

Aus dem Institut für Parasitologie
der Tierärztlichen Hochschule Hannover

**Untersuchungen zur Verbreitung von Anthelminthikaresistenzen
bei Pferden in Niedersachsen**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Veterinärmedizin (Dr. med. vet.)
durch die Tierärztliche Hochschule Hannover

Vorgelegt von
Nicole Catherine Wirtherle
aus Überlingen

Hannover 2003

Wissenschaftliche Betreuung: Prof. Dr. T. Schnieder

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Schnieder
2. Gutachter: Dr. B. Ohnesorge

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.03

Diese Arbeit entstand mit der Unterstützung der Bayer AG, Leverkusen

Meinen Eltern zum Dank

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits auf folgenden Tagungen vorgestellt sowie in angegebener Originalarbeit publiziert:

Nicole Wirtherle, Thomas Schnieder, Georg von Samson-Himmelstjerna (2002):
„Untersuchungen zu Anthelminthikaresistenzen bei Pferden in Norddeutschland.“
Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e. V. (DVG),
Travemünde, 19.-20. 03.2002

Nicole Wirtherle, Thomas Schnieder, Georg von Samson-Himmelstjerna (2002):
„A study on anthelmintic resistance in horse small strongyles in lower saxony.“
International Meeting of the German (DGP) and Dutch (NVP) Societies for Parasitology,
Travemünde, 20.-23. 03.2002

Nicole Wirtherle, Thomas Schnieder, Georg von Samson-Himmelstjerna (2003):
„The prevalence of benzimidazole resistance on German horse farms.“
Vet. Rec. (angenommen)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	13
2	Literaturübersicht	15
2.1	Infektionen mit kleinen Strongyliden des Pferdes.....	15
2.1.1	Erreger.....	15
2.1.2	Vorkommen.....	16
2.1.3	Biologie.....	16
2.1.4	Klinik und Pathogenese.....	18
2.1.5	Pathologie	18
2.1.6	Immunologie.....	19
2.1.7	Diagnose.....	19
2.1.8	Bekämpfung	20
2.1.8.1	Weidetechnische Maßnahmen.....	20
2.1.8.2	Anthelminthikaeinsatz.....	21
2.1.8.3	Biologische Maßnahmen	22
2.2	Anthelminthika und ihre Wirkungsmechanismen.....	24
2.2.1	Benzimidazole	24
2.2.1.1	Wirkstoffe	24
2.2.1.2	β-Tubulin	25
2.2.1.2.1	Aufbau und Funktion der Mikrotubuli	25
2.2.1.2.2	Molekularbiologie des β-Tubulins.....	25
2.2.1.3	Wirkungsweise der Benzimidazole	26
2.2.1.4	Molekularer Hintergrund der Benzimidazolresistenz.....	27
2.2.2	Makrozyklische Laktone	30
2.2.2.1	Wirkstoffe	30
2.2.2.2	Wirkungsmechanismus	31
2.2.2.3	Molekularer Hintergrund	32
2.2.2.4	Resistenzmechanismus	33

2.2.3	Tetrahydropyrimidine	35
2.2.3.1	Wirkstoffe	35
2.2.3.2	Wirkungsmechanismus	36
2.2.3.3	Molekularer Hintergrund	37
2.2.3.4	Resistenzmechanismus	37
2.3	Anthelminthikaresistenz	38
2.3.1	Definition	38
2.3.2	Vorkommen.....	39
2.3.3	Diagnostik	41
2.3.3.1	In vivo-Tests	41
2.3.3.1.1	Kontrollierter Test	41
2.3.3.1.2	Kritischer Test	41
2.3.3.1.3	Eizahlreduktionstest.....	42
2.3.3.2	In vitro-Tests.....	44
2.3.3.2.1	Larvenschlupfhemmtest.....	44
2.3.3.2.2	Larvenentwicklungshemmtest	46
2.3.3.2.3	Larvenparalysetest	47
2.3.3.2.4	Tubulinbindungstest	48
2.3.3.3	Molekularbiologische Methoden.....	48
2.3.3.3.1	Allelspezifische PCR	48
2.4	Statistik	51
2.4.1	Probitanalyse.....	51
3	Eigene Untersuchungen.....	52
3.1	Übersicht.....	52
3.2	Material	53
3.2.1	Anthelminthika	53
3.2.2	Chemikalien.....	53
3.2.3	Enzyme	53
3.2.4	Kits	53

3.2.5	DNA, Primer und dNTPs	54
3.2.5.1	DNA.....	54
3.2.5.2	Primer	54
3.2.5.3	Sonden	54
3.2.5.4	DNTPs	54
3.2.6	Lösungen und Puffer.....	54
3.2.7	Einwegartikel.....	55
3.2.8	Mehrwegartikel.....	55
3.2.9	Geräte.....	56
3.2.10	Computerprogramme	56
3.3	Methoden.....	57
3.3.1	Versuchstiere	57
3.3.2	Auswahl der Betriebe und Probennahme	57
3.3.3	Erfassung der Daten.....	58
3.3.3.1	Erläuterung des Fragebogens.....	58
3.3.4	Kotuntersuchung	62
3.3.5	Larvenkultur	63
3.3.6	Eizahlreduktionstest.....	63
3.3.7	Larvenschlupfhemmtest.....	64
3.3.7.1	Gewinnung der Eisuspension	64
3.3.7.2	Herstellung der TBZ-Verdünnung.....	64
3.3.7.3	Herstellung der PYR-Verdünnung	65
3.3.7.4	Vorversuch I und II.....	65
3.3.7.5	Versuch I und II	65
3.3.8	Larvenparalyse-Test.....	66
3.3.8.1.1	Herstellung der IVM-Verdünnung	66
3.3.8.1.2	Vorversuch III.....	66
3.3.8.1.3	Versuch III	66
3.3.9	Auswertung der <i>in vitro</i>-Tests.....	67
3.3.10	Gewinnung der DNA	68
3.3.10.1	Vorbereitende Maßnahmen	68

3.3.10.2	DNA-Präparation.....	68
3.3.11	Real-time PCR	69
3.3.12	Statistische Auswertung	71
3.4	Ergebnisse.....	73
3.4.1	Betriebe	73
3.4.2	Larvendifferenzierung	73
3.4.3	Kotprobenuntersuchung	73
3.4.4	Fragebogen.....	77
3.4.5	Eizahlreduktionstest.....	87
3.4.5.1	Fenbendazol.....	87
3.4.5.2	Ivermectin	88
3.4.6	Larvenschlupfhemmtest.....	88
3.4.6.1	Vorversuch I	88
3.4.6.2	Vorversuch II	90
3.4.6.3	Versuch I.....	94
3.4.6.4	Versuch II	97
3.4.7	Larvenparalysetest	99
3.4.7.1	Vorversuch III.....	99
3.4.7.2	Versuch III	100
3.4.8	PCR	101
3.4.9	Korrelation der Parameter	107
4	Diskussion.....	109
4.1	Auswahl der Proben und Technik der Kotuntersuchung	109
4.2	Kotproben- und Fragebogenuntersuchung	111
4.3	Eizahlreduktionstest und Larvenschlupfhemmtest.....	118
4.3.1	Benzimidazole	118
4.3.2	Pyrantel.....	121
4.4	Eizahlreduktionstest und Larvenparalysetest mit Ivermectin.....	123
4.5	Allelspezifische PCR	125

4.6	Beurteilung der Praktikabilität der Verfahren.....	127
4.6.1	Kotuntersuchung	127
4.6.2	Eizahlreduktionstest.....	127
4.6.3	Larvenschlupfhemmtest.....	128
4.6.4	Lavenparalysetest.....	129
4.6.5	Real-time PCR	129
4.6.6	Schlussfolgerung	130
5	Zusammenfassung	132
6	Summery	134
7	Literaturverzeichnis	136
8	Anhang.....	179
8.1	Abbildungsverzeichnis	194
8.2	Tabellenverzeichnis	196
8.3	Abkürzungsverzeichnis	199

1 Einleitung

Von den Parasiten des Pferdes sind die kleinen Strongyliden weltweit am häufigsten verbreitet und werden heute als wichtigste pathogene Endoparasiten bei dieser Spezies betrachtet. Man unterscheidet heute elf Gattungen mit insgesamt 50 Arten. Die Infektion erfolgt durch orale Aufnahme dritter Larven, die sich in der Mukosa von Colon und Zäkum zu vierten Larven entwickeln. Das gleichzeitige Auswandern zahlreicher Larven ins Darmlumen führt zu dem Krankheitsbild der larvalen Cyathostominose, welche mit akutem Durchfall einhergeht und zu großen Verlusten unter den Jungtieren führen kann. Der jahrelange therapeutische und prophylaktische Einsatz von Anthelminthika verschiedener Wirkstoffklassen hat zu einem starken Rückgang hinsichtlich der durch große Strongyliden verursachten Erkrankungen geführt. Gleichzeitig fand eine starke Selektion auf Anthelminthika-resistente kleine Strongyliden statt.

Von den 3 Wirkstoffklassen, die hauptsächlich zur Bekämpfung eingesetzt werden, hat insbesondere der über 40 Jahre stattfindende häufige Einsatz von Benzimidazolen (BZ) zu einer starken Resistenzentwicklung geführt. Auch gegen die Gruppe der Tetrahydropyrimidine (PYR) gibt es erste Anzeichen des Wirkungsverlustes. Die Wirkstoffe der makrozyklischen Laktone (ML) zeigen immer noch sehr gute Wirkung, und bisher gibt es trotz der häufigen Anwendung in den letzten zwei Jahrzehnten kaum Informationen über Resistenzen gegen diese Wirkstoffgruppe bei den Endoparasiten des Pferdes. Die Tatsache, dass viele Pferdebesitzer aufgrund der guten Wirkung bevorzugt ML anwenden, lässt darauf schließen, dass der Selektionsdruck auf ML-resistente Würmer ausgesprochen hoch und das Auftreten von Resistenz nur eine Frage der Zeit ist.

Zur Diagnose einer Anthelminthikaresistenz (AR) werden verschiedene Tests verwendet. Als Goldstandard der *in vivo*-Tests dient der sogenannte Eizahlreduktionstest (EZRT), der die Reduktion der Eiausscheidung nach einer Anthelminthikabehandlung misst. Im Gegensatz dazu wird bei kritischen oder kontrollierten Prüfungen die Wurmbürde nach Behandlung direkt erfasst, was ein genaueres Bild über den Befall gibt, aber die Tötung von Versuchstieren verlangt. *In vitro*-Tests messen die AR bei den Entwicklungsstadien und beruhen auf der oviziden, larviziden, entwicklungshemmenden oder paralytischen Wirkung der Anthelminthika, welche bei resistenten Individuen herabgesetzt ist. Die neueste Art der

Diagnose stellt der Einsatz einer allelspezifischen Polymerase Kettenreaktion (PCR) dar, mit der eine Punktmutation im Codon 200 im β -Tubulin festgestellt werden kann und welche als Nachweis für eine BZ-Resistenz gilt. Die verschiedenen Methoden unterscheiden sich generell in ihrer Sensitivität und Spezifität sowie in ihrem Kosten- und Arbeitsaufwand.

Es gibt derzeit nur wenig aktuelle Daten über die Prävalenz von kleinen Strongyliden und dem Auftreten von AR in Niedersachsen. Insbesondere ist wenig bekannt über den Status von PYR und ML. Diese Arbeit soll anhand von Kotuntersuchungen und verschiedenen AR-Tests neue Informationen zu dem Auftreten von kleinen Strongyliden des Pferdes und der Verbreitung von AR in Niedersachsen liefern. Dabei sollten insbesondere Daten zum Weide- und Entwurmungsmanagement mittels eines detaillierten Fragebogens erfasst werden, um Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von AR, Häufigkeit des Anthelminthikaeinsatzes und bestimmten weidehygienischen Maßnahmen im Betrieb aufzuzeigen. Als AR-Tests werden der Eizalreduktionstest (EZRT), der Larvenschlupfhemmtest (LSHT), der Larvenparalysetest (LPT) sowie eine neuentwickelte Methode der allelspezifischen PCR angewendet.

2 Literaturübersicht

2.1 Infektionen mit kleinen Strongyliden des Pferdes

2.1.1 Erreger

Die Nomenklatur der kleinen Strongyliden aus der Familie der Strongylidae ist seit der Entdeckung dieser Parasiten immer wieder geändert worden und die Zugehörigkeit einzelner Vertreter zu verschiedenen Unterfamilien wurde immer wieder in Frage gestellt. Grund ist die große Anzahl von Arten und die morphologische Vielfalt. Man unterscheidet in der Familie der Strongylidae die Unterfamilien Strongylinae, Cyathostominae und Gyalocephalinae. Die sogenannten kleinen Strongyliden sind derzeit mit 51 Arten und mindestens elf Gattungen vertreten (ECKERT 2000) (s.Tab.1). Die einzelnen Arten werden anhand von morphologischen Kriterien wie Mundkapsel, innerem und äußerem Blätterkranz und dem Hinterende der adulten Tiere unterschieden. Während die Differenzierung von großen Strongyliden bei den adulten Tieren aufgrund der Größenunterschiede möglich ist, können Eier (100 – 140 µm), erstes und zweites Larvenstadium weder zur Artdiagnose noch zur Abgrenzung von großen Strongyliden herangezogen werden. Eine erste Differenzierung ist ab dem dritten Larvenstadium anhand der Anzahl der Mitteldarmzellen möglich (ECKERT 2000). In den letzten Jahren wurde verstärkt nach einer einheitlichen Nomenklatur mit festgesetzten Kriterien der Differenzierung der verschiedenen Arten verlangt. An einem neuen Identifikationsschlüssel wird derzeit gearbeitet (Lichtenfels 2002). Neueste Untersuchungen beschäftigen sich mit molekularbiologischen Methoden zur Speziesdifferenzierung (HUNG et al. 1997, 1999; PAPE et al. 1999; HUNG et al. 2000; HODGKINSON et al. 2001; PAPE et al. 2002). HODGKINSON et al. (2001) entwickelten Oligonekleotidsonden zur Identifikation von *Cylicocyclus ashworthi*, *Cylicocyclus nassatus*, *Cylicostephanus longibursatus* und *Cylicostephanus goldi*. Kürzlich wurden auch Sonden für *Cylicocyclus insigne* und *Cyathostomum catinatum* entwickelt.¹

¹ laut persönlicher Mitteilung von Frau J. E. Hodgkinson, Hannover am 18. Februar 2003

<u>Unterfamilien</u>	<u>Gattungen (Anzahl der Arten)</u>
<i>Strongylinae</i>	<i>Strongylus</i> (4), <i>Bidentostomum</i> (1), <i>Craterostomum</i> (1)*, <i>Oesophagodontus</i> (1)*, <i>Triodontophorus</i> (7)*
<i>Cyathostominae</i> *	<i>Cyathostomum</i> (5), <i>Caballonema</i> (1), <i>Coronocylus</i> (5), <i>Cylicocylus</i> (11), <i>Cylicodontophorus</i> (2), <i>Cylicostephanus</i> (7), <i>Cylindropharynx</i> (7), <i>Hsiungia</i> (1), <i>Petrovinema</i> (2), <i>Parapoteriostomum</i> (4), <i>Poteriostomum</i> (2), <i>Skrjabinodontus</i> (3), <i>Tridentoinfundibulum</i> (1)
<i>Gyalocephalinae</i> *	<i>Gyalocephalus</i> (1)

Tabelle 1: Strongyliden der Equiden: Unterfamilien und Gattungen der Familie Strongylidae (* kleine Strongyliden) (nach ECKERT 2000).

2.1.2 Vorkommen

Infektionen mit kleinen Strongyliden kommen weltweit vor und Prävalenzen von 80 - 100 % machen diese Nematoden zu den wichtigsten und häufigsten Endoparasiten des Pferdes (OGBOURNE 1976; REINEMEYER 1986; TOLLIVER et al. 1987; GAWOR 1995; ECKERT 2000). Beschrieben wurden in den meisten Fällen Mischinfektionen von 4-10 Arten, seltener Mischinfektionen mit bis zu 16 Arten oder Monoinfektionen (OGBOURNE 1976; GAWOR 1995). Die fünf häufigsten Arten, die bis zu 89 % der Wurmbürde ausmachen sind *Cyathostomum catinatum*, *Cc. nassatus*, *Cylicostephanus longibursatus*, *Cy. coronatum* und *Cs. goldi* (OGBOURNE 1976; REINEMEYER 1986; GAWOR 1995). Die Befallsraten liegen in den meisten Fällen unter 200.000 Würmern pro Tier, aber in seltenen Fällen sind Würmbürden von bis zu 3 Millionen Würmern beschrieben worden (REINEMEYER 1986; ECKERT 2000). OGBOURNE (1976) fand bei der Untersuchung von 55 Pferden in der Weidesaison eine mittlere Wurmbürde von 400.000 Würmern pro Tier.

2.1.3 Biologie

Die adulten kleinen Strongyliden parasitieren im dorsalen und ventralen Colon sowie im Caecum, wobei jeder Darmabschnitt eine charakteristische Strongylidenfauna bestimmter Arten beherbergt (OGBOURNE 1976; ECKERT 2000). Die geschlechtsreifen Weibchen

legen am Ansiedlungsort Eier ab, die mit dem Kot in die Außenwelt gelangen. Die Eier sind etwa 100 bis 140 µm groß, dünnchalig und enthalten wenige Furchungszellen. In Abhängigkeit von Temperatur, Druck und Luftfeuchtigkeit schlüpfen die ersten Larven unter idealen Bedingungen (25 °C, 80 % Luftfeuchtigkeit) bereits nach 48 Stunden (REINEMEYER 1986). Die Larven müssen sich zweimal häuten, um sich zu infektiösen dritten Larven zu entwickeln. Die ersten und zweiten Larven sind unbescheidet und ernähren sich von Bakterien im Kot. Die infektiösen dritten Larven sind bescheidet und nehmen keine Nahrung mehr auf. Dieses Stadium ernährt sich von in den Mitteldarmzellen eingelagerten Reserven und kann in der Außenwelt überleben, bis diese Reservestoffe aufgebraucht sind. Die Infektion mit kleinen Strongyliden erfolgt oral über kontaminiertes Futter. Im Dünndarm werfen die dritten Larven ihre Scheide ab und wandern in die Lieberkühnschen Krypten der Dickdarmschleimhaut. Von dort dringen sie in die Mukosa und Submukosa ein, wo sie vom Wirtsgewebe bindegewebig eingekapselt werden. In dieser Kapsel vollzieht sich innerhalb von 6 – 12 Tagen die weitere Entwicklung zu vierten Larven, die aber auch verzögert sein kann (EYSKER u. MIRCK 1986; REINEMEYER 1986; ECKERT 2000). Die vierten Larven verbleiben noch ein bis zwei Monate in der Schleimhaut, bevor sie ins Darmlumen wandern. Dort entwickeln sie sich in unbestimmter Zeit zu geschlechtreifen adulten Würmern. Während die Larven hauptsächlich in die Schleimhaut von Caecum und vorderem ventralen Colon einwandern, suchen die adulten Würmer je nach Art unterschiedliche Prädilektionsstellen im Caecum und im ventralen bzw. dorsalen Colon auf (OGBOURNE 1976; EYSKER u. MIRCK 1986; REINEMEYER 1986; ECKERT 2000). Die Präpatenz der kleinen Strongyliden beträgt 5,5 bis 14 Wochen (REINEMEYER 1986), allerdings kann die Entwicklung der Larven auch verzögert sein. Dritte und vierte Larven können in der Darmwand bis zu 3 Jahren verbleiben, bevor sie sich weiter entwickeln. Unklar ist, ob diese Hypobiose abhängig von der Wurmbürde im Darmlumen ist oder einem natürlichen Zyklus unterliegt. Einige Studien zeigen einen Anstieg von vierten Larven im Darmlumen nach anthelminthischer Behandlung (REINEMEYER 1986). Auch saisonale Zusammenhänge sind beobachtet worden. So kommt es im April und Mai sowie im Spätsommer zum sogenannten „spring-“ und „summer rise“, einem Anstieg der Eiausscheidung mit dem Kot. Im Frühjahr kann dieses Phänomen auftreten noch bevor oder kurz nachdem die Tiere auf die Weide kommen. Aufgrund der Präpatenz (s.o.) kann diese hohe Eiausscheidung also nicht durch Neuinfektion zustande kommen. Die

Ursache für die Aktivierung der inhibierten Larven zu gerade diesem Zeitpunkt ist noch nicht geklärt (OGBOURNE 1976; EYSKER u. MIRCK 1986; HERD 1986a; REINEMEYER 1986).

2.1.4 Klinik und Pathogenese

Die Klinik der larvalen oder Winter-Cyathostominose ist geprägt von saisonalem oft plötzlichem Durchfall, Abmagerung und Kolik. Bei schwerem Verlauf kann es trotz Therapie zum Tod der Tiere kommen (REINEMEYER 1986; MAIR 1991; Herd 1992; RIBBECK 1997; ABBOTT 1998a, 1998b). Durch das massive Austreten von vierten Larven aus der Mukosa und Submukosa kommt es zu schwerwiegenden Schäden der Dickdarmschleimhaut und den damit verbundenen Störungen. Die entzündlichen Veränderungen der Schleimhaut führen zu Durchfall und Dehydratation und demzufolge zu Störungen des Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushaltes. Gleichzeitig kommt es über die Schleimhautschäden zu einem Albuminverlust, der zusammen mit einer gestörten Resorption im Darm zu einem negativen Eiweißhaushalt, folgender Abmagerung sowie ventralen Ödemen führen kann (RIBBECK 1997). Experimentelle Infektionen hatten zudem noch Pyrexie, Tachykardie, Anorexie, blutigen und schleimigen Durchfall und Fellwechselstörungen zur Folge (REINEMEYER 1986; ECKERT 2000). Obwohl nicht pathognomonisch, können Laborergebnisse wie Anämie, Hypalbuminämie, Eosinophilie und Leukozytose mit Kernlinksverschiebung hinweisend sein. In manchen Fällen wurde auch ein Anstieg von Beta-Globulinen beobachtet (REINEMEYER 1986; ABBOT 1998). Bei älteren Pferden ist der Befall mit kleinen Strongyliden häufig die Ursache für chronischen Durchfall, der auch in vielen Fällen zum Tode führt (ECKERT 2000).

2.1.5 Pathologie

An Cyathostominose gestorbene Tiere sind abgemagert bis kachektisch und weisen Ödeme in Unterhaut und Darmwand auf. Die Darmschleimhaut ist gerötet, und es finden sich multifokale subseröse Blutungen sowie kleine Knötchen. Die Larvendichte kann bis zu 463 Larven/cm² betragen (RIBBECK 1997; ECKERT 2000). Im Darminhalt sind meist zahlreiche vierte Larven und Präadulte zu finden. Die histologische Untersuchung der Darmwand zeigt

eine akute bis chronische destruierende Enteritis mit massiver Leukozyteninfiltration, Lymphangiectasien, Mediahyperplasie von kleinen Arterien sowie Fibroplasie der Submukosa (EYSKER u. MIRCK 1986; REINEMEYER 1986; RIBECK 1997).

2.1.6 Immunologie

Bisher ist wenig bekannt über die Immunreaktionen von Pferden in bezug auf kleine Strongyliden. Zahlreiche Untersuchungen bestätigten immer wieder erhöhte Infektionsraten bei Fohlen und Jungtieren, was zu der Vermutung führte, dass die Tiere mit zunehmenden Alter eine Immunität entwickelten (HERD u. GABEL 1990; BOERSEMA et al. 1996; KLEI u. CHAPMAN 1999). MONAHAN et al. (1997) wiesen nach, dass Fohlen, die auf einer mit Strongyliden kontaminierten Weide grasten bei einer späteren experimentellen Infektion Immunität zeigten. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, dass es beim Pferd tatsächlich zu einer altersabhängigen Immunitätsausbildung kommt, diese allerdings unvollständig zu sein scheint. In späteren Untersuchungen zeigten MONAHAN et al. (1998), dass es bei älteren zuvor infizierten Ponies im Vergleich zu jungen parasitenfreien Tieren zu einer eindeutigen Resistenz gegen alle Strongylidenstadien kommt. Der Vergleich von Tieren gleichen Alters zeigte, dass die Immunität der Jungtiere sich nicht gegen die infektiösen dritten Larven, sondern gegen die intramuralen Entwicklungsstadien richtet. CHAPMAN et al. (2002) konnten bei experimentellen Infektionen an Ponies keinerlei Immunitätsentwicklung beobachten, vermuteten aber, dass die Versuchsdauer von vier Monaten zu kurz für eine nachweisbare Immunantwort war. Die genauen Mechanismen dieser Immunität sind bisher noch unbekannt.

2.1.7 Diagnose

Die Diagnose der Cyathostominose ist schwierig, da die Symptome nicht pathognomonisch sind. Eine Kotuntersuchung ist hinsichtlich der Diagnosestellung wenig hilfreich, da gerade im akuten Krankheitsverlauf häufig keine Eier ausgeschieden werden. Zudem hat der Nachweis von Strongylideneiern im Kot wenig Aussagekraft, da die meisten Tiere mit Strongyliden infiziert sind, ohne daran zu erkranken. Allerdings kann das Auftreten vieler vierter Larven und Präadulter im Kot hinweisend sein. Die Differenzierung der Larven in der

Kotprobe oder mittels Kotkultur gewonnener Larven gibt Aufschluss über die Beteiligung großer und kleiner Strongyliden. Oftmals liefert die Vorgeschichte wertvolle Hinweise. Eine hohe Besatzdichte, unregelmäßige oder kürzliche Entwurmung, ein schlechter Ernährungszustand und ein plötzliches Auftreten der Krankheit in den Monaten von Januar bis Mai sowie im August und September sind im Zusammenhang mit Cyathostominose häufig beobachtet worden. Meistens sind Tiere unter sechs Jahren betroffen. Die sichersten Befunde sind die Ergebnisse einer Blutuntersuchung im Zusammenhang mit dem klinischen Erscheinungsbild. Hypalbuminämie, Anämie, Leukozytose, Eosinophilie und ein Anstieg der Beta-Globuline sind in den meisten Fällen festzustellen. Eine sichere Diagnose kann nur die Sektion ergeben (REINEMEYER 1986; RIBBECK 1997; ABBOTT 1998a, 1998b; ECKERT 2000).

2.1.8 Bekämpfung

Durch das gehäufte Auftreten von AR in den letzten Jahren ist die Bekämpfung der kleinen Strongyliden schwierig geworden. Während man vor wenigen Jahrzehnten noch versuchte, das Resistenzproblem mit immer kürzeren Intervallen zwischen den Entwurmungen zu bekämpfen (DUNCAN 1985), wird heute eine Kombination von Weidemanagement und zeitlich sinnvoller Entwurmung mit Anthelminthika unterschiedlicher Wirkungsgruppen als beste Strategie empfohlen (HERD 1986b; WALLER 1997).

2.1.8.1 Weidetechnische Maßnahmen

Das Prinzip ist die weitgehende Reduktion von Entwicklungsstadien auf den beweideten Flächen und die damit verbundene Senkung des Infektionsdruckes. Das kann erreicht werden durch das Absammeln des Kotes von der Weide. Dies geschieht in kleinen Betrieben meist manuell, während größere Betrieben mit dafür entwickelten Maschinen mit Vakuumpumpe arbeiten (DUNCAN 1985; HERD 1986a; REINEMEYER 1986; HERD u. COLE 1995; RIBBECK 1997; ABBOT 1998; LYONS et al. 1999). Das zweimalige Entfernen von Kot pro Woche reduziert die Larvendichte auf 1.000 L₃/Kg Gras im Vergleich zu 4.850-10.210 L₃/Kg Gras in Beständen, die regelmäßig anthelminthisch behandelten und 18.486 L₃/Kg Gras in Betrieben, die nicht behandelten. Zudem wird die von den Tieren beweidete Fläche um 50 % -

100 % erhöht, da Pferde die mit Kot verunreinigten Stellen normalerweise meiden (HERD u. COLE 1995; HERD 1986a). Des Weiteren reduziert die alternierende Beweidung mit kleinen oder großen Wiederkäuern die Weidekontamination. Hierbei werden die Pferde im Sommer nach einer Anthelminthikabehandlung auf eine Weide umgetrieben, die in dieser Saison nur von Schafen oder Rindern beweidet wurde. Der Infektionsdruck von Strongyliden ist auf dieser Weide zwar herabgesetzt, es besteht aber das Risiko einer Infektion mit spezieübergreifenden Parasiten wie *Trichostrongylus axei* (EYSKER et al. 1983; DUNCAN 1985; HERD 1986a; ABBOTT 1998a, 1998b; LYONS et al. 1999). Das regelmäßige Versetzen der Tränke zur Verhinderung von Geilstellenbildung sowie das Entfernen von vorhandenen Geilstellen durch Ausmähen sind weitere wertvolle Maßnahmen zur Senkung des Infektionsdruckes. Das Abschleppen der Weide ist dann sinnvoll, wenn es bei trockenem Wetter durchgeführt wird. So werden die Larven auf der Weide verteilt und trocknen aus, während bei feuchtem Wetter dadurch nur eine Erhöhung des Infektionsrisikos bewirkt wird, da die Larven sich dann gleichmäßig auf der ganzen Weide entwickeln (HERD 1986a; ABBOTT 1998). Hohe Besatzdichte ist zu vermeiden, und Umtriebsweiden sind Standweiden vorzuziehen (RIBBECK 1997).

2.1.8.2 Anthelminthikaeinsatz

Die wichtigsten drei Anthelminthikaklassen, die auch in Deutschland für das Pferd zugelassen sind, sind die BZ und Probenzimidazole, PYR und die ML, (DUNCAN 1985; DIPIETRO u. TODD 1987). In Anbetracht des in den letzten Jahren stark gestiegenen Vorkommens von Resistenzen gegen einige Wirkstoffe ist es wichtig, Anthelminthika gezielt einzusetzen. Die Kombination mit oben aufgeführten Maßnahmen ermöglicht eine wirkungsvolle Bekämpfung der Strongyliden bei minimalem Anthelminthikaeinsatz. Wichtig sind eine exakte Dosierung und die Kontrolle der Wirksamkeit mittels Kotuntersuchungen, um Resistenzen frühzeitig zu erkennen. Gebräuchlich ist der Wechsel zwischen Medikamenten verschiedener Wirkstoffklassen entweder nach jeder Anwendung oder im jährlichen Wechsel. Von dem langfristigen Einsatz eines einzigen Wirkstoffes sowie von zu kurzen Entwurmungsintervallen wird abgeraten, da hiermit die Resistenzentstehung gefördert wird. Die planmäßige Chemotherapie dient der Reduktion der Ausscheidung von Strongylideneiern und soll den Infektionsdruck auf der Weide senken. In der Literatur sind hierfür verschiedene Verfahren

beschrieben worden. Empfohlen wird besonders der Einsatz von IVM (0,2 mg/Kg) oder MOX (0,4 mg/Kg) zu Beginn der Weidesaison und zweimal in achtwöchigem Intervall. Eine weitere erfolgreiche Methode ist Gabe von IVM zu Beginn und zum Ende der Weidesaison und einer dritten Behandlung im Juli mit PYR (7,5 mg/Kg). Eine selektivere aber auch aufwendigere Prophylaxe ist die Entwurmung anhand der EpG-Werte. Demnach wird die ganze Herde behandelt, wenn mehr als 50 % der Pferde ein EpG > 200 aufweisen. Dafür müssen die Pferde regelmäßig auf Strongyliden untersucht werden. Der Einsatz von BZ ist aufgrund der verbreiteten Resistenzlage kritisch zu beurteilen. Eine Ausnahme stellt die Verabreichung von Oxfendazol (OxfBZ) oder Fenbendazol (FBZ) bei therapeutischer Dosierung (7,5-10 mg/Kg) an fünf aufeinander folgenden Tagen da, welche sich als wirksam in der Therapie einer manifesten Cyathostominose sowie gegen BZ-resistente Strongyliden erwies. In den U.S.A. wird unter anderem die tägliche orale Gabe von Pyrantel-Tartrat-Pellets (2,65 mg/Kg) mit dem Futter (Strongid[®] C, Pfizer, New York, NY) empfohlen, die gute Ergebnisse zeigte (VALDEZ et al 1995). Allerdings ist dieses Entwurmungsregime hinsichtlich der Resistenzentstehung und der Belastung des Wirtsorganismus durch die tägliche Anthelminthikagabe kritisch zu beurteilen (HERD 1992; RIBBECK 1997). Für Fohlen und Jährlinge muß die verminderte Wirkung von Anthelminthika berücksichtigt werden, die vermutlich auf mangelnder Immunität beruht (HERD 1986a, 1992; HERD u. MAJEWSKI 1994; BOERSEMA et al. 1996). Wichtig ist, dass jedes neue Pferd im Bestand auf Würmer untersucht und noch vor dem Weidegang entwurmt wird (HERD 1992; RIBBECK 1997).

2.1.8.3 Biologische Maßnahmen

Aufgrund der wachsenden Resistenzproblematik sind in den letzten zwei Jahrzehnten die Bemühungen um eine alternative Parasitenkontrolle immer stärker geworden. Ein neuer Ansatz ist eine biologische Bekämpfung von Endoparasiten mittels parasitisch lebender Pilze. Diese sollen nicht eine Eliminierung sondern eine Reduktion der infektiösen dritten Larven auf der Weide bewirken und somit den Infektionsdruck senken. Obwohl an vielen Pilzarten geforscht wurde zeigte sich eine Spezies bis jetzt am erfolgreichsten in der Wurmkontrolle. Die Sporen von *Duddingtonia flagrans* werden mit dem Futter verabreicht, überstehen die Darmpassage und keimen bei entsprechenden Wetterbedingungen in den Kothaufen aus. Sie

bilden ein dreidimensionales Hyphennetz aus, in dem freie Larvenstadien von Nematoden hängenbleiben. Fütterungsversuche mit Sporen von *D. flagrans* zeigten in verschiedenen Studien bei Wiederkäuern und Pferden eine signifikante Reduktion der infektiösen Larven im Kot. Derzeit wird untersucht in welchem Maße sich *D. flagrans* und andere Pilzarten für den regulären Einsatz in der Endoparasitenbekämpfung eignen (FERNÁNDEZ 1997; LARSEN 2000).

2.2 Anthelminthika und ihre Wirkungsmechanismen

2.2.1 Benzimidazole

2.2.1.1 Wirkstoffe

Seit der erste Vertreter der BZ, das Thiabendazol (TBZ) vor 40 Jahren beschrieben wurde (BROWN 1961) sind eine Vielzahl verwandter Wirkstoffe entwickelt worden. Die wichtigsten sind Albendazol (ABZ), Cambendazol (CBZ), Fenbendazol (FBZ), Flubendazol (FIBZ), Mebendazol (MBZ), Oxfendazol (OxfBZ) und Oxibendazol (OxBZ). Die Benzimidazole zeichnen sich durch ein breites Wirkungsspektrum mit hohem therapeutischen Index sowie durch eine starke Wirkung (90-100%) gegen lumenale Stadien von kleinen Strongyliden aus (DIPIETRO u. TODD 1987; LACEY 1990; HERD 1992). Die selektive Toxizität gegenüber Wirts- und Parasitentubulin beruht auf der höheren Affinität der Benzimidazole zum β -Tubulin der Parasiten (LACEY 1990). Allerdings zeigen die meisten Vertreter dieser Wirkstoffklasse keine Wirksamkeit gegen enzystierte Entwicklungsstadien in der Darmwand. Ausgenommen ist die Gabe von Oxfendazol bei therapeutischen Dosierung sowie die Gabe von Fenbendazol an fünf aufeinander folgenden Tagen bei therapeutischer oder etwas höherer Dosierung (7,5 – 10 mg/Kg), was eine Reduktion von 91,5 – 99,4 % bewirken soll (DUNCAN 1985; ABBOTT 1998a, 1998b; DUNCAN et al. 1998). Die Probenzimidazole wie Benomyl, Netobimin und Febantel haben keine direkte Wirkung sondern werden erst durch enzymatische Veränderungen durch den Wirtsmetabolismus zu potenten Wirkstoffen umgebaut. Diese Stoffwechselprodukte zeigen die gleiche Wirkung wie die anderen Benzimidazole (GOTTSCHALL et al. 1990; MARTIN 1997).

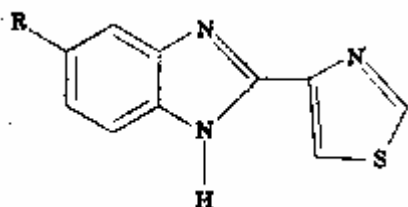


Abbildung 1: Strukturformel der BZ

2.2.1.2 β -Tubulin

2.2.1.2.1 Aufbau und Funktion der Mikrotubuli

Mikrotubuli sind hochkonservierte Proteine, die in fast jeder Eukaryotenzelle vorkommen. Sie sind unter anderem notwendig für die Zellteilung, die Strukturbildung des Cytoskeletts und von Zellfortsätzen, den intrazellulären Transport und die Exozytose sowie für die Bewegung von Flagellen und Geißeln (DUSTIN 1984; CLEVELAND u. SULLIVAN 1985; SULLIVAN 1988; MARTIN 1997). Die Untereinheit der Mikrotubuli ist das Tubulin, ein heterodimeres lösliches Protein, das seinerseits von zwei engverwandten 50 kDa Proteinen, α - und β -Tubulin, gebildet wird. Sowohl α - als auch β -Tubulin umfassen ca. 450 Aminosäuren und enthalten Bindungsstellen für GTP (DUSTIN 1984; MARTIN 1997). Tubulin und Mikrotubuli liegen in der Zelle in einem dynamischen Gleichgewicht vor, das von einer Reihe endogener Faktoren abhängt. Einer davon ist die Anwesenheit von mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP), die der Stabilität der Mikrotubuli dienen. Des Weiteren beeinflussen GTP, $MgCl_2^+$, Ca^{2+} , Calmodulin sowie Temperaturänderungen die Polymerisation (SULLIVAN 1988; LACEY 1990; MARTIN 1997). Mikrotubuli sind röhrenförmige Zellorganellen, die gebildet werden indem sich die Tubulineinheiten zu länglichen Protofilamenten zusammenlagern. Durch ringförmige Anordnung der Protofilamente entsteht ein Röhrensystem. Dieses Gebilde hat einen positiven Pol, an dem ständig weitere Tubulineinheiten angelagert werden, und einen negativen Pol, an dem sie abgebaut werden (MARTIN 1997). Bei Säugern sowie bei den meisten Eukarioten bilden 13 solcher Protofilamente einen Ring. Bei einigen Nematoden fand man allerdings Abweichungen. So sind bei *Caenorhabditis elegans* in den meisten Körperzellen Mikrotubuli mit 11 Protofilamenten zu finden, während in den sechs berührungssensitiven Neuronen 15 typisch sind (CHALFIE u. THOMSON 1982). *Ascaridia galli* besitzt nur Mikrotubuli mit 11 Protofilamenten und *Trichostrongylus colubriformis* 11, 12 oder in Neuronen 14 (DAVIS u. GULL 1983).

2.2.1.2.2 Molekularbiologie des β -Tubulins

Sowohl α - als auch β -Tubuline sind Produkte von Multigenfamilien, die im Genom verteilt sind. Tubulin-DNA Sequenzen sind bei allen Metazoen hochkonserviert (CLEVELAND u. SULLIVAN 1985; LACEY 1990). So wurde zwischen dem β -Tubulin aus Gehirngewebe von Huhn und Schwein >99% Übereinstimmung der Aminosäuren-Sequenz gefunden.

Überraschenderweise konnten innerhalb einer Spezies weitaus größere Abweichungen gefunden werden. Man stellte fest, dass die Polypeptide neben hochkonservierten Sequenzen auch heterogene Bereiche enthielten. Diese sind nicht wahllos verstreut, sondern abschnittsweise verteilt. Zwischen den Aminosäuren 401 und 425 findet sich eine Sequenz, die bei allen untersuchten Spezies identisch ist. Die variablen Bereiche befinden sich überwiegend im Bereich des carboxyterminalen Endes. Einige konservierte Bereiche wiederum liegen innerhalb der variablen Sequenzen, was Anlass zu der Vermutung gab, dass diese variablen Sequenzen β -Tubulin-Isotypen kodieren (CLEVELAND u. SULLIVAN 1985). Bei vielen Spezies wurden bisher Isotypen identifiziert, bisher aber blieb der Nachweis für zell- oder funktionsspezifische β -Tubulinisotypen aus. Bei Säugetieren und Vögeln wurden sechs Isotypklassen nachgewiesen (SULLIVAN 1988). Die Analyse zahlreicher β -Tubulinsequenzen bei Nematoden lässt darauf schließen, dass nur bei engverwandten Spezies Isotypklassen vorkommen, die nicht von allen Nematoden geteilt werden (GEARY et al. 1998). Bei *C. elegans* sind bisher drei Isotypen (ben1, tub1, mec7) festgestellt worden (DRISCOLL et al. 1989). GUENETTE et al. (1991, 1992) wiesen bei *Brugia pahangi* zwei Isotypen nach, die nicht in allen Entwicklungsstufen gleich exprimiert wurden. So kam Isotyp 2 nur bei adulten Männchen vor. Bei *Dirofilaria immitis* und *Onchocerca volvulus* wurde nur ein Isotyp gefunden (GEARY et al. 1998). Bei zahlreichen Untersuchungen an *Haemonchus contortus* und *T. colubriformis* wurden die Isotypen 1 und 2 nachgewiesen, die in ihren Carboxyenden verschieden sind (GEARY et al. 1992; KWA et al. 1993a, 1993b; BEECH et al. 1994), allerdings werden weitere Isotypen nicht ausgeschlossen. Kürzlich sind die ersten β -Tubulinsequenzen von zwei Vertretern der kleinen Strongyliden veröffentlicht worden. Bei *Cc. Nassatus* fand man Sequenzen, die hohe Übereinstimmung mit dem Isotyp 1 von *H. contortus* aufwiesen (98%). Aufgrund der Ähnlichkeit wurden sie ebenfalls als Isotyp 1 eingestuft. Untersuchungen an *Cy. Coronatum* zeigten Übereinstimmungen von 95-96% (PAPE et al. 1999, 2001).

2.2.1.3 Wirkungsweise der Benzimidazole

Benzimidazole wirken, indem sie an das Tubulin binden und somit die Polymerisation zu Mikrotubuli hemmen. Dabei ist es nicht notwendig, alle gelösten Tubulindimere zu binden. Das sogenannte „capping“, die Bindung von BZ an die Mikrotubuli, verhindert eine weitere

Anlagerung von Tubulineinheiten an den positiven Pol, während von der anderen Seite her depolymerisiert wird (LACEY 1990). Im Zusammenhang mit Benzimidazolen sind zwei unabhängige Mechanismen postuliert worden. In frühen Untersuchungen wurde die Hemmung des Fumarat-Reduktase-Systems und damit des Elektronentransports der Mitochondrien bei Pilzen und BZ-sensiblen Nematoden festgestellt (SANGSTER et al. 1985). Der erste Hinweis auf das Tubulin wurde in Fütterungsversuchen mit MBZ bei mit *Ascaris suum* infizierten Schweinen erbracht. Das Anthelminthikum bewirkte eine Reduktion der Mikrotubuli in den Darmzellen der Nematoden (BORGERS u. DE NOLLIN 1975). Zur gleichen Zeit entdeckten Forscher der Firma Janssen Pharmazeutika, dass ein Vertreter der BZ, das Nocodazol die Polymerisation von Mikrotubuli bei Säugern hemmte (HOEBEKE 1976). Bindungsstudien mit Colchizin konnten diese Wirkung auch für diverse andere BZ bestätigen (FRIEDMANN u. PLATZER 1978; IRELAND et al. 1979; KÖHLER u. BACHMANN 1981; LACEY u. PRICHARD 1986). Damit war der Beweis für die hohe Affinität der BZ für die Colchizin-Bindungsdomäne erbracht. Ungeklärt war indessen die selektive Wirksamkeit der BZ. Obwohl bewiesen war, dass *in vitro* auch Säugertubulin von BZ gebunden wurde, blieb die Anwendung der therapeutischen Dosis beim Wirtstier ohne Symptome. In Bindungsstudien mit embryonalem Tubulin von *A. suum* und bovinem Tubulin aus Gehirnzellen wiesen FRIEDMANN u. PLATZER (1980) eine wesentlich höhere Affinität von MBZ und FBZ zu dem Nematodentubulin nach und schlossen daraus, dass der Grund für eine selektive Toxizität in den Unterschieden zwischen Säuger- und Nematodentubulin lag. Andere wiederum hielten die unterschiedliche Anzahl von Protofilamenten in den Mikrotubuli für den Grund (DAVIS u. GULL 1983).

2.2.1.4 Molekularer Hintergrund der Benzimidazolresistenz

Die Resistenz eines Erregers jeglicher Art gegen einen Wirkstoff hängt generell mit einer Veränderung von Absorption, Verteilung, Verstoffwechslung, Exkretion oder Angriffspunkt zusammen (LACEY 1990). Aufgrund von Bindungsstudien, die eine unterschiedliche Affinität des β -Tubulins resistenter und sensibler Populationen von *H. contortus* (LACEY u. PRICHARD 1986; LUBEGA u. PRICHARD 1991) und *T. colubriformis* (SANGSTER et al. 1985) zu BZ zeigten, vermutete man den Resistenzmechanismus in einer molekularen Veränderung des β -Tubulins (ENOST u. COLES 1990; ROOS 1990). Untersuchungen zum

Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) wiesen Unterschiede im β -Tubulin-Gen sensibler und resistenter Populationen von *H. contortus* nach. Während man bei sensiblen Populationen zwei bis sechs Fragmente fand, konnte man bei den resistenten Populationen nur ein bis zwei feststellen. Alle aber wiesen ein Fragment bestimmter Länge auf (9 Kb), das auch bei einigen sensiblen Populationen gefunden worden war. Dies gab Grund zu der Vermutung, dass es sich bei der Resistenzentwicklung nicht um eine Deletion handelte, sondern dass auch in sensiblen Populationen schon in geringen Mengen resistente Individuen vorhanden waren (ROOS 1990, ROOS et al. 1990). Andere Versuche bestätigten diese Ergebnisse (LUBEGA u. PRICHARD 1991; KWA et al. 1993a, 1993b). Bei Untersuchungen der Isotypen des β -Tubulins von *H. contortus* stellte sich heraus, dass bei resistenten Individuen nur noch ein bestimmtes Allel des Isotyps 1 vorhanden war im Gegensatz zu sensiblen Tieren, die sowohl eine Vielfalt von Isotyp 1-Allelen als auch des Isotyps 2 aufwiesen (KWA et al 1993a, 1993b; LE JAMBRE 1993; LUBEGA et al 1994). Wie schon von KWA et al. (1993c) vermutet stellte sich heraus, dass sich die Isotyp1- β -Tubuline resistenter und sensibler Populationen von *H. contortus* an drei Stellen im Gen unterscheiden (Codon 76, 200 und 368) (GEARY et al. 1992; KWA et al. 1993c, 1994). Interessanterweise war eine Veränderung im Codon 200 (Phe für BZ-S und Tyr für BZ-R) auch bei anderen Organismen in Verbindung mit BZ-Resistenz beschrieben worden. Die Lage des Codon 200 nahe einer GTP-Bindungsdomäne schien eine Veränderung des Polymerisationsverhaltens der Mikrotubuli resistenter Würmer plausibel zu erklären (KWA et al. 1994, 1995). Die Entwicklung einer allelspezifischen PCR ermöglichte die Untersuchung einzelner Individuen hinsichtlich ihres Genotyps. Das Ergebnis zeigte eine signifikante Korrelation zwischen der Punktmutation im Codon 200 von TTC zu TAC und dem Vorhandensein von Resistenz. Derselbe Zusammenhang konnte auch für *T. colubriformis* (KWA et al. 1994, 1995) und *Teladorsagia circumcincta* (ELARD et al. 1996, 1999; SILVESTRE u. HUMBERT 2000) festgestellt werden. Die Autoren vermuteten, dass die drei wichtigsten Vertreter der Trichostrongyliden der Hauswiederkäuer die gleichen Resistenzmechanismen entwickelt hatten (ELARD et al. 1996, 1999). KWA et al. gelang 1995 die Übertragung von BZ-Sensibilität auf BZ-resistente *C. elegans* durch Injektion von *H. contortus* Genkonstrukten, die im Codon 200 für Phe kodierten. Die Injektion von Genkonstrukten mit Tyr an dieser Stelle änderten den Resistenzstatus von *C. elegans* nicht.

Damit war der Beweis erbracht, dass der Resistenzmechanismus von *H. contortus* auf der Punktmutation im Codon 200 basiert (KWA et al. 1995). Bei *C. elegans* hängt der Resistenzstatus vom β -Tubulin *ben-1* Locus ab. Fehlt dieser Genort, dann sind die betroffenen Individuen gegen Benomyl resistent. Diese Tiere sind voll lebensfähig, demzufolge scheint *ben-1* nicht lebenswichtig zu sein. Die β -Tubulin Loci *ben-1*, *mec-7* und *tub-1* unterscheiden sich an mehreren Positionen. Bei allen drei Isotypen vorkommende Unterschiede befinden sich an den Positionen 56, 218, 231, 278, 328 und 331. Die Mutation im Codon 200 ist nur zwischen *ben-1* und *tub-1* zu finden. Letztendlich ist ungeklärt, ob eine oder mehrere Mutationen bei *C. elegans* für BZ-Resistenz verantwortlich sind, oder ob möglicherweise der Unterschied im Carboxyende von *ben-1* eine Rolle spielt (DRISCOLL et al. 1989). Die Spezies *B. pahangi*, *D. immitis* und *O. volvulus* kodieren im Codon 200 ebenfalls für Phe, was auf BZ-Sensibilität hinweist. Aber obwohl man diese Aminosäure sowohl bei Adulten als auch bei Mikrofilarien an dieser Stelle findet, wirken BZ nur auf die Mikrofilarien. Der Grund für die Unempfindlichkeit der adulten Filarien ist noch nicht geklärt (GUENETTE et al. 1991; GEARY et al. 1998). Neueste Untersuchungen an kleinen Strongyliden zeigten bei sieben verschiedenen Arten eine hohe Korrelation von Tyr-Allelen im Codon 200 des β -Tubulin und dem Auftreten von BZ-Resistenz (PAPE et al. 2002; SAMSON-HIMMELSTJERNA et al. 2002a)

SUTHERLAND et al. (1988) fanden neben der Wirkung von BZ auf Tubulin noch einen anderen Zusammenhang. Sie stellten fest, dass bei BZ-resistenten Trichostrongyliden eine höhere unspezifische Acetylcholinesteraseaktivität als bei BZ-sensiblen zu beobachten war. Sie vermuteten, dass das Enzym eine Entgiftungsfunktion erfüllt und möglicherweise die Wirkung des BZ beeinträchtigt. Eine weitere Möglichkeit war, dass die veränderte Struktur des Tubulins zu einer erhöhten Ausschüttung des Enzyms führt. Erste Versuche an Levamisol- (LEV) und Morantel- (MOR) resistenten *Ostertagia circumcincta* und *T. colubriformis* zeigten auch hier erhöhte Acetylcholinesterase –Werte (AChE) (SUTHERLAND et al. 1988, 1989; SUTHERLAND U. LEE 1990, 1993).

Ein weiterer Mechanismus wird seit wenigen Jahren diskutiert. P-Glykoprotein (P-gp) ist ein Membran-Transport-Protein, dass in menschlichen Krebszellen für multiple Resistenz gegen Medikamente verantwortlich ist. Auch BZ dient in solchen Zellen als Substrat für den Transport (NARE et al. 1994). Substanzen, die bei menschlichen Zellen diesen Effekt der

multiplen Resistenz aufheben, wie z.B. Verapamil führten bei Eiern von *H. contortus* zu einer Verstärkung der Wirkung von BZ (BEUGNET et al. 1997; KERBOEUF et al. 1999). BLACKHALL et al.¹ fanden 6 Allele für P-gp, deren Häufigkeiten sich zwischen BZ-resistenten und –sensiblen Isolaten von *H. contortus* unterschieden. Insbesondere trat bei dem resistenten Isolat das Allel P auf, das bei sensiblen Individuen nicht gefunden wurde. Die Autoren schlossen daraus, dass dieser Mechanismus mit zum Resistenzgeschehen beiträgt. MERINO et al. (2002) konnten bei Versuchen an Zellkulturen und Mäusen keinen P-gp abhängigen Transport von ABZ feststellen und schlossen einen Zusammenhang für diese Substanz aus.

