

Aus dem Institut der Parasitologie und Tropenveterinärmedizin
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Epidemiologische, klinische und serologische Untersuchungen
zum Verlauf von *Parascaris* spp.-Infektionen
bei Fohlen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Melanie Köhler (geb. Völlger)
Tierärztin
aus **Frankfurt/ Oder**

Berlin 2016

Journal-Nr.: 3903



**Gedruckt mit der Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. G. von Samson-Himmelstjerna
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Johannes Handler
Dritter Gutachter:	PD Dr. Roswitha Merle

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): foal, Parascaris, respiratory diseases, fecal egg count, ELISA, western blotting, excretory secretory antigens, cultivation, populations, pathogenesis, Germany

Tag der Promotion: 25.10.2016



Meiner Familie



Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Der Parasit: <i>Parascaris</i> spp.	3
2.1.1 Vorkommen/Epidemiologie von <i>Parascaris</i> spp.....	3
2.1.2 Morphologie	6
2.1.3 Entwicklungszyklus	7
2.2 Parascariose	9
2.2.1 Pathogenese und Klinik	9
2.2.2 Pathologie.....	11
2.2.3 Differentialdiagnosen	12
2.3 Diagnostik und Bekämpfung	14
2.3.1 Diagnostik	14
2.3.1.1 FLOTAC-Verfahren.....	14
2.3.1.2 Einfluss auf die koproskopisch nachgewiesenen EpG-Werte.....	15
2.3.2 Bekämpfung.....	16
2.3.2.1 Maßnahmen in Haltung/Management	16
2.3.2.2 Anthelminthikaeinsatz	17
2.3.2.3 Biologische Maßnahmen.....	18
2.4 Immunologie	18
2.4.1 Immunglobuline beim Pferd	19
2.4.2 Antikörper in der Stutenmilch	19
2.4.3 Passive Immunität	20
2.4.4 Maternale Antikörper im Fohlen	22
2.4.5 Immunologische Reaktionen auf Parasiten-/Bakterieninfektionen	23
2.4.6 Untersuchungen zur Immunisierung mit <i>Ascaris suum</i> -Antigenen	24
2.5 In vitro-Kultivierung zur Gewinnung des exkretorisch-sekretorischen Antigens (ES)	25
2.5.1 Gewinnung von Ascariden-Eiern	25
2.5.2 Embryonierung	26
2.5.3 Schlupf der Larven	28
2.5.4 Kultivierung von Ascariden-Larven	30
2.5.5 Kultivierung von adulten Ascariden-Würmern	31
2.5.6 Isolierung von exkretorisch-sekretorischem Antigen (ES)	32
2.6 Antigene und serologische Reaktionen	32
2.6.1 ES-Antigen von Ascariden	32



2.6.2 Ganzwurmextrakt (somatisches Antigen).....	35
2.6.3 Antigen aus der Körperflüssigkeit des <i>Ascaris suum</i> -Wurmes	36
2.7 Anthelminthikaresistenz.....	37
2.7.1 Definition	37
2.7.2 Anthelminthika	38
2.7.3 Ursachen und Vorkommen von Anthelminthikaresistenzen.....	39
2.8 Zielsetzung	40
3 Material und Methoden.....	41
3.1 Lösungen und Puffer.....	41
3.2 Antikörper, Medien, Reagentien, Reaktionskits	43
3.3 Gefäße, Geräte und Verbrauchsmaterialien	44
3.4 Probanden.....	46
3.4.1 Probandengruppe.....	46
3.4.2 Haltung der Probanden	47
3.4.3 Impfung und Entwurmung der Fohlen	48
3.4.4 Klinische Untersuchung	48
3.4.5 Labordiagnostische Untersuchung	50
3.5 Kot- und Blutproben	50
3.5.1 Auswahl der Probanden	50
3.5.2 Probenentnahme.....	51
3.5.3 Koproskopische Untersuchung (FLOTAC-Verfahren).....	51
3.5.4 Nachträgliche Untersuchung der Probanden	52
3.6 Eiisolierung, Embryonierung und Kultivierung	52
3.6.1 Aufreinigung von <i>Parascaris</i> spp.-Eiern aus dem Kot.....	53
3.6.2 Gewinnung von <i>Parascaris</i> spp.-Eiern aus adulten Weibchen	53
3.6.3 Embryonierung von <i>Parascaris</i> spp.-Eiern.....	54
3.6.4 Gewinnung von <i>Parascaris</i> spp.-Larven.....	55
3.6.5 <i>In vitro</i> -Kultivierung der <i>Parascaris</i> spp.-Larven.....	56
3.6.6 Aufbereitung von <i>Parascaris</i> spp.-ES-Antigen	56
3.6.7 Gewinnung weiterer <i>Parascaris</i> spp.-Antigene und Beschreibung des <i>Ascaris suum</i> - Hämoglobin-Antigens	57
3.6.7.1 ES-Antigen der adulten <i>Parascaris</i> spp.-Würmer.....	57
3.6.7.2 Somatisches Antigen der <i>Parascaris</i> spp.-Larven.....	57
3.6.7.3 Somatisches Antigen der adulten <i>Parascaris</i> spp.-Würmer.....	58
3.6.7.4 <i>Ascaris suum</i> -Hämoglobin-Antigen (Schweinespulwurm-Antigen)	58



