *Trichostrongyloidea*-tyyppisten loisten munia, eikä sitä voi luotettavasti erottaa pelkän McMaster-menetelmän avulla muista *Trichostrongyloidea*-tyyppisistä munista (Taylor ym. 2007). Muita menetelmiä *H. contortus* -tartunnan määrittämiseen on kasvattaa ja tunnistaa ulosteesta loisten toukkamuodot, maapähkinä-lektiinivärjäys, polymeraasiketjumenetelmä eli PCR-menetelmä (polymerase chain reaction), FAMACHA (FAffa MALan CHArt) ja ulosteen veritesti. Näistä tartunnan luotettavaan määrittämiseen pystytään toukkamuotojen määrittämisellä, maapähkinälektiinivärjäyksellä ja PCR-menetelmällä. FAMACHA mittaa anemian astetta lampaassa ja ulosteen veritesti ruuansulatuskanavaan menetettyä verta, joten ne määrittävät loistartunnan aiheuttamia muutoksia, eivätkä itse tartuntaa. FAMACHA ja ulosteen veritesti ovat hyödyllisiä apuvälineitä määrittäessä kliinisen tartunnan vakavuutta, mutta eivät sovellu esiintyvyytutkimuksen suorittamiseen. Menetelmä, jota itse päädyimme käyttämään tutkimuksessa, oli maapähkinälektiinivärjäys. Menetelmässä maapähkinälektiini, johon on liitetty fluoresoiva molekyyli, sitoutuu *H. contortus* -loisen pintarakenteisiin (Jurasek ym. 2010). Näin *H. contortus* -munat fluoresoivat tutkittaessa fluoresenssimikroskoopilla muiden *Trichostrongyloidea*-tyyppisten loisten pysyessä fluoresoimattomina (Jurasek ym. 2010). Vaikka PCR-menetelmä on tarkempi kuin lektiinivärjäysmenetelmä, päädyimme käyttämään tutkimuksessa lektiinivärjäystä, sillä menetelmä on taloudellinen vaihtoehto ja helppo toteuttaa. Tulokset saatiin nopeasti verrattuna toukkien kasvattamiseen ja tunnistukseen perustuvaan menetelmään. Toimivan menetelmän rakentamisen lisäksi työssä tutkittiin ulostenäytteitä kuudelta lammastilalta Etelä-Suomesta *H. contortuksen* suhteen.

2 KIRJALLISUUSKATSAUS

2.1 *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus on sukkulamato ja kuuluu *Trichostrongyloidea*-yläheimoon. Loisen aikuismuodot elävät lampaan juoksutusmahassa ja ovat 2-3 cm pituudeltaan. *H. contortus* -loisen isäntälajeja ovat lammas, vuohi, nauta, hirvieläimet, kameli ja laama. (Taylor ym. 2007.) Urokset on väriltään punaisia ja naaraalla on valkoinen sukuelinosa kiertyneenä verentäyteisen suoliston ympäri muodostaen puna-valkoisen kaksoiskierteen (Radostits ym. 2007, Taylor ym. 2007). Tunnistusmerkkejä uroksella on epäsymmetrinen selänpuoleinen suuaukko ja piikit. Naaraalla on yleensä sukuaukon peittävä läppä. Kummallakin sukupuolella on nystymäiset ulokkeet etuosassa ja suuontelossa on kutikulapiikki. *H. contortuksen* munan koko on 74 x 44 µm ja muoto säännöllinen ellipsi, jossa on tynnyrin muotoiset sivuseinät ja lukuisia solurakkuloita, mitkä täyttävät melkein koko munan. (Taylor ym. 2007.)

2.1.1 Elämänkierto

Trichostrongyloideat, *H. contortus* mukaan lukien, elävät esiparasiittisen vaiheen ympäristössä. Kuoriutuminen munasta ykkösvaiheen toukaksi (L₁) ja L₁-toukan kehittyminen L₂-muodon toukaksi ja edelleen L₃-muodoksi tapahtuu maassa. L₁ ja L₂ käyttävät ravinnokseen ympäristössä olevia bakteereita. (Taylor ym. 2007.) Kehitys L₁-muodosta tartuntakykyiseen L₃-muotoon voi tapahtua hyvissä olosuhteissa muutamassa päivässä, mutta kypsyminen voi viivästyä viikoilla tai kuukausilla riippuen ilmaston olosuhteista kuten lämpötilasta ja kosteudesta (O'Connor ym. 2006, Taylor ym. 2007). *H. contortus* -loisen munat sekä L₁- ja L₂-toukkamuodot ovat hyvin herkkiä kylmyydelle sekä kuivuudella. Suotuisin lämpötila kehittymiselle L₃-muotoon on 25-37 astetta, mutta kehittyminen voi tapahtua 10 ja 41 asteen välillä. Alle 10 asteen lämpötiloissa kehittyminen munasta L₃-muotoon ei onnistu. (O'Connor ym. 2006.)

Korkeissa lämpötiloissa toukat kehittyvät liian nopeasti ja ovat yliaktiivisia, jolloin niiden ravintovarastot kuluvat nopeasti ja kuolleisuus nousee (Taylor ym. 2007). Suotuisin ilman kosteus toukkien kehittymiselle on 100 % ja kosteuden laskiessa alle 85 % L₃-muotoja ei enää kehity (O'Connor ym. 2006). Kosteuden vaihtelu pienellä aikavälillä ei vaikuta toukkien kehittymiseen, kunhan ilman kosteus on välillä yli 85 % (O'Connor ym. 2006). Maan pinnan lähistöllä kosteus on yleensä korkeampi esimerkiksi ulosteiden ja maaperän ansiosta ja tämä edistää toukkien kehittymistä (Taylor ym. 2007).

Tartuntakykyisellä L₃-toukkamuodolla on suojaava pintakerros, joka eristää toukan ympäristöstä ja samalla suojaa toukkaa ympäristön vaikutuksilta. Tämän kerroksen takia toukka ei pysty hankkimaan ympäristöstään ravintoa, vaan se selviää aikaisemmin varastoidun ravinnon avulla. Korkeissa lämpötiloissa toukka käyttää ravintovarastonsa nopeammin loppuun metabolian kiihtyessä, joten korkeat lämpötilat voivat olla haitallisia L₃-muodolle. L₃-muoto on muutoin L₁- ja L₂-muotoja kestävämpi ilmaston muutoksille ja tässä muodossa *H. contortus* voi selvitä epäsuotuisissa olosuhteissa, kuten kylmyydestä ja kuivuudesta. L₃ toukalle suotuisin ilmasto on lämmin ja kostea. Selviytyminen heikkenee lämpötilan noustessa liian korkeaksi tai matalaksi sekä ilmaston kuivuessa. (O'Connor ym. 2006, Taylor ym. 2007.)

Eläin saa tartunnan syödessään L₃-toukan. L₃-muoto kuoriutuu suojaavasta kerroksesta eläimen pötsissä. (Taylor ym. 2007.) Elimistössä L₃-muodosta kehittyy vielä L₄-muoto ennen kehittymistä aikuiseksi madoksi (Abbott ym. 2012). Kehittyminen L₃-muodosta aikuiseksi madoksi tapahtuu juoksutusmahan rauhasten lähellä. Ennen viimeistä kuoriutumista toukalle kehittyy kutikulapiikki, jonka avulla se pystyy imemään verta limakalvon verisuonista. Prepatenssi-aika eli aika, mikä kuluu tartunnasta munia tuottavien aikuisten matojen kehittymiseen, on *H. contortus* -loisella lampaassa 2-3 viikkoa. (Taylor ym. 2007.) Naaras munii 5000-15000 munaa päivässä useiden kuukausien ajan, kun muut *Trichostrongyloidea*-lajit tuottavat munia 100–200 päivässä (Hansen & Perry, 1994, Getachew ym. 2007). Lampaissa on todettu munien

tuotannossa nousua 2-4 viikkoa ennen karitsoimista (Abbott ym. 2012, Miller ym. 1998, Ng'ang'a ym. 2004).

H. contortuksen ympäristössä elävät toukkamuodot eivät kestä pohjoista ilmastoa ja ovat tämän takia olleet ongelma pääasiassa trooppisen ja subtrooppisen ilmaston maissa. Lämpimissä maissa *H. contortuksella* on jatkuva elämänkierto ja laitumet saastuvat loisella jatkuvasti. (Taylor 2007.) Loisilla on kyky kehittyä olosuhteiden mukaan selviytyäkseen ympäristössä tai isäntäeläimessä epäsuotuisista olosuhteista ja näin on tapahtunut *H. contortuksen* kohdalla. Ruotsissa tehdyn tutkimuksen mukaan *H. contortus* ei pysty säilymään ympäristössä talven yli, vaan sen selviytymismekanismi on säilyä isäntäeläimessä kylmän jakson ajan. (Waller ym. 2003.) *H. contortuksen* L₄-muoto pystyy menemään lepoaiheeseen eli hypobioosiin lampaan juoksutusmahassa (Sargison 2008, Waller ym. 2003). Karitsoivilla uuhilla lepoaiheessa oleva toukkamuoto jatkaa kehittymistä aikuismuodoksi keväällä (Taylor 2007, Sargison 2008). Tämä johtuu väliaikaisesta vastuskyvyn heikkenemisestä karitsoinnin ja maidontuotannon takia. Toukkamuotojen kehittyminen aiheuttaa uuhilla akuutin haemonchoosin, jolloin uuhet saastuttavat loisilla ympäristöään. (Sargison 2008.) Hypobioottisista toukista lähtöisin olevat loiset ovatkin merkittävä tekijä laitumien tartuntapaineen kasvussa keväällä ja alkukesästä (Abbott ym. 2012). Karitsat, jotka ovat herkkiä loistartunnalle, saavat helposti tartunnan laitumelta (Sargison 2008). Muilla kuin karitsoivilla uuhilla suurin osa L₄-muodoista poistuu elimistöstä kehittymättä munia tuottaviksi aikuismuodoiksi (Sargison 2008). *H. contortusta* kehittyi pohjoisissa oloissa vain yksi sukupolvi vuodessa (Waller ym. 2003).

2.1.2 Patogeneesi

H. contortus aiheuttaa eläimen sairastumisen kahdella eri tavalla. Ruuansulatuskanavaa infektoivat sukkulamadot aiheuttavat ruuansulatuskanavan oireita eli ruokahalun vähentymistä, suolen liikkeen muutoksia, mahan pH:n nousua ja

proteiinien metabolian häiriintymistä (Hoste 2001, Angulo-Cubillán ym. 2010). Tärkeämpi sairastumista aiheuttava tekijä *H. contortus* -loisella on se, että aikuismuodot sekä L₄-vaiheen toukat käyttävät verta ravinnokseen. Yksi mato käyttää noin 0,05 ml verta vuorokaudessa. Akuutti *H. contortus* -tartunta eli akuutti haemonchoosi aiheuttaa anemian ja kliiniset oireet tulevat näkyviin parin viikon kuluessa tartunnasta. Tärkein oire tartunnasta on punasolumäärän voimakas ja jatkuva lasku. Hematokriitti yleensä vakiintuu matalalle tasolle, mutta punasolujen tuotanto lisääntyy kaksin- tai kolminkertaiseksi. Lopulta punasolujen, raudan sekä proteiinien jatkuvasta menetyksestä sekä ruokahalun laskemisesta johtuen eläin ei pysty enää korvaamaan veren puutosta. Tällöin hematokriitti laskee liian matalalle aiheuttaen eläimelle vakavan hapen puutteen ja kuoleman. Uuhien maidontuotanto voi lakata *H. contortus* -tartunnan takia ja aiheuttaa vieroittamattomien karitsojen kuoleman. Hyvin voimakkaissa tartunnoissa, eli jos matoja on yli 30 000, voi lammas kuolla vakavaan verta vuotavaan mahatulehdukseen. Tätä kutsutaan hyperakuutiksi haemonchoosiksi. (Taylor ym. 2007.)