2.2.2 Makrozyklische Laktone

2.2.2.1 Wirkstoffe

Seit zwanzig Jahren wird eine weitere Anthelminthikagruppe eingesetzt, die ein sehr breites Spektrum besitzt. Man fasst die makrozyklischen Laktone (ML) auch unter dem Begriff Endectozide zusammen, da sie eine sehr starke Wirkung sowohl auf Endo- als auch auf Ektoparasiten haben. Man unterteilt sie in Avermectine (AVM) und Milbemycine (MBM). Zu den Avermectinen gehören Ivermectin (IVM), Doramectin (DOM), Eprinomectin (EPM), Selamectin (SLM) und Abamectin (ABM). Vertreter der MBM sind Moxidectin (MOX), Milbemycin (MBM) und Milbemycinnoxim (MBMO). Dabei handelt es sich bei den meisten Wirkstoffen um halbsynthetische Derivate von AVM (A₁, A₂, B₁, B₂), bzw. MBM und MBMO. Produziert werden die Ausgangsstoffe von verschiedenen Arten von *Streptomyces* (SCHOLTYSYG u. STEUBER 2002). Für Pferde sind derzeit IVM und MOX zugelassen. Sie zeichnen sich durch eine geringe Toxizität bei therapeutischer Dosierung (0,2 bzw. 0,4 mg/Kg) und eine gute Wirkung gegen adulte große und kleine Strongyliden sowie gegen Wanderlarven der großen Strongyliden aus (90 – 100 %) (DIPIETRO u. TODD 1987; HERD 1992). Zudem wird im Kot die Entwicklung zu dritten Larven gehemmt (TYRRELL et al. 2002). Während das IVM weniger wirksam gegen intramurale Stadien der kleinen Strongyliden ist (HERD 1992), bewirkt das MOX eine Reduktion der inhibierten vierten Larven (EYSKER et al. 1997).

¹ laut persönlicher Mitteilung von Herrn W. Blackhall, Hannover am 15. Dezember 2002

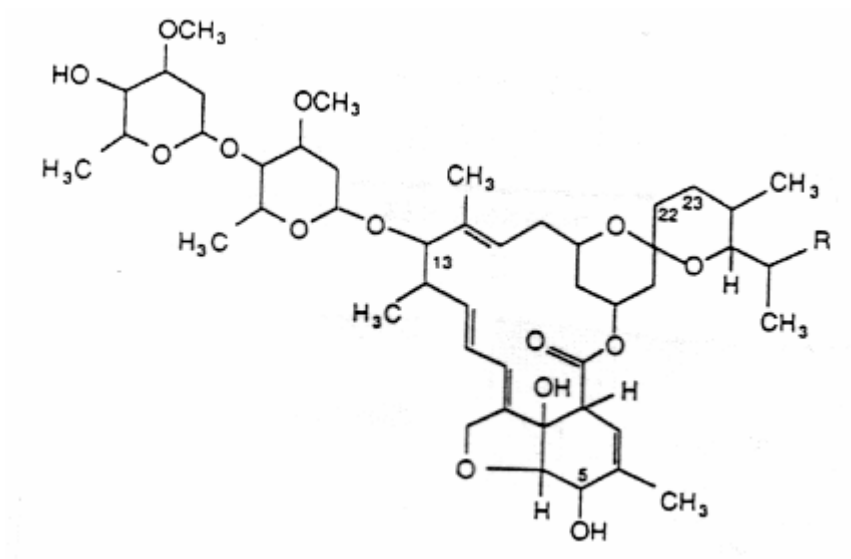


Abbildung 2: Strukturformel von IVM.

2.2.2.2 Wirkungsmechanismus

Der Wirkungsmechanismus der ML ist noch nicht vollständig geklärt. Bis auf wenige Ausnahmen (PAIEMENT et al. 1999) zeigen die meisten Untersuchungen die gleichen Ergebnisse für die hier relevanten Wirkstoffe (IVM + MOX), was auf denselben oder einen sehr ähnlichen Wirkungsmechanismus schließen lässt (CULLY et al. 1994; CONDER u. CAMPBELL 1995; SHOOP et al. 1995; BROWNLEE et al. 1997; KÖHLER 2001). Frühe Untersuchungen ließen einen Zusammenhang zwischen ML-Aktivität und von γ -Aminobuttersäure (GABA) abhängigen Chloridkanälen vermuten. Diese ließ sich zwar in einigen Versuchen bestätigen (FRITZ et al. 1979; MELLIN et al. 1983; ALBERT et al. 1986) aber es gab auch Ergebnisse, die eine Abhängigkeit widerlegten (MELLIN et al. 1983; DUCE u. SCOTT 1985). Weitere Studien wiesen auf glutamatgesteuerte Chloridkanäle als Angriffsziel bei Insekten und Krustentieren hin (DUCE u. SCOTT 1985). Gesichert ist, dass ML bei wirbellosen Tieren eine Steigerung des Cl⁻Einstroms an Nerven- und Muskelzellen bewirken, was zu einem stark erhöhten Ruhepotential und einer funktionellen Paralyse führt (TURNER u. SCHAEFFER 1989; SHOOP et al. 1995). Untersuchungen an *C. elegans* und *A. suum* zeigten auch bei Nematoden eine Wirkung von AVM auf glutamatgesteuerte Chloridkanäle (CULLY et al. 1994; ARENA et al. 1995; MARTIN 1996). Dabei spielt

einerseits die Wirkung auf die somatische Muskulatur eine Rolle, wobei eine hohe Dosierung notwendig ist, bevor diese Wirkung eintritt (KÖHLER 2001). Viel empfindlicher ist dagegen die Muskulatur des Pharynx. Studien an *C. elegans*, *H. contortus* und *A. suum* haben gezeigt, dass ML schon bei therapeutischer Dosis zu einem Verlust der Pumpaktion der Pharynxmuskulatur führten, wodurch die Nahrungsaufnahme der Parasiten blockiert wird (AVERY u. HORWITZ 1990; GEARY et al. 1993; MARTIN 1996; BROWNLEE et al. 1997). Die Autoren vermuteten, dass die Hauptwirkung im Nahrungsentzug und dem Verhungern der Parasiten besteht (GEARY et al. 1993; PAIEMENT et al. 1999; SANGSTER u. GILL 1999). SHERIFF et al. (2002) konnten in jüngsten Untersuchungen auch die paralytische Wirkung von IVM auf die Pharynxmuskulatur von *T. colubriformis* in einem *in vitro* Versuch bestätigen. Allerdings führten *in vivo* Untersuchungen an *H. contortus* nicht zu veränderter Pharynxaktivität bei Würmern, die nach einer IVM-Behandlung von Schafen aus dem Kot isoliert wurden (SHERIFF et al. 2001).

Geringe Mengen an ML verstärken zudem die Wirkung von Glutamat, während höhere Mengen direkt an den Kanälen zu einer irreversiblen Öffnung führen (MARTIN 1997; KÖHLER 2001). Zusätzlich potenzieren höhere Konzentrationen von ML auch die Wirkung von GABA an den entsprechenden Kanälen. Da dies aber erst in recht hohen Dosierungen der Fall ist, steht dieser Mechanismus im Hintergrund (KÖHLER 2001). Die ausgesprochen hohe selektive Toxizität lässt sich damit erklären, dass diese stark ML-empfindlichen Chloridkanäle bei Vertebraten nicht vorkommen (MARTIN 1997; KÖHLER 2001) und die therapeutischen Konzentrationen zu niedrig sind, um dem Wirt zu schaden. Allerdings gibt es einige Tierarten, die sehr empfindlich auf IVM reagieren. So kommt es bei Schildkröten und Hunden, bevorzugt Collies und möglicherweise Bobtails, zu Überempfindlichkeitsreaktionen, die mit ZNS-Depression, Somnolenz, Ataxie und Tremor einhergehen. Dabei treten diese Nebenwirkungen schon ab Dosierungen von 0,05 mg IVM/Kg auf (UNGEMACH 2002).

2.2.2.3 Molekularer Hintergrund

Arbeiten an *C. elegans* haben bewiesen, dass ein wichtiger Angriffspunkt für die ML eine Gruppe von glutamat-gesteuerten Chloridkanälen (GluCl) ist, welche spezifisch für wirbellose Tiere und phylogenetisch eng verwandt mit den GABA-abhängigen Chloridkanälen der Wirbeltiere sind. Diese Kanäle sind Proteine-Komplexe, die in der Zellwand verankert sind

und α - und β -Untereinheiten aufweisen (CULLY et al. 1994; ARENA et al. 1995; CULLY et al. 1996, MARTIN 1996, DENT et al. 1997a; VASSILATIS et al. 1997). Für diese Untereinheiten wurden bei *C. elegans* zwei Genfamilien gefunden, GluCl α und GluCl β . Die Ergebnisse von elektrophysiologischen Untersuchungen deuten daraufhin, dass Glu an die β -Untereinheit und IVM an die α -Untereinheit bindet (CULLY 1994). Drei Genklassen für GluCl α - wurden bei *C. elegans* gefunden: glc-1 und avr-14, die für neuronale GluCl α 1 und 3 kodieren und avr-15, das für GluCl α 2 an pharyngealen Muskelzellen kodiert (DENT et al. 1997b; VASSILATIS et al. 1997; DENT et al. 2000). LAUGHTON et al. (1997) fanden weitere Untereinheiten, die durch das alternativ gespleißte Gen gbr-2 kodiert werden und vermuteten eine neue γ -Untereinheit. Später stellte sich heraus, dass gbr-2 und avr-14 identisch sind (LAUGHTON et al. 1997; JAGANNATHAN 1999). Expressionsstudien geben Anlaß zu der Vermutung, dass die Kombination von GluCl α 2 und β -Untereinheiten die natürliche Form von GluCl bei Nematoden darstellen, allerdings kann die Beteiligung weiterer Gene oder zusätzlicher Angriffspunkte für ML nicht ausgeschlossen werden (VASSILATIS et al. 1997). Bei *H. contortus* wurden drei GluCl-Gene gefunden, von denen zwei ortholog zu GluCl β und gbr-2/avr-14 von *C. elegans* sind (DELANY et al. 1998; JAGANNATHAN et al. 1999). Bei *A. suum* konnte ein Gen nachgewiesen werden, das ortholog zu gbr-2/avr-14 ist. Eng verwandte Sequenzen wurden auch bei *O. volvulus* und *D. immitis* gefunden (JAGANNATHAN et al. 1999; SANGSTER u. GILL 1999). Trotz der großen Gemeinsamkeiten zwischen den untersuchten Parasiten und *C. elegans* waren Unterschiede festzustellen zwischen der Expression von GluCl β , welches bei *C. elegans* in pharyngealen Muskelzellen nachgewiesen wurde, während es bei *H. contortus* in einigen Motoneuronen exprimiert wird (LAUGHTON et al. 1997; DELANY et al. 1998).

2.2.2.4 Resistenzmechanismus

Obwohl die Wirkung von ML auf GluCl nachgewiesen ist, sind die Ergebnisse von Resistenzuntersuchungen sehr widersprüchlich. Während MOX sich in einer Studie als wirksam gegen IVM-resistente *H. contortus* erwies (COLES et al. 1994), zeigten sich andere IVM-resistente Populationen auch resistent gegen MOX (SANGSTER u. GILL 1999), was auf denselben Wirkungsmechanismus schließen lässt. Die Untersuchungen des Resistenzmechanismus wurden zum größten Teil mittels *in vitro* Tests durchgeführt. Bisher

gibt es nur einzelne Hinweise auf mögliche Mechanismen bei *C. elegans*, *H. contortus*, *T. colubriformis* und *O. circumcincta*. Bindungsstudien an *H. contortus* zeigten keinen Unterschied in der Bindungsaffinität von IVM bei sensiblen und resistenten Populationen (ROHRER et al. 1994), was darauf schließen lässt, dass sich die Resistenz nicht in einer molekularen Veränderung des Zielortes äußert. Andererseits konnte in unabhängigen Versuchen nachgewiesen werden, dass IVM bei resistenten Populationen von *H. contortus* nicht zu einer so starken Lähmung der Pharynxmuskulatur führte wie bei sensiblen Populationen, was ein Hinweis darauf war, dass die Resistenz mit einer Veränderung am Zielgewebe einherging (KOTZE 1998; SANGSTER u. GILL 1999). GILL und LACEY (1998) untersuchten das Verhalten von resistenten und sensiblen Isolaten von *H. contortus*, *T. colubriformis* und *O. circumcincta* im Larvenparalysetest (LPT) und dem Larvenmotilitätstest (LMT), wobei sie feststellten, dass sich resistente Populationen in fünf unterschiedlichen Phänotypen äußerten, die sich in ihrer Sensitivität gegenüber LPT, LMT und Paraherquamid unterschieden. Dieses Phänomen führten sie darauf zurück, dass die Resistenz bei den einzelnen Isolaten unter unterschiedlichen Voraussetzungen hervorgebracht worden war. Die Autoren schlossen daraus, dass mindestens zwei Angriffspunkte für die Wirkung von ML sowie für die Resistenzentwicklung von Bedeutung waren (GILL u. LACEY 1998). BLACKHALL et al. (1998) fanden für GluCl α ein vermehrtes Auftreten eines bestimmten Allels bei resistenten Populationen, während ein anderes Allel bei diesen Isolaten reduziert war. Die Häufigkeiten der Allele für GluCl β unterschieden sich nicht (BLACKHALL et al. 1998). Sie vermuteten, dass eine Veränderung an der α -Untereinheit möglicherweise die Bindungsaffinität von IVM nicht verändert, aber eine allosterische Hemmung hervorrief, durch die IVM den Ionenkanal nicht mehr öffnen konnte. Eine weitere Möglichkeit sahen sie in einer veränderten Genregulation aufgrund einer Mutation in der Promotorregion einer α -Untereinheit (BLACKHALL et al. 1998). HEJMADI et al. (2000) fanden eine Korrelation zwischen einer erhöhten Anzahl von Bindungsstellen für L-Glutamat mit geringer Bindungsaffinität und dem Auftreten von IVM-Resistenz bei *H. contortus*.

Genetische Untersuchungen an dem IVM-resistenten *H. contortus* Isolat (CAVR) ließ die Autoren vermuten, dass ein einziges Gen für Resistenz verantwortlich war (LE JAMBRE et al. 2000), während bei *T. colubriformis* auf ein Multigen-Geschehen vermutet wurde (GILL u. LACEY 1998). Bei *C. elegans* schien eine simultane Mutation an mindestens drei GluCl α -

Untereinheiten notwendig zu sein, um Resistenz hervorzurufen (DENT et al. 2000). In genetischen Studien an cDNA-Sequenzen von *H. contortus* war kein Unterschied in kodierenden Abschnitten von IVM-resistenten und –sensiblen Isolaten festzustellen (CHEESEMAN et al. 2001). Neueste genetische Untersuchungen an GABA-Rezeptoren von *H. contortus* und *C. elegans* zeigten einen Zusammenhang zwischen Expression einiger Sequenzen für GABA-Rezeptoruntereinheiten und dem Auftreten von IVM-Resistenz (BLACKHALL 1999; FENG et al. 2002). Einen ganz anderen Ansatz fanden XU und Kollegen (1998). Sie wiesen einen genetischen Polymorphismus mit einer erhöhten Expression von P-gp in IVM-resistenten Populationen von *H. contortus* nach. Die Umkehr der Resistenz durch Zugabe von Verapamil war der Hinweis für eine Beteiligung von P-gp am Resistenzmechanismus (XU et al. 1998). P-gp sind transmembrane Proteine, die für eine multiple Medikamentenresistenz bei Krebszellen des Menschen verantwortlich sind. Sie schleusen unspezifische cytotoxische Stoffe aus der Zelle aus (MOLENTO u. PRICHARD 1999b; SANGSTER et al. 1999a, 1999b). Auch andere Untersuchungen bestätigten einen Zusammenhang zwischen der Expression von P-gp und dem Auftreten von IVM-Resistenz (MOLENTO u. PRICHARD 1999b; SANGSTER et al. 1999b). MEALEY et al. 2001 fanden einen Zusammenhang zwischen der IVM-Überempfindlichkeit einer Subpopulation von Collies und dem Auftreten von Deletionsmutanten für das sogenannte „multi-drug-resistance“ Gen (*mdr1*), welches für ein P-gp kodiert und schlossen daraus, dass die Anwesenheit von P-gp die Wirkung von IVM abschwächt.

2.2.3 Tetrahydropyrimidine

2.2.3.1 Wirkstoffe

Zu den als Anthelminthika eingesetzten Pyrimidinen gehören Pyrantel (PYR), Oxantel (OX) und Morantel (MOR), wobei nur PYR als Tartrat oder Pamoat bei Pferden zugelassen ist (DIPIETRO u. TODD 1987; MARTIN 1997). PYR (7,5 mg/Kg) hat eine gute Wirksamkeit gegen kleine Strongyloiden, *S. vulgaris* und *Parascaris equorum* (95-97%). Weniger gute Wirkung wird gegen *S. edentatus*, *S. equinus*, *Anoplocephala perfoliata* und *Oxyuris equi* beobachtet. PYR ist unwirksam gegen *Strongyloides westeri*, *Habronema spp.* Und *Gasterophilus spp* (ECKERT 2000).

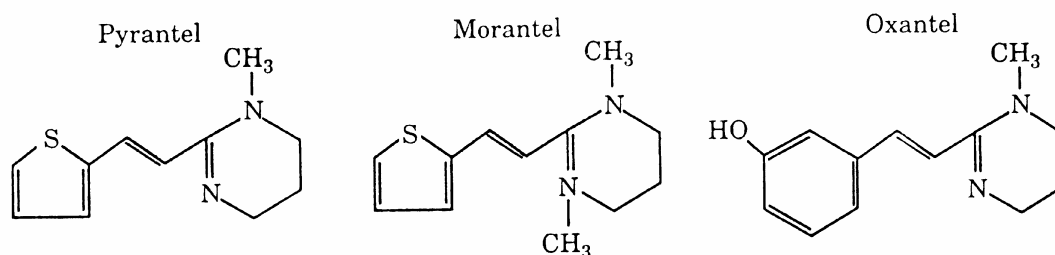


Abbildung 3: Strukturformeln von PYR, MOR und OX.

2.2.3.2 Wirkungsmechanismus

Die Pyrimidine wirken ebenso wie Levamisol und Butamisol, welche zu der Gruppe der Imidazothiazole zählen und heute beim Pferd nicht mehr eingesetzt werden, agonistisch an den nicotinergen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) (MARTIN 1997; KÖHLER 2001; SCHOLTSIK u. STEUBER 2002). Versuche an *A. suum* zeigten, dass die Zugabe jeder dieser Stoffe zu *A. suum* Präparationen Depolarisation und Kontraktion von Muskelzellen zur Folge hatte, was vermuten ließ, dass es sich um den gleichen Wirkungsmechanismus handelte (ACEVES et al. 1970; AUBRY et al. 1970; MARTIN 1982; HARROW u. GRATION 1985). Die Depolarisation kam durch Öffnung von nicht-selektiven Kationen-Kanälen zustande, und die parallele Anwendung von PYR und Acetylcholin (ACh) führte zu einer agonistischen Wirkung an den gleichen nicotinergen Rezeptoren (HARROW u. GRATION 1985). SANGSTER et al. (1998) konnten diese Ergebnisse mit Liganden-Bindungsstudien bestätigen. Bei den Parasiten hat diese Wirkung der nicotinergen Agonisten (nA) eine spastische Paralyse und die Ausscheidung mit dem Kot zur Folge (KÖHLER 2001). Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass die Wirkung bei höheren Konzentrationen abnimmt, was durch das Phänomen des „Channel Blocks“ erklärt wurde. Dabei kommt es durch die sehr großen positiv geladenen Anthelminthikamoleküle zu einem „Verstopfen“ der Kationenkanäle (COLQUHOUN u. SAKMAN 1985; HARROW u. GRATION 1985; ROBERTSON u. MARTIN 1993). Elektrophysiologische Studien an *A. suum* haben die Existenz nicotinerger nAChR an der Oberfläche von somatischen Muskelzellen bei Nematoden bewiesen (EVANS u. MARTIN 1996; MARTIN et al. 1996, 1998).

2.2.3.3 Molekularer Hintergrund

Die meisten molekularbiologischen Untersuchungen über diese Gruppe der Anthelminthika wurden mit LEV an *C. elegans* durchgeführt und die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf parasitische Nematoden und den Wirkungsmechanismus von PYR ist unklar (KÖHLER 2001). Bei Säugetieren sind die nAChR aus fünf Untereinheiten aufgebaut, die in der Zellmembran lokalisiert sind. Die Bindungsstelle für Ach liegt auf den α -Untereinheiten, dabei kann die Zusammensetzung der Untereinheiten variieren (SANGSTER 1999b; KÖHLER 2001). Arbeiten an *C. elegans* lassen darauf schließen, dass bei Nematoden ein ähnlicher Zusammenhang besteht (MARTIN et al. 1997). Während Ach an die α -Untereinheit bindet, vermutet man die Bindungsstelle für die nA an der Verbindungsstelle von α - und β -Untereinheit (MARTIN et al. 1997). ROBERTSON und MARTIN (1993) stellten mit der „Patch-Clamp“-Technik, einer elektrophysiologischen Methode zur Untersuchung des Verhaltens einzelner Ionenkanäle, bei den Ionenkanälen von *A. suum* unterschiedliche Leitfähigkeit fest. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass es unterschiedliche Kombinationen von Untereinheiten gibt, die unterschiedliche physiologische Eigenschaften hervorrufen. Untersuchungen an *Oesophagostomum dentatum* gaben Hinweise auf mindestens vier verschiedene nicotinerge Subtypen (MARTIN et al. 1997). Expressionsstudien an *Xenopus* Oozyten zeigten, dass verschiedene cDNA-Sequenzen der nAChR von *C. elegans* die Ausprägung von heteromeren Ionenkanälen zur Folge hatten, die sich durch LEV öffnen ließen (FLEMING et al. 1997).

2.2.3.4 Resistenzmechanismus

Hinsichtlich des Resistenzmechanismus bei nA ist nur wenig bekannt. Die meisten Untersuchungen wurden an *C. elegans*, *A. suum*, *O. dentatum* und einigen Trichostrongyliden mit LEV durchgeführt (KÖHLER 2001). Die Ergebnisse dieser Studien lassen allerdings darauf schließen, dass Resistenz mit einer Strukturveränderung an der Bindungsstelle für nA einhergeht (MARTIN et al. 1998; ROBERTSON et al. 1999; SANGSTER u. GILL 1999; MARTIN u. ROBERTSON 2000). Man fand heraus, dass bei *H. contortus* zwei Bindungsstellen mit unterschiedlicher Affinität eine Rolle spielen. Bei resistenten Individuen war die Bindung an Rezeptoren mit schwacher Affinität herabgesetzt, im Gegensatz zu LEV-

resistenten *C. elegans*, bei denen die Bindung an den Kanälen mit hoher Affinität herabgesetzt war (SANGSTER et al. 1998; SANGSTER u. GILL 1999). Die Autoren vermuteten, dass LEV-Resistenz bei den getesteten Isolaten in Zusammenhang mit einer Veränderung der Bindungsstellen mit schwacher Affinität stand. FLEMING et al. (1997) wiesen bei *C. elegans* mehrere Gene für nAChR nach, die im Zusammenhang mit LEV-Resistenz standen. Einige dieser Gene sorgten bei Expressionsstudien an *Xenopus* Oozyten für die Ausprägung fehlerhafter Rezeptoren (FLEMING et al. 1997). Der Vergleich von Sequenzen von nAChR-Untereinheiten bei *T. colubriformis*, *H. contortus* und *O. circumcincta* zeigte keinen Unterschied zwischen resistenten und sensiblen Individuen (WILEY et al. 1996; HOEKSTRA et al. 1997). Versuche an *O. dentatum* mit der „Patch-clamp“-Technik zeigten bei resistenten Tieren eine herabgesetzte LEV-induzierte Öffnung der Kanäle sowie eine verkürzte Öffnungszeit. Einer der nAChR-Subtypen fehlte bei den resistenten Populationen. Die Autoren vermuteten, dass es bei LEV-Resistenz eine Verschiebung in der Population der nAChR-Subtypen hin zu den weniger LEV-sensiblen nAChR gab (ROBERTSON et al. 1999). Entsprechende Versuche mit PYR-resistenten Populationen von *O. dentatum* lassen vermuten, dass sich der Resistenzmechanismus gegen nA ähnelt (ROBERTSON et al. 2000).

2.3 Anthelminthikaresistenz

2.3.1 Definition

AR ist dann vorhanden, wenn mehr Individuen einer Population therapeutische Konzentrationen eines Wirkstoffes tolerieren als in einer sensiblen Population der gleichen Spezies (PRICHARD et al. 1980). Eine ähnliche Definition ist die Veränderung der Allelhäufigkeit durch Anthelminthikaselektion in einer ursprünglich sensiblen Population (Köhler 2001; Sangster u. Gill 1999; Shoop 1993). Als Neben- oder Parallelresistenz wird ein Zustand bezeichnet, bei dem die Selektion durch einen Wirkstoff auch eine Resistenz gegen andere Wirkstoffe gleicher Wirkungsart hervorruft. Kreuzresistenz liegt bei gleichzeitiger Resistenz gegen Wirkstoffe unterschiedlicher Wirkstoffgruppen vor. Multiple Resistenz ist das Auftreten von Resistenz gegen zwei oder mehr unterschiedliche Wirkstoffgruppen (PRICHARD et al. 1980; WIESNER u. RIBBECK 1991; SHOOP 1993; SANGSTER 1999a). Resistenz muß unterschieden werden von Anthelminthikatoleranz, die durch mangelnde

Wirkstoffkonzentration, unterschiedliche Sensibilität verschiedener Entwicklungsstadien, geschlechtsabhängige Unterschiede, geographische Unterschiede derselben Spezies oder unterschiedliche Eigenschaften einer Spezies in verschiedenen Wirtstieren hervorgerufen werden kann (CONDER u. CAMBELL 1995; SANGSTER u. GILL 1999). Das Entstehen von AR ist abhängig von genetischen und biologischen Eigenschaften der Parasiten sowie von Anthelminthika-abhängigen Faktoren (DARGATZ ET AL. 2000; SANGSTER 2001).

2.3.2 Vorkommen

AR bei Endoparasiten des Pferdes sind bisher eindeutig für kleine Strongyliden nachgewiesen worden (KAPLAN 2002). Obwohl es einige Hinweise auf vereinzelte AR bei großen Strongyliden gegen BZ und PYR gibt (COLES et al. 1999), besteht die Möglichkeit, dass es sich dabei eher um mangelnde Wirksamkeit der Wirkstoffe gegen große Strongyliden handelt (KAPLAN 2002). LYONS et al. (1996) konnten trotz der Verwendung von BZ über 18 Jahre keine Resistenzentwicklung gegen große Strongyliden feststellen. BOERSEMA et al. (2002) fanden bei einem Pferdebestand eine verminderte Wirkung von ML gegen *P. equorum* und vermuteten Resistenz. Bei kleinen Strongyliden sind bisher weltweit Resistenzen gegen BZ, Phenothiazin, Piperazin und PYR nachgewiesen worden, während IVM in allen Untersuchungen noch die volle Wirkung zeigte (LYONS et al. 1999; SANGSTER 1999a; KAPLAN 2002). Seit den ersten Berichten über AR in den 70er Jahren (BARGER 1979) sind in zahlreichen Ländern Untersuchungen mit verschiedenen Anthelminthika durchgeführt worden. In Tab. 2 sind einige davon aufgeführt.

<u>Land</u>	<u>Literaturangaben</u>
Deutschland	BAUER et al. 1983; BAUER 1986; BÜRGER u. BAUER 1987; ULLRICH et al. 1988; PFÜLLER 1990; ZEEUW 1997; KLEI et al. 2001; SCHUMANN 2001;
Österreich	LIPPERT 1992 ;
Niederlande	EYSKER et al. 1989 u. 1991 ; BORGSTEEDE et al. 1993 ; BOERSEMA et al. 1995 u. 1996 ; EYSKER et al. 1997 ;
Belgien	DORNY et al. 1988 ; DEMEULENAERE et al. 1997 ;
Schweden	NILSSON et al. 1989;
Dänemark	BJØRN et al. 1991 ; CRAVEN et al. 1998 u. 1999 ;
Norwegen	IHLER 1995; IHLER und BJØRN 1996;
Slovenien	VARADY et al. 2000 ;
Ukraine	BORGSTEEDE et al. 1997 ;
Frankreich	COLLOBERT et al. 1998;
Großbritannien	LOVE et al. 1989 ; LUMSDEN et al. 1989 ; KING et al. 1990 ; MAIR u. CRIPPS 1991 ;
Irland	O`BRIAN u.GERAGHTY 1990;
U.S.A.	CHAPMAN et al. 1991, 1996 ; REPETA et al. 1993 ; TOLLIVER et al. 1993 ; MONAHAN et al.1996 ; LYONS et al. 1996 u. 2001 ; YOUNG et al. 1999 ; KLEI et al. 2001 ; MARTIN-DOWNUM et al. 2001 ;
Kanada	SLOCOMBE u. COTE 1977 ; SLOCOMBE et al. 1989 ; PICHE et al. 1989 ;
Brasilien	PEIRERA et al. 1991 ; COSTA et al. 1998 ;
Australien	BARGER u. LISLE 1979; WHITLOCK et al. 1980; KELLY et al. 1981;

Tabelle 2 : Untersuchungen zu AR in verschiedenen Ländern.

2.3.3 Diagnostik

2.3.3.1 In vivo-Tests

2.3.3.1.1 Kontrollierter Test

Nach den Richtlinien der World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) ist der kontrollierte Test eine zuverlässige Methode um die Effizienz von Anthelminthika zu bestimmen. Eine Gruppengröße von mindestens sechs Tieren wird empfohlen. Die Tiere sollen nach dem Zufallsprinzip in eine Behandlungs- und eine Kontrollgruppe eingeteilt werden. Ein bis maximal zwei Wochen nach Behandlung werden die Tiere getötet und die Wurmbürde gezählt und identifiziert. Zur Berechnung der Effizienz wird folgende Formel empfohlen: $\text{Effizienz \%} = (\text{mittlere Wurmzahl der Kontrolltiere} - \text{mittlere Wurmzahl der behandelten Tiere}) \times 100 / \text{mittlere Wurmzahl der Kontrolltiere}$. Als statistische Tests sind der t-Test und der Mann-Whitney-Test geeignet (DUNCAN et al. 1988; JOHANSEN 1989).

2.3.3.1.2 Kritischer Test

Der kritische Test wird bei einzeln gehaltenen Tieren durchgeführt, die experimentell oder natürlich infiziert und behandelt werden. Jedes Tier fungiert als eigene Kontrolle. Nach der Behandlung werden bis zur Tötung der Tiere nach sieben Tagen täglich Kotproben genommen und die Würmer gezählt. Am Tag sieben wird die im Tier verbliebene Wurmbürde ausgezählt. Die Ausgangswurmbürde ergibt sich aus der Summe der einzelnen Zählungen. Die Berechnung der Effizienz erfolgt nach: $\text{Anzahl der ausgeschiedenen Parasiten} / (\text{Anzahl der ausgeschiedenen Parasiten} + \text{Anzahl der im Tier verbliebenen Parasiten}) \times 100$. Der gepaarte t-Test und der Wilcoxon-Test können zur statistischen Überprüfung verwendet werden.

Sowohl der kontrollierte als auch der kritische Test sind geeignet zur Untersuchung der Parasitika-Effizienz gegen adulte und luminale larvale Stadien von kleinen und großen Strongyliden, *P. equorum*, *O. equi* sowie gegen Larven von *Gasterophilus spp.* (DUNCAN et al. 1988). Der kontrollierte Test ist auch geeignet für die Untersuchung der Larvenstadien in der Darmwand. Die Nachteile dieser Tests sind der hohe Zeit- und Kostenaufwand und die Notwendigkeit der Schlachtung von Versuchstieren (JOHANSEN 1989).

2.3.3.1.3 Eizahlreduktionstest

Der EZRT ist der einfachste und am häufigsten angewendete AR-Test. Er vergleicht die Eizahl pro einem Gramm Kot (EpG) vor und nach einer anthelminthischen Behandlung (GEERTS und GRYSSELS 2000; JOHANSEN 1989). Die W.A.A.V.P. gibt genaue Empfehlungen für die Durchführung des EZRT bei kleinen Wiederkäuern bezüglich Gruppengröße, Kotuntersuchung mit modifiziertem McMaster-Verfahren, Behandlung sowie Auswertung und Interpretation der Ergebnisse. Die Angaben für Pferde beschränken sich auf einen kurzen Kommentar, der auf die meist kleinen Gruppengröße der Pferdebestände im Vergleich zu Schafbetrieben hinweist, wodurch meist zuwenig Tiere für eine Kontrollgruppe vorhanden sind. Des Weiteren wird eine Eizahlreduktion (EZR) von weniger als 90 % als hinweisend für AR angenommen, ohne allerdings eine Empfehlung für die Berechnung beim Pferd zu geben (COLES et al. 1992). Die in verschiedenen AR-Studien bei Pferden durchgeführten EZRT unterscheiden sich oft in Durchführung und Berechnung der EZR, was einen direkten Vergleich schwierig macht (KAPLAN 2002). Verschiedene Formeln zur Berechnung von EZR beim Pferd werden in der Literatur angegeben:

$$(1) \text{ EZR} = (\text{EpG}_{\text{vB}} - \text{EpG}_{\text{nB}}) \times 100 / \text{EpG}_{\text{vB}}$$

(CHAPMAN 1991; YOUNG et al. 1999)

EZR = Eizahlreduktion in Prozent

EpG_{vB} = Eizahl pro Gramm Kot vor der Behandlung

EpG_{nB} = Eizahl pro Gramm Kot nach der Behandlung

$$(2) \text{ EZR} = 100 \times (1 - T / C)$$

(PEREIRA et al. 1991)

T = geometrisches Mittel der (EpG +10) in der behandelten Gruppe

C = geometrisches Mittel der (EpG +10) in der unbehandelten Gruppe

(3) $EZR = (1 - t_{10} / t_0) \times 100$

(KING et al. 1990)

t_0 = geometrisches Mittel der EpG in der behandelten Gruppe am Tag 0

t_{10} = geometrisches Mittel der EpG in der behandelten Gruppe am Tag 10

(4) $EZR = 100 \times (1 - EpG_B / EpG_K)$

(COLES et al. 1992)

EpG_B = es Mittel der EpG in der behandelten Gruppe Tag 10-14 nach Behandlung

EpG_K = es Mittel der EpG in der Kontrollgruppe Tag 10-14 nach Behandlung

CRAVEN et al. (1998) verglichen verschiedene Methoden der EZR-Berechnung. Methode 1 (COLES et al. 1992) berechnete EZR mit dem arithmetischen Mittel. Eine EZR < 95 % oder ein unterer Konfidenzintervall (uKL) von < 90 % war hinweisend auf AR. Methode 2 (COLES et al. 1992) war modifiziert für die Anwendung am Pferd. Hier war eine EZR von < 90 % ein Zeichen für Resistenz. Methode 3 (DASH et al. 1988) berechnete ebenfalls das arithmetische Mittel, aber Resistenz wurde mit einer EZR von < 80 % definiert. ANDERSON et al. (1988) ging in Methode 4 ebenfalls von einer Reduktion von < 80% aus, berechnete aber das geometrische Mittel. Methode 5 (BJØRN et al. 1991) verwendete geometrische Mittel und berechnete die EZR aus den EpG vor und nach Behandlung. Die Resistenzdefinition erfolgte wie in Methode 1. Diese Berechnungen führten zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich des Auftretens von AR, wobei Methode 1 am sensitivsten war (CRAVEN et al. 1998). Weitere Berechnungen wurden von POOK et al. (2002) durchgeführt. Da das arithmetische Mittel einfacher zu berechnen ist als das geometrische Mittel und es eine

bessere Schätzung der Würmbürde erlaubt, wird es von vielen Untersuchern empfohlen (COLES et al. 1992; DASH et al. 1988; MCKENNA 1990).

Die Vorteile des EZRT liegen in der einfachen Durchführung und dem geringen Kostenaufwand (BAUER 1983; COLES et al. 1992, JOHANSEN 1989). Zudem lässt er sich im Vergleich zu den *in vitro* Tests für alle Anthelminthika anwenden (COLES et al. 1992; VÁRADY u. CÖRBA 1999). Die Nachteile liegen in dem hohen Zeitaufwand und der geringen Sensitivität, da Resistenz unter 25 % nicht nachgewiesen werden kann. Man benötigt größere Tiergruppen, deren EpG-Werte > 150 liegen sollten (COLES et al. 1992; DARGATZ et al. 2000; JOHANSEN 1989; MARTIN et. Al. 1989; WALLER 1997). Unreife Larvenstadien, die noch keine Eier ausscheiden, werden durch den EZRT nicht erfasst und die Beteiligung verschiedener Spezies am Resistenzgeschehen bleibt unberücksichtigt. Ein weiterer Nachteil ist, dass manche Anthelminthika die Eiausscheidung zeitweilig senken, ohne allerdings die adulten Würmer abzutöten. Um diesen Effekt zu vermindern, sollten mind. 10 Tage zwischen Behandlung und zweiter Probennahme liegen (JOHANSEN 1989; PRICHARD et al. 1980). Trotzdem wird der EZRT als beste Möglichkeit für AR-Screening im Feld angesehen (COLES 1992, JOHANSEN 1989, KAPLAN 2002).

Da die *in vivo*-Methoden häufig zeitaufwendig und schwer zu reproduzieren sind und sich einzelne Tieren hinsichtlich Eiausscheidung, Immunität und Wirkstoffstoffwechsel (CRAVEN et al. 1999) stark unterscheiden können, wurde in den letzten Jahren vermehrt nach praktikablen und sensitiven *in vitro*-Tests geforscht.

2.3.3.2 In vitro-Tests

2.3.3.2.1 Larvenschlupfhemmtest

Der Larvenschlupfhemmtest (LSHT) ist als erstes von LE JAMBRE (1976) angewendet worden. Er wird von der W.A.A.V.P. als AR-Test für BZ empfohlen (COLES et al. 1992) und wurde von verschiedenen Untersuchern in unterschiedlichen Varianten durchgeführt (JOHANSEN 1989; JOHANSEN u. WALLER 1989; DORNY et al. 1994; BOERSEMA u. PANDEY 1997; MAINGY et al. 1998a, b; ULLRICH 1987; VÁRADY u. CORBA 1999). Generell macht man sich hierbei die ovizide Wirkung von BZ zunutze und die Eigenschaft resistenter Individuen, in höheren Wirkstoffkonzentrationen zu schlüpfen als sensible

(JOHANSEN 1989). Man inkubiert unembryonierte Nematodeneier mit verschiedenen Konzentrationen von Wirkstoff und stellt das Verhältnis von geschlüpften zu nichtgeschlüpften Larven fest. Dabei muß berücksichtigt werden, dass Nematodeneier mit zunehmender Entwicklung gegen BZ resistent werden und die Eier bis zur Durchführung des Tests maximal 24 Stunden bei vier °C, oder bis zu sieben Tage unter anaeroben Zuständen aufbewahrt werden können (HUNT u. TAYLOR 1989; ULLRICH 1987; WHITLOCK 1980). Durch die Berechnung von LD₅₀-Werten (BZ-Konzentration bei der 50 % der Larven nicht schlüpfen) mittels der Probitanalyse können Daten verschiedener Studien verglichen und AR anhand von Schwellenwerten definiert werden (ULLRICH 1987; JOHANSEN 1989). Verschiedene LD₅₀-Werte für BZ-resistente kleine Strongyliden des Pferdes wurden in diversen Untersuchungen festgestellt (s. Tab. 3).

LD ₅₀ -Werte	Untersucher
0,16-0,20 µg/ml TBZ	WHITLOCK et al. 1980
0,092-0,19 µg/ml TBZ	KELLY et al. 1981; BAUER 1983
0,1 µg/ml TBZ	COLES et al. 1992
0,44 µM (0,088 µg/ml) TBZ	IHLER u. BJØRN 1996
0,06-0,08 µg/ml TBZ	ULLRICH 1987
0,141-0,158 µ/ml TBZ	VON WITZENDORFF 2001

Tabelle 3: Verschiedene Angaben der LD₅₀-Werte für BZ im LSHT aus verschiedenen Untersuchungen.

Der LSHT wird in der Regel mit TBZ durchgeführt, da dieser Vertreter der BZ sich im Vergleich zu anderen Wirkstoffen durch seine hohe Löslichkeit in Wasser auszeichnet. Die Übertragbarkeit auf andere BZ wird mit dem häufigen Auftreten von Nebenresistenzen begründet (GEERTS u. GRYSSELS 2000; JOHANSEN 1989). Der LSHT wird häufig in Kombination mit dem EZRT empfohlen und gilt bei einigen Untersuchern als sensibler Test (VÁRADY u. CØRBA 1999; LE JAMBRE et al. 1976; JOHANSEN u. WALLER 1989). Nach den Angaben der W.A.A.V.P. kann AR mit dem LSHT erst ab einer Prävalenz von > 25 % festgestellt werden (COLES et al. 1992). Der Vorteil ist, dass der Test innerhalb von

drei Tagen ohne großen Kostenaufwand durchgeführt werden kann. Allerdings sind die Ergebnisse unterschiedlicher Laboratorien nicht unmittelbar miteinander zu vergleichen (JOHANSEN 1989).

Obwohl der LSHT generell nur für BZ empfohlen wird (COLES et al. 1992), gibt es Ergebnisse, die zeigen, dass auch eine Anwendung mit LEV möglich ist. Dabei wird im Gegensatz zu BZ die Wirkung auf embryonierte Eier kurz vor dem Schlupf untersucht (DOBSEN et al. 1986).

2.3.3.2.2 Larvenentwicklungshemmtest

Von verschiedenen Autoren beschrieben (AMARANTE et al. 1996; COLES et al. 1988; GIORDANO et al. 1988; HUBERT u. KERBOEUF 1992; IHLER 1995; JOHANSEN u. WALLER 1989, VÁRADY u. CØRBA 1999), dient der Lavenentwicklungshemmtest (LEHT) dazu, den Einfluß verschiedener Anthelminthikakonzentrationen auf die Entwicklung von Nematodeneiern zu ersten, zweiten und dritten Larven zu messen. Dabei werden die Eier sieben Tage lang in einem Nährmedium mit verschiedenen Konzentrationen von Anthelminthikum inkubiert und anschließend die Entwicklungsstadien differenziert und ausgezählt. Als Anhaltspunkt für mögliche Resistenz dient wie bei dem LSHT die Konzentration, bei der 50 % der Eier, bzw. Larven sich nicht zum nächsten Stadium entwickeln (COLE et al. 1988). Es gibt auch einen kommerziell erhältlichen Test (DrenchRite[®]) von der Firma Horizon Technology, Australien, der für BZ, LEV und ML bei *H. contortus*, *T. colubriformis* und *O. circumcincta* angewendet werden kann. Der LEHT ist zeitaufwendiger und arbeitsintensiver als der LSHT, benötigt aber keine frischen Nematodeneier für die Durchführung, was die Anwendung bei Feldversuchen erleichtert, da der Kot nicht innerhalb einer bestimmten Zeit verarbeitet werden muß (CONDER u. CAMBELL 1995; GEERTS u. GRYSSELS 2000). Der Vorteil ist, dass man mehrere Wirkstoffe parallel untersuchen kann. Zudem ist eine Speziesdifferenzierung anhand der dritten Larvenstadien möglich. Der Test zeigt gute Korrelation mit *in vivo*-Versuchen und wird von manchen Autoren sensitiver eingestuft als EZRT und LSHT (DOBSON et al. 1986; GILL et al. 1995; JOHANSEN u. WALLER 1989, POOK et al. 2002; VÁRADY u. CØRBA 1999; YOUNG et al. 2000). CRAVEN et al. (1999) fanden schlechte Übereinstimmung zwischen dem LSHT, LEHT und dem EZRT. Sie zogen die Schlussfolgerung, dass ein Test

alleine nicht ausreicht um AR anzuzeigen. Außerdem gibt es nur wenige Untersuchungen an kleinen Strongyliden des Pferdes und somit wenig Referenzwerte (CRAVEN et al. 1999; IHLER 1995; POOK et al. 2002).

2.3.3.2.3 Larvenparalysetest

Ein weiterer *in vitro*-Test, der häufig für MOR und LEV eingesetzt wurde, ist der Larvenparalysetest (LPT). Bei diesem Test lässt eine herabgesetzte Anzahl an paralysierten dritten Larven einer sonst sensiblen Spezies in Anwesenheit eines Anthelminthikums auf Resistenz schließen (SUTHERLAND u. LEE 1990). Für diesen Test werden dritte Larven in einer Kotkultur angezchtet und dann 24 Stunden mit verschiedenen Anthelminthikonzentrationen inkubiert. Anschließend werden die paralysierten und motilen Larven ausgezählt und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Auch für diesen Test werden LD₅₀-Werte ausgerechnet (MARTIN u. LE JAMBRE 1979; VÁRADY u. CØRBA 1999). Dieser Test ist nicht geeignet für die Resistenzdiagnostik von BZ (SUTHERLAND u. LEE 1990). Allerdings haben FOLZ et al. (1987a) ein Gerät zur Messung von Mikromotilität verwendet und konnten damit BZ-resistente *H. contortus* nachweisen. SUTHERLAND u. LEE (1990) fanden eine weitere Methode mit der im LPT auch TBZ untersucht werden konnte. Ihr Test beruhte auf der Tatsache, dass TBZ-resistente Trichostrongyliden im Vergleich zu sensiblen Individuen eine größere Menge AchE produzieren. Eine Zugabe von Eserin (Physostigmin), einem AchE-Hemmer, führt bei sensiblen Larven zu einer reversiblen Paralyse, da dieser Wirkstoff ebenso wie AchE kompetitiv an Ach-Rezeptoren bindet. Bei resistenten Larven ist die Lähmung herabgesetzt, da der Überschuß an AchE das Eserin verdrängt (SUTHERLAND u. LEE 1990). VÁRADY u. CØRBA (1999) verwendeten sowohl die Methode nach FOLZ et al. (1987a) als auch die Methode nach SUTHERLAND und LEE (1990) zur Diagnose von LEV-Resistenz bei *H. contortus* und *O. circumcincta*, konnten aber keine Resistenzen nachweisen. Der LPT wird widersprüchlich beurteilt. Der Vorteil des LPT ist die Verwendung von dritten Larven, die leicht anzuzchten sind und sich über einen längeren Zeitraum lagern lassen. Der Nachteil ist, dass es zwischen den Ergebnissen verschiedener Untersucher zu großen Schwankungen kommt (BOERSEMA 1983). GEERTS et al. (1989) konnten allerdings keine Unterschiede zwischen der Auswertung verschiedener Untersucher feststellen. Der Zeitpunkt der Auswertung des Tests ist kritisch und kann nicht zu einem

späteren Zeitpunkt wiederholt werden, um Ergebnisse aus verschiedenen Tests vergleichen zu können (JOHANSEN 1989).

2.3.3.2.4 Tubulinbindungstest

Der Tubulinbindungstest (TBT) beruht auf der vergleichsweise geringen Bindungsaffinität der BZ zum Tubulin bei BZ-resistenten Nematoden im Vergleich zu BZ-sensiblen (LACEY u. PRICHARD 1986). Bei diesem Test wird Tubulinextrakt aus sensiblen und resistenten Parasiten (Adulte, Larven oder Eier) mit Tritium-markiertem BZ versetzt und inkubiert, bis ein Gleichgewicht eintritt. Mit einer Kohleextraktion wird der überschüssige Wirkstoff entfernt und das gebundene BZ mit einem Szintillationspektrometer gemessen. Die Proteinkonzentration wird ins Verhältnis zur gebundenen BZ-Menge gesetzt (JOHANSEN 1989). Dieser Test kann sehr schnell durchgeführt werden und ist sehr sensitiv. Die Ergebnisse sind zwischen Laboren einfacher zu vergleichen als bei den übrigen *in vitro*-Tests. Von Nachteil sind der Kostenaufwand sowie die Arbeit mit radioaktivem Material, was geeignete Räumlichkeiten und geschultes Personal voraussetzt (JOHANSEN 1989; LACEY u. SNOWDON 1988).

2.3.3.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.3.3.1 Allelspezifische PCR

KWA et al. (1994) entwickelten die ersten spezifischen Primer zur Detektion von AR bei parasitischen Nematoden. Mit einer allelspezifischen klassischen PCR konnte zwischen homozygoten und heterozygoten BZ-resistenten *H. contortus* und *T. colubriformis* unterschieden werden. Für diese PCR wurden zwei allelspezifische Vorwärts- und ein β -Tubulin Isotyp spezifischer Rückwärtsprimer verwendet, mit denen eine mögliche Mutation am Codon 200 von Phe zu Tyr identifiziert werden konnte. Mittels einer Gelelektrophorese konnte das PCR-Ergebnis sichtbar gemacht werden. Inzwischen wurde diese Methode auch für *T. circumcincta* und die kleinen Strongyliden des Pferdes etabliert (ELARD et al. 1996, 1999; SILVESTRE u. HUMBERT 2000; PAPE 2001; SAMSON-HIMELSTJERNA 2002). Nach ROOS et al. (1995) erlaubt die PCR eine Detektion von AR bei nur 1 % resistenter Individuen in einer Population. Der Nachteil ist, dass die Produkte aus der PCR mittels einer Gelelektrophorese analysiert werden müssen, was sehr arbeitsaufwendig ist. Zudem ist die

Quantifizierung des PCR-Produktes anhand der Bandenstärke begrenzt und andere Quantifizierungsverfahren arbeits- und zeitaufwendig. (ZARLENGA et al. 1998).

Mit der Entwicklung einer quantitativen Echt-Zeit- oder Real-time PCR konnte dieses Problem umgangen werden (BUSTIN 2000; HELPS et al. 2001). Die Kombination von Fluoreszenzdetector, PCR Cycler und integrierter Software macht es möglich, während jedes Zyklus der PCR die Menge der Nukleinsäuren zu messen. Die Grundlage hierfür ist die Verwendung fluoreszierender Farbstoffe, die sich entweder unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagern oder als genspezifische Sonden eingesetzt werden (ZARLENGA u. HIGGINS 2001). Es werden inzwischen verschiedene Sondenformate auf dem Markt angeboten, die sich in Struktur, Mechanismus und Anwendbarkeit unterscheiden, alle aber basieren auf dem Effekt des sogenannten „Quenching“. Man verwendet zwei Farbstoffe, einen „Quencher“ und einen „Reporter“. Der Quencher resorbiert Licht im gleichen Wellenlängenbereich, in dem auch das Emmisionspektrum des Reporters liegt. Werden die beiden in räumliche Nähe gebracht, resorbiert der Quencher das vom Reporter emittierte Licht. Trennt man die beiden, kommt es zu einem Fluoreszenzsignal (ZARLENGA u. HIGGINS 2001). Die am häufigsten verwendeten Sonden sind die TaqMan-Sonden (KUTYAVIN et al 2000), die Molecular Beacons (TYAGI u. KRAMER 1996) und die kürzlich entwickelten TaqMan Minor Groove Binder (AFONINA et al. 1997). Bei TaqMan-Sonden sind Quencher und Reporter an ein spezifisches Oligonukleotid gebunden welches an die gesuchte Stelle in der Template-DNA bindet. Durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase wird die Sonde hydrolysiert und die Markermoleküle getrennt (BUSTIN 2000). Die Molekular Beacons hingegen haben an beiden Enden der spezifischen Sequenz eine sechs bp umfassende komplementäre Stammsequenz, an die wiederum Quencher und Reporter gebunden sind. Die intramolekularen Anziehungskräfte bedingen die Ausbildung einer Haarnadelformation, welche Quencher und Reporter in räumliche Nähe bringt. Bei Anlagerung an den Matrizenstrang streckt sich das Molekül und es kommt zu einem Fluoreszenzsignal. Diese Sonden werden während der Elongation nicht hydrolysiert (TYAGI u. KRAMER 1996). MGB-Sonden sehen ähnlich aus wie die einfachen Taq-Man-Sonden mit dem Unterschied, dass sie zusätzlich am 5'- oder 3'-Ende mit einem MGB (z.B. Dihydrocyclopyrroloindol) konjugiert sind. Wenn die Sonde bindet, lagert sich dieser in die kleine Krümmung der doppelsträngigen DNA der anschließenden fünf oder sechs bp und stabilisiert den

Doppelstrang. Das Quenching erfolgt, während sich die Sonde in Lösung befindet, da es dabei zu einer Knäulform des Oligonukleotidstrangs kommt, wobei Quencher und Reporter in räumlich Nähe zueinander kommen. Bei Anlagerung streckt sich die Sonde (KUTYAVIN et al. 2000). Die verstärkte Bindungsintensität der MGB-Sonden erlaubt eine Erhöhung der Annealing-Temperatur und damit eine höhere Spezifität. Das Prinzip der Quantifizierung liegt in der Messung des „Threshold Cycle“ (C_t). Bei jedem Zyklus wird die Fluoreszenz gemessen. Der Zyklus, bei dem eine Probe die Hintergrundfluoreszenz überschreitet wird als sogenannter C_t -Wert festgehalten, welcher immer in der exponentiellen Phase liegt und vom Verbrauch einzelner Reaktionskomponenten nicht beeinflusst wird. Zusätzlich wird zur Quantifizierung ein Standard eingesetzt, welcher in bekannter Menge verwendet wird. Er dient zur Berechnung der DNA-Menge in der zu untersuchenden Probe zu Beginn der PCR. (BUSTIN 2000). Der Vorteil der Real-time PCR ist, dass die PCR-Produkte schon während der Reaktion beurteilt werden können und die Analyse im Anschluß mittels eines Softwareprogramms durchgeführt wird (HELPS et al. 2001). Der Schritt der Elektrophorese entfällt. Die Real-time PCR bietet eine schnelle und zuverlässige Verarbeitung vieler Proben bei gleicher oder besserer Sensitivität und Spezifität als die klassische PCR. Die Nachteile sind ein hoher Kostenaufwand für die Anschaffung der Apparaturen und die notwendige Optimierung herkömmlicher PCR-Protokolle (Bustin 2000). Bisher ist diese Methode erfolgreich für den speziesspezifischen Nachweis einiger Trichostrongylen bei Wiederkäuern angewendet worden (Samson-Himmelstjerna et al. 2002b). SAMSON-HIMMELSTJERNA et al.¹ entwickelten eine allelspezifische Real-time PCR zur Untersuchung des A/T-Polymorphismus im Codon 200 des β -Tubulins der kleinen Strongylen. Mit dieser Technik konnte zuverlässig und reproduzierbar zwischen den drei Genotypen TTC/TTC, TTC/TAC und TAC/TAC unterschieden werden. Sie ermöglichte die Untersuchung vieler Individuen und gab Aufschluss über die Allelfrequenz.