3.7 Antigengewinnung	58
3.7.1 SDS-PAGE	59
3.7.2 Proteinfärbung mittels Coomassie Blue	59
3.7.3 Western Blot.....	60
3.7.4 Immunodetektion.....	61
3.7.5 Chemilumineszenz.....	61
3.8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	61
3.8.1 Vorversuche.....	61
3.8.2 ELISA-Protokoll	62
3.8.3 Antigene im ELISA.....	64
3.8.3.1 Larvales ES-Antigen	64
Anti-Horse IgG (H+L):.....	64
Anti-Horse IgM:	65
Anti-Horse IgG (T):.....	65
3.8.3.2 Adultes ES-Antigen.....	66
Anti-Horse IgG (H+L):.....	66
Anti-Horse IgM:	66
3.8.3.3 Somatisches Antigen der Larven	66
Anti-Horse IgG (H+L):.....	67
3.8.3.4 <i>Ascaris suum</i> -Hämoglobin-Antigen.....	67
3.8.4 Präkolostrale Seren.....	67
3.9 Statistische Auswertung	69
3.9.1 Fragestellungen für die statistische Auswertung	69
3.9.2 Test auf Unabhängigkeit verschiedener Einflüsse auf die Parasiteninfektion.....	71
3.9.3 Regressionsgleichungen	71
4 Ergebnisse.....	73
4.1 Koproskopische, klinische und epidemiologische Auswertung in einem Pferdebestand	73
4.1.1 Koproskopische Auswertung im Gestüt.....	73
4.1.2 Spulwurmeiausscheidung und Lebensalter der Fohlen	75
4.1.3 Jahresvergleich von infizierten Fohlen und deren <i>Parascaris</i> spp.-Eiausscheidung	78
4.1.4 <i>Parascaris</i> spp. und das Geschlecht der Fohlen	79
4.1.5 Zeitpunkt der ersten Eiausscheidung und Präpatenz	80
4.1.6 Zusammenhang der <i>Parascaris</i> spp.-Infektion mit einer klinischen Erkrankung.....	82
4.1.7 Entwurmungsdaten und Einfluss der Entwurmungshäufigkeit auf die Eiausscheidung bzw. Infektion mit dem Parasiten	90
4.1.8 <i>Parascaris</i> spp.-infizierte Fohlen und die Weidezeit	92



4.1.9 Einfluss des Geburtsmonats auf die Parasiteninfektion	93
4.2 Antigenetische und serologische Untersuchungen	95
4.2.1 Embryonierung und Schlupf der Larven	95
4.2.2 <i>In vitro</i> -Kultivierung der <i>Parascaris</i> spp.-Larven	97
4.2.3 Charakterisierung der larvalen Antigene	97
4.2.3.1 Larvales ES-Antigen mit IgG (H+L) Sekundärantikörper	98
4.2.3.2 Larvales ES-Antigen mit IgM Sekundärantikörper	101
4.2.3.3 Larvales somatisches ES-Antigen	102
4.2.4 Charakterisierung der Antigene aus adulten <i>Parascaris</i> spp.-Würmern	103
4.2.5 Serologische Untersuchungen mittels ELISA	105
4.2.5.1 ES-Antigen der <i>Parascaris</i> spp.-Larven	106
4.2.5.2 ES-Antigen der <i>Parascaris</i> spp.-Adulten	109
4.2.5.3 Somatisches Antigen der <i>Parascaris</i> spp.-Larven	110
4.2.5.4 Seren von monoinfizierte Pferde	110
4.2.5.5 <i>Ascaris suum</i> -Hämoglobin-Antigen	111
4.2.5.6 Präkolostrale Blutproben der Fohlen	112
4.3. Schlussfolgerungen	112
5 Diskussion	115
5.1 Koproskopische Auswertung	115
5.1.1 Prävalenz	115
5.1.2 Einfluss von Alter/Geschlecht und Jahreszeit auf die Infektion	116
5.1.3 Abhängigkeit der Pferdespulwurminfektion von Weide und Entwurmung	117
5.1.4 Präpatenz der untersuchten Fohlen	119
5.1.5 Koproskopischer Infektionsverlauf	121
5.1.6 Klinische Parameter	123
5.2 <i>In vitro</i>-Kultivierung und ES-Antigen	127
5.2.1 Embryonierung und Larvenschlupf	127
5.2.2 <i>In vitro</i> -Kultivierung	128
5.2.3 ES-Antigen der <i>Parascaris</i> spp.-Larven	129
5.2.4 ES-Antigen der adulten <i>Parascaris</i> spp.-Würmer	131
5.3 Serologische Reaktionen untersuchter Fohlen im ELISA	132
5.3.1 ELISA unter Verwendung von ES-Antigenen adulter und larvaler <i>Parascaris</i> spp.-Stadien	132
5.3.2 ELISA unter Verwendung der präkolostralen Serumproben	135
5.3.3 Weitere Antigene und Sekundärantikörper im ELISA	136
5.3.4 Kreuzreaktivität im ELISA	137



