

Detection of benzimidazole resistance by PCR-RFLP in *Haemonchus contortus* recovered from sheep

Case report

Nagy Gábor<sup>1\*</sup>  
Zsolnai Attila<sup>1</sup>  
Csivincsik Ágnes<sup>2</sup>  
Sugár László<sup>1</sup>

G. Nagy<sup>1\*</sup>  
A. Zsolnai<sup>1</sup>  
Á. Csivincsik<sup>2</sup>  
L. Sugár<sup>1</sup>

1. Kaposvári Egyetem Agrár-  
és Környezettudományi Kar  
H-7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40.

\*e-mail: nagy.gabor@ke.hu

2. Somogy Megyei Kormányhivatal  
Élelmiszerlánc-biztonsági  
és Állategészségügyi Igazgatóság,  
Kaposvár

# Benzimidazol-rezisztencia kimutatója PCR-RFLP-módszerrel juhól izolált *Haemonchus contortus*-ban

## Esetismertetés

### ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők egy haemonchosisban elhullott anyajuh boncolását végezték el. Mivel az állat elhullása előtt 26 nappal albendazol hatóanyagú féregellenes kezeléssel esett át, a nagyszámú *Haemonchus contortus* ( $n = 2920$ ) jelenléte az oltógyomorban a rezisztencia gyanúját vetette fel. A  $\beta$ -tubulin 1. izotípusú génjének 200. kodonhelyén található nukleotid-polimorfizmuson (Phe200Tyr) alapuló PCR-RFLP vizsgálata a gyanút megerősítette. A homozigóta-rezisztens (RR) egyedek aránya 66,78%, a heterozigótáké pedig 33,33% volt; homozigóta-érzékeny egyed nem volt a vizsgált férgek között ( $n = 15$ ). A parazitapopuláció a Phe200Tyr mutációhoz kapcsolt benzimidazol-rezisztencia szempontjából Hardy-Weinberg-egyensúlyban volt ( $p = 1,0$ ), a rezisztens genotípus prevalenciája 95%-os konfidencia-intervallum mellett 39,68–85,83% volt. Az eredmények igazolták, hogy a több éven át tartó, rendszeres benzimidazol-használat megváltoztathatja a gyógyszer-rezisztenciához kapcsolt gének relatív gyakoriságát, ezáltal a rezisztens allél nagyarányú elterjedését okozhatja az érintett parazitapopulációban. Ismereteink szerint Magyarországon ez az első eset, amelyben igazolódott a *Haemonchus contortus* benzimidazollal szembeni rezisztenciája.

### SUMMARY

The authors dissected a ewe died of haemonchosis on the 26<sup>th</sup> day after an albendazole treatment. The large number of *Haemonchus contortus* recovered from the abomasum suggested the possibility of benzimidazole resistance, which was confirmed by PCR-RFLP based on single-nucleotide polymorphism of codon 200 in isotype 1  $\beta$ -tubulin gene (Phe200Tyr). The proportion of resistant homozygotes (RR), heterozygotes (RS) and susceptible homozygotes (SS) were 66.78%, 33.33% and 0%, respectively ( $n = 15$ ). By Haldane's exact test Hardy-Weinberg equilibrium of the population was accepted ( $p = 1.0$ ). The true prevalence of resistant genotype (RR), which was calculated by Sterne's exact method, proved to be 39.68–85.83% (confidence interval: 95%). These results confirmed that long-term usage of benzimidazoles can change the relative allele frequency of genes associated with drug resistance; hereby it can cause large-scale spread of resistant allele. To our knowledge, this study proved the resistance to benzimidazole in *Haemonchus contortus* in Hungary for the first time.