Trooppisilla alueilla esiintyy kroonista haemonchoosia, joka on vähemmän tunnettu. Tämä kehittyy kuivalla kaudella, kun tartunnan uudelleen saaminen on vähäistä mutta ravinnosta on puutetta. Tällöin jo parin sadan madon aiheuttama jatkuva veren menetys voi aiheuttaa lampaalle painon laskua, heikkoutta ja ruokahalun alenemista. (Taylor ym. 2007.)

Lampaat voivat kehittää vastustuskyvyn loisia vastaan. Vastustuskyky kehittyy hitaasti, noin 2-4 kuukauden jatkuvan loisaltistumisen seurauksena. Karitsoille vastustuskyky kehittyy 4-5 kuukauden iässä. Vastustuskyky ei ole kuitenkaan 100 % vaan lampaaseen jää pieni määrä loisia. Alhaisen loismäärän lisäksi loiset eivät lisäänty tehokkaasti vastustuskykyisessä lampaassa, jolloin lammas ei myöskään levitä loista suuria määriä ympäristöönsä. Jos lammas ei jatkuvasti altistu loisille tartuntapaineen vähentymisen takia, vastustuskyky katoaa. Tartuntapaine voi vähentyä esimerkiksi tehokkaan

loislääkityksen tai puhtaiden laidunten seurauksena. Tästä johtuen pieni tartuntapaine olisi haluttavaa vastustuskyvyn säilyttämisen takia. (Abbott ym. 2012.)

2.1.3 Kliiniset oireet, diagnoosi ja patologia

Hyperakuutissa haemonchoosissa eläin kuolee yllättäen verta vuotavaan mahatulehdukseen (Taylor ym. 2007). Akuutissa haemonchoosissa kliinisinä oireina ovat vaaleat limakalvot, anemia, sydämen lyöntitiheyden kasvaminen, hengitystiheyden kohoaminen, pöhöttyminen, uneliaisuus, tummat ulosteet ja villan irtoaminen (Taylor ym. 2007, Aitken 2007, Abbott ym. 2012). Pöhöttymää muodostuu yleensä leuan alle sekä vastaonteloon kertyy nestettä (Aitken 2007). Kroonisessa muodossa kliiniset oireet ovat heikkous, painon aleneminen, kasvun hidastuminen ja villan laadun huononeminen (Taylor ym. 2007). Kroonisessa muodossa leuan alla voi olla pöhöttymää johtuen hypoproteiniemiasta. Pitkäaikainen veren menettäminen aiheuttaa mikrosyyttistä anemiaa. (Abbott ym. 2012.) Ripulia ei yleensä esiinny haemonchoosin yhteydessä vaan lampaalla voi olla lievää ummetusta (Abbott ym. 2012, Taylor ym. 2007). Uuhilla voi olla alentumaa maidontuotannossa, mikä voi johtaa uuhien karitsoiden huonoon kasvuun tai kuolemaan (Abbott ym. 2012).

Diagnoosi tehdään yleensä kliinisten oireiden ja esitietojen perusteella, mutta ulostetutkimuksesta suoritettava madon munien määrittäminen on hyvä varmistus diagnoosille (Taylor ym. 2007). Ruumiinavauksessa normaalilöydöksiä ovat nesteen kertyminen vatsaonteloon ja sydänpussiin. Juoksutusmahan sisältö on usein tumman ruskea ja limakalvo on vaalea, pöhöttynyt ja limainen. Limakalvon pinnalla on yleensä tummanpunaisia petekkioita. Veri on laimeaa ja maksa vaalea ja hauras. (Aitken 2007.) Lisäksi punainen luuydin on laajentunut luuytimen keskiosaan. Joskus terminaalivaiheessa olevassa lampaassa madot voivat kadota juoksutusmahasta. Hyperakuutissa haemonchoosissa muutoksia nähdään vain juoksutusmahassa, koska luuydin ei ole ehtinyt reagoida. (Taylor ym. 2007.)

2.2 *Haemonchus contortus* Suomessa ja Pohjoismaissa

Vaikka *H. contortus* on ennen ollut trooppisten ja subtrooppisten maiden ongelma, näyttää laji levinneen pohjoiseen Eurooppaan. Ruotsissa tehdyn esiintyvyytutkimuksen mukaan 37 % katraista löydettiin *H. contortus* -tartunta (Lindqvist ym. 2001). Esiintyvyytutkimus suoritettiin 152 luomutilalla. Tartuntaa löytyi ympäri Ruotsia ja infektoituneita katraita oli pohjoisemmassa kuin 65^oN (Lindqvist ym. 2001). Suomesta *H. contortuksen* tartuntatilanteesta ei ole paljon tietoa. Vuonna 2008 kaksi lammasta ylikiiminkiläiseltä tilalta tutkittiin Evirassa patologistesti ja niillä diagnosoitiin *H. contortus* -tartunta (Manninen & Oksanen 2010). Pari vuotta aiemmin ennen tätä oli raportoitu *H. contortus* -tartunnasta Hailuodosta (Manninen & Oksanen 2010). Vuonna 2009 Eviran patologisanatomisesti tutkituista 78 lampaasta yhdessä todettiin *H. contortus*-tartunta (Evara 2010). Viime vuosina Eviran patologisanatomisissa tutkimuksissa on löytynyt *H. contortusta* vuosittain 2-4 tilalla (Syrjälä Paula, suullinen tiedonanto). Myös Norjasta *H. contortus* -tartuntoja on todettu (Domke ym. 2012). Vuonna 2013 Etelä-Suomessa sijaitsevan lammastilan karitsalle tehdystä patologisesta tutkimuksesta löytynyt *H. contortus* (suullinen tiedonanto E. Mustonen)

2.3 *Haemonchus contortus* -tartunnan hallinta ja hoito

Trichostrongyloidea-perheeseen kuuluvia loisia on perinteisesti hoidettu pienillä märehitijöillä loislääkityksen avulla. Lääkityksen ongelmana on nykyään loisten lisääntyvä vastustuskyky eli resistenssi lääkille. Resistenssiä on todettu monissa maissa ja eri lääkeaineryhmiä kohtaan. Jotkin kannat voivat olla resistenttejä useammallekin eri lääkeaineryhmälle. Loislääkeresistenssi on kasvanut ympäri maailmaa johtuen lääkkeiden liiallisesta käytöstä. (Bath ym.2001.)

2.3.1 Lääkitseminen

Loislääkkeet ovat olleet perinteinen *H. contortus* -tartunnan hoitokeino. *H. contortukseen* tehoa kaikki märehtijöiden laajakirjoiset loislääkkeet ja osa kapeakirjoisista, jos kanta ei ole kehittänyt resistenssiä kyseistä lääkeainetta kohtaan (Sargison 2008, Taylor ym. 2007). Lampaan loistartunnan hoitoon soveltuvat laajakirjoiset loislääkkeet voidaan jakaa viiteen ryhmään: bentsimidatsolit, makrosykliset laktonit, kolinergiset agonistit, amino-asetonitrili-johdannaiset ja spiroindolit (Zajac 2006, Abbott ym. 2012). Bentsimidatsoleista *H. contortus* -loistartunnan hoitoon sopivat albendatsoli ja fenbendatsoli. Niiden vaikutus perustuu mikrotubulusten muodostumisen estämiseen. Makrosyklisistä laktoneista käytetään yleisimmin moksidektiinia ja avermektiineihin kuuluvaa ivermektiiniä (Zajac 2006.) Ne vaikuttavat estämällä hermoimpulssin kulkeutumista lisäämällä glutamaatin säätelemien kloridi-ionikanavien läpäisevyyttä. Kloridi-ionien virratessa soluun solukalvon jännite pienentyy estäen hermoimpulssin kulkeutumisen. Lihasten lamaaminen johtaa loisen poistumiseen ruansulatuskanavasta. Ne estävät myös loisella nielun toimintaa, jolloin loinen ei pysty saamaan ravintoa ja näännyy. Lääkeaine vaikuttaa kuitenkin nopeasti, joten tärkeämpi vaikutusmekanismi on lihasten lamaaminen, sillä loisen kuoleminen ravinnon puutteeseen vie enemmän aikaa. (Sangster & Gill 1999.) Kolinergisia agonisteja ovat pyranteeeli, levamisoli ja moranteeli ja ne toimivat loisen hermoston asetyylikoliinireseptorien agonisteina aiheuttaen loisen halvaantumisen (Zajac 2006). Viime vuosina on tullut kaksi uutta laajakirjoista loislääkeryhmää markkinoille; amino-asetonitrili-johdannaiset ja spiroindolit. Amino-asetonitrili-johdannaiset tehoavat kaikkiin sukkulamatoihin, vaikka ne olisivat resistenttejä muille laajakirjoisille loislääkkeille. Ensimmäinen tähän ryhmään kuuluva markkinoille tullut yhdiste on monepanteeli. Monepanteeli vaikuttaa kolinergisten agonistien kanssa samalla tavalla aiheuttaen lihasten lamaantumisen, mutta sen vaikutuskohde on nikotiiniasetyylikoliinireseptori, joka on ominainen sukkalamatoille. Tästä johtuen se on hyvin turvallinen käyttää. Spiroindoleista derkvanteeli on markkinoilla yhdistelmävalmisteena avermektiineihin kuuluvan abamektiinin kanssa. Derkvanteeli on nikotiini-kolinerginen antagonistti estämällä viestin välitykseen hermo-

lihasliitoksessa ja aiheuttaen sukkulamadon halvaantumisen. Kapeakirjoisista loislääkkeistä *H. contortukseen* tehoavat klosanteeli ja nitroksyniili. Lääkeainesuosituksena *H. contortukselle* ovat pitkävaikutteiset lääkkeet eli moksidektiini ja klosanteeli, joista moksidektiini tehoaa myös L₃-vaiheen toukkiin. (Abbott ym. 2012.)

Uuhilla loisten munien tuotanto kohoaa yleensä lähellä karitsoimisaikaa ja kohonnut tuotanto kestää noin kuuden viikon ajan. Tänä aikana uuhet voivat saastuttaa laitumet suurella määrällä madon munia. Uuhien lääkitsemistä loislääkkeellä suositellaankin karitsoimisaikaan, jos tilalla tiedetään olevan loistartunta. Jos tilalla on vakava loisongelma, voi lääkityksen uusia kolmen tai neljän viikon välein. Toistettava lääkitys lisää työmäärää huomattavasti ja tällöin toisena vaihtoehtona olisi käyttää pitempi-vaikutteista lääkevalmistetta kuten moksidektiinia. Suun kautta annettuna moksidektiinin vaikutus kestää 21 päivää ja pistoksena annettuna 35 päivää. (Sargison 2008.) Myös ivermektiinistä, bentsimidatsoleihin kuuluvasta albandatsolista ja klosanteelista on olemassa valmisteita, joiden vaikutus on pitempiaikaisempi (Abbott ym. 2012, Sargison 2008). Lääkitsemistiheys riippuu paljolti kuinka suuri tartuntapaine tilan laitumilla on. Jos tartuntapaine on suuri, joudutaan lampaita lääkitsemään neljän viikoin välein. Lääkityksen tarkoitus tällöin ei ole saada laitumia loisista puhtaiksi vaan vähentää tartuntapainetta. Jos uuhien lääkitys onnistuu, karitsoita ei ole tarpeen lääkittää ennen vieroitusta. (Sargison 2008.)