6 Zusammenfassung	139
7 Summary	141
8 Literaturverzeichnis.....	143
9 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	161
9.1 Tabellenverzeichnis	161
9.2 Abbildungsverzeichnis	162
10 Anhang	165
Tabelle 13: Untersuchungsprotokoll	165
Tabelle 14: "Fohlentabelle"	167
Tabelle 15: Regressionsergebnisse.....	181
Statistische Berechnungen der Zeiteffekte	184
Zusammenhang Lebenswochen und <i>Parascaris</i> spp.-EpG-Werte	186
Zusammenhang erster koproskopisch positiver Befund und Nasenausfluss.....	187
Publikationsverzeichnis	189
Danksagung.....	191
Selbstständigkeitserklärung	193



Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
APF	„artificial perienteric fluid“ (englisch, nachgeahmte Bauchhöhlenflüssigkeit)
AR	Anthelminthikaresistenz
AsHb	<i>A. suum</i> -Hämoglobin
BZ	Benzimidazol
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ELISA	„Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (englisch, Enzym gekoppeltes, antikörperbasiertes Nachweisverfahren)
EpG	Eier pro Gramm Kot
ES	exkretorisch-sekretorisch
EZRT	Eizahlreduktionstest
g	Gramm
G/l	Giga pro Liter (10 ⁹ Zellen/Liter)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
(H+L)	schwere und leichte Immunglobulinkette
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
kDa	Kilodalton
KI	Konfidenzintervall
L	Liter
Lnn.	„Lymphonodi“ (lateinisch, Lymphknoten)
L2	Larve 2
L3	Larve 3
L4	Larve 4
M.	Marker
M	Mol/L
MDS	Magen-Darm-Strongyliden



MEM	„Minimum Essential Medium“
min	Minute
ml	Milliliter
ML	Makrozyklische Laktone
MW	Mittelwert
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
NaClO	Natriumhypochlorid
obB	ohne besonderen Befund
OD	Optische Dichte
OPD	Ortho-Phenylendiamin-Tablette
OR	„Odds Ratio“ (statistische Wahrscheinlichkeitsangabe)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
präkol.	Präkolostal (vor der ersten Milchaufnahme)
postkol.	Postkolostal (nach der ersten Milchaufnahme)
PYR	Pyrantel
R.	Rhodococcus
rpm	Umdrehungen pro Minute („rounds per minute“)
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	„Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese“ (englisch, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
som.	Somatisch
StAbw	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TLCK	Tosyl-L-Lysin-Chlormethyl-Keton-Hydrochlorid
V	Volt
WAVVP	„World Association for the Advancement of the Veterinary Parasitology“

1 Einleitung

Einer der wichtigsten Parasiten des Pferdes ist der Spulwurm. Dieser ubiquitär auftretende Parasit führt vor allem bei Fohlen und Absetzern zu klinischen Problemen. Nach Ausbildung einer Immunität wird der Spulwurm eher selten bei älteren Tieren nachgewiesen.

Eine Besonderheit dieses Parasiten sind die dickschaligen, runden und klebrigen Eier, in denen sich nach einer Entwicklungsphase eine infektiöse Larve befindet. Diese charakteristische Eischale ermöglicht eine hohe Widerstandsfähigkeit und somit lange Überlebenszeit, so dass diese Parasiteneier trotz guter Hygiene im Stall und auf der Weide oftmals Jahre überdauern können. Diese Eigenschaft erschwert die Bekämpfung dieses Parasiten. Eine Larvenwanderung durch den Körper, die zu ersten Schäden führt, bevor eine Infektion überhaupt koproskopisch nachgewiesen werden kann, ist eine weitere Besonderheit.