Die Nachteile der molekularbiologischen Methoden generell sind ein hoher Kostenaufwand und die Tatsache, dass die molekularen Grundlagen der AR noch viele Fragen offenlassen. Welche Bedeutung die Zusammenhänge, die man bis heute herausgefunden hat, für die Resistenzentstehung und –mechanismen wirklich haben, ist letztendlich noch nicht geklärt.

¹ laut persönlicher Mitteilung von Herrn G. von Samson-Himmelstjerna, Hannover am 10. Januar 2003

2.4 Statistik

2.4.1 Probitanalyse

Die Probitanalyse wird häufig in der Toxizitätsforschung eingesetzt. Mittels einer Probit-Transformation der Versuchsergebnisse kann die mittlere letale (LD_{50}) oder effektive (ED_{50}) Dosis berechnet werden, die als Maß für die Wirkung eines toxischen Stoffes verwendet wird. LD_{50} bezeichnet die mittlere Dosis, bei der 50 % der Testorganismen sterben, während die ED_{50} die mittlere Dosis ist, bei der bei 50 % ein bestimmter Effekt eintritt. Die graphische Darstellung ergibt eine Summenprozentkurve, wobei die Konzentrationen als x-Werte und die Prozente der korrespondierenden überlebenden Testorganismen als y-Werte dienen. Diese Kurve wird durch Transformation in eine Gerade überführt. Der $LD(ED)_{50}$ -Wert kann entweder abgelesen oder berechnet werden (HEALY 1988; LOZAN u. KAUSCH 1988).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Übersicht

In den Jahren 2000 und 2001 wurden insgesamt 1.383 Pferde auf 64 Betrieben untersucht. Bei der ersten Probennahme wurden alle verfügbaren Pferde eines Betriebes mittels EpG auf Strongylidenbefall untersucht und eine Fragebogenerhebung zu Haltung, Entwurmungs- und Weidemanagement durchgeführt. Von den Proben stammten 3,5 % aus sieben Kleinbetrieben, 58,8 % aus 36 Reitställen und 36,7 % aus 21 Zuchtbetrieben. Bei mehr als fünf Pferden mit einer Strongylideneizahl von > 150 EpG pro Betrieb (20 Betriebe) wurden die betreffenden Tiere zwei bis vier Tage später im Rahmen eines EZRT mit FBZ (10 Betriebe) bzw. IVM (10 Betriebe) behandelt, dessen Ergebnis durch Untersuchung einer dritten Kotprobe 14 Tage später abgelesen wurde. Am Tag nach der ersten Probennahme wurde vom Kot der noch nicht behandelten Tiere im Labor ein LSHT mit TBZ bzw. PYR sowie von jeder Kotprobe Larvenkulturen angesetzt. Die dritten Larven wurden pro Tier in zwei Portionen geteilt und zum einen für einen LPT mit Ivermectin und zum anderen für eine allelspezifische PCR verwendet. Mit dieser PCR sollte eine eventuelle Punktmutation von TTC (Phe) zu TAC (Tyr) an Position 200 im β -Tubulin-Gen festgestellt werden. Die Kotproben wurden in der Regel rektal entnommen, es sei denn, das Tier hatte gerade frischen Kot abgesetzt. In diesem Fall wurde der Kot unter Vermeidung von Kontamination durch Erde, Gras oder Einstreu vom Boden aufgenommen. Die Proben wurden nach der Entnahme sofort in Kühlboxen überführt und ins Labor transportiert. Dort erfolgte die Lagerung bis zur weiteren Verarbeitung in Kühlzellen bei 4°C. Um Referenzwerte für die *in vitro*-Tests zu gewinnen, wurde jeder Test ebenfalls mit Kotproben institutseigener Versuchspferde durchgeführt.

3.2 Material

3.2.1 Anthelminthika

Ivomec P [®]	Merial, Hallbergmoos
Panacur [®]	Intervet, Boxmeer, Holland

3.2.2 Chemikalien

Agarose NEEO Ultra Qualität Rotiagarose [®]	Carl Roth, Karlsruhe
Ampuwa [®]	Fresenius, Bad Homburg
DMSO	Merck, Darmstadt
Ethanol 99,6 %, DAB10	Carl Roth, Karlsruhe
Ivermectin, Reinsubstanz	Sigma, Steinheim
Natriumhypochlorit, 12 % Cl	Carl Roth, Karlsruhe
Pyrantel, Reinsubstanz	Sigma, Steinheim
Salzsäure, min. 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
SYBRE [®] Green	BIOzym, Hessisch Oldendorf
Thiabendazol, Reinsubstanz	Sigma, Steinheim

3.2.3 Enzyme

Surestart [™] Polymerase	Applied Biosystems, Weiterstadt
Proteinase K	Mackerey und Nagel, Düren

3.2.4 Kits

NukleoSpin [®] Tissue Kit	Mackerey und Nagel, Düren
Brilliant Core Buffer	Stratagene, Amsterdam, Holland

3.2.5 DNA, Primer und dNTPs

3.2.5.1 DNA

Die DNA für die allelspezifische PCR wurde aus adulten kleinen Strongyliden aus zwei Versuchspferden sowie aus einzelnen dritten Larven isoliert, die von fünf Pferden aus der Probennahme des Jahres 2000 stammten.

3.2.5.2 Primer

Name	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
Vorwärts- primer	AAT GCT ACC CTA TCC GTT CAT CA	Life Technologies, Eggenstein
Rückwärts- primer	CAA ATA TCA TAG AGA GCT TCA TTG TCA AT	Life Technologies, Eggenstein

3.2.5.3 Sonden

Name	Sequenz (5' → 3')	Hersteller
Sonde T	5'-FAM-AAT ACA GAC GAA ACT TTC TG- MGB	Applied Biosystems, Weiterstadt
Sonde A	5'-FAM- AAT ACA GAC GAA ACT TAC TG – MGB	Applied Biosystems, Weiterstadt

3.2.5.4 DNTPs

dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Stratagene, Amsterdam, Holland
Low DNA MASS™ Ladder	Life Technologies, Eggenstein

3.2.6 Lösungen und Puffer

Ladepuffer, 6fach:	0,25 % Bromphenolblau + 40 % Saccharose
--------------------	---

Lugol'sche Lösung:	in destiliertem Wasser 10 g Kaliumjodid und 5 g Jod, kristallin, ad destiliertem Wasser
Natriumchloridlösung, gesättigt:	100 % NaCl in H ₂ O
TAE-Puffer, 1fach:	40 mM Tris-Acetat, 1mM EDTA, pH 8
Ethanol 70 %	700 ml 99,6 % Ethanol, 266 ml destilliertes Wasser

3.2.7 Einwegartikel

Einwegrektalisierhandschuhe	Carl Roth, Karlsruhe
Mikrotiterplatten, 6, 12, 24 wells	Renner GmbH, Dannstadt
Pasteurpipetten, 1 ml	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen, 0,5-10 µl; 1-200 µl; 100- 1000 µl	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße, 0,2 ml; 1,5 ml; 120 ml	BIOzym, Hessisch Oldendorf
Reaktionsgefäße, 11 ml	Renner GmbH, Dannstadt
Savelock-Reaktionsgefäße, 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Scip Tube, 8x, 2 ml	Stratagene, Amsterdam, Holland
Optical Cap, 8x	Stratagene, Amsterdam, Holland
Sterilfildertips, 10 µl, 100 µl	BIOzym, Hessisch Oldendorf

3.2.8 Mehrwegartikel

Einmachgläser 250 ml	Hersteller unbekannt
Mörser, Pistill	Schott-Duran, Mainz
Plastikmesszylinder, 100 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Haushaltssiebe	Hersteller unbekannt
Bechergläser, 250 ml; 2 l	Schott-Duran, Mainz
Reagenzgläser, 10 ml	Schott-Duran, Mainz
Petrischale, Ø 10 cm	Schott-Duran, Mainz

Plastikspritze, 500 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Kühlbox	Camping Gaz, Lyon, Frankreich
Kühlakku	Hersteller unbekannt
McMaster-Zählkammern	MSD-AGVET, München

3.2.9 Geräte

Elektrische Präzisionswaage L610 D	Sartorius, Göttingen
Elektrische Präzisionswaage 1413MP8	Sartorius, Göttingen
Elektrische Präzisionswaage PN1210	Mettler, Gießen
Mikroskop Axiophot	Zeiss, Jena
Pipetten:	
Eppendorf Research 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg

Thermoblöcke:

Uno-Thermoblock	Biometra, Göttingen
-----------------	---------------------

Tischzentrifugen:

Centrifuge 415 C	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge A 14	Jouan, Unterhachingen
Wärmeschrank (7801109)	Heraeus, Osterode

3.2.10 Computerprogramme

ABI PRISM™ Primer Express	Applied Biosystems, Weiterstadt
---------------------------	---------------------------------

3.3 Methoden

3.3.1 Versuchstiere

Es handelte sich hierbei um drei Ponies, die mit unterschiedlich BZ-empfindlichen Strongylidenpopulationen infiziert waren. Tier eins war ein Helminthen-naiver 3 jähriger Shettlandpony-Hengst, der mit einer BZ-sensiblen Population (Population P) kleiner Strongyliden infiziert worden war (PAPE et al. Im Druck). Das Tier wurde an der Tierärztlichen Hochschule Hannover einzeln in einer betonierten Stallung gehalten, die nur mit Einmalüberziehschuhen betreten wurde, um eine Kontamination mit anderen Strongylidenpopulationen zu vermeiden. Die Versuchstiere zwei und drei waren eine 3 jährige Ponystute unbekannter Rasse und eine Shettlandponystute unbekanntes Alters, die mit den BZ-resistenten Populationen L bzw. M infiziert waren und in dreiwöchigem Abstand mit einer Dosierung von 15 mg FBZ/Kg KGW (Panacur[®]) behandelt wurden. Diese Tiere wurden in Weidehaltung gehalten. Alle drei Tiere wurden mit autoklaviertem Heu ad libitum und pelletiertem Fertigfutter gefüttert. Die EpG-Werte wurden wöchentlich untersucht und lagen bei allen drei Versuchstieren zur Zeit der Untersuchungen zwischen 200 und 900. Der Vorversuch I (LSHT mit TBZ) wurde mit den Populationen P und L, die Vorversuche II (LSHT mit PYR) und III (LPT mit IVM) mit den Populationen L und M durchgeführt.

3.3.2 Auswahl der Betriebe und Probennahme

Die Betriebe wurden aus der Liste der „Deutschen Reiterlichen Vereinigung“ (FN) für Bremen, Hannover, Celle und Hamburg ausgewählt sowie aus den „Gelben Seiten“, aus Internetannoncen und über mündliche Empfehlung von Tierärzten und Pferdehaltern. Von 177 kontaktierten Betrieben zeigten 91 Interesse, an der Studie teilzunehmen. Um in die nähere Auswahl für eine Probennahme zu kommen, mussten folgende Bedingungen erfüllt sein: Ein Bestand musste mindestens zehn Pferde halten, der Abstand zur letzten Entwurmung sollte mindestens acht Wochen betragen und die Besitzer mussten sich mit dem Versuchsaufbau einverstanden erklären. Dazu gehörte auch, dass die Kotproben rektal entnommen wurden, womit einige Pferdehalter nicht einverstanden waren und somit aus der Wahl genommen wurden. Insgesamt gingen 64 Betriebe in die Studie ein. Für die weiteren

Untersuchungen kamen nur Betriebe in Betracht, die mindestens fünf Pferde mit einem EpG > 150 aufwiesen, von denen genug Kot gewonnen werden konnte. Dies war bei 20 Betrieben der Fall. Die Probennahme erfolgte bei allen zur Verfügung stehenden Pferden eines Bestandes, von denen rektal Kot gewonnen oder frisch vom Boden genommen werden konnte. Bei fünf Betrieben wurden die Proben von den Pferdehaltern für ein Screening auf MDS-Eier eingeschickt. Sofern die Proben den Voraussetzungen entsprachen, wurden diese Betriebe angefahren und die Probennahme sowie die Untersuchungen wie bei allen anderen Betrieben durchgeführt.

3.3.3 Erfassung der Daten

3.3.3.1 Erläuterung des Fragebogens

Bei allen Betrieben, die beprobt wurden, wurde eine Fragebogenerhebung durchgeführt. Die Betriebe, die Proben eingeschickt hatten, wurden telefonisch befragt. Ein Muster des Fragebogens ist in den Abb. 4 und 5 ersichtlich. Die Daten galten jeweils für alle Tiere des Betriebes. Einzelne Tiere, die anders gehalten wurden, als der Rest der Herde, wurden nicht berücksichtigt. Der Bogen wurde in vier Abschnitte unterteilt, die im Folgenden erläutert werden:

- Abschnitt 1: Betriebsdaten:

Betriebsart: Es wurde zwischen Reitstall, Zuchtbetrieb und Kleinbetrieb unterschieden. Als Reitställe galten Betriebe, die mehr als 15 Tiere hielten und nicht mehr als zwei Fohlen pro Jahr zogen. Betriebe mit weniger als 15 Tieren und weniger als zwei Fohlen pro Jahr galten als Kleinbetriebe. Betriebe, die im Jahr mehr als zwei Fohlen zogen, wurden als Zuchtbetriebe eingestuft. Anzahl der Pferde: Alle Pferde, die sich zur Zeit der Probennahme auf der Betriebsfläche befanden, wurden gezählt. Tiere, die sich auf Weiden anderer Höfe befanden, oder in anderen Betrieben aufgestellt waren, wurden nicht berücksichtigt.

Jährlinge und Fohlen wurden extra aufgeführt. Da Jungtiere erfahrungsgemäß eine höhere Eiausscheidung zeigen als ältere Tiere, sollte diese Information Zusammenhänge zwischen der Anzahl der Jungtiere und einer erhöhten Eiausscheidung des gesamten Pferdebestandes aufzeigen. Gastpferde: Pferde, die noch nicht länger als acht Wochen auf dem Betrieb waren,

wurden extra aufgeführt. Entwurmung bei Einstallung: Es wurde notiert, ob Neuzugänge vor dem Aufstallen entwurmt wurden. Diese Information sollte Auskunft darüber geben, ob das Einbringen neuer Tiere in den Betrieb einen Einfluss auf das Auftreten von Wurmbefall durch Einführung neuer Populationen von Strongyliden zeigte.

- Abschnitt 2: Weidemanagement

Es wurde notiert, ob und wie lange die Tiere Weidegang hatten, um festzustellen, ob die Dauer der Beweidung einen Einfluss auf die Intensität des Parasitenbefalls ausübt, da Heu und Gras die Hauptquellen für eine Infektion mit Strongylideneiern darstellen. Die Weidefläche wurde in Hektar (ha) erfasst, hierbei handelte es sich um die gesamte Grasfläche des Betriebes einschließlich der Flächen, die zur Heuernte verwendet wurden. Da verschiedene weidehygienische Maßnahmen einen Einfluss auf die Infektion mit Strongyliden haben können, wurden folgende Daten erfasst: Häufigkeit des Weidewechsels, Absammeln des Kotes von der Weide, Entfernung von Geilstellen und der Einsatz von Düngemitteln. In Kombination mit den Informationen über Weidepflege, Anzahl der Pferde und der Haltung anderer Tiere sollten diese Daten Aufschluss über Infektionsdruck und Einfluss dieser Maßnahmen auf die Infektion mit Endoparasiten geben. Über die Besatzdichte konnten die meisten Besitzer der Betriebe keine Aussage machen, da die Größen der Einzelweiden unbekannt waren oder die Anzahl der Pferde pro Weide variierte.

- Abschnitt 3: Stall

Hier wurde notiert, ob die Ställe täglich oder unregelmäßig gemistet wurden bzw. Tiefstreu verwendet wurde. Zudem wurden Desinfektionsmaßnahmen vermerkt. Diese Informationen sollten klären, ob die einzelnen Stallhaltungen sowie Hygienemaßnahmen einen Einfluss auf Strongylidenbefall zeigen.

- Abschnitt 4: Entwurmung

Es wurden Daten zur Häufigkeit der Entwurmung und zu den eingesetzten Anthelminthika erhoben, um den Einfluss des Entwurmungsmanagements auf die Infektion mit kleinen Strongyliden zu erfassen. Der letzte Entwurmungstermin und das eingesetzte Anthelminthikum wurde notiert um die Wirksamkeit verschiedener Anthelminthika zu untersuchen. Das Auftreten klinischer Symptome wurde vermerkt, um festzustellen, ob eine

erhöhte Eiausscheidung im Zusammenhang mit einer klinischen Erkrankung steht und ob Betriebe, die Probleme mit Wurmbefall haben, vermehrt AR aufweisen.

Unabhängig von der Fragebogenuntersuchung wurde von jedem Probestier das Alter, die Rasse und das Geschlecht erfasst.

Um festzustellen, ob das Klima in den Jahren 2000 und 2001 der Probennahme einen Einfluß auf die Prävalenz von kleinen Strongyliden zeigte, wurden die Daten der Höchst- und Tiefsttemperaturen sowie des Niederschlags analysiert. Die Daten wurden vom Deutschen Wetterdienst [<http://www.dwd.de>] übernommen und stammten aus der Wetterstation Hannover. Zur Analyse wurden immer fünf Tageswerte gemittelt und die Ergebnisse für die beiden Jahre miteinander verglichen.

Name:	Adresse:	Tel.:
<ul style="list-style-type: none"> Haltung 		
Betriebsart		
Reitstall	Zuchtbetrieb	Kleinbetrieb
Anzahl der Pferde: _____		
davon	_____ Jährlinge	_____ Fohlen
Neuzugänge, Gastpferde seit	_____ Wochen	_____ Monaten
Entwurmung bei Einstallung	ja	nein
<ul style="list-style-type: none"> Weidemanagement 		
Weidegang	ja	nein
ganzjährig	Sommer	tagsüber
stundenweise		
Weidefläche _____ ha		
Weidewechsel	ja	nein
jährlich	halbjährlich	monatlich
wöchentlich		
Absammeln von Kot	ja	nein
unregelmäßig	alle 2 Wochen	1x / Woche
2x / Woche		
Geistellenentfernung	ja	nein
1x jährlich	2x jährlich	öfter
Andere Tiere	Wiederkäuer	Schweine
	Esel	Wildwiederkäuer
Düngung	ja	nein
Mineral	Gülle	Pferdemist
Sonstiges		

Abbildung 4: Teil 1 und 2 des Fragebogens, der im Rahmen der Kotuntersuchungen mit den Besitzern zusammen ausgefüllt wurde – Erklärungen zu den einzelnen Punkten sind im Text unter Punkt 3.3.3 „Erfassung der Daten“ zu finden.

• Stallhygiene		
Misten		
unregelmäßig	täglich	Tiefstreu
Jährliche Desinfektion	ja	nein
• Entwurmungsstrategie		
Entwurmung	ja	nein
jährlich	halbjährlich	vierteljährlich
alle 2 Monate	alle 4 Wochen	
Wechsel der Medikamente	ja	nein
Banminth [®]	Ivomec [®]	Panacur [®]
Rintal [®]	Equest [®]	Telmin [®]
Dectomax [®]	Sonstige_____	
Letzter Entwurmungstermin	_____	mit_____
Klinische Symptome	ja	nein
Durchfall	Kolik	Blässe
Abmagern	Kümmern	Inappetenz

Abbildung 5: Teil 3 und 4 des Fragebogens, der im Rahmen der Kotuntersuchungen mit den Besitzern zusammen ausgefüllt wurde – Erklärungen zu den einzelnen Punkten sind im Text unter Punkt 3.3.3 „Erfassung der Daten“ zu finden.

3.3.4 Kotuntersuchung

Zur quantitativen Bestimmung der Eiausscheidung wurden die Proben mit einem modifizierten McMaster-Verfahren untersucht. Pro Probe wurden 4 g Kot mit 60 ml gesättigter Kochsalzlösung durch einen Haushaltssieb gespritzt und in einem Plastikmesskolben aufgefangen. Die Suspension wurde in eine Glasflasche mit Glasstopfen überführt, geschwenkt und ein Teil davon mit einer Einmalpipette in eine modifizierte

McMaster-Zählkammer gefüllt. Die Eier wurden nach drei bis fünf Minuten Flotationszeit in den zwei Zählrastern ausgezählt. Das Ergebnis mal 50 multipliziert ergab den EpG-Wert. Die Empfindlichkeit der Methode lag bei 50 EpG.

3.3.5 Larvenkultur

Von allen Kotproben, von denen *in vitro*-Tests durchgeführt werden sollten, wurden je zwei Kotkulturen angesetzt, damit genug Larvenmaterial für einen Larvenparalysetest und die allelspezifische PCR gesammelt werden konnte. Dafür wurde der restliche Kot auf zwei Einmachgläser verteilt und in einer Kulturkammer bei 25 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit über sieben Tage inkubiert. Die Gläser wurden am siebten Tag dann mit Leitungswasser gefüllt, mit einer Petrischale bedeckt und gestülpt. Der Rand der Petrischale wurde ebenfalls mit Leitungswasser gefüllt. Am achten Tag wurden die über Nacht ausgewanderten Larven aus dem Rand der Petrischale abgesaugt und in Glasgefäße mit Schraubverschluss überführt. Die Larven aus der Probennahme 2000 wurden dann mit 70 % Ethanol konserviert und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Da diese Larven durch den Alkohol so dehydriert waren, dass keine spätere Differenzierung anhand der Mitteldarmzellen mehr möglich war, wurden die Larven bei der Probennahme 2001 in Wasser aufbewahrt.

3.3.6 Eizahlreduktionstest

Zwei bis vier Tage nach der ersten Probennahme wurde der EZRT durchgeführt. Dafür wurden die Tiere in zehn Betrieben mit FBZ (Panacur[®]) und in zehn Betrieben mit IVM (Ivermectin P[®]) behandelt. Die Dosierung erfolgte nach der Empfehlung des Herstellers für Panacur[®] mit 7,5 mg TBZ/Kg KGW und für Ivermectin P[®] mit 0,2 mg IVM/Kg KGW. Das Gewicht der Tiere wurde durch mindestens zwei Personen (Untersucher und Tierbesitzer, ggf. Helfer) geschätzt und der höhere Wert für die Dosierung angenommen. 14 Tage nach der Behandlung wurde erneut eine Kotprobe genommen und auf Eiausscheidung untersucht. Das Ergebnis wurde nach folgender Formel (BAUER 1986) berechnet.

$$\text{EZR} = (\text{EpG}_{\text{vB}} - \text{EpG}_{\text{nB}}) \times 100 / \text{EpG}_{\text{vB}}$$

Sämtliche Ergebnisse sind Tab. 25 im Anhang zu entnehmen.

3.3.7 Larvenschlupfhemmtest

3.3.7.1 Gewinnung der Eispension

Die Kotproben der zweiten Probennahme vor der Behandlung wurden innerhalb von 24 Stunden nach der Probennahme verarbeitet. In der Zwischenzeit fand die Lagerung bei 4 °C weitestgehend unter Luftabschluss statt, um eine frühzeitige Embryonierung zu verhindern und das Entstehen einer natürlichen Resistenz zu vermeiden (ULLRICH 1987). Um die Eispension zu gewinnen, wurden ca. 200 – 300 g Kot in kleinen Portionen mit gesättigter Kochsalzlösung in einem Mörser zerrieben und mit einer Plastikspritze in zwei bis vier 250 ml Bechergläser gespritzt. Je niedriger die EpG war, umso mehr Kot wurde verwendet um möglichst viele Eier auszuwaschen. Nach einer Flotationszeit von 30 Minuten wurden die flotierten Eier mit einer an der Spitze schräg abgeschnittenen Einmalpipette aus Plastik abgesaugt und in einem Volumen von etwa fünf ml in ein 2 l Becherglas überführt. Dieses wurde mit Leitungswasser gefüllt. Nach einer einstündigen Sedimentation wurde der Überstand abgegossen. Übrig blieben ca. 50 ml einer Eispension, die für die *in vitro*-Tests verwendet wurde.

3.3.7.2 Herstellung der TBZ-Verdünnung

Für die TBZ-Verdünnung wurde zuerst eine TBZ-Stammlösung hergestellt. Dazu wurden 100 mg Thiabendazol in 100 ml destilliertem (dest.) Wasser unter ständigem Rühren und Zugabe von 600 µl von 1N HCl vollständig gelöst. Mit dieser Stammlösung I wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, die folgende Konzentrationen aufwies: 2; 6; 14; 18; 20; 30; 40; 50 und 60 µg TBZ/ml. Die Endkonzentrationen in den Proben waren 0,01; 0,03; 0,05; 0,07; 0,09; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25 und 0,3 µg TBZ/ml. Für die Negativkontrolle wurde eine Stammlösung Ia angesetzt. Dafür wurden 10 ml dest. Wasser mit 60 µl 1N HCl gemischt.

3.3.7.3 Herstellung der PYR-Verdünnung

Für die Herstellung der Pyrantelverdünnungen wurde eine Stammlösung II von 30 mg PYR/ml hergestellt. Dazu wurden 3 g Pyrantel unter ständigem Rühren in 100 ml dest. Wasser gelöst. Es wurde eine Verdünnungsreihe mit 0,03; 0,1; 0,3; 3 und 5 mg PYR/ml hergestellt. Die Endkonzentrationen in den Proben waren 0,15; 0,5; 1,5; 15 und 25 µg PYR/ml.

3.3.7.4 Vorversuch I und II

Für den LSHT wurden 12er, bzw. 24er Mikrotiterplatten mit 1990 µl Eisuspension bestückt und jeweils mit 10 µl der entsprechenden Anthelminthikaverdünnung (s.o.) versetzt. Vorversuch I wurde mit TBZ mit den Populationen P und L durchgeführt und für Vorversuch II wurde Pyrantel bei den Populationen L und M verwendet. Pro Tier und Substanz wurden immer zwei Parallelansätze angesetzt. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle für jeden Ansatz 1990 µl der Eisuspension mit 10 µl der Stammlösung Ia bzw. mit dest. Wasser versetzt. Danach wurden die Platten für 48 Stunden bei 25 °C in einem Wärmeschrank inkubiert. Jeder Versuch wurde fünfmal wiederholt. Da das Ablesen der Tests sehr zeitaufwendig war, wurden die Tests nach der Inkubationszeit mit 2 Tropfen Lugol'scher Lösung pro Vertiefung abgestoppt. Das Jod tötete die Entwicklungsstadien ab und garantierte den Status praesens des Testendes für eine spätere Auswertung. Die Auswertung erfolgte durch Auszählen des Verhältnisses von Eiern zu Larven unter dem Mikroskop bei 16- und 40facher Vergrößerung. Dafür wurden von jeder Probe 100 Entwicklungsstadien ausgezählt. Da bei dem LSHT mit PYR ein anderes Verhältnis zwischen embryonierten und nicht embryonierten Eiern im Vergleich zu TBZ auffiel wurde für drei weitere Wiederholungen zusätzlich das Verhältnis von Larven, emryonierten und nichtembryonierten Eiern ausgezählt. Tests, bei denen weniger als 100 Stadien gezählt wurden, wurden verworfen.

3.3.7.5 Versuch I und II

Die Versuche wurden nach den Protokollen der Vorversuche durchgeführt. Für TBZ wurden die Proben vom Jahr 2000 mit den Endkonzentrationen 0,06; 0,1 und 0,25 µg TBZ/ml getestet. Da sich drei Werte in manchen Fällen für die Berechnung der LD₅₀-Werte als

zuwenig erwiesen, wurden für die Proben im Jahr 2001 folgende Endkonzentrationen verwendet: 0,03; 0,06; 0,1; 0,15 und 0,2 µg TBZ/ml. Für PYR wurden die gleichen Konzentrationen eingesetzt wie bei den Vorversuchen. Jede Probe wurde für beide Substanzen doppelt angesetzt. Nach Inkubation wurden die Tests abgestoppt und in den folgenden Wochen ausgewertet. Die Stammlösungen und die Verdünnungsreihen wurden wöchentlich neu angesetzt.

3.3.8 Larvenparalyse-Test

3.3.8.1.1 Herstellung der IVM-Verdünnung

Für die IVM-Verdünnung wurde eine Stammlösung mit 1 mg IVM/ml hergestellt. Dafür wurden 10 mg IVM in 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) unter leichtem Schütteln gelöst. Aus dieser Stammlösung wurden Verdünnungsstufen von 0,002; 0,02; 0,1; 0,2 und 1 mg IVM/ml hergestellt. Die Endkonzentrationen in den Proben betrug 0,01, 0,1, 0,5, 1 und 5 µg IVM/ml.

3.3.8.1.2 Vorversuch III

Der LPT wurde im Vorversuch mit den Populationen L und M durchgeführt. Dafür wurden 1990 µl einer Larvensuspension, die mittels Kotkulturen gewonnen worden war, in 6er Mikrotiterplatten pipettiert. Diese Suspension wurde so eingestellt, dass sie etwa 200 Larven enthielt. Höhere Besatzzahlen der Wells hatten eine erhöhte Larvensterblichkeit in der Kontrolle zur Folge. Zu der Larvensuspension wurden je 10 µl der Verdünnungsstufen gegeben. Die Negativkontrolle bestand aus 1990 µl Larvenlösung und 10 µl DMSO. Die Platten wurden anschließend 24 Stunden bei 25 °C in einem Wärmeschrank inkubiert. Die Auswertung erfolgte dann durch mikroskopisches Auszählen von 100 Larven bei 2,5- und 16 facher Vergrößerung (paralysierte und motile Larven), wobei jede Larve 3 Sekunden beobachtet wurde. Tests, bei denen weniger als hundert Larven gezählt wurden, wurden verworfen.

3.3.8.1.3 Versuch III

Im Versuch III wurde der LPT nach Protokoll des Vorversuchs durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse des Vorversuchs III wurden die IVM-Verdünnungen 0,01, 0,1, 0,5, 1,0 und 5,0 µg

IVM/ml eingesetzt. Jede Probe wurde doppelt angesetzt. Die Verdünnungen von IVM mussten alle zwei Tage neu angesetzt werden, da laut Hersteller nach dieser Zeit die Stabilität verloren ging.

3.3.9 Auswertung der *in vitro*-Tests

Die Larvenschlupfhemmung wurde für TBZ und PYR wie folgt berechnet:

$$\text{LS-H (\%)} = 100 - \text{LS}$$

$$\text{LS (\%)} = \text{LS}_{\text{ANTH}} \times 100 / \text{LS}_{\text{K}}$$

LS-H : Larvenschlupfhemmung

LS: Larvenschlupf

LS_{ANTH}: Larvenschlupf in der entsprechenden Anthelminthikakonzentration

LS_K: Larvenschlupf in der Negativkontrolle

Die LD₅₀-Werte wurden mit der Probitanalyse (Sigma Plot 2000) ausgerechnet. Dafür wurden die Werte der Larvenschlupfhemmung gegen die Konzentrationsstufen in ein Achsenkreuz eingetragen und dann in Probits transformiert. Es wurde eine Regressionsgerade erstellt und mit den Werten b_0 und b_1 die LD₅₀-Werte ausgerechnet. Dafür wurden b_0 und b_1 in folgende Gleichung eingesetzt:

$$\text{LD}_{50}(\mu\text{g Anthelm/ml}) = ((5 - (b_0)) / (b_1))$$

Die Daten aus dem LPT wurden auf die gleiche Weise berechnet. Statt der Larvenschlupfhemmung wurde die Larvenparalyse berechnet. Für LS_{ANTH} wurde die Menge der beweglichen Larven in den Ansätzen mit Anthelminthikum eingesetzt. Als LS_K dienten die beweglichen Larven in den Kontrollansätzen. Die Ergebnisse der Parallelansätze wurden zu einem arithmetischen Mittelwert pro Tier zusammengefasst.

3.3.10 Gewinnung der DNA

3.3.10.1 Vorbereitende Maßnahmen

Die dritten Larven der kleinen Strongyliden sind mit einer Scheide ausgestattet, die für die hohe Widerstandsfähigkeit verantwortlich ist. Um die DNA extrahieren zu können, muss die Scheide vorher entfernt werden. Das geschieht durch Zugabe von Natriumhypochlorit, wodurch die Larven veranlasst werden, aktiv aus ihren Scheiden zu schlüpfen. Eine unbestimmte Larvenmenge in 3 ml Wasser wurde mit 62,5 µl Natriumhypochlorit versetzt und 30 min bei 41 °C geschüttelt. Um das Natriumhypochlorit wieder zu entfernen, wurde das Gemisch mit autoklaviertem dest. Wasser auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt, 20 min. bei 2.000 U/min ($g = 649,6$) zentrifugiert und bis auf ein Volumen von 1 ml abgesaugt. Dieser Schritt wurde dreimal durchgeführt.

Die Larven aus der Probennahme 2000 waren in Alkohol konserviert und abgestorben. Demzufolge konnten sie nicht entscheidet werden. Allerdings wird bei toten Larven die Scheide mit der Zeit durchlässig und so konnte auch von diesen Larven nach Auswaschung des Alkohols ohne weitere Behandlung die DNA extrahiert werden. Um den Alkohol auszuwaschen, wurde jeweils 1 ml Larvensuspension mit einer unbestimmten Menge Larven mit 10 ml autoklaviertem dest. Wasser verdünnt, mehrere Stunden sedimentiert und der Überstand abgesaugt. Dies wurde dreimal wiederholt.

3.3.10.2 DNA-Präparation

Die DNA einzelner Larven wurde mit Hilfe des NukleoSpin[®]Tissue Kits der Firma Mackerey und Nagel isoliert, wobei die mitgelieferten Puffer und die Proteinase K verwendet wurden. Die genaue Zusammensetzung der Puffer ist nicht bekannt. Das vom Hersteller empfohlene Protokoll wurde der geringen Menge des Larvengewebes angepasst. Für jede Larve wurde ein Verdaumedium aus 18 µl T1-Lysis Puffer und 2,5 µl Proteinase K hergestellt. Da die Ausbeute der DNA-Präparation gering war, wurden später 5 µl Proteinase K eingesetzt. Die einzelnen Larven wurden unter dem Mikroskop bei 16 facher Vergrößerung in einem Volumen von je 1 µl herauspipettiert und in dem Verdaumedium über Nacht bei 55 °C im Uno-Thermoblock verdaut. Zur Inaktivierung der Proteinase erfolgte die Zugabe von 20 µl

B3 Puffer und eine weitere Inkubation für zehn Minuten bei 70 °C. Im Weiteren wurden zur Fällung der DNA 21 µl von 99,6 % Ethanol hinzupipettiert und das Gemisch dann über die Säulen des Kits gegeben. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt für eine Minute bei 10.000 U/min ($g = 8.400$), bei dem die DNA in der Säule gebunden und der Durchfluss in einem Sammelgefäß aufgefangen wurde. Zur Aufreinigung erfolgten zwei Waschschrte mit einmal 50 µl BW Puffer und einmal 60 µl B5 Puffer wobei dazwischen immer wieder eine Minute bei 10.000 U/min zentrifugiert wurde. Um die Silica Membran zu trocknen, wurden die Säulen dann drei Minuten bei 14.000 U/min ($g = 16.464$) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säulen auf 1,5 ml Reaktionsgefäße umgesteckt. Zuletzt erfolgte die Eluierung der DNA in zwei Schritten mit je 20 µl autoklaviertem dest. Wasser, das auf 70 °C angewärmt war, in zwei weiteren Zentrifugationsschritten von je einer Minute bei 14.000 U/min. Die isolierte DNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20 °C eingefroren. Das Ziel war es, mindestens 100 Larven von fünf verschiedenen Pferden mittels der Real-time PCR zu charakterisieren. Die DNA der 52 adulten kleinen Strongyliden stand aus früheren Untersuchungen bereits zur Verfügung (SAMSON-HIMMELSTJERNA 2002a).

3.3.11 Real-time PCR

Es wurden 52 adulte Würmer von acht verschiedenen Arten charakterisiert (*Cc. Nassatus*, *Cc. Insigne*, *Cc. Elongatus*, *Cc. Radiatus*, *Cy. Catinatum*, *Cy. Coronatus*, *Cy. Pateratum*, *Cs. Hybridus*), deren DNA in früheren Untersuchungen mit der klassischen PCR untersucht worden war (SAMSON-HIMMELSTJERNA 2002a). Von den Würmern stammten 22 aus dem Versuchspferd, welches mit dem Stamm M infiziert war und 30 Würmer aus einem Anthelminthika-naiven Dülmener Wildpferd. Von jedem Wurm wurden zwei PCR-Läufe durchgeführt. Zusätzlich wurden dritte Larven von fünf verschiedenen Pferden aus der vorliegenden Studie untersucht, welche sowohl mit dem LSHT als auch dem EZRT als BZ-resistent diagnostiziert worden waren (mittlere EZR 46,5 %, mittlerer LD₅₀-Wert 0,16 mg/ml TBZ). Als Standard wurde linearisierte β-Tubulin Plasmid-DNA von *Cc. Nassatus* verwendet (SAMSON-HIMMELSTJERNA 2002a), mit der eine Verdünnungsreihe von 10¹; 10²; 10³; 10⁴; 10⁶ und 10⁷ Gen Kopien hergestellt wurde. Ein Plasmid enthielt für das Codon 200 die Sequenz TTC (Sonde T), die für Phe kodierte, das andere enthielt die Sequenz TAC (Sonde A), welche für Tyr kodierte. Die Verdünnungsstufe von 10⁷ Kopien wurde als heterologe

DNA eingesetzt. Als Sonden wurden MBG-Konjugate verwendet, die mit FAM markiert waren. ROX wurde als Referenzfarbstoff eingesetzt. Bei der Negativkontrolle wurden anstelle von DNA 17 μl doppelt dest. Wasser hinzupipettiert.

Pro Reaktion wurden folgende Mastermixe (Endkonzentrationen) eingesetzt:

Standardreihe (Plasmid-DNA) und adulte Würmer:

16,06	μl	autoklaviertes dest. Wasser
2,5	μl	10x Reaktionspuffer
2,78	μl	MgCl_2 (5 mM)
1	μl	dNTP (200 μM)
0,03	μl	Vorwärtsprimer (10nM)
0,63	μl	Rückwärtsprimer (300 nM)
je 0,5	μl	Sonde A bzw. T (200 nM)
0,38	μl	Referenzfarbstoff ROX
0,25	μl	PCR-Polymerase (0,025 U/ μl)
1	μl	Plasmid, bzw. genomische DNA

Larven:

2,5	μl	10x Reaktionspuffer
2,78	μl	MgCl_2 (5 mM)
1	μl	dNTP (200 μM)
0,03	μl	Vorwärtsprimer (10nM)
0,63	μl	Rückwärtsprimer (300 nM)
je 0,5	μl	Sonde A bzw. T (200 nM)
0,38	μl	Referenzfarbstoff ROX
0,25	μl	PCR-Polymerase (0,025 U/ μl)
17	μl	genomische DNA

Die PCR wurde als sogenannte „two-step“ PCR durchgeführt, bei der im Gegensatz zu der häufigeren „three-step“ PCR, bei der unterschiedliche Temperaturen für Annealing und Extension eingesetzt werden, die Bindung und Verlängerung der Primer bei gleicher

Temperatur stattfindet. Folgendes Temperaturprofil wurde angewendet (VON SAMSON-HIMMELSTJERNA et al. 2002a):

- | | | | |
|----|-------------------------------------|-------|--------|
| 1. | Aktivierung der Hotstart-Polymerase | 95 °C | 10 min |
| 2. | Denaturierung | 95 °C | 15 sek |
| 3. | Annealing und Extension | 64 °C | 1 min |

Die PCR wurde mit dem MX4000 durchgeführt.

Die Auswertung der PCR erfolgte mittels des Software-Programms des Herstellers anhand der C_t -Werte. Für die Analyse der Ergebnisse wurde die gemessene normalisierte Baseline-korrigierte Fluoreszenz verwendet (dRn). Die C_t -Werte wurden anhand der Hintergrundfluoreszenz von mindestens drei Zyklen während der ersten 15 Zyklen berechnet. Die Option der „adaptive baseline“ wurde angewendet. C_t -Werte = 39,0 wurden nicht als positiv gewertet, da es bei 40 Zyklen gegen Ende der PCR zu Bildung von unspezifischen DNA-Produkten kommen kann.

3.3.12 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde an Rechnern der Tierärztlichen Hochschule Hannover mit den Programmen SAS, SigmaStat 2.0 und SigmaPlot durchgeführt. Signifikante Korrelationen und Unterschiede in der Fragebogenauswertung wurden mit dem Chiquadrattest und dem t-Test berechnet (SAS, SigmaStat). Die Normalverteilung der Ergebnisse des Larvenschlupftests wurde mit Kolmogorov-Smirnov (SigmaStat) überprüft. Die Korrelation der Ergebnisse aller Proben aus den *in vitro*-Tests, den EZRT und der PCR wurde mit dem Chiquadrattest (SAS, SigmaStat) berechnet. Die Berechnung der Stichprobengröße erfolgte nach BOCK (1998) und wurde bestätigt durch Frau Glaser, Institut für Biometrie, Epidemiologie und Informationsverarbeitung der Tierärztlichen Hochschule Hannover. Folgende Formel wurde angewendet:

$$n = p(1 - p) / \alpha^2 \times u_{1-\alpha/2}^2$$

n = Anzahl der Proben

p = vermutete Prävalenz

α = Genauigkeit (0,1)

$1 - \alpha = \text{Konfidenz (95 \%)}$

Dabei bezeichnet $u_{1-\alpha/2}$ das $1 - \alpha/2$ -Quantil der Standardnormalverteilung.

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Betriebe

In den Jahren 2000 und 2001 wurden insgesamt 1.383 Pferde auf 64 Betrieben untersucht. Die FN gibt in ihrem Jahresbericht von 1996 für Niedersachsen 19.500 Pferdehalter und 105.900 Pferde an, wobei aber nur die FN-registrierten Betriebe erfasst wurden. Die hier untersuchten Betriebe stellen also 0,3 % der registrierten Betriebe dar. Die Anzahl der untersuchten Pferde beläuft sich auf 1,3 %. Die Betriebe verteilten sich auf die Regierungsbezirke (RB) Lüneburg einschließlich Bremen (50 %), Braunschweig (9,4 %) und Hannover (40,6 %) (s. Abb. 4). Bis auf sechs Betriebe (9,4 %) konnte bei allen Pferdehaltern mindestens ein Tier mit MDS-Befall festgestellt werden. Vier dieser Betriebe lagen im RB Hannover, einer im RB Lüneburg und einer im RB Braunschweig.

3.4.2 Larvendifferenzierung

Die dritten Larven konnten zum Zeitpunkt der mikroskopischen Untersuchung nicht mehr differenziert werden. Durch die Lagerung in Alkohol bzw. Wasser über mehrere Wochen waren die Mitteldarmzellen nicht mehr erkennbar.

3.4.3 Kotprobenuntersuchung

Die Kotprobenuntersuchung ergab für die gesamte Probennahme bei 39,8 % der Proben den Nachweis für MDS-Befall; insgesamt erfüllten aber nur 25,2 % die Voraussetzung mit einer EpG > 150. Beim Vergleich der Proben aus den Jahren 2000 und 2001 konnte ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Häufigkeiten der Eiausscheidung festgestellt werden. Während im ersten Jahr der Untersuchungen 61,5 % der 369 Proben positiv für MDS waren (95 % Konfidenzintervall 56,3 – 66,5), konnten im folgenden Jahr nur bei 31,8 % von 1.014 Proben (95 % Konfidenzintervall 28,9 – 38,7) MDS nachgewiesen werden ($p < 0,001$). Bei fünf Tieren konnten Spulwürmer nachgewiesen werden (0,36 %). Drei (0,22 %) waren positiv für Bandwürmer. Die Verteilung der gesamten und der positiven Kotproben im

Verlauf der Probennahme ist in Abb. 7 dargestellt. Die Analyse der Wetterdaten vom Deutschen Wetterdienst [<http://www.dwd.de>] aus den Jahren 2000 und 2001 ergab keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Höchst-, Tiefst- und Niederschlagswerte.



Abbildung 6: Die Standorte der untersuchten Pferdebetriebe in Niedersachsen.

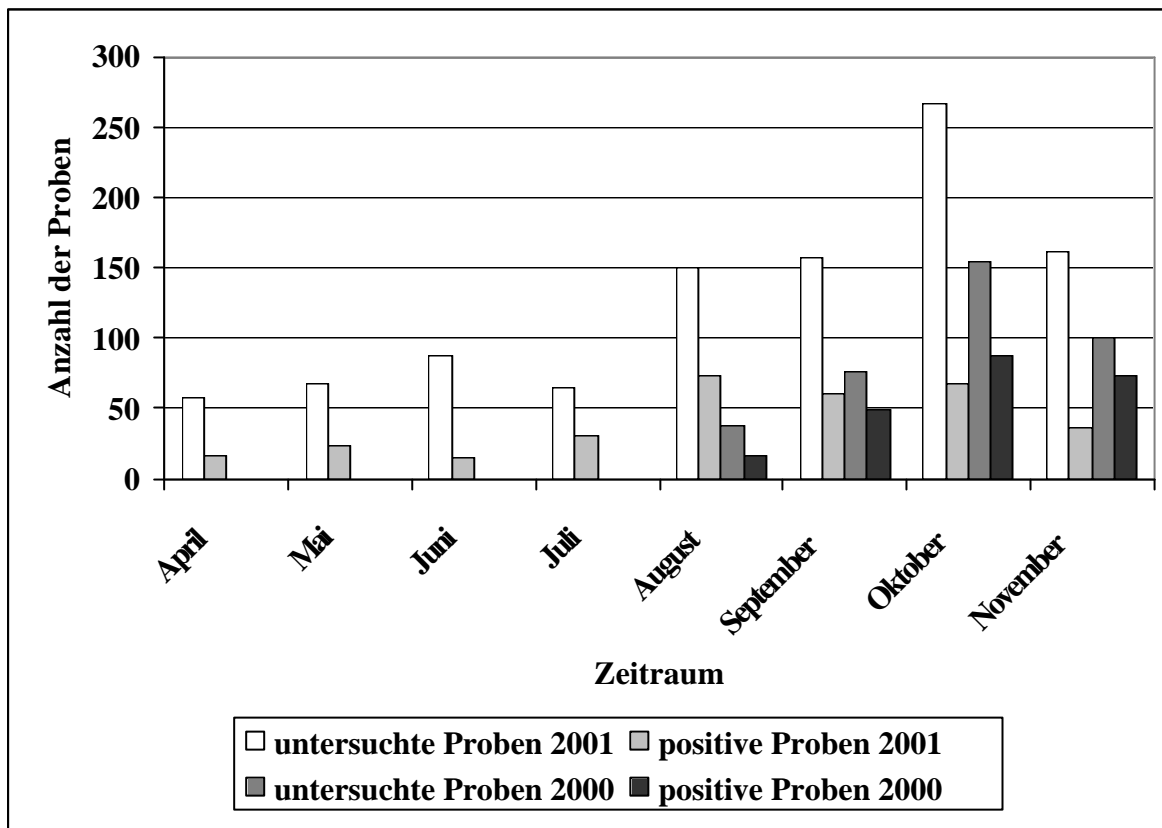


Abbildung 7: Verteilung der untersuchten und der positiven Kotproben in den Jahren 2000 ($n=369$) und 2001 ($n=1014$).

Die meisten Proben wurden in den Monaten August bis November 2001 gesammelt. Im Jahr 2001 mussten aufgrund der signifikant niedrigeren EpG-Werte wesentlich mehr Proben gesammelt werden als im Jahr 2000 ($p<0,001$). Während im Jahr 2000 220 von 369 (59,6 %) Proben im $EpG > 150$ lagen, waren es im Jahr 2001 nur 331 von 1014 (32,6 %).

Die Höhe der EpG unterschied sich signifikant zwischen den Jahren 2000 und 2001 für die in beiden Jahren betrachteten Monate August bis September. Der arithmetische Mittelwert der Proben von August bis November 2000 betrug $387,98 (\pm 160,4)$, während die Kotprobenuntersuchung in diesen Monaten im Jahr 2001 einen Mittelwert von $156,64 (\pm 83,8)$ ergab ($p<0,001$) (Abb. 8).

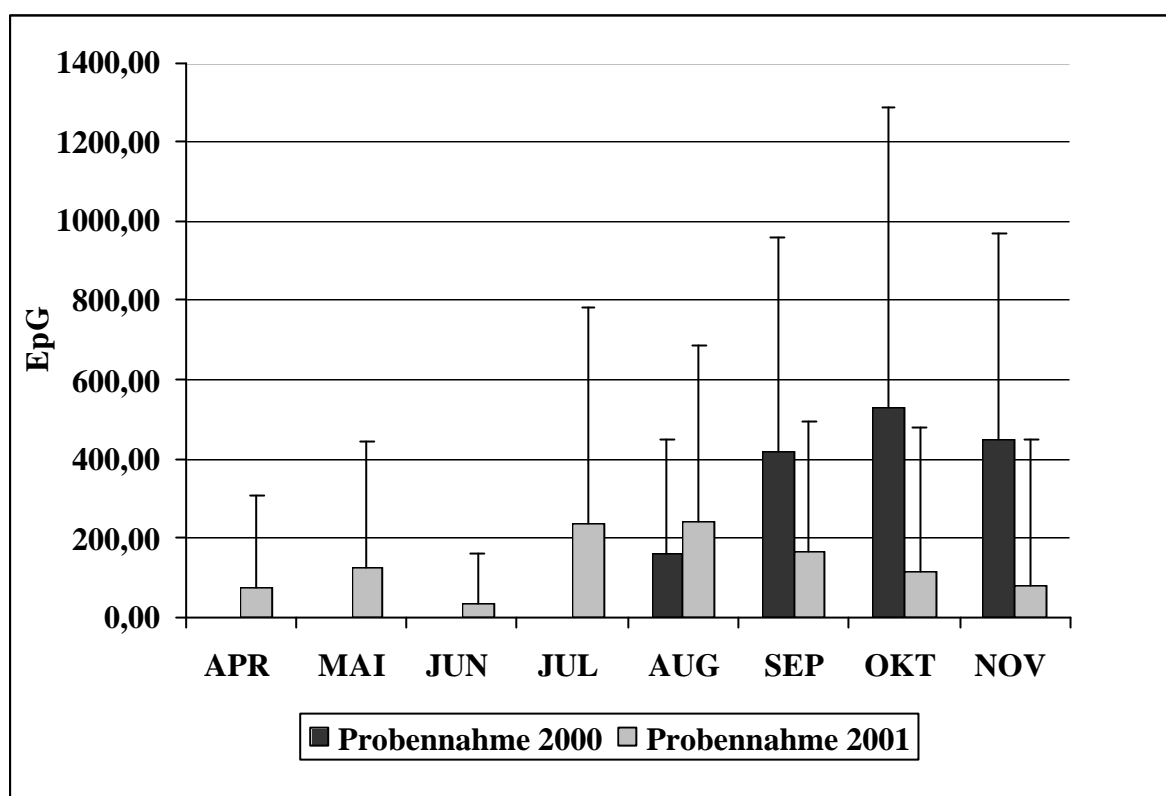


Abbildung 8: Arithmetische Mittelwerte der EpG pro Monat für die Probennahmen in den Jahren 2000 (n=369) und 2001 (n= 1014) ($p < 0,001$).