Lampailla suositaan suun kautta annettavia loislääkkeitä, koska teurastusvarojat ovat lyhyemmät suun kautta annettavilla valmisteilla ja pistettävät loislääkkeet voivat aiheuttaa reaktion pistokohtaan (Sargison 2008). Suun kautta annettaessa lääke kannattaa antaa lääkitsemiseen tarkoitetulla pistoolilla kielen vallin taakse suun takaosaan, jolloin estetään märekourun muodostuminen ja lääke päätyy pötsiin. Pötsissä lääke imeytyy hitaammin, jolloin saavutetaan pidempi vaikutusaika lääkeaineelle. Aika, jonka lääkeaine on elimistössä, on tärkeä erityisesti

bentsimidatsoleille ja makrosyklisille laktoneille, sillä niiden teho perustuu lääkkeen vaikutusaikaan. (Bath ym. 2001.)

2.3.1.1 Lääkitseminen Suomessa

Suomessa ei ole lampaalle myyntiluvallista loislääkettä, mutta erityislupavalmisteissa on suun kautta annettavana valmisteita, joiden vaikuttava aine on joko moksidektiini tai albendatsoli (Fimea 2013). Kaskadisäädöksen perusteella voidaan käyttää myös ivermektiini-injektiovalmisteita tai hevoselle rekisteröityjä suun kautta annettavia ivermektiini- tai fenbendatsolivalmisteita (Lääketietokeskus 2013, Evira 2013). Suomessa loislääkitys suositellaan tehtäväksi vähintään kolme vuorokautta ennen laitumille laskemista. Imeville karitsoille ei suoriteta loishäätöä, vaan karitsat lääkitään 3-4 viikkoa laitumelle laskemisen jälkeen (Evira, Lampaiden terveydenhuolto). Siitoseläimet voidaan lääkittää syksyllä sellaisella valmisteella, mikä tehoaa myös lepovaiheessa oleviin loisen toukkamuotoihin. Tällaisia aineita ovat albendatsoli, fenbendatsoli, ivermektiini, doramektiini, eprinomektiini ja moksidektiini. Lääkekierto tulisi toteuttaa kolmella eri lääkkeellä, vaihto kerran vuodessa. (Evira, Lampaiden terveydenhuolto.)

2.3.2 Lääkeaineresistenssi ja sen vaikutusmekanismit

Lääkeaineresistenssia esiintyy makrosyklisiä laktoneita, kolinergisia agonisteja ja bentsimidatsoleita vastaan ja sitä on tavattu kaikkialla maailmalla (Waller 1997, Bath ym. 2001). Myös useammalle eri lääkeaineelle resistenteistä kannoista on raportoitu (Almeida ym. 2010, Bath ym. 2001). Resistenssiongelmaa pyritään ratkaisemaan tartuntojen hallintaan liittyvillä keinoilla sekä hoitamalla loislääkitys suositusten mukaisesti.

Bentsimidatsolin vaikutus perustuu mikrotubulusten muodostumisen estämiseen (Zajac 2006). Tubuliinista eli mikrotubulusten rakennusosasta on olemassa eri muotoja ja bentsimidatsolille resistenteissä sukkulamadoissa yleisin on muoto, johon bentsimidatsolit liittyvät vain heikosti. Lääkkeen pitoisuuden laskiessa bentsimidatsoli irtoaa tubuliinista ja sen vaikutus menetetään. Lääkkeen vaikutusta pystyisi lisäämään, jos sukkulamato altistuu lääkkeen vaikutukselle pidemmän ajan. Lääkeannoksen voi toistaa kaksi tai kolme kertaa 12 tunnin välein vaikutuksen lisäämiseksi. (Sargison 2008.) Bentsimidatsoliresistenssi on yleensä koko lääkeaineryhmän resistenssi eli yhdelle bentsimidatsolille resistentti loinen on resistentti saman ryhmän lääkkeille (Zajac 2006).

Makrosyklisen laktonien lääkeresistenssin mekanismeja ei kunnolla tiedetä, mutta lääkkeen vaikutus riippuu pitoisuudesta ja altistusajasta, joten bentsimidatsolilla käytetty lääkeannoksen uusiminen parantaa myös makrosyklisen laktonien tehoa resistentteihin kantoihin (Sargison 2008, Zajac 2006). Makrosyklisen laktonien annos voidaan toistaa 36-48 tunnin välein (Sargison 2008). Makrosyklisen laktonien eli mm. ivermektiinin ja moksidektiinin kemialliset rakenteet muistuttavat toisiaan, joten niidenkin kohdalla resistenssi on lääkeryhmäkohtaista (Zajac 2006).

Kolinergiset agonistit vaikuttavat asetyylikoliinin tavoin parasympaattista hermostoa stimuloiden aiheuttaen halvaantumisen ja vaikuttavat erityisesti lihaskalvoilla oleviin reseptoreihin. Resistenteillä loisilla lääkkeen sitoutumiskyky reseptoriin laskee reseptorien muuttuneen rakenteen takia ja lääkkeen teho loiseen vähenee. (Sangster & Gill 1999.) Kolinergisista agonisteista levamisoli eroaa kemialliselta rakenteeltaan pyrantelista ja moranteelista, mutta niiden vaikutusmekanismi on sama. Tästä johtuen yhdelle aineelle vastustuskykyisen loiskannan oletetaan olevan resistentti myös muille. (Zajac 2006.) Kolinergisillä agonisteilla lääkeannoksen uusiminen ei paranna tehoa resistenttejä kantoja vastaan (Sargison 2008).

2.3.2.1. Suositeltavat lääkitsemistavat resistenssin ehkäisemiseksi

Loistartunnan hoitamiseksi ja resistenssin kehittymisen ehkäisemiseksi oikeanlainen lääkitseminen on tärkeää. Lääkitsemisen onnistumiseen vaikuttavat lääkeannos, käytettävä lääkevalmiste, lääkitsemisajankohta ja -tiheys. (Sargison 2008, Abbott ym. 2012.)

On todettu, että lääkekonsentraation laskiessa resistenttien kantojen määrä nousee (Waller 1997). Tästä johtuen oikea lääkeannos oikein annettuna on yksi hyvän loislääkityksen perusta. Lääkeannoksen määrä pitää olla oikea elopainoon verrattuna, että saadaan tarpeeksi hyvä teho loisten hävittämiseen. Lampaiden oikeita painoja ei aina tiedetä ennen lääkitsemistä, mikä voi johtaa lampaan painon ja samalla lääkeannoksen aliarvioimiseen, eikä riittävää tehoa loisten hävittämiseen saada aikaan. Jokaisen lampaan punnitseminen ennen lääkitsemistä on hyvin työlästä, ja siksi eläinten lääkeannos määritetään painavimman lampaan mukaan. (Bath ym. 2001.) Useimmilla suun kautta annettavilla bentsimidatsoleilla ja makrosyklisillä laktoneilla on suuret turvamarginaalit, joten annoksen yliarvioinnista ei ole haittaa eläimelle ja näin varmistetaan lääkkeen riittävä teho (Sargison 2008). Ruuan vähentäminen 24 tunnin ajan ennen lääkitsemistä on todettu parantavan imeytymistä erityisesti bentsimidatsolien ja makrosyklisten laktonien kohdalla. Ruuan vähentäminen aiheuttaa ruuansulatuskanavan liikkuvuuden vähentämistä, jolloin ruuansulatuskanavan läpikulku-aika kasvaa ja loiset altistuvat tehokkaammin lääkkeelle. Lisäksi lääkkeen imeytyminen paranee. (Bath ym. 2001, Abbott ym. 2012). Ruuan vähentämistä loislääkinnän yhteydessä ei voida käyttää hyväksi tiheyden loppuvaiheessa oleville uuhille (Abbott ym. 2012).

Lääkitsemismäärällä on todettu olevan vaikutusta resistenssin kehittymiseen. Mitä tiheämmin eläimiä lääkitään, sitä enemmän resistenssiä ilmenee. (Abbott ym. 2012, Sargison 2008.) Loislääkitys antaa resistenteille loisille enemmän elintilaa ja ne lisääntyvät voimakkaammin. Loislääkkeille epäherkät loiset ehtivät lisääntyä ja resistenttien loisten osuus kasvaa ja laitumet saastuvat resistenttien loisten munilla. Tästä johtuen turhaa loislääkitys tulisi välttää. (Abbott ym. 2012.) Pidentämällä aikaa loislääkitysten välillä saadaan valintaa resistenttien loiskantoihin pieneneväksi. Katraissa, joissa tartuntapaine on suuri, lääkitsemisvälin pidentäminen aiheuttaisi taloudellisia menetyksiä kasvun hidastumisena. (Sargison 2008.) Riittävän lääkityksen määrittäminen on tilakohtaista, johon vaikuttaa erityisesti tilan laitumien loiskuormitus. (Abbott ym. 2012.)

Lääkkeen poistaminen hetkellisesti käytöstä ei auta lääkeresistenssi-ongelman poistamisessa. Resistenssi tulee kuitenkin nopeasti takaisin, kun lääkitseminen aloitetaan uudestaan. (Waller 1997.) Useamman eri lääkkeen kierrättämisellä eli lääkekierrolla on tutkimuksissa todettu olevan vaikutusta resistenttien kantojen vähenemiseen. Tämä perustuu siihen, että ensimmäisen loislääkkeen jäljiltä säilyneet resistentit kannat tuhoutuvat lääkittäessä seuraavalla kerralla toisen lääkeaineryhmän lääkkeellä. (Waller 1997.) Sopiva tasapaino lääkkeiden kierto on kuitenkin haasteellista ja vaikka lääkekierrolla on todettu olevan vaikutusta resistenssin vähenemiseen, niin se on kovin tehokas keino (Waller 1997, Abbott ym. 2012). Lääkekierto toimii luultavasti vain siinä vaiheessa, kun resistenttien loisten osuus kannasta on niin pieni, ettei tilalla ole vielä havaittu ongelmaa resistenttien loisten suhteen (Abbott ym. 2012). Lääkeaineiden yhdistäminen voi lisätä niiden kliinistä tehoa, mutta se voi edistää samalla resistenttien kantojen kehittymistä. Tästä syystä useamman lääkeaineen käyttöä ei suositella samanaikaisesti ainakaan ilman asiantuntevia ohjeita. (Bath ym. 2001.) Nykysuosituksen mukaan useampaa kuin yhtä vaikuttavaa ainetta sisältävää valmistetta tulisi käyttää vain, kun resistenttejä loisia on hyvin vähän kokonaisloiskannasta. Kahta eri lääkevalmistetta ei tulisi koskaan yhdistää ennen lääkitsemistä. (Abbott ym. 2012)

Vanhempien loislääkitysohjeiden mukaan eläimet siirrettiin lääkityksen jälkeen puhtaalle laitumelle. Tällöin lääkityksestä selvinneet lääkeaineelle resistentit loiset saastuttivat uuden laitumen ja resistenttien loisten valikoituminen tehostuu. (Sargison 2008.) Nykysuositusten mukaisesti lääkittyjen eläinten tulisi pysyä samalla laitumella, tarhassa tai karsinassa 3-4 viikkoa lääkityksen jälkeen kuin missä ne olivat ennen lääkitystä (Bath ym. 2001, Abbott ym. 2012). Lääkityt lampaat eivät pääse saastuttamaan muita laitumia tai karsinoita lääkityksestä selvinneillä resistenteillä loisilla vaan saavat elimistöön lääkkeille herkkiä loiskantoja ympäristöstä (Bath ym. 2001). Toinen vaihtoehto lääkkeille herkkien loiskantojen säilyttämiseksi on jättää 10 % katraasta lääkittämättä (Abbott ym. 2012, Sargison 2008). Keväällä uuhia lääkittäessä tulisi jättää osa uuhista lääkittämättä tai lääkittää uuhet hyvissä ajoin, että uuhet saavat uuden loistartunnan ennen niiden vastustuskyvyn palautumista normaaliksi (Abbott ym. 2012). Näillä tavoilla pystytään ehkäisemään resistenttien kantojen valikoitumista. Kuljetettaessa lampaita toiselle tilalle lampaat tulisi lääkittää ennen siirtoa sekä pitää karanteenissa tilalla. Lampaat tulisi karanteenin jälkeen siirtää laitumelle, missä on riskiryhmän eläimiä ja todennäköisesti loisia. Lääkityksestä selvinneet loiset, joilla on lääkeresistenssi, sekoittuvat ja laimentuvat laitumella olevaan loiskantaan ja lääkeresistenssin pitäisi vähentyä. (Bath ym. 2001.) Uuhia on ollut tapana lääkittää ennen astutuskautta tiinehtymisen parantamiseksi, mutta tästä käytännöstä ei ole oletettavasti hyötyä muiden kuin alhaiseen kuntoluokkaan kuuluvien uuhien kohdalla, joiden kohdalla tiinehtyminen voi parantua kuntoluokan parantuessa. (Sargison 2008.) Hyväkuntoisilla uuhilla on yleensä vähän loisia astutuskautena eikä lääkittäminen astutuskautena lisää tiinehtymistä (Abbott ym. 2012, Sargison 2008). Lisäksi astutuskautena monet loiset, kuten *H. contortus*, ovat lepovaiheessa, jolloin loislääkkeiden teho niihin on heikompaa (Abbott ym. 2012, Sargison 2008).

