

I

Aus dem Department für Pathobiologie
der Veterinärmedizinischen Universität Wien
(Departmentsprecher: Univ-Prof.Dr.rer.nat. Armin Saalmüller)

Institut für Parasitologie
(Leiter: Univ.-Prof. Dr.med.vet. Anja Joachim Dipl. EVPC)

Monitoring der Wirksamkeit von Anthelminthika auf österreichischen Schafbetrieben

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Florian Untersweg

Wien, im Jänner 2022

II

Betreuer: Dr. med. vet. Barbara Hinney, Dipl. EVPC
Institut für Parasitologie
Department für Pathobiologie
Veterinärmedizinische Universität Wien

BegutachterIn: Prof. Dr. Juergen Rehage
Vizerektor für Lehre und klinische Veterinärmedizin
Veterinärmedizinische Universität Wien

Abkürzungsverzeichnis

AR = Anthelminthikaresistenz

BCS = body condition score

BZ = Benzimidazole

DNA = deoxyribonucleic acid

EPG = eggs per gram

EHT = Egg Hatch Test

EZRT = Eizahlreduktionstest

FAMACHA = FAffa MAIan CHArt

FBZ = Fenbendazol

FERCT = fecal egg count reduction test

HCl = Salzsäure

L3 = infektiöse Drittlarve

MDS = Magen-Darm Strongyliden

PCR = polymerase chain reaction

TAKG = Tierarzneimittelkontrollgesetz

WAAVP = World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

Formatiert: Englisch (Vereinigtes Königreich)

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	5
2. LITERATURÜBERSICHT	6
2.1. MAGEN-DARM-STRONGYLIDEN	6
2.1.1. ENTWICKLUNGSZYKLUS.....	6
2.2. PATHOGENESE, KLINIK	7
2.3. DIAGNOSE	9
2.4. ANTHELMINTHIKA	10
<i>Benzimidazole</i>	10
<i>Makrozyklische Laktone</i>	11
<i>Salicylsäureanilide</i>	11
<i>Amino-Acetonitril-Derivate</i>	11
2.5. ANTHELMINTHIKARESISTENZEN	12
2.6. RESISTENZMECHANISMEN.....	13
2.7. RESISTENZDIAGNOSE	13
3. ANGABEN ZUM EIGENANTEIL	15
3.1. VERSUCHSTEIL	15
3.2. MANUSKRIFT	15
MITWIRKUNG IN ALLEN TEILEN DES MANUSKRIPTS ZU STUDIE 1.....	15
4. MITTEILUNG ZUR ANNAHME DER ARBEIT	15
5. PUBLIKATION.....	16
6. DISKUSSION	26
7. ZUSAMMENFASSUNG	29
8. SUMMARY	30
9. LITERATURVERZEICHNIS	31
10. ANHANG.....	35

1. Einleitung und Fragestellung

Bereits vor 11.000 Jahren wurde die erste Domestikation von Schafen in Südwest-Asien beschrieben. Im Jahre 2010 wurden insgesamt 1.1 Milliarden Schafe und 0.95 Milliarden Ziegen gezählt (Chessa et al. 2009, Brunner und Kühleitner 2020). Die Statistik Austria beschrieb im Jahr 2020 einen Schafbestand von 393.764 Tieren in Österreich (Quelle: Statistik Austria). Die Nutzung von verschiedenen Produkten aus der Schafhaltung, wie z.B. Wolle, Fleisch und Milch, machen Schafe im Vergleich zur konventionellen Milchviehhaltung attraktiv. Die durchschnittliche Herdengröße betrug 2019 ca. 26 Schafe je Betrieb bei 15.700 gezählten Schafbetrieben in Österreich (Quelle: Statistik Austria).

Eine der größten tiergesundheitslichen Herausforderungen unserer Zeit stellt der Befall mit Parasiten dar. In den letzten Jahren haben die Frequenz und Intensität des Befalls mit Helminthen in manchen Regionen deutlich zugenommen. Diese Zunahme kann unter anderem auch auf den Klimawandel zurückgeführt werden: Dieser begünstigt die Entwicklung der Parasiten und erhöht somit den Infektionsdruck. Des Weiteren spielt auch die Zunahme von Resistenzen der Trichostrongyliden aber auch der Leberegel gegen Anthelminthika (AR) und das Management der Landwirte mit diesen eine weitere tragende Rolle (Morgan et al. 2013). Diese AR führen in weiterer Folge zu unzureichenden Gewichtszunahmen als auch zu verminderter Milchproduktion und stellen somit nicht nur einen Schaden für die Tiere, sondern auch einen wirtschaftlichen Verlust für den Landwirt dar (Papadopoulos 2008). Auch die Haltungform, wie z.B. der Wechsel von Stallhaltung zu Alping, kann einen Einfluss auf die Entwicklung von Resistenzen haben. Neue Strategien in der Anwendung von Anthelminthika sind notwendig, um die Resistenzbildung einzudämmen und enorme wirtschaftliche Verluste zu vermeiden (Hinney et al. 2020).

Eine Hypothese dieser Arbeit war, dass ein hohes Ausmaß an Resistenzen gegen Benzimidazole (Fenbendazol) in Tirol und der Steiermark vorliegt und zudem auch Resistenzen gegen makrozyklische Laktone (Moxidectin) detektiert werden können. Eine weitere Hypothese war, dass *Haemonchus* in hohem Maß in österreichischen Betrieben vorkommt. Die Studie wurde in Schafbetrieben in der Steiermark und in Tirol durchgeführt mit dem Ziel die derzeitige Resistenzlage gegen Fenbendazol und Moxidectin auf Grundlage eines standardisierten Eizahlreduktionstests (EZRT) zu ermitteln. Dieser orientiert sich in der Durchführung an den aktuellen Richtlinien der Europäischen COST Action „Combar-COMBatting Anthelmintic Resistance in Ruminants“ (<https://www.combar-ca.eu>).

2. Literaturübersicht

2.1. *Magen-Darm-Strongyliden*

Die durch Helminthen der Wiederkäuer verursachten wirtschaftlichen Einbußen belaufen sich europaweit auf 1.8 Milliarden Euro, davon in Österreich 29 Millionen Euro jährlich (Chartier et al. 2020). In Mitteleuropa stellen hier nach wie vor die Magen-Darm-Strongyliden (MDS) die Hauptrolle unter den Endoparasiten der kleinen Wiederkäuer dar (Hertzberg und Sager 2006). Hierbei werden 17 verschiedene Gattungen als Vertreter der Trichostrongyliden beschrieben. Unter den für das Schaf wichtigsten Vertretern gilt der „rote gedrehte Magenwurm“ (*Haemonchus contortus*). Er kommt meistens als Mischinfektion mit anderen Gattungen, unter anderem mit *Ostertagia*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus* und *Cooperia* vor (Deplazes und Eckert 2013, Bostedt und Ganter 2019). Auch *Nematodirus* wird zu den MDS gezählt, obwohl diese Gattung nicht zu den Trichostrongyliden, sondern zur Familie der Molineidae gehört. Die MDS umfassen eine Länge von 2.5 bis 30 mm und setzen sich je nach Gattung während der Entwicklung in den verschiedenen Bereichen des Magen-Darmtraktes fest (Bostedt und Ganter 2019).

2.1.1. *Entwicklungszyklus*

Eine Infektion mit MDS erfolgt in der Regel oral über die Aufnahme von infektiösen Drittlarven (L3) über das Futter auf Weideflächen. Danach beginnt die interne Entwicklung der getrenntgeschlechtlichen Larven. Hierbei wird durch bestimmte Signale im Pansen oder Labmagen bei den Larven eine Enzymfreisetzung herbeigeführt. Diese Enzyme wirken dann von innen auf die Scheide der Larven ein und führen zum Aufbrechen der Scheide. Dieser Vorgang wird lokal durch starke motorische Bewegungen der Larve unterstützt und führt somit zum Ausschlüpfen dieser (Ecdysis). Die Larven können sich nun bis zur L5 weiterentwickeln. In diesem Stadium können die Larven in der Magen- oder Darmschleimhaut in ein Ruhestadium (Hypobiose) gehen, oder sich direkt zu geschlechtsreifen Adulten weiterentwickeln, die sich je nach Gattung im Magen- oder Dünndarmlumen ansiedeln. Dort kommt es zur Paarung der Männchen und Weibchen. Die Weibchen scheiden Eier aus, die sich extern bis zur infektiösen L3 entwickeln können (Bostedt und Ganter 2019).

Klimatische Bedingungen beeinflussen den externen Entwicklungszyklus stark. Temperatur und Feuchtigkeit sowie die geographische Lage und die Höhenlage stellen essentielle

Einflüsse dar. Für eine gute Entwicklung der Trichostrongyliden sind feuchtwarme Klimazonen besonders vorteilhaft. Übermäßige Hitze, extreme Kälte und trockene Bedingungen können zum Austrocknen bzw. Abfrieren der Larvenstadien und somit zur Unterbrechung des Entwicklungszyklus führen. Hierfür sind vor allem *H. contortus*, *T. circumcincta* und *T. colubriformis* anfällig (O'Connor et al. 2006).

Haemonchus contortus weist einige artspezifische Besonderheiten im Jahresverlauf auf. Die besonders kälteempfindlichen Larven können in kälteren Breitengraden nicht auf der Weide überwintern, der Parasit überwintert daher entweder als hypobiotische L4 in der Darmschleimhaut oder als Adultus im Wirt. Im Frühjahr kommt es dann zum „Spring-Rise“ Phänomen, bei dem es durch Reaktivierung von hypobiotischen Larven während des Beginns der Weidesaison zum vermehrten Ausscheiden von Wurmeiern kommt (Deplazes und Eckert 2013). Zudem wurde bei immunologisch geschwächten Muttertieren ein „periparturient egg rise“ beschrieben, bei dem es in der Ablammsaison zur vermehrten Eiausscheidung kommt. Durch die sehr hohe Menge an ausgeschiedenen Eiern (ca. 5000/Weibchen/Tag), führt eine Infektion mit *H. contortus* zu einer sehr stark mit Eiern kontaminierten Weide und somit bei günstigen Bedingungen und guter Translokation (Übergang von L3 aus dem Kot auf die Grasflächen) zu einer hohen Infektionsgefahr bereits kurz nach Beginn der Weidesaison. Als weiteres Phänomen im Zusammenhang mit einer *Haemonchus*-Infektion wird die „Selbstreinigung“ beschrieben, bei dem bereits im Labmagen sitzende adulte Stadien bei Neuaufnahme von Larven eine allergische Reaktion erleiden und sich dadurch fast vollständig eliminieren (Deplazes und Eckert 2013).

Eine Besonderheit im Lebenszyklus von *Nematodirus battus* ist, dass dieser einen winterlichen Kältereiz benötigt, der bei raschen Temperaturanstiegen zu hoher Infektionsgefahr für Lämmer führt (Deplazes und Eckert 2013; Hertzberg und Sager 2006).

2.2. Pathogenese, Klinik

Trichostrongyliden führen bei Schafen zu unterschiedlichen klinischen Symptomen, die von Faktoren wie z.B. Alter, Immunitätslage, Rassedisposition, Stress, Besatzdichte, Weidemanagement, Ernährung, Infektionsdosis und der Zusammensetzung von verschiedenen Trichostrongyliden abhängig sind. Die Infektionsdosis wird von Temperaturverlauf und Jahreszeit bestimmt (Bostedt und Ganter 2019, Roeber et al. 2013a). Bei Infektionen ist vor allem bei jungen, nicht immunen, bei adulten immungeschwächten Tieren und bei Tieren, die einem hohen Infektionsdruck durch L3 ausgesetzt sind, mit klinischen Symptomen zu rechnen.

Haemonchus contortus

Weibchen sind in der Lage tausende Eier pro Tag zu produzieren. Das ist auch der Grund warum *H. contortus* einer der fruchtbarsten der Strongyliden ist. Durch die hohe Anzahl an produzierten Eiern kommt es zu einer schnellen Kontamination der Weide und in Folge zu Ausbrüchen der Haemonchose. Adulte Würmer sind kurzlebig und überleben in ihrem Wirt nur wenige Monate, können jedoch erhebliche Schäden verursachen. Dabei werden die pathogenen Mechanismen hauptsächlich durch das Stadium der L4 und die Adulten hervorgerufen. Im Vordergrund steht hier die Anämie, die durch das Saugen von Blut ausgelöst wird und circa zwei Wochen nach Infektion sichtbar wird. Akute Verläufe führen je nach Intensität der Infektion zur hämorrhagischen Anämie, Meläna, Ödemen, Schwäche, verminderter Woll-, und Muskelzunahme und bei schweren Verläufen zum Tod. Bei chronischen Verläufen kann verminderte Nahrungsaufnahme, Gewichtsverlust und Anämie beobachtet werden. Im Gegensatz zu vielen anderen MDS ist bei *Haemonchus* kein Durchfall zu beobachten (Roeber et al. 2013a).