Legeltetett kérődzők tartásakor az egyik legnagyobb gazdasági kárt okozó állategészségügyi problémát a parazitikus fonálféreg, elsősorban a gyomor- és bélféreg jelentik (27, 29). Egyes becslések szerint a legeltetett juh- és szarvasmarha-állományokban a parazitózisokból eredő gazdasági kártétel mértéke világviszonylatban évenként több tízmilliárd dollár (22). Napjainkban a gyomor- és bélféreg elleni védekezés központi és legtöbbször egyetlen eleme a széles spektrumú anthelmintikumok használata. Sajnos azonban az intenzív és átgondolatlan gyógyszerhasználat több – elsősorban a *Trichostrongylidae*-családba tartozó – féregfajban a gyógyszer-rezisztencia megjelenésével és gyors elterjedésével járt (9, 18). Az európai kérődzőállományok gyomor-bélférgei esetében leggyakrabban a benzimidazolokkal és a levamisollal szembeni rezisztenciát igazolták (18).

**A kiskérődzőket fertőző *Haemonchus contortus*-ban a benzimidazollal szembeni rezisztenciával kapcsolt mutációk a  $\beta$ -tubulin génekhez köthetők**

**Egy 5 éves anyajuhot boncoltak fel, ami elhullása előtt 26 nappal albendazol-kezelést kapott**

**A parazitológiai vizsgálat során az emésztőrendszer szakaszaiból elkülönítve végeztek parazitológiai vizsgálatot**

**A legeltetett juh- és szarvasmarha-állományokban a parazitózisok által okozott gazdasági kártétel világviszonylatban évi több tízmilliárd dollár**

A kiskérődzők gyomor-bélférgei között az egyik leginkább patogénnek tartott faj az oltógyomorban élő vérszívó fonálféreg, a *Haemonchus contortus* (27, 28). A féreg örökítőanyagában a benzimidazollal szembeni rezisztenciával kapcsolt mutációk a  $\beta$ -tubulin génekhez köthetők (8). A jelenségért az 1. izotípusú gén 200., 198. és 167. kodonján előforduló nukleotid-polimorfizmus (SNP) tehető felelőssé. Ezek közül leggyakrabban a 200. kodon mutációját (Phe200Tyr) használják rezisztenciátípusozásra (2, 5), amikor a kodon által kódolt aminosav, a fenil-alanin helyére tirozin épül be (13). A tipizálásra ritkábban használt másik két SNP esetében a 198. kodon mutációja következtében a glutaminsav helyére alanin, míg a 167. kodon esetében a fenil-alanin helyére tirozin vagy hisztidin épül be (5, 6, 20, 24).

A benzimidazolokkal szembeni rezisztencia kimutatására többféle módszer létezik (2), amelyek közül napjainkban egyre gyakrabban alkalmazzák a különböző molekuláris diagnosztikai eljárásokat (8, 23, 26). Előnyük, hogy a tesztek érzékenysége és pontossága jóval meghaladja az egyéb diagnosztikai módszerekét, így megfelelő mintaszám mellett már egészen kis arányú rezisztenciaállal jelenlétét is képesek kimutatni a féregpopulációkból (4, 11). Széles körű, mindennapos alkalmazásuknak azonban egyelőre gátat szab a vizsgálatok költsége (22).

Tanulmányunk célja az eset során felmerülő, benzimidazolokkal szembeni rezisztencia gyanújának igazolása volt. A vizsgálathoz a *H. contortus* faj  $\beta$ -tubulin 1. izotípusának 200. kodonján lévő SNP-polimorfizmust használtuk fel.

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### DIAGNOSZTIKAI BONCOLÁS

2014. május végén egy árutermelő juhállományból származó 5 éves anyajuh boncolását végeztük el. Az állat elhullása előtt 26 nappal féregellenes kezeléssel (Albendazin 2,5% belsőleges szuszpenzió – AUV, Pernix Pharma Kft., Zalaegerszeg, Hungary) esett át. Az alkalmazott gyógyszer mennyiségét a gyártó ajánlásai alapján állapította meg a kezelő állatorvos.