Paras lääkitystapa olisi kohdennettu lääkitys, jossa loislääkityksen tarve määritetään ulostenäytteestä ja vain eläimet, joille loiset ovat terveydellinen ongelma, lääkittään. Kohdennettu lääkitys vähentää loislääkkeiden käyttöä ja lääkittävien eläinten määrän

laskiessa ympäristössä säilyy enemmän loiskantoja, joilla ei ole resistenssiä lääkaineita kohtaan. Tämän tyylinen hoitomuoto soveltuu harvoin tuotantoeläimille, koska eläinten suuren lukumäärän takia ulostenäytteiden tutkituttaminen olisi työlästä ja kallista. Loislääkityksen tarve olisi hyvä määrittää diagnostisen testin avulla, mutta lampaiden kohdalla testin kustannusten pitäisi olla matalat. (Hoste ym. 2002.) Etelä-Afrikassa käytetään myöhemmin kuvattavaa FAMACHA-menetelmää, kun määritellään loislääkinnän tarvetta eläimille (Sargison 2008).

Aikaisemmin lääkityksessä on huomioitu vain eläimessä elävät loiset, eikä ympäristössä olevaan loiskuormaan ole kiinnitetty tarpeeksi huomiota lääkitystä suunniteltaessa. Tämä on vaikuttanut loisresistenssin kehittymiseen. Vaikka oikea lääkeannos ja lääkainekierto ovat tärkeitä, niin niillä ei ole niin isoa vaikutusta resistenssin kehittymiseen kuin mitä ympäristössä olevien loismuotojen huomioimisessa loistartuntaa hoidettaessa. (Bath ym. 2001)

2.3.3 Tartunnan hallintakeinot ja ehkäiseminen

H. contortus –tartuntaa pystyy hallitsemaan ja ehkäisemään lääkinnällisten keinojen lisäksi muilla tavoilla. Lääkeresistenssin yleistyessä muut hallinta- ja ehkäisykeinot tulevat tärkeämmiksi.

Loistartunnan hallitsemisessa eläimen hyvä vastuskyky on olennainen (Sargison 2008). Lampaan hyvä kuntoluokka ja valkuaispitoinen ruokinta edistää hyvää vastustuskykyä loisia vastaan ja ravinnolla onkin todettu olevan vaikutusta *H. contortus* -tartunnan vakavuuteen (Sargison 2008, Abbott ym. 2012). Ruuansulatuskanavassa elävät sukkulamadot aiheuttavat ruokahaluttomuutta ja alentavat ravinnon käytön tehokkuutta. Proteiinit eivät pääse imeytymään elimistöön yhtä tehokkaasti kuin normaalisti ja lisäksi ruuansulatuskanavan tartunnassa proteiineja kuluu ruuansulatuskanavan limakalvon korjaamiseen, plasmaproteiinien sekä limakalvon

proteiinien tuottamiseen. Tutkimuksissa on todettu, että runsaasti proteiinia sisältävä ravinto vähentää loisten määrää ruuansulatuskanavassa ja siten lievittää tartunnan vaikutuksia eläimeen. (Coop & Holmes 1996, Valderra'bano ym. 2006.)

Loistartunnalle riskissä ovatkin eläimet, joiden vastustuskyky on alentunut. Riskiryhmään kuuluvat karitsat, vieroitetut lampaat sekä imettävät uuhet. Niiden vastustuskyky on alhaisempi ja immuunivaste loisia vastaan on täten heikompi. Nämä loistartunnalle riskissä olevat ryhmät olisi hyvä eristää. Ryhmien eristämisessä pitää huomioida myös laitumien erottelu, sillä jos tartunnan saaneet eläimet ja terveet eläimet käyttävät samoja laitumia, myös terveiden eläinten tartuntapaine nousee. Lääkitsemisessä voi riittää pelkästään riskiryhmien lääkitseminen, jos ne eristetty muista lampaista. (Bath ym. 2001.)

Tärkeimpiä asioita loistartunnan hallitsemisessa on laitumien kunto loisten suhteen (Sargison 2008). Laitumilla loiskuormitusta voi vähentää laidunkierron avulla. Laidunkierron voi toteuttaa eri eläinlajien kierrolla, esimerkiksi hevosien tai nautojen avulla. Naudoilla ja hevosilla on eri loiset kuin lampaalla, joten ne eivät saa tartuntaa lampaan loisista. Hevoset tai naudat puhdistavat laidunta syömällä ravinnon mukana tulevat toukat ja loisten määrä laitumella vähenee, koska hevoset ja naudat eivät infektoidu lampaiden loisista. (Bath ym. 2001, Sargison 2008.) Myös viljan viljelyä voi käyttää laidunkierrossa hyväksi (Sargison 2008). Laitumen odotetaan puhdistuvan loisista, jos se on käyttämättä kaksi kesää ja yhden talven (Evira, Lampaiden loistorjunta). Laidunkierto ei kuitenkaan luo täysin turvallista laidunta loisten suhteen, se vain vähentää tartuntapainetta (Bath ym. 2001, Sargison 2008). Laiduntamisessa tulee myös muistaa, että suuri lammastiheys nostaa myös toukkien määrää laitumella (Bath ym. 2001). Tästä syystä lampailla pitäisi olla tarpeeksi tilaa laiduntaa (Bath ym. 2001).

Lääkeresistenssejä kantoja loisista voidaan vähentää lisäämällä ei-resistenttejä kantoja tilalle, jossa on ollut ongelmia resistenttien kantojen kanssa. Resistenttien loisten määrä vähenee tällöin suhteessa kokonaisloismäärään. Ongelmatiloilla eläinten oikeanlainen ruokinta on tärkeää. Vaikka tällä ei voida vaikuttaa suoraan loistartuntaan, ehkäisee varsinkin proteiinipitoinen ruoka loisten haitallisia vaikutuksia. (Bath ym. 2001.) Lammassrotujen välillä on myös eroja niiden vastustuskyvyssä *H. contortusta* vastaan (Thamsborg ym. 1999, Miller ym. 1998). Vastustuskykyisempien kantojen käyttö jalostuksessa voisi ehkäistä loistartuntoja ja vähentää ympäristön loiskuormaa. (Bath ym. 2001.)

2.3.4. Rokotus

Lääkeresistenssin kehittyminen ja se, että uusia loislääkkeitä ei tule markkinoille usein, on ajanut rokotuksen kehittämistä. Lampailla syntyy luonnostaan vähitellen vastustuskyky loisen L₃-toukka- tai aikuisimuotoja vastaan (Balic ym. 2002). Nuorilla karitsoilla vastustuskykyä ei ole ja karitsojen vieroittaminen ja laiduntamisen aloittaminen ajoittuu aikaan, jolloin loisen toukkien määrä laitumella on suurimmillaan. Loistartunnan takia aika teuraspainon saavuttamiseen kasvaa, jolloin tuotantokulut kasvavat. Rokotuksella olisikin tärkeintä suojata nuoret karitsat tartuntaa vastaan laiduntamisen alkamisesta siihen asti kunnes vastustuskyky kehittyy. Toimiva rokote vähentäisi myös laitumen saastumista. (Bethony ym. 2006.)

Mekanismeja lampaiden vastustuskykyyn parasiittejä vastaan ei vielä täysin ymmärretä, joten rokotteen kehittäminen on hankalaa. Ruuansulatuskanavan loisia kohtaan vastustuskyky kehittyy hitaasti ja eri mekanismit kohdistuvat eri loisiin. Loisrokotteissa käytetyt antigeenit voivat olla peräisin joko loisen isäntäeläimessä tavattavissa toukka-asteista tai aikuisesta loisesta. Antigeenit voivat olla ns. piileviä antigeenejä tai perinteisesti rokotteenä käytettyjä eritettäviä tai pinta-antigeenejä. (Newton & Meeusen 2003.)

Piilevät antigeenit ovat yleensä peräisin loisen suolistosta. Niihin kohdistuvat vasta-aineet ovat hyvin tehokkaita verta ravinnokseen käyttäviä sukkulamatoja, kuten *H. contortusta*, vastaan. Teho perustuu siihen, että vasta-ainetta päätyy suuria määriä loiseen isännästä imetyn veren mukana. Samasta syystä vasta-aineet piileviä antigeenejä vastaan eivät tehoa loisilla, jotka eivät käytä verta ravinnoksi. *H. contortuksen* piilevistä antigeeneista on kehitetty useita rokotteita, joilla on saavutettu hyvä teho. (Newton & Meeusen 2003.) Tähän mennessä tehokkaimmaksi on kuvailtu aminopeptidaasi H11, joka on löydetty mikrovillusten pinnalta suoletta L₄-toukkamuodolla ja aikuisilla madoilla. Se vähentää loiskuormitusta yli 90 % useilla lammaskuuduilla ja toimii myös nuorilla ja tiineillä eläimillä. (Newton & Munn 1999.) Nuorilla eläimillä piilotetuista antigeeneista kehitetyt rokotteet ovat toimineet muita rokotteita tehokkaammin (Bethony ym. 2006). Rokotteista ei ole kuitenkaan tullut kaupallista tuotetta, sillä rekombinanttimenetelmällä tuotetut rokotteet ovat osoittautuneet tehottomaksi ja siten rokotteiden teollinen valmistaminen ei ole ollut mahdollista (Newton & Meeusen 2003).

Rokotteissa, joiden teho perustuu loisen erittämiin antigeeneihin tai sen pintarakenteisiin eli luonnollisiin antigeeneihin on saatu hyviä tuloksia rokotteiden tehosta. Luonnollisista antigeeneista tehtyjen rokotteiden etu on, että ne voivat tehotta samanaikaisesti eri ruuansulatuskanavan sukkulamatoja vastaan ja immuunivaste pysyy tehokkaana laiumella saatujen luonnollisten loistartuntojen myötä. Osa lampaista, erityisesti nuoret karitsat, vastaa heikosti luonnollisista antigeeneistä kehitettyihin rokotteisiin. (Newton & Meeusen 2003.) Eritettävien antigeenien avulla kehitetyistä rokotteista on kuitenkin saatu vaste 9 kuukauden ikäisillä lampaila *H. contortusta* vastaan myös rekombinanttimenetelmällä tuotetun rokotteen avulla (Vervelde ym. 2002).