Bei 54,7 % der Betriebe lagen die mittleren EpG-Werte < 200 . Bei 9,4 % waren alle untersuchten Proben negativ. Bei Kleinbetrieben waren nur mittlere EpG-Werte < 200 festzustellen, womit bei diesen Betrieben keine weiteren Untersuchungen durchgeführt werden konnten. Die mittleren EpG-Werte von Reitställen und Zuchtbetrieben unterschieden sich signifikant. Während 63,9 % der Reitställe eine mittlere Eiausscheidung < 200 zeigten (n=36), lagen nur 23,8 % der Zuchtbetriebe in diesem Bereich (n=21). 8,3 % der Reitställe zeigte EpG-Werte > 500 . Bei den Zuchtbetrieben waren 28,6 % der Betriebe > 500 ($p=0,005$) (s. Abb. 9).

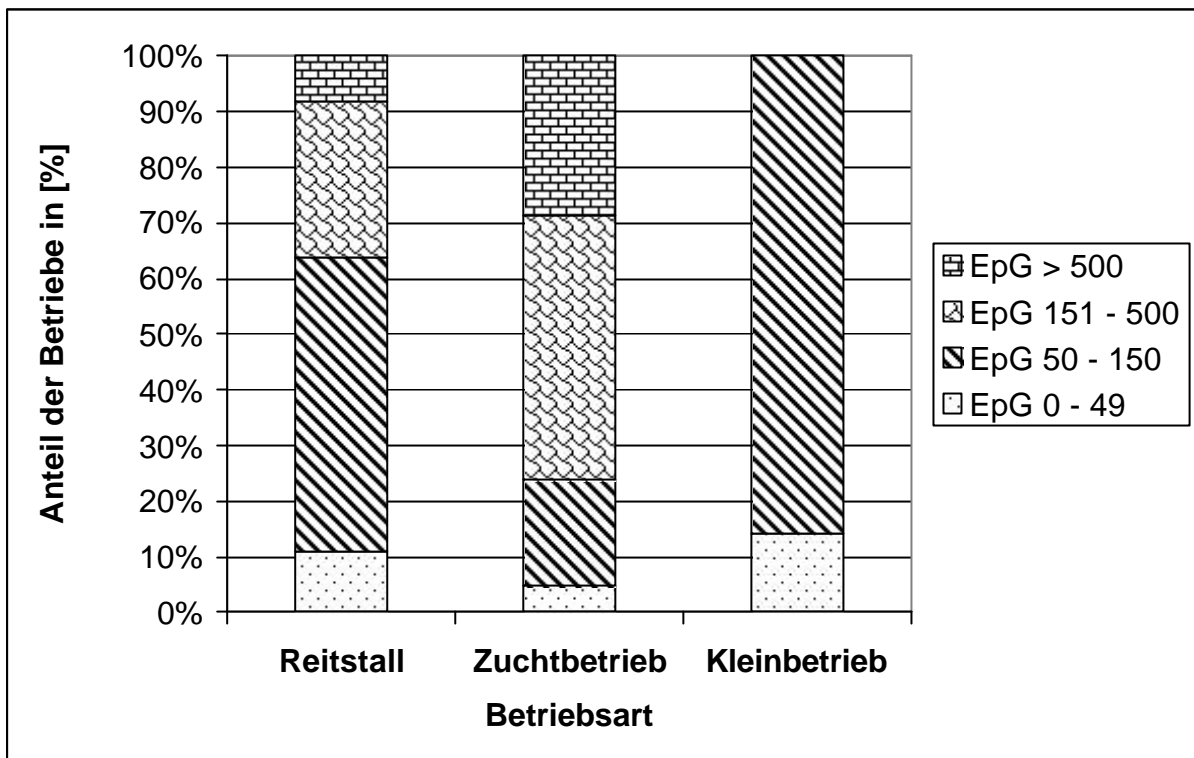


Abbildung 9: Arithmetische Mittel der EpG-Werte bei den verschiedenen Betriebsarten
 „Reitstall“ (n= 36), „Zuchtbetrieb“ (n= 21) und „Kleinbetrieb“ (n= 7).

3.4.4 Fragebogen

Die Tabellen der Fragebogenauswertung beziehen sich jeweils auf den prozentualen Anteil der verschiedenen Untersuchungskategorien an allen Proben (n=1.383) und den darin enthaltenen Prozentsatz an positiven Proben.

Alter:

Tiere zwischen 0,5 und 2 Jahren wiesen eine signifikant häufigere Eiausscheidung auf ($p=0,001$) als ältere Tiere (s. Tab. 4). Die Anzahl der Fohlen aus Zuchtbetrieben unterschied sich hochsignifikant von denen der anderen Betriebsarten ($p=0,001$). Von 126 Fohlen stammten 85,7 % aus Zuchtbetrieben, 12,7 % aus Reitställen und 1,6 % aus Kleinbetrieben.

Kategorie Alter	untersuchte Proben		positive Proben	
	n	[%]	n	[%]
0,5 – 2 J.	50	3,6	42	84,0
2,5 – 5 J.	201	14,5	98	48,8
5,5 – 10 J.	500	36,2	182	36,4
10,5 – 15 J.	438	31,7	159	36,3
15,5 – 20 J.	116	8,4	37	31,9
> 20 J.	46	3,3	20	43,5
keine Angabe	32	2,3	13	40,6

Tabelle 4: Verteilung der untersuchten Kotproben sowie deren Anteil an positiven Proben in den verschiedenen Altersklassen ($n=1.383$) ($p=0,001$).

Kategorie Rasse	untersuchte Proben		positive Proben	
	n	[%]	n	[%]
KB	2	0,1	1	50,0
WB	871	63,0	335	38,5
VB	77	5,6	32	41,6
KP/PO	401	29,0	170	42,4
keine Angabe	32	2,3	13	40,6

Tabelle 5: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben bei den verschiedenen „Rassen“ ($n=1.383$). KB: Kaltblut; WB: Warmblut; VB: Vollblut; KP/PO: Kleinpferd/Pony

Rasse:

Für den Fragebogen wurde für alle Tiere die genaue Rasse erfasst. Für eine bessere Übersicht wurde hier eine Einteilung in Kaltblut (KB), Warmblut (WB), Vollblut (VB) und Kleinpferde/Pony (KP/PO) vorgenommen. Es konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Eiausscheidung zwischen den Rassen festgestellt werden ($p=0,33$) (s. Abb. 5).

Geschlecht:

Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern hinsichtlich der Eiausscheidung festgestellt werden ($p=0,942$) (s. Tab. 6).

Kategorie Geschlecht	untersuchte Proben		positive Proben	
	n	[%]	n	[%]
Stute	680	49,2	302	44,4
Hengst	65	4,7	32	49,2
Wallach	638	46,1	217	34,0

Tabelle 6: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben bei Stuten, Hengsten und Wallachen.

Weidegang:

Die Tiere wurden entsprechend der Dauer des Weidegangs in verschiedenen Gruppen unterteilt: „kein Weidegang“, „stundenweise“, „tagsüber“, „Sommer“, „ganzjährig“. Die Ausscheidung von Strongylideneiern wies bei den verschiedenen Gruppen einen signifikanten Unterschied auf. Die Tiere, die stundenweise Weidegang hatten, waren weniger häufig befallen als die Tiere, die tagsüber Weidegang hatten ($p=0,034$). Auch bei dem Vergleich zwischen den Gruppen „Sommer“ und „ganzjährig“ war ein signifikanter Unterschied festzustellen ($p=0,015$). Allerdings zeigte der Vergleich von „tagsüber“ und „Sommer“ eine signifikant höhere Befallsrate bei den Tieren, die nur tagsüber auf der Weide waren ($p=0,005$). Die prozentuale Häufung der gesamten sowie der positiven Proben ist in Tab. 7 dargestellt.

Kategorie Weidegang	untersuchte Proben		positive Proben	
	n	[%]	n	[%]
stundenweise	342	24,7	115	33,6
tagsüber	722	52,2	320	44,3
Sommer	199	14,4	55	27,6
ganzjährig	68	4,9	36	52,9
keine Angabe	52	3,8	25	48,1

Tabelle 7: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben bei den verschiedenen Weidehaltungen (n=1.383) (p<0,05).

Betriebsart:

Die untersuchten Proben teilten sich folgendermaßen auf die verschiedenen Betriebsarten auf (n=1.383):

- Kleinbetrieb Weniger als 15 Pferde und höchstens zwei Fohlen, ein Besitzer (3,5 %).
- Reitstall < 20 Pferde von einem oder mehreren Besitzern mit mehr als 15 Tieren, insgesamt höchstens 20 Tiere, darunter höchstens zwei Fohlen (11,1 %).
- Reitstall > 20 Pferde von einem oder mehreren Besitzern, insgesamt mehr als 20 Tiere, darunter höchstens zwei Fohlen (47,7 %).
- Zucht < 20 Pferde von einem Besitzer, insgesamt höchstens 20 Tiere, darunter mehr als zwei Fohlen (3,6 %).
- Zucht > 20 Pferde von einem Besitzer, insgesamt mehr als 20 Tiere, darunter mehr als zwei Fohlen (4,0 %).

Kategorie Betriebsform	untersuchte Proben		positive Proben	
	n	[%]	n	[%]
Kleinbetrieb	49	3,5	26	53,1
Reitstall < 20 T.	153	11,1	50	32,7
Reitstall > 20 T.	605	43,7	198	32,7
Zucht < 20 T.	87	6,3	52	59,8
Zucht > 20 T.	489	35,4	225	46,0

Tabelle 8: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben bei den verschiedenen Betriebsformen (n=1.383).

In jeder Betriebsform wurden MDS-infizierte Pferde gefunden. Bei Zuchtbetrieben mit mehr als 20 Pferden wurde eine signifikant höhere Befallsrate beobachtet als bei den anderen Betrieben ($p=0,001$) (s. Tab. 8).

Bestandsgröße:

Betriebe mit mehr als 70 Tieren unterschieden sich signifikant von kleineren Betrieben ($p=0,006$). In diesen Betrieben waren mehr positive Probe festzustellen als bei den anderen. Die Verteilung der gesamten und der positiven Proben ist in Tab. 9 dargestellt.

Kategorie Tierzahl	untersuchte Proben		positive Proben	
	n	[%]	n	[%]
1 – 10 Tiere	46	3,3	28	60,9
11 – 20 Tiere	254	18,4	91	35,8
21 – 40 Tiere	587	42,4	188	32,0
41 – 70 Tiere	252	18,2	97	38,5
> 70 T.	244	17,6	147	60,2

Tabelle 9: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben bei unterschiedlicher Bestandsgröße (n=1.383).

Weidehygiene:

Verschiedene Daten zur Weidehygiene wurden bei den Betrieben erhoben. Es wurde nach der

Häufigkeit des Entfernens von Kot und Geilstellen von der Weide sowie nach Weidewechsel und Wechselbeweidung mit anderen Tierarten gefragt:

Weidewechsel:

Die Proben wurde nach der Art des Weidewechsels in folgende Gruppen eingeteilt: kein Weidewechsel, jährlicher Wechsel, halbjährlicher Wechsel, monatlicher Wechsel und wöchentlicher Wechsel. Es konnte ein signifikanter Unterschied für die Tiere ohne Weidewechsel berechnet werden ($p=0,01$). Bei diesen Tieren waren im Vergleich zu den Tieren mit Weidewechsel weniger Proben Strongyliden-positiv (s. Tab. 10).

Kategorie Weidewechsel	untersuchte Proben		positive Proben	
	n	[%]	n	[%]
nie	284	20,5	78	27,5
jährlich	16	1,2	14	87,5
halbjährlich	107	7,7	48	44,9
monatlich	803	58,1	333	41,5
wöchentlich	173	12,5	78	45,1

Tabelle 10: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von der Häufigkeit des Weidewechsels (n=1.383).

Kotsammeln:

Die Betriebe wurden eingeteilt nach der Häufigkeit des „Kotsammelns“. Es konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,001$). Kotsammeln reduzierte den Anteil der positiven Proben von 50,3 % auf 28,6 % in den Betrieben (s. Tab. 11).

Kategorie Kotsammeln	untersuchte Proben		positive Proben	
	n	[%]	n	[%]
nie	718	51,9	361	50,3
unregelmäßig	395	28,6	128	32,4
alle 2 Wochen	162	11,7	38	23,5
1x / Woche	57	4,1	13	22,8
2x / Woche	51	3,7	11	21,6

Tabelle 11: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von der Häufigkeit des Entfernens von Kot auf der Weide(n=1.383).

Geilstellenentfernung:

Die Betriebe wurden danach eingeteilt, ob und wie häufig sie Geilstellen entfernten (s. Tab. 12). Es konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt zwischen den Betrieben, die diese Maßnahme durchführten und denen, die Geilstellen nicht entfernten ($p=0,001$). 41,2 % der Proben von den Betrieben, bei denen keine Geilstellen entfernt wurden, waren positiv. Im Vergleich waren nur 22,9 % der Proben aus den Betrieben positiv, die diese Maßnahme in unterschiedlicher Häufigkeit durchführten. Die Maßnahme „Geilstellenentfernung“ reduzierte also die Gesamteiausscheidung um fast die Hälfte.

Kategorie Geilstellen	untersuchte Proben		positive Proben	
	n	[%]	n	[%]
nie	105	7,6	24	22,9
unregelmäßig	232	16,8	111	47,8
alle 2 Wochen	739	53,4	293	39,6
1x / Woche	307	22,2	123	40,1
2x / Woche	0	0,0	0	0,0

Tabelle 12: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von der Häufigkeit des Entfernens Geilstellen auf der Weide(n=1.383).

Wechselbeweidung:

Die Proben wurden eingeteilt in die Gruppen „keine Wechselbeweidung“, Wiederkäuer, Esel und Wildwiederkäuer (s. Tab. 13). Schweine wurden auf keinem der Betriebe gehalten. Für die Wechselbeweidung mit Wiederkäuern und Wildwiederkäuern konnte ein signifikanter Unterschied zu den Betrieben ohne Wechselbeweidung festgestellt werden. Bei letzteren wurden wesentlich weniger positive Proben gefunden ($p=0,001$). Der Unterschied zu Haltungen mit Eseln war nicht signifikant ($p=0,162$).

Kategorie	untersuchte Proben		positive Proben	
	n	[%]	n	[%]
keine	935	67,6	319	34,1
Wiederkäuer	295	21,3	139	47,1
Esel	57	4,1	28	49,1
Wildwiederkäuer	96	6,9	65	67,7

Tabelle 13: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von der Wechselbeweidung durch andere Tierarten (n=1.383).

Düngung:

Die Proben wurde eingeteilt nach dem Düngemittel, welches von den Betrieben eingesetzt wurde: „keine Düngung“, „Mineraldünger“, „Gülle“, „Pferdemist“ und „sonstiges“ (s. Tab. 14). Die Gruppen „Gülle“ und „Pferdemist“ unterschieden sich signifikant von der Gruppe „Mineral“ durch eine häufigere Eiausscheidung ($p<0,001$). Alle drei Gruppen wiesen signifikant mehr positive Proben auf als die Gruppe „keine Düngung“ ($p=0,018$).

Kategorie Düngemittel	untersuchte Proben		positive Proben	
	n	[%]	n	[%]
keine	51	3,7	7	13,7
Mineral	1094	79,1	402	36,7
Gülle	95	6,9	67	70,5
Pferdemist	96	6,9	65	67,7
sonstiges	47	3,4	10	21,3

Tabelle 14: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von verschiedenen Düngemitteln (n=1.383).

Stallhaltung:

Bei der Stallhaltung wurde unterschieden zwischen den Tieren, die unregelmäßig oder täglich gemistet wurden und solchen, die auf Tiefstreu standen (s. Tab. 15). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren, die täglich gemistet wurden und den Tieren, die auf Tiefstreu gehalten wurden ($p < 0,001$). Tiefstreu begünstigte eine erhöhte Eiausscheidung.

Kategorie Misten	untersuchte Proben		positive Proben	
	n	[%]	n	[%]
unregelmäßig	12	0,9	7	58,3
täglich	596	43,1	163	27,3
Tiefstreu	743	53,7	368	49,5
unbekannt	32	2,3	13	40,6

Tabelle 15: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von der Stallhaltung und der Häufigkeit des Mistens (n=1.383).

Desinfektionsmaßnahmen:

Hier wurden die Betriebe danach eingeteilt, ob sie im Stall Desinfektionsmaßnahmen durchführten. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Desinfektionsmaßnahmen und einer reduzierten Eiausscheidung festgestellt werden (s. Tab. 16).

Kategorie Desinfektion	untersuchte Proben		positive Proben	
	n	[%]	n	[%]
ja	925	66,9	379	41,0
nein	458	33,1	172	37,6

Tabelle 16: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von der Durchführung von Desinfektionsmaßnahmen (n=1.383).

Anthelminthikaeinsatz:

Hier wurde das zuletzt eingesetzte Anthelminthikum erfasst. Die verschiedenen Präparate wurden nach den Wirkstoffgruppen zusammengefasst: „ohne Behandlung“, PYR, ML und BZ (s. Tab 17). Der Einsatz von ML führte zu einer signifikant niedrigeren Befallsrate im Vergleich zu PYR, BZ und der unbehandelten Gruppe ($p < 0,001$). Dagegen unterschieden sich die Gruppen PYR, BZ und „ohne Behandlung“ nicht signifikant voneinander ($p > 0,2$).

Kategorie Anthelminthikum	untersuchte Proben		positive Proben	
	n	[%]	n	[%]
keine	16	1,2	14	87,5
PYR	410	29,6	210	51,2
ML	679	49,1	161	23,7
BZ	278	20,1	166	59,7

Tabelle 17: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von dem zuletzt eingesetzten Anthelminthikum (n=1.383).

Klinik:

Während der Untersuchungen konnten bei keinem Pferd klinische Symptome hinsichtlich eines Parasitenbefalls nachgewiesen werden. Von 64 Betrieben berichteten vier Betriebe, dass

sie häufiger Probleme mit dem Abmagern einzelner Tiere hatten. Ein Betrieb stellte vermehrt Durchfall fest und ein Betrieb hatte in letzter Zeit Probleme mit Koliken gehabt. Diese Betriebe machten Parasiten für diese Symptome verantwortlich, eine tierärztliche Untersuchung und Diagnostik waren nicht durchgeführt worden. Nur drei dieser Betriebe kamen für die Resistenztests in Betracht.

3.4.5 Eizahlreduktionstest

3.4.5.1 Fenbendazol

Bei 21,7 % der mit FBZ behandelten Pferde konnte eine EZR von 100 % festgestellt werden. Mehr als 50 % zeigten eine EZR von < 90 % (s. Abb. 10). In jedem Betrieb war mindestens ein Pferd mit einer EZR von < 90 % vorhanden. Der arithmetische Mittelwert der EZR-Werte lag bei 7 von 10 Betrieben < 90 %. Die arithmetischen Mittelwerte der EpGs vor und nach der Behandlung mit FBZ sowie die gemittelten EZR-Werte sind in Tab. 25 im Anhang angegeben.

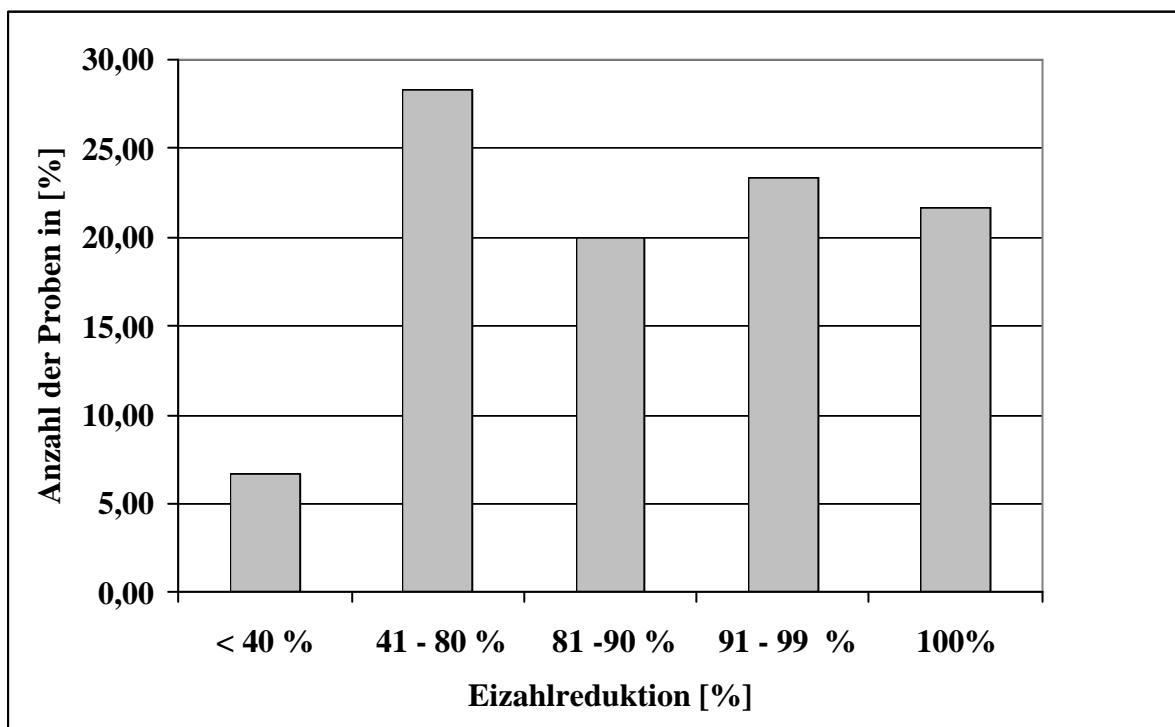


Abbildung 10: Verteilung der EZR bei 60 Proben in 10 Betrieben nach Therapie mit FBZ.

Betrieb	mEpG _{vB}	mEpG _{nB}	mFECR [%]
1	1000 (± 659)	429 (± 225)	54,82 (± 30)
2	490 (± 178)	60 (± 82)	90,20 (± 13)
3	960 (± 383)	140 (± 139)	86,75 (± 12)
4	1389 (± 931)	56 (± 46)	93,51 (± 10)
5	725 (± 375)	75 (± 42)	85,61 (± 16)
6	1019 (± 592)	181 (± 194)	75,90 (± 10)
7	680 (± 391)	150 (± 158)	122,4 (± 41)
8	730 (± 1613)	350 (± 591)	75,37 (± 45)
9	583 (± 470)	142 (± 139)	74,76 (± 17)
10	1110 (± 1620)	340 (± 597)	80,37 (± 13)

Tabelle 18: Arithmetische Mittelwerte der Eizahlen vor (mEpG_{vB}) und nach (mEpG_{nB}) der Anthelminthikabehandlung in den einzelnen Betrieben (Standardabweichung) sowie der arithmetische Mittelwert der Eizahlreduktionen pro Betrieb.

3.4.5.2 Ivermectin

Für die Betriebe 11 – 20 wurde der EZRT mit IVM durchgeführt. Nach der Behandlung lagen die EpG-Werte bei allen Tieren unter der Nachweisgrenze von 50 EpG und die EZR für alle bei 100 %.

3.4.6 Larvenschlupfhemmtest

3.4.6.1 Vorversuch I

Die Ergebnisse des Vorversuch I, der an zwei unterschiedlichen Strongylidenpopulationen (Population L + P) in fünf unabhängigen Wiederholungen jeweils im doppelten Ansatz durchgeführt wurde, sind den Anhangstabellen 26 und 27 zu entnehmen. Die Tab. 19 und 20 geben die Mittelwerte für die LD₅₀, LD₉₆ und LD₉₉ sowie die Larvenschlupfhemmung bei 0,1 µg TBZ/ml aus den fünf Versuchswiederholungen wieder. Für die BZ-sensible Referenzpopulation P ergab sich aus allen Untersuchungen für den LD₅₀-Wert ein arithmetisches Mittel von 0,06 µg TBZ/ml. Die Standardabweichung betrug 0,01. Bei der

Schwellenkonzentration von 0,1 µg TBZ/ml war eine Larvenschlupfhemmung von 94 % ($\pm 2,5$) zu beobachten. Für den BZ-resistenten Stamm L lag der Mittelwert der LD₅₀ bei 0,26 µg TBZ/ml mit einer Standardabweichung von 0,11. Bei diesem Stamm lag die Larvenschlupfhemmung bei einer Konzentration von 0,1 µg TBZ/ml bei 24 % ($\pm 2,44$). Die Larvenschlupfhemmung unterschied sich bei den beiden Populationen signifikant ($p=0,005$). Die Larvenschlupfhemmung für beide Populationen ist in Abb. 11 dargestellt.

Wiederholung	LS-H bei 0,1 µg TBZ/ml [%]	LD ₅₀ [µg TBZ/ml]	LD ₉₆ [µg TBZ/ml]	LD ₉₉ [µg TBZ/ml]
1	91 ($\pm 1,47$)	0,06 ($\pm 0,00$)	0,14 ($\pm 0,00$)	0,17 ($\pm 0,00$)
2	95 ($\pm 2,23$)	0,06 ($\pm 0,01$)	0,13 ($\pm 0,01$)	0,16 ($\pm 0,01$)
3	95 ($\pm 1,55$)	0,06 ($\pm 0,00$)	0,14 ($\pm 0,00$)	0,17 ($\pm 0,00$)
4	97 ($\pm 2,17$)	0,06 ($\pm 0,01$)	0,13 ($\pm 0,01$)	0,16 ($\pm 0,00$)
5	93 ($\pm 1,48$)	0,07 ($\pm 0,01$)	0,14 ($\pm 0,00$)	0,16 ($\pm 0,00$)
Mittelwerte 1-5	94 ($\pm 2,50$)	0,06 ($\pm 0,01$)	0,14 ($\pm 0,00$)	0,16 ($\pm 0,00$)

Tabelle 19: Arithmetische Mittelwerte der Larvenschlupfhemmung (LS-H), der LD₅₀-, LD₉₆- und der LD₉₉-Werte aus den fünf Wiederholungen des Vorversuchs I mit der Population P.

Wiederholung	LS-H bei 0,1 µg TBZ/ml [%]	LD ₅₀ [µg TBZ/ml]	LD ₉₆ [µg TBZ/ml]	LD ₉₉ [µg TBZ/ml]
1	21 ($\pm 0,64$)	0,28 ($\pm 0,02$)	0,59 ($\pm 0,02$)	0,69 ($\pm 0,01$)
2	25 ($\pm 0,95$)	0,27 ($\pm 0,02$)	0,64 ($\pm 0,03$)	0,76 ($\pm 0,04$)
3	27 ($\pm 3,29$)	0,27 ($\pm 0,01$)	0,64 ($\pm 0,01$)	0,76 ($\pm 0,01$)
4	27 ($\pm 2,16$)	0,23 ($\pm 0,01$)	0,57 ($\pm 0,01$)	0,69 ($\pm 0,01$)
5	24 ($\pm 0,22$)	0,27 ($\pm 0,01$)	0,60 ($\pm 0,04$)	0,71 ($\pm 0,04$)
Mittelwerte 1-5	24 (2,44)	0,26 ($\pm 0,11$)	0,61 ($\pm 0,30$)	0,72 ($\pm 0,25$)

Tabelle 20: Arithmetische Mittelwerte der Larvenschlupfhemmung (LS-H), der LD₅₀-, LD₉₆- und der LD₉₉-Werte aus den fünf Wiederholungen des Vorversuchs I mit der Population L.

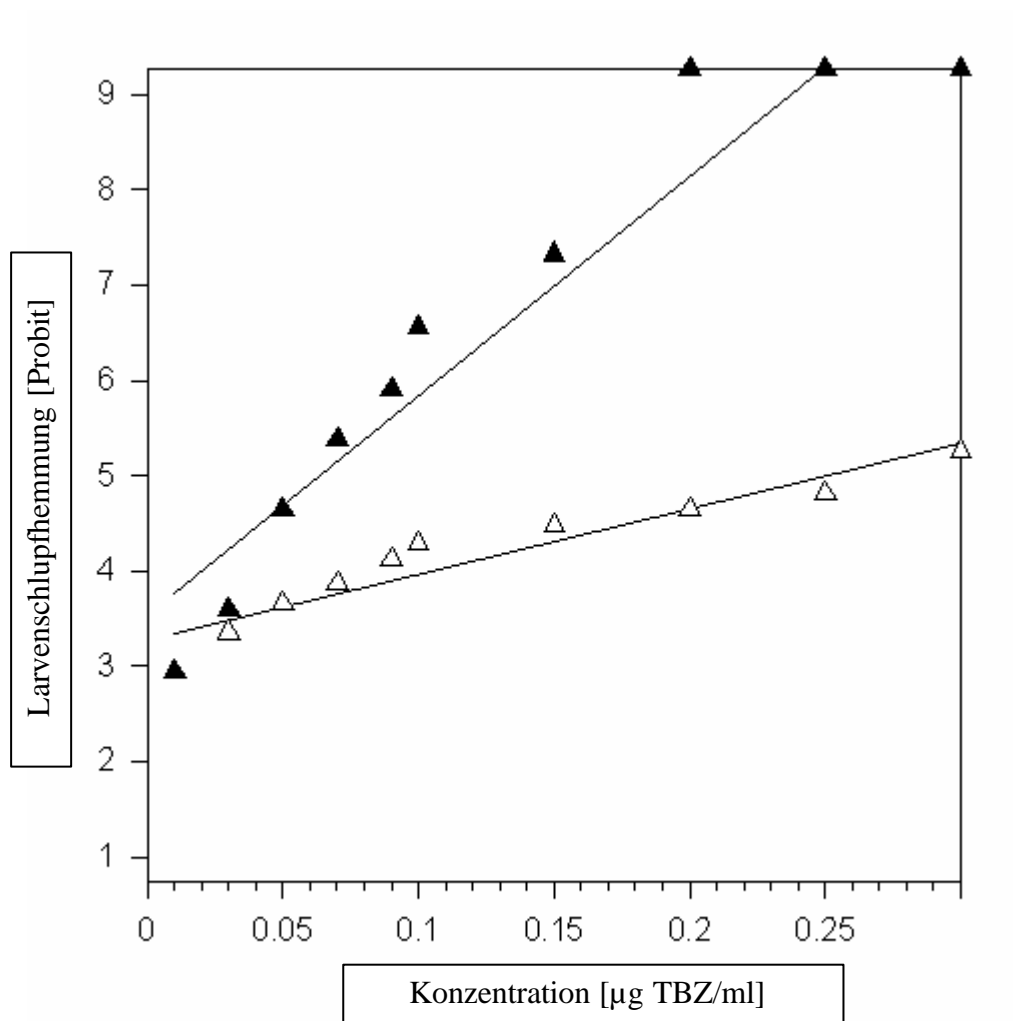


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Larvenschlupfhemmung der BZ-resistenten (? ; Population L) und der BZ-sensiblen (? ; Population P) Strongylidenpopulation.

3.4.6.2 Vorversuch II

Für den LSHT mit PYR wurden fünf unabhängige Wiederholungen im Parallellansatz mit den Strongylidenpopulationen (L und M) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Anhangstabellen 28 und 29 aufgeführt. In Tab 21 und 22 sind die Mittelwerte der LD₅₀-, LD₉₆- und der LD₉₉-Werte aus den fünf Wiederholungsversuchen sowie die Standardabweichung

dargestellt. Für die Population L betrug der arithmetische Mittelwert der LD₅₀ aller Versuchsdurchgänge 2,69 µg PYR/ml mit einer Standardabweichung von 1,65. Die Population M lag mit ihrem LD₅₀-Wert bei 13,94 µg PYR/ml. Die Standardabweichung betrug hier 0,76. Trotz der unterschiedlichen LD₅₀-Werte unterschieden sich die beiden Populationen nicht signifikant in ihrer Larvenschlupfhemmung (p=0,229). Beide Populationen gelten als PYR-sensibel. Mangels Referenzwerte für PYR-Resistenz aus der Literatur wurde hier als Schwellenwert der LD₅₀-Wert der Population M plus dreifacher Standardabweichung angenommen (16,22 µg PYR/ml).

Wiederholung	LD ₅₀ [µg PYR/ml]	LD ₉₆ [µg PYR/ml]	LD ₉₉ [µg PYR/ml]
1	1,53 (± 0,24)	18,87 (± 1,70)	24,57 (± 2,18)
2	4,94 (± 0,01)	20,16 (± 0,29)	25,16 (± 0,39)
3	2,1 (± 0,07)	16,24 (± 5,32)	20,88 (± 7,05)
4	1,02 (± 0,05)	21,12 (± 2,00)	27,72 (± 2,67)
5	3,84 (± 0,28)	18,92 (± 7,74)	23,87 (± 10,18)
Mittelwerte 1-5	2,69(± 1,65)	19,06 (± 7,95)	24,44 (± 2,46)

Tabelle 21: Arithmetische Mittelwerte der LD₅₀-, LD₉₆- und der LD₉₉-Werte aus den 5 Wiederholungen des Vorversuchs II mit der Population L.

Wiederholung	LD ₅₀ [µg PYR/ml]	LD ₉₆ [µg PYR/ml]	LD ₉₉ [µg PYR/ml]
1	13,15 (± 0,07)	29,10 (± 0,82)	34,33 (± 1,11)
2	13,55 (± 2,44)	28,09 (± 0,00)	32,87 (± 0,80)
3	13,78 (± 0,51)	30,88 (± 0,32)	36,50 (± 0,59)
4	14,06 (± 0,15)	29,91 (± 2,99)	35,12 (± 1,26)
5	15,16 (± 1,34)	32,93 (± 3,05)	38,76 (± 3,62)
Mittelwerte 1-5	13,94(± 0,76)	30,18 (± 12,43)	35,52 (± 2,24)

Tabelle 22: Arithmetische Mittelwerte der LD₅₀-, LD₉₆- und der LD₉₉-Werte aus den 5 Wiederholungen des Vorversuchs II mit der Population M.

Da bei dem LSHT mit PYR im Vergleich zu dem LSHT mit TBZ ein verändertes Verhältnis von embryonierten zu nichtembryonierten Eiern festgestellt wurde, wurden weitere drei Wiederholungen im Doppelansatz durchgeführt und dieses Verhältnis zusätzlich zur Larvenschlupfhemmung ausgezählt. Die arithmetischen Mittelwerte der Ergebnisse für den LSHT mit TBZ und mit PYR sind in den Anhangstabellen 30 und 31 aufgeführt. Die Verteilung der Entwicklungsstadien bei den verschiedenen Konzentrationsstufen mit TBZ und PYR ist in den Abb. 12 und 13 dargestellt. Der Unterschied an der Anzahl embryonierter Eier zwischen vergleichbaren Konzentrationen ist hochsignifikant ($p < 0,001$). Während der Anteil an embryonierten Eiern im LSHT mit TBZ etwa konstant bleibt, steigt er beim LSHT mit PYR mit zunehmender Konzentration bis zu einem Anteil von 84,5 % an.

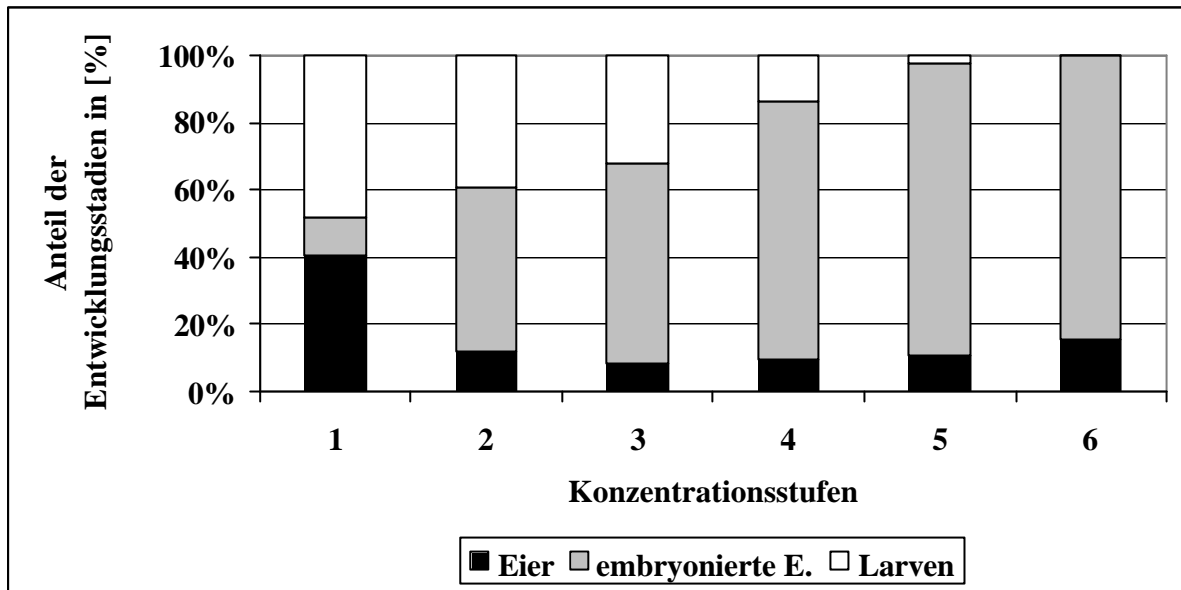


Abbildung 12: Verhältnis von embryonierten und nichtembryonierten Eiern und Larven im LSHT mit PYR für Population L. Konzentrationsstufen: 1= Kontrolle (0 mg PYR/ml), 2=0,15 mg PYR/ml, 3=0,5 mg PYR/ml, 4=1,5mg PYR/ml, 5=15 mg PYR/ml und 6= 25mg PYR/ml.

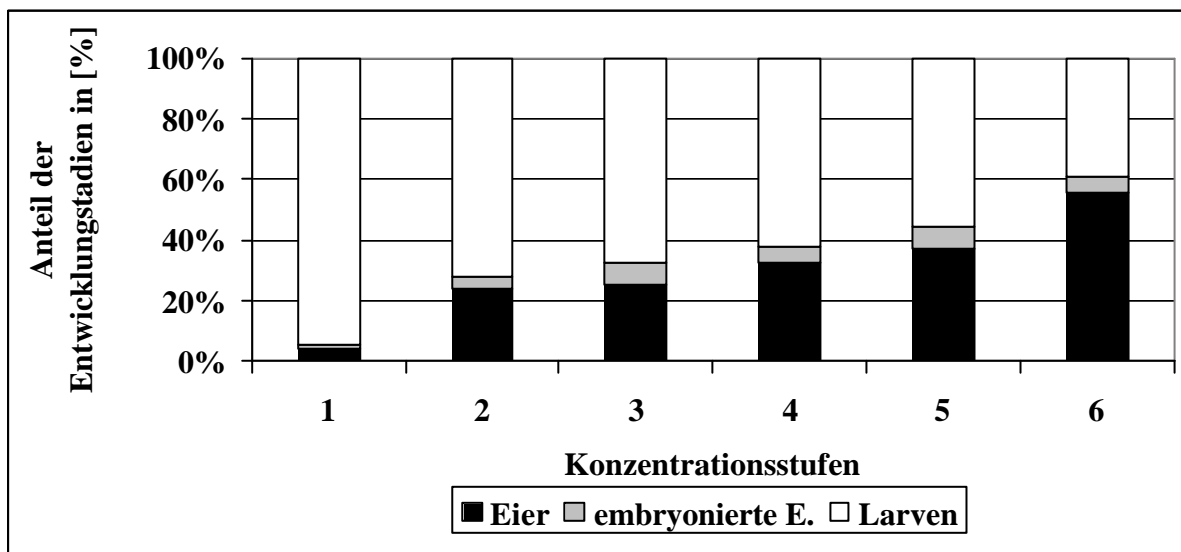


Abbildung 13: Verhältnis von embryonierten und nichtembryonierten Eiern und Larven im LSHT mit TBZ für Population L. Konzentrationsstufen: 1= Kontrolle (0 mg TBZ/ml), 2=0,1 mg TBZ/ml, 3=0,15 mg TBZ/ml, 4=0,2 mg TBZ/ml, 5=0,25 mg TBZ/ml und 6=0,3 mg TBZ/ml.

3.4.6.3 Versuch I

Die Ergebnisse des LSHT mit TBZ für die Betriebe 1-20 sind in den Anhangstabellen 34 und 35 aufgeführt. Von den 139 getesteten Proben konnten 4 Tests nicht ausgewertet werden und wurden verworfen. Für 69,63 % der untersuchten Proben wurde ein LD_{50} -Wert von $> 0,1 \mu\text{g}$ TBZ/ml ermittelt. Im Vergleich der Proben aus den Jahren 2000 und 2001 war kein signifikanter Unterschied festzustellen ($p=0,24$). Die Verteilung der LD_{50} -Werte ist in Abb. Dargestellt. Die Prävalenz von Pferden mit LD_{50} -Werten $> 0,1 \mu\text{g}$ TBZ/ml unterschied sich nicht signifikant in den verschiedenen Betriebsarten ($p=0,554$). Bei drei von zehn Zuchtbetrieben wiesen < 50 % der mittels des LSHT untersuchten Proben Resistenz auf, bei Reitställen war es einer von zehn Betrieben ($n=20$) (s. Abb. 14).

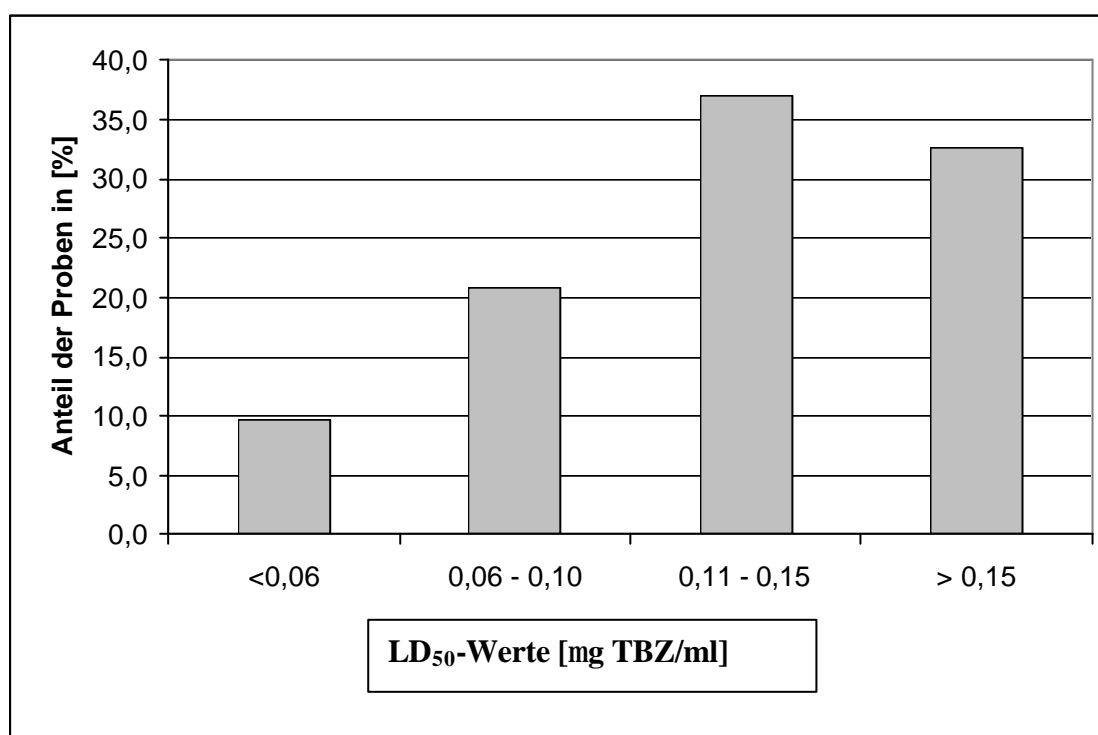


Abbildung 14: Verteilung der LD_{50} -Werte der im LSHT für TBZ untersuchten Proben ($n=135$).

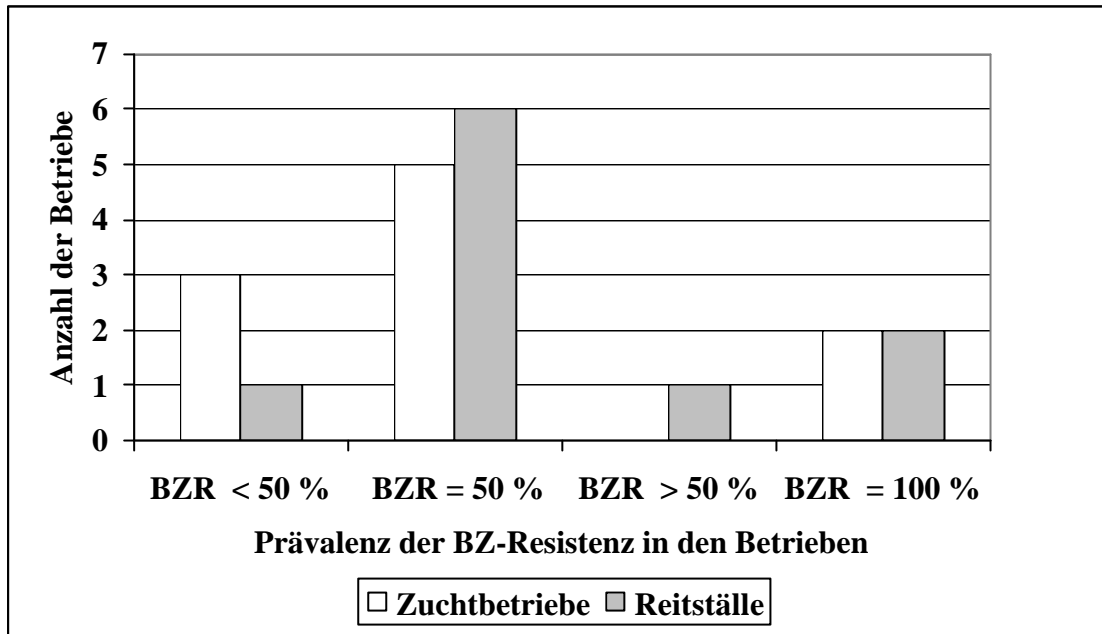


Abbildung 15: Auftreten von BZ-Resistenz (BRZ) ($LD_{50} > 0,1 \text{ mg TBZ/ml}$) in Prozent der Tiere pro Betrieb in den Betriebsformen „Zuchtbetrieb“ und „Reitstall“.

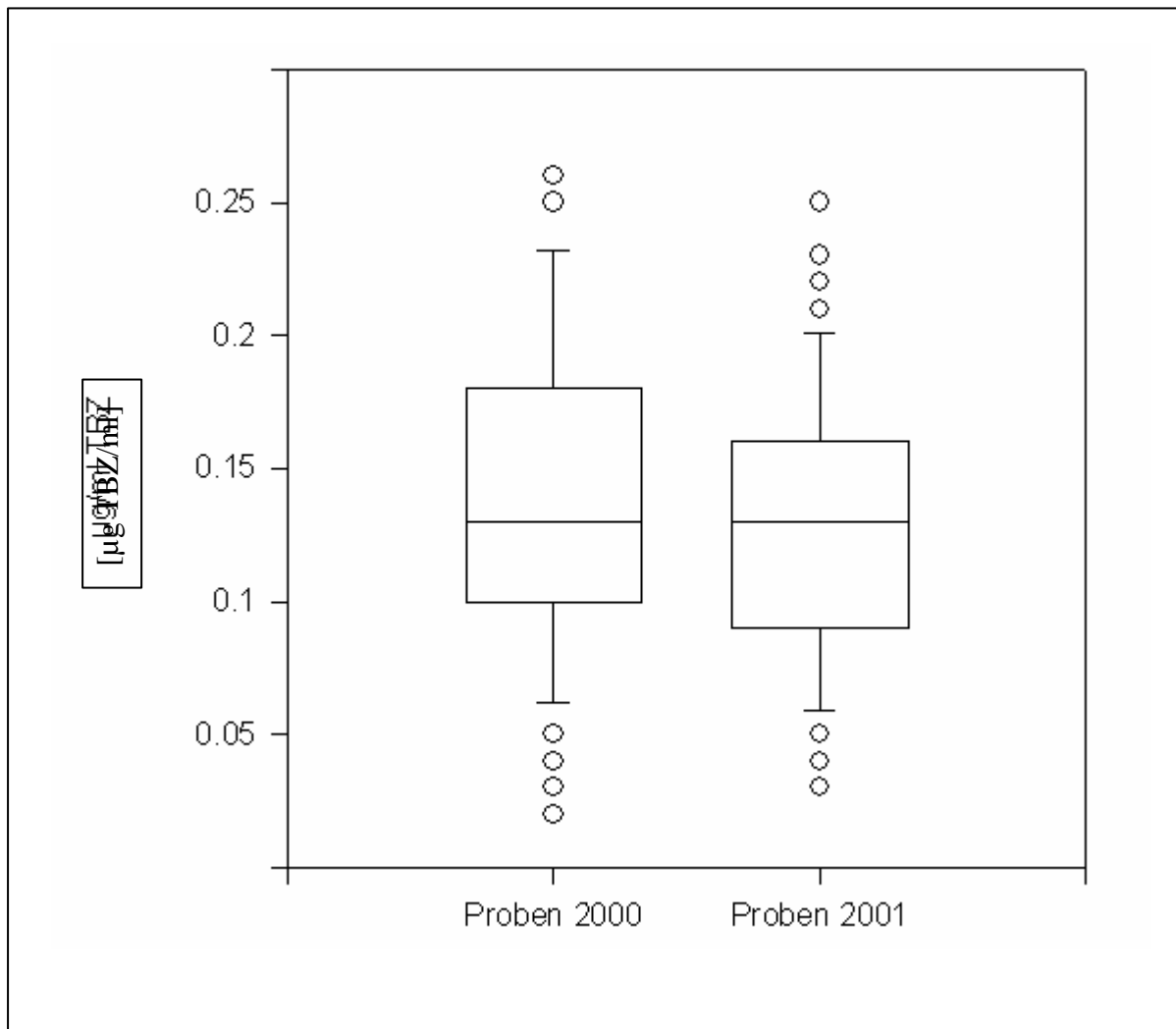


Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung der LD₅₀-Werte der Proben aus dem Jahren 2000 (n=61) und 2001 (n=74) im Vergleich.

3.4.6.4 Versuch II

Der LSHT mit PYR wurde an 77 Tieren in 10 Betrieben im Jahr 2001 durchgeführt. Bei 13 Proben konnten die Tests nicht ausgewertet werden und wurden verworfen. Die LD₅₀- und LD₉₉-Werte sind in der Anhangstabelle 35 aufgeführt. 53,1 % der Proben ergaben einen LD₅₀-Wert von > 16,1 µg PYR/ml. Die Verteilung der LD₅₀-Werte ist in Abb. 17 dargestellt.

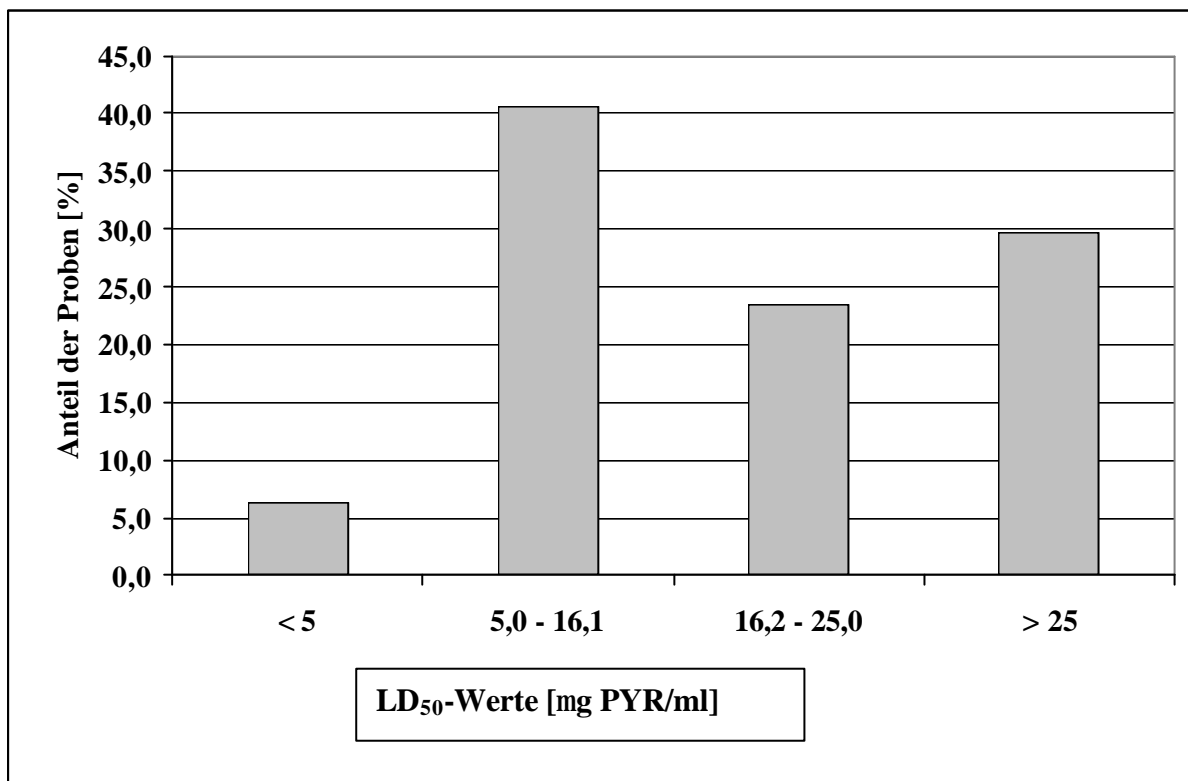


Abbildung 17: Verteilung der LD₅₀-Werte der im LSHT für PYR untersuchten Proben (n=64).