### PARAZITOLÓGIAI VIZSGÁLAT

A parazitológiai vizsgálathoz az emésztőrendszer szakaszait (oltógyomor, vékonybél, vastagbél) egymástól elválasztottuk, belőlük elkülönítve végeztük a féregizolálást. Első lépésként ez egyes szakaszok tartalmát műanyag edényekbe helyeztük, majd felnyitásuk után a nyálkahártyákat folyó csapvízzel többször alaposan lemostuk. A folyamatot mindhárom szakasz esetében addig folytattuk, míg a szuszpenzió 2 literre hígult. Ebből a mennyiségből, a férgek faji és mennyiségi meghatározásához, alapos keverés után 100 ml-t emeltünk ki. A férgek faji meghatározása KOTLÁN és KOBULEJ (12), NEMESÉRI és HOLLÓ (17), LICHTENFELS és PILITT (14, 15), LICHTENFELS és MTSAI (16), ill. JACQUET és MTSAI (10) határozókulcsainak segítségével történt. Az egyes

fajok kalkulált féregszámát a 100 ml-ben számolt darabszám 20-szoros szorzata adta.

Mivel a *Teladorsagia circumcincta*/*Teladorsagia trifurcata* fajok esetében csak a hím egyedeket lehet biztonságosan megkülönböztetni egymástól, ebben az esetben az általunk kalkulált féregszámban minkét faj szerepel. A *Trichostrongylus colubriformis* és *Trichostrongylus vitrinus* esetében az egyedszám-meghatározás szintén ezzel a módszerrel történt.

### DNS-ELŐKÉSZÍTÉS

A rendelkezésre álló szakirodalmi adatok (3, 26) és a járványtani körülmények alapján feltételeztük, hogy a benzimidazollal szemben rezisztens genotípus (RR) aránya meghaladja a 20%-ot. Ezért a mintaszám meghatározásánál PFEIFFER (19) ajánlását vettük figyelembe, amely szerint végtelen populációban egy tulajdonság 20%-os előfordulásának 95%-os biztonságú kimutatásához szükséges mintaszám 13, ezért az izolált *H. contortus* példányokból 15 hímet véletlenszerűen kiválasztottunk, majd a molekuláris vizsgálatokig 96%-os alkoholban tároltunk. Egy-egy példányhoz 50 µl lízisszuszpenz (Tris 10 mM, pH 7,5; KCl 50 mM; Tween20 0,5%; proteináz-K 1,2 µg/µl) adtunk a sejtek lízisének elősegítésére. Az elegyet 5 órán keresztül 56 °C-on tartottuk, majd 94 °C-on 10 percig inaktíváltuk a proteázt. Az így előkészített minták 1–1 µl-ét használtuk fel a további vizsgálatokhoz.

### PCR-RFLP-VIZSGÁLAT

A rezisztencia gyanúját a férgek  $\beta$ -tubulin génjének 1. izotípusán, a 200. kodon vizsgálatával végeztük el. Az ezen a ponton előforduló mutáció ugyanis az, amelyhez leggyakrabban és legszorosabban köthető a benzimidazolokkal szembeni rezisztencia megjelenése (5, 23, 30). A benzimidazol-rezisztencia meghatározásához használt láncindító szekvenciák (primerek) a következők voltak 5'-CTACCCTTCCG-TCCATCAA-3' és 5'-TGAAGACGAGGGAATGGAAC-3' (23). A primerek 0,2 µM, a dNTP 200 µM, a MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM koncentrációjúak voltak. A DyNAzyme polimeráz (Finnzymes Oy, Espoo, Finland) 0,5 U mennyiségben volt jelen a 10 µl térfogatú PCR-reakcióban. A PCR hőmérsékleti profilja a kezdeti 94 °C, 3 perc után 45 cikluson keresztül 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s volt. A PCR után a termékhez 5 egység Taal (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) restrikciós endonukleázt és 1/10 térfogatú, 10-szeres hígítású puffert (330 mM Tris-acetát, 100 mM Mg-acetát, 660 mM K-acetát és 1 mg/mL BSA) adtunk. Az emésztés 65 °C-on egész éjszakán keresztül tartott. A restrikciós fragmentek elválasztására MetaPhor agarózt (FMC, Rockland, ME, USA) TBE- (Tris-bórsav-EDTA-) oldatban, 4%-os töménységben alkalmaztunk, a használt marker TrackIt™ 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, CA, USA) volt.