Die lange Präpatenz des Pferdespulwurmes bedingt, dass infizierte Fohlen erst nach knapp drei Monaten koproskopisch identifiziert werden können. Zu diesem Zeitpunkt beginnen die weiblichen Adulten im Dünndarm der Fohlen mit der Ausscheidung von widerstandsfähigen Eiern in großen Mengen.

In experimentellen Studien wurde die Larvenwanderung im Körper des Pferdes untersucht. Nach der oralen Aufnahme von Spulwurmeiern und dem Larvenschlupf im Darm penetrieren die Larven die Darmwand und gelangen über das Portalvenensystem in die Leber. Dort wandern sie durch das Parenchym und dringen anschließend in die Lebervenen ein, worauf hin sie über das Blutsystem bzw. das rechte Herz die Lunge erreichen. In der zweiten bis vierten Woche nach der Infektion sind die Spulwurmlarven im Lungenparenchym nachweisbar. Über den tracheoösophagealen Transport gelangen die Parasitenlarven letztlich zurück in den Dünndarm.

Die Diagnostik zum Nachweis von Spulwurminfektionen beim Pferd beruht auf dem Einachweis im Kot der infizierten Fohlen. Eine fehlende Korrelation zur vorhandenen Wurmbürde und eine intermittierende Eiausscheidung mit dem Kot schränken die Aussagekraft dieser diagnostischen Methode jedoch ein. Bereits der Nachweis von einem Parasitenei im Kot ist ausreichend, um die Entwurmung einzuleiten. Die Jungtiere werden metaphylaktisch in regelmäßigen Abständen behandelt.

In der epizootiologischen Untersuchung der Spulwurminfektion bei einer Vielzahl von Fohlen auf einem der weltweit größten Warmblutgestüte, dem Gestüt Lewitz, sollten neue Erkenntnisse zu dieser Parasiteninfektion gewonnen werden. Hierzu wurden Fragestellungen

des Infektionszeitpunktes, der Prädispositionen für diese Parasiteninfektion, klinische Auffälligkeiten und der Einfluss einer metaphylaktischen Entwurmung näher untersucht.

Die Körperwanderung der Spulwurmlarven durch Leber und Lunge verursacht vermutlich Schäden, die eine zukünftige Infektion bzw. Erkrankung begünstigen könnte. Ein diagnostischer Nachweis zum Zeitpunkt dieser Körperwanderung ist bisher nicht möglich. Ein serologisches Verfahren zur frühzeitigen Erkennung wäre wünschenswert, um betroffene Pferde bereits während der Präpatenz gezielt als solche identifizieren zu können. Die Wanderungsschäden der Larven und die beginnende Ausscheidung der Parasiteneier bzw. die damit einhergehende Kontamination der Umgebung könnten reduziert werden. Als diagnostisch vielversprechende Antigene zur immunologischen Detektion einer Pferdespulwurminfektion bereits während der Phase der Larvenwanderung durch den Wirt erscheinen die exkretorisch-sekretorischen (ES) Antigene der wandernden Larven. Eine Gewinnung dieser Antigenfraktion durch eine *in vitro*-Kultivierung wurde für verwandte Spulwurmartens beschrieben und hier ebenfalls durchgeführt. Außerdem wurden ES und somatische Antigene adulter Parasiten hinsichtlich ihres diagnostischen Potentials untersucht. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte regelmäßige Probenentnahme und exakte Untersuchung von Kotproben bei Fohlen im Rahmen eines engmaschigen gestütsinternen Gesundheitsmonitorings in einem sehr großen Gestüt ermöglichte die Erfassung und ätiologische Auswertung zahlreicher klinischer und weiterer Parameter im Zusammenhang mit der Epidemiologie des Erregers.

2 Literaturübersicht

2.1 Der Parasit: *Parascaris* spp.

Zu den Parasitosen bei Pferden gehören verschiedene Arten von Cestoden, Trematoden und Nematoden. Bei der in dieser Studie untersuchten Parasitenart handelt es sich um einen Helminth aus der Gruppe der Nematoden. Die Ordnung der Ascaridida beinhaltet bedeutende Vertreter der Überfamilie Ascaridoidea (vereinfacht Ascariden), welche durch parasitierende adulte Stadien im Verdauungstrakt mit einem spindelförmigen, bindfaden- bis bleistiftdicken Aussehen charakterisiert sind und die eine Größe bis zu 50 cm erreichen können. Zu dieser Überfamilie gehört die Familie Ascarididae mit den Unterfamilien Ascaridinae, welche den Schweinespulwurm (*Ascaris suum*) und die Pferdespulwürmer (*Parascaris univalens* und *Parascaris equorum*) umfassen, sowie die Unterfamilie Toxocarinae mit dem