Teladorsagia circumcincta

Weibchen dieser Art sind im Vergleich zu *Haemonchus* nicht so fruchtbar und produzieren im Durchschnitt pro Tag nur 100-200 Eier. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass sich *Teladorsagia* nicht von Blut ernährt und hier für die pathogenen Mechanismen allein die Larvenstadien verantwortlich sind. Die Entwicklung dieser findet in den Drüsenzellen des Labmagens statt und führt dabei zur Knötchenbildung in der Mukosa und in weiterer Folge zur Schädigung der Belegzellen. Dies führt dann wiederum zu einer reduzierten HCl-Sekretion und einem Anstieg des pH-Wertes. Dadurch kann Pepsinogen nicht mehr in die aktive Form Pepsin umgewandelt werden was wiederum zu einem erhöhten Plasmapepsinogenspiegel und als Folge zu einer verminderten Proteinverdauung führt (Roeber et al. 2013a). Ein weiterer Effekt der verringerten Sekretion von HCl ist, dass die Gastrinsekretion gesteigert wird und in weiterer Folge zu einer verminderten Motilität des Vormagensystems führt. Dadurch kommt es zu einer geringeren Entleerung der Vormägen und in Folge zur Inappetenz (Deplazes und Eckert 2013). Als Leitsymptome bei Infektionen mit *T. circumcincta* gelten Durchfall, geringere Gewichtszunahme, Gewichtsverlust und eine reduzierte Wollproduktion (Roeber et al. 2013a).

Trichostrongylus spp.

Trichostrongylus spp. kommen im Dünndarm vor und entfalten ihre pathogene Wirkung hauptsächlich bei Lämmern. Bei adulten Tieren kann eine Infektion zu einer signifikanten Verminderung des Wollwachstums führen. Häufig vorkommende Spezies sind *T. colubriformis*, *T. rugatus* und *T. vitrinus*. Bei Wanderung der jungen adulten Stadien werden massive Schäden der Duodenalschleimhaut verursacht, die zu Anzeichen einer generalisierten Enteritis mit Blutungen, Ödembildung und in weiterer Folge Plasmaproteinverlusten führen. Dies hat eine Hypoproteinämie und Hypoalbuminämie zur Folge. Leichte Verläufe von *Trichostrongylus*-Infektionen sind oft schwierig von einer Mangelernährung zu unterscheiden. Bei schweren Verläufen ist mit langanhaltenden wässrigen Durchfällen und kotverschmutztem Schwanz bzw. kotverschmutzter Hinterhand zu rechnen (Roeber et al. 2013a).

2.3. Diagnose

Klinische Symptome geben oft Hinweise auf einen MDS-Befall, sind jedoch nicht beweisend. Daher sollte routinemäßig eine parasitologische Diagnostik erfolgen (Zarlenga et al. 2016). MDS-Eier können mit dem Flotationsverfahren nachgewiesen werden. Es sollte aber auch immer zusätzlich ein Sedimentationsverfahren durchgeführt werden, welches einen Leberegelbefall nachweisen kann. Leberegel können zu ähnlichen klinischen Erscheinungen wie *Haemonchus* führen (z.B. Anämie und Kehlgangödem). Aufgrund der Tatsache, dass Leberegel und MDS unterschiedlich therapiert werden und Mischinfektionen häufig sind, ist hier eine genaue Diagnostik notwendig (Roeber et al. 2013b).

Mit der Eizählung (FEC-fecal egg count) kann die Höhe der Wurmausscheidung pro Gramm Kot, Eier pro Gramm Kot (EpG) festgestellt werden. Der EpG kann verwendet werden, um Behandlungswürdige Tiere zu identifizieren (Roeber und Kahn 2014). Die Wurmausscheidung korreliert allerdings nicht immer mit der tatsächlichen Wurmbürde. So kann ein hoher EpG auch von nur wenigen fruchtbaren *H. contortus*-Weibchen herbeigeführt werden. Mehrere Möglichkeiten den EpG festzustellen, wie z.B. die Methode nach McMaster, die Wisconsin Flotation sowie Mini-FLOTAC und FLOTAC, sind beschrieben. Die Eizählung nach McMaster stellt hierbei die häufigste zur Anwendung kommende Methode dar, die laborspezifisch modifiziert werden kann. Dabei werden unter anderen verschiedene Flüssigkeiten, Verdünnungen und Zählweisen angewandt (Roeber et al. 2013b). Die FLOTAC und Mini FLOTAC-Technik stellt eine Weiterentwicklung mit niedrigerer Nachweisgrenzen im Vergleich zu McMaster dar (Cringoli et al. 2017). Im Falle einer

Überschreitung des EpG von > 200 ist eine signifikante Infektion mit Trichostrongylen vorhanden. Der EPG sollte jedoch gemeinsam mit den klinischen Symptomen bzw. Alter, Immunitätslage und Fütterungszustand sowie der vorherrschenden Trichostrongylenart beurteilt werden, um zu entscheiden ob ein Tier tatsächlich behandlungsbedürftig ist (Roeber et al. 2013b). Bei einem überwiegenden Befall mit *H. contortus* kann, aufgrund der hohen Eiausscheidung eines einzelnen Weibchens, die Grenze für ein behandlungswürdiges Tier auch deutlich höher angesetzt werden.

Ein wichtiges Kriterium in Bezug auf die Therapie der vorhandenen Wurmpopulationen ist daher die Differenzierung der einzelnen Gattungen. Hierfür wird Kot benötigt, der mit Wurmeiern belastet ist. Dieser wird dann über einen gewissen Zeitraum und bei bestimmter Temperatur bebrütet, in der sich das Ei bis hin zur L3 entwickeln kann. Das meist verwendete Protokoll schreibt sieben Tage bei 27 ° C vor (Roeber et al. 2013b). Die dabei entstandenen Larven werden danach geerntet und zur Differenzierung unter dem Mikroskop nach ihrer Morphologie beurteilt. Die Entwicklung der verschiedenen Gattungen ist von Temperatur, Feuchtigkeit und vor allem Zeit abhängig. Dieses Verfahren gilt nach wie vor als Goldstandard und ist zwar gut durchführbar aber sehr zeitaufwändig. Die Polymerase Chain Reaction (PCR) stellt durch Analyse der DNA einen neuen Ansatz dar. Dieses Verfahren ist unabhängig vom Entwicklungsstadium des Parasiten (Roeber et al. 2013b). Zur genaueren Quantifizierung von Wurmbelastungen erwies sich die Real Time PCR als vorteilhaft.

2.4. Anthelminthika

Durch die Erfindung der Anthelminthika wurde die Behandlung von Helminthen revolutioniert. Schon in den 1950ern wurden hochwirksame Anthelminthika entwickelt. Im Schnitt wurde alle zehn Jahre ein neues Präparat entwickelt, wobei seit einigen Jahren die Neuentwicklung von Wirkstoffen in der Veterinärmedizin aus wirtschaftlichen Gründen zurückgegangen ist (van Wyk et al. 2006).

Es stehen eine Reihe verschiedener Wirkstoffklassen zur Bekämpfung von Helminthen zur Verfügung (Besier et al. 2016; Papadopoulos 2008), die nachfolgend beschrieben werden.

Benzimidazole

Sie zählen zu den ersten Präparaten, die entwickelt wurden und waren durch die hohe Wirksamkeit und leichte Handhabung sehr beliebt. So finden sich einige unterschiedliche Produkte am Markt, die ein unterschiedliches und großes Spektrum gegenüber Helminthen aufweisen. Die Wirkweise basiert auf zellulärer Ebene indem sie die Polymerisation von

Mikrotubuli hemmen. Dies führt zum Zelltod. Durch weite Verbreitung über ganze Kontinente hinweg, ist eine verminderte Wirksamkeit aufgrund von Resistenzbildungen bekannt. So werden sie häufig nur mehr als Kombinationspräparate als wirksam erachtet (Besier et al. 2016).

Makrozyklische Laktone

Das erste makrozyklische Laktone, das Ivermectin, kam in den 1980ern zum Einsatz. Zu den makrozyklischen Laktone (ML) gehören zwei verschiedene Gruppen, die Avermectine (zu denen auch Ivermectin gehört) und die Milbemycine. Die ML wirken gegen ein großes Parasitenspektrum. Sie erfassen fast alle Nematoden, nicht aber Zestoden und Trematoden, und haben auch eine Wirkung gegen eine Vielzahl von Ektoparasiten (Besier et al. 2016). Der komplette Wirkmechanismus der ML ist nicht vollständig bekannt. Ein wichtiger Wirkmechanismus ist die selektive Bindung an Glutamat-gesteuerten Chloridkanälen, welcher einen Einstrom von Chlorionen und im Falle der Avermectine eine Hyperpolarisation der Nervenzellmembran bewerkstelligt. Die Hyperpolarisation der Nervenzellmembranen entfällt bei den Milbemycinen. Sowohl bei Avermectinen als auch bei Milbemycinen kommt es durch die Hemmung der Reizweiterleitung zur Paralyse und in Folge zum Tod des Parasiten (Besier et al. 2016). Auch in dieser Wirkstoffgruppe ist eine zunehmende Resistenzbildung zu beobachten (Besier et al. 2016).

Salicylsäureanilide

Ein wichtiger Vertreter dieser Wirkstoffgruppe ist das Closantel. Closantel ist nur gegen *Haemonchus*, nicht aber gegen andere MDS wirksam. Zudem wirkt es gegen den großen Leberegel *Fasciola hepatica* und die Ektoparasitengattung *Oestrus*. Der Wirkmechanismus beruht auf der Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, welche zur Hemmung des Energiestoffwechsels führt. Die Wirkung ist besonders bei blutsaugenden Helminthen effektiv und ist durch ihr schmales Spektrum sehr selektiv für die oben genannten Helminthen. Zu Resistenzen von *Haemonchus* gegen Closantel ist wenig bekannt (Besier et al. 2016).

Amino-Acetonitril-Derivate

Monepantel ist der wichtigste Vertreter dieser Wirkstoffgruppe. Das neueste am Markt vertretene Anthelminthikum entfaltet seine Wirkung durch agonistische Wirkung gegenüber des nicotinergen Acetylcholin-Rezeptors und führt damit zur Depolarisation und Paralyse der MDS. Auch hier wurden bereits Resistenzen festgestellt (Besier et al. 2016).

2.5. Anthelminthikaresistenzen

Anthelminthikaresistenz ist die Fähigkeit eines Helminthenstammes, Dosierungen eines Anthelminthikums zu überleben, die sich bei der Mehrzahl der Individuen in einer normal empfindlichen Wirtstierpopulation als letal erweisen würden (Geary et al. 2012). Diese Resistenzen entstehen durch natürliche Genmutationen in einer Wurmpopulation, die dazu führen, dass manche Würmer weniger empfindlich auf Anthelminthika reagieren (Coles 2005). Wenn diese Wurmpopulation dann einem Anthelminthikum ausgesetzt wird, haben die Würmer mit den entsprechenden Mutationen einen Selektionsvorteil gegenüber den empfindlichen Würmern und es kommt zu einer Selektion auf Anthelminthikaresistenzen (AR). Der exzessive Einsatz von Anthelminthika war jahrelang fast die einzige Strategie zur Parasitenbekämpfung (Jackson et al. 2012). Dieser übermäßige Einsatz führte vor allem bei den MDS der kleinen Wiederkäuer zu AR. Bereits in den 1980er Jahren wurde eine verminderte Wirksamkeit der Parasitenpopulationen gegenüber Benzimidazolen entdeckt (Hertzberg und Sager 2006, Jackson et al. 2012). Heute sind in über 40 Ländern Resistenzen von Helminthen wie *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus spp.*, *Teladorsagia circumcincta*, *Fasciola hepatica* and *Nematodirus spp.* gegen ein oder mehrere Wirkstoffgruppen bekannt (Jackson et al. 2012). Vor allem der blutsaugende *H. contortus* ist für seine Resistenzbildung besonders bekannt. Mittlerweile ist nachweisbar, dass bei fast allen Wirkstoffgruppen Resistenzen vorhanden sind, die ungefähr zehn Jahren nach Erstzulassung auftraten. Eine Resistenz einer Helminthenpopulation liegt laut WAAVP dann vor, wenn bei einem Eizahlreduktionstest nach medikamentöser Behandlung die Eizahlreduktion weniger als 95 % beträgt und das unter 95 % Konfidenzniveau unter 90 % liegt (Kotze und Prichard 2016). Das Grundkonzept einer AR-Bildung beruht darauf, dass die resistente Population ein Selektionsvorteil gegenüber der empfindlichen Population erhält. Dies erfolgt durch Maßnahmen, die die Wurmpopulation einem Anthelminthikum aussetzen, wenn die Population der empfindlichen Würmer besonders angreifbar ist. Dies ist insbesondere dann der Fall, wenn sich nur wenige empfindliche Würmer in einem Schutzraum, indem sie nicht von Anthelminthika angreifbar sind (Refugium) befinden (Van Wyk et al. 2006).