### STATISZTIKAI SZÁMÍTÁSOK

A molekuláris diagnosztikai vizsgálattal kapott genotípus-gyakoriságokból a minta allélgyakoriságait, valamint a Hardy-Weinberg-egyensúly alapján várható genotípus-gyakoriságokat határoztuk meg. A mintában tapasztalt és a Hardy-Weinberg-szabálynak megfelelően várható genotípus-gyakoriságokat Haldane-féle egzakt próbával hasonlítottuk össze az R-statistics software version 3.1.1 statisztikai program 'HardyWeinberg' version 1.5.4 csomagjának segítségével (7). Az RR genotípus parazitapopuláción belüli valós prevalenciáját 95%-os konfidencia-intervallum (CI 95%) megadásával, Sterne-féle egzakt próba segítségével becsültük (21).

## EREDMÉNYEK

### DIAGNOSZTIKAI BONCOLÁS

Az anyajuh rendkívül gyenge tápláltsági állapotú volt, látható nyálkahártyái porcelánfehérek voltak. Az orrnyílásból fehér, habos tartalom ürült. Az áll alatti tájék vizenyősen beszűrődött.

**15 *H. contortus* hímet választottak ki molekuláris vizsgálatokra**

**A  $\beta$ -tubulin gén vizsgálatát PCR-RFLP-módszerrel végezték**

**A genotípusok valós gyakoriságát statisztikai módszerekkel számították ki**

**1. TÁBLÁZAT.** Az izolált gyomor-bélféreg feregajok és kalkulált mennyiségük

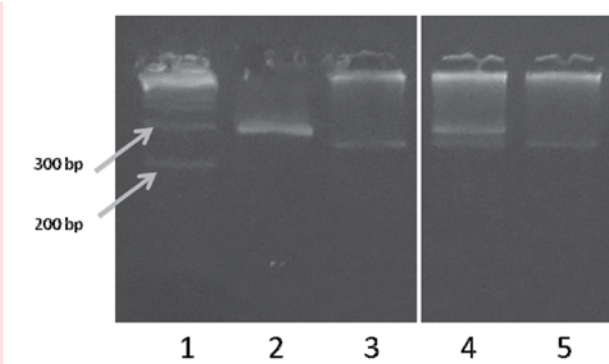
**TABLE 1.** Recovered gastrointestinal worm species and their calculated number

Helyeződés	Féregfaj	Kalkulált szám (db)
Oltógyomor	<i>Haemonchus contortus</i>	2920
	<i>Teladorsagia circumcincta</i> / <i>Teladorsagia trifurcata</i>	3500
Vékonybél	<i>Trichostrongylus colubriformis</i> / <i>Trichostrongylus vitrinus</i>	400
	<i>Cooperia curticei</i>	120
Vastagbél	<i>Oesophagostomum venulosum</i>	40

**Az állat elhullását, ill. az ahhoz vezető vérfogyottságot, senyveséget az oltógyomorban élősködő nagyszámú vérszívó féreg okozta**

A belső vizsgálattal általános vérfogyottságot, a has- és mellüregben a zsírszövet helyén savós beszűrődést tapasztaltunk. Az oltógyomor nyálkahártyája haragosvörös volt, rajta és az oltótartalomban nagyszámú, fehér-vörösen sávozott féreg volt látható. A szív halványbarna színű, lekerekedett volt, a jobb kamra fala elvékonyodott. A tüdők tömött tapintatúak voltak, a légutakat felnyitva, bennük kemény habba verődött, fehér színű tartalmat találtunk.

Vérfogyottságot, ill. a fehérje- és energiahányos állapot következtében kialakult súlyos fokú lesoványodást állapítottunk meg, amelynek közvetlen oka – minden valószínűség szerint – az oltógyomorban élősködő nagyszámú vérszívó féreg jelenléte volt.