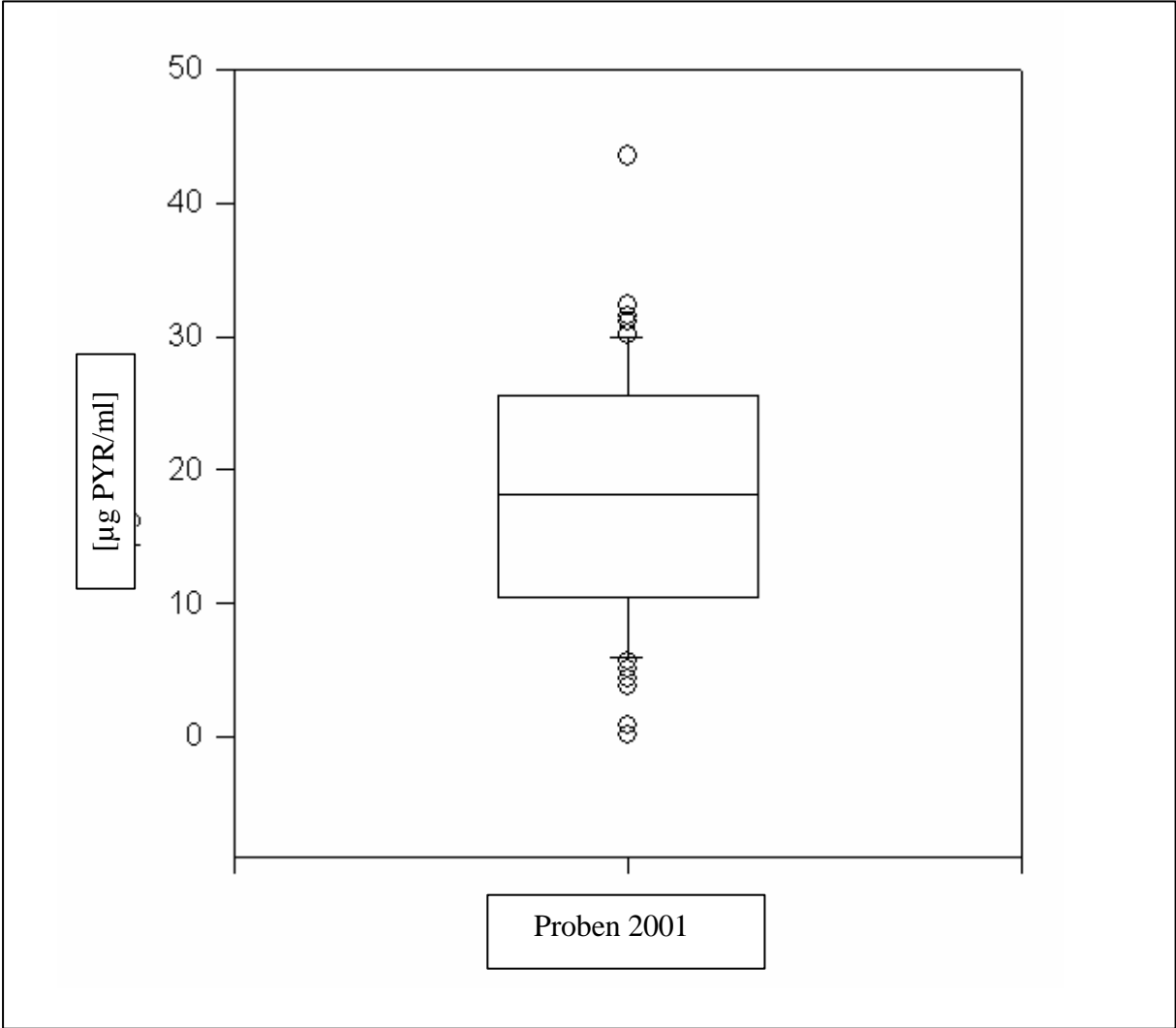


Abbildung 18: Verteilung der LD₅₀-Werte aus dem LSHT mit PYR (n=64).

3.4.7 Larvenparalysetest

3.4.7.1 Vorversuch III

Für den LPT mit IVM wurden fünf unabhängige Wiederholungen im Parallellansatz mit zwei Strongylidenpopulationen (L und M) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Anhangstabellen 32 und 33 aufgeführt. In Tab 23 und 24 sind die Mittelwerte der LD₅₀-, LD₉₆- und der LD₉₉-Werte aus den fünf Wiederholungsversuchen sowie die Standardabweichungen dargestellt. Für Population L betrug der arithmetische Mittelwert der LD₅₀ aller Versuchsdurchgänge 0,22 µg IVM/ml mit einer Standardabweichung von 0,20. Population M lag mit seinem LD₅₀-Wert bei 0,36 µg IVM/ml. Die Standardabweichung betrug hier 0,14. Die beiden Populationen unterschieden sich nicht signifikant im Anteil der paralysierten Larven (p=0,964). Beide Populationen galten als IVM-sensibel. Auch für IVM gibt es keine Referenzwerte aus der Literatur für eine IVM-Resistenz im LPT mit kleinen Strongyliden. Der Mittelwert der LD₅₀ von Population M zuzüglich der dreifachen Standardabweichung soll hier als Annäherungswert für eine mögliche Resistenz gewertet werden (0,64 µg IVM/ml).

Wiederholung	LD ₅₀ [µg IVM/ml]	LD ₉₆ [µg IVM/ml]	LD ₉₉ [µg IVM/ml]
1	0,03 (± 0,04)	1,97 (± 2,14)	2,61 (± 1,13)
2	0,19 (± 0,02)	2,09 (± 2,08)	2,71 (± 1,20)
3	0,13 (± 0,01)	2,02 (± 2,11)	2,64 (± 1,16)
4	0,57 (± 0,33)	2,29 (± 1,91)	2,86 (± 1,32)
5	0,20 (± 0,05)	2,10 (± 2,06)	2,73 (± 1,22)
Mittelwerte 1-5	0,22 (± 0,20)	2,09 (± 0,86)	2,71 (± 0,10)

Tabelle 23: Arithmetische Mittelwerte der LD₅₀-, LD₉₆- und der LD₉₉-Werte aus den fünf Wiederholungen des Vorversuchs III mit der Population L.

Wiederholung	LD ₅₀ [µg IVM/ml]	LD ₉₆ [µg IVM/ml]	LD ₉₉ [µg IVM/ml]
1	0,22 (± 0,20)	2,17 (± 2,00)	2,84 (± 1,24)
2	0,36 (± 0,15)	2,16 (± 2,01)	3,88 (± 1,25)
3	0,22 (± 0,13)	2,06 (± 2,05)	2,66 (± 1,20)
4	0,55 (± 0,22)	3,06 (± 1,97)	3,89 (± 1,27)
5	0,44 (± 0,022)	2,23 (± 1,97)	2,82 (± 1,27)
Mittelwerte 1-5	0,36(± 0,14)	2,34 (1,02)	3,22 (± 0,61)

Tabelle 24: Arithmetische Mittelwerte der LD₅₀-, LD₉₆- und der LD₉₉-Werte aus den fünf Wiederholungen des Vorversuchs II mit der Population M.

3.4.7.2 Versuch III

Der LPT mit IVM wurde an 77 Tieren in 10 Betrieben durchgeführt. 14 der Tests konnten nicht ausgewertet werden und wurden verworfen. Die LD₅₀- und LD₉₉-Werte sind in der Anhangstabelle 19 aufgeführt. 60,3 % der Proben ergaben einen LD₅₀-Wert von > 0,63 µg IVM/ml (s. Abb. 311). Die Verteilung der LD₅₀-Werte ist in Abb. 18 dargestellt.

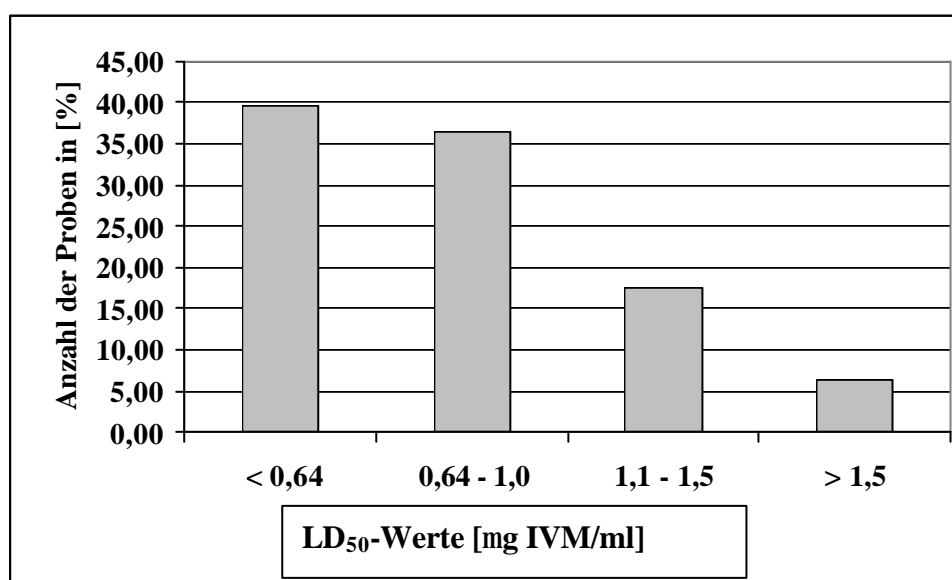


Abbildung 19: Verteilung der LD₅₀-Werte der im LPT für IVM untersuchten Proben (n=63)

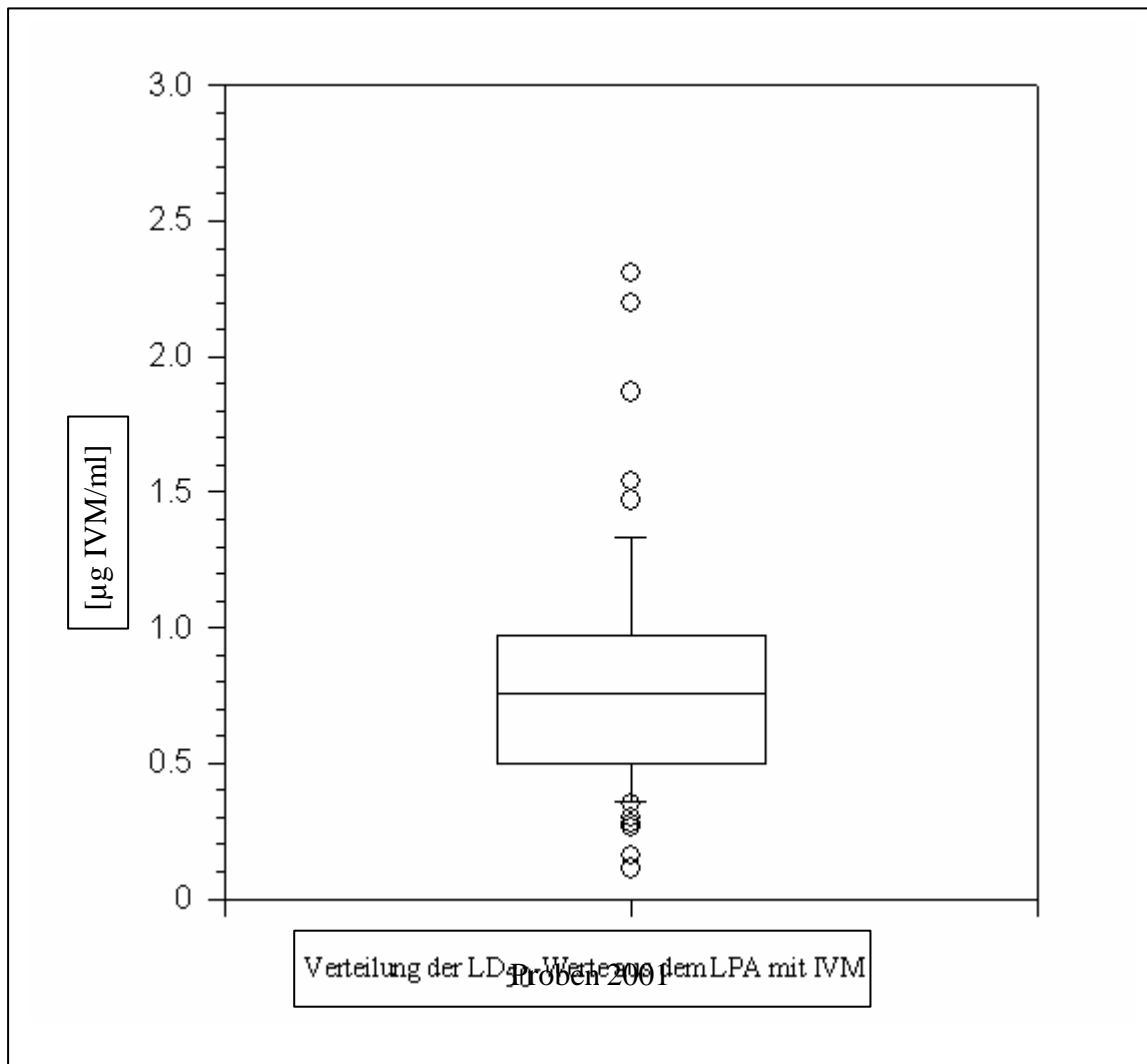


Abbildung 20: Verteilung der LD₅₀-Werte aus dem LPT mit IVM (n=63).

3.4.8 PCR

In den Abb. 21 – 24 sind exemplarisch die Ergebnisse der Real-time PCR dargestellt. Bei Abb. 21 handelt es sich um die Ergebnisse eines Standards für die T-Sonde. Jede Kurve stellt die Fluoreszenzentwicklung in einer Probe dar. Je mehr DNA in einem Ansatz war, umso früher stieg die Kurve über den Schwellenwert. Die Menge an Ausgangs-DNA wurde mittels des C_t-Wertes charakterisiert. Die Standards wurden in Konzentrationen von 10¹ – 10⁶ Kopien eingesetzt. Die C_t-Werte für die A-Sonde lagen in dem Bereich von 20,83 (10⁶) – 35,82 (10¹). Eine Zehnerpotenz bei den Kopien machte einen C_t-Wert-Unterschied von ca. 3,0 aus. Die

Variationskoeffizienten (VK) betragen 1,93 % – 4,29 % mit einem arithmetischen Mittelwert von 2,79 % ($\pm 0,75$) (s. Anhangstabelle 37).

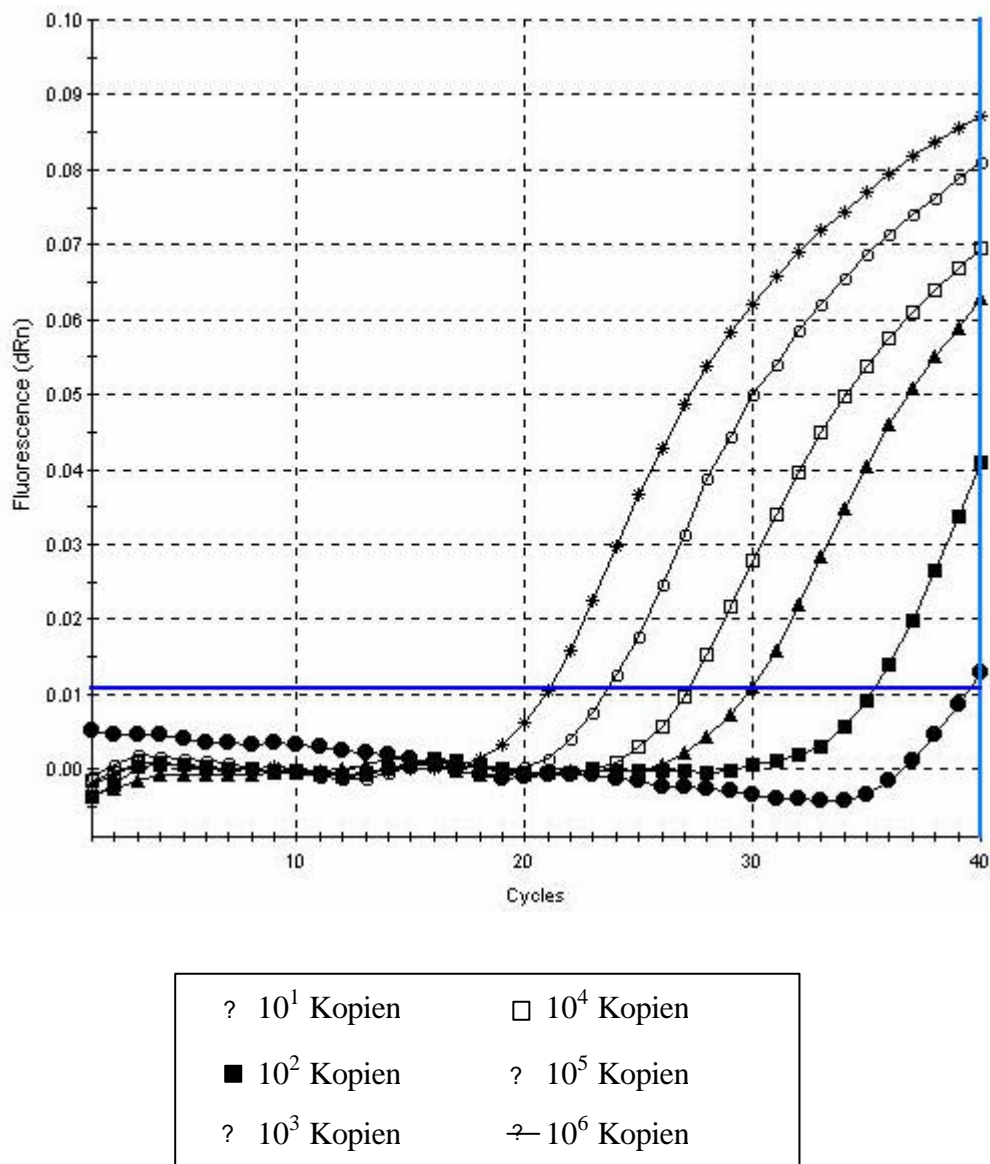


Abbildung 21: Beispiel der Standardkurve in der Real-time PCR.

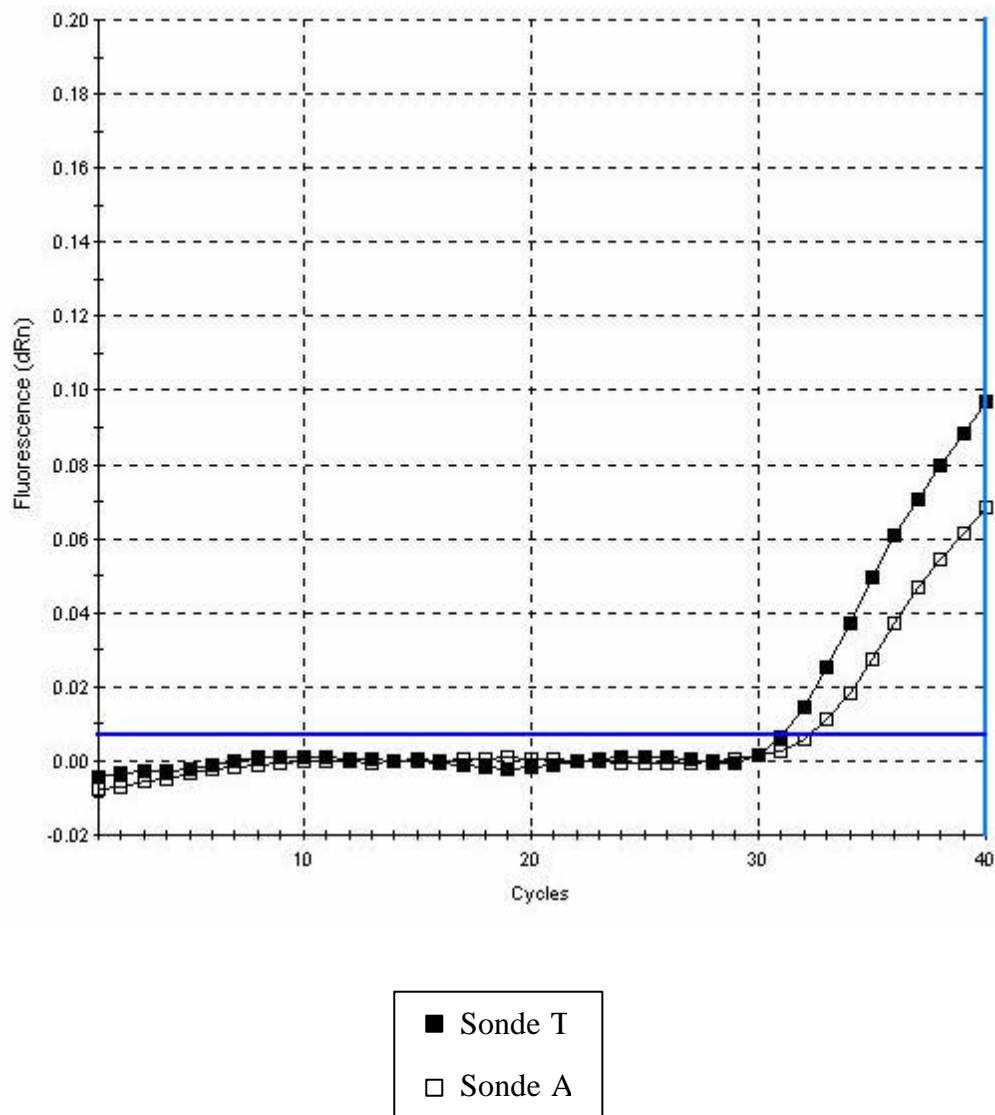


Abbildung 22: Nachweis des Genotyps TTC/TAC in einer Larvenpräparation in der Real-time PCR.

Die Larven, die im Codon 200 im β -Tubulin den Genotyp TTC/TTC aufwiesen wurden in der PCR durch einen Fluoreszenzanstieg in den Ansätzen mit der T-Sonde erkannt. Larven-DNA mit dem Genotyp TAC/TAC fluoreszierte nur in Anwesenheit der A-Sonde, während Heterozygote mit dem Genotyp TTC/TAC mit beiden Sonden Fluoreszenz entwickelten. Beispiele für die drei Genotypen sind in den Abb. 22 – 24 dargestellt.

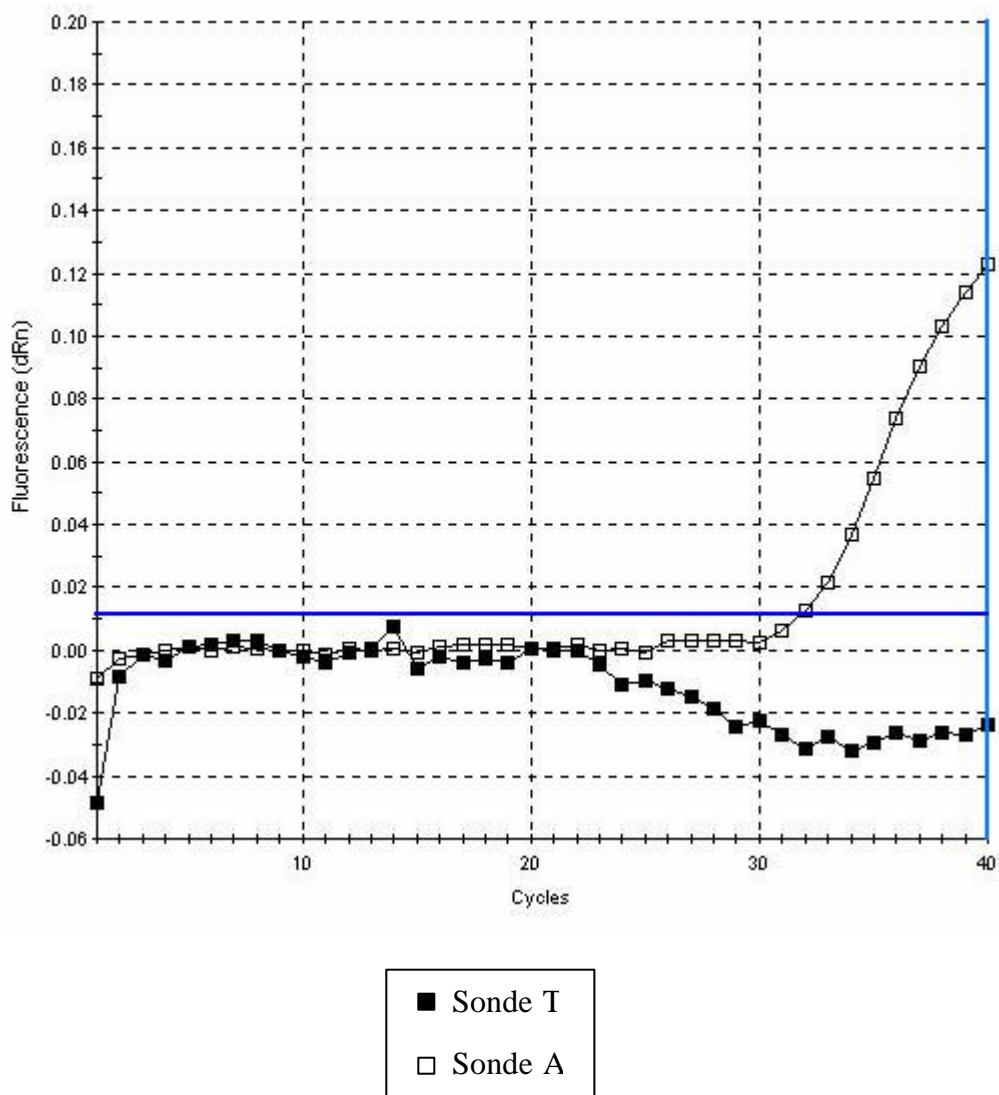


Abbildung 23: Nachweis des Genotyps TAC/TAC in einer Larvenpräparation in der Real-time PCR.

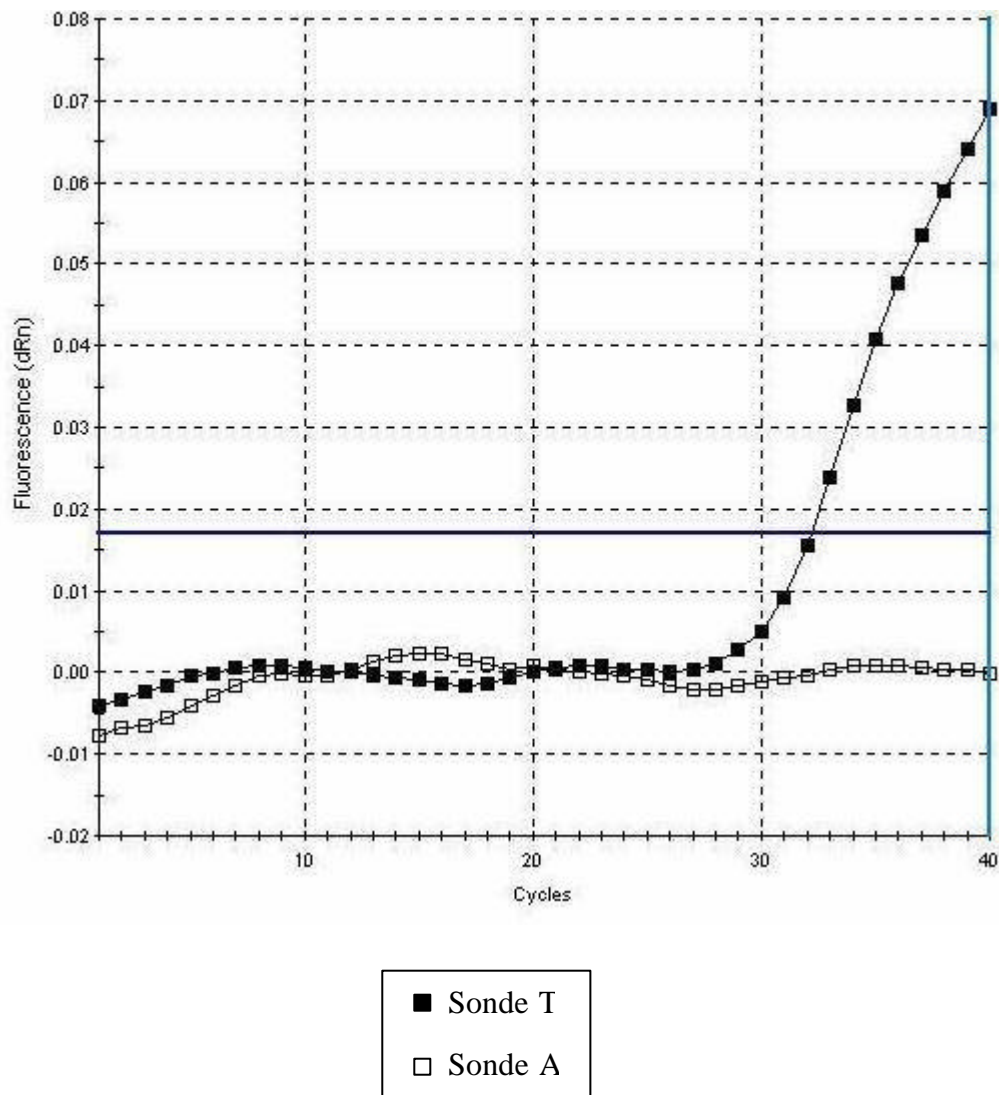


Abbildung 24: Nachweis des Genotyps *TTC/TTC* in einer Larvenpräparation in der Real-time PCR.

Mit der Real-time PCR wurden 53 adulte Würmer aus 8 verschiedenen Arten (*Cc. Nassatus*, *Cc. Insigne*, *Cc.s elongatus*, *Cc. Radiatus*, *Cy. Catinatum*, *Cy. Coronatus*, *Cy. Pateratum*, *Cylicostephanus hybridus*) untersucht. Zudem wurden dritte Larven aus Kotproben fünf verschiedener Pferde der Feldstudie im Einzelansatz charakterisiert. Die Pferde waren alle mittels des LSHT und des EZRT als BZ-resistent getestet worden (mittlerer EZR 46,6 %, mittlerer LD₅₀-Wert 0,16 µg TBZ/ml). Die Adulten sowie die Larven konnten anhand der Ergebnisse der Real-time PCR eindeutig den drei verschiedenen Genotypen *TTC/TTC*, *TTC/TAC* und *TAC/TAC* zugeordnet werden. Die Wiederholung der DNA-Proben der adulten Würmer ergab übereinstimmende Resultate (s. Tab. 36).

Von den adulten Würmern ergaben 23 deutliche C_t -Werte mit der T-Sonde ($33,0 \pm 3,6$), aber auch in einigen Fällen sehr hohe C_t -werte mit der A-Sonde ($39,6 \pm 1,2$) und wurden somit als homozygot für TTC eingestuft, da C_t -Werte = 39,0 nicht als positiv galten (s. 3.3.12). Die C_t -Werte von 27 Würmern, die als heterozygot diagnostiziert wurden, lagen bei 29,0 ($\pm 5,0$) für die T-Sonde und 29,1 ($\pm 4,3$) für die A-Sonde. Der mittlere Variationskoeffizient (VK) der C_t -Werte lag bei den für TTC homozygoten Würmern bei 1,6 % ($\pm 2,4\%$) und 7,4 % ($\pm 3,5\%$) für die A-Sonde bzw. die T-Sonde. Bei den heterozygoten Würmern lag der mittlere VK bei 11,1 % ($\pm 17,4\%$) und 11,2 (16,6 %) bei A- und T-Sonde entsprechend. Ein Wurm, der als homozygot für TAC eingestuft wurde, zeigte C_t -Werte von 32,58 ($\pm 0,08$) für die A-Sonde und von 40,0 ($\pm 0,0$) für die T-Sonde.

Die Genotyp-Verteilung der Larven der einzelnen Tiere ist in Abb. 25 dargestellt. Die Genotypen waren bei den einzelnen Pferden folgendermaßen verteilt (Proben Nr.: 1/a: 22 Larven; 1/b: 16 Larven; 1/c: 24 Larven; 1/d: 23 Larven; 2/a: 17 Larven): Genotyp TTC/TTC wurde bei 31,3 – 52,9 % und Genotyp TTC/TAC bei 30,4 – 68,8 % der Larven gefunden, während die Häufigkeit des Genotyps TAC/TAC zwischen 0 – 26,1 % lag.

In allen Untersuchungen blieben die Negativkontrollen sowie die Ansätze mit heterologer DNA ohne C_t -Wert.

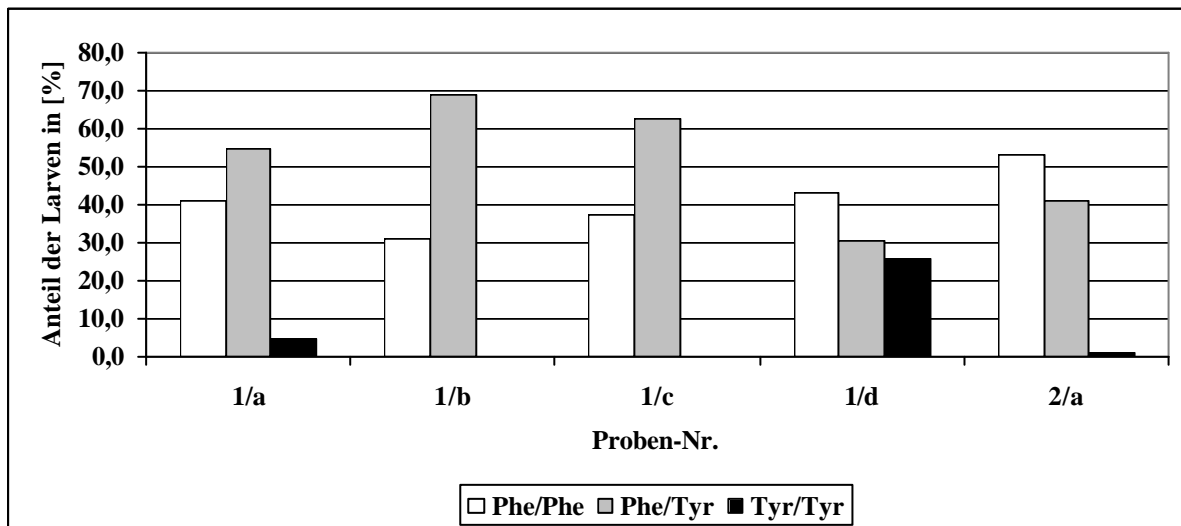


Abbildung 25: Genotyp-Verteilung einzelner dritter Larven aus den Proben 1/a, 1/b, 1/c, 1/d und 2/e, die mit der Real-time PCR untersucht wurden ($n=105$).

Die Verteilung der gesamten Larven-Ergebnisse aus der Real-time PCR ist in Abb. 26 dargestellt. 41,3 % der untersuchten dritten Larven zeigten den Genotyp TTC/TTC. 50,9 % hatten den Genotyp TTC/TAC und 7,8 % den Genotyp TAC/TAC. Die arithmetischen Mittel der C_t -Werte für die verschiedenen Allele betragen bei dem Genotyp TTC/TTC 34,7 (\pm 2,8), bei dem Genotyp TTC/TAC 32,3 (\pm 3,0) bzw. 31,5 (\pm 2,6) für die A- Sonde und die T-Sonde sowie 32,1 (\pm 1,0) für den Genotyp TAC/TAC. Daraus ergaben sich Allelhäufigkeiten von 66,7 % für das Allel TTC und 33,3 % für das Allel TAC in einer phänotypisch resistenten Population.

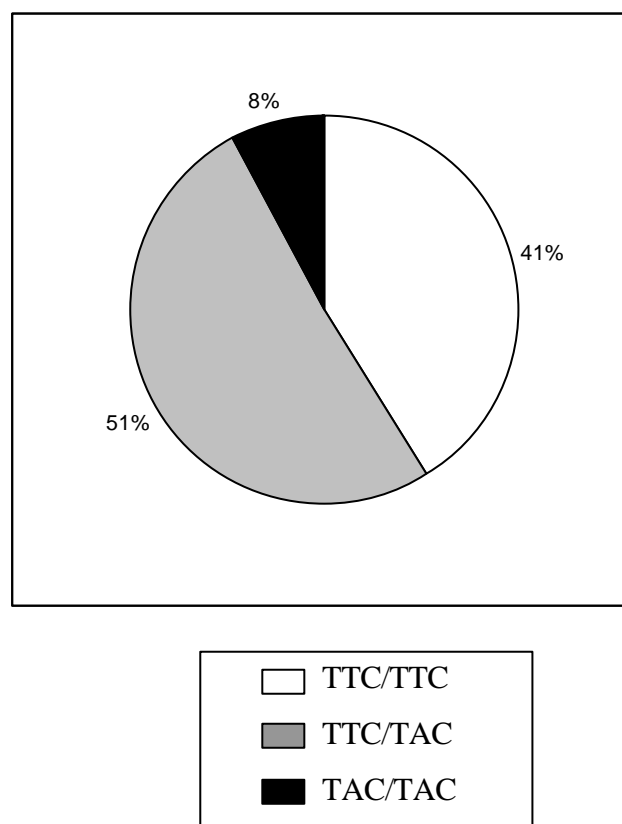


Abbildung 26: Genotyp-Verteilung der in der Real-time PCR untersuchten dritten Larven ($n=105$).

3.4.9 Korrelation der Parameter

Der EZRT fand in 55 % der Fälle BZ-Resistenz, während mit dem LSHT für die gleichen Tiere 75 % der Proben als resistent galten (s. Tab. 38). Die Ergebnisse des EZRT und des LSHT für FBZ, bzw. TBZ korrelierten bei 66,7 % der Proben. Für 48,3 % zeigten beide Tests

nach den festgesetzten Kriterien ($EZR < 90\%$; $LD_{50} > 0,1 \mu\text{g TBZ/ml}$) Resistenz an, während bei 18,3 % beide Tests BZ-Sensibilität anzeigten. In 33,3 % der Fälle gaben die Tests unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich des Resistenzstatus. Bei 73,3 % der Proben zeigte mindestens ein AR-Test Resistenz an ($n=60$) (s. Abb. 27). Die Übereinstimmung der beiden Tests ist signifikant ($p=0,025$).

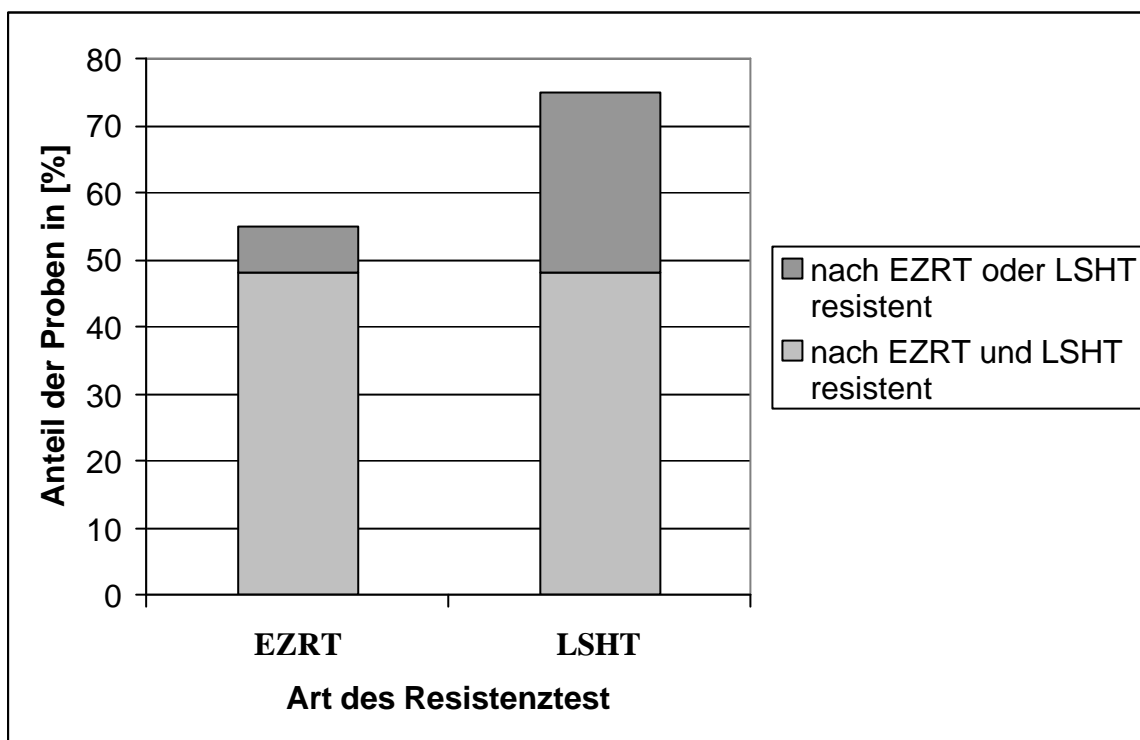


Abbildung 27: Zusammenfassende Darstellung der Resistenzlage gegen BZ in 10 Betrieben nach EZRT und LSHT ($n=60$).

4 Diskussion

4.1 Auswahl der Proben und Technik der Kotuntersuchung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Verbreitung von kleinen Strongyliden und das Auftreten von AR bei Pferden in Niedersachsen untersucht. Des Weiteren wurden von jedem untersuchten Betrieb Daten hinsichtlich der Tierhaltung, des Entwurmungs- und des Weidemanagements erhoben. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen werden im folgenden diskutiert.

Für eine statistisch gesicherte Auswertung war die Untersuchung von mindestens 62 Betrieben erforderlich. Die Berechnung dieser Stichprobengröße erfolgte nach BOCK (1998) (s. 3.3.13). Es wurde hierfür von einer Prävalenz für kleine Strongyliden von 80 % ausgegangen, wie es in vielen Untersuchungen in der Literatur beschrieben wurde (GAWOR 1995; ECKERT 2000). Für die Berechnung der Stichprobengröße wurde eine Grundgesamtheit aller pferdehaltenden Betriebe in Niedersachsen von 19.500 angenommen. Da es keine Registrierungspflicht für diese Tierart in Deutschland gibt und Pferde heutzutage auch nicht mehr in der Viehzählung erfasst werden, wurde von den Zählungen der FN ausgegangen. Diese erfasst allerdings nur FN-registrierte Betriebe. Obwohl die wahre Grundgesamtheit aller pferdehaltenden Betriebe vermutlich höher liegt als der hier übernommene Wert, stellt die Zählung der FN den einzigen Anhaltspunkt für die Anzahl der Betriebe in Niedersachsen dar. Trotz der Abweichung der angenommenen von der hier ermittelten Prävalenz für kleine Strongyliden von 39,8 % und obgleich der angenommene Wert für die Grundgesamtheit der Betriebe möglicherweise vom wahren Wert abweicht, kann dennoch davon ausgegangen werden, dass die gesammelte Stichprobe repräsentativ ist, da die Ergebnisse der Kotuntersuchung innerhalb des 95 %-Konfidenzintervalls liegen.

Untersucht wurden 64 Betriebe, die sich in Nutzungsart, Haltung, Tieranzahl, Rasse, Weide- und Entwurmungsmanagement unterschieden, so dass man die gefundenen Ergebnisse als repräsentativ für diese Kriterien betrachten kann. Regionale Unterschiede wurden ebenfalls berücksichtigt, da die untersuchten Betriebe sich auf verschiedene Regionen der Regierungsbezirke Hannover, Lüneburg und Braunschweig verteilten (s. Abb. 6). Die Probennahme umfasste die Monate August bis November 2000 und März bis Dezember 2001.

Es handelte sich überwiegend um die Monate der Weidesaison. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass es bei kleinen Strongylyden Unterschiede in der Prävalenz in Abhängigkeit von der Jahreszeit gibt und im Frühling sowie im Herbst mit einem besonders hohen Infektionsrisiko zu rechnen ist (REINEMEYER 1986; ECKERT 2000). Um Jahreszeitbedingte Unterschiede zwischen verschiedenen Betrieben hinsichtlich der Prävalenz kleiner Strongylyden zu vermeiden, wäre es wünschenswert gewesen, die Proben im gleichen Zeitraum zu sammeln. Aufgrund des großen Arbeitsaufwandes und der Abhängigkeit von den Pferdebesitzern hinsichtlich der Probennahmetermine war dies nicht möglich.

Eine Voraussetzung für die Auswahl der Betriebe war, dass die letzte Wurmkur mindestens zwei Monate zurückliegen musste. Die Präpatenz von kleinen Strongylyden beträgt aber zwischen 5,5 und 14 Wochen (ECKERT 2000). Es bleibt daher zu berücksichtigen, dass Pferde, die zur Zeit der Probennahme infiziert waren, sich aber noch in der Präpatenz befanden, nicht als MDS-positiv diagnostiziert werden konnten.

Die hier verwendete modifizierte McMaster-Methode, die häufig in der Diagnostik eingesetzt wird, zeigt eine Probe erst ab 50 EpG als positiv an und ist somit nicht sehr sensitiv. Für die Feststellung der Prävalenz kleiner Strongylyden wurde von jedem Tier nur einmal eine Probe genommen. Die Eiausscheidung kann bei kleinen Strongylyden aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten stark variieren, und die Höhe des EpG lässt keinen direkten Rückschluss auf die Befallsintensität beim Einzeltier zu (ECKERT 2000). Eine negative Kotuntersuchung wiederum kann eine Infektion nicht ausschließen. Eine genauere Untersuchung wäre anhand mehrerer Proben eines Tieres zu unterschiedlichen Zeitpunkten möglich gewesen, was aber aus Gründen der Praktikabilität nicht durchführbar war. Trotz der oben genannten Nachteile stellt die modifizierte McMaster-Methode die praktikabelste Methode für einen hohen Probendurchsatz dar. Obgleich es nur eine schwache Korrelation zwischen der Höhe des EpG und der Wurmbürde beim Einzeltier gibt, eignet sich diese Methode für die Herdendiagnostik. Nach ECKERT (2000) können bei Berücksichtigung des Alters der Tiere und epidemiologischer Faktoren hohe Eizahlen im Kot als Hinweis auf eine hohe Befallsintensität gewertet werden.

4.2 Kotproben- und Fragebogenuntersuchung

Die in der hier durchgeführten Kotprobenuntersuchung ermittelte Prävalenz von MDS bei 1.383 Pferden betrug 39,8 %. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von den häufig in der Literatur für Strongyliden beschriebenen Prävalenzen von 80 – 100 %, welche aber häufig auf Befunde an Schlachttieren zurückgehen. Diese erlauben eine präzisere Ermittlung der Prävalenz als die Kotuntersuchung (GAWOR 1995; ECKERT 2000). ULLRICH (1987) fand mittels der modifizierten McMaster-Methode bei Pferden in Nordrhein-Westfalen eine Prävalenz von 61,3 % für MDS. Aufgrund der schon beschriebenen Problematik von geringer Sensitivität des Untersuchungsverfahrens, Präpatenz des Erregers und der Variabilität der Eiausscheidung ist die tatsächliche Befallsrate vermutlich wesentlich höher anzunehmen. Geht man davon aus, dass die Pferde eines Betriebes, die Weidegang haben, dem gleichen Infektionsrisiko ausgesetzt sind und die Untersuchungsmethode eine Spezifität von 100 % trägt, kann ein Betrieb als infiziert betrachtet werden, sobald mindestens ein Tier positiv getestet wird. Auf Betriebsebene ergibt sich also nach diesem Kriterium für MDS eine Prävalenz von 94,5 %. Nur bei 5,5 % der Betriebe waren alle Proben negativ. Um die tatsächliche Prävalenz der Einzeltiere festzustellen, müssten während der gesamten Dauer der Präpatenz regelmäßig Proben der Einzeltiere untersucht werden. Genaue Aussagen über die Befallsintensität ließen sich nur anhand von ausgiebigen Untersuchungen an Schlacht- oder Sektionspferden machen. Die Prävalenz von Spulwürmern lag bei der Einzeltieruntersuchung bei 0,36 %, die von Bandwürmern bei 0,21 %. BEELITZ und GOTHE (1997) wiesen eine Prävalenz von 5,5 % für Spulwurmbefall bei Pferden in Oberbayern nach. Sie führten die niedrige Prävalenz darauf zurück, dass sich bei Fohlen ab 6 Monaten eine Immunität gegen Spulwürmer ausbildet. Da in der vorliegenden Arbeit nur Tiere untersucht wurden, die älter als 6 Monate waren, ist die hier gefundene niedrige Prävalenz vermutlich darauf zurückzuführen. BEHRENS (2001) fand bei der Untersuchung von Einzelkotproben bei Pferden in Niedersachsen in dem Zeitraum von Oktober 1989 bis Juni 1999 eine Prävalenz für Bandwürmer von 3 %, auf Betriebsebene allerdings stellte sie eine Prävalenz von 35,2 % fest. BEELITZ und GOTHE (1997) stellten in einer Untersuchung von fünf bayrischen Zuchtbetrieben von Mai 1994 bis August 1995 bei 25,2 % der 127 untersuchten Pferde Bandwürmer fest. Sowohl BEHRENS (2001) als auch BEELITZ und GOTHE (1997) führten

in ihren Untersuchungen Anreicherungsverfahren mit Zinksulfat durch, welche sensitiver sind als die hier verwendete modifizierte McMaster-Methode. Das erklärt, warum die in diesen Untersuchungen gefundene Prävalenz von Bandwürmern höher liegt als die in der vorliegenden Arbeit gefundene Prävalenz.

Die Betriebe, die in den Jahren 2000 und 2001 untersucht wurden, unterschieden sich hochsignifikant hinsichtlich der mittleren EpG-Werte und der Anzahl der positiven Proben ($p < 0,001$) (s. Abb. 8). Eine niedrige Infektionsrate kann auf ein gutes Entwurmungs- und Weidemanagement zurückzuführen sein aber auch biologische oder klimatische Gründe haben. Bezüglich der Betriebsdaten, des Entwurmungs- und des Weidemanagements konnten zwischen den Betrieben aus den zwei Probenjahren keine Unterschiede festgestellt werden. Auch die Analyse der Wetterdaten in bezug auf Temperatur- oder Niederschlagsunterschiede zwischen den beiden Jahren ergab keine Signifikanzen, die dieses Phänomen erklären könnten. Die Ursache für die Diskrepanz der mittleren EpG-Werte und der Infektionsrate ist unklar.

In allen Altersgruppen konnten positive Kotproben festgestellt werden. Jungtiere < 2 Jahren schieden hochsignifikant häufiger Eier aus als ältere Tiere. Auch bei Tieren zwischen 2 und 5 Jahren wurden häufiger Eier gefunden als bei Tieren > 5 Jahren ($p < 0,001$) (s. Tab. 4). In dieser Untersuchung konnte die von HERD und GABEL (1990) und von BOERSEMA et al. (1996) festgestellte Häufung des Strongylidenbefalls bei Jungtieren bestätigt werden. Sie erklärten dieses Phänomen mit einer noch nicht so stark entwickelten Abwehrlage bei Jungtieren. Dies führt zu einer erhöhten Ansammlung inhibierter Larven in der Mukosa, auf welche die Anthelminthika keine ausreichende Wirkung haben. In den letzten Jahren wurden vermehrt Versuche zur Immunitätsentwicklung bei Pferden im Zusammenhang mit Strongylideninfektionen durchgeführt (MONAHAN et al. 1997, 1998; CHAPMAN et al. 2002). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich bei älteren Tieren im Vergleich zu Jungtieren eine Teilimmunität gegen kleine Strongyliden ausbildet. Allerdings werden auch bei älteren Tieren massive Strongylideninfektionen beobachtet. Ob und in wie weit kleine Strongyliden beim Pferd eine Immunantwort hervorrufen ist bisher noch nicht geklärt.

Es konnten in der vorliegenden Untersuchung hinsichtlich Rasse und Geschlecht keine signifikanten Unterschiede bei der Eiausscheidung festgestellt werden ($p > 0,3$) (s. Tab. 5 u. 6).

Die Untersuchung der Pferde auf eine Abhängigkeit zwischen der Ausscheidung von MDS-Eiern und der Länge des Weidegangs ergab signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen (s. Tab. 7). Die Tiere, die stundenweise Weidegang hatten, zeigten eine weniger positive Proben als die Tiere, die in den Monaten Mai bis Oktober den ganzen Tag auf der Weide waren ($p=0,034$). Überraschenderweise wurden bei den Tieren, die den ganzen Sommer Weidegang hatten signifikant weniger positive Proben gefunden als bei den Tieren, die von morgens bis abends während der Weidesaison auf der Weide standen ($p=0,006$). Wie zu erwarten, hatte erstere Gruppe auch eine niedrigere Befallsrate als die Tiere, die ganzjährig Weidegang hatten. Wenn man davon ausgeht, dass mit zunehmender Dauer des Weidegangs das Infektionsrisiko steigt, dann überrascht es, dass die Tiere, die stundenweise auf der Weide standen, sich in der Häufigkeit der Eiausscheidung nicht von den Tieren unterschieden, die den ganzen Sommer Weidegang hatten. Diese beiden Gruppen aber zeigten weniger positive Proben als die anderen Kategorien. Zur Überprüfung der Bedeutung dieser Ergebnisse sind weitere Untersuchungen notwendig. In der Literatur wurden solche Beobachtungen bisher nicht beschrieben.