Einflüsse wie die Behandlungshäufigkeit zählen zu den wichtigsten um eine AR voranzutreiben. So wurde bei gehäuftem Anthelminthika Einsatz derselben Wirkgruppe eine beschleunigte Resistenzbildung dokumentiert. Zu niedrige Dosierung und langfristiger Einsatz desselben Anthelminthikums tragen ebenso zu selektionresistenten Stämme bei (Papadopoulos 2008). Eine Strategie, die besonders schnell zu einer Resistenzbildung führt, ist die sogenannte „dose and move“- Strategie. Hier werden alle Tiere einer Herde entwurmt

und dann auf eine nicht von Parasiten kontaminierte Weide umgetrieben. Unter diesen Bedingungen überleben fast nur resistente Würmer, was die Entwicklung von AR sehr beschleunigt.

2.6. Resistenzmechanismen

Der Zusammenhang von Benzimidazolen (BZ) und Resistenzentwicklung wurde bereits 1986 von Lacey und Prichard 1986 beschrieben. Bei Benzimidazolen beruht die verminderte Wirkung auf Selektion von Allelen für bestimmte beta-Tubulin-Typen. Auch im Bereich der makrozyklischen Laktone wurden bereits Resistenzen bei *H. contortus* beschrieben – wobei mehrere Mechanismen zur Resistenzlage beitragen könnten.

Blackhall et al. 1998 hat eine Mutation im α -subunit GluCl-Gen für die Resistenz von *H. contortus* beschrieben, wohingegen auch Veränderungen im γ -aminobutyric acid (GABA)-Rezeptor für Resistenzen verantwortlich sein können. In anderen Studien wurde dem P-Glycoprotein-Pumpen auch eine tragende Rolle in der Resistenz gegen *H. contortus* zugeschrieben (Blackhall et al. 1998). Urdaneta-Marquez et al. beschrieb 2014 das Auftreten verschiedener Polymorphismen am Gen von *H. contortus*. Die Identifikation des resistenten Haplotyps, dem Hco-dyf-7(r), der in resistenten Isolaten von *H. contortus* aus verschiedenen geografischen Lokationen vorhanden war, führte zur bedeutenden Weiterentwicklung im Resistenzmonitoring (Urdaneta-Marquez et al. 2014).

2.7. Resistenzdiagnose

Prinzipiell lassen sich Test zur AR-Diagnose in in vivo in vitro und molekularbiologische Tests unterscheiden (Coles et al. 2006).

Im Folgenden wird nur der Eizahlreduktionstest (EZRT), der zu den in vivo-Tests gezählt wird, beschrieben.

Bei der Durchführung werden vor der Behandlung Kotproben entnommen und eine Eizählung mit einem quantitativem Verfahren durchgeführt. Die Höhe der Wurmbelastung wird mit dem EpG (Eier pro Gramm Kot) angegeben. Danach werden die Tiere mit dem genau dosiertem zu testenden Anthelminthikum behandelt. Je nach Protokoll werden nach ca. vierzehn Tagen wiederum Kotproben der entwurmt Tiere entnommen und der EpG wiederum quantitativ erfasst. Aus diesen Werten wird anschließend die Eizahlreduktion berechnet. (Coles 1992; Coles et al. 2006). Der Test hat jedoch einige Schwachstellen vorzuweisen: Allen voran die geringe Sensitivität. So zählen auch die hohen Kosten, die Ungenauigkeit der Zähltechniken und die Variation der Eiproduktion dazu. Er ist trotzdem der Goldstandard zum Nachweis von Resistenzen (Kotze und Prichard 2016). Bei

Vorhandensein von resistenten Eiern kann unter Verwendung von Larvenkulturen ein Rückschluss auf spezifisch beteiligte Nematoden getroffen werden (Papadopoulos 2008).

3. Angaben zum Eigenanteil

3.1. *Versuchsteil*

Hauptversuch: Rektale Kotprobenentnahmen an Tag null und Tag vierzehn in steirischen und Tiroler Betrieben, sowie weitere Kotprobenentnahme auf Betrieb eins für Mini FLOTAC, Tieridentifikation und Probenzuordnung, zusätzlich Beurteilung des FAMACHA Score und BCS, Gewichtsbestimmung und Behandlung der Schafe mit Anthelminthika am Folgetag.

Laborarbeit: Ansatz der gesättigten Flotationslösung, Verarbeitung und Analyse von Einzel- und Sammelkotproben mit Mini-FLOTAC (Eiauszahlungen, EZ), Verarbeitung von Koprokulturen bis zum Schritt der Larvenextraktion.

Datenverarbeitung: Dokumentation der EZ für Einzel- und Sammelkotproben in Excel, Kalkulation der EZRT für Einzel- und Sammelkotproben, Berechnung der Konfidenzintervalle mit Hilfe von eggCounts 2.3 (https://www.math.uzh.ch/as/index.php?id=software_as00)

3.2. *Manuskript*

Mitwirkung in allen Teilen des Manuskripts zu Studie 1.

4. Mitteilung zur Annahme der Arbeit

Das Manuskript wurde am 29. Dezember 2020 bei „Parasite“ eingereicht, am 24. Mai 2021 akzeptiert und am 11. Juni 2021 publiziert. (Anhang 1)

5. Publikation

Parasite 28, 50 (2021)
 © F. Untersweg et al., published by EDP Sciences, 2021
<https://doi.org/10.1051/parasite/2021048>

 **PARASITE**
 Available online at:
www.parasite-journal.org

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

Multispecific resistance of sheep trichostrongylids in Austria

Florian Untersweg^{1,a}, Viktoria Ferner^{1,a}, Sandra Wiedermann¹, Marie Göller¹, Marion Hörl-Rannegger², Waltraud Kaiser³, Anja Joachim¹, Laura Rinaldi⁴, Jürgen Krücken⁵, and Barbara Hinney^{1,5}

¹ Institute of Parasitology, Department of Pathobiology, Vetmeduni Vienna, Veterinärplatz 1, 1210 Vienna, Austria

² Animal Health Service (TGD) Salzburg, 5020 Salzburg, Austria

³ Tierärztliche Praxisgemeinschaft Passail OG, 8162 Passail, Austria

⁴ Laboratory of Parasitology and Parasitic Diseases, Department of Veterinary Medicine and Animal Production, University of Naples Federico II, 80138 Naples, Italy

⁵ Institute for Parasitology and Tropical Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, 14163 Berlin, Germany

Received 29 December 2020, Accepted 24 May 2021, Published online 11 June 2021


Abstract – Anthelmintic overuse and failure to implement methods preventing the development and spread of anthelmintic resistance (AR) have led to an alarming increase of resistant ovine trichostrongylids worldwide. The aim of the present study was to determine whether the routine anthelmintic treatment strategy was effective, to obtain insights into the frequency of AR in trichostrongylids of sheep in Austria, and to determine the presence of different trichostrongylid genera. On 30 sheep farms, the faecal egg count reduction test (FECRT) was performed with the Mini-FLOTAC technique in two consecutive studies. In study 1, only fenbendazole and moxidectin were tested, while different compounds and products were used in study 2. Overall, 33 treatment groups were formed: 11 groups were treated with benzimidazoles (fenbendazole and albendazole), 2 groups with avermectins (ivermectin, doramectin), 18 groups with moxidectin, and two groups with monepantel. Reduced efficacy was detected in 64%, 100%, 28% and 50% of these groups, respectively. The most frequently detected genus in larval cultures was *Haemonchus*, which had been barely detected in Austria previously, followed by *Trichostrongylus*. Multispecific resistance of trichostrongylids in Austria seems to be on the rise and *H. contortus* was detected unexpectedly frequently in comparison to previous studies. There is an urgent need to develop efficient communication strategies aimed at improving the engagement of farmers and veterinarians in sustainable parasite control.

Key words: Nematode, Benzimidazoles, Macrocyclic lactones, Monepantel, Faecal egg count reduction test.

Résumé – Résistance multispécifique des trichostrongylidés des ovins en Autriche. La surutilisation des anthelminthiques et l'échec de la mise en œuvre de méthodes empêchant le développement et la propagation de la résistance aux anthelminthiques (RA) ont conduit à une augmentation alarmante des trichostrongylidés ovins résistants dans le monde. Le but de nos études était de déterminer si la stratégie de traitement anthelminthique de routine était efficace, d'avoir un aperçu de la fréquence de la RA chez les trichostrongylidés des moutons en Autriche et de déterminer la présence de différents genres de trichostrongylidés. Dans 30 élevages ovins, le test de réduction du nombre d'œufs fécaux (FECRT) a été réalisé avec la technique Mini-FLOTAC dans deux études consécutives. Dans l'étude 1, seuls le fenbendazole et la moxidectine ont été testés, tandis que différents composés et produits ont été utilisés dans l'étude 2. Au total, trente-trois groupes de traitement ont été formés, 11 groupes ont été traités avec des benzimidazoles (fenbendazole et albendazole), 2 groupes avec des avermectines (ivermectine, doramectine), 18 groupes avec la moxidectine et deux groupes avec le monepantel. Une efficacité réduite a été détectée dans 64 %, 100 %, 28 % et 50 % de ces groupes, respectivement. Le genre le plus fréquemment détecté dans les cultures larvaires était *Haemonchus*, qui avait été rarement détecté en Autriche auparavant, suivi de *Trichostrongylus*. La résistance multispécifique des trichostrongylidés en Autriche semble augmenter et *H. contortus* a été détecté fréquemment, de manière inattendue par rapport aux études précédentes. Il est urgent de développer des stratégies de communication efficaces visant à améliorer l'engagement des éleveurs et des vétérinaires dans le contrôle durable des parasites.

*Corresponding author: Barbara.hinney@vetmeduni.ac.at

^aThese authors contributed equally to this work.

COMBRAR  **Special Issue – Combatting Anthelmintic resistance in ruminants**
 Invited Editors: Johannes Charlier, Hervé Hoste, and Smaragda Sotiraki

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Trichostrongyloidea in small ruminants can severely impair animal health and productivity [3]. Common signs of trichostrongylid infections are poor weight gain, weight loss, reduced wool and milk production, diarrhoea, weakness, and ill thrift [8, 25, 29]. Severe cases can result in sudden death, especially after infections with the blood feeding *Haemonchus contortus* [2]. Recently, the annual costs of helminth infection in ruminants in Europe was estimated at €1.8 billion (€29 million in Austria) [3]. The control of gastrointestinal nematode (GIN) infections can be roughly categorised into pharmaceutical and non-pharmaceutical approaches (e.g. grazing systems, use of bioactive compounds, etc.) [30]. Modern anthelmintics were initially highly efficacious, so that treatment strategies in the past decades often relied heavily on the use of drugs in suppressive treatment approaches [34, 38]. However, these strategies resulted in selection for anthelmintic resistance (AR) [38]. The use of ineffective anthelmintics in the EU has been estimated to contribute to the cost of GIN infections to an extent of €38 million annually (€0.6 million in Austria) [3]. In order to slow down the development of AR, more sustainable treatment strategies have been designed [30]. A key pillar of sustainable treatment approaches is the regular monitoring of anthelmintic efficacy [17, 30]. Among the tests to check for AR, the faecal egg count reduction test (FECRT) is the method most broadly applied. It has the advantage of being applicable to all anthelmintic drugs available, but has the disadvantage of low sensitivity [4, 5, 20]. Furthermore, there are different views on how to standardise this test. The latest guideline of the World Association for the Advancement of Parasitology (WAAVP) for this method was published in 2006, and a new guideline is to be published soon [17]. *In vitro* methods have been developed but are less widely employed. A major challenge is the standardisation of these techniques, especially for mixed species samples from the field [5, 9]. In addition, molecular techniques are available for the detection of BZ resistance alleles [5, 23]. A recent meta-analysis of AR in Europe demonstrated that AR is widespread, but that there are also clear data gaps [27]. For research on small ruminants in Austria, more reliable estimates of the prevalence of AR are considered to be beneficial [27]. The analysis also revealed that comparability between studies is difficult due to non-standardisation of test methods and non-representative sampling, while it was acknowledged that representative sampling is often impossible or impractical [27].