Suurin ongelma toimivan rokotteen tuottamisessa on se, että antigeenin tuottaminen rekombinanttimenetelmällä on vaikeaa (Newton & Meeusen 2003). Tähän ongelmaan voisi olla ratkaisuna tuottaa rokotteen antigeenit sukkulamatoihin kuuluvan *Caenorhabditis elegansin* avulla. Rokotteen tuotantokulut eivät saisi olla liian korkeat, jotta eläinten rokottaminen oli vielä taloudellista. Olisi myös hyvä, jos rokote olisi tehokas useampaa ruuansulatuskanavan sukkulamatoa vastaan samanaikaisesti. Tämä voidaan saavuttaa käyttämällä rokotteissa antigeenejä, jotka ovat yhteisiä eri sukkulamatoille tai kehittämällä rokotteita, joissa on useita eri antigeenejä. (Bethony ym. 2006.)

2.4 *Haemonchus contortus* -loisen määrittäminen

2.4.1 Ulosteen erottelulaskenta ja toukkamuotojen määrittäminen

Ulostenäytteet loistartunnan määrittämiseen tulisi kerätä peräsuolesta ja tutkia tuoreena. Jos näytteiden kerääminen peräsuolesta on mahdotonta, voidaan tuoretta ulostetta ottaa näytteeksi pellolta tai lattialta. Nopea ja helppo menetelmä loisten määrittämiseen on ulosteesta tehtävä loisen munien laskenta (fecal egg count, FEC). (Taylor ym 2007.) Modifioitu McMaster-menetelmä on FEC-menetelmä, jolla saadaan helposti ja nopeasti määritettyä loisten munien määrä ulosteessa. Siinä tietty määrä ulostetta sekoitetaan kylläiseen liuokseen. Näyte suodatetaan, sekoitetaan tasaiseksi, liuosta laitetaan McMaster-laskukammioon ja loisten munat lasketaan mikroskoopin avulla. Tällä menetelmällä saadaan laskettua madonmunien määrä grammassa ulostetta (eggs per gram, epg). (Hansen & Perry, 1994.) *H. contortuksen* määrittämiseen tämä menetelmä ei kuitenkaan sovellu, sillä *Trichostrongyloidea*-munien morfologiassa on vain pieniä eroja, joten loisten määrittäminen munien morfologiaan perustuen on erittäin hankalaa. FEC:stä voidaan kuitenkin määrittää strongyloidityyppiset munat, mikä yhdessä kliinisten oireiden kanssa auttaa *H. contortus*-tartunnan diagnosoimisessa. (Taylor ym 2007.)

H. contortus on perinteisesti määritetty viljelemällä ulostenäytettä toukkamuotojen kasvattamiseksi. *H. contortuksen* toukat pystyy L₃-vaiheessa erottamaan muista *Trichostrongyloidea*-lajeista. Toukkia saadaan viljeltyä laittamalla uloste kannelliseen astiaan pimeään ja huoneenlämpöön 14-21 vuorokaudeksi tai 27 °C 7-10 vuorokaudeksi (Hansen & Perry, 1994). Hautomisen jälkeen näytteestä eristetään toukat käyttämällä Baermannin tekniikkaa, jossa toukat saadaan erotettua laittamalla uloste kellumaan veteen esimerkiksi sideharsopussin, jolloin uimaan lähtevät toukat painuvat astian pohjalle vettä painavimpina (Hansen & Perry, 1994). Tämän jälkeen toukat voidaan tappaa ja värjätä Lugolin liuoksella ja tutkia mikroskoopin avulla (Taylor ym. 2007). Toukkien viljelymenetelmä on ollut laajasti käytetty mutta on työläs, hidas ja toukkien lajien tunnistaminen voi olla hankala. Lisäksi ulkoiset tekijät voivat vaikuttaa toukkien kehittymiseen. Esimerkiksi näytteiden väärät säilöntäolosuhteet voivat vaikuttaa kielteisesti *H. contortus*-toukan kehittymiseen. (Jurasek ym. 2010)

2.4.2 Maapähkinälektiinivärjäys

Lektiiniä on käytetty ihmisen sukkulamatojen diagnostiikassa. Palmer ja McCombe (1996) tutkivat lektiinien kiinnittymistä *Trichostrongyloidea*-muniin. Tutkimuksessa maapähkinän agglutiinin todettiin kiinnittyvän spesifisesti *H. contortuksen* muniin. Lektiiniin liitetään ultraviolettivalossa fluoresoiva fluoreskeiini-isotiosyanaatti, jolloin *H. contortuksen* munat näkyvät loistavan vihreinä ultraviolettivalossa, kun muut munat ovat pääosin huomaamattomia tai voivat fluoresoida hieman (Jurasek ym. 2010). Myös *H. contortuksen* toukkamuodot sitovat maapähkinälektiinin itseensä ja fluoresoivat ultraviolettivalossa. Lektiinivärjäyksen ja perinteisen toukkien erottelulaskennan tuloksissa oli 15 % ero, mutta tämän uskotaan riittävän menetelmän tarkkuudeksi (Palmer & McCombe 1996). Palmerin ja McComben kehittämän menetelmän heikkous on työläs munien puhdistuvaihe. Menetelmästä kehitettiin toinen versio (Jurasek ym. 2010), joka on nopea ja helppo suorittaa. Jurasakin menetelmä ja toukkien erottelulaskennan tulokset korreloivat hyvin. Tällä menetelmällä ei saada laskettua munien määrää ulosteessa vaan määritellään *H. contortus* -munien osuus muista

Trichostronglyoidea-munista (Jurasak ym. 2010). Menetelmä sopii suoritettavaksi hyvin yhdessä McMaster-menetelmän kanssa.

2.4.3 Polymeraasiketjureaktiomenetelmä

McMaster-menetelmällä on hyvä määrittellä loistartunnan vakavuus, mutta sillä ei pystytä tekemään kovin tarkkaa lajimäärittystä. Tarkempaan loisten lajimäärittämiseen vaaditaan toukkien kasvattaminen, joka on hidasta, teknillisesti vaativaa sekä virhealtista, koska kasvatusolosuhteet ovat tarkat lämpötilan ja kosteuden suhteen. Jos toukkien kasvattaminen tapahtuu väärissä olosuhteissa, voi tutkimuksen tulos vääristyä. (Sweeny ym. 2011.) Viime aikoina on kehitetty polymeerasiketjumenetelmä eli PCR-menetelmä (polymerase chain reaction) lampaan loisten määrittämiseksi ulostenäytteestä. PCR-menetelmällä pystytään määrittämään jo useita loisia ja voi tulevaisuudessa olla mahdollista määrittää myös loisten resistenttejä kantoja näytteistä.

Tällä hetkellä PCR-määrittäminen on olemassa *Teladorsagia circumcincta*-, *Trichostrongylus*-, *Oesophagostomum venulosum*, *H. contortus*- ja *Chabertia ovina*-loiselle (Sweeny ym. 2011). Jokainen loinen pitää kuitenkin määrittää erikseen, mikä lisää sekä työtä että määrittämisen hintaa (Sweeny ym. 2011). PCR-menetelmässä etuja perinteiseen määrittämenetelmään on hyvä herkkyys ja tarkkuus sekä se, että testiin riittää hyvin pieni määrä ulostetta. Tarkkuus on tutkimuksien mukaan 100 % ja herkkyys 98-100 % (Sweeny ym. 2011, Roeber ym. 2011). PCR-menetelmän todellista herkkyyttä on kuitenkin vaikea määrittää, sillä McMaster-menetelmä ei ole 100 % herkkä (Learmount ym. 2009). PCR:n voidaan olettaa olevan herkempi kuin flotaatioon perustuvat menetelmät (Roeber ym. 2011). Aikaa määrittämiseen menee kaksi vuorokautta eli tulos saadaan nopeampaan kuin perinteisellä menetelmällä (Roeber ym. 2011).

Perinteisellä PCR-menetelmällä voidaan vain määrittää onko lampaassa patogeenisia loisia, mutta loisinfektion vakavuutta sillä ei pysty määrittämään. Tällöin voidaan käyttää McMasteria loiskuorman arviointiin ja PCR:ä lajien määrittämiseen. (Sweeny ym 2011.) Toinen vaihtoehto on reaaliaikainen PCR (real time PCR eli RT-PCR) eli kvantitatiivinen PCR. RT-PCR-menetelmiä on kehitettynä lampaan loismääritykseen, mutta tällä hetkellä ne toimivat kvantitatiivisesti, kun loisen munia on näytteessä 5-75. Tästä suuremmilla munien määrillä ei saada tuloksiin eroja. (Harmon ym. 2007.)

PCR-menetelmä on tulevaisuudessa tärkeä loistartunnan diagnosoimisessa mutta vaatii vielä kehittymistä automatiikassa, kvantitatiivisuudessa sekä usean loisen yhtäaikaisessa määrittämisestä samasta näytteestä.

2.4.4 FAMACHA

FAMACHA (FAffa MAIan CHArt) on kliiniseen tutkimiseen perustuva menetelmä, jonka avulla pyritään määrittämään kärsiikö eläin verta ravinnokseen käyttävän loisen aiheuttamasta infektiosta tai anemiasta ja löytämään erityisesti ne eläimet, joiden oma vastustuskyky ei pysty selviytymään infektiosta. Menetelmällä voidaan myös määrittää uusintalääkityksen tarve. FAMACHA:ssa on tarkoituksena saada käsitys eläimen hematologisesta tilasta, erityisesti onko eläimen punasolumassa eli hematokriitti matala. Menetelmä perustuu lampaan tai vuohen silmän sidekalvon värin tutkimiseen. Sidekalvo tarkastellaan alemman silmäluomen sisäpuolelta hyvässä valossa ja verrataan standardina olevaan värikuviin. Sidekalvon väri muuttuu anemian kehittyessä syvänpunaisesta vaaleanpunaisen kautta valkoiseen. FAMACHA:n avulla karjasta pitäisi pystyä poimimaan loisinfektiosta kärsivät yksilöt ilman laboratoriotestiä. FAMACHA:ssa eläimet luokitellaan hematokriitin mukaan viiteen eri luokkaan. Sidekalvon väri on eri jokaisessa luokassa ja hoitosuositus tulee näiden luokkien perusteella. FAMACHA:n luokittelu on selvitetty taulukossa 1. (Bath ym. 2001.)

Taulukko 1. FAMACHA-luokitus.

Luokka	1	2	3	4	5
Hematokriitti	yli 28	23-27	18-22	13-17	alle 12
Konjuktiivan väri	punainen	punainen-vaalean-punainen	vaalean-punainen	vaalean-punainen-vaikoinen	vaikoinen
Hoitopäätös	ei hoideta	ei hoideta	ehkä	hoidetaan	hoidetaan

FAMACHA:n on todettu olevan riittävän tarkka kliiniseen käyttöön ja se korreloi hyvin hematokriitin kanssa. Menetelmän herkkyyttä saadaan parannettua, jos hoidetaan myös luokkaan 3 kuuluvat eläimet. Tällöin virhepositiivisten eläinten määrä nousee, mutta terveen eläimen lääkitsemisellä ei ole niin paljon haittaa kuin sairaan eläimen lääkitsemättä jättämisellä. (Scheuerle ym. 2010.) FAMACHA:n tarkkuus riippuu tutkimuksen tekijän kokemuksesta. Kokemattomien henkilöiden käytössä menetelmän herkkyys heikkenee. Mutta vaikka menetelmä ei olisikaan kovin tarkka, on sen todettu olevan riittävän tehokas arvioimaan kliinistä anemiaa. FAMACHA:n tarkoituksena on vähentää lääkittävien eläinten määrää ja siten vähentää hoitokustannuksia. FAMACHA:n käyttäminen ehkäisee myös resistanssin syntymistä, sillä vain sairaiden eläinten lääkitseminen on tehokas keino resistanssin ehkäisemisessä. FAMACHA:a ei suositella ainoaksi loisinfektiota määrittäväksi menetelmäksi, mutta se toimii hyvin osana loishallintaa. (Bath ym. 2001.)