Die untersuchten Betriebsarten wurden in fünf Kategorien eingeteilt. In jeder Betriebsart wurden MDS-Eier nachgewiesen (s. Tab. 8). Auffällig war eine signifikant höhere Anzahl positiver Proben in Zuchtbetrieben mit mehr als 20 Tieren ($p<0,001$). Auch die Zuchtbetriebe mit weniger Pferden zeigten eine höhere Befallsrate als die übrigen Betriebe, auch wenn der Unterschied nicht signifikant war. Diese Beobachtung ist damit zu erklären, dass Zuchtbetriebe generell einen höheren Prozentsatz an Jungtieren und Fohlen halten. Wie auch in diesen Untersuchungen beobachtet, wird bei Jungtieren häufig eine wesentlich höhere Infektionsrate festgestellt, was das Kontaminationsrisiko für die übrigen Pferde erhöht. Weitere Merkmale von Zuchtbetrieben, welche hohe Infektionsraten begünstigen, sind ein reger Tierverkehr und höhere Besatzdichten der Weiden (OSTERMAN LIND et al. 1999).

Bei der Analyse des Vorkommens Strongyliden-positiver Pferde bei Betrieben mit unterschiedlichen Tierzahlen wurde festgestellt, dass Pferde aus Betrieben mit Tierzahlen > 70 signifikant häufiger mit MDS infiziert waren als die Tiere aus kleineren Beständen ($p=0,006$) (s. Tab. 9). In der vorliegenden Untersuchung unterschieden sich die Betriebe mit > 70 Pferden hinsichtlich Betriebsart oder Weidefläche nicht von den übrigen Betrieben. Allerdings konnten keine Informationen hinsichtlich der Besatzdichte der Weiden ermittelt

werden, da die genauen Weidegrößen nicht bekannt waren und der Besatz wechselte. Obwohl Bestände mit größeren Tierzahlen auch mehr Betriebsfläche besaßen, ist es trotzdem möglich, dass die Besatzdichte im einzelnen größer war als bei anderen Betrieben, was einen höheren Infektionsdruck verursacht hätte und eine mögliche Erklärung für eine höhere Befallsrate wäre.

Bei 70,3 % der Betriebe wurden die Tiere auf wechselnden Weiden gehalten (s. Tab. 10). Überraschenderweise hatten diese Betriebe eine signifikant höhere Befallsrate als die Betriebe, die auf ihren Weiden keinen Weidewechsel durchführten. Auch bei den Betrieben, die die Beweidung der Betriebsflächen durch Pferde, Wiederkäuer, Wildwiederkäuer oder Esel abwechselten, wurden mehr positive Pferde festgestellt als bei den Betrieben, deren Weiden nur durch Pferde genutzt wurden ($p < 0,01$) (s. Tab. 13). Allerdings waren keine Informationen darüber erhältlich, wie lange die einzelnen Weiden bis zur Wiederbeweidung brach lagen bzw. wie häufig zwischen den Tierarten gewechselt wurde. Der Umtrieb der Tiere auf eine in dieser Weidesaison noch nicht durch Pferde genutzte Weide in Kombination mit einer anthelminthischen Behandlung führte in anderen Untersuchungen zur Reduktion des Infektionsdruckes (RIBBECK 1997; LYONS et al. 1999). Die Weiden müssen lange genug brach liegen, damit die freilebenden dritten Larven absterben. Der gleiche Effekt tritt ein, wenn Wiederkäuer für mehrere Monate Pferdeweiden abgrasen, da sie die Dichte der Strongylidenlarven durch Aufnahme beim Grasens verringern, selbst jedoch nicht infiziert werden (EYSKER et al. 1983; LYONS et al. 1999). Möglicherweise lagen die Weiden bei den betreffenden Betrieben nicht lange genug brach bzw. wurde vielleicht der Weidewechsel in zu kurzen Abständen durchgeführt. Dies hätte eine Reduktion der freien Larven verhindert. Das würde allerdings nicht erklären, warum die Befallsrate sogar höher war als in den übrigen Betrieben. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Bedeutung dieser Ergebnisse festzustellen. In der Literatur finden sich keine Hinweise auf eine mögliche Erklärung.

Wie auch bei anderen Untersuchern beschrieben (DUNCAN 1985; HERD 1986a; HERD u. COLE 1995) bewirkten weidehygienische Maßnahmen wie das Absammeln von Kot und das Entfernen von Geilstellen von der Weide signifikant niedrigere Befallsraten mit kleinen Strongyliden ($p = 0,001$) (s. Tab. 11 u. 12). Die Entfernung des Kotes von der Weide bewirkt eine Reduktion der freilebenden dritten Larven und somit eine Senkung des Infektionsdruckes. Je häufiger diese Maßnahme durchgeführt wird umso effektiver ist die

Larvenreduktion. Zudem verringert sie die Ausprägung von Geilstellen, welche ein Kontaminationsrisiko darstellen da sie den Larven Schutz vor Austrocknung bieten und die von den Pferden beweidete Fläche verkleinern. Das Entfernen der Geilstellen führt daher ebenfalls zu einer Senkung des Infektionsdrucks (HERD 1986a; ABBOTT 1998a, 1998b).

Bei dem Einsatz verschiedener Düngemittel ergaben sich signifikante Unterschiede in bezug auf die Infektionsrate mit kleinen Strongyliden. Wie zu erwarten führte der Einsatz von Pferdemist zu einer wesentlich höheren Befallsrate als der Einsatz von Mineraldünger. Dies ist dadurch zu erklären, dass man mit dem Kot noch zusätzlich infektiöse Larven auf den Weiden verteilt und damit den Infektionsdruck erhöht (HERD 1986a; LYONS et al. 1999). Überraschenderweise wurden bei den Betrieben, die keinen Dünger verwendeten, weniger positive Proben festgestellt als bei den Betrieben, die Mineraldünger einsetzten (s. Tab. 14). Da die freilebenden dritten Larven keine Nahrung mehr aufnehmen, erscheint eine positive nutritive Wirkung des Mineraldüngers unwahrscheinlich. Möglicherweise enthält er aber Stoffe, die für die Entwicklung der ersten und zweiten Larven, welche sich von Bakterien im Kot ernähren, von Nutzen sind. Eine weitere Erklärung für die Begünstigung der Strongylidenlarven durch die Anwendung von Düngemitteln ist vielleicht die Tatsache, dass das Gras auf gedüngten Weiden schneller und höher wächst und den Larven somit mehr Schutz vor Austrocknung bietet.

In Betrieben mit unterschiedlicher Stallhaltung waren hochsignifikante Unterschiede bei den Befallsraten mit Strongyliden festzustellen. Pferde, die auf Tiefstreu standen, welche nur im Abstand von mehreren Wochen gewechselt wurde, waren häufiger positiv für MDS-Eier als Tiere, die täglich gemistet wurden ($p < 0,001$) (s. Tab. 15). Die tägliche Entfernung des Kotes aus der Box führt zu einer drastischen Reduktion der infektiösen Larven und erklärt, warum Tiere aus dieser Stallhaltung eine niedrigere Befallsrate zeigten.

Alle Betriebe wurden zu ihrem Entwurmungsmanagement befragt. Es stellte sich heraus, dass die Entwurmung ausnahmslos nach einem eigenen bzw. vom Tierarzt aufgestellten Prophylaxeplan durchgeführt wurde. Tiere, die kümmerten, wenig fraßen, deren Fell schlecht war, oder die Durchfall hatten, wurden oft häufiger entwurmt ohne eine Diagnose durch eine Kotuntersuchung zu stellen. Kotuntersuchungen wurden nur dann durchgeführt, wenn trotz Behandlung oben genannte Symptome nicht verschwanden. Die Dosierung erfolgte auf allen Betrieben anhand des geschätzten KGW des Einzeltieres. Allerdings wurde pro Tier maximal

eine Packung eines Anthelminthikums verabreicht, deren Wirkstoffmenge nur für 600 Kg KGW ausreicht. Diese Art der Parasitenkontrolle ist bei vielen Pferdebesitzern verbreitet und wurde auch in anderen Untersuchungen bestätigt (LENDAL et al. 1998; KAPLAN 2002). Die oben genannten Methoden führen durch einen erhöhten Selektionsdruck auf resistente Parasiten zu einem schnellen Wirkungsverlust von Anthelminthika (HERD 1992; LYONS et al. 1999; KAPLAN 2002).

Die Hälfte der in der vorliegenden Studie untersuchten Betriebe hatte als letztes Präparat vor Beginn dieser Untersuchung Vertreter aus der Wirkstoffklasse der ML eingesetzt. Bei diesen Betrieben war eine hochsignifikante Reduktion der Befallsrate mit Strongyliden nachweisbar ($p < 0,001$) (s. Tab. 17). Dies ist eventuell ein Grund, warum nur bei 39,8 % der untersuchten Tiere MDS festgestellt werden konnten, da IVM, wie in den hier durchgeführten EZRT erwiesen, eine 100 % Wirkung zeigt. Die Tatsache, dass bis zu 90,6 % der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Betriebe zusätzlich zur Anthelmintikabehandlung verschiedene weidehygienische Kontrollmaßnahmen durchführten, ist vermutlich ein weiterer Grund, warum die MDS-Prävalenz so niedrig war.

In allen auf AR untersuchten Betrieben wurde BZ-Resistenz festgestellt. Es war daher nicht festzustellen, ob sich BZ-sensible Betriebe in der Art des Entwurmungs- und des Weidemanagements signifikant von BZ-resistenten Betrieben unterschieden. Signifikante Unterschiede hinsichtlich der oben genannten Kriterien konnten auch zwischen Betrieben mit unterschiedlicher Anzahl an BZ-resistenten Pferden nicht festgestellt werden. Das kann darauf zurückzuführen sein, dass unterschiedliche Strategien des Entwurmungs- und des Weidemanagements vielleicht keinen Einfluß auf die Entwicklung und das Fortschreiten von BZ-Resistenz haben. Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass Maßnahmen, die eine Reduktion des Parasitenbefalls bewirken, auch eine Reduktion der resistenten Population zur Folge haben. ULLRICH (1987) fand bei der Untersuchung von Pferden in Nordrhein-Westfalen keinen Zusammenhang zwischen Weidemanagement und dem Auftreten von AR. KELLY et al. (1981) wiederum stellten bei Gestüten, die keine Weidepflege betrieben, ein hohes Resistenzvorkommen fest. Nach BJØRN et al. (1991) waren Faktoren wie häufige Anwendung von Anthelminthika, insbesondere derselben Wirkstoffgruppe, Unterdosierung, permanente Standweiden, hohe Besatzraten und das Aufstallen von Gastpferden ohne anthelminthische Behandlung häufig verantwortlich für das Entstehen von AR.

Möglicherweise haben diese Faktoren aber nur einen Einfluss auf Populationen mit einer schwachen BZ-Resistenz. Vielleicht war die BZ-Resistenz in der vorliegenden Untersuchung schon zu weit fortgeschritten, um noch durch diese Maßnahmen beeinflusst zu werden.

Umständehalber konnte im Rahmen dieser Untersuchung weder eine Unterscheidung zwischen großen und kleinen Strongyliden noch eine Artdiagnose der kleinen Strongyliden durchgeführt werden. Andere Untersucher fanden in verschiedenen Studien, dass die großen Strongyliden in den letzten Jahren immer seltener auftraten (OGBOURNE 1976; HERD u. GABEL 1990; GAWOR 1995; YOUNG et al. 1999; WITZENDORFF 2001; KAPLAN 2002). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die in den Kotproben der vorliegenden Untersuchung nachgewiesenen MDS-Eier überwiegend von kleinen Strongyliden stammten. Im Vergleich zu den kleinen Strongyliden ist bei den Strongylusarten noch keine AR nachgewiesen worden, was KELLY et al. (1981) darauf zurückführen, dass große Strongyliden mit 6,5 – 11 Monaten eine wesentlich längere Präpatenz haben (ECKERT 2000). Die kleinen Strongyliden dagegen können unter guten Bedingungen in einem Jahr in zwei bis drei Generationen auftreten, was den Selektionsdruck auf resistente Würmer erhöht. Die fehlende AR bei den großen Strongyliden wiederum erklärt den starken Rückgang der Prävalenz, da die häufig eingesetzten Anthelminthika immer noch volle Wirksamkeit gegen Adulte und Larven dieser Arten haben.

Wie oben erwähnt handelt es sich bei natürlichen Infektionen mit kleinen Strongyliden in den meisten Fällen um Mischpopulationen unterschiedlicher Zusammensetzung. Da die Höhe der Eiausscheidung unterschiedlicher Arten variieren kann und EpG-Werte nur schwach mit der Höhe der Wurmbürde korreliert sind (s. o.), ist eine Artdifferenzierung hinsichtlich der Befallsintensität mit verschiedenen Arten aus den Larven einer einzelnen Kotprobe nicht sehr aussagekräftig (BAUER 1986; REINEMEYER 1986; NIELSON et al. 1989; GAWOR 1995). Zudem haben die einzelnen Arten unterschiedliche Bedeutungen hinsichtlich der Pathogenität und der Resistenzentwicklung. Um genauen Einblick in die Artenbeteiligung einer Infektion zu gewinnen ist, die Untersuchung mittels Sektion notwendig.

4.3 Eizahlreduktionstest und Larvenschlupfhemmtest

4.3.1 Benzimidazole

Nach den Kriterien von BAUER (1986) konnte mittels des EZRT mit FBZ bei insgesamt 55 % der in der vorliegenden Studie untersuchten Pferde Resistenz gegen BZ ermittelt werden. Auf jedem Betrieb war mindestens ein BZ-resistentes Tier nachzuweisen. Bei 70 % der Betriebe waren mehr als die Hälfte der Tiere resistent. Nach den Richtlinien der W.A.A.V.P. (COLES et al. 1992) wurde mittels des LSHT mit TBZ bei 75 % der gleichen Proben BZ-Resistenz nachgewiesen. Auch mit diesem Test wurden bei allen Betrieben BZ-resistente Pferde detektiert. Bei 90 % der Betriebe waren mindestens 50 % der untersuchten Tiere resistent. Wie auch bei den Untersuchungen von VÁRADY et al. (2000) und CRAVEN et al. (1999) korrelierten die Ergebnisse des EZRT und des LSHT während WITZENDORFF (2001) keine Übereinstimmung fand. VÁRADY et al. (2000) erklärten Diskrepanzen zwischen den beiden Tests mit der Messung unterschiedlicher Wirkungen auf die Parasiten. Während der LSHT auf der oviziden Wirkung der BZ beruht, werden beim EZRT die adulten Würmer getötet. Beide aber messen eine verminderte Wirksamkeit eines Anthelmithikums, daher sollte man von einem Resistenzgeschehen ausgehen, wenn auch nur einer der Tests positiv ist. Die Tatsache, dass auf jedem Betrieb mit jedem Test mindestens ein Pferd positiv auf BZ-Resistenz getestet wurde, deutet auf eine sehr hohe Prävalenz hin. Würde man als Definition für BZ-Resistenz statt des Schwellenwertes einer EZR von $< 90\%$ einen Wert von $< 95\%$ annehmen, wie es von COLES et al. (1992) für die Durchführung des EZRT beim Schaf empfohlen wurde, dann stiege die Resistenzrate der untersuchten Proben auf 73,3 %. In diesem Falle würden 76,7 % der Ergebnisse des EZRT mit den Ergebnissen des LSHT korrelieren im Vergleich zu 66,7 % bei einem Schwellenwert von $< 90\%$.

Bei zwei der Betriebe gab es große Schwankungen bei den EZR der einzelnen Pferde, obgleich die Tiere in der Regel auf den gleichen Weiden standen (s. Tab. 18). So konnten bei Betrieb Nr. 1 EZR zwischen 0 % - 87,8 % ermittelt werden. Bei Betrieb Nr. 8 war die EZR bei vier Tieren 100 %, während sie bei einem Tier 0 % war. Solche Streuungen der Ergebnissen des EZRT sind auch bei anderen Untersuchungen festgestellt worden (NIELSON et al. 1989; WITZENDORFF 2001). Eine mögliche Erklärung wäre ein Unterschied in der

Dosierung des applizierten Anthelminthikums aufgrund falscher Schätzwerte des Körpergewichtes oder falscher Applikation mit Verlust des Medikaments. Um den Schätzfehler gering zu halten, wurde das Gewicht immer von mindestens zwei Personen geschätzt und die Dosierung mittels des höheren Wertes ausgerechnet. Bei der Applikation wurde darauf geachtet, dass die Tiere die Substanz vollständig aufnahmen. Eine andere Ursache für die Schwankung der EZR könnten individuelle Unterschiede der Absorption und des Metabolismus einzelner Pferde sein (YOUNG et al. 2000). Möglicherweise kommen Schwankungen der EZR auch durch unterschiedliche Wirksamkeit der Anthelminthika auf verschiedene Arten und Gattungen einer Mischpopulation zustande (NIELSON et al. 1989; CRAVEN et al. 1999).

In der Diagnostik der BZ-Resistenz mittels des LSHT wird von COLES et al. (1992) ein Schwellenwert für die LD₅₀ von 0,1 µg BZ/ml angegeben. LD₅₀-Werte > 0,1µg BZ/ml sind demnach ein Nachweis für BZ-Resistenz. Diese Definition ist international anerkannt und wird in vielen Untersuchungen als Kriterium verwendet, obgleich in einigen Untersuchungen auch andere Grenzwerte für Resistenz diskutiert wurden. In der vorliegenden Untersuchung stand dieser Wert in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Vorversuche, bei denen der LSHT mit der BZ-sensiblen Population P und der BZ-resistenten Population L durchgeführt wurde (s. Tab.19 u. 20). Dabei ergab sich für die sensible Population P ein LD₅₀-Wert von 0,06 (± 0,01) µg TBZ/ml und für die resistente Population L ein LD₅₀-Wert von 0,26 (± 0,11) µg TBZ/ml. Der sehr hohe Referenzwert bei Population L im Vergleich zu den Daten aus der Literatur erklärt sich durch die jahrelange Selektion dieser Strongylidenpopulation mittels regelmäßiger BZ-Behandlung des Versuchstieres. Dies zeigt, dass das Resistenzniveau durch dauerhafte Anwendung des gleichen Wirkstoffes gesteigert werden kann. Insgesamt wurden bisher Schwellenwerte der LD₅₀ für BZ-Resistenz von 0,06 – 0,2 µg BZ/ml postuliert (WHITLOCK et al. 1980; KELLY et al. 1981; BAUER 1983; ULLRICH 1987; IHLER u. BJØRN 1996; WITZENDORFF 2001). IHLER u. BJØRN (1996) stellten in ihren Untersuchungen fest, dass ein LD₅₀-Wert von 0,1 µg BZ/ml ein deutliches Zeichen für BZ-Resistenz ist. Die Variabilität der in der Literatur angegebenen Schwellenwerte für BZ-Resistenz ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich die Methodik sowie die untersuchten Populationen von Labor zu Labor unterscheiden (IHLER u. BJØRN 1996). Die unterschiedliche Berechnung der LD₅₀-Werte kann ebenfalls eine Ursache für das Auftreten

unterschiedlicher Grenzwerte sein. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Larvenschlupfhemmung zu Probits transformiert, um die Dosis-Wirkungskurve als lineare Beziehung darzustellen (s. Abb. 11). KELLY et al. (1981) transformierten die Daten logarithmisch und die Prozentsätze des Larvenschlupfes in eine Arcus-Sinus-Funktion. BAUER (1983) hingegen erstellte Dosis-Wirkungskurven ohne Transformation der Daten.

Eine andere Definition für Resistenz im LSHT wurde von ULLRICH (1987) verwendet. Hier wurde statt des LD₅₀-Wertes der LD₉₆-Wert als Grundlage des Schwellenwertes eingesetzt. Proben, die einen LD₉₆-Wert > 0,15 µg BZ/ml aufwiesen, wurden als resistent eingestuft. In der vorliegenden Untersuchung wurden auch die LD₉₆-Werte mit den Ergebnissen der Populationen P und L berechnet. Während die sensible Population P mit einem Mittelwert von 0,14 (± 0) µg TBZ/ml nur knapp unter dem Schwellenwert von 0,15 µg BZ/ml lag, ergab Population L mit einem mittleren LD₉₆-Wert von 0,61 (± 0,3) µg TBZ/ml einen deutlich höheren Wert. Nach dieser Definition wären 97,2 % der untersuchten Pferde resistent. Der Vorteil der Erhebung einer LD₉₆ liegt darin, dass nur eine Konzentrationsstufe zur Resistenzerkennung eingesetzt werden muss und somit der Arbeitsaufwand wesentlich geringer ist, was einen höheren Probendurchsatz ermöglicht. Für die Berechnung individueller LD₅₀-Werte sollten pro Anthelminthikum mindestens fünf Konzentrationen eingesetzt und pro Konzentration mindestens 100 Entwicklungsstadien ausgezählt werden (WITZENDORFF 2001).

Wie auch beim EZRT beobachtet kamen in der vorliegenden Untersuchung bei den Ergebnissen des LSHT große Schwankungen innerhalb einiger Betriebe vor (s. Tab. 34 u. 35). So wurden bei Betrieb Nr. 3 Werte von 0,03 bis 0,18 µg TBZ/ml und bei Betrieb Nr. 8 eine Streuung von 0,05 – 0,22 µg TBZ/ml festgestellt. Zwischen den Ergebnissen der Proben aus den Jahren 2000 und 2001 gab es keine signifikanten Unterschiede. WITZENDORFF (2001) stellte in Untersuchungen an Pferden in drei chilenischen Betrieben ebenfalls eine starke Streuung der LD₅₀-Werte fest. Hier können ähnliche Erklärungen wie bei dem EZRT möglich sein. Einerseits wären Pipettierfehler beim Ansatz der Tests eine mögliche Erklärung für die Streuung der LD₅₀-Werte, andererseits kann die Varianz auch durch eine unterschiedliche Wirksamkeit von BZ auf verschiedene Gattungen und Arten hervorgerufen werden.

Nach (COLES 1992) ist der LSHT weniger sensitiv als der EZRT. In der vorliegenden Untersuchung war das Gegenteil der Fall. Mit dem LSHT wurde bei 75 % der Pferde BZ-Resistenz erkannt, der EZRT detektierte jedoch nur bei 55 % BZ-Resistenz. Während CRAVEN et al. (1999) und GRIMSHAW et al. (1994) ebenfalls den EZRT als sensibler einstufen, hielt MCKENNA (1990) beide Tests für ähnlich sensitiv. Da die Tests aber, wie schon beschrieben, unterschiedliche Parameter messen, ist ein direkter Vergleich vielleicht nicht möglich. Um Resistenz möglichst früh zu erkennen, sollten beide Tests in Kombination angewendet werden, wie auch von COLES et al. (1992) empfohlen, und jedes positive Ergebnis als Hinweis für eine Resistenzentstehung gewertet werden, da keiner der beiden Tests BZ-Resistenz unter einer Prävalenz von 25 % erkennt (MARTIN et al. 1989).

4.3.2 Pyrantel

Aufgrund der in den letzten Jahren häufigeren Feststellung von PYR-Resistenz in verschiedenen Ländern (CHAPMAN et al. 1996; BEELITZ u. GOTHE 1997; CRAVEN et al. 1998), sollte hier der aktuelle Stand in Deutschland ermittelt werden. Obgleich sich der LSHT nach COLES et al. (1992) nicht zur Durchführung mit PYR eignet, wurde nach erfolgreicher Evaluierung dieses Verfahrens unter Verwendung der Populationen L und M dieser Test als Methode zur AR-Bestimmung gewählt. Dieser Test ist im Vergleich zu den für die Untersuchung von PYR empfohlenen LEHT und LPT leichter abzulesen und zu standardisieren. Der Grund, warum PYR bisher nicht für den LSHT verwendet wurde, ist die Tatsache, dass diese Wirkstoffgruppe keine direkte ovizide Wirkung zeigt (SCHOLTSIK u. STEUBER 2002). In dieser Untersuchung wurde allerdings festgestellt, dass es bei steigenden Konzentrationen auch mit PYR zu einer Hemmung des Larvenschlupfes kam. Im Vergleich zum LSHT mit TBZ wurde, wie zu erwarten, eine signifikant höhere Zahl an embryonierten Eiern festgestellt ($p < 0,001$) (s. Abb. 12 u. 13). Häufig wurden auch Larven beobachtet, die die Eihülle schon durchstoßen hatten, sich aber nicht von ihr befreien konnten. Da der Wirkstoff bei der Herstellung der Verdünnungsreihen in dest. Wasser gelöst wurde, entfällt eine mögliche Wirkung durch ein Lösungsmittel. Möglicherweise ändert sich kurz vor dem Schlupf der Larven die Durchlässigkeit der Eischale, so dass der Wirkstoff eindringen kann. An freien Larven wird die Wirkung des PYR als nicotinerger Agonist postuliert, welche zur Paralyse führt (MARTIN 1997). Dieser Mechanismus könnte auch auf die Larven in der

Eischale wirken und den Schlupf durch Paralyse verhindern. Vielleicht ist die Eischale aber auch generell durchgängig für PYR, welches möglicherweise erst dann eine Wirkung entfaltet, wenn die Rezeptoren ausgebildet sind. Das würde die fehlende ovizide Wirkung erklären. DOBSON et al. (1985) führten den LSHT mit LEV an Trichostrongyliden des Schafes durch und fanden ähnliche Ergebnisse wie beim LSHT mit BZ. Gleichzeitig fanden sie deutliche Unterschiede zwischen LEV-sensiblen und LEV-resistenten Populationen. Im Gegensatz zu der vorliegenden Untersuchung, die genauso durchgeführt wurde wie der LSHT mit TBZ, inkubierten DOBSON et al. (1985) die Eier bis kurz vor dem Schlupf, bevor sie das Anthelminthikum hinzugaben. VÁRADY u. CORBA (1999) führten einen ähnlichen Test unter der Bezeichnung Larvenschlupfparalysetest durch. In der vorliegenden Untersuchung wurde der LSHT mit PYR an den Populationen L und M evaluiert. Die Ergebnisse des Stammes L ergaben für die LD₅₀-Werte ein arithmetisches Mittel von 2,69 (\pm 1,65) μ g PYR/ml (s. Tab.21). Für Population M wurde ein Mittelwert von 13,94 (\pm 0,76) μ g PYR/ml ermittelt (s. Tab. 22). Dieser Unterschied zwischen den beiden Populationen ist überraschend, da beide Versuchsponies auf der gleichen Weide standen und während sie in Besitz der Hochschule waren keinen Kontakt mit PYR hatten. Über die Zeit davor kann keine Aussage getroffen werden. Aufgrund der Tatsache, dass das mit der Population M infizierte Versuchspony seit mindestens fünf Jahren vor Versuchsbeginn nicht mit PYR behandelt wurde, wird vermutet, dass es sich bei den hohen LD₅₀-Werten dieser Population nicht um PYR-Resistenz handelt. Für die Ergebnisse des Versuchs II der Feldstudie wurde daher der LD₅₀-Wert der Population M zuzüglich der dreifachen Standardabweichung (16,22 μ g PYR/ml) als Näherung an einen Schwellenwert für Resistenz verwendet. 53,1 % der Proben lagen über diesem LD₅₀-Wert (s. Abb. 17 u. 18). Die Ergebnisse des Vorversuches II mit den Populationen L und M zeigten starke Streuungen zwischen den verschiedenen Wiederholungsversuchen. Möglicherweise handelt es sich hierbei um natürliche Schwankungen in einer sensiblen Population. Da keine nachweislich PYR-resistente Strongylidenpopulation zur Verfügung stand, konnten keine Referenzwerte für PYR-Resistenz gewonnen werden. Daher ist unklar, welche Bedeutung die starken Schwankungen der Ergebnisse hinsichtlich einer PYR-Resistenz haben. Aus Mangel an MDS-positiven Pferden, war es auch nicht möglich einen EZRT zum Vergleich durchzuführen. Es konnte

daher nicht festgestellt werden, ob die Ergebnisse des LSHT für PYR-sensible und -resistente MDS-Populationen mit den Ergebnissen eines EZRT korrelieren.

4.4 Eizahlreduktionstest und Larvenparalysetest mit Ivermectin

Seit der Einführung der ML vor zwanzig Jahren wurde der EZRT mit IVM und MOX immer wieder durchgeführt, um eine mögliche Resistenzentwicklung früh zu entdecken. In den achtziger Jahren fanden BAUER et al. (1986) eine EZR von 97 – 100 % in deutschen Vollblutbetrieben. Bis heute bestätigten zahlreiche Untersuchungen die gute Wirksamkeit der ML, bei denen immer eine EZR von > 95 % festgestellt wurde (BÜRGER u. BAUER 1987; COLLOBERT et al. 1998; EYSKER et al. 1991 u. 1997; KLEI et al. 2001; POOK et al. 2002; REPETA 1993; SCHUHMANN 2001). Der EZRT aus den vorliegenden Untersuchungen ergab eine 100 % ige EZR für IVM. Obwohl trotz häufigem Einsatz bisher kein Wirkungsverlust festgestellt wurde, sind viele Autoren der Ansicht, dass es nur eine Frage der Zeit ist bis sich eine IVM-Resistenz entwickeln wird (PRICHARD 1990; SANGSTER 1999a; KAPLAN 2002). BOERSEMA et al. (2002) fanden kürzlich IVM-Resistenz bei *P. equorum* bei Pferden in den Niederlanden. Die hohe Prävalenz von IVM-Resistenz bei einigen Trichostrongyliden von Schaf und Ziege (GEERTS u. GRYSSELS 2000) lässt darauf schließen, dass früher oder später auch bei kleinen Strongyliden die ersten Fälle von IMV-Resistenz auftreten werden. Obwohl sich die Trichostrongyliden der kleinen Wiederkäuer und die kleinen Strongyliden des Pferdes in der Biologie sehr ähnlich sind, gibt es doch einige Unterschiede, die möglicherweise der Grund sind, weshalb sich bei den kleinen Strongyliden bisher noch keine IVM-Resistenz gezeigt hat (SANGSTER 1999a; KAPLAN 2002). Die längere Präpatenz kleiner Strongyliden und ein großes Refugium in Form von inhierten Larven in der Darmschleimhaut, sind Faktoren, die einen Selektionsdruck senken. Obwohl in Betracht gezogen werden muss, dass die kleinen Strongyliden möglicherweise nicht das Potential haben, eine IVM-Resistenz zu entwickeln, ist dieser Fall eher unwahrscheinlich, da mehrere Gattungen nachweislich Resistenz gegen BZ und teilweise auch schon gegen PYR entwickelt haben (SANGSTER 1999a).

Bei den Trichostrongyliden der Wiederkäuer ist der Resistenzmechanismus für IVM-Resistenz nicht vollends geklärt und man weiß nicht, ob die bei diesen Tierarten verwendeten

AR-Tests für die Feststellung von IVM-Resistenz geeignet sind. Daher ist es schwierig, abzuschätzen, wie sich die Resistenzsituation bei den kleinen Strongyliden entwickeln wird (DARGATZ et al. 2000). Bedenklich ist auf jeden Fall der häufige Einsatz dieser Wirkstoffgruppe, da ML, solange keine neuen Wirkstoffe auf dem Markt sind, die letzte Möglichkeit für die medikamentelle Bekämpfung von AR kleiner Strongyliden sind.

Es gibt keine Erkenntnisse hinsichtlich eines möglichen Resistenzmechanismus kleiner Strongyliden gegen ML. Aus diesem Grund ist die Auswahl eines geeigneten AR-Test, der Resistenz-relevante Eigenschaften prüft, schwierig. Da sich IVM aufgrund der fehlenden oviziden Wirkung nicht für einen LSHT eignet und der LEHT sehr zeitsaufwendig ist, wurde hier der LPT an dritten Larven kleiner Strongyliden durchgeführt. Dieser Test ist bisher in der Literatur für kleine Strongyliden nicht beschrieben worden, eignete sich aber zur Diagnose von LEV, MOR und IVM-Resistenz bei verschiedenen Trichostrongyliden (GEERTS et al. 1989; SUTHERLAND u. LEE 1989; GILL u. LACEY 1998; VÁRADY u. CØRBA 1999). Nach erfolgreicher Evaluierung des LPT mit IVM an den IVM-naiven Referenzpopulationen L und M wurde dieser Test zur Untersuchung der Proben aus der vorliegenden Feldstudie angewendet. Die arithmetischen Mittel der LD₅₀-Werte lagen bei 0,22 µg IVM/ml (\pm 0,2) für Population L und bei 0,36 µg IVM/ml (\pm 0,14) für Population M (s. Tab. 23 u. 24). Die beiden Versuchssponies, die mit diesen beiden Populationen infiziert waren, hatten während sie in Besitz der Hochschule waren, keinen Kontakt mit ML gehabt. Über die Zeit davor sind keine Angaben erhältlich gewesen. Wie schon für Pyrantel beschrieben, wurde der höhere Wert zuzüglich der dreifachen Standardabweichung (0,64 µg IVM/ml) als möglicher Schwellenwert für eine IVM-Resistenz betrachtet. Bei den hier mittels des LPT mit IVM untersuchten Proben lagen 60,3 % über diesem Schwellenwert (s. Abb. 20 u. 21). Dabei hatten 6,4 % der Proben einen LD₅₀-Wert von $>$ 1,5 µg/ml IVM. Die unterschiedlichen LD₅₀-Werte der beiden Referenzstämme sind möglicherweise auf eine natürliche Varianz einer sensiblen Population zurückzuführen. Die Ergebnisse des EZRT lassen darauf schließen, dass alle getesteten Tiere mit IVM-sensiblen Strongyliden infiziert sind. Allerdings liegen die Ergebnisse des LPT zu einem großen Prozentsatz über dem hier definierten Referenzwert. Da es keine Informationen hinsichtlich eines Resistenzmechanismus gibt, ist es unklar, ob sich Resistenz überhaupt in einer verminderten Paralyse der dritten Larven äußert. Andererseits handelt es sich aber hier vielleicht schon um schwachresistente Würmer, die mit dem EZRT

nicht detektiert werden konnten. Eine genaue Aussage zur Relevanz des hier beschriebenen Verfahrens wird erst möglich sein, wenn man phänotypisch resistente Strongylidenstämme isoliert hat. Zwischenzeitlich ist es wichtig, möglichst viele Informationen zu ermitteln, um eine Resistenzentwicklung möglichst früh zu erkennen.

4.5 Allelspezifische PCR

Die allelspezifische PCR wurde mit der Real-time PCR an 53 adulten Würmern von acht Strongylidenarten sowie an 200 dritten Larven kleiner Strongyliden von fünf verschiedenen Pferden durchgeführt, die mit BZ-resistenten kleinen Strongyliden infiziert waren. Wie bei anderen Untersuchungen (BUSTIN 2000, SAMSON-HIMMELSTJERNA 2002b) lagen die berechneten VK-Werte für die Standardkurven $< 5\%$ (s. Tab. 37). Trotzdem ergab sich bei der Quantifizierung der DNA der untersuchten Larven und Würmer eine hohe Variabilität, da die Abweichungen der Standards sich zu den Schwankungen der C_t -Werte aus den Doppelansätzen addierten. Daher wurde in der vorliegenden Untersuchung auf eine Quantifizierung verzichtet und der Schwerpunkt auf die Diagnose der Genotypen des Codons 200 des β -Tubulin-Gens gelegt. Die Genotypen der hier untersuchten adulten Würmer waren in früheren Untersuchungen mittels der konventionellen PCR charakterisiert worden und korrespondierten zu den hier ermittelten Genotypen¹. Alle 53 Würmer ergaben in zwei unabhängigen Untersuchungen dieselben Ergebnisse (s. Tab. 36). Von den 200 präparierten Larven konnten 102 Ergebnisse erzielt werden (s. Abb. 25). Die Genotyp-Verteilung ergab Anteile von 41 % an Larven mit dem Genotyp TTC/TTC, 51 % mit TTC/TAC und 8 % an Larven, die den Genotyp TAC/TAC aufwiesen (s. Abb. 26). Diese Genotypverteilung unterscheidet sich von den Ergebnissen von PAPE (2001), die bei einer BZ-resistenten Strongylidenpopulation Allelfrequenzen von 28,7 – 49,6 % für TTC/TTC, 12,4 – 38,6 % für TTC/TAC und 32,7 – 38 % für TAC/TAC fand. Während der Anteil von TTC/TTC Larven bei beiden Untersuchungen im gleichen Bereich liegt, ist das Verhältnis von TTC/TAC und TAC/TAC Larven in der vorliegenden Untersuchung zugunsten der heterozygoten Larven verschoben. Allerdings ergab die Genotypisierung adulter Würmer bei PAPE (2001) ein ähnliches Verhältnis wie bei den hier untersuchten dritten Larven. Die niedrige Anzahl der

¹ laut persönlicher Mitteilung von Herrn G. von Samson-Himmelstjerna, Hannover am 03 Februar 2003

TAC/TAC aufweisenden Larven in der vorliegenden Untersuchung ist möglicherweise auf die sehr variable Eiausscheidung einzelner adulter Weibchen zurückzuführen. WITZENDORFF (2001) fand bei Untersuchungen an Pferden in Chile bei drei verschiedenen Betrieben Genotyp-Verhältnisse von 9,3 – 47,7 % für TTC/TTC, 33,1 – 61,4 % für TTC/TAC und 12,4 – 47,2 % für TAC/TAC. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede der Genotypverteilung vor und nach einer BZ-Behandlung.

Die Ergebnisse aus verschiedenen Untersuchungen zeigen demnach eine große Variabilität der Allelfrequenzen bei BZ-resistenten oder teilweise BZ-resistenten Populationen. Überraschend ist, dass die Häufigkeit des Allels TAC in phänotypisch resistenten Populationen eher niedrig ist. Faktoren, die für dieses Phänomen verantwortlich sein könnten, sind mögliche Fitnessunterschiede resistenter und sensibler Würmer oder Larven, die nicht in Zusammenhang mit der Wirkung von BZ stehen. ELARD et al. (1998) untersuchten Parameter wie Eiproduktion, Entwicklungsraten von Eiern und Larven, Lebensdauer der Adulten und Anzahl der Larven, die sich im Wirt ansiedelten, bei BZ-sensiblen und –resistenten Populationen von *T. circumcincta*. Sie konnten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Fitness der verschiedenen Populationen feststellen. In anderen Untersuchungen mit TBZ an *H. contortus* stellte sich heraus, dass BZ-Sensibilität mit der größten Fitness gekoppelt war, allerdings hatten stark resistente Populationen einen selektiven Vorteil gegenüber schwach resistenten Populationen (MAINGI et al. 1989). Die Autoren begründeten damit auch die Tatsache, dass in einer schwach resistenten Population ohne weitere BZ-Selektion die Resistenz reversibel ist, während sich unter dauerhaftem BZ-Einfluss eine stark resistente Population bildet, die sich auch bei späterer Abwesenheit von BZ nicht mehr zum sensiblen Status zurückentwickelt. Die Untersuchung dieser Parameter bei den kleinen Strongyliden könnte einen wichtigen Einblick in die Resistenzentwicklung geben.

Ein weiterer wichtiger Aspekt hinsichtlich unterschiedlicher Häufigkeiten des TAC-Allels ist der Vererbungsmodus. LE JAMBRE et al. (1979) fanden bei Kreuzungsversuchen an TBZ-resistenten und –sensiblen *H. contortus* Hinweise darauf, dass es sich bei dieser Spezies um einen autosomalen co-dominanten Erbgang handelt. Allerdings führte in späteren Untersuchungen die Behandlung von *H. contortus* und *T. circumcincta* mit TBZ zur vollständigen Elimination von Larven, die TTC/TTC oder TTC/TAC aufwiesen (ROOS et al.

1995; ELARD u. HUMBERT 1999). Daraus schlossen die Autoren, dass bei diesen Spezies die BZ-Resistenz rezessiv vererbt wird. Möglicherweise führt Entstehung von BZ-Resistenz unter unterschiedlich starkem Selektionsdruck zu verschiedenen Resistenztypen mit unterschiedlichen Erbgängen. Die in der vorliegenden Studie untersuchte Strongylidenpopulation wurde mittels zweier AR-Tests als BZ-resistent diagnostiziert. Die Tatsache, dass der Anteil von den Larven mit dem Genotyp TAC/TAC < 10 % betrug, lässt darauf schließen, dass sich der Erbgang der BZ-Resistenz kleiner Strongyliden von dem anderer Spezies unterscheidet. PAPE (2001) vermutete, dass es sich bei dem Codon 200 nicht um die einzige für die Entstehung von BZ-Resistenz verantwortliche Mutation im β -Tubulin-Gen handelt. Wie auch bei *H. contortus* wurde bei kleinen Strongylidenarten ein weiteres Codon (167) gefunden, das einen Polymorphismus aufweist (PAPE et al. 2002). Die Bedeutung dieses Codons hinsichtlich einer BZ-Resistenz ist noch nicht geklärt.

4.6 Beurteilung der Praktikabilität der Verfahren

4.6.1 Kotuntersuchung

Die Sensibilität der modifizierten McMaster-Methode ist nicht besonders hoch. Durch die hohe Nachweisgrenze von 50 EpG ist es möglich, dass einige Proben als falsch negativ diagnostiziert wurden. Dazu kommt, dass in der hier beschriebenen Untersuchung zur Feststellung der Prävalenz von kleinen Strongyliden bei 1.383 Pferden nur eine Kotprobe pro Pferd genommen wurde. Die Eiausscheidung bei kleinen Strongyliden variiert aber sowohl von Art zu Art als auch zu verschiedenen Zeitpunkten. Daher ist eine höhere Prävalenz zu vermuten als in der vorliegenden Untersuchung gefunden wurde.

4.6.2 Eizahlreduktionstest

Der EZRT ist vom Prinzip leicht durchführbar und wird international als Resistenztest empfohlen. Die Probennahme ist allerdings sehr aufwendig, da man mindestens zweimal zu den Betrieben fahren muß. Zudem ist man von der Kooperation der Pferdebesitzer abhängig. Weitere Nachteile ergeben sich aus der Variabilität der Eiausscheidung, wodurch die Interpretation bei nur einer Probennahme vor und nach Behandlung erschwert wird. Die in der

vorliegenden Untersuchung durchgeführte Dosierung anhand von Schätzwerten des KGW stellt eine mögliche Fehlerquelle dar. Da es aus Praktikabilität nicht möglich war die Tiere zu wiegen und die Gewichtsrechnung anhand von Brustumfang und Körperlänge für einen hohen Probendurchsatz zu aufwendig war, wurde in dieser Untersuchung trotzdem anhand von Schätzwerten behandelt und darauf geachtet möglichst hohe Schätzwerte zu wählen.

4.6.3 Larvenschlupfhemmtest

Der LSHT zeigte sich hier als sehr arbeits- und zeitaufwendiges Verfahren. Um die Ergebnisse des hier durchgeführten LSHT mit anderen an der Hochschule durchgeführten Untersuchungen vergleichen zu können (ULLRICH 1987; WITZENDORFF 2001), sollten die Kotproben innerhalb von 24 Stunden verarbeitet werden. Unter dieser Voraussetzung erwies sich der LSHT als sehr aufwendig hinsichtlich der Organisation, da innerhalb dieser Zeit Probennahme, Kotprobenuntersuchung und die Verarbeitung der Proben durchgeführt werden musste. Die Gewinnung der Eispension durch Flotation und Sedimentation ist ein effektives aber sehr mühsames Verfahren und erlaubt nur einen limitierten Probendurchsatz. Da der LSHT in der vorliegenden Untersuchung mit je fünf Verdünnungsstufen im doppelten Ansatz pro Wirkstoff durchgeführt wurde, mussten mindestens 50 ml Eispension mit einer Konzentration von mindestens 50 MDS-Eiern/ml gewonnen werden. Ein weiterer Nachteil ist die zeitaufwendige Auswertung. Bei den Tieren, die ein niedriges EpG aufwiesen, dauerte die Auswertung eines LSHT bis zu zwei Tage. Um diesen Arbeitsschritt zu verkürzen, wurden statt 200 (ULLRICH 1987; VÁRADY et al. 1999) nur 100 Entwicklungsstadien pro Verdünnungsstufe ausgezählt, wie es auch von WITZENDORFF (2001) durchgeführt wurde. Aufgrund des limitierten Probendurchsatzes und des Arbeitsaufwandes eignet sich der LSHT nicht für epidemiologische Studien. WITZENDORFF (2001) diskutierte, dass die Untersuchung anhand von Sammelproben geeigneter für AR-Screening vieler Bestände wäre. Dadurch würden auch die Schwankungen der Ergebnisse und die Anzahl nichtverwertbarer Tests limitiert werden. Zudem könnten bei Sammelproben auch mehr Entwicklungsstadien pro Konzentrationsstufe ausgezählt werden, was ein genaueres Ergebnis liefern würde. Eine weitere Möglichkeit zur Steigerung der Praktikabilität wäre die Resistenzdiagnose anhand von LD₉₆-Werten. ULLRICH (1987) definierte als Schwellenwert für BZ-Resistenz einen LD₉₆-Wert von 0,15 µg BZ/ml. Sie setzte im LSHT nur diese Konzentration ein. Alle

untersuchten Proben, deren Larvenschlupfhemmung bei dieser Konzentration < 96 % war, wurden als BZ-resistent eingestuft. Durch die Verwendung nur einer Konzentration pro Probe kann die Dauer der Auswertung stark reduziert werden.

4.6.4 Lavenparalysetest

Der LPT war leicht durchzuführen und nicht sehr zeitintensiv. Bei der Auswertung durch einen Untersucher war der Test zuverlässig und reproduzierbar. Die Ergebnisse zweier verschiedene Untersucher bei einem LPT, der an einer anderen Spezies durchgeführt wurde, unterlag allerdings großen Schwankungen. Die subjektive Beurteilung des Paralysezustandes erschwert den Vergleich verschiedener Untersuchungen. Eine mögliche Verbesserung wäre die Standardisierung der Beurteilung durch Kategorisierung verschiedener Paralysestadien, was den Test aber aufwendiger machen und die Festsetzung eines Grenzwertes für IVM-Resistenz erschweren würde. Eine Alternative zu diesem Test ist die Methode von GATONGI et al. (2002), die kürzlich einen Larvenmigrationshemmtest für *H. contortus* entwickelten, bei dem das Migrationverhalten unter dem Einfluss von IVM getestet wurde. Sie konnten mit diesem Test signifikante Unterschiede zwischen IVM-sensiblen und IVM-resistenten *H. contortus*-Populationen feststellen

4.6.5 Real-time PCR

Die Real-time PCR wurde hier zur Genotypisierung hinsichtlich des TTC/TAC-Polymorphismus im β -Tubulin-Gen eingesetzt. Diese Methode erwies sich als ähnlich sensitiv und spezifisch wie die allelspezifische konventionelle PCR (PAPE 2001). Die schnelle Auswertung mittels Fluoreszenzmessung und eines Software Programms ermöglichte einen hohen Probendurchsatz. Die Genotypfrequenz, die in diesen Untersuchungen ermittelt wurden, entsprachen den Ergebnissen der klassischen PCR an einer experimentell gewonnenen BZ-resistenten Population kleiner Strongyliden (PAPE 2001). Im Rahmen der Diagnostik für BZ-Resistenz erwies sich diese Methode als zeitsparende und reproduzierbare Alternative zur aufwendigeren klassischen PCR.

4.6.6 Schlussfolgerung

Obwohl die Prävalenz von MDS bei Einzelproben in diesen Untersuchungen nur bei ca. 40 % lag, war die Prävalenz von BZ-Resistenz in den Betrieben, die mit AR-Tests untersucht wurden, sehr hoch. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen weisen auf eine weit verbreitete und hochgradige BZ-Resistenz bei Pferdebetrieben in Niedersachsen hin. Diese Studie steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die in anderen Untersuchungen in Deutschland sowie in anderen Ländern weltweit festgestellt wurden. Über das Auftreten von PYR-Resistenz kann aufgrund mangelnder Referenzwerte keine Aussage gemacht werden. Allerdings lässt die relativ häufige Anwendung dieses Präparates und die hier gefundenen hohen LD₅₀-Werte im LSHT darauf schließen, dass auch in Deutschland eine Resistenzentwicklung zu befürchten ist. Die Ergebnisse des EZRT für IVM zeigen eine uneingeschränkte Wirksamkeit. Trotzdem kann das Vorhandensein einer IVM-Resistenz nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Der häufige Einsatz dieser Substanz ist bedenklich, da auf diese Weise der Selektionsdruck erhöht wird. Obwohl ein großer Anteil an Pferdebesitzern inzwischen mit weidehygienischen Maßnahmen arbeitet, wird der anthelminthischen Behandlung der höchste Stellenwert in der Parasitenbekämpfung eingeräumt. Dabei wird die Behandlung meistens ohne vorherigen Nachweis von Parasitenbefall durchgeführt. Für eine nachhaltige Parasitenkontrolle ist ein vernünftiger Einsatz von Anthelminthika, der auf das Nötigste beschränkt werden sollte, notwendig. Insbesondere sollte der Einsatz von ML so weit wie möglich reduziert werden, um die Wirkung dieser Anthelminthikagruppe noch möglichst lange zu erhalten. Zudem ist die Verstärkung der Bekämpfung mittels alternativer Methoden, wie Kotabsammeln, Geilstellenentfernung und Weidewechsel von großer Bedeutung. Des Weiteren sollte mindestens zweimal im Jahr eine Kotuntersuchung durchgeführt werden, um festzustellen, ob eine anthelminthische Behandlung notwendig ist. Ein geringer Befall der Pferde ist unbedenklich und auch wünschenswert, damit die Tiere eine Immunität aufbauen können. Um eine erfolgreiche anthelminthische Behandlung durchzuführen, ist es unerlässlich die Wirksamkeit der eingesetzten Präparate zu überprüfen. Dafür muss 10 bis 14 Tage nach der Behandlung eine Kotuntersuchung durchgeführt werden. Bei reduzierter Wirksamkeit sollte die betreffende Wirkstoffklasse vorerst nicht mehr angewendet werden.

Bisher sind nur Präparate der oben genannten Wirkstoffklassen für das Pferd zugelassen. In Anbetracht der immer häufiger auftretenden AR ist die Entwicklung neuer Substanzen notwendig, um auch in Zukunft Parasiten erfolgreich bekämpfen zu können. Einige Substanzen wurden in den letzten Jahren entdeckt, die anthelminthische Wirkung zeigten, für die aber bisher noch keine Zulassung für die Anwendung beim Tier erreicht wurde. Das Paraherquamid ist ein Oxindol Alkaloid, welches von *Pinicillium paraherquei* und *P. charlesii* produziert wird und das in verschiedenen Versuchen an Nagetieren, Schafen und Rindern hervorragende Wirkung gegen Nematoden bei guter Verträglichkeit zeigte (OSTLIND et al. 1990; SHOOP 1990, 1992a, 1992b). Allerdings kam es bei Versuchen an Hunden nach der Anwendung zu starken Nebenreaktionen wie Depression, Ataxie und Nickhautvorfall (SHOOP et al. 1991). Gegen Arthropoden und Cestoden wurde bisher keine Wirkung beschrieben. Über Wirkungsweise und Zielort dieses Wirkstoffes ist noch nichts bekannt (GEARY et al. 1999). Weitere neue Wirkstoffe mit antiparasitärer Wirkung sind das PF1022A und dessen Derivat Emodepsid. Diese Substanzen sind Cyclooctadepsipeptide und werden von dem Pilz *Mycelia sterilia* produziert. Das PF1022A zeigte *in vitro* und *in vivo* eine hohe Effektivität gegen verschiedene intestinale Nematoden bei verschiedenen Tierarten (KACHI et al. 1995; SAMSON-HIMMELSTJERNA et al. 2000; HARDER u. SAMSON-HIMMELSTJERNA 2002). SAMSON-HIMMELSTJERNA et al. (2000) fanden bei der oralen Anwendung des PF1022A bei Pferden eine hohe Effektivität gegen kleine Strongyliden. Selbst fünf Wochen nach Behandlung lag die EZR > 95 %. Das Emodepsid zeigte eine hohe Wirksamkeit gegen zahlreiche Mikrofilarien (HARDER u. SAMSON-HIMMELSTJERNA 2002). Auch bei dieser Wirkstoffklasse ist bisher keine Wirkung gegen Arthropoden und Cestoden beschrieben worden. Der Wirkungsmechanismus dieser Substanzen ist noch nicht hinreichend erklärt. Es ist unerlässlich, diese Wirkstoffe weiterzuentwickeln, um neue Ressourcen in der Parasitenbekämpfung zu schaffen.