**1. ÁBRA.** A vizsgált *H. contortus* egyedek genotípus-profilja  
1. csatorna: 100 bp molekulalétra (TrackIt™ 1 kb Plus DNA Ladder); 2. csatorna: emésztetlen PCR-termék (hossza 305 bp); 3., 5. csatorna homozigóta RR genotípusú egyedek (emésztés utáni termék hossza 257 bp); 4. csatorna: RS genotípusú heterozigóta egyed (emésztés utáni termékek hossza 305 és 257 bp)

**FIGURE 1.** Genotype profile of the investigated *H. contortus* specimen

Lane 1: 100 bp molecule ladder (TrackIt™ 1kb Plus DNA Ladder); Lane 2: undigested PCR product (the length is 305 bp); lane 3 and 5: homozygous RR sample (length of digested product is 257 bp); lane 4: heterozygous RS sample (length of digested products are 305 and 257 bp)

### PARAZITOLÓGIAI VIZSGÁLAT

A parazitológiai vizsgálat során az elhullott állatból 6 féregfajt izoláltunk, amelyek összesített kalkulált száma 6980 volt. Az oltógyomorból *H. contortus* és *T. circumcincta* / *T. trifurcata*, a vékonybélből *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus vitrinus* és *Nematodirus filicollis*, míg a vastagbélből *Oesophagostomum venulosum* férgemet sikerült azonosítanunk (1. táblázat, 2. ábra).

### DNS-VIZSGÁLAT

A primerpár által felerősített 305 bp hosszúságú fragment az emésztés után a benzimidazolokkal szembeni érzékenységgel, a 257 bp hosszúságú fragment a benzimidazolokkal szembeni rezisztenciával kapcsolt allél jelenlétéről adott visszajelzést (1. ábra). A vizsgált mintákban homozigóta-érzékeny (SS) férget nem találtunk. A férgek közül 5 heterozigóta (RS), míg 10 egyed homozigóta-rezisztens (RR) volt (2. táblázat).

### STATISZTIKAI SZÁMÍTÁSOK

A 2. táblázatban leírt genotípus- és allélgyakoriságok adataival elvégzett statisztikai számítás alapján a vizsgált tulajdonságra nézve a populáció Hardy-Weinberg-egyensúlyban van ( $p = 1,0$ ). Az RR genotípus Sterne-féle egzakt módszerrel becsült valós prevalenciája a parazitapopuláción belül 39,68–85,83% (CI 95%).

**2. TÁBLÁZAT.** Genotípus és allélgyakoriság a vizsgált 15 hím *Haemonchus contortus* példányban  
S = érzékeny, R = rezisztens; n = 15

**TABLE 2.** Genotype and allele frequency in the 15 male *Haemonchus contortus* specime examined  
S = susceptible, R = resistant; n = 15

Genotípusok gyakorisága (%)			Allélgyakoriság (%)	
Homozigóta-rezisztens (RR)	Heterozigóta (RS)	Homozigóta-érzékeny (SS)	Rezisztens (R)	Érzékeny (S)
66,7	33,3	0	83,3	16,7

## MEGVITATÁS

A kórbonctani és a parazitológiai vizsgálat eredményei alapján az állat elhullásában jelentős szerepet játszott a súlyos mértékű gyomor-bélférgesség. Az izolált féregfajok jellemző parazitái a kiskérődzőknek, melyek között kiemelkedő számban fordult elő a *H. contortus* ( $n = 2920$ ) és a *T. circumcincta/T. trifurcata* ( $n = 3500$ ). A többi faj esetében csak enyhe fertőzöttség volt megállapítható.