2.4.5 Ulosteen veritesti

Kun *H. contortus* alkaa käyttää ravinnokseen lampaan verta, verta ilmestyy myös ulosteeseen. Määrittämällä lampaan ulosteessa olevan veren määrää voidaan arvioida mahdollisen loisinfektion voimakkuutta. Itse *H. contortus*-loista ei tällä menetelmällä

määritetä, joten testiä suositellaan käytettävän infektiota epäiltäessä ja loislääkityksen jälkeen paranemisen seuraamiseen. (Colditz & Le Jambre 2008.)

Colditz & Le Jambren (2008) tutkimuksessa käytettiin Bayerin Hemastix-testiä, jossa on asteikko 1-5 arvioimaan ulosteessa olevan veren määrää. Testin tulos kolme tai yli kolme oli merkki anemiasta ja siten näillä tuloksilla voidaan epäillä haemonchoosia. Asteikko seurasi ulosteessa laskettuja munien määriä ja hematokriitin laskua eli testi kertoi infektion vakavuudesta. Spesifisyys vaihteli välillä 89,2-94,4 % ja sensitiivisyys välillä 71,3-94,4 % infektion eri vaiheissa. Virhepositiivisia ja –negatiivisia tuloksia oli koko tutkimuksen ajan ja näistä virhepositiivisia oli enemmän. (Colditz & Le Jambre 2008.)

Ancare on kehittänyt haemonchoosin määrittämiseen oman kaupallisen ulosteen veritestin, haemonchus dipstick testin. Testissä testataan 10-20 eläimen tuoreesta ulosteesta tehty yhteisnäyte. Näyte liuotetaan ja keitetään, sillä ruuan sisältämien aineiden on todettu aiheuttavan vääriä positiivisia tuloksia ja keittämällä näyte ehkäistään tämä. Tämän jälkeen näyte testataan reagenssiliuskalla ja liuskan värimuutosta verrataan kontrolliliuskaan. (Ancare)

Muista suolistolouisista testin avulla ei saada mitään tietoa, joten testi ei käy loistilanteen kartoittamiseen vaan soveltuu parhaiten riskitiloille tilanteen seurantaan. Pelkästään anemian merkkejä seuraamalla voi lievemmät tai alkuvaiheen haemonchoosi-tapaukset jäädä huomioimatta, sillä lampaat tuottavat hyvin punasoluja. Ulosteen veritestillä pystyttäisiin epäilemään infektiota ennen vakavampien kliinisten oireiden ilmaantumista. Mahdollisen virhetekijän testin käyttöön tuo se, että ulosteen veri ei ole aina merkki haemonchoosista vaan voi johtua myös fascioloosista, kokkidioosista tai enteriitistä. (Colditz & Le Jambre 2008.)

3 AINEISTO JA MENETELMÄ

Työn tarkoituksena oli pystyttää menetelmä Jurasak ym. 2010 artikkelin mukaisesti *H. contortuksen* määrittämiseen ulostenäytteestä lektiinivärjäyksen avulla. Pilottitutkimuksessa tutkittiin kuuden lammastilan ulostenäytteet ja *H. contortuksen* esiintyminen näillä tiloilla.

3.1 Näytteiden kerääminen

Tutkimukseen osallistui 6 lammastilaa Etelä-Suomesta. Tilakoko vaihteli noin 20 lampaasta 200 lampaaseen. Ulostenäytteet kerättiin tiloilta maaliskuun loppupuolella ja huhtikuussa. Joillakin tiloilla näytteet otti eläinlääkäri ja opiskelijat (tilat A, C, E ja F) ja toisilla tiloilla tilallinen hoiti näytteenoton (tilat B ja D). Näytteitä otettiin yleensä noin 10 prosentista eläimistä ja vähintään 10 näytettä per tila. Tästä johtuen pienemmillä tiloilla otettiin suhteessa enemmän näytteitä. Näytteitä otettiin tiloilla niin, että jokaisesta tilalla olevasta lammasryhmästä (karitsat, vanhemmat ja nuoremmat uuhet) tulisi ainakin yksi näyte. B-tilalta otettiin myöhemmin vielä lisänäytteitä kuusi kappaletta. Tilat ja näytemäärät ovat taulukossa 2. Näytteitä otettiin yhteensä 103. Ulostenäytettä kerättiin peräsuolesta noin 10 gramman verran, jotta siitä riittäisi McMaster-määritykseen ja lektiinivärjäykseen. Ulostenäytteet pyrittiin tutkimaan mahdollisimman pian keräämisen jälkeen. Jos näytteitä ei ehditty tutkia heti, ne säilytettiin jääkaappilämpötilassa. Tilan B näytteet säilytettiin poikkeavasti pakkasessa keräämisen jälkeen.

Taulukko 2. Tutkimukseen osallistuneet tilat ja näytemäärät.

Tila	Uuhia tilalla	Lampaiden rotu	Näytemäärä
A	20	suomenlammas ja tuontirotu	10
B	40	suomenlammas ja tuontirotu	17
C	100	risteytys	11
D	200	risteytys + tuontirotu	20
E	200	suomenlammas	25
F	180	suomenlammas + risteytys	20

3.2 *Haemonchus contortus* –loisen määrittäminen ulostenäytteistä

Ulostenäytteille tehtiin ensiksi McMaster-määrittäminen. Koska McMaster-menetelmällä ei voida erottaa *H. contortus* –munia muista *Trichostrongyloidea*-tyyppisistä munista niin, näytteille, joista löytyi *Trichostrongyloidea*-tyyppisiä loisten munia, tehtiin lektiinivärjäys.

3.2.1 McMaster

McMaster-menetelmällä määritetään munien määrä grammassa ulostetta. 4 grammaa ulostetta punnittiin astiaan, johon lisättiin ensin 6 ml flotaatioliuosta. Flotaatioliuoksena käytettiin kyllästettyä sokeri-suolaliuosta, joka valmistettiin 1 litraan vettä 400 grammaa natriumkloridia ja 500 grammaa sokeria. Uloste sekoitettiin flotaatioliuokseen mahdollisimman hyvin ja seokseen lisättiin vielä 50 ml flotaatioliuosta. Lopullisessa seoksessa on 4 grammaa ulostetta ja 56 ml flotaatioliuosta. Seos sekoitettiin tasaiseksi ja suodatettiin sideharson läpi puhtaaseen astiaan. Seos sekoitettiin vielä huolellisesti, että loisten munat olisivat tasaisesti nesteessä, jonka jälkeen ulosteliuosta pipetoitiin McMaster-kammioihin. Liuoksen

annettiin seisoa kammioissa vähintään 5 minuuttia ennen madon munien laskentaa. Laskenta suoritettiin mikroskoopilla (Alphaphot-2 YS2, Nikon) käyttäen 10 x 10 suurennosta. Molemmista kammioista laskettiin madon munat ja madon munien yhteismäärä kerrottiin luvulla 50. Näin saadaan tulokseksi munien määrä grammassa ulostetta (epg).

3.2.2 Lektiinivärjäys

Lektiinivärjäys tehtiin Jurasakin artikkelin mukaisesti. Lektiinivärjäyksessä 2 grammaa ulostetta laitetaan muoviputkeen ja siihen lisätään 5 ml vettä. Uloste sekoitetaan hyvin veden kanssa. Näytteeseen lisätään vielä 18 ml vettä ja sekoitetaan hyvin. Näytteen annetaan olla yön yli jääkaapissa, jotta munat erottuisivat hyvin ulosteesta. Seuraavana päivänä näyte sekoitetaan hyvin ja 10 ml näyteliuosta kaadetaan sentrifuugiputkeen. Näytettä sentrifugoidaan (Centrifuge 5810 R, Eppendorf) viisi minuuttia 280 G:ssä, supernatantti kaadetaan pois ja 2 ml kyllästettyä sokeriliuosta lisätään näyteputkeen. Näyte sekoitetaan hyvin, näyteputki täytetään melkein täyteen sokeriliuoksella ja sentrifugoidaan 5 minuutin ajan 280 G:ssä. Näyteputkeen lisätään vielä lisää sokeriliuosta niin, että sokeriliuos muodostaa kuperan pinnan putken suulle ja putken suulle asetetaan peitinlasi. Loisten munat nousevat kyllästetyssä sokeriliuoksessa pintaan, kiinnittyvät peitinlasiin ja saadaan kerättyä siitä talteen. Putkien annetaan olla huoneenlämmössä peitinlasilla peitettynä tunnin ajan. Tämän jälkeen peitinlasi irrotetaan ja siihen kiinnittyneet munat huuhdellaan 1,5 ml:lla PBS-liuosta (phosphate buffered saline, 100 mM 7.4 pH, Sigma-Aldrich) 1,5 ml sentrifuugiputkeen. Näytettä sentrifugoidaan viiden minuutin ajan 280 G:ssä, supernatantti poistetaan ja sedimentti sekoitetaan 1,5 ml:aan PBS:ää. Näyte sentrifugoidaan jälleen viiden minuutin ajan 280 G:ssä ja supernatantti poistetaan. Näytteeseen lisätään 1ml PBS:ään laimennettua fluoresoivaa lektiinivalmistetta (Lectin from *Arachis hypogaea* (peanut) FITC conjugate, Sigma-Aldrich). Jurasakin artikkelin mukaan lektiiniliuoksen pitoisuus pitäisi olla 5 µg/ml. Käytettävissä olevan vaa'an tarkkuus ei riittänyt tällaisen laimennoksen tekemiseen. Tästä syystä käytetyn

lektiiniiliuksen pitoisuutta ei tiedetä varmasti. Näytettä inkuboitiin tunnin ajan huoneenlämmössä sekoittajassa (Speci-mix test tube rocker, Termo Scientific), jonka jälkeen näyte sentrifigoitiin viiden minuutin ajan 280 G:ssä ja supernatantti poistettiin. Näyte pestiin lisäämällä 1,5 ml PBS:ää näytteeseen, sekoittamalla näyte hyvin, sentrifigoimalla näyte viiden minuutin ajan 280 G:ssä ja poistamalla supernatantti. Pesu toistettiin ja lopuksi 5 µl sedimenttiä pipetoitiin objektilasille ja siihen lisättiin 3 µl fluoresenssin kiinnitysnestettä (Fluoromount, Sigma-Aldrich). Näyte peitettiin peitinlasilla ja mikroskoipoitiin fluoresenssimikroskoopilla (GWD Olympus B112 ja BH2-RFCA). *H. contortus* -loisen munat fluoresoivat kirkkaan vihreinä, kun muut *Trichostrongyloidea*-tyyppiset munat olivat haalean vihreitä.