Recently, a very high frequency of BZ-resistance alleles in *Haemonchus* spp. and *Trichostrongylus* spp. was detected in Styria, south-eastern Austria, indicating that this drug class was no longer efficient on any of the sampled farms [16]. The occurrence of moxidectin (MOX)-resistance was also suggested [28].

The aim of our study was to obtain updated information on the occurrence of AR in different trichostrongylid species that infect sheep in Austria by performing FECRT and larval cultures. To achieve this, two studies were performed in different federal states of Austria. In the first study, only two anthelmintic compounds (the BZ fenbendazole (FBZ) and/or the macrocyclic lactone MOX) were used. For study 1, we hypothesised that a high level of BZ-resistance is present and

that MOX-resistance can be observed on Austrian farms. In the second study, a wider variety of compounds and products were applied so that all anthelmintic groups that were available for sheep in Austria were tested. For study 2, we hypothesised that routine treatments on Austrian farms are often not effective.

Materials and methods

In the period from autumn 2018 to autumn 2020, 32 farms were examined and FECRTs for the detection of AR of various compounds were performed on 30 of these farms in two studies.

In study 1, FBZ and MOX were applied. FBZ was chosen to gather up to date information on the phenotype of BZ-resistance in Austria in order to complement recent findings that were only focused on the genotype of BZ-resistance [16]. Special attention was also paid to MOX, as it was proposed to still be efficacious when moderate resistance against other macrocyclic lactones (ML) is already present [22]. Thus, by focusing on the efficacy of this compound, we aimed to get a better impression of the overall progression of ML resistance in Austria.

In study 2, different factors required a change of study design: (1) the goal was to observe the efficacy of compounds applied in routine treatments. Therefore, we did not suggest a certain product. (2) Motivation of veterinarians and farmers to participate in our study was increased when they had a free choice to decide which anthelmintic compound was used. (3) Difficulties were encountered with the design of study one (initially planned as a randomised approach including control groups). Thus, the second study followed a more naturalistic (field-based) approach where the decision on compounds was not influenced by the investigators but only made by the attending veterinarian and the farmer. Besides BZ, ML (MOX, ivermectin (IVM), doramectin (DOR)) and the rather new compound monepantel (MON) were applied.

Farms and animals

All of the farms examined had pasture access. A further prerequisite for participation was that no deworming was performed for at least three months before sampling. Animals over the age of 6 months were included. Sheep were kept for wool production, landscape conservation, breeding, and meat production. A combination of all of these purposes was often present on farms.

All farms from study 1 were organised in the same network for the breeding of Tyrolian mountain sheep, and selection was based on the interest of the farmers in participating, which was partly driven by experience of treatment failure on these farms.

In study 2, the majority of farms were consulted by the animal health service of Salzburg. An information mail about anthelmintic resistance was sent out by the animal health service encouraging farms to participate, and as many farms as possible were included. Selection was partly based on the practicability of visiting these farms and on the interest of the attending veterinarians. Additional farms not organised in

Table 1. Farms and animals included in both studies as well as further details on study design.

	Study 1	Study 2
Time period of first examination	September–October 2018	Nov. – Dec. 2019 except #31 (Feb. 2020) and #32 + #33 (Sept. – Oct. 2020)
Min./max. number of animals examined/farm	10–70	10–40
Number farms/animals examined	13/500	19/375
Breed	Tyrolian mountain sheep	Various sheep breeds
Number farms/animals included in FECRT	11/126	19/263
Threshold EPG for inclusion in FECRT	≥100	≥50
Number of animals with EPG ≥ 200	93 (73%)	168 (63.9%)
Treatment decision by	Institute of Parasitology in consultation with attending veterinarian and farmer	Attending veterinarian and farmers
Treatment and sampling performed by	A project team member (FU)	The attending veterinarian, a project team member (VF, MHR or WK) or the farmer during the presence of a project team member (VF, MHR or WK).
Drug provided by	Institute of Parasitology, Vetmeduni Vienna	Attending veterinarian
Anthelmintic compounds used	MOX (Cydectin [®] , Elanco) 0.2 mg/kg BW and/or Fenbendazole (FBZ) (Panacur [®] Suspension 2.5%, MSD) 5 mg/kg BW	Different compounds and formulations of the groups of BZs; MLs as well as MON (see Table 3)
Farms not visited but samples sent in. Sampling and treatment performed by attending veterinarian	–	N = 6 (#26, 27, 32, 31, 33)

the animal health service also participated, since they had observed treatment failures in their flocks. They were not visited, but samples were submitted by the attending veterinarians according to instructions. The main differences between the studies as well as further information on the study design are shown in Table 1.

Faecal egg count reduction test

In study 1, faeces were collected rectally and individual samples were examined on the same day by Mini-FLOTAC [7], with a detection limit of 5 eggs per gram (EPG) of faeces, using a sodium chloride flotation solution (FS2, specific gravity = 1.200).

Based on the result of the egg counts, animals were allocated to treatment groups (Tables 1 and 2).

Due to small flock sizes and/or low egg excretion levels, only eight groups included 10 or more animals each, while in four groups fewer animals were included (Table 2). Pregnant ewes were excluded from the FBZ groups. Faeces were examined on the day of sampling and animals were treated one day after faecal examination. Before treatment, the applicators were calibrated, and the animals were weighed on a portable scale (Soehnle Professional 2755, Soehnle Industrial Solutions GmbH, Backnang, Germany) to allow for body mass-based treatment. On farm 12, two compounds were applied and animals were allocated to the groups by random numbers. On day 14 after treatment, faecal samples were collected and individual egg counts were again obtained with Mini-FLOTAC with the same protocol as used before.

In study 2, no intervention in the treatment decision of the responsible veterinarian was made. However, treatment and

sampling were supervised by a team member or an expert (Table 1). Attention was paid to the fact that no expired drugs were used. Animals were weighed to ensure that they received the correct dose of the drug, irrespective of the routine practices on the farms. This was either done with a portable scale or on scales provided on the farms. Only on farms 31 and 32 was the weight of animals estimated by the veterinarian and the dosage of the anthelmintic compound was adjusted to a slightly higher weight than estimated. The prescribed anthelmintic drug was applied to all animals (Tables 1 and 3) immediately after faecal sampling and body weight determination/estimation. The faeces of animals included in the FECRT (Tables 1 and 3) were examined within three days after sampling. Until examination, the samples were vacuum packed [24] and stored below room temperature to prevent egg development.

Larval culture and larval differentiation

Before treatment, all samples positive for strongyle eggs from one farm were pooled for larval culture. After treatment, the positive samples of each farm were pooled per treatment group. Faeces were mixed with water and vermiculite and incubated at 25 °C for 13 days. On day 14, the third-stage larvae were harvested and identified (≈100 larvae per coproculture) using the identification key developed by van Wyk et al. [36].

Statistical analysis

For calculation of the FECR and corresponding credibility intervals, the web interface (https://www.math.uzh.ch/as/index.php?id=software_as00) based on the R package eggCounts 2.3 was used [31, 39]. “eggCounts” uses a hierarchical

Table 2. Data about sheep farms included in study 1, anthelmintic drug applied, and number of animals included in the respective group (FBZ = fenbendazole; MOX = moxidectin); result of the FECRT. Classification: R = resistant; SR = suspected resistance; S = susceptible. Status in square brackets = number of animals in treatment group < 10. EZR = egg count reduction.

Farm #	Region/lowland or alpine pasture/frequency of deworming/contact with goats	Group/no. of animals included	Mean EPG value before/after treatment	EZR paired with individual efficacy (95% CI)	EZR paired (95% CI)	Status
1	Tyrol/alpine/2–4/yes	FBZ/12	620/62	95 (87–99)	90 (88–92)	SR
2	Tyrol/alpine/2–3/yes	MOX/7	605/11	98 (87–100)	98 (97–99)	[SR]
3	Tyrol/alpine/2–4/yes	MOX/12	385/114	79 (53–97)	70 (66–74)	R
4	Tyrol/alpine-fenced field/3–4/yes	MOX/12	1147/41	96 (87–99)	96 (96–97)	SR
5	Tyrol/alpine/2–3/no	FBZ/9	302/14	96 (92–98)	95 (93–97)	[S]
6	Tyrol/alpine/2–3/no	MOX/9	419/8	97 (87–100)	98 (97–99)	[SR]
7	Tyrol/alpine/2–3/no	MOX/10	306/3	99 (97–100)	99 (98–100)	S
9	Tyrol/alpine/2–3/yes	MOX/11	359/1	100 (99–100)	100 (99–100)	S
10	Styria/lowland/2–3/no	MOX/10	568/12	98 (92–100)	98 (97–99)	S
12	Styria/lowland/2–3/yes	FBZ/13	874/456	48 (23–66)	48 (44–51)	R
		MOX/13	1088/241	84 (61–96)	78 (76–80)	R
13	Tyrol/alpine/2–3/yes	MOX/8	308/2	99 (98–100)	99 (98–100)	[S]

Bayesian model to cover the different levels of variation in egg count data. These include: (i) a binomial distribution of EPGs to cover differences between true EPG and observed EPG due to dilution and counting before and after treatment; (ii) a Poisson model to model true EPGs, which covers random distribution of eggs in the faecal sample; (iii) a gamma distribution to model overdispersed egg shading intensity between animals both before and after treatment; (iv) individual treatment efficacies for each animal based on a random effect model with treatment efficacies following another gamma distribution. Calculations were carried out using pre- and post-treatment egg counts with the standard “two sampled paired” (without allowing individual treatment efficacies) and “two samples paired with individual efficacy” parameters. No zero-inflated distributions were considered since only positive animals were included in the FECRT. The final interpretation of efficacy was based on “two samples paired with individual efficacy”. eggCounts uses a Bayesian approach and Markov chain Monte Carlo sampling to estimate model parameters from the data. The estimate for the FECR is the mode of the posterior FECR distribution, the 95% credibility limits from the 2.5% and 97.5% quantiles of the distribution [39].

Definition of AR was based on Coles et al. [4], where resistance is considered to be present when egg count reduction is less than 95% and the lower CL is less than 90%, and suspected resistance (SR) is present when only one of the two criteria is observed. The difference between the two calculation standards of eggCounts was further analysed (Supplementary Files).

Testing for significance between groups was carried out by applying the Mid-P exact test provided by OpenEpi (<https://www.openepi.com>). The difference was considered significant at $p < 0.05$.

Results

Faecal egg count reduction test

In study 1, BZ resistance, suspected resistance and susceptibility were detected on one farm each. However, on the farm

with susceptibility, only nine animals were examined (Table 2). MOX resistance was detected on two, suspected resistance on three, and susceptibility on four farms. Amongst the groups with susceptibility and suspected resistance, three consisted of <10 animals (Table 2).

In study 2, BZ resistance was observed on six farms (of which in three <10 animals were examined) and susceptibility on two farms. MOX resistance was observed on two farms and susceptibility on six farms, of which in one <10 animals were examined. On both farms where IVM or DOR were tested, resistance was present (Table 3). Monepantel resistance and susceptibility were detected on one farm each (Table 3).