Az elhullást 26 nappal megelőzően az állat hatékony adagban féregellenes (Albendazin 2,5% belsőleges szuszpenzió AUV, Pernix Pharma Kft., Zalaegerszeg, Hungary) kezelésem esett át. Mivel az orálisan alkalmazott albendazol és metabolitjainak hatása viszonylag rövid ideig tart (1, 10), a vizsgálat során tapasztalt erős fertőzöttség eredetére két magyarázat volt adható. Egyrészt a legelő L3 lárvákkal való igen erős fertőzöttsége, másrészt pedig, hogy az alkalmazott hatóanyag nem érthette el a hatását. Mivel az állományban évtizedek óta alkalmaznak albendazol hatóanyagú féregellenes szereket, az erős fertőzöttség hátterében a szerrel szembeni rezisztenciát feltételeztük. Feltételezésünket az elhullott juhból izolált *H. contortus* példányokon elvégzett molekuláris diagnosztikai vizsgálatokkal igazoltuk, mivel legtöbbször ebben a fajban tapasztalható az anthelmintikumokkal szembeni rezisztencia (24). Az alkalmazott PCR-RFLP-eljárással sikerült bizonyítani, hogy az állatból izolált férgekben nagy arányban, 66,78%-ban van jelen a  $\beta$ -tubulin 1. izotípusú gén 200. kodonján az a Phe200Tyr SNP, amely összefüggésbe hozható a benzimidazolokkal szembeni rezisztenciával. Eredményeink, amelyek a benzimidazolok huzamosabb használata nyomán kialakuló gyógyszer-rezisztenciát bizonyítják, más szerzők tapasztalataival egyezők (3, 5, 26). (Mivel a vizsgált állatban legnagyobb számban a *T. circumcincta/T. trifurcata* volt megtalálható, vélelmezhető, hogy az állományban ez a féregfaj is rezisztens az adott hatóanyaggal szemben.)

Vizsgálatunk alapján elmondható, hogy a kiskérődzőkben gyakran előforduló *H. contortus* fajban Magyarországon is kimutattuk a benzimidazol-rezisztenciával kapcsolt allélváltozatot. Bár az eset elemzésekor csak egy infrapopuláció egyedeit vizsgáltuk, eredményeink statisztikai elemzése a rezisztens genotípus magas arányát igazolta a parazitapopulációban. Ez alapján valószínűsíthető, hogy az érintett juhállományban a jelenség általános. Úgy véljük, a gyomor-bélféreg gyógyszer-rezisztenciája hazánkban is előfordul, de elterjedtsége, ill. az egyes állományokon belüli mértéke egyelőre nem ismert. A probléma állat-egészségügyi és gazdasági jelentősége szükségessé teszi a helyzet pontos felmérését, amely átfogó vizsgálatokkal lehetséges.

**A nagyszámú féreg jelenléte az évtizedek óta alkalmazott albendazzal szembeni rezisztenciát valószínűsítette, amit molekuláris biológiai módszerekkel igazoltak**