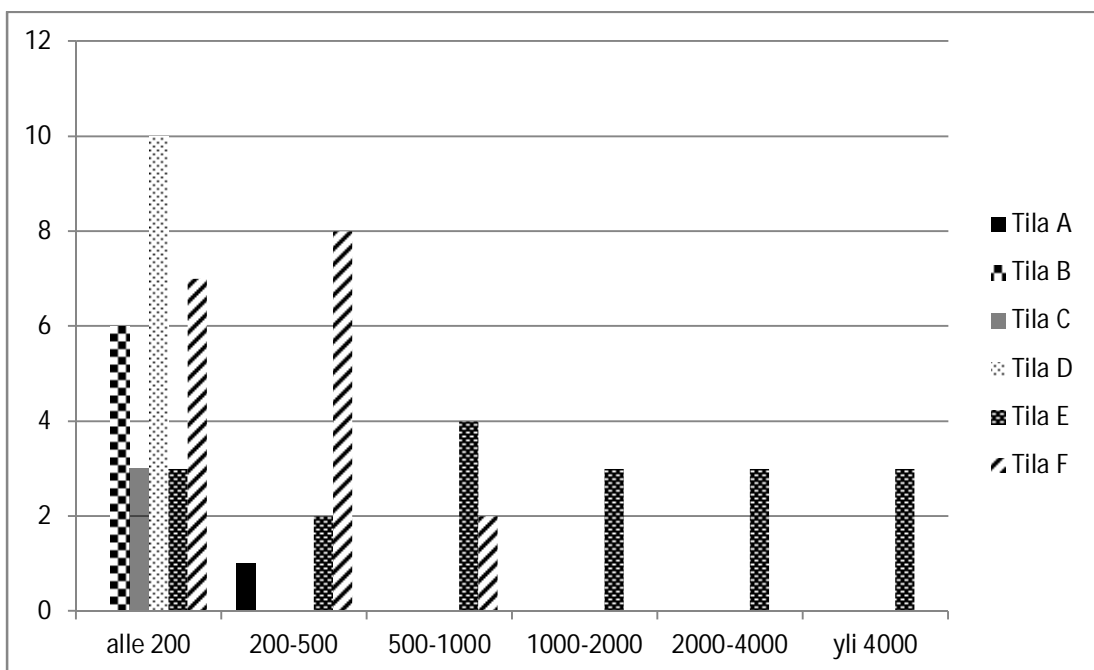
4 TULOKSET

Taulukossa 3 on esitetty McMaster-menetelmällä tutkittujen näytteiden tilakohtaiset positiiviset ja negatiiviset tulokset. Positiivisista näytteistä löytyi *Trichostrongyloidea*-tyyppisiä muna. Negatiivisissa näytteissä ei ollut loisten muna ollenkaan tai muiden kuin *Trichostrongyloidea*-tyyppisten loisten muna.

Taulukko 3. McMaster-menetelmällä tutkittujen ulostenäytteiden tilakohtaiset positiiviset ja negatiiviset tulokset *Trichostrongyloidea*-yläheimoisten madonmunien suhteen.

Tila	positiiviset näytteet	negatiiviset näytteet	ei tutkittu	Positiivisten näytteiden %- osuus
Tila A	1	8	1	11
Tila B	6	11	0	35
Tila C	3	5	3	38
Tila D	10	10	0	50
Tila E	18	7	0	72
Tila F	17	3	0	85

Yhteensä positiivisia näytteitä *Trichostrongyloidea*-tyyppisten loisten suhteen oli 55 eli 55,5 %. Jokaiselta tilalta löytyi vähintään yksi positiivinen näyte. Tiloilla positiivisten näytteiden määrä vaihteli 11-85 % välillä. Joidenkin ulostenäytteiden määrät olivat liian pieniä, jotta niistä olisi riittänyt ulostetta molempiin tutkimuksiin, joten näistä näytteistä ei tehty McMaster-määrittystä vaan pelkästään lektiinivärväys. Kuvassa 1 on kuvattuna kaikkien *Trichostrongyloidea*-tyyppisten munien suhteen positiivisten näytteiden epg-arvot eli munien määrä grammassa ulostetta.



Kuva 1. X-akselilla on madon munien määrä grammassa ulostetta (epg) ja y-akselilla näytteiden määrä.

Lektiinivärväyksessä kaikista näytteistä ei löytynyt munia, vaikka McMaster-menetelmän mukaan niissä olisi pitänyt olla *Trichostrongyloidea*-tyyppisiä munia. Taulukossa 4 on lueteltuna näytteet, joista löytyi *Trichostrongyloidea*-tyyppisiä munia lektiinivärväyksessä. *H. contortuksen* munat fluoresoivat eli nämä näytteet olivat positiivisia. Muut *Trichostrongyloidea*-tyyppiset munat näkyvät mikroskoopissa mutta eivät fluoresoi.

Taulukko 4. Lektiiinivärjäyksessä löydetyt *Trichostrongyloidea*-tyyppiset munat.

Näyttenumero	<i>H. contortus</i> - loisen munat	Muut <i>Trichostrongyloidea</i> - tyyppiset munat
A:7	0	6
B:5	18	5
B:9	4	1
D:16	0	1
E:3	0	1
E:4	0	4
E:7	0	3
E:6	0	20
E:5	0	1
E:9	0	3
E:12	0	2
E:14	0	2
E:15	0	2
E:16	0	3
E:18	0	2
E:23	0	4
F:1	0	1
F:4	1	1
F:8	2	1
F:10	3	0
F:11	0	1
F:13	1	0
F:14	1	0
F:16	1	0
F:20	2	0

Lektiiinivärjäyksessä loisten munia löytyi yhteensä 25 näytteestä, vaikka 55 näytteessä McMaster-menetelmän mukaan oli *Trichostrongyloidea*-tyyppisiä munia. Yhteensä positiivisia näytteitä *H. contortuksen* suhteen oli 9 eli 8,7 %. *H. contortus* -positiivisia tiloja oli kaksi, tilat B ja F.

H. contortus -loisen suhteen positiivisten näytteiden McMaster-tulokset on esitetty taulukossa 5. Samassa taulukossa on määritetty *H. contortus* -tartunnan aste Hansen & Perryn (1994) mukaan.

Taulukko 5. *H. contortus* –positiivisten näytteiden McMaster-menetelmän tulokset, munia grammassa ulostetta, epg, ja *H. contortus* –tartunnan vakavuus epg-arvon perusteella Hansen & Perryn (1994) arvojen mukaan.

Positiivinen näyte	Epg-arvo	<i>H. contortus</i> -tartunnan vakavuus
B:5	200	lievä
B:9	100	lievä
F:4	100	lievä
F:8	800	lievä
F:10	150	lievä
F:13	400	lievä
F:14	100	lievä
F:16	100	lievä
F:20	300	lievä

5 POHDINTA

H. contortus -loisen esiintymisestä Suomessa ei ole tietoa lukuun ottamatta Eviran patologisista tutkimuksista saatavaa tietoa ja paria tapausraporttia. Lammastilojen ulostenäytteitä ei ole Suomessa tutkittu erityisesti *H. contortuksen* varalta. Loisen esiintymisen tutkimusta on vaikeuttanut sopivan menetelmän puuttuminen. Muita menetelmiä loisen määrittämiseen tässä työssä käytetyn lektiinivärjäyksen lisäksi ovat munien kasvattaminen toukiksi ja toukkien tunnistaminen sekä PCR-menetelmä. Munien kasvattaminen on työläs ja hidas menetelmä, joka lisäksi vaatii kokemusta toukkien tunnistamisesta, eikä siten sovellu rutiinin omaiseen laboratoriomääritykseen hyvin. PCR-menetelmä on tarkka menetelmä *H. contortuksen* määrittämiseen, mutta menetelmän pystytys vaatii enemmän aikaa ja on kalliimpi toteuttaa kuin käytetty lektiinivärjäysmenetelmä.

Lektiinivärjäysmenetelmä ei vaadi laboratoriolta erikoisvarustelua lukuun ottamatta fluoresenssimikroskooppia. Menetelmän pystytyksessä ei ollut ongelmia ja ulostenäytteiden värjäys oli helppo ja nopea suorittaa. Tästä syystä menetelmä voisi sopia laajemminkin käytössä lampaiden ulostenäytteiden tutkimiseen. Ongelmana lektiinivärjäyksessä on positiivisen kontrollin puuttuminen ja näytteiden säilyminen määrityskelpoisina. Nämä ongelmat ovat myös yhteydessä toisiinsa, sillä positiivista ulostenäytettä ei voida säilyttää kontrollina tulevaisuudessa tehtäviin määrityksiin. Ulostenäytteet säilyvät jääkaapissa joitakin vuorokausia määrityskelpoisina, mutta tutkimus on sitä luotettavampi, mitä tuoreemmista näytteistä määritys tehdään. Pitkä näytteiden säilytysaika heikentää fluoresenssia, jolloin voidaan saada väärä negatiivisia tuloksia. Myös näytteiden pakastaminen heikentää fluoresenssia.

Positiivisen kontrollin puuttuminen johtaa aina epävarmuuteen tulosten oikeellisuudesta ja lisäksi menetelmän validointia ilman positiivista kontrollia ei voida suorittaa. Aiempien tutkimusten mukaan vain *H. contortuksen* pintarakenteet sitovat

maapähkinälektiiniä (Jurasak ym. 2010, Palmer & McCombe 1996) . Jos tähän tietoon voi luottaa, tulosten tulisi olla oikeellisia, vaikka menetelmän olosuhteet vaihtelevat. Menetelmää ei ole vielä käytetty paljoa käytännössä, joten kattavampaa tietoa sen toimivuudesta ei ole. Pystyttämässämme menetelmässä lektiinivalmisteen pitoisuutta ei voitu vakioida laboratorioteknisistä syistä, joten voi olla mahdollista, että lektiiniliuoksen pitoisuus on haluttua matalampi tai vahvempi. Liian matalan liuoksen vaarana on, etteivät *H. contortus* -munat värjäydy. Jos pitoisuus on liian korkea, vaarana on, että muut munat voisivat teoriassa sitoa lektiiniväriä itseensä. Tämä ei ole kuitenkaan niin todennäköistä kuin liian matalan pitoisuuden aiheuttamat väärät negatiiviset tulokset.

Lektiinivärjäykseen kannattaa yhdistää McMaster-määritys, sillä lektiinivärjäyksessä ei voida tutkia munien määrää, vain sitä onko näytteessä *H. contortus* -munia. Lisäksi menetelmä on nopeampi ja halvempi kuin lektiinivärjäys, joten jos näytteessä ei ole *Trichostrongyloidea*-tyyppisiä munia, ei lektiinivärjäys ole tarpeellinen. McMaster on luultavasti myös herkempi kuin lektiinivärjäys, sillä tutkimuksessamme McMaster-menetelmällä 55 näytteestä löytyi *Trichostrongyloidea*-tyyppisiä munia ja lektiinivärjäyksessä vain 25 näytteestä löytyi loisten munia.

H. contortuksen esiintymistä tutkittiin kuudella lammastilalla Etelä-Suomesta. Otos on pieni, mutta tarkoituksena oli testata menetelmää ja saada selville, onko kyseessä yleinen ongelma suomalaisilla lammastiloilla. Aikaisemmin *H. contortuksen* on ajateltu olevan ongelma lämpimissä maissa ja sen ei ole uskottu selviävän Pohjois-Euroopan talvesta. Yksittäisiä tapauksia *H. contortuksesta* on kuitenkin todettu Suomessa ja muissa Pohjoismaissa. Ruotsissa on tehty levinneisyystutkimus, jonka mukaan 37 % katraista oli positiivisia *H. contortuksen* suhteen (Lindqvist ym. 2001). Tähän tutkimukseen osallistuneista tiloilta otettiin 10-25 näytettä tilaa kohden. Näytteiden määrä riippui tilakoosta. Näytteitä pyrittiin ottamaan tiloilla olevista eri ryhmistä, siten että jokainen ryhmä tuli edustetuksi. Näytteiden kokonaislukumääräksi tuli 103. Näytteet tutkittiin yksittäisnäytteinä mahdollisimman tarkan tuloksen saamiseksi.