Larval differentiation

For unidentified reasons, the larval cultures did not yield sufficient larvae in all cases. In study 1, for eight farms, sufficient ($n = 100$) larvae could be harvested for larval differentiation before treatment. On five of these, *Haemonchus* spp. larvae were predominant, and on three *Trichostrongylus* larvae were determined in the same or larger numbers (Fig. 1). Other genera (*Chabertia*, *Oesophagostomum*, *Cooperia*, *Teladorsagia*) occurred very rarely and only at low frequency. From five farms and in seven groups, more than 100 larvae post treatment were harvested. Post treatment, the relative frequency of *Haemonchus* spp. increased in all MOX treatment groups (significantly on farms #3, #7 and #12; $p < 0.001$) and in the FBZ treatment group of farm #12 ($p < 0.001$).

In study 2, larval cultures only yielded sufficient larvae for seven farms before treatment and three farms post treatment (Fig. 2). Before treatment, on two farms *Trichostrongylus* was predominant, on two *Haemonchus*, on one farm *Cooperia*, and on farm #18 four genera with no clear dominance were counted. Post treatment on farm #15 the predominance of *Cooperia* significantly increased from 57% to 76% after treatment with FBZ. On farm #33, where almost only *Haemonchus* (99%) was detected before treatment, 36% *Cooperia* were counted after treatment (this difference was significant; $p < 0.001$). On farm #27 after treatment with BZ,

Table 3. Data about sheep farms included in study 2; anthelmintic drug applied and number of animals included in the respective group (FBZ = fenbendazole; ABZ = albendazole; IVM = ivermectin; DOR = doramectin; MOX = moxidectin; MON = monepantel) and result of the FECRT. Dosage applied: * \approx 5 mgFBZ/kg BW; ** \approx 5 mgABZ/kg BW; *** \approx 3.8 mg ABZ/kg BW; + \approx 0.2 mg IVM/kg BW; ++ \approx 0.2 mg MOX/kg BW; ND = no data. Region: SZB: Salzburg, LA: Lower Austria. Classification: R = resistant; SR = suspected resistance; S = susceptible. Status in square brackets = number of animals in treatment group < 10. EZR = egg count reduction.

Farm #	Region/lowland or alpine pasture/frequency of deworming/contact with goats	Group/no. of animals included	Compound/dosage	Mean EPG value before/after treatment	EZR paired with individual efficacy (95% CI)	EZR paired (95% CI)	Status
14	SZB/lowland/2/yes	FBZ/5	*Panacur [®] 250 mg tablets/0.5 tablet/25 kg*	1764/399	69 (35–98)	77 (75–80)	[R]
15	SZB/alpine/2/ND	FBZ/9	*Panacur [®] 250 mg/bolus; 1 bolus/50 kg i.r.	1665/1856	57 (30–90)	0 (0–2)	[R]
16	SZB/alpine/2/ND	ABZ/13	**Albendazole 10% Suspension aniMedica/0.5 mL/10 kg	105/0	100 (99–100)	100 (99–100)	S
17	SZB/lowland/3–4/ND	ABZ/6	**Albendazole 10% Suspension aniMedica/0.5 mL/10 kg	514/255	52 (25–87)	50 (44–57)	[R]
18	SZB/lowland/2–3/yes	ABZ/16	***Valbazen [®] 1.9%/1 mL/5 kg	1186/186	89 (83–94)	84 (83–86)	R
19	SZB/alpine/1–3/ND	ABZ/17	**Albendazole 10% Suspension aniMedica/0.5 mL/10 kg	579/372	61 (40–77)	36 (31–40)	R
20	SZB/lowland/2/ND	MOX/16	**Cydectin [®] /1 mL/5 kg p.o.	215/0	100 (100–100)	100 (100–100)	S
21	SZB/alpine/depending on fecal examination/ND	IVM/13	*Noromectin [®] /0.5 mL/25 kg	888/455	53 (30–79)	49 (45–52)	R
21		MOX/11	**Cydectin [®] /1 mL/5 kg p.o.	424/67	86 (62–98)	84 (81–87)	R
22	SZB/lowland/2/ND	MOX/12	**Cydectin [®] /1 mL/5 kg p.o.*	1813/43	99 (92–100)	98 (97–98)	S
23	SZB/lowland/3–4/ND	MOX/19	**Cydectin [®] /1 mL/5 kg p.o.	471/3	100 (100–100)	99 (99–100)	S
24	SZB/lowland/2/ND	MOX/11	**Cydectin [®] /1 mL/5 kg p.o.	326/6	100 (97–100)	98 (97–99)	S
25	SZB/alpine/1–3/ND	MOX/13	**Cydectin [®] /1 mL/5 kg p.o.	1897/4	100 (100–100)	100 (100–100)	S
26	LA/lowland/ND/ND	MOX/15	**Cydectin [®] /1 mL/5 kg p.o.	1241/1	100 (100–100)	100 (100–100)	S
27	LA/lowland/ND/ND	ABZ/10	**Albendazol 10% Suspension aniMedica/0.5 mL/10 kg	1419/70	97 (93–99)	95 (94–96)	S
28	SZB/lowland/1/ND	MOX/7	**Cydectin [®] /1 mL/5 kg p.o.	296/0	100 (99–100)	100 (99–100)	[S]
28		MON/15	+++Zolvix [®] /2.5 mg/kg p.o.	728/0	100 (100–100)	100 (100–100)	S
29	SZB/lowland/2/yes	MON/11	+++Zolvix [®] /2.5 mg/kg p.o.	818/383	87 (59–99)	53 (49–57)	R
31	SZB/ND/ND	ABZ/18	**Albendazole 10% Suspension aniMedica/0.5 mL/10 kg	440/124	79 (63–91)	72 (69–75)	R
32	LA/lowland/2/ND	MOX/12	**Cydectin [®] /1 mL/5 kg p.o.	1820/428	89 (66–99)	77 (75–78)	R
33	Styria/lowland/2/yes	DOR/14	Dectomax [®] /0.2 mg/kg i.m.	1190/140	92 (77–99)	88 (87–89)	R

Trichostrongylus was predominant with 84% (no pre-treatment data were available). Additional results from cultures with less than 100 larvae counted are shown in Figure 2.

Discussion

Anthelmintic resistance on the farms examined

Reduced efficacy of all anthelmintics available for sheep in Austria was observed in our studies. We were able to provide the first description of MON resistance and the first clear evidence of MOX resistance in Austria. MOX resistance was previously suspected for one farm [28] but could not be confirmed so far.

It cannot be estimated how fast these resistances have developed in Austrian nematode populations and what the actual prevalence of AR is, since there is a lack of previously generated representative data on AR in Austria and these were also not provided within this study. There have hardly been any systematic studies performed which would allow to draw such

conclusions in other European countries either [27]. However, for reliable estimates a longer-term approach of this kind would be necessary. This can be seen in Norway, where a representative sampling yielded results that differed substantially from data generated by convenience sampling [11]. In addition, in both of our studies, convenience samples were taken. Thus, the non-representative sampling with voluntary participation probably resulted in a selection bias with an overrepresentation of farms that had already experienced treatment failure, or farms that were especially interested in sustainable parasite control and thus have management strategies that are not representative for Austria. Furthermore, the aims and study design of both studies presented here differed so that the degree of comparability of the two studies is low. For example, only two compounds provided by us were tested in study 1, while in study 2, six different compounds and seven products provided by the attending veterinarian were used. Nonetheless, the procedure of the FECRT itself was very similar (e.g. application of the drug through or under supervision of a team member or expert after the weighing of animals, the use of Mini-FLOTAC on

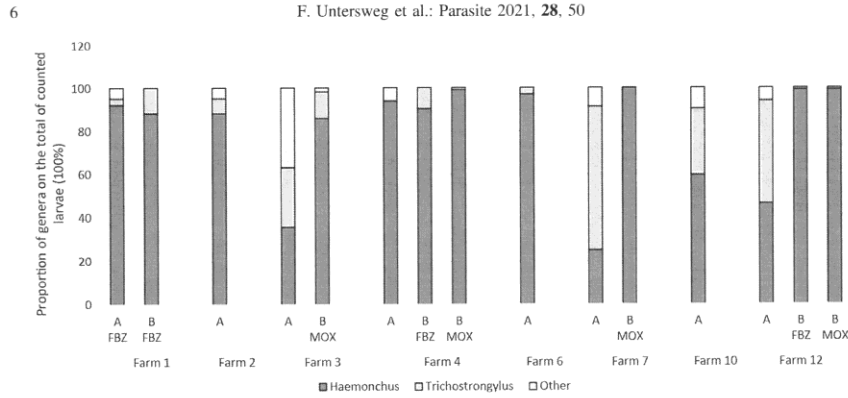


Figure 1. Results of larval differentiation in study 1 shown as proportions of different genera. Each column represents 100% of counted larvae. A = before treatment (pooled samples of whole farm), B = after treatment (pooled samples of the respective treatment group). Other = *Teladorsagia*, *Chabertia*, *Oesophagostomum*.

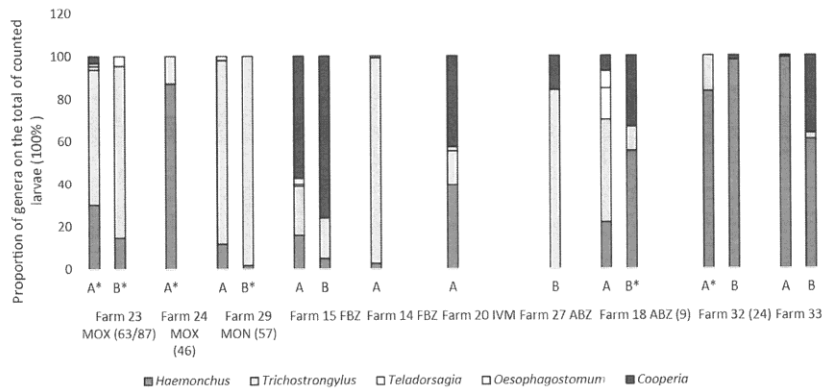


Figure 2. Results of larval differentiation in study 2 shown as proportion of different genera. Each column represents 100% of counted larvae. A = before treatment (pooled samples of whole farm), B = after treatment (pooled samples of the respective treatment group). If less than 100 larvae were differentiated, this is marked by an asterisk, and number of larvae that were differentiated is given in brackets.

individual samples and the use of two standards of eggCounts for the calculation of FECR). Thus, although the non-representative sampling and different study design does not allow a comparison of the two studies, for simplification we combine observations of both studies to form a general picture of AR in Austria in the following discussion.

Benzimidazole resistance in Austria was already described in 1996 [15], and this matches the observation of increasing BZ resistance worldwide for almost four decades [6]. It also

matches our previous observation of high levels of BZ-resistance alleles in Austria [16]. These observations notwithstanding, susceptibility to BZ was observed on three farms. The frequency of BZ resistance of 64% in our study is comparable to the observations of most Central and some Southern European studies, while especially Italy and Spain showed a considerably lower prevalence. Northern and Eastern European countries also tend to have lower frequencies of BZ resistance [27].

We only tested one sheep farm each for efficacy of IVM and DOR, and in both cases resistance was detected. However, this does not allow us to draw generalised conclusions about the efficacy of these drugs on Austrian sheep farms nor to compare it with European studies where up to 50% of farms were observed to show ML resistance [27]. It is currently assumed that MOX shows a certain degree of cross-resistance with other MLs, but that it might still be efficacious on some farms where ML resistance has already appeared [22]. Although resistance to MOX might develop rather slowly [22], it appears to already be quite progressed in Austria, since the drug was introduced in 1998, as 24% of the tested farms showed a resistant nematode phenotype. Only a few European studies have investigated MOX on a larger number of farms. The frequency of MOX resistance was slightly higher in the UK and the Netherlands (37% and 34%) and comparable in Germany (19%), while no MOX resistance was described in Italy [27]. In contrast to MOX, MON resistance seems to develop rather rapidly [32]. In line with this (and despite the fact that MON was introduced in Austria only in 2010), we already observed MON resistance in one of the two tested sheep farms. This seems highly alarming as AR against all registered compounds available in Austria was thus observed (levamisole is not on the market at present). MON resistance in European countries has also already been observed in Belgium, the Netherlands, Switzerland, and the UK [27].

To conclude, all of the hypotheses made for study 1 and 2 were supported by our findings: high frequencies of BZ resistance, the presence of MOX resistance and ineffective routine treatments in the field. The latter might be partly based on the fact that farmers preferred to use cheaper compounds, with BZs frequently applied. Obviously, veterinarians and farmers were not aware of the high frequency of AR in BZ drugs. However, AR also occurred on farms where the more expensive compounds MOX and MON were used. We did not document management factors in detail, but as whole flock treatments and dose-and-move strategies were common practice on the investigated farms, probably most veterinarians and farmers had not been informed about sustainable control methods. Consequently, methods were applied that led to a strong selection for AR. Thus, it will be necessary to develop effective communication channels so that sustainable control strategies will be readily adopted by farmers and veterinarians [35, 37].