Abgesehen von der Entwicklung neuer Wirkstoffe ist es dringend notwendig, mehr über die Biologie der Parasiten, Wirkungsweise der Anthelminthika und Resistenzmechanismen zu erfahren. Nur so wird es möglich AR früh und sicher zu erkennen und langfristig begrenzen zu können.

5 Zusammenfassung

Nicole Catherine Margarethe Wirtherle (2003):

Untersuchungen zur Verbreitung von Anthelminthikaresistenzen bei Pferden in Niedersachsen

Die kleinen Strongyliden zählen weltweit zu den wichtigsten Parasiten des Pferdes und haben in den letzten Jahren aufgrund der Zunahme von Anthelminthikaresistenz (AR) immer mehr an Bedeutung gewonnen. Die möglichst frühe Diagnose einer AR sowie ein umfangreiches Wissen über die Resistenzmechanismen sind die wichtigsten Voraussetzungen um Resistenz bekämpfen zu können. Ziel dieser Arbeit war zum einen die Ermittlung der Prävalenz von kleinen Strongyliden sowie das Auftreten von AR bei Pferden in Niedersachsen, zum anderen sollte eine explorative Datenanalyse über Betriebsmerkmale, Weide- und Entwurmungsmanagement mittels einer Fragebogenerhebung Aufschlüsse über mögliche Zusammenhänge mit einer Resistenzproblematik geben.

Insgesamt wurden in den Jahren 2000 und 2001 auf 64 Betrieben Kotproben von 1.383 Pferden auf den Befall mit Magen-Darm-Strongyliden (MDS) untersucht. Bei 39,8 % der Proben wurden MDS nachgewiesen. Auf 91,6 % der Betriebe wurde mindestens ein Tier mit MDS nachgewiesen, womit die betriebsbezogene Prävalenz wesentlich höher lag als die Prävalenz bei den Einzelproben. Die Prävalenz von MDS-Eiern im Kot und die mittleren EpG-Werte unterschieden sich in den beiden Probenjahren signifikant. Jungtiere zeigten signifikant höhere Eiausscheidungen als ältere Tiere. Bei Zuchtbetrieben wurde eine signifikant höhere Befallsrate festgestellt als bei den anderen Betriebsformen. Rasse und Geschlecht hatten keinen Einfluss auf den Befall mit MDS. Bei den Maßnahmen der Weidehygiene erreichte sowohl Kot- als auch Geilstellenentfernung eine signifikante Senkung der Befallsrate. Hinsichtlich des Entwurmungsmanagements stellte sich eine signifikante Häufung der Anwendung von IVM heraus.

BZ-Resistenz konnte bei 73,3 % der auf AR untersuchten Proben mit mindestens einem AR-Test ermittelt werden. Zur Anwendung kam der Larvenschlupfhemmtest (LSHT) und der Eizahlreduktionstest (EZRT). Als Schwellenwerte dienten ein LD₅₀-Wert von > 0,1 µg

TBZ/ml (COLES et al. 1992) bzw. eine Eizahlreduktion (EZR) von < 90 % (BAUER 1986). Die Ergebnisse der beiden Tests korrelierten. Der LSHT wurde zum ersten Mal für PYR angewendet. Der Test ließ sich erfolgreich durchführen. LD₅₀-Werte von zwei PYR-sensiblen kleinen Strongyliden-Populationen lagen zwischen 2,69 (± 1,65) µg PYR/ml und 13,95 (± 0,76) µg PYR/ml. Mehr als 50 % der Proben lagen deutlich über diesen Werten. Mangels Referenzwerte von PYR-resistenten Strongylidenpopulationen konnte keine Aussage hinsichtlich der Prävalenz einer PYR-Resistenz gemacht werden. Die Durchführung des EZRT mit IVM ergab in allen Fällen eine EZR von 100 %. Die Durchführung des Larvenparalysetest (LPT) mit IVM an dritten Larven von zwei IVM-sensiblen Strongylidenpopulationen ergaben Mittelwerte für die LD₅₀ von 0,22 (± 0,2) µg IVM/ml und 0,36 (± 0,14) µg IVM/ml. Die Untersuchung der Proben mit dem LPT ergab LD₅₀-Werte zwischen 0,11 und 2,31 µg IVM/ml mit einem Median von 0,76 µg IVM/ml. Auch hier konnte mangels eines Schwellenwerts keine Diagnose anhand des *in vitro*-Tests gestellt werden. Die Ergebnisse der EZRT lassen den Schluss zu, dass bei den hier untersuchten Pferden noch keine IVM-Resistenz aufgetreten ist.

Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Betriebsformen, Weide- und Entwurmungsmanagements konnten nicht festgestellt werden.

Die Real-time PCR wurde als Mittel zur Resistenzdetektion an adulten Strongyliden und dritten Larven eingesetzt. Anhand dieser Methode konnten die Genotypen hinsichtlich des Codons 200 des β-Tubulin-Gens von 53 Adulten und 102 Larven eindeutig und zuverlässig charakterisiert werden. Die Prävalenz der Allele TTC und TAC in der Larvenpopulation betragen 66,7 % bzw. 33,3 %. Die Genotypisierung der adulten Würmer waren reproduzierbar und korrelierten mit den Ergebnissen der konventionellen PCR in Untersuchungen. Da die quantitative Untersuchung mittels der Real-time PCR hier nicht durchführbar war ist diese Methode für den Einsatz in der Klinik oder in der Routinediagnostik zum Nachweis von Bezimidazolresistenz nicht geeignet.

6 Summery

Nicole Catherine Margarethe Wirtherle (2003):

Investigation of the prevalence of anthelmintic resistance in horses in Lower Saxony

The small strongyles belong to the most important parasites in horses all over the world, and due to the growing prevalence of anthelmintic resistance (AR) during these past years they have become even more important. Early detection as well as distinct knowledge about the mechanisms of resistance are essential for a successful control of AR. This study aims at investigating the prevalence of small strongyles as well as the incidence of AR in horses in Lower Saxony, Germany. Furthermore, an explorative analysis of data about the characteristics of the properties as well as pasture-management factors and anthelmintic regimes was performed in order to determine possible causes of AR.

During the years 2000 and 2001, 1.383 fecal samples of 64 farms were tested for strongyle eggs. Of these 39,8 % were tested positive. Compared to the number of infected horses, prevalence on the properties turned out to be much higher; on 91,6 % of farms at least one animal was found to harbour strongyle infection. There was a significant difference in the mean fecal egg counts (FEC) between the years 2000 and 2001 although no obvious differences of property management or weather conditions were found. Significantly higher rates of infection were also found for horses younger than 5 years as well as for those that were kept on studs. Breed or gender did not influence the infection with strongyles. Measures of pasture hygiene, such as removing faeces and clipping roughs, significantly reduced the rate of infection. As for anthelmintic treatment IVM was used more frequently than other anthelmintics.

Of those samples tested for AR, 73,3 % were positiv for benzimidazole (BZ) resistance according to at least one AR-assay. A faecal egg count reduction test (FECRT) and an egg hatch assay (EHA) was performed for 135 samples from 20 farms with fenbendazole (FBZ) and thiabendazole (TBZ) respectively. LD₅₀-values > 0,1 µg/ml TBZ (COLES et al. 1992)

and fecal egg count reduction (FECR) of < 90 % (BAUER 1986) were considered to indicate resistance. The results of both tests were correlated.

The EHA was successfully performed for pyrantel (PYR) for the first time. Mean LD₅₀-values of two PYR-sensitive small strongyle populations were 2,69 (± 1,65) and 13,95 (± 0,76) µg/ml PYR. More than 50 % of the 64 tested samples noticeably exceeded the higher value. Since there is no data of a known PYR-resistant strongyle population, no diagnosis concerning the prevalence of PYR-resistance could be made. Due to the low prevalence of small strongyles, FECRT with PYR could not be performed

The FECRT with ivermectin (IVM) was performed for 77 horses on ten farms. A FECR of 100 % was found in all cases. Larval paralysis assays (LPA) performed on two IVM-sensitive strongyle populations resulted in mean LD₅₀-values of 0,22 (± 0,2) and 0,36 (± 0,14) µg/ml IVM. The LD₅₀-values found for 63 samples ranged between 0,11 and 2,31 µg/ml with a median of 0,76 µg/ml IVM. Similar to PYR, no diagnosis of IVM-resistance could be made by the *in vitro* test due to the lack of the threshold limits for resistance. According to the results of the FECRT with IVM, no detectable IVM-resistance has developed so far.

Possibly due to the low number of farms on which AR-tests could be performed, no significant correlation was found between characteristics of the properties, pasture management factors and anthelmintic regimes as far as AR is concerned.

Another method used for the detection of BZ-resistance was the allele-specific real-time PCR that was performed on adult worms and third stage larvae of small strongyles. This method allowed specific and reliable genotyping of the codon 200 in 53 adults and 102 larvae. The results showed allele frequencies of 66,7 % and 33,3 % in a BZ-resistant population of small strongyles for the TTC and TAC alleles respectively. The genotypes of adult worms were reproduceable and corresponded with earlier results of the conventional PCR. Since the quantitative analysis did not yield very distinct results this method is not suitable for routine diagnostics or clinical use in order to discern benzimidazole resistance.

7 Literaturverzeichnis

ABBOT, E. M. (1998a):

Larval cyathostomosis – Part 1.

Equine Pract. 20, 6-7

ABBOT, E. M. (1998b):

Larval cyathostomosis – Part 2.

Equine Pract. 20, 6-8

ACEVES, J., D. ERLIJ u. R. MARTINEZ-MARANON (1970):

The mechanism of the paralysing action of tetramisole on *A. Somatic* muscle.

Br. J. Pharmacol. 38, 602-607

AFONINA, I., M. ZIVARTS, E. LUKHTANOV, H. GAMPER u. R. B.MEYER (1997):

Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder.

Nucleic Acids Res. 25, 2657-2660

ALBERT, J., C. J. LINGLE, E. MARDER u. M. B. O'NEIL (1986):

A GABA-activated chloride-conductance not blocked by picrotoxin on spiny lobster neuromuscular preparations.

Br. J. Pharmacol. 87, 771-779

AMARANTE, A. F. T., W. E. POMROY, W. A. G. CHARLESTON, D. M. LEATHWICK u.

M. T. T. TORNEROS (1996):

Evaluation of a larval development assay for the detection of anthelmintic resistance in

Ostertagia circumcincta.

Int. J. Parasitol 27, 305-311

ANDERSON, N. (1988):

Aspects of the biology of *Ostertagia ostertagi* in relation to the genesis of ostertagiasis.

Vet. Parasitol. 27, 13-21

ARENA, J. P., K. K. LIU, P. S. PARESS, E. G. FRAZIER, D. F. CULLY, H. MROZIK u.

J. M. SCHAEFFER (1995):

The mechanism of action of avermectins in *C. Elegans*: correlation between activation of glutamate-sensitive chlorid current, membrane binding, and biological activity.

J. Parasitol. 81, 286-294

AUBRY, M. L., P. COWELL, M. J. DAVEY u. S. SHEVDE (1970):

Aspects of the pharmacology of a new anthelmintic: pyrantel.

Br. J. Pharmacol. 38, 332-344

BARGER, I. A. U. K. A. LISLE (1979):

Benzimidazole resistance in small strongyles of horses.

Aust. Vet. J. 55, 594-595

BAUER, C. (1983):

Anthelminthika-Resistenzen bei Magen-Darm-Strongyliden der Wiederkäuer und Pferde.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 96, 357-363

BAUER, C., R. GANDRAS, M. STOYE u. H.-J. BÜRGER (1983):

Field study of anthelmintic resistance of strongylids in horses.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 96, 312-316

BAUER, C. (1986):

Untersuchungen zur Wirksamkeit einiger Anthelminthika gegenüber benzimidazol-resistenten kleinen Strongyliden.

Der praktische Tierarzt 67, 637-641

BAUER, C., J. C. MERKT, G. JANKE-GRIMM u. H.-J. BÜRGER (1986):

Prevalence and control of benzimidazole-resistant small strongyles on German thoroughbred studs.

Vet. Parasitol. 21, 189-203

BEECH, R. N., R. K. PRICHARD u. M. E. SCOTT (1994):

Genetic variability of the beta-tubulin genes in benzimidazole-susceptible and -resistant strains of *H. Contortus*.

Genetics 138, 103-110

BEHRENS, T. (2001):

Bandwürmer (Anoplocephaliden) beim Pferd: Prävalenz in Norddeutschland sowie Eignung eines serologischen Nachweisverfahrens (ELISA) zur Diagnostik.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

BEUGNET, F., M. GAUTHEY u. D. KERBOEUF (1997):

Partial *in vitro* reversal of benzimidazole resistance by the free-living stages of *H. Contortus* with verapamil.

Vet. Rec. 141, 575-576

BJØRN, H., C. SOMMER, H. SCHOUGARD, S. A. HENRIKSEN u. P. NANSEN (1991):

Resistance to benzimidazole anthelmintics in small strongyles (*Cyathostominae*) of horses in Denmark.

Acta Vet. Scand. 32, 253-260

BLACKHALL, W. J., J.-F. POULIOT, R. K. PRICHARD u. R. N. BEECH (1998):

H. Contortus: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains.

Ex. Parasitology 90, 42-48

BOCK, J. (1998):

Bestimmung des Stichprobenumfangs.

Verlag Oldenbourg, München

BOERSEMA, J. H. (1983):

Resistance to nematodes to anthelmintics.

Tijdschr. Diergeneeskd. 108, 426-429

BOERSEMA, J. H., F. H. M. BORGSTEDDE, M. EYSKER u. I. SAEDT (1995):

The reappearance of strongyle eggs in faeces of horses treated with pyrantel embonate.

Vet. Q. 17, 18-20

BOERSEMA, J. H., M. EYSKER, J. MAAS u. W. M. VAN DER AAR (1996):

Comparison of the reappearance of strongyle eggs in foals, yearlings, and adult horses after treatment with ivermectin or pyrantel.

Vet. Quart. 18, 7-9

BOERSEMA, J. H. U. V. S. PANDEY (1997):

Anthelmintic resistance of trichostrongylids in sheep in the highveld of Zimbabwe.

Vet. Parasitol. 68, 383-388

BOERSEMA, J. H., M. EYSKER u. J. W. NAS (2002):

Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones.

Vet. Rec. 150, 279-281

BORGERS, M. U. S. DE NOLLIN (1975):

Ultrastructural changes in *Ascaris suum* intestine after mebendazole treatment *in vivo*.

J. Parasitol. 61, 110-122

BORGSTEEDE, F. H. M., J. H. BOERSEMA, C. P. GAASENBEEK u. W. P. VAN DER BURG (1993):

The reappearance of eggs in faeces of horses after treatment with ivermectin.

Vet. Quart. 15, 24-26

BORGSTEEDE, F. H. M., G. M. DVOJNOS u. V. A. KHARCHENKO (1997):

Benzimidazole resistance in cyathostomes in horses in the Ukraine.

Vet. Parasitol. 68, 113-117

BROWN, H. D., A. R. MATZUK, I. R. ILVES, L. H. PETERSON, S. A. HARRIS, L. H.

SARETT, J. R. EGERTON, J. J. YAKSTIS, W. C. CAMPBELL u. A. C. CUCKLER (1997):

Antiparasitic drugs – IV.2'-(4'-Thiazolyl)-benzimidazole, a new anthelmintic.

J. Amer. Chem. Soc. 83, 1764-1765

BROWNLEE, D. J. A., L. HOLDEN-DYE u. J. R. WALKER (1997):

Actions of the anthelmintic ivermectin on the pharyngeal muscle of the parasitic nematode, *Ascaris suum*.

Parasitology 115, 553-561

BUSTIN, S. A. (2000):

Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.

J. Mol. Biol. 25, 169-193

BÜRGER, H.-J. U. C. BAUER (1987):

Efficacy of four anthelmintics against benzimidazole-resistant cyathostomes of horses.

Vet. Rec. 120, 293-296

CHALFIE, M. U. J. N. THOMSON (1982):

Structural and functional diversity in the neuronal microtubules of *C. Elegans*.

J. Cell Biol. 93, 15-23

CHAPMAN, M. R., T. R. KLEI u. D. D. FRENCH (1991):

Identification of thiabendazole-resistant cyathostome species in Louisiana.

Vet. Parasitol. 39, 293-299

CHAPMAN, M. R., D. D. FRENCH, C. M. MONAHAN u. T. R. KLEI (1996):

Identification and characterization of a pyrantel pamoate resistant cyathostome population.

Vet. Parasitol. 66, 205-212

CHAPMAN, M. R., D. D. FRENCH, H. W. TAYLOR u. T. R. KLEI (2002):

One season of pasture exposure fails to induce a protective resistance to cyathostomes but increases numbers of hypobiotic third-stage larvae.

J. Parasitol. 88, 678-683

CHEESEMAN, C. L., N. S. DELANY, D. J. WOODS u. A. J. WOLSTENHOLME (2001):

High-affinity ivermectin binding to recombinant subunits of the *Haemonchus contortus* glutamate-gated chloride channel.

Mol. Biochem.Parasitol. 114, 161-168

CLEVELAND, D. W. U. K. F. SULLIVAN (1985):

Molecular biology and genetics of tubulin.

Annu. Rev. Biochem. 54, 331-365

COLES, G. C., J. P. TRITSCHLER, D. J. GIORDANO, N. J. LASTE u. A. L. SCHMIDT

(1988):

Larval development test for detection of anthelmintic resistant nematodes.

Res. Vet. Sci. 45, 50-53

COLES, G. C., C. BAUER, F. H. BORGSTEEDE, S. GEERTS, T. R. KLEI, M. A. TAYLOR u. P. J. WALLER (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.

Vet. Parasitol. 44, 35-44

COLES, G. C., BORGSTEEDE u. S. GEERTS (1994):

Recommendations for the control of anthelmintic resistant nematodes of farm animals in the EU.

Vet. Rec. 26, 205-206

COLES, G. C., S. N. BROWN u. C. M. TREMBATH (1999):

Pyrantel-resistant large strongyles in racehorses.

Vet. Rec. 145, 408

COLLOBERT, C., N. BERNARD, F. CLÉMENT, J. HUBERT, D. KERBOEUF, A. FLOCHLAY u. F. BLOND-RIOU (1998):

Efficacy of oral moxidectin gel against benzimidazole-resistant Cyathostomes in horses both naturally and artificially infected with a field population.

J. Equine Vet. Sci. 28, -

COLQUHOUN, D. U. B. SAKMANN (1985):

Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate.

J. Physiol 369, 501-557

CONDER, G. A. U. W. C. CAMPBELL (1995):

Chemotherapy of nematode infections of veterinary importance, with special reference to drug resistance.

Adv. Parasitol. 35, 1-84

COSTA, A. J., O .F .BARBOSA, F. R. MORAES, A. H. ACUNA, U. F. ROCHA, V. E. SOARES, A. C. PAULLILO u. A. SANCHES (1998):

Comparative efficacy evaluation of moxidectin gel and ivermectin paste against internal parasites of equines in Brazil.

Vet. Parasitol. 80, 29-36

CRAVEN, J., H. BJORN, S. A. HENRIKSEN, P. NANSEN, M. LARSEN u. S. LENDAL (1998):

Survey of anthelmintic resistance on Danish horse farms, using 5 different methods of calculating faecal egg count reduction.

Equine Vet. J. 30, 289-293

CRAVEN, J., H. BJORN, E. H. BARNES, S. A. HENRIKSEN u. P. NANSEN (1999):

A comparison of *in vitro* tests and a faecal egg count reduction test in detecting anthelmintic resistance in horse strongyles.

Vet. Parasitol. 85, 49-59

CULLY, D. F., D. K. VASSILATIS, K. K. LIU, P. S. PARESS, L. H. VAN DER PLOEG, J. M. SCHAEFFER u. J. P. ARENA (1994):

Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*.

Nature 371, 707-711

CULLY, D. F., P. S. PARESS, K. K. LIU, J. M. SCHAEFFER u. J. P. ARENA (1996):

Identification of a *Drosophila melanogaster* glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent avermectin.

J. Biol. Chem. 271, 20187-20191

DARGATZ, D. A., J. L. TRAUB-DARGATZ u. N. C. SANGSTER (2000):

Antimicrobial and anthelmintic resistance.

Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 16, 515-519

DASH, K. M., E. HALL u. I. A. BARGER (1988):

The role of arithmetic and geometric mean worm egg counts in faecal egg count reduction tests and in monitoring strategic drenching programs in sheep.

Aust. Vet. J. 65, 66-68

DAVIS, C. U. K. GULL (1983):

Protofilament number in microtubules in cells of two parasitic nematodes.

J. Parasitol. 69 (6), 1094-1099

DELANY, N. S., D. L. LAUGHTON u. A. J. WOLSTENHOLME (1998):

Cloning and localisation of an avermectin receptor-related subunit from *Haemonchus contortus*.

Mol. Biochem. Parasitol. 97, 177-187

DEMEULENAERE, D., J. VERCRUYSSSE, P. DORNY u. E. CLAEREBOUT (1997):

Comparative study of ivermectin and moxidectin in the control of naturally acquired cyathostomeinfections in horses.

Vet. Rec. 141, 383-386

DENT, J. A., M. W. DAVIS u. L. AVERY (1997a):

Avr-15 encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in *Caenorhabditis elegans*.

EMBO J. 16 (19), 5867-5879

DENT, J. A., M. M. SMITH, D. K. VASSILATIS u. L. AVERY (1997b):

The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 97, 2674-2679

DIPIETRO, J. A. U. K. S. TODD (1987):

Anthelmintics used in treatment of parasitic infections of horses.

Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 3, 1-14

DOBSON, R. J., A. D. DONALD, P. J. WALLER u. K. L. SNOWDON (1986):

An egg-hatch assay for resistance to levamisole in trichostrongyloid nematode parasites.

Vet. Parasitol. 19, 77-84

DORNY, P., J. VERCRUYSSSE, A. JALILA, R. SANI u. C. SYMOENS (1988):

Control of haemonchosis in Malaysian goats with closantel.

Vet. Parasitol. 53, 233-241

DORNY, P., J. VERCRUYSSSE u. P. BERGHEN (1994):

Resistance of equine small strongyles to benzimidazoles in Belgium.

Zentralbl. Veterinarmed. [B] 35, 72-75

DRISCOLL, M., E. DEAN, E. REILLY, E. BERGHOLZ u. M. CHALFIE (1989):

Genetic and molecular analysis of a *Caenorhabditis elegans* beta-tubulin that conveys benzimidazole sensitivity.

J. Cell Biol. 109, 2993-3003

DUCE, I. R. U. R. H. SCOTT (1985):

Actions of dihydroavermectin B1a on insect muscle.

Br. J. Pharmacol. 85, 395-401

DUNCAN J. L. (1985):

Internal parasites of the horse and their control.

Equine Vet. J. 17, 79-82

DUNCAN, J. L., J. H. ARUNDEL, J. H. DRUDGE, A. MALCZEWSKI u.

J. O. SLOCOMBE (1988):

World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of equine anthelmintics.

Vet. Parasitol. 30, 57-72

DUNCAN, J. L., K. BAIRDEN u. E. M. ABBOTT (1998):

Elimination of mucosal cyathostome larvae by five daily treatments with fenbendazole.

Vet. Rec. 142, 268-271

DUSTIN, P. (1984):

Microtubules.

2. Aufl. Verlag Springer, New York

ECKERT, J. (2000):

Helminthologische Methoden.

In: M. ROMMEL, J. ECKERT, E. KUTZER, W. KÖRTING u. T. SCHNIEDER (Hrsg.):

Veterinärmedizinische Parasitologie.

5. Aufl. Verlag Parey, Berlin, Hamburg, S. 72

ECKERT, J. (2000):

Helminthosen der Equiden.

In: M. ROMMEL, J. ECKERT, E. KUTZER, W. KÖRTING u. T. SCHNIEDER (Hrsg.):

Veterinärmedizinische Parasitologie.

5. Aufl. Verlag Parey, Berlin, Hamburg, S. 351-417

ELARD, L., A. M. COMES u. J. F. HUMBERT (1996):

Sequences of beta-tubulin cDNA from benzimidazole-susceptible and – resistant strains of *Teladorsagia circumcincta*, a nematode parasite of small ruminants.

Mol. Biochem. Parasitol. 79, 249-253

ELARD, L. (1997):

A simple PCR method for rapidly detecting defined point mutations.

[http://www.tto.trends.com/cgi-bin/tto/pr/pg_a...in/tto/pr/pg_srr.cgi?sid=search.21223#top]

ELARD, L., J. CABARET u. J. F. HUMBERT (1999):

PCR diagnosis of benzimidazole-susceptibility or –resistance in natural populations of the small ruminant parasite, *Teladorsagia circumcincta*.

Vet. Parasitol. 80, 231-237

ENOST, A. U. G. C. COLES (1990):

Effect of benzimidazole drugs on tubulin in benzimidazole resistant and susceptible strains of *Caenorhabditis elegans*.

Int. J. Parasitol. 20, 161-167

EVANS, A., M. U. R. J. MARTIN (1996):

Activation and cooperative multi-ion block of single nicotinic-acetylcholine channel currents of *Ascaris suum* muscle by the tetrahydropyrimidine anthelmintic, morantel.

Br. J. Pharmacol. 118, 1127-1140

EYSKER, M., J. JANSEN, R. WEMMENHOVE u. M. H. MIRCK (1983):

Alternate grazing of horses and sheep as control for gastro-intestinal helminthiasis in horses.

Vet. Parasitol. 13, 273-280

EYSKER, M. U. M. H. MIRCK (1986):

The distribution of inhibited early third stage Cyathostominae larvae in the large intestine of the horse.

Z. Parasitenkd. 72, 815-820

EYSKER, M., J. H. BOERSEMA u. F. N. J. KOOYMAN (1989):

Effect of repeated oxfendazole treatment on small strongyles infections in Shetland ponies.

Vet. Science 46, 409-412

EYSKER, M., J. H. BOERSEMA u. F. N. J. KOOYMAN (1991):

Effect of early season ivermectin and pyrantel treatments on strongylid infections in young shetland ponies in The Netherlands.

Vet. Parasitol. 38, 33-39

EYSKER, M., J. H. BOERSEMA, G. C. GRINWIS, F. N. KOOYMAN u. J. POOT (1997):

Controlled dose confirmation study of a 2 % moxidectin equine gel against equine internal parasites in The Netherlands.

Vet. Parasitol. 70, 165-173

FENG, X. P., J. HAYASHI, R. N. BEECH u. R. K. PRICHARD (2002):

Study of the nematode putative GABA type-A receptor subunits: evidence for modulation by ivermectin.

J. Neurochem. 83, 870-878

FERNANDEZ, A. S., M. LARSEN, P. NANSEN, J. GRONVOLD, S. A. HENRIKSEN u. J. WOLSTRUP (1997):

Effect of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* on the free-living stages of horse parasitic nematodes: a pilot study.

Vet. Parasitol. 73, 257-266

FLEMING, J. T., M. D. SQUIRE, T. M. BARNES, T. TORNOE, K. MATSUDA, J. AHNN, A. FIRE, J. E. SULSTON, E. A. BARNARD, D. B. SATTELLE u. J. A. LEWIS (1997):

Caenorhabditis elegans levamisole resistance genes lev-1, unc-29, and unc-38 encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits.

J. Neuroscience 17, 5843-5857

FOLZ, S. D., R. A. PAX, E. M. THOMAS, J. L. BENNETT, B. L. LEE u. G. A. CONDER (1978):

Detecting *in vitro* anthelmintic effects with a micromotility meter.

Vet. Parasitol. 24, 241-250

FRIEDMAN, P. A. U. E. G. PLATZER (1978):

Interaction of anthelmintic benzimidazoles and benzimidazole derivatives with bovine brain tubulin.

Biochim. Biophys. Acta 544, 605-614

FRIEDMAN, P. A. U. E. G. PLATZER (1980):

Interaction of anthelmintic benzimidazoles with *Ascaris suum* embryonic tubulin.

Biochem. Biophys. Acta 630, 271-278

FRITZ, L. C., C. C. WANG u. A. GORIO (1979):

Avermectin B1a irreversibly blocks postsynaptic potentials at the lobster neuromuscular junction by reducing muscle membrane resistance.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 76, 2062-2066

GATONGI, P. M., J. M. NJOROGE, M. E. SCOTT, S. RANJAN, J. M. GATHUMA, W. K. MUNYUA, H. CHERUIYOT u. R. K. PRICHARD (2002):

Susceptibility to IVM in a field strain of *Haemonchus contortus* subjected to four treatments in a closed sheep-goat flock in Kenya.

Vet. Parasitol. 2454, 1-6

GAWOR, J. J. (1995):

The prevalence and abundance of internal parasites in working horses autopsied in Poland.

Vet. Parasitol. 58, 99-108

GEARY, T. G., S. C. NULF, M. A. FAVREAU, L. TANG, R. K. PRICHARD, N. T.

HATZENBUHLER, M. H. SHEA, S. J. ALEXANDER u. R. D. KLEIN (1992):

Three beta-tubulin cDNAs from the parasitic nematode *Haemonchus contortus*.

Mol. Biochem. Parasitol. 50, 295-306

GEARY, T. G., S. M. SIMS, E. M. THOMAS, L. VANOVER, J. P. DAVIS, C. A.

WINTERROWE, R. D. KLEIN, N. F. HO u. P. THOMPSON (1992):

Haemonchus contortus: ivermectin-induced paralysis of the pharynx.

Exp. Parasitol. 77, 88-96

GEARY, T. G., S. C. NULF, S. J. ALEXANDER-BOWMAN, B. M. MAHMOUD, R. K.

PRICHARD u. R. D. KLEIN (1998):

Cloning and characterization of cDNAs encoding beta-tubulin from *Dirofilaria immitis* and *Onchocerca volvulus*.

J. Parasitol. 84, 356-360

GEARY, T. G., N. C. SANGSTER u. D. P. THOMPSON (1999):

Frontiers in anthelmintic pharmacology.

Vet. Parasitol. 84, 275-295

GEERTS, S., J. BRANDT, F. H. BORGSTEEDE u. H. VAN LOON (1989):

Reliability and reproducibility of the larval paralysis test as an *in vitro* method for the detection of anthelmintic resistance of nematodes against levamisole and morantel tartrate.

Vet. Parasitol. 30, 223-232

GEERTS, S. U. B. GRYSEELS (2000):

Drug resistance in human helminths: current situation and lessons from livestock.

Clin. Microbiol. Rev. 13, 207-222

GILL, J. H., J. M. REDWIN, J. A. VAN WYK u. E. LACEY (1995):

Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus*- effects of ivermectin resistance.

Int. J. Parasitol. 25, 463-470

GILL, J. H. U. E. LACEY (1998):

Avermectin/milbemycin resistance in trichostrongyloid nematodes.

Int. J. Parasitol. 28, 863-877

GIORDANO, D. J., J. P. TRITSCHLER u. G. C. COLES (1988):

Selection of ivermectin-resistant *Trichostrongylus colubriformis* in lambs.

Vet. Parasitol. 30, 139-148

GOTTSCHALL, D. W., V. J. THEODORIDES u. R. WANG (1990):

The metabolism of benzimidazole anthelmintics.

Parasitol. Today 6, 115-124

GUENETTE, S., R. K. PRICHARD, R. D. KLEIN u. G. MATLASHEWSKI (1991):

Characterization of a beta-tubulin gene and a beta-tubulin gene products of *Brugia pahangi*.

Mol. Biochem. Parasitol. 44, 153-164

GUENETTE, S., R. K. PRICHARD u. G. MATLASHEWSKI (1992):

Identification of a novel *Brugia pahangi* beta-tubulin gene (beta 2) and a 22-nucleotide spliced leader sequence on beta 1-tubulin mRNA.

Mol. Biochem. Parasitol. 50, 275-284

HARDER, A. U. G. VON SAMSON-HIMMELSTJERNA (2002):

Cyclooctadepsipeptides – a new class of anthelmintically active compounds.

Parasitol. Res. 88, 481-488

HARROW, I. D. U. K. A. F. GRATION (1985):

Mode of action of the anthelmintics morantel, pyrantel and levamisole in the muscle cell membrane of the nematode *Ascaris suum*.

Pesticide Science 16, 662-672

HEALY, M. J. R. (2001):

Estimating LD₅₀s without a Computer.

Parasitol. Today 4, 25-27

HEJMADI, M. V., S. JAGANNATHAN, N. S. DELANY, G. C. COLES u.

A. J. WOLSTENHOLME (2000):

L-Glutamate binding sites of parasitic nematodes: an association with ivermectin resistance?

Parasitology 120, 535-545

HELPS, C., N. REEVES, S. TASKER u. D. HARBOUR (2001):

Use of real-time quantitative PCR to detect *Chlamydia felis* infection.

J. Clin. Microbiol. 39, 2675-2676

HERD, R. P. (1986a):

Epidemiology and control of equine strongylosis at Newmarket.

Equine Vet. J. 18, 447-452

HERD, R. P. (1986b):

Parasite control in horses: Seasonal use of equine anthelmintics.

Mod. Vet. Pract. 67, 895-898

HERD, R. P. U. A. A. GABEL (1990):

Reduced efficacy of anthelmintics in young compared with adult horses.

Equine Vet. J. 22, 164-169

HERD, R. P. (1992):

Choosing the optimal equine anthelmintic.

Vet. Med. 87, 231-239

HERD, R. P. U. G. A. MAJEWSKI (1994):

Comparison of daily and monthly pyrantel treatment in yearling thoroughbreds and the protective effect of strategic medication of mares on their foals.

Vet. Parasitol. 55, 93-104

HERD, R. P. U. G. C. COLES (1995):

Slowing the spread of anthelmintic resistant nematodes of horses in the United Kingdom.

Vet. Rec. 136, 481-485

HODGKINSON, J. E., S. LOVE, J. R. LICHTENFELS, S. PALFREMA, Y. H. RAMSEY u. J. B. MATTHEWS (2001):

Evaluation of the specificity of five oligoprobes for identification of cyathostomin species from horses.

Int. J. Parasitol. 31, 197-204

HOEBEKE, J., G. VAN NIJEN u. M. DE BRABANDER (1976):

Interaction of nocodazol (R17934), a new antitumoral drug, with rat brain tubulin.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 324

HOEKSTRA, R., F. H. BORGSTEEDE, J. H. BOERSEMA u. M. H. ROOS (1997):

Selection for high levamisole resistance in *Haemonchus contortus* monitored with an egg-hatch assay.

Int. J. Parasitol. 27, 395-1400

HUBERT, J. U. D. KERBOEUF (1992):

A microlarval development assay for the detection of anthelmintic resistance in sheep nematodes.

Vet. Rec. 130, 442-446

HUNG, G.-C., N. B. CHILTON, I. BEVERIDGE, A. MCDONNELL, J. R. LICHTENFELS
u. R. B. GASSER (1997):

Molecular delineation of *Cylicocyclus nassatus* and *Cylicocyclus ashworthi* (Nematoda:
Strongylidae).

Int. J. Parasitol. 27, 601-605

HUNG, G.-C., N. B. CHILTON, I. BEVERIDGE u. R. B. GASSER (1999):

Secondary structure model for the ITS-2 precursor rRNA of strongyloid nematodes of equids:
implications for phylogenetic inference.

Int. J. Parasitol. 29, 1949-1964

HUNG, G.-C., N. B. CHILTON, I. BEVERIDGE u. R. B. GASSER (2000):

A molecular systematic framework for equine strongyles based on ribosomal DNA sequence
data.

Int. J. Parasitol. 30, 95-103

HUNT, K. R. U. M. A. TAYLOR (1989):

Use of the egg hatch assay on sheep faecal samples for the detection of benzimidazole
resistant nematodes.

Vet. Rec. 125, 153-154

IHLER, C. F. (1995):

A field survey on anthelmintic resistance in equine small strongyles in Norway.

Acta Vet. Scand. 36, 135-143

IHLER, C. F. U. H. BJORN (1996):

Use of two *in vitro* methods for the detection of benzimidazole resistance in equine small
strongyles (*Cyathostoma spp.*).

Vet. Parasitol. 65, 117-125

IRELAND, C. M., K. GULL, W. E. GUTTERIDGE u. C. I. POGSON (1979):

The interaction of benzimidazole carbamates with mammalian microtubule protein.

Biochem. Pharmacol. 28, 2680-2682

JAGANNATHAN, S., D. L. LAUGHTON, C. L. CRITTEN, T. M. SKINNER, L.

HOROSZOK u. A. J. WOLSTENHOLME (1999):

Ligand-gated chloride channel subunits encoded by the *Haemonchus contortus* and *Ascaris suum* orthologues of the *Caenorhabditis elegans* gbr-2 (avr-14) gene.

Mol. Biochem. Parasitol. 103, 129-140

JOHANSEN, M. V. (1989):

An evaluation of techniques used for the detection of anthelmintic resistance in nematode parasites of domestic livestock.

Vet. Res. Commun. 13, 455-466

JOHANSEN, M. V. U. P. J. WALLER (1989):

Comparison of three *in vitro* techniques to estimate benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* of sheep.

Vet. Parasitol. 34, 213-221

KACHI, S., A. ISHIIH u. M. TERADA (1995):

Effects of PF1022A on *Angiostrongylus cantonensis* in the pulmonary arteries and larvae migrating into the central nervous system of rats.

Parasitol. Res. 81, 631-637

KAPLAN, R. M. (2002):

Anthelmintic resistance in nematodes of horses.

Vet. Res. 33, 491-507

KELLY, J. D., J. H. WEBSTER, D. L. GRIFFIN, H. V. WHITLOCK, I. C. MARTIN u. M. GUNAWAN (1981):

Resistance to benzimidazole anthelmintics in equine strongyles. 1. Frequency, geographical distribution and relationship between occurrence, animal husbandry procedures and anthelmintic usage.

Aust. Vet. J. 57, 163-171

KERBOEUF, D., P. CHAMBRIER, Y. LE VERN u. J. AYCARDI (1999):

Flow cytometry analysis of drug transport mechanisms in *Haemonchus contortus* susceptible or resistant to anthelmintics.

Parasitol. Res. 85, 118-123

KING, A. I., S. LOVE u. J. L. DUNCAN (2001):

Field investigation of anthelmintic resistance of small strongyles in horses.

Vet. Rec. 127, 232-233

KLEI, T. R. U. M. R. CHAPMAN (1999):

Immunity in equine cyathostome infections.

Vet. Parasitol. 85, 123-136

KLEI, T. R., S. REHBEIN, M. VISSER, W. K. LANGHOLFF, M. R. CHAPMAN, D. D. FRENCH u. P. HANSON (2001):

Re-evaluation of ivermectin efficacy against equine gastrointestinal parasites.

Vet. Parasitol. 98, 315-320

KOTZE, A. C. (1998):

Effects of macrocyclic lactones on ingestion in susceptible and resistant *Haemonchus contortus* larvae.

J. Parasitology 84, 631-635

KÖHLER, P. u. R. BACHMANN (1981):

Intestinal tubulin as possible target for the chemotherapeutic action of mebendazole in parasitic nematodes.

Mol. Biochem. Parasitol. 4, 325-336

KÖHLER, P. (2001):

The biochemical basis of anthelmintic action and resistance.

Int. J. Parasitol 31, 336-345

KUTYAVIN, I. V., I. A. AFONINA, A. MILLS, V. V. GORN, E. A. LUKHTANOV, E. S. BELOUSOV, M. J. SINGER, D. K. WALBURGER, S. G. LOKHOV, A. A. GALL, R. DEMPCY, M. W. REED, R. B. MEYER u. J. HEDGPETH (2000):

3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures.

Nucleic Acids 28, 655-661

KWA, M. S., F. N. KOOYMAN, J. H. BOERSEMA u. M. H. ROOS (1993a):

Effect of selection for benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* on beta-tubulin isotype 1 and isotype 2 genes.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 191, 413-419

KWA, M. S., J. G. VEENSTRA u. M. H. ROOS (1993b):

Molecular characterisation of beta-tubulin genes present in benzimidazole-resistant populations of *Haemonchus contortus*.

Mol. Biochem. Parasitol. 60, 133-143

KWA, M. S., J. G. VEENSTRA u. M. H. ROOS (1993c):

Benzimidazole resistance in *H. Contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1.

Mol. Biochem. Parasitol. 63, 299-303

KWA, M. S., J. G. VEENSTRA, M. VAN DIJK u. M. H. ROOS (1995):

Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*.

J. Mol. Biol. 246, 500-510

LACEY, E. U. R. K. PRICHARD (1986):

Interactions of benzimidazoles (BZ) with tubulin from BZ-sensitive and BZ-resistant isolates of *Haemonchus contortus*.

Mol. Biochem. Parasitol. 19, 171-181

LACEY, E. U. K. L. SNOWDON (1988):

A routine diagnostic assay for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes using tritiated benzimidazole carbamates.

Vet. Parasitol. 27, 309-324

LACEY, E. (2000):

Mode of action of benzimidazoles.

Parasitol. Today 6, 112-115

LARSEN, M. (2000):

Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi.

Parasitology 120, S121-S131

LAUGHTON, D. L., G. G. LUNT u. A. J. WOLSTENHOLME (1997):

Reporter gene constructs suggest that the *Caenorhabditis elegans* avermectin receptor beta-subunit is expressed solely in the pharynx.

J. Exp. Biol. 200, 1509-1514

LAUGHTON, D. L., G. G. LUNT u. A. J. WOLSTENHOLME (1997):
Alternative splicing of a *Caenorhabditis elegans* gene produces two novel inhibitory amino acid receptor subunits with identical ligand binding domains but different ion channels.
Gene 201, 119-125

LE JAMBRE, L. F. (1976):
Egg hatch as an *in vitro* assay of thiabendazole resistance in nematodes.
Vet. Parasitol. 2, 385-391

LE JAMBRE, L. F., W. M. ROYAL u. P. J. MARTIN (1979):
The inheritance of thiabendazole resistance in *Haemonchus contortus*.
Parasitology 78, 107-119

LE JAMBRE, L. F. (1993):
Molecular variation in trichostrongylid nematodes from sheep and cattle.
Acta Trop. 53, 331-343

LE JAMBRE, L. F., J. H. GILL, I. J. LENANE u. P. BAKER (2000):
Inheritance of avermectin resistance in *Haemonchus contortus*.
Int. J. Parasitol. 30, 105-111

LENDAL, S., M. M. LARSEN, H. BJORN, J. CRAVEN, M. CHRIEL u. S. N. OLSEN (1998):
A questionnaire survey on nematode control practices on horse farms in Denmark and the existence of risk factors for the development of anthelmintic resistance.
Vet. Parasitol. 78, 49-63

LICHTENFELS, J. R., L. M. GIBBONS u. R. C. KRECEK (2002):
Recommended terminology and advances in the systematics of the *cyathostominae* (*nematoda: strongyloidea*) of horses.
Vet. Parasitol. 107, 337-342

LIPPERT, B. (1992):

Anthelminthika – Resistenz bei Pferdestrongyliden.

Wien. Tierärztl. Mschr. 79, 25

LOVE, S., Q. A. MCKELLAR u. J. L. DUNCAN (1989):

Benzimidazole resistance in a herd of horses.

Vet. Rec. 124, 560-561

LOZAN, J. L. u. H. KAUSCH (1988)

Probitanalyse.

In: J. L. LOZAN u. H. KAUSCH (Hrsg.): Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler.

2. Aufl. Verlag Parey, Berlin, Hamburg, S. 265-276

LUBEGA, G. W. U. R. K. PRICHARD (1991):

Specific interaction of benzimidazole anthelmintics with tubulin from developing stages of thiabendazole-susceptible and –resistant *Haemonchus contortus*.

Biochem. Pharmacol. 41, 93-101

LUBEGA, G. W., R. D. KLEIN, T. G. GEARY u. R. K. PRICHARD (1994):

Haemonchus contortus: the role of two beta-tubulin gene subfamilies in the resistance to benzimidazole anthelmintics.

Biochem. Pharmacol. 47, 1705-1715

LUMSDEN, G. G., R. QUAN-TAYLOR, S. M. SMITH u. I. M. WASHBROOKE (1989):

Field efficacy of ivermectin, fenbendazole and pyrantel embonate paste anthelmintics in horses.

Vet. Rec. 125, 499

LYONS, E. T., S. C. TOLLIVER, J. H. DRUDGE, S. STAMPER, T. W. SWERCZEK u. D. E. GRANSTROM (1996):

Critical test evaluation (1977-1992) of drug efficacy against endoparasites featuring benzimidazole-resistant small strongyles (population S) in Shetland ponies.

Vet. Parasitol. 66, 67-73

LYONS, E. T., S. C. TOLLIVER u. J. H. DRUDGE (1999):

Historical perspective of cyathostomes: prevalence, treatment and control programs.

Vet. Parasitol. 85, 97-112

LYONS, E. T., S. C. TOLLIVER, J. H. DRUDGE, S. S. COLLINS u. T. W. SWERCZEK (2001):

Continuance of studies on Population S benzimidazole-resistant small strongyles in a Shetland pony herd in Kentucky: effect of pyrantel pamoate (1992-1999).

Vet. Parasitol. 94, 247-256

MAINGI, N., M. E. SCOTT u. R. K. PRICHARD (1989):

Effect of selection pressure for thiabendazole resistance on fitness of *Haemonchus contortus* in sheep.

Parasitology, 100, 327-335

MAINGI, N., H. BJØRN, V. M. GICHOHI, W. K. MUNYUA u. J. M. GATHUMA (1998a):

Resistance to benzimidazoles and levamisole in nematode parasites of sheep in Nyandarua District of Kenya.

Acta Trop. 69, 31-40

MAINGI, N., H. BJØRN u. A. DANGOLLA (1998b):

The relationship between faecal egg count reduction and the lethal dose 50 % in the egg hatch assay and larval development assay.

Vet. Parasitol. 77, 133-145

MAIR, T. S. U. P. J. CRIPPS (1991):

Benzimidazole resistance in equine strongyles: association with clinical disease.

Vet. Rec. 128, 613-614

MARTIN-DOWNUM, K., T. YAZWINSKI, C. TUCKER, M. FINCHER, J. RALPH u.

J. HAMILTON (2001):

Cyathostome fecal egg count trends in horses treated with moxidectin, ivermectin or fenbendazole.

Vet. Parasitol. 101, 75-79

MARTIN, P. J. U. L. F. LE JAMBRE (1979):

Larval paralysis as an *in vitro* assay of levamisol and morantel tartrate resistance in *Ostertagia*.

Vet. Sci. Comm. 3, 159-164

MARTIN, P. J. (1982):

Electrophysiological effects of piperazine and diethylcarbamazine on *Ascaris suum* somatic muscle.

Br. J. Pharmacol. 77, 255-265

MARTIN, P. J., N. ANDERSON u. R. G. JARRETT (1989):

Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and *in vitro* assays.

Aust. Vet. J. 66, 236-240

MARTIN, R. J. (1996):

An electrophysiological preparation of *Ascaris suum* pharyngeal muscle reveals a glutamate-gated chloride channel sensitive to the avermectin analogue, milbemycin D.

Parasitology 112, 247-252

MARTIN, P. J., M. A. VALKANOV, V. M. DALE, A. P. ROBERTSON u. I. MURRAY (1996):

Electrophysiology of *Ascaris suum* and anti-nematodal drug action.

Parasitology 113, S137-S156

MARTIN, R. J. (1997):

Modes of action of anthelmintic drugs.

Vet. Journal 154, 11-34

MARTIN, R. J., A. P. ROBERTSON u. H. BJØRN (1997):

Target sites of anthelmintics.

Parasitology 114, S111-S124

MARTIN, R. J., I. I. MURRAY, A. P. ROBERTSON, H. BJØRN u. N. SANGSTER (1998):

Anthelmintics and ion-channels: after a puncture, use a patch.

Int. J. Parasitol. 28, 849-862

MARTIN, R. J. U. A. P. ROBERTSON (2000):

Electrophysiological investigation of anthelmintic resistance.

Parasitology 120, S87-S94

MCKENNA, P. B. (1990):

The detection of anthelmintic resistance by the faecal egg count reduction test: an examination of some of the factors affecting performance and interpretation.

N.Z. Vet. J. 38, 142-147

MEALEY, K. L., S. A. BENTJEN, J. M. GAY u. G. H. CANTOR (2001):

Ivermectin sensitivity in collies is associated with a deletion mutation of the *mdr1* gene.

Pharmacogenetics 11, 727-733

MELLIN, T. N., R. D. BUSCH u. C. C. WANG (1983):

Postsynaptic inhibition of invertebrate neuromuscular transmission by avermectin B1a.

Neuropharmacology 22, 89-96

MERINO, G., A. I. ALVAREZ, J. G. PRIETO u. R. B. KIM (2002):

The anthelmintic agent albendazole does not interact with p-glycoprotein.

Drug Metab. Dispos. 30, 365-369

MOLENTO, M. B., G. T. WANG u. R. K. PRICHARD (1999a):

Decreased ivermectin and moxidectin sensitivity in *Haemonchus contortus* selected with moxidectin over 14 generations.

Vet. Parasitol. 86, 77-81

MOLENTO, M. B. U. R. K. PRICHARD (1999b):

Effects of the multidrug-resistance-reversing agents verapamil and CL 347,099 on the efficacy of ivermectin or moxidectin against unselected and drug-selected strains of *Haemonchus contortus* in jirds (*Meriones unguiculatus*).

Parasitol. Res. 85, 1007-1011

MONAHAN, C. M., M. R. CHAPMAN, H. W. TAYLOR, D. D. FRENCH u. T. R. KLEI (1996):

Comparison of moxidectin oral gel and ivermectin oral paste against a spectrum of internal parasites of ponies with special attention to encysted cyathostome larvae.

Vet. Parasitol. 63, 225-235

MONAHAN, C. M., M. R. CHAPMAN, H. W. TAYLOR, D. D. FRENCH u. T. R. KLEI (1997):

Foals raised on pasture with or without daily pyrantel tartrate feed additive: comparison of parasite burdens and host responses following experimental challenge with large and small strongyle larvae.

Vet. Parasitol. 73, 277-289

MONAHAN, C. M., M. R. CHAPMAN, H. W. TAYLOR, D. D. FRENCH u. T. R. KLEI (1998):

Experimental cyathostome challenge of ponies maintained with or without benefit of daily pyrantel tartrate feed additive: comparison of parasite burdens, immunity and colonic pathology.

Vet. Parasitol. 74, 229-241

NARE, B., Z. LIU, R. K. PRICHARD u. E. GEORGES (1994):

Benzimidazoles, potent anti-mitotic drugs: substrates for the P-glycoprotein transporter in multidrug-resistant cells.

Biochem. Pharmacol. 48, 2215-2222

NILSSON, O., A. LINDHOLM u. D. CHRISTENSSON (1990):

A field evaluation of anthelmintics in horses in Sweden.

Vet. Parasitol. 32, 163-171

O'BRIEN, D. J. U. V. GERAGHTY (1990):

Possible benzimidazole resistance in horses in Ireland.

Ir. Vet. J. 43, 104-107

OGBOURNE, C. P. (1976):

The prevalence, relative abundance and site distribution of nematodes of the subfamily *Cyathostominae* in horses killed in Britain.

J. Helminthol. 50, 203-214

OSTERMAND-LIND, E., J. HÖGLUND, B.-J. LJUNGSTRÖM, O. NILSSON u.

A. UGGLA (1999):

A field survey on the distribution of strongyle infections of horses in Sweden and factors affecting faecal egg counts.

Equine Vet. J. 31, 68-72

OSTLIND, D. A., W. G. MICKLE, D. V. EWANCIV, F. J. ANDRIULI, W. C. CAMPBELL, S. HERNANDEZ, S. MOCHALES u. E. MUNGUIRA (1990):

Efficacy of paraherquamide against immature *Trichostrongylus colubriformis* in the gerbil (*Meriones unguiculatus*).

Res. Vet. Sci. 48, 260-261

PAIEMENT, J. P., C. LEGER, P. RIBEIRO u. R. K. PRICHARD (1999):

Haemonchus contortus: effects of glutamate, ivermectin, and moxidectin on inulin uptake activity in unselected and ivermectin-selected adults.

Exp. Parasitol. 92, 193-198

PAPE, M., G. Von SAMSON-HIMMELSTJERNA u. T. SCHNIEDER (1999):

Characterisation of the beta-tubulin gene of *Cylicocyclus nassatus*.

Int. J. Parasitol. 29, 1941-1947

PAPE, M. (2001):

Molekulare Untersuchungen zur Benzimidazolresistenz bei den kleinen Strongyliden der Pferde.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Ph. D. These

PAPE, M., T. SCHNIEDER u. G. Von SAMSON-HIMMELSTJERNA (2002):

Investigation of diversity and isotypes of the beta-tubulin cDNA in several small strongyle (*Cyathostominae*) species.