## IRODALOM

1. ALVAREZ, L. I. – SÁNCHEZ, S. F. – LANUSSE, C. E.: Modified plasma and abomasal disposition of albendazole in nematode-infected sheep. *Vet. Parasitol.*, 1997. 69. 241–253.
2. COLES, G. C. – JACKSON, F.: The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.*, 2006. 136. 167–185.
3. ČUDEKOVÁ, P. – VÁRADY, M. et al.: Phenotypic and genotypic characterisation of benzimidazole susceptible and resistant isolates of *Haemonchus contortus*. *Vet. Parasitol.*, 2010. 172. 155–159.
4. ELARD, L. – CABARET, J. – HUMBERT, J. F.: PCR diagnosis of benzimidazole-susceptibility or -resistance in natural populations of the small ruminant parasite, *Teladorsagia circumcincta*. *Vet. Parasitol.*, 1999. 80. 231–237.
5. ENCALADA-MENA, L. – TUYUB-SOLIS, H. et al.: Phenotypic and genotypic characterization of *Haemonchus* spp. and other gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazole in infected calves from the tropical regions of Campeche State, Mexico. *Vet. Parasitol.*, 2014. 205. 246–254.
6. GHISI, M. – KAMINSKY, R. – MÄSER, P.: Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet. Parasitol.*, 2007. 144. 313–320.
7. GRAFFELMAN, J.: The number of marker sin the HapMap Project: Some notes on Chi-square and exact tests for Hardy-Weinberg equilibrium. *Am. J. Hum. Genet.*, 2010. 86. 813–823.
8. HUMBERT, J. F. – CABARET, J. et al.: Molecular approaches to studying benzimidazole resistance in trichostrongylid nematode parasites of small ruminants. *Vet. Parasitol.*, 2001. 101. 405–414.
9. IHLER, C. F.: Anthelmintic resistance. An overview of the situation in the Nordic countries. *Acta Vet. Scand.*, 2010. 52. S24.
10. JACQUIET, P. – CABARET, J. et al.: Identification of *Haemonchus* species in domestic ruminants based on morphometrics of spicules. *Parasitol. Res.*, 1997. 83. 82–86.
11. KASSAI T.: *Helminthológia*. Medicina Könyvkiadó Rt. Budapest, 2003. 2261–289.
12. KOTLÁN S. – KOBULEJ T.: *Parazitológia*. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest, 1972. 273–315.
13. KWA, M. S. G. – VEENSTRA, J. G. – ROOS, M. H.: Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in  $\beta$ -tubuline isotype I. *Molec. Biochem. Parasitol.*, 1994. 63. 299–303.
14. LICHTENFELS, J. R. – PILITT, P. A.: Cuticular ridge patterns of *Nematodirus* (Nematoda: Trichostrongyloidea) parasitic in domestic ruminants of North America, with a key to species. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, 1983. 50. 261–274.
15. LICHTENFELS, J. R. – PILITT, P. A.: A redescription of *Ostertagia bisonis* (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species of Ostertagiinae with a tapering lateral synlophe from domestic ruminants in North America. *J. Helminthol. Soc. Wash.*, 1991. 58. 231–244.
16. LICHTENFELS, J. R. – PILITT, P. A. – HOBERG, E. P.: New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. *J. Parasitol.*, 1994. 80. 107–119.
17. NEMESÉRI L. – HOLLÓ F.: *Állatorvosi parazitológiai diagnosztika*. Mezőgazdasági Kiadó. Budapest, 1972. 209–224.
18. PAPADOPOULOS, E. – GALLIDIS, E. – PTOCHOS, S.: Anthelmintic resistance in sheep in Europe: A selected review. *Vet. Parasitol.*, 2012. 198. 85–88.
19. PFEIFFER, D. U.: *Veterinary Epidemiology – An introduction*. 2002. Royal Veterinary College. North Mymms, UK. <http://ww3.panafiosa.org.br/Comp/MAPA/431857.pdf>
20. PRITCHARD, R. K.: Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends Parasitol.*, 2001. 17. 445–453.
21. REICZIGEL J.: Confidence intervals for the binomial parameter: some new considerations. *Stat. Med.*, 2003. 22. 611–621.
22. ROEBER, J. F. – JET, A. R. – GASSER, R. B.: Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance – an Australian perspective. *Paras. Vect.*, 2013. 6. 153.
23. von SAMSON-HIMMELSTJERNA, G.: Molecular diagnosis of anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.*, 2006. 136. 99–107.
24. SILVESTRE, A. – CABARET, J.: Mutation in position 167 of isotype 1  $\beta$ -tubulin gene of Trichostrongylid nematodes: role in benzimidazole resistance? *Mol. Biochem. Parasitol.*, 2002. 120. 297–300.
25. SILVESTRE, A. – LEIGNEL, V. et al.: Sheep and goat nematode resistance to anthelmintics: pro and cons among breeding management factors. *Vet. Res.*, 2002. 33. 465–480.
26. TIWARI, J. – KUMAR, S. et al.: Detection of benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* using RFLP-PCR technique. *Vet. Parasitol.*, 2006. 138. 301–307.
27. WALLER, P. J. – THAMSBORG, S. M.: Nematode control in 'green' ruminant production systems. *Trends Parasitol.*, 2004. 20. 493–497.
28. WALLER, P. J. – CHANDRAWATHANI, P.: *Haemonchus contortus*: Parasite problem No. 1 from tropics – polar circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Trop. Biomed.*, 2005. 22. 131–137.
29. WALLER, P. J. – RUDBY-MARTIN, L. et al.: The epidemiology of abomasal nematodes of sheep in Sweden, with particular reference to overwintering survival strategies. *Vet. Parasitol.*, 2004. 122. 207–220.
30. WOLSTENHOLME, A. J. – FAIRWEATHER, I. et al.: Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol.*, 2004. 20. 469–476.

Közlésre ér.: 2014. szept. 15.