Composition of trichostrongylid species as detected by larval culture

Haemonchus and *Trichostrongylus* were the most frequently detected genera in this study. While *Haemonchus* spp. were amongst the most frequently counted larvae in study 1 (Styria and Tyrol), on five farms in study 2 (mostly in Salzburg), *Trichostrongylus* larvae predominated. It is important to note that the eggs shed by a species do not directly correlate with the number of individuals in the host. *Haemonchus* spp. in particular are more fecund than most other trichostrongylid species [14]. Another factor involved in fecundity is the host itself, since immunity, health and genetics can strongly influence the number of eggs shed by intestinal worms [26]. In addition, samples in which *Trichostrongylus* dominated

were collected in November/December, whereas those samples in which *Haemonchus* was present were mostly collected in September and October. The mean temperatures in Austria in September and October 2018 were 14.2 °C and 9.9 °C, respectively, while they dropped to 3.9 °C and 0.7 °C in November and December 2019 (Central Institute for Meteorology and Geodynamics (ZAMG); <https://www.zamg.ac.at>). Thus, the temperature-sensitive *Haemonchus* had probably already started to enter hypobiosis at the later sampling. It therefore cannot be concluded that *Haemonchus* occurs more often in Styria and Tyrol and less often in Salzburg. Additionally, this as well as previous studies in Austria did not generate geographically representative data, as convenience samples were examined. Similar reasons prevent us from concluding with certainty that the prevalence of *Haemonchus* and *Trichostrongylus* in Austria has increased in recent years. In general, *Haemonchus* was considered to be of no relevance for alpine regions in the past [12]. This is clearly not the case anymore, as *Haemonchus* occurred on all examined farms in the present study, independently of the pasturing type. The spatial distribution of *Haemonchus* is dependent on many factors, amongst them temperature, with a clear preference for a warm climate [21]. Climate change might lead to a shift in the composition of pasture-borne worm populations in livestock and might have led to a higher prevalence of *H. contortus* in regions where this species was previously underrepresented [33]. In 1977, *Haemonchus contortus* was hardly detected in sheep from Austria [13]. Since 1880, average temperatures in Austria have increased by about 2 °C [1]. Indeed, the mean temperature in Austria throughout the 1970s was 1.73 °C lower than throughout the 2010s (6.17 °C vs. 7.9 °C (ZAMG <https://www.zamg.ac.at>)). However, we assume that the development of AR is also a strong factor for the unexpectedly high prevalence of *Haemonchus* (and *Trichostrongylus*) in our study, as they were clearly the genera that dominated post treatment. Through its high fecundity and high genetic diversity, *Haemonchus* has the ability to develop AR particularly quickly [18]. Interestingly, in a recent study, we found few BZ-resistance alleles in *Teladorsagia* from Austria, while they occurred in high frequencies in *Haemonchus* and *Trichostrongylus* [16]. These observations match the results of a low *Teladorsagia* prevalence in the present study.

Faecal egg count reduction test

The FECRT has the advantage of being a universally applicable test for detecting AR, but has the disadvantage of low sensitivity. Its comparability is limited by the fact that there are several ways to perform the test and interpret the results [17], although guidelines exist [5]. The present study deviated from the WAAVP guidelines, mainly due to the fact that farm sizes were too small and not enough animals reached a sufficient EPG, and consequently not all treatment groups had at least 10 animals. Also, one third of individuals included did not meet the WAAVP-requirements of an EPG of 200 [5]. However, we performed the Mini-FLOTAC technique with a detection limit of 5 EPG and thus achieved higher analytic sensitivity and accuracy than the McMaster technique, which was recommended in the WAAVP-guideline [4]. Tests with

higher accuracy might make it possible to obtain valid data even when animal numbers and/or egg counts are low [19]. It has been indicated that new WAAVP guidelines will even accept a raw egg count of 200 per treatment group [17], and this requirement was met in all of our groups. On farms with low animal numbers, instead of performing FECRT, molecular tests like resistance allele-analysis or laboratory tests like the egg hatch test might be better alternatives for detecting AR against BZ. However, for ML or MON, technically more complicated tests such as the larval development test are required. Clustering small farms that are from the same region and that are grazing the same pasture for a FECRT (e.g. in transhumance systems) might be another possibility to deal with the problem of low animal numbers on individual farms. The use of composite and repeated samplings for small farms should also be considered. Including a control group in the FECRT is the current recommendation of the WAAVP guidelines. Although we tried to include control groups in study 1, they ultimately could not be used for FEC calculation. Interestingly, some authors even observed that omitting the control group renders more reliable results [10]. Various methods have been proposed to calculate the percentage of egg reduction on farms. We used two standards of eggCounts for the calculation of FECR. They differed clearly when variability within a farm was high (Supplementary Files) and as the standard with individual efficacy is considered to give a more precise estimate of FECR, this might be the preferred standard to apply [39]. As protocols and methods for the detection of AR vary considerably and are hardly standardised, Working Group 1 of the COST action COMBAR (<https://www.combar-ca.eu/>) recently harmonised the current protocols for the diagnosis of AR, which will allow for better comparability of test results (https://www.combar-ca.eu/sites/default/files/FECRT_PROTOCOL_sheep_goats_March%202021.pdf).

Conclusion

Multispecific resistance of trichostrongylids has been detected on Austrian sheep farms. The most abundant and resistant genera were *Haemonchus* and *Trichostrongylus*. Best practice advice that can be easily implemented should thus be communicated to practitioners and farmers as soon as possible. We also wish to point out that monitoring drug efficacy on small farms (<40 animals) is important for obtaining an informative picture of AR in countries where most farms are small. Guidelines that consider different farm sizes would help to comprehensively monitor anthelmintic efficacy worldwide.

Supplementary material

Supplementary material is available at <https://www.parasite-journal.org/10.1051/parasite/2021048/olm>

Supplementary Data. Comparison of different standards of eggCounts 2.3.

Supplementary Figure 1. Scatter plot of the coefficient of variation of individual egg count reduction on farms (CV FECR_i) plotted against the difference between the two

calculation standards of eggCounts ($|\Delta\text{FECR}|$ -categories). Categorisation: 1 = $\Delta 0$; 2 = $\Delta 1-5$; 3 = $\Delta 6-10$; 4 = $\Delta > 10$.

Acknowledgements. This study is based upon work from COST Action COMBAR CA16230, supported by COST (European Cooperation in Science and Technology). We wish to thank the animal health service Salzburg for help in recruiting farms, as well as for the financial support of study 2.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare. MHR was employed at the animal health service Salzburg.

Ethics approval and consent to participate

This investigation was discussed and approved by the institutional ethics and animal welfare committee of the Vetmeduni, Vienna in accordance with good scientific practice guidelines and national legislation (ETK-07/08/2018; study 1, ETK-185/11/2019; study 2). Written consent was obtained from all animal owners.

The number of farms with AR detected in study 1 was already included in a recent meta-analysis [27].

References

1. Austrian Panel on Climate Change (APCC). 2014. Austrian Assessment Report Climate Change 2014 (AAR14).
2. Besier RB, Kahn LP, Sargison ND, van Wyk JA. 2016. Diagnosis, treatment and management of *Haemonchus contortus* in small ruminants. *Advances in Parasitology*, 93, 181–238.
3. Charlier J, Rinaldi L, Musella V, Ploeger HW, Chartier C, Vineer HR, Hinney B, von Samson-Himmelstjerna G, Băcescu B, Mickiewicz M, Mateus TL, Martínez-Valladares M, Quealy S, Azaizeh H, Sekovska B, Akkari H, Petkevicius S, Hektoen L, Höglund J, Morgan ER, Bartley DJ, Claerebout E. 2020. Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, 182, 105103.
4. Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, Waller PJ. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44, 35–44.
5. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor MA, Vercruyse J. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136, 167–185.
6. Conway DP. 1964. Variance in the effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. *American Journal of Veterinary Research*, 25, 844–846.
7. Cringoli G, Maurelli MP, Leveck B, Bosco A, Vercruyse J, Utzinger J, Rinaldi L. 2017. The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nature Protocols*, 12, 1723–1732.
8. Cringoli G, Veneziano V, Pennacchio S, Mezzino L, Santaniello M, Schioppi M, Fedele V, Rinaldi L. 2007. Economic efficacy of anthelmintic treatments in dairy sheep naturally infected by gastrointestinal strongyles. *Parassitologia*, 49, 201–207.

9. Demeler J, Küttler U, von Samson-Himmelstjerna G. 2010. Adaptation and evaluation of three different in vitro tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. *Veterinary Parasitology*, 170, 61–70.
10. Dobson RJ, Hosking BC, Jacobson CL, Cotter JL, Besier RB, Stein PA, Reid SA. 2012. Preserving new anthelmintics: a simple method for estimating faecal egg count reduction test (FECRT) confidence limits when efficacy and/or nematode aggregation is high. *Veterinary Parasitology*, 186, 79–92.
11. Domke AVM, Chartier C, Gjerde B, Höglund J, Leine N, Vatn S, Stuen S. 2012. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats in Norway. *Parasitology Research*, 111, 185–193.
12. Eckert J, Hertzberg H. 1994. Parasite control in transhumant situations. *Veterinary Parasitology*, 54, 103–125.
13. El-Moukdad AR. 1977. Untersuchungen über die Endo-Parasiten der Schafe in Österreich (Studies on endoparasites of sheep in Austria). *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*, 64, 283–288.
14. Emery DL, Hunt PW, Le Jambre LF. 2016. *Haemonchus contortus*: the then and now, and where to from here? *International Journal for Parasitology*, 46, 755–769.
15. Hertzberg H, Bauer C. 2000. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in sheep and goats: new data on prevalence, epidemiology, preventive measures and alternatives to anthelmintic drugs. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 113, 122–128.
16. Hinney B, Schoiswohl J, Melville L, Ameen VJ, Wille-Piazzai W, Bauer K, Joachim A, Krücken J, Skuce PJ, Krametter-Frötscher R. 2020. High frequency of benzimidazole resistance alleles in trichostrongyloids from Austrian sheep flocks in an alpine transhumance management system. *BMC Veterinary Research*, 16, 132.
17. Kaplan RM. 2020. Biology, epidemiology, diagnosis, and management of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of livestock. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 36, 17–30.
18. Kotze AC, Prichard RK. 2016. Anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus*: history, mechanisms and diagnosis. *Advances in Parasitology*, 93, 397–428.
19. Leveck B, Rinaldi L, Charlier J, Maurelli MP, Morgoglione ME, Vercurysse J, Cringoli G. 2011. Monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes when faecal egg counts are low: do the analytic sensitivity and the formula matter? *Parasitology Research*, 109, 953–957.
20. Martin PJ, Anderson N, Jarrett RG. 1989. Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. *Australian Veterinary Journal*, 66, 236–240.
21. Musella V, Catelan D, Rinaldi L, Lagazio C, Cringoli G, Biggeri A. 2011. Covariate selection in multivariate spatial analysis of ovine parasitic infection. *Preventive Veterinary Medicine*, 99, 69–77.
22. Prichard RK, Geary TG. 2019. Perspectives on the utility of moxidectin for the control of parasitic nematodes in the face of developing anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 10, 69–83.
23. Raminke S, Melville L, Rinaldi L, Hertzberg H, de Waal T, von Samson-Himmelstjerna G, Cringoli G, Mavrot F, Skuce P, Krücken J, Demeler J. 2016. Benzimidazole resistance survey for *Haemonchus*, *Teladorsagia* and *Trichostrongylus* in three European countries using pyrosequencing including the development of new assays for *Trichostrongylus*. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 6, 230–240.
24. Rinaldi L, Coles GC, Maurelli MP, Musella V, Cringoli G. 2011. Calibration and diagnostic accuracy of simple flotation, McMaster and FLOTAC for parasite egg counts in sheep. *Veterinary Parasitology*, 177, 345–352.
25. Roeber F, Jex AR, Gasser RB. 2013. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance – an Australian perspective. *Parasites & Vectors*, 6, 1363.
26. Rose Vineer H, Baber P, White T, Morgan ER. 2019. Reduced egg shedding in nematode-resistant ewes and projected epidemiological benefits under climate change. *International Journal for Parasitology*, 49, 901–910.
27. Rose Vineer H, Morgan ER, Hertzberg H, Bartley DJ, Bosco A, Charlier J, Chartier C, Claerebout E, de Waal T, Hendrickx G, Hinney B, Höglund J, Ježek J, Kašný M, Keane OM, Martínéz-Valladares M, Mateus TL, McIntyre J, Mickiewicz M, Munoz AM, Pithian CJ, Ploeger HW, Rataj AV, Skuce PJ, Simin S, Sotiraki S, Spinu M, Stuen S, Thamsborg SM, Vadlejch J, Varady M, von Samson-Himmelstjerna G, Rinaldi L. 2020. Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: creation and meta-analysis of an open database. *Parasite*, 27, 69.
28. Schoiswohl J, Hinney B, Tichy A, Bauer K, Joachim A, Krametter-Frötscher R. 2017. Suspected resistance against moxidectin in sheep strongylid nematodes in Austria. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5, 109–117.
29. Symons LE, Steel JW, Jones WO. 1981. Effects of level of larval intake on the productivity and physiological and metabolic responses of lambs infected with *Ostertagia circumcincta*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 32, 139.
30. Taylor MA. 2012. SCOPS and COWS – “worming it out of UK farmers”. *Veterinary Parasitology*, 186, 65–69.
31. Torgerson PR, Paul M, Furrer R. 2014. Evaluating faecal egg count reduction using a specifically designed package “eggCounts” in R and a user friendly web interface. *International Journal for Parasitology*, 44, 299–303.
32. van den Brom R, Moll L, Kappert C, Vellema P. 2015. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. *Veterinary Parasitology*, 209, 278–280.
33. van Dijk J, David GP, Baird G, Morgan ER. 2008. Back to the future: developing hypotheses on the effects of climate change on ovine parasitic gastroenteritis from historical data. *Veterinary Parasitology*, 158, 73–84.
34. van Wyk JA. 2001. Refugia-overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 68, 55–67.
35. van Wyk JA, Hoste H, Kaplan RM, Besier RB. 2006. Targeted selective treatment for worm management – how do we sell rational programs to farmers? *Veterinary Parasitology*, 139, 336–346.
36. van Wyk JA, Mayhew E. 2013. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 80, 539.
37. Vande Velde F, Charlier J, Claerebout E. 2018. Farmer behavior and gastrointestinal nematodes in ruminant livestock-uptake of sustainable control approaches. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 255.
38. Waghorn TS, Miller CM, Oliver A-MB, Leathwick DM. 2009. Drench-and-shift is a high-risk practice in the absence of refugia. *New Zealand Veterinary Journal*, 57, 359–363.
39. Wang C, Torgerson PR, Kaplan RM, George MM, Furrer R. 2018. Modelling anthelmintic resistance by extending eggCounts package to allow individual efficacy. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 8, 386–393.