Näytteiden yhdistäminen vähentäisi määrityksiin käytettyä työmäärää, mutta samalla menetelmän herkkyys kärsisi ja McMaster-menetelmän käyttö lampaiden loiskuormituksen määrittämiseen ei onnistuisi. Näytteenottoajankohta oli karitsoimisen lähellä, jolloin uuhet ovat herkimpää loistartunnoille.

Positiivisia näytteitä *H. contortuksen* suhteen oli 9 eli 8,7 % näytteistä. Positiiviset näytteet olivat peräisin kahdelta tilalta, B ja F. *H. contortukselle* on tyypillistä voimakas munien tuotanto verrattuna muihin *Trichostrongyloidea*-tyyppisiin loisiin. McMaster-määrityksissä voimakasta munien tuotantoa ei kuitenkaan havaittu lektiinivärjäyksessä positiiviseksi osoittaneiden näytteiden kohdalla. Kokonaisuudessaan McMaster-tulokset viittasivat tiloilla lieviin loistartuntoihin, sillä melkein kaikkien näytteiden epg-arvot olivat alle 500. Lampailla epg-arvoja 50-800 pidetään lievänä loistartunnan merkinä (Hansen & Perry, 1994). Vain tilan E kohdalla loisten munien määrät olivat korkeat, jopa yli 4000. Tilan E:n kohdalla voidaan puhua voimakkaasta loisinfektiosta, sillä voimakkaan loistartunnan raja on yli 1200 munaa grammassa ulostetta (Hansen & Perry, 1994). Tältä tilalta ei kuitenkaan löytynyt *H. contortusta*. *H. contortus* -positiivisille näytteillä epg-arvot olivat pääasiassa 100-400 ja yhdelle näytteelle 800. Nämä epg-arvot ovat lievän tartunnan rajoissa, jotka ovat 100-2000 (Hansen & Perry, 1994). Matalat munien määrät voivat johtua siitä, että tutkituilla eläimillä oli vastustuskykyä loista vastaan, eikä niillä siten ollut voimakasta tartuntaa, vaikka loisen munia löytyikin ulosteesta. Tutkitut eläimet olivat enimmäkseen vanhempia eläimiä ja vanhemmilla eläimillä on parempi vastustuskyky loisista vastaan kuin nuoremmilla.

Tutkimuksessa onnistuttiin pystyttämään menetelmä *H. contortus* -loisen tutkimukseen ulostenäytteistä. Menetelmässä on omat heikkoutensa, mutta tällä hetkellä Suomessa ei ole tarjolla tarkempaa menetelmää. Loisen levinneisyyttä ja sen aiheuttamia ongelmia olisi hyvä tutkia laajemmin Suomessa.

6. VIITTEET

Abbot KA, Taylo M, Stubbings LA. Sustainable worm control strategies for sheep, 4th edition. A technical manual for veterinary surgeons and advisers. Sustainable control of parasites, 2012.

Aitken ID. Diseases of sheep. 4. p. Blackwell Publishing, Oxford 2007.

Almeida FA, Garcia KCOD, Torgerson PR, Amarante AFT. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. *Parasitol Int* 2010, 59: 622-625.

Ancare. Fact sheet. Haemonchus Dipstick Test, An on-farm decision support tool for Barber's Pole worm infection in sheep.

http://www.ancare.com.au/SiteCollectionDocuments/vr/haemonchus_dipstick_test_fact_sheet.pdf Haettu 5.12.2013.

Angulo-Cubillán FJ, García-Coiradas L, Alunda JM, Cuquerella M, de la Fuente C. Biological characterization and pathogenicity of three *Haemonchus contortus* isolates in primary infections in lambs. *Vet Parasitol* 2010, 171: 99-105

Balic A, Bowles VM, Meeusen EN. Mechanisms of immunity to *Haemonchus contortus* infection in sheep. *Parasite Immunol* 2002, 24: 39-46

Bath GF, Hansen JW, Krecek RC, van Wyk JA, Vatta AF. Sustainable approaches for managing haemonchosis in sheep and goats. *FAO animal production and health paper*

2001. <http://ebookbrowse.com/sustainable-approaches-for-managing-haemonchosis-in-sheep-and-goats-pdf-d66855923>, haettu 2.2.2012

Bethony JM, Loukas A, Hotez PJ, Knox DP. Vaccines against blood-feeding nematodes of humans and livestock. *Parasitology* 2006, 133: 63-79

Colditz IG, Le Jamber LF. Development of a faecal occult blood test to determine the severity of *Haemonchus contortus* infections in sheep. *Vet Parasitol* 2008, 153: 93-99

Coop RL, Holmes PH. Nutrition and parasite interaction. *Int J Parasitol* 1996, 26: 951-962.

Domke AV, Chartier C, Gjerde B, Höglund J, Leine N, Vatn S, Stuen S. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats in Norway. *Parasitol Res* 2012, E-julkaisu ennen lehdessä julkaisemista,

<http://www.springerlink.com.libproxy.helsinki.fi/content/p4101r1772641714/fulltext.pdf> Haettu 7.4.2012

Evira. Eviran julkaisuja 8/2010. Eläintaudit Suomessa 2009
<http://www.evira.fi/portal/fi/evira/julkaisut/?a=view&productId=95> Haettu 14.2.2012.

Evira. Lampaiden terveydenhuolto. Lampaiden loistorjunta.

http://www.evira.fi/files/attachments/fi/elaimet/elainten_terveys_ja_elaintaudit/terveydenhuolto/lampaat/lampaiden_loistorjunta.pdf Haettu 21.2.2012

Evira. Tuotantoeläimille hyväksytyt lääkevalmisteet. 16.8.2013

http://www.evira.fi/files/attachments/fi/elaimet/elainten_terveys_ja_elaintaudit/laakiseminen/tuotantoelaimet_valm.pdf Haettu 24.9.2013

Fimea. Erityislupavalmisteet eläinlajeittain. 31.7.2013

http://www.fimea.fi/download/23639_ERITYISLUPAVALMISTEET_ELAINLAJEITTAIN_2013-07-31.pdf Haettu 5.12.2013

Getachew T, Dorchies P, Jacquet P. Trends and challenges in the effective and sustainable control of *Haemonhcus contortus* infection in sheep. Review. Parasite, 2007, 14: 3-14

Hansen J, Perry B. The epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of ruminants. E-julkaisu. ILRAD, Nairobi, 1994.

http://www.fao.org/wairdocs/ilri/x5492e/x5492e05.htm#3.4.1.5_guideline_to_the_interpretation_of_faecal_egg_counts_in_young_animals Haettu 24.9.2013.

Harmon AF, Williams ZB, Zarlenga DS, Hildreth MB. Real-time PCR for quantifying *Haemonchus contortus* eggs and potential limiting factors. Parasitol Res 2007, 101: 71-76

Hoste H. Adaptive physiological processes in the host during gastrointestinal parasitism. Int J Parasitol 2001, 31: 231-244

Hoste H, Chartier C, Le Frileux Y. Control of gastrointestinal parasitism with nematodes in dairy goats by treating the host category at risk. *Vet Res*, 2002, 33: 531-545

Jurasek ME, Bishop-Stewart JK, Storey BE, Kaplan RM, Kent ML. Modification and further evaluation of a fluorescein-labeled peanut agglutinin test for identification of *Haemonchus contortus* eggs. *Vet Parasitol* 2010, 169: 209-213

Learmount J, Conyers C, Hird H, Morgan C, Craig BH, von Samson-Himmelstjerna G, Taylor M. Development and validation of real-time PCR methods for diagnosis of *Teladorsagia circumcincta* and *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Parasitol* 2009, 166: 268-274

Lindqvist Å, Ljungström B-L, Nilsson O, Waller PJ. The Dynamics, prevalence and impact of nematode infections in organically raised sheep in Sweden. *Acta vet scand* 2001, 42: 377-389

Lääketietokeskus. Pharmaca Fennica Veterinaria 2013. Porvoo 2013.

Newton SE, Meeusen ENT. Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep. *Parasite Immunol* 2003, 25: 283-296

Newton SE, Munn EA. The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*. *Parasitol Today* 1999, 15: 166-172

Ng'ang'a CJ, Munyua WK, Maingi N, Kayari PWN. Occurance of peri-parturient rise in trichostrongylid nematode egg output in Dorper ewes in a semi-arid area of Kajiado District of Kenya. *Acta Tropica*, 2004, 92: 213-218

Manninen S-M, Oksanen A. Haemonchosis in a sheep flock in North Finland. *Acta vet scand* 2010, 52: 19

Miller JE, Bahirathan M, Lemarie SL, Hembry FG, Kearney MT, Barras SR. Epidemiology of gastrointestinal nematode parasitism in Suffolk and Gulf Coast Native sheep with special emphasis on relative susceptibility to *Haemonchus contortus* infection. *Vet Parasitol* 1998, 74: 55-74

O'Connor LJ, Walkden-Brown SW, Kahn LP. Ecology of the free-living stages of major trichostrongyloid parasites of sheep. *Vet Parasitol* 2006, 142: 1-15

Palmer DG, McCombe IL. Lectin staining of trichostrongylid nematode eggs of sheep: rapid identification of *Haemonchus contortus* eggs with peanut agglutinin. *Int J Parasitol*, 1996, 26: 447-450

Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD (toim.) Haemonchosis in ruminants. *Teoksessa: Veterinary medicine, a textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*. 10. p. Elsevier Limited, Philadelphia 2007, 1548-1551

Roeber F, Jex AR, Campbell AJD, Campell BE, Anderson GA, Gasser B. Evaluation and application of a molecular method to assess the composition of strongylid nematode

population in sheep with naturally acquired infections. *Infect Genet Evol* 2011, 11: 849-854.

Saari S, Nikander S. *Elinympäristönä hevonen – hevosen loiset ja sairaudet*. 2. p. Pfizer Oy Animal Health, Helsinki, 2009.

Sangster NC, Gill J. Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitol Today* 1999, 15: 141-146

Sargison N. *Sheep flock health, a planned approach*. 1. p. Blackwell Publishing, Oxford, 2008.

Scheuerle M, Mahling M, Muntwyler J, Pfister K. The accuracy of the FAMACHA-method in detecting anaemia and haemonchosis in goat flocks in Switzerland under field conditions. *Vet Parasitol* 2010, 170: 71-77

Sweeny JPA, Robertson ID, Ryan UM, Jacobson C, Woodgate RG. Comparison of molecular and McMaster microscopy techniques to confirm the presence of naturally acquired strongylid nematode infection in sheep. *Mol Biochem Parasitol* 2011, 180: 62-67.

Taylor MA, Coop RL, Wall RL. *Veterinary Parasitology*. 3. p. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, 2007

Valderra'bano J, Gomez-Rinco'n, J Uriarte. Effect of nutritional status and fat reserves on the periparturient immune response to *Haemonchus contortus* infection in sheep. Vet Parasitol 2006, 141: 122-131

Waller Pj, Rudby-Martin L, Ljungström B.L, Rydzik A. The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to over-winter survival strategies. Vet Parasitol 2004, 122: 207-220

Thamsborg SM, Gray GD, Gill HS, Burgess SK, Lea JM. The intramammary inflammatory response of genetically resistant Merino ewes infected with *Haemonchus contortus*. Int J Parasitol 1999, 29: 451-458

Vervelde L, Van Leeuwen MA, Kruidenier M, Kooyman FN, Huntley JF, Van Die I, Cornelissen AW. Parastie Immunol 2002, 24: 189-201

Waller PJ. Anthelmic resistance. Vet Parasitol 1997, 72: 391-412

Zajac AM. Gastrointestinal nematodes of small ruminants: life cycle, anthelmintics, and diagnosis. Vet Clin Food Anim 2006, 22: 529-541