J. Parasitol. 88, 673-677

PEREIRA, M. C., I. KOHEK JUNIOR, R. CAMPOS, S. B. LIMA u. R. P. FOZ (1991):

A field evaluation of anthelmintics for control of cyathostomes of horses in Brazil.

Vet. Parasitol. 38, 121-129

PFÜLLER, H. (1990):

In vitro- und *in vivo*-Untersuchungen zur Anthelminthikaresistenz bei Nematoden-Infektionen von Schaf und Pferd.

Berlin, Humboldt-Univ., Diss.

PICHÉ, C. A., J. M. KENNEDY u. S. BAUCK (1989):

Benzimidazole resistance in horses in western Canada.

Can. Vet.J. 30, 173-174

PINNOCK, R. D., D. B. SATTELLE, K. A. GRATION u. I. D. HARROW (1988):

Actions of potent cholinergic anthelmintics (morantel, pyrantel and levamisole) on an identified insect neurone reveal pharmacological differences between nematode and insect acetylcholine receptors.

Neuropharmacology 27, 843-848

POOK, J. F., M. POWER, N. C. SANGSTER, J. L. HODGSON u. D. R. HODGSON (2002):

Evaluation of tests for anthelmintic resistance in cyathostomes.

Vet. Parasitol. 106, 331-343

PRICHARD, R. K., C. A. HALL, J. D. KELLY, I. C. A. MARTIN u. A. D. DONALD

(1980):

The problem of anthelmintic resistance in nematodes.

Aust. Vet. J. 56, 239-251

REINEMEYER, C. R (1986):

Small strongyles: recent advances.

Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 2, 281-312

REPETA, D. L., N. BIRNBAU u. C. H. COURTNEY (1993):

Anthelmintic resistance on pleasure horse farms in North Central Florida.

Equine Pract. 15, 8-12

RIBBEK, R., G. F. SCHUSSER u. W. HAUPT (1997):

Zum Vorkommen der larvalen Cyathostominose beim Pferd.

Tierärztl. Umschau 52, 254-263

ROBERTSON, S. J. U. R. J. MARTIN (1993):

Levamisole-activated single-channel currents from muscle of the nematode parasite *Ascaris suum*.

Br. J. Pharmacol. 108, 170-178

ROBERTSON, A. P., H. E. BJØRN u. R. J. MARTIN (1999):

Resistance to levamisole resolved at the single-channel level.

FASEB J. 13, 749-760

ROBERTSON, A. P., H. E. BJØRN u. R. J. MARTIN (2000):

Pyrantel resistance alters nicotinic acetylcholine receptor single-channel properties.

Eur. J. Pharmacol. 394, 1-8

ROHRER, S. P., E. T. BIRZIN, C. H. EARY, J. M. SCHAEFFER u. W. L. SHOOP (1990):

Ivermectin binding sites in sensitive and resistant *Haemonchus contortus*.

J. Parasitol. 80, 493-497

ROOS, M. H. (1990):

The molecular nature of benzimidazole resistance in helminths.

Parasitol. Today 6, 125-127

ROOS, M. H., J. H. BOERSEMA, F. H. BORGS TEDE, J. CORNELISSEN, M. TAYLOR

u. E. J. RUITENBERG (1990):

Molecular analysis of selection for benzimidazole resistance in the sheep parasite

Haemonchus contortus.

Mol. Biochem. Parasitol. 43, 77-88

ROOS, M. H., M. S. G. KWA u. W. N. GRANT (1995):

New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematodes.

Parasitol. Today 11, 148-150

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Von, A. HARDER, T. SCHNIEDER, J. KALBE u. N. MENCKE (2000):

In vivo activities of the new anthelmintic depsipeptide PF 1022A.

Parasitol. Res. 86, 194-199

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Von, M. PAPE, C. Von WITZENDORFF u. T. SCHNIEDER (2002a):

Allele-specific PCR for the beta-tubulin codon 200 TTC/TAC polymorphism using single adult and larval small strongyle (*Cyathostominae*) stages.

J. Parasitol. 88, 254-257

SAMSON-HIMMELSTJERNA, G. Von, A. HARDER u. T. SCHNIEDER (2002b):

Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites.

Int. J. Parasitol. 32, 1529-1535

SANGSTER, N. C., R. K. PRICHARD u. E. LACEY (1985):

Tubulin and benzimidazole-resistance in *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda).

J. Parasitol. 71, 645-651

SANGSTER, N. C., F. L. RILEY u. L. J. WILEY (1998):

Binding of [³H]m-aminolevamisole to receptors in levamisole-susceptible and -resistant *Haemonchus contortus*.

Int. J. Parasitol. 28, 707-717

SANGSTER, N. C. U. J. GILL (1999):

Pharmacology of anthelmintic resistance.

Parasitol. Today 15, 141-146

SANGSTER, N. C. (1999a)

Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectins/milbemycins?

Vet. Parasitol. 85, 189-204

SANGSTER, N. C. (1999b):

Anthelmintic resistance: past, present and future.

Int. J. Parasitol. 29, 115-124

SANGSTER, N. C., S. C. BANNAN, A. S. WEISS, S. C. NULF, R. D. KLEIN u.

T. G. GEARY (1999):

Haemonchus contortus: sequence heterogeneity of internucleotide binding domains from p-glycoproteins.

Exp. Parasitol. 91, 250-207

SANGSTER, N. C. (2001):

Managing parasiticide resistance.

Vet. Parasitol. 98, 89-109

SCHOLTYSIK, G. U. S. STEUBER (2002):

Antiparasitäre Chemotherapie.

In: H.-H. FREY u. W. LÖSCHER (Hrsg.): Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie der Haustiere.

2. Aufl. Verlag Ferdinand Enke, Stuttgart, S. 401-455

SCHUMANN, K. (2001):

Strategische Parasitenbekämpfung gegen Wurminfektionen beim Pferd mit makrozyklischen Laktonen.

Berlin, Freie Univ., Fachber. Veterinärmed., Diss.

SHERIFF, J. C., A. C. KOTZE, D. R. HENNESSY u. N. C. SANGSTER (2001):

Is inhibition of feeding by macrocyclic lactones a part of their action *in vivo*?

in: 18. International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Stresa 2001, Kongr.ber., S. 147

SHERIFF, J. C., A. C. KOTZE, N. C. SANGSTER u. R. J. MARTIN (2002):

Effects of macrocyclic lactone anthelmintics on feeding and pharyngeal pumping in *Trichostrongylus colubriformis in vitro*.

Parasitology 125, 477-484

SHOOP, W. L., J. R. EGERTON, C. H. EARY u. D. SUHAYDA (1990):

Anthelmintic activity of paraherquamide in sheep.

J. Parasitol. 76, 349-351

SHOOP, W. L., C. H. EARY, B. F. MICHAEL, H. W. HAINES u. R. L. SEWARD (1991):

Anthelmintic activity of paraherquamide in dogs.

Vet. Parasitol. 40, 339-341

SHOOP, W. L., B. F. MICHAEL, H. W. HAINES u. C. H. EARY (1992a):

Anthelmintic activity of paraherquamide in calves.

Vet. Parasitol. 43, 259-263

SHOOP, W. L., H. W. HAINES, C. H. EARY u. B. F. MICHAEL (1992b):

Acute toxicity of paraherquamid and its potential as an anthelmintic.

Am. J. Vet. Res. 53, 2032-2034

SHOOP, W. L. (1993):

Ivermectin resistance.

Parasitol. Today 9, 154-159

SHOOP, W. L., H. MROZIK u. M. H. FISHER (1995):

Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health.

Vet. Parasitol. 52, 139-156

SILVESTRE, A. U. J. F. HUMBERT (2000):

A molecular tool for species identification and benzimidazole resistance diagnosis in larval communities of small ruminant parasites.

Exp. Parasitol. 95, 271-276

SLOCOMBE, J. O. D. U. J. F. COTE (1977):

Small strongyles of horses with cross resistance to benzimidazole anthelmintics and susceptibility to unrelated compounds.

Can. Vet. J. 18, 212-217

SLOCOMBE, J. O. D., J. F. COTE u. I. MCMILLAN (1989):

Effectiveness of oxibendazole against benzimidazole-resistant strongyles in horses.

Can. Vet. J. 30, 663-665

SULLIVAN, K. F. (1988):

Structure and utilization of tubulin isotypes.

Annu. Rev. Cell Biol. 4, 687-716

SUTHERLAND, I. A., D. L. LEE u. D. LEWIS (1988):

Detection of benzimidazole resistance in trichostrongylid nematodes.

Parasitol. Today 4, 22-24

SUTHERLAND, I. A., D. L. LEE u. D. LEWIS (1989):

Colorimetric assay for the detection of benzimidazole resistance in trichostrongyles.

Res. Vet. Sci. 46, 363-366

SUTHERLAND, I. A. U. D. L. LEE (1990):

A larval paralysis assay for the detection of thiabendazole resistance in trichostrongyles.

Parasitology 100, 131-135

SUTHERLAND, I. A. U. D. L. LEE (1993):

Acetylcholinesterase in infective-stage larvae of *Haemonchus contortus*, *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* resistant and susceptible to benzimidazole anthelmintics.

Parasitology 107, 553-557

SUTHERLAND, I. A., A. E. BROWN u. D. M. LEATHWICK (2000):

Selection for drug-resistant nematodes during and following extended exposure to anthelmintic.

Parasitology 121, 217-226

TOLLIVER, S. C., E. T. LYONS u. J. H. DRUDGE (1987):

Prevalence of internal parasites in horses in critical tests of activity of parasiticides over a 28-year period (1956-1983) in Kentucky.

Vet. Parasitol. 23, 273-284

TOLLIVER, S. C., E. T. LYONS, J. H. DRUDGE, S. STAMPER u. D. E. GRANSTROM (1993):

Critical tests of thiabendazole, oxbendazole, and oxfendazole for drug resistance of population-B equine small strongyles (1989 and 1990).

Am. J. Vet. Res. 54, 908-913

TURNER, M. J. U. J. M. SCHAEFFLER (1999):

Mode of action of ivermectin.

In: W. C. CAMBELL (Hrsg.): Ivermectin and abamectin.

Verlag Springer, New York, S. 73-88

TYAGI, S. U. F. R. KRAMER (1996):

Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization.

Nat. Biotechnol. 14, 303-308

TYRRELL, K. L., R. J. DOBSON, P. A. STEIN u. S. W. WALKDEN-BROWN (2002):

The effects of ivermectin and moxidectin on egg viability and larval development of ivermectin-resistant *Haemonchus contortus*.

Vet. Parasitol. 107, 85-93

ULLRICH, D., C. BAUER u. H.-J. BÜRGER (1988):

Benzimidazoleresistenz bei kleinen Strongyliden (*Cyathostominae*): Verbreitung in Pferdebeständen Nordrhein-Westfalens.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 101, 406-408

ULLRICH, D. (1987):

Verbreitung benzimidazol-resistenter Strongyliden in Nordrhein-Westfalen.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diss.

UNGEMACH, F. R. (2002):

Antiparasitika.

In: W. LÖSCHER, F. R. UNGEMACH u. R. KROKER (Hrsg.): Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren.

5. Aufl. Verlag Parey, Berlin, S. 245-289

VALDEZ, R. A., J. A. DIEPIETRO, A. J. PAUL, T. F. LOCK, L. L. HUNGERFORD u. K. S. TODD (1995):
Controlled efficacy study of the bioequivalence of Strongid C and generic pyrantel tartrat in horses.
Vet. Parasitol. 60, 83-102

VARADY, M. U. J. CORBA (1999):
Comparison of six *in vitro* tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep.
Vet. Parasitol. 80, 239-249

VARADY, M., A. KONIGOVA u. J. CORBA (2000):
Benzimidazole resistance in equine cyathostomes in slovakia.
Vet. Parasitol. 94, 67-74

VASSILATIS, D. K., J. P. ARENA, R. H. PLASTERK, H. A. WILKINSON, J. M. SCHAEFFER, D. F. CULLY u. L. H. VAN DER PLOEG (1997):
Genetic and biochemical evidence for a novel avermectin-sensitive chloride channel in *Caenorhabditis elegans*. Isolation and characterization.
J. Biol. Chem. 272, 33167-33174

WALLER, P. J. (1997):
Anthelmintic resistance.
Vet. Parasitol. 72, 391-405

WHITLOCK, H. V., J. D. KELLY, C. J. PORTER, D. L. GRIFFIN u. I. C. A. MARTIN (1980):
In vitro field screening for anthelmintic resistance in strongyles of sheep and horses.
Vet. Parasitol. 7, 215-232

WIESNER, E. u. R. RIBBECK (1991):

Wörterbuch der Veterinärmedizin.

Verlag Gustav Fischer, Stuttgart

WILEY, L. J., A. S. WEISS, N. C. SANGSTER u. Q. LI (1996):

Cloning and sequence analysis of the candidate nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit gene tar-1 from *Trichostrongylus colubriformis*.

Gene 182, 97-100

WITZENDORFF, C. von (2001):

Untersuchungen zur Benzimidazolresistenz bei kleinen Strongyliden der Pferde in Chile.

Hannover, Tierärztl. Hochsch., Diplomarbeit

XU, M., M. MOLENTO, W. BLACKHALL, P. RIBEIRO, R. BEECH u. R. PRICHARD

(1998):

Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of p-glycoprotein homolog.

Mol. Biochem. Parasitol. 91, 327-339

YOUNG, K. E., V. GARZA, K. SNOWDEN, R. J. DOBSON, D. POWELL u. T. M. CRAIG

(1999):

Parasite diversity and anthelmintic resistance in two herds of horses.

Vet. Parasitol. 85, 205-214

YOUNG, K. E., J. M. JENSEN u. T. M. CRAIG (2000):

Evaluation of anthelmintic activity in captive wild ruminants by fecal egg reduction tests and a larval development assay.

J. Zoo Wildl. Med. 31, 348-352

ZARLENGA, D. S., L. C. GASBARRE, P. C. BOYD, E. LEIGHTON u.

J. R. LICHTENFELS (1998):

Identification and semi-quantitation of *Ostertagia ostertagi* eggs by enzymatic amplification of ITS-1 sequences.

Vet. Parasitol. 77, 245-257

ZARLENGA, D. S., M. B. CHUTE, L. C. GASBARRE u. P. C. BOYD (2001):

A multiplex PCR assay for differentiating economically important gastrointestinal nematodes in cattle.

Vet. Parasitol. 97, 199-209

ZARLENGA, D. S. U. J. HIGGINS (2001):

PCR as a diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology.

Vet. Parasitol. 101, 215-230

ZEEUW, G. (1997):

Vergleichenden Untersuchungen über Effekt und Wirkungsdauer von Moxidectin, Ivermectin und Pyrantelmonat beim Pferd unter Gestütsbedingungen.

München, Univ., Veterinärmed. Fak. Diss.

8 Anhang

Probe Nr.	EpG _v	EpG _n	EZR	Probe Nr.	EpG _v	EpG _n	EZR
1/a	550	100	81,82	6/a	400	50	87,50
1/b	300	450	0,00	6/b	1100	300	72,73
1/c	800	600	25,00	6/c	1550	150	90,32
1/d	700	750	0,00	6/d	1500	200	86,67
1/e	1800	550	69,44	6/e	800	50	93,75
1/f	800	300	62,50	6/f	1900	600	68,42
1/g	2050	250	87,80	6/g	650	100	84,62
2/a	700	50	92,86	6/h	250	0	100,00
2/b	450	50	88,89	7/b	1200	0	100,00
2/c	300	0	100,00	7/c	450	200	55,56
2/d	350	0	100,00	7/d	400	400	0,00
2/e	650	200	69,23	7/e	1000	100	90,00
3/a	600	150	75,00	7/f	350	50	85,71
3/b	600	0	100,00	8/a	1000	0	100,00
3/c	900	0	100,00	8/b	800	0	100,00
3/d	1450	250	82,76	8/c	50	50	0,00
3/e	1250	300	76,00	8/d	1500	0	100,00
4/a	2500	50	98,00	8/e	300	0	100,00
4/b	950	50	94,74	9/a	1500	400	73,33
4/c	2300	50	97,83	9/b	500	100	80,00
4/d	600	0	100,00	9/c	350	50	85,71
4/e	2950	100	96,61	9/d	350	200	42,86
4/f	450	150	66,67	9/e	600	50	91,67
4/g	750	50	93,33	9/f	200	50	75,00
4/h	1100	0	100,00	10/a	200	50	75,00
4/i	900	50	94,44	10/b	300	50	83,33
5/a	1300	100	92,31	10/c	3950	1400	64,56
5/b	350	150	57,14	10/d	950	200	78,95
5/c	850	50	94,12	10/e	150	0	100,00
5/d	300	50	83,33				
5/e	650	50	92,31				

Tabelle 25: Ergebnisse des EZRT mit FBZ. EpG_vB=EpG vor der Behandlung; EpG_nB=EpG nach der Behandlung; EZR%=Eizahlreduktion in % (n=60).

Parallel- ansatz	Larvenschlupfhemmung (%)				
	Wiederholungen				
	1	2	3	4	5
1	4	6	3	4	10
2	4	7	5	9	12
1	3	2	2	0	2
2	1	3	1	1	5
1	9	10	7	7	11
2	8	8	9	4	10
1	34	34	36	32	32
2	58	38	38	34	25
1	70	68	64	66	61
2	64	67	64	69	53
1	80	85	82	82	79
2	83	83	84	85	77
1	90	94	96	96	92
2	92	97	94	99	94
1	97	99	98	100	99
2	97	100	98	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100
1	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	100

Tabelle 26: Ergebnisse des Vorversuch I mit der Population P.

Parallel- ansatz	Larvenschlupfhemmung (%) Wiederholungen				
	1	2	3	4	5
1	10	1	5	20	6
2	6	8	3	18	3
1	0	4	1	4	2
2	2	4	0	1	0
1	2	9	4	6	4
2	3	8	4	10	3
1	6	12	5	13	7
2	9	9	9	10	10
1	6	17	15	15	13
2	11	14	13	21	11
1	13	20	21	25	16
2	19	20	21	23	16
1	21	25	24	25	23
2	20	24	29	28	24
1	22	31	28	33	30
2	28	29	33	38	30
1	28	37	34	38	36
2	37	33	36	41	37
1	33	41	42	49	45
2	43	41	47	48	38
1	56	64	59	64	61
2	60	57	57	70	56

Tabelle 27: Ergebnisse des Vorversuch I mit der Population L.

Parallel- ansatz	Larvenschlupfhemmung (%) Wiederholungen				
	1	2	3	4	5
1	5	5	40	5	50
2	3	5	38	10	46
1	19	11	8	36	6
2	20	12	16	34	13
1	43	29	50	39	40
2	40	32	45	43	37
1	78	64	83	74	74
2	78	62	79	74	74
1	96	87	93	87	88
2	93	84	92	82	83
1	99	99	98	99	100
2	98	99	100	98	96

Tabelle 28: Ergebnisse des Vorversuch II mit der Population L.

Parallel- ansatz	Larvenschlupfhemmung (%) Wiederholungen				
	1	2	3	4	5
1	5	17	11	15	14
2	10	15	10	17	13
1	4	0	4	4	2
2	2	5	2	4	2
1	12	5	11	6	8
2	10	8	9	5	7
1	16	48	22	12	19
2	17	35	21	18	21
1	59	58	56	49	56
2	61	52	50	57	61
1	89	86	87	91	74
2	90	94	88	86	84

Tabelle 29: Ergebnisse des Vorversuch II mit der Population M.

Konzentration $\mu\text{g PYR/ml}$	embryonierte Eier	nicht- embryonierte Eier	Larven
0	40,5 (4,2)	11,3 (2,4)	48,1 (3,1)
0,15	11,8 (1,7)	48,7 (4,0)	39,5 (2,7)
0,5	8,3 (3,2)	59,3 (3,2)	32,3 (3,6)
1,5	9,3 (3,6)	77,2 (3,9)	13,5 (4,5)
15	10,7 (4,3)	86,8 (4,5)	2,5 (1,0)
25	15,3 (3,4)	84,5 (3,7)	0,17 (0,4)

Tabelle 30: Anteil von embryonierten, nichtembryonierten Eiern und Larven beim LSHT mit PYR. Bei Population L.

Konzentration $\mu\text{g PYR/ml}$ TBZ	embryonierte Eier	nicht- embryonierte Eier	Larven
0	4,5 (3,8)	1,0 (0,9)	94,5 (3,3)
0,1	24,2 (4,9)	4,0 (2,7)	71,8 (2,3)
0,15	25,3 (4,6)	7,3 (3,5)	67,3 (2,0)
0,2	32,3 (3,3)	5,5 (2,6)	62,2 (1,9)
0,25	36,8 (4,2)	7,8 (3,8)	55,3 (3,2)
0,3	56,0 (5,4)	4,8 (3,9)	39,2 (2,0)

Tabelle 31: Anteil von embryonierten, nichtembryonierten Eiern und Larven beim LSHT mit TBZ bei Stamm L.

Parallel- ansatz	Larvenparalyse (%) Wiederholungen				
	1	2	3	4	5
1	22	26	37	15	24
2	35	38	32	15	38
1	22	14	11	6	16
2	14	18	15	6	19
1	29	28	21	7	33
2	25	29	26	7	34
1	73	65	78	72	64
2	80	74	75	72	68
1	97	95	98	94	93
2	98	94	97	94	92
1	100	100	100	98	100
2	100	100	100	100	100

Tabelle 32: Ergebnisse des Vorversuch III mit der Population M.

Parallel- ansatz	Larvenparalyse % Wiederholungen				
	1	2	3	4	5
1	27	23	30	15	24
2	22	42	12	10	56
1	29	10	13	6	8
2	8	12	8	11	7
1	38	21	20	12	17
2	17	22	19	12	20
1	88	87	67	72	64
2	65	72	70	72	75
1	97	91	99	94	93
2	97	93	98	94	98
1	100	99	100	98	100
2	100	100	100	100	100

Tabelle 33: Ergebnisse des Vorversuch III mit der Population L.

Probe Nr.	µg TBZ/ml			Probe Nr.	µg TBZ/ml		
	LD ₅₀	LD ₉₆	LD ₉₉		LD ₅₀	LD ₉₆	LD ₉₉
1/a	0,16	0,28	0,32	6/a	0,17	0,43	0,51
1/b	0,19	0,39	0,45	6/b	0,07	0,37	0,47
1/c	0,15	0,27	0,31	6/c	0,12	0,38	0,46
1/d	0,14	0,28	0,33	6/d	0,09	0,33	0,41
1/e	0,18	0,32	0,37	6/e	0,12	0,41	0,50
1/f	0,25	0,49	0,57	6/f	0,08	0,41	0,55
1/g	0,25	0,46	0,54	6/g	0,12	0,36	0,44
2/a	0,19	0,35	0,41	6/h	0,09	0,38	0,47
2/b	0,19	0,37	0,44	7/a	0,10	0,32	0,25
2/c	0,25	0,49	0,57	7/b	0,12	0,35	0,37
2/d	0,18	0,38	0,45	7/c	0,14	0,26	0,41
2/e	0,03	0,30	0,39	7/d	0,12	0,31	0,39
3/a	0,15	0,40	0,48	7/e	0,12	0,34	0,39
3/b	0,10	0,27	0,33	7/f	0,17	0,32	0,41
3/c	0,04	0,28	0,35	8/a	0,15	0,28	0,32
3/d	0,13	0,41	0,50	8/b	0,22	0,39	0,45
3/e	0,18	0,34	0,39	8/c	0,13	0,24	0,28
4/a	0,10	0,30	0,36	8/d	0,05	0,29	0,37
4/b	0,04	0,23	0,29	8/e	0,17	0,43	0,51
4/c	0,05	0,29	0,37	9/a	0,18	0,31	0,36
4/d	0,11	0,42	0,51	9/b	0,16	0,39	0,46
4/e	0,11	0,29	0,35	9/c	0,14	0,26	0,30
4/f	0,11	0,33	0,40	9/d	0,12	0,20	0,22
4/g	0,09	0,26	0,32	9/e	0,10	0,15	0,16
4/h	0,02	0,22	0,28	9/f	0,25	0,63	0,75
4/i	0,13	0,29	0,35	10/a	0,18	0,31	0,36
5/a	0,26	0,48	0,55	10/b	0,17	0,39	0,46
5/b	0,17	0,39	0,46	10/c	0,14	0,26	0,30
5/c	0,26	0,50	0,58	10/d	0,12	0,20	0,22
5/d	0,13	0,36	0,43	10/e	0,10	0,15	0,16
5/e	0,22	0,43	0,50				

Tabelle 34: Ergebnisse des Versuch I: L₅₀-, LD₉₆- und LD₉₉-Werte aus den LSHT für TBZ für die Probennahme aus dem Jahr 2000 (n=61)

Probe Nr.	µg TBZ/ml			µg PYR/ml		µg IVM/ml	
	LD ₅₀	LD ₉₆	LD ₉₉	LD ₅₀	LD ₉₉	LD ₅₀	LD ₉₉
I/a	0,08	0,19	0,22	0,86	14,88	0,59	2,89
I/b	0,21	0,29	0,32	15,31	49,11	0,16	0,46
I/c	0,13	0,21	0,24	n.d.	13,9	0,64	2,94
I/d	0,18	0,35	0,41	3,77	15,77	0,57	2,89
I/e	0,16	0,29	0,33	11,71	31,23	0,95	3,04
I/f	0,14	0,32	0,38	5,07	17,44	0,73	2,98
I/g	0,16	0,32	0,38	5,7	23,35	0,73	2,99
II/a	0,14	0,26	0,3	27,6	44,21	1,08	3,03
II/b	0,19	0,28	0,31	31,53	50,4	n.d.	n.d.
II/c	0,21	0,39	0,48	28,3	44,96	1,15	3,04
II/d	0,09	0,2	0,24	28,05	46,26	1,07	3,01
II/e	0,11	0,19	0,22	26,28	42,24	0,75	2,9
II/f	0,13	0,26	0,3	27,81	45,88	0,76	2,9
II/g	0,14	0,27	0,31	29,95	52,31	n.d.	n.d.
II/h	0,14	0,27	0,32	31,14	75,98	n.d.	n.d.
II/I	0,14	0,28	0,28	30,15	63,81	0,98	3,03
II/j	0,12	0,28	0,24	32,34	90,35	n.d.	n.d.
III/a	0,12	0,2	0,17	23,81	41,8	2,31	5,56
III/b	0,14	0,26	0,22	25,46	41,64	n.d.	n.d.
III/c	0,1	0,15	0,13	25,04	64,32	1,87	3,99
III/d	0,25	0,63	0,62	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
III/e	0,18	0,31	0,23	27,38	43,84	1,2	3,77
III/f	0,16	0,39	0,3	25,55	43,69	1,11	3,01
IV/a	0,08	0,35	0,44	31,08	67	0,63	3,92
IV/b	0,22	0,36	0,41	43,53	97,81	0,3	2,72
IV/c	0,15	0,24	0,27	8,97	55,04	0,44	2,8
IV/d	0,09	0,3	0,36	12,71	44,37	n.d.	n.d.
IV/e	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	45,4	0,77	2,92
IV/f	0,23	0,41	0,47	27,1	58,94	0,41	2,8
IV/g	0,21	0,35	0,4	25,94	50,12	1,09	3,01

Tabelle 35: Ergebnisse des Versuchs I, II und III: LD₅₀-, LD₉₆- und LD₉₉-Werte aus den LSHT mit TBZ; LD₅₀- und LD₉₉-Werte für den LSHT mit PYR; LD₅₀- und LD₉₉-Werte aus dem LPT mit IVM für die Proben aus dem Jahr 2001 (n=78); (n.d.:kein Ergebnis).

Probe Nr.	µg TBZ/ml			µg PYR/ml		µg IVM/ml	
	LD ₅₀	LD ₉₆	LD ₉₉	LD ₅₀	LD ₉₉	LD ₅₀	LD ₉₉
V/a	0,04	0,1	0,13	4,35	15,51	0,59	2,91
V/b	0,13	0,24	0,28	11,31	40,83	0,45	2,82
V/c	0,05	0,16	0,2	6,02	34,07	0,88	3,97
V/d	0,03	0,09	0,11	n.d.	n.d.	0,89	2,99
V/e	0,1	0,23	0,28	14,14	39,2	0,88	4,12
V/f	0,08	0,17	0,19	n.d.	n.d.	0,76	2,94
V/g	0,12	0,23	0,26	10,01	28,97	0,84	2,98
V/h	0,09	0,19	0,22	10,53	36,36	0,88	2,99
VI/a	0,09	0,22	0,26	11,84	43,76	2,2	4,2
VI/b	0,17	0,27	0,3	23,54	44,64	0,96	3,09
VI/c	0,07	0,19	0,23	20,14	53,37	1,47	4,28
VI/d	0,1	0,31	0,38	11,91	36,77	0,53	3,76
VI/e	0,15	0,3	0,35	25,38	51,98	1,31	3,11
VI/f	0,05	0,11	0,14	12,75	51,98	n.d.	n.d.
VI/g	0,12	0,24	0,28	15,46	35,64	n.d.	n.d.
VI/h	0,15	0,38	0,45	14,51	47,7	n.d.	n.d.
VII/a	0,14	0,29	0,34	n.d.	n.d.	1,33	3,14
VII/b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,71	2,9
VII/c	0,14	0,28	0,32	n.d.	n.d.	1,54	3,88
VII/d	0,15	0,32	0,38	n.d.	n.d.	1,33	3,52
VII/e	0,15	0,27	0,3	n.d.	n.d.	0,35	2,5
VII/f	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,22	3,08
VII/g	0,17	0,23	0,25	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VIII/a	0,18	0,29	0,34	15,45	44,55	0,43	3,91
VIII/b	0,16	0,31	0,37	9	38,06	n.d.	3,69
VIII/c	0,14	0,26	0,28	9,74	28,17	0,43	4,13
VIII/d	0,12	0,19	0,22	13,31	33,31	n.d.	n.d.
VIII/e	0,1	0,15	0,16	11,87	31,6	0,61	2,87
VIII/f	0,25	0,39	0,46	7,1	30,47	0,26	4,3
VIII/g	0,08	0,15	0,17	10,34	34,32	0,36	3,85
VIII/h	0,08	0,14	0,16	7,18	43,67	n.d.	n.d.
VIII/i	0,18	0,31	0,36	9,33	35,79	0,56	5,01

Tabelle 35: Fortsetzung.

Probe Nr.	µg TBZ/ml			µg PYR/ml		µg IVM/ml	
	LD ₅₀	LD ₉₆	LD ₉₉	LD ₅₀	LD ₉₉	LD ₅₀	LD ₉₉
IX/A	0,1	0,23	0,27	19,34	45,91	0,59	2,92
IX/b	0,18	0,37	0,43	18,14	45,85	0,48	2,81
IX/c	0,2	0,36	0,39	20,05	42,88	0,55	2,85
IX/d	0,12	0,23	0,27	17,89	45,44	0,96	3,03
IX/e	0,11	0,22	0,25	19,39	42,94	0,93	3
IX/f	0,11	0,31	0,34	18,31	40,55	0,47	2,85
IX/g	0,11	0,24	0,28	n.d.	n.d.	0,8	2,94
X/a	0,14	0,35	0,42	8,42	24,29	0,49	2,85
X/b	0,04	0,1	0,12	21,56	61,15	0,86	3,61
X/c	0,18	0,39	0,46	0,14	0,3	0,44	2,86
X/d	0,07	0,16	0,19	20,27	58,13	0,11	2,66
X/e	0,06	0,13	0,15	18,12	48,05	0,71	2,92
X/f	0,04	0,12	0,12	20,85	54,05	0,28	2,75
X/g	0,09	0,25	0,31	18,94	50,12	0,81	3
X/h	0,04	0,13	0,16	20,74	60,47	0,76	3,02

Tabelle 35: Fortsetzung.

Wurm Nr.	Spezies	Real-time PCR	
		1. Versuch	2. Versuch
W345	<i>Cylicocyclus insignis</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W437	<i>Cylicocyclus radiatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W239	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W245	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W246	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W253	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W260	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W269	<i>Cylicocyclus radiatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W274	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
W278	<i>Cylicocyclus elongatus</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
W282	<i>Cylicocyclus radiatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W285	<i>Cylicocyclus elongatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W289	<i>Cylicocyclus radiatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W296	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W324	<i>Cylicocyclus insignis</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W325	<i>Cylicocyclus radiatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
M38	<i>Cyathostomum coronatum</i>	TAC/TAC	TAC/TAC
W82	<i>Cyathostomum catinatum</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
W142	<i>Cylicocyclus insignis</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
W176	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W177	<i>Cylicocyclus insignis</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
W143	<i>Cylicocyclus insignis</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
W154	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
W157	<i>Cylicocyclus insignis</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
W159	<i>Cylicocyclus insignis</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
W171	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W180	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
W183	<i>Cylicocyclus insignis</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
W193	<i>Cylicocyclus radiatus</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
W197	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	Kein Ergebnis	Kein Ergebnis
W215	<i>Cylicocyclus insignis</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
W294	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC

Tabelle 36: Ergebnisse der Genotypisierung von 52 adulten kleinen Strongyliden in zwei Untersuchungen mit der Real-time PCR.

W300	<i>Cylicocyclus radiatus</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
M19	<i>Cyathostomum catinatum</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
M20	<i>Cylicostephanus hybridus</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
M41	<i>Cyathostomum catinatum</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
M42	<i>Cyathostomum catinatum</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
M44	<i>Cyathostomum coronatum</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
M45	<i>Cyathostomum catinatum</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
M47	<i>Cyathostomum pateratum</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
M57	<i>Cyathostomum pateratum</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
M64	<i>Cyathostomum catinatum</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
M69	<i>Cyathostomum catinatum</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
M70	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
M72	<i>Cyathostomum catinatum</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
M75	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
M78	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
M81	<i>Cyathostomum catinatum</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
M96	<i>Cyathostomum catinatum</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
M98	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
M100	<i>Cylicocyclus nassatus</i>	TTC/TTC	TTC/TTC
M117	<i>Cyathostomum catinatum</i>	TTC/TAC	TTC/TAC
M120	<i>Cyathostomum catinatum</i>	TTC/TAC	TTC/TAC

Tabelle 36: Fortsetzung

Sonde	Kopienzahl	Mittlerer C_t - Wert	Standardabweichung (STABW)	Variationskoeffizient (VK)
A (TAC)	10^1	35,82	0,97	2,72
A (TAC)	10^2	33,56	0,75	2,22
A (TAC)	10^3	29,66	0,54	1,83
A (TAC)	10^4	26,85	0,52	1,93
A (TAC)	10^5	23,11	0,66	2,85
A (TAC)	10^6	20,83	0,55	2,66
T (TTC)	10^1	35,45	1,32	3,72
T (TTC)	10^2	31,51	0,62	1,97
T (TTC)	10^3	28,61	0,82	2,88
T (TTC)	10^4	25,17	0,81	3,22
T (TTC)	10^5	21,46	0,78	3,22
T (TTC)	10^6	18,11	0,78	4,29

Tabelle 37: Ergebnisse der Standardkurven für linearisierte Plasmid-DNA für die A- und die T-Sonde in den Verdünnungsstufen 10^1 – 10^6 .

Probe Nr.	$\mu\text{g TBZ/ml}$ LD ₅₀	EZR EZR in %	Probe Nr.	$\mu\text{g TBZ/ml}$ LD ₅₀	EZR EZR in %
1/a	0,16	81,82	6/a	0,17	87,50
1/b	0,19	0,00	6/b	0,07	72,73
1/c	0,15	25,00	6/c	0,12	90,32
1/d	0,14	0,00	6/d	0,09	86,67
1/e	0,18	69,44	6/e	0,12	93,75
1/f	0,25	62,50	6/f	0,08	68,42
1/g	0,25	87,80	6/g	0,12	84,62
2/a	0,19	92,86	6/h	0,09	100,00
2/b	0,19	88,89	7/a	0,10	n.d.
2/c	0,25	100,00	7/b	0,12	100,00
2/d	0,18	100,00	7/c	0,14	55,56
2/e	0,03	69,23	7/d	0,12	0,00
3/a	0,15	75,00	7/e	0,12	90,00
3/b	0,10	100,00	7/f	0,17	85,71
3/c	0,04	100,00	8/a	0,15	100,00
3/d	0,13	82,76	8/b	0,22	100,00
3/e	0,18	76,00	8/c	0,13	0,00
4/a	0,10	98,00	8/d	0,05	100,00
4/b	0,04	94,74	8/e	0,17	100,00
4/c	0,05	97,83	9/a	0,18	73,33
4/d	0,11	100,00	9/b	0,16	80,00
4/e	0,11	96,61	9/c	0,14	85,71
4/f	0,11	66,67	9/d	0,12	42,86
4/g	0,09	93,33	9/e	0,10	91,67
4/h	0,02	100,00	9/f	0,25	75,00
4/i	0,13	94,44	10/a	0,18	75,00
5/a	0,26	92,31	10/b	0,17	83,33
5/b	0,17	57,14	10/c	0,14	64,56
5/c	0,26	94,12	10/d	0,12	78,95
5/d	0,13	83,33	10/e	0,10	100,00
5/e	0,22	92,31			

Tabelle 38: Ergebnisse des LSHT mit TBZ und des EZRT mit FBZ für die Betriebe 1-10 (n=6)

8.1 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Strukturformel der BZ</i>	24
<i>Abbildung 2: Strukturformel von IVM.</i>	31
<i>Abbildung 3: Strukturformeln von PYR, MOR und OX.</i>	36
<i>Abbildung 4: Teil 1 und 2 des Fragebogens, der im Rahmen der Kotuntersuchungen mit den Besitzern zusammen ausgefüllt wurde – Erklärungen zu den einzelnen Punkten sind im Text unter Punkt 3.3.3 „Erfassung der Daten“ zu finden.</i>	61
<i>Abbildung 5: Teil 3 und 4 des Fragebogens, der im Rahmen der Kotuntersuchungen mit den Besitzern zusammen ausgefüllt wurde – Erklärungen zu den einzelnen Punkten sind im Text unter Punkt 3.3.3 „Erfassung der Daten“ zu finden.</i>	62
<i>Abbildung 6: Die Standorte der untersuchten Pferdebetriebe in Niedersachsen.</i>	74
<i>Abbildung 7: Verteilung der untersuchten und der positiven Kotproben in den Jahren 2000 (n=369) und 2001 (n=1014).</i>	75
<i>Abbildung 8: Arithmetische Mittelwerte der EpG pro Monat für die Probennahmen in den Jahren 2000 (n=369) und 2001 (n= 1014).</i>	76
<i>Abbildung 9: Arithmetische Mittel der EpG-Werte bei den verschiedenen Betriebsarten „Reitstall“ (n= 36), „Zuchtbetrieb“ (n= 21) und „Kleinbetrieb“ (n= 7).</i>	77
<i>Abbildung 10: Verteilung der EZR bei 60 Proben in 10 Betrieben.</i>	87
<i>Abbildung 11: Graphische Darstellung der Larvenschlupfhemmung der BZ-resistenten (? ; Population L) und der BZ-sensiblen (? ; Population P) Strongylidenpopulation.</i>	90
<i>Abbildung 12: Verhältnis von embryonierten und nichtembryonierten Eiern und Larven im LSHT mit PYR für Population L. Konzentrationsstufen: 1= Kontrolle (0 µg PYR/ml), 2=0,15 µg PYR/ml, 3=0,5 µg PYR/ml, 4=1,5µg PYR/ml, 5=15 µg PYR/ml und 6= 25µg PYR/ml.</i>	93
<i>Abbildung 13: Verhältnis von embryonierten und nichtembryonierten Eiern und Larven im LSHT mit TBZ für Population L. Konzentrationsstufen: 1= Kontrolle (0 µg TBZ/ml), 2=0,1 µg TBZ/ml, 3=0,15 µg TBZ/ml, 4=0,2 µg TBZ/ml, 5=0,25 µg TBZ/ml und 6=0,3 µg TBZ/ml.</i>	93

<i>Abbildung 14: Verteilung der LD₅₀-Werte der im LSHT für TBZ untersuchten Proben (n=135).</i>	94
<i>Abbildung 15: Auftreten von BZ-Resistenz (BRZ) (LD₅₀ > 0,1 mg TBZ/ml) in Prozent der Tiere pro Betrieb in den Betriebsformen „Zuchtbetrieb“ und „Reitstall“</i>	95
<i>Abbildung 16: Häufigkeitsverteilung der LD₅₀-Werte der Proben aus dem Jahren 2000 (n=61) und 2001 (n=74) im Vergleich.</i>	96
<i>Abbildung 17: Verteilung der LD₅₀-Werte der im LSHT für PYR untersuchten Proben (n=64).</i>	97
<i>Abbildung 18: Verteilung der LD₅₀-Werte aus dem LSHT mit PYR (n=64).</i>	98
<i>Abbildung 19: Verteilung der LD₅₀-Werte der im LPT für IVM untersuchten Proben (n=63)</i>	100
<i>Abbildung 20: Verteilung der LD₅₀-Werte aus dem LPT mit IVM (n=63).</i>	101
<i>Abbildung 21: Beispiel der Standardkurve in der Real-time PCR.</i>	102
<i>Abbildung 22: Darstellung des Ergebnisses einer Larvenpräparation in der Real-time PCR (Genotyp: TTC/TAC).</i>	103
<i>Abbildung 23: Darstellung des Ergebnisses einer Larvenpräparation in der Real-time PCR (Genotyp: TAC/TAC).</i>	104
<i>Abbildung 24: Darstellung des Ergebnisses einer Larvenpräparation in der Real-time PCR (Genotyp: TTC/TTC).</i>	105
<i>Abbildung 25: Genotyp-Verteilung einzelner dritter Larven aus den Proben 1/a, 1/b, 1/c, 1/d und 2/e, die mit der Real-time PCR untersucht wurden (n=105).</i>	106
<i>Abbildung 26: Genotyp-Verteilung der in der Real-time PCR untersuchten dritten Larven (n=105).</i>	107
<i>Abbildung 27: Zusammenfassende Darstellung der Testergebnisse von EZRT und LSHT (n=60).</i>	108

8.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Strongyliden der Equiden: Unterfamilien und Gattungen der Familie Strongylidae (nach ECKERT 2000).</i>	16
<i>Tabelle 2 : Untersuchungen zu AR in verschiedenen Ländern.</i>	40
<i>Tabelle 3: Verschiedene Angaben der LD₅₀-Werte für BZ im LSHT aus verschiedenen Untersuchungen.</i>	45
<i>Tabelle 4: Verteilung der untersuchten Kotproben sowie deren Anteil an positiven Proben in den verschiedenen Altersklassen (n=1.383).</i>	78
<i>Tabelle 5: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben bei den verschiedenen „Rassen“ (n=1.383). KB: Kaltblut; WB: Warmblut; VB: Vollblut; KP/PO: Kleinpferd/Pony.</i>	78
<i>Tabelle 6: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben bei Stuten, Hengsten und Wallachen.</i>	79
<i>Tabelle 7: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben bei den verschiedenen Weidehaltungen (n=1.383).</i>	80
<i>Tabelle 8: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben bei den verschiedenen Betriebsformen (n=1.383).</i>	81
<i>Tabelle 9: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben bei unterschiedlicher Bestandsgröße (n=1.383).</i>	81
<i>Tabelle 10: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von der Häufigkeit des Weidewechsels (n=1.383).</i>	82
<i>Tabelle 11: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von der Häufigkeit des Entferns von Kot auf der Weide(n=1.383).</i>	83
<i>Tabelle 12: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von der Häufigkeit des Entferns Geilstellen auf der Weide(n=1.383).</i>	83
<i>Tabelle 13: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von der Wechselbeweidung durch andere Tierarten (n=1.383).</i>	84

<i>Tabelle 14: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von verschiedenen Düngemitteln (n=1.383).</i>	85
<i>Tabelle 15: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von der Stallhaltung und der Häufigkeit des Mistens (n=1.383).</i>	85
<i>Tabelle 16: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von der Durchführung von Desinfektionsmaßnahmen (n=1.383).</i>	86
<i>Tabelle 17: Verteilung der untersuchten Kotproben und deren Anteil an positiven Proben in Abhängigkeit von dem zuletzt eingesetzten Anthelminthikum (n=1.383).</i>	86
<i>Tabelle 18: Arithmetische Mittelwerte der Eizahlen vor ($mEpG_{vB}$) und nach ($mEpG_{nB}$) der Anthelminthikabehandlung in den einzelnen Betrieben (Standardabweichung) sowie der arithmetische Mittelwert der Eizahlreduktionen pro Betrieb.</i>	88
<i>Tabelle 19: Arithmetische Mittelwerte der Larvenschlupfhemmung (LS-H), der LD₅₀-, LD₉₆- und der LD₉₉-Werte aus den fünf Wiederholungen des Vorversuchs I mit der Population P.</i>	89
<i>Tabelle 20: Arithmetische Mittelwerte der Larvenschlupfhemmung (LS-H), der LD₅₀-, LD₉₆- und der LD₉₉-Werte aus den fünf Wiederholungen des Vorversuchs I mit der Population L.</i>	89
<i>Tabelle 21: Arithmetische Mittelwerte der LD₅₀-, LD₉₆- und der LD₉₉-Werte aus den 5 Wiederholungen des Vorversuchs II mit der Population L.</i>	91
<i>Tabelle 22: Arithmetische Mittelwerte der LD₅₀-, LD₉₆- und der LD₉₉-Werte aus den 5 Wiederholungen des Vorversuchs II mit der Population M.</i>	92
<i>Tabelle 23: Arithmetische Mittelwerte der LD₅₀-, LD₉₆- und der LD₉₉-Werte aus den fünf Wiederholungen des Vorversuchs III mit der Population L.</i>	99
<i>Tabelle 24: Arithmetische Mittelwerte der LD₅₀-, LD₉₆- und der LD₉₉-Werte aus den fünf Wiederholungen des Vorversuchs II mit der Population M.</i>	100
<i>Tabelle 25: Ergebnisse des EZRT mit FBZ. $EpG_{vB}=EpG$ vor der Behandlung; $EpG_{nB}=EpG$ nach der Behandlung; $EZR\%=Eizahlreduktion$ in % (n=60).</i>	180
<i>Tabelle 26: Ergebnisse des Vorversuch I mit der Population P.</i>	181
<i>Tabelle 27: Ergebnisse des Vorversuch I mit der Population L.</i>	182
<i>Tabelle 28: Ergebnisse des Vorversuch II mit der Population L.</i>	183

<i>Tabelle 29: Ergebnisse des Vorversuch II mit der Population M.....</i>	<i>183</i>
<i>Tabelle 30: Anteil von embryonierten, nichtembryonierten Eiern und Larven beim LSHT mit PYR. Bei Population L.....</i>	<i>184</i>
<i>Tabelle 31: Anteil von embryonierten, nichtembryonierten Eiern und Larven beim LSHT mit TBZ bei Stamm L.....</i>	<i>184</i>
<i>Tabelle 32: Ergebnisse des Vorversuch III mit der Population M.</i>	<i>185</i>
<i>Tabelle 33: Ergebnisse des Vorversuch III mit der Population L.....</i>	<i>185</i>
<i>Tabelle 34: Ergebnisse des Versuch I: L₅₀-, LD₉₆- und LD₉₉-Werte aus den LSHT für TBZ für die Probennahme aus dem Jahr 2000 (n=61).....</i>	<i>186</i>
<i>Tabelle 35: Ergebnisse des Versuchs I, II und III: L₅₀-, LD₉₆- und LD₉₉-Werte aus den LSHT mit TBZ; LD₅₀- und LD₉₉-Werte für den LSHT mit PYR; LD₅₀- und LD₉₉-Werte aus dem LPT mit IVM für die Proben aus dem Jahr 2001 (n=78); (n.d.:kein Ergebnis).</i>	<i>187</i>
<i>Tabelle 36: Ergebnisse der Genotypisierung von 52 adulten kleinen Strongyliden in zwei Untersuchungen mit der Real-time PCR.</i>	<i>190</i>
<i>Tabelle 37: Ergebnisse der Standardkurven für linearisierte Plasmid-DNA für die A- und die T-Sonde in den Verdünnungsstufen 10¹ – 10⁶.</i>	<i>192</i>
<i>Tabelle 38: Ergebnisse des LSHT mit TBZ und des EZRT mit FBZ für die Betriebe 1-10 (n=6)</i>	<i>193</i>

8.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ABM	Abamectin
ABZ	Albendazol
Ach	Acetylcholin
AchE	Acetylcholinesterase
Aqua dest.	Destiliertes Wasser
AR	Anthelminthikaresistenz
AVM	Avermectin
bp	Basenpaar
BZ	Benzimidazol
BZR	Benzimidazolresistenz
C	Cytosin
Ca ²⁺	Kalziumionen
CBZ	Cambendazol
Cl ⁻	Chloridionen
Ct	Threshold Cycle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonuclein acid
DOM	Doramectin
dRn	normalisierte Baseline-korrigierte Fluoreszenz
ED	effektive Dosis
EHA	egg hatch assay
EpG	Eizahl pro einem Gramm Kot
EPM	Eprinomectin
EZR	Eizahlreduktion in %
EZRT	Eizahlreduktionstest
FAM	6-Carboxy-Fluoreszin
FBZ	Fenbendazol

FEC	fecal egg count
FECR	fecal egg count reduction
FECRT	fecal egg count reduction test
FIBZ	Flubendazol
FN	Deutsche reiterliche Vereinigung
G	Guanosin
GABA	γ-Aminobuttersäure
GluCl	Glutamat-gesteuerter Chloridkanal
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
IVM	Ivermectin
kb	1000 Basenpaare
KB	Kaltblut
KGW	Körpergewicht
KP	Kleinpferd
L ₃	dritte Larven
LD	Letale dosis
LEHT	Larvenentwicklungshemmtest
LEV	Levamisol
LMT	Larvenmotilitätstest
LPA	larval motility assay
LPT	Larvenparalysetest
LSHT	Larvenschlupfhemmtest
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MBM	Milbemycin
MBMO	Milbemycinoxim
MBZ	Mebendazol
MDS	Magen-Darm-Strongyliden
MGB	minor groove binder
MgCl ₂ +	Magnesiumchlorid

ML	Makrozyklische Laktone
MOR	Morantel
MOX	Moxidectin
nA	nicotinerger Agonist
nAChR	nicotinerger Acetylcholinrezeptor
OX	Oxantel
OxBZ	Oxbendazol
OxfBZ	Oxfenbendazol
PCR	Polymerase Kettenreaktion
P-gp	P-Glycoprotein
Phe	Phenylalanin
PO	Pony
PYR	Pyrantel
RB	Regierungsbezirk
RFLP	Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus
ROX	6-Carboxy-x-rhodamin
SLM	Selamectin
T	Thymidin
TBT	Tubulib-Bindungsstudie
TBZ	Thiabendazol
Tyr	Tyrosin
VB	Vollblut
WB	Warmblut

Danksagung

Last but not least....

möchte ich mich herzlich bedanken....

bei Herrn Prof. Dr. Thomas Schnieder für die Überlassung des Dokorthemas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie die Betreuung und die immer bestehende Möglichkeit eines persönlichen Gesprächs.

bei Herrn Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna für die fachlichen Anregungen und zahlreichen Hilfestellungen im Rahmen der Arbeit sowie für die Flexibilität und Freundlichkeit in der Zusammenarbeit.

Ich möchte mich herzlich bedanken bei Herrn Dr. M. von Keyserlingk für die Vermittlung von Kontakten zu Pferdhaltern sowie bei dem Verein für Kleinpferde- und Ponyzucht und allen anderen Pferdehaltern, die mich in meiner Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern und Mitdoktoranten des Instituts für Parasitologie, die durch Tatkraft und seelische Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ganz besonders möchte ich Frau Sandra Buschbaum für ihre Unterstützung und immerwährende Hilfsbereitschaft in Wort und Tat danken, die mir die Arbeit oft erleichtert haben.

Den Mitarbeitern des Instituts für Biometrie und Statistik danke ich für ihre Zeit und Mühe und für die Hilfestellung bei vielen Berechnungen.

Ganz besonders danke ich alle denen, die privat zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, darunter möchte ich besonders Frau Dr. Nicole Coati für eifriges Korrekturlesen und treue Freundschaft bedanken.

Herrn Dieter Brodbeck gilt mein Dank für seine Geduld und Hilfe bei allen technischen (und anderen) Schwierigkeiten bei der Gestaltung der Dissertation.

All meinen Freunden möchte ich für ihre seelische Unterstützung in der ganzen Zeit der Doktorarbeit und für ihre Geduld mit meinen „black moods“ danken, insbesondere seien erwähnt Vera von der Heyden, Thomas Grothe und Susanne Gallenkamp.

Zu guter Letzt möchte ich meinem Freund für seine endlose Geduld und seinen Trost und meinen Eltern für ihren Rückhalt, ihren Schutz und ihre Unterstützung danken, die mir bei all meinen Vorhaben das nötige Selbstvertrauen gaben und ohne die ich nicht da wäre, wo ich heute bin.