Cite this article as: Untersweg F, Ferner V, Wiedermann S, Göller M, Hörl-Rannegger M, Kaiser W, Joachim A, Rinaldi L, Krücken J & Hinney B. 2021. Multispecific resistance of sheep trichostrongylids in Austria. *Parasite* 28, 50.



An international open-access, peer-reviewed, online journal publishing high quality papers on all aspects of human and animal parasitology

Reviews, articles and short notes may be submitted. Fields include, but are not limited to: general, medical and veterinary parasitology; morphology, including ultrastructure; parasite systematics, including entomology, acarology, helminthology and protistology, and molecular analyses; molecular biology and biochemistry; immunology of parasitic diseases; host-parasite relationships; ecology and life history of parasites; epidemiology; therapeutics; new diagnostic tools.
All papers in Parasite are published in English. Manuscripts should have a broad interest and must not have been published or submitted elsewhere. No limit is imposed on the length of manuscripts.

Parasite (open-access) continues **Parasite** (print and online editions, 1994-2012) and **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée** (1923-1993) and is the official journal of the Société Française de Parasitologie.

Editor-in-Chief:
Jean-Lou Justine, Paris

Submit your manuscript at
<http://parasite.edmgr.com/>

6. Diskussion

Anthelminthikaresistenzen (AR) der MDS stellen ein zunehmendes Problem in Europa dar. Diese Studie diente dem Zweck, ein aktuelles Bild der derzeitigen Resistenzlage gegenüber Benzimidazolen und makrozyklischen Laktonen in Tirol und der Steiermark zu erheben. Eine Meta-Analyse zu AR in Europa zeigte deutliche Datenlücken in diesem Bereich auf, unter anderem auch, weil die vorhandenen Studien untereinander schwer vergleichbar sind. Der Grund der schlechten Vergleichbarkeit liegt einerseits in der Verwendung von nicht-standardisierten Testmethoden sowie nicht-repräsentative Stichproben, wobei die Praxis zeigt, dass die Gewinnung von repräsentativen Stichproben unmöglich oder nicht praktikabel ist (Rose Vineer et al. 2020).

Diese Probleme spiegeln sich auch in dieser Studie wieder: Da der Eizahlreduktionstest (EZRT) sehr zeit- und kostenintensiv ist, lag die Anzahl untersuchter Betriebe in dieser Studie deutlich unter der notwendigen Zahl, um eine repräsentative Stichprobe von Betrieben zu erhalten. Insgesamt wurden in dieser Studie dreizehn Betriebe in Tirol (zehn) bzw. in der Steiermark (drei) mit insgesamt fünfhundert Tieren beprobt. Von den ausgewählten dreizehn Betrieben, die allesamt eine Schafzucht im Nebenerwerb betrieben, konnte auf zwei Betrieben aufgrund einer zu geringen Gruppengröße der zu entwurmenden Schafe kein EZRT durchgeführt werden. Davon stammte jeweils ein Betrieb aus der Steiermark und aus Tirol. Insgesamt wurden 500 Schafe beprobt, bei denen alle Tiere der Rasse Tiroler Bergschaf gestellt wurde und davon 126 Schafe in die Studie inkludiert. Um die Gruppengröße erreichen zu können, wurde von den WAAVP Guidelines abgewichen. Ein Drittel der beprobten Schafe haben die WAAVP-Voraussetzungen mit einem EPG > 200 nicht erreicht. Um eine höhere Sensitivität zu erreichen, wurde die Mini-FLOTAC-Technik (EPG >5) angewandt um eine höhere Genauigkeit im Vergleich zur McMaster-Zählung zu erreichen, die von WAAVP-Guidelines empfohlen wird.

Bereits eine Studie von Hinney et al. 2020 konnte eine Resistenz von *Haemonchus spp.* gegenüber Benzimidazolen detektieren (Hinney et al. 2020). Mit unserer Studie konnten wir diese Ergebnisse untermauern. So zeigten 64 % der Studienpopulation eine Resistenz gegenüber Benzimidazolen. Auch vergleichbare Studien aus Zentral- und Südeuropa bestätigen eine BZ Resistenz, wobei Italien und Spanien eine geringere Prävalenz zeigten (Rose Vineer et al. 2020). Auch das Vorhandensein einer Resistenz der Trichostrongyliden in Österreich gegenüber Moxidectin wurde bereits angenommen, konnte aber nicht bestätigt werden (Schoiswohl et al. 2017).

In der hier vorliegenden Studie konnte eine Resistenz gegenüber Moxidectin, welches zu den makrozyklischen Laktonen gehört, erstmals für Österreich eindeutig detektiert werden.

Nur wenige Studien aus Europa haben eine MOX Resistenz in größeren Populationen beschrieben, wie z.B. in Deutschland mit 19 %. In Italien wurde bis dato keine Resistenz gegen MOX beschrieben (Rose Vineer et al. 2020).

Ein Grund für die vermehrte Resistenzbildung gegen Anthelminthika in Österreich könnte im Entwurmungs- und Weidemanagement zu finden sein. Der Hauptteil der beprobten Betriebe setzt auf eine Entwurmung bei Weideaustrieb, der vor dem Auftrieb auf die höher gelegenen alpinen Weideflächen stattfindet. Dabei werden zum Großteil alle Tiere zur selben Zeit entwurmt. Dies entspricht der „dose and move“-Strategie, die als eine der größten Risikofaktoren für die Entwicklung von AR beschrieben wird (Coles 2005). Hinzu kommen weitere häufige Fehlerquellen im Entwurmungsmanagement, wie z.B. die Unterdosierung des Anthelminthikums. Bei der Dosierung des Anthelminthikums konnte auch in unserer Studie eine Unterschätzung des Gewichts durch die Tierbesitzer beobachtet werden. Da die meisten Landwirte keine Waage besitzen, kommt es daher vermutlich häufig zu einer Unterdosierung der Anthelminthika.

Bei der Durchführung der Studie wurde versucht, bekannte Fehlerquellen und Störfaktoren auszuschließen. Hochwertige Anthelminthika bekannter Hersteller wurden verwendet und vor Verabreichung die Dosierung des Anthelminthikums auf das Gewicht der Tiere berechnet. Dazu wurden die Tiere mit einer Waage gewogen.

Eine Limitation der Studie stellt die willkürliche Probenauswahl dar. Daraus könnte eine Selektionsverzerrung resultieren, da vor allem Betriebe überrepräsentiert waren, die bereits erste Resistenzentwicklungen erfahren haben oder auch Managementstrategien verfolgen, die nicht repräsentativ für Österreich sein könnten.

Diese Studie legt jedoch Nahe, dass BZ auf den meisten österreichischen Betrieben unwirksam sind. Repräsentative Langzeitstudien, wie z.B. in Norwegen sind notwendig, um eine fundierte Aussage über die Entwicklung von AR treffen zu können (Domke et al. 2012).

Eine Folgestudie könnte die detaillierte Beurteilung von Resistenzen anhand von österreichweiten für die Population repräsentativen Stichproben erfassen. In diese Studie sollten Betriebsgrößen aller Art in allen österreichischen Bundesländern umfassen. Die dafür anfallenden Kosten sind für die Landwirte aufgrund des durchschnittlichen Marktwertes eines Schafes kaum wirtschaftlich tragbar. Daher müsste sich eine kostengünstigere Lösung zur Überwachung der Resistenzen finden (Levecke et al. 2012).

Um in Zukunft eine Minimierung der AR zu bewerkstelligen, sind umfangreiche Maßnahmen zu treffen. Die Aufklärung der Landwirte durch den Tierarzt stellt hierbei einen wesentlichen Punkt dar. Dabei sollte auf das Problem der stetig zunehmenden AR hingewiesen werden. In diesem Zuge sollte auch darauf hingewiesen werden, dass es nur eine begrenzte Anzahl von Anthelminthika gibt, die zum Einsatz kommen können. Einige davon sind auf manchen

Betrieben aufgrund ihrer verminderten Wirkung nicht mehr einsetzbar. Grundsätzlich sollte eine routinemäßige Untersuchung von Kotproben vor der Behandlung erfolgen um den Einsatz Anthelminthika möglichst zu mindern. Aufgrund der „kostenintensiven“ Kotuntersuchung im Verhältnis zum Wert eines Tieres muss auf jeden Fall an zusätzliche Optimierungsmethoden gedacht werden. Auch bei starker Kostenlimitierung sollte jedoch zumindest eine Sammelkotprobe von einigen Tieren genommen werden um einen allgemeinen Überblick im Bestand bezüglich der Wurmbürde und Wurm��pezies zu erhalten. Darauf basierend kann dann die Wahl auf das richtige Anthelminthikum getroffen werden jedoch sollte der Einsatz nur bei solchen Tieren erfolgen, die von einer Behandlung profitieren. Zusätzlich können weitere Strategien des selektiven Behandelns eingesetzt werden, um das Refugium für Anthelminthika-empfindliche Würmer zu vergrößern. Dazu gehört die Auswahl von Behandlungswürdigen Tieren mit der FAMACHA® Karte und dem Body conditioning scoring. Zusätzlich sollten vor dem Einsatz die zu behandelten Tiere gewogen werden um die richtige Dosierung zu gewährleisten. Ebenso können im Weidemanagement einige Vorkehrungen zum Erhalt von Refugien getroffen werden. So sollten Tiere nach der selektiven Behandlung mit unbehandelten Tieren weiterhin auf derselben Weide Grasern. Zusammenfassend sind die SCOPS nach Taylor (2012) die nachfolgend aufgelistet sind zu empfehlen um ein Fortschreiten der AR zu mindern:

- Entwicklung einer Kontrollstrategie mit dem Tierarzt
- Verwendung effektiver Quarantänestrategien, um keine resistenten Würmer einzuschleppen
- Überprüfung der Wirksamkeit der Anthelminthika im Betrieb
- Verabreichung von Anthelminthika in richtiger Dosierung und zum richtigen Zeitpunkt
- Verwendung der Anthelminthika nur bei Notwendigkeit
- Wahl der richtigen Anthelminthika (möglichst schmales Wirkspektrum)
- Entwicklung von Strategien um möglichst viele Anthelminthika empfindliche Würmer zu bewahren.
- Verminderung der Abhängigkeit von Anthelminthika (durch z.B. Weidemanagement und wurmresistente Schafrassen)

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie sollten aktuelle Daten zur Entwicklung von Anthelminthikaresistenzen der Schaftrichostrongyliden in Tirol und der Steiermark erhoben werden. Dazu wurden zwei häufig verwendete Anthelminthika-Klassen, Fenbendazol (FBZ) und Moxidectin (MOX) auf ihre Wirksamkeit gegen Magen-Darm-Strongyliden in Schafen überprüft. Hierbei wurde von insgesamt fünfhundert Schafen von dreizehn ausgewählten Betrieben in Tirol und der Steiermark rektal Kotproben entnommen. Ein Drittel der beprobten Schafe hatten nicht genügend Tiere mit ausreichend hoher Eiausscheidung. Deshalb wurden von den ursprünglich beprobten dreizehn Betrieben nur elf Betriebe mit insgesamt 129 Tieren inkludiert. Am Tag vor Behandlung sowie vierzehn Tage danach wurde ein Mini-FLOTAC zur Ermittlung der Eizahlreduktion durchgeführt. Neun Gruppen wurden mit MOX, drei Gruppen mit FBZ behandelt. Auf zwei Betrieben konnte eine Resistenz gegenüber MOX und eine Resistenz gegen FBZ auf einem Betrieb festgestellt werden. Des Weiteren wurde eine Resistenz gegen FBZ auf einem Betrieb bzw. MOX auf drei Betrieben vermutet. Die Erstellung einer Kontrollgruppe war aufgrund von niedriger Eiausscheidung nicht möglich. Folgestudien mit größeren Betrieben sind notwendig, um eine repräsentative Aussage für Österreich zu treffen.

Die vorliegende Studie untermauert die bereits in anderen europäischen Ländern beschriebene zunehmende Anthelminthikaresistenz. Zudem ist die Schulung von Landwirt:innen und Veterinären bezüglich Refugienbildung notwendig, um die Entstehung von AR einzudämmen.

8. Summary

This study tries to display the recent anthelmintic resistance of sheep trichostrongylids in Tyrol and Styria. For this purpose two frequently used classes of anthelmintics, fenbendazole (benzimidazole) and moxidectin (macrocyclic lactones) were tested for their effectiveness against gastrointestinal strongyles in sheep. Rectal fecal samples were taken from a total of five hundred sheep from thirteen selected farms in Tyrol and Styria. A third of the sheep samples did not meet the WAAVP requirements with an EPG > 200, so eleven of the thirteen farms originally sampled were included with a total of 129 animals.

A mini-FLOTAC was carried out on day zero and on day fourteen to determine the reduction in the number of eggs. A total count of nine groups were treated with MOX and three groups were treated with FBZ. It was possible to detect a MOX resistance on two farms and on another farm a resistance against FBZ. We suspected a resistance against FBC on one farm and a resistance against MOX on three other farms. It was not possible to create a control group due to low egg excretion. Follow-up studies with larger companies are necessary in order to be conclusive for Austria. The present study underpins the increasing resistance to anthelmintics as described in other European countries.

In addition, the training of farmers and veterinarians on the formation of refugia is necessary in order to curb the development of AR.

9. Literaturverzeichnis

- Besier RB. 2012. Refugia-based strategies for sustainable worm control: Factors affecting the acceptability to sheep and goat owners. *Veterinary Parasitology*, 186(1–2):2–9.
- Besier RB, Kahn LP, Sargison ND, Van Wyk JA. 2016. *Diagnosis, Treatment and Management of Haemonchus contortus in Small Ruminants*. Elsevier Ltd.
- Blackhall WJ, Prichard RK, Beech RN. 1998. Haemonchus contortus : Selection at a Glutamate-Gated Chloride Channel. *Experimental Parasitology*, 48(3–4):42–48.
- Braunreiter C. 2012. Körperkonditionsbeurteilung (BCS) beim Milchschaaf.
- Brunner N, Kühleitner M. 2020. The growth of domestic goats and sheep: A meta study with Bertalanffy-Pütter models. *Veterinary and Animal Science*, 10(July).
- Cabaret J, Bouilhol M, Mage C. 2002. Managing helminths of ruminants in organic farming. *Veterinary research*, 33:625–640.
- Charlier J, Rinaldi L, Musella V, Ploeger HW, Chartier C, Vineer HR, Hinney B, von Samson-Himmelstjerna G, Băcescu B, Mickiewicz M, et al. 2020. Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, 182(July):105103.
- Chessa B, Pereira F, Arnaud F, et al. Revealing the history of sheep domestication using retrovirus integrations. *Science*. 2009;324(5926):532-536. doi:10.1126/science.1170587
- Coles GC. 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44 (1992) 35-44 Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam 35, 34(10):1473–1477.
- Coles GC. 2005. Anthelmintic resistance - Looking to the future: A UK perspective. *Research in Veterinary Science*, 78(2):99–108.
- Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, Von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, Taylor MA, Vercruyse J. 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes

of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 136(3–4):167–185.

Cringoli G, Maurelli MP, Levecke B, Bosco A, Vercruysse J, Utzinger J, Rinaldi L. 2017. The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nature Protocols*, 12(9):1723–1732.

Domestication S, Retrovirus U. 2009. Edinburgh Research Explorer Revealing the History of Sheep Domestication Using Retrovirus. *Science*, 324(5926):532–536.

Domke AVM, Chartier C, Gjerde B, Höglund J, Leine N, Vatn S, Stuen S. 2012. Prevalence of anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats in Norway. *Parasitology Research*, 111(1):185–193.

Gasser RB, Bott NJ, Chilton NB, Hunt P, Beveridge I. 2008. Toward practical, DNA-based diagnostic methods for parasitic nematodes of livestock - Bionomic and biotechnological implications. *Biotechnology Advances*, 26(4):325–334.

Geary TG, Hosking BC, Skuce, PJ, Von Samson-Himmelstjerna G, Maeder S, Holdsworth WP, Vercruysse J (2012): WAAVP Guideline on anthelmintic combination products targeting nematode infections of ruminants and horses. *Vet Parasitol.*, 190: 306-316.

Hertzberg H, Sager H. 2006. Problematik des helminthenbefalls bei hauswiederkäuern in der Schweiz: Aktuelle perspektiven. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 148(9):511–521.

Hinney B, Schoiswohl J, Melville L, Ameen VJ, Wille-Piazza W, Bauer K, Joachim A, Krücken J, Skuce PJ, Krametter-Frötscher R. 2020. High frequency of benzimidazole resistance alleles in trichostrongyloids from Austrian sheep flocks in an alpine transhumance management system. *BMC Veterinary Research*, 16(1):1–9.

Jackson F, Miller J. 2006. Alternative approaches to control-Quo vadit? *Veterinary Parasitology*, 139(4):371–384.

Jackson F, Varady M, Bartley DJ. 2012. Managing anthelmintic resistance in goats-Can we learn lessons from sheep? *Small Ruminant Research*, 103(1):3–9.

Karlsson LJE, Greeff JC. 2012. Genetic aspects of sheep parasitic diseases. *Veterinary*

Parasitology, 189(1):104–112.

Kearney PE, Murray PJ, Hoy JM, Hohenhaus M, Kotze A. 2016. The „Toolbox“ of strategies for managing *Haemonchus contortus* in goats: What's in and what's out. *Veterinary Parasitology*, 220:93–107.

Kotze AC, Prichard RK. 2016. Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*. History, Mechanisms and Diagnosis. Elsevier Ltd.

Lacey E, Prichard RK. 1986. Interactions of benzimidazoles (BZ) with tubulin from BZ-sensitive and BZ-resistant isolates of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 19(2):171–181.

Landwirtschaftskammer-Österreich. 2018. Leitfaden für die Tierbehandlung am Bio-Betrieb.

Levecke B, Rinaldi L, Charlier J, Maurelli MP, Bosco A, Vercruyse J, Cringoli G. 2012. The bias, accuracy and precision of faecal egg count reduction test results in cattle using McMaster, Cornell-Wisconsin and FLOTAC egg counting methods. *Veterinary Parasitology*, 188(1–2):194–199.

Morgan ER, Charlier J, Hendrickx G, Biggeri A, Catalan D, Von Samson-Himmelstjerna G, Demeler J, Müller E, Van Dijk J, Kenyon F, et al. 2013. Global change and helminth infections in grazing ruminants in Europe: Impacts, trends and sustainable solutions. *Agriculture (Switzerland)*, 3(3):484–502.

Naeem M, Iqbal Z, Roohi N. 2021. Ovine haemonchosis: a review. *Tropical Animal Health and Production*, 53(1).

O'Connor LJ, Walkden-Brown SW, Kahn LP. 2006. Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*, 142(1–2):1–15.

Papadopoulos E. 2008. Anthelmintic resistance in sheep nematodes. *Small Ruminant Research*, 76(1–2):99–103.

Roeber F, Kahn L. 2014. The specific diagnosis of gastrointestinal nematode infections in livestock: Larval culture technique, its limitations and alternative DNA-based

approaches. *Veterinary Parasitology*, 205(3–4):619–628.

Roeber F, Jex AR, Gasser RB. 2013a. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - An Australian perspective. *Parasites and Vectors*, 6(1):1–13.

Roeber F, Jex AR, Gasser RB. 2013b. Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. *Biotechnology Advances*, 31(8):1135–1152.

Rose Vineer H, Morgan ER, Hertzberg H, Bartley DJ, Bosco A, Charlier J, Chartier C, Claerebout E, De Waal T, Hendrickx G, et al. 2020. Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: Creation and meta-analysis of an open database. *Parasite*, 27.

Russel A. 1984. Farm Practice Body condition scoring of sheep by Angus Russel. *Advances in Veterinary Science*, (May):91–94.

Taylor MA. 2012. SCOPS and COWS-'Worming it out of UK farmers'. *Veterinary Parasitology*, 186(1–2):65–69.

Urdaneta-Marquez L, Bae SH, Janukavicius P, Beech R, Dent J, Prichard R. 2014. A dyf-7 haplotype causes sensory neuron defects and is associated with macrocyclic lactone resistance worldwide in the nematode parasite *Haemonchus contortus*. *International Journal for Parasitology*, 44(14):1063–1071.

van Wyk JA, Bath GF. 2002. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary research*, 33:509–529.

van Wyk JA, Hoste H, Kaplan RM, Besier RB. 2006. Targeted selective treatment for worm management-How do we sell rational programs to farmers? *Veterinary Parasitology*, 139(4):336–346.

Zarlenga DS, Hoberg EP, Tuo W. 2016. The Identification of *Haemonchus* Species and Diagnosis of Haemonchosis. *Advances in Parasitology*, 93:145–180.

10. Anhang

Special Issue - Combatting Anthelmintic resistance in ruminants. Invited Editors: Johannes Charlier, Hervé Hoste, and Smaragda

Sotiraki

Open Access

Research Article

Issue	Parasite Volume 28, 2021 Special Issue - Combatting Anthelmintic resistance in ruminants. Invited Editors: Johannes Charlier, Hervé Hoste, and Smaragda Sotiraki
Article Number	50
Number of page(s)	10
DOI	https://doi.org/10.1051/parasite/2021048
Published online	11 June 2021

Parasite 28, 50 (2021)

Research Article

Cite this article:

Untersweg F, Ferner V, Wiedermann S, Göller M, Hörl-Rannegger M, Kaiser W, Joachim A, Rinaldi L, Krücken J, Hinney B. Multispecific resistance of sheep trichostrongylids in Austria. Parasite. 2021;28:50. doi: 10.1051/parasite/2021048. Epub 2021 Jun 11. PMID: 34114948; PMCID: PMC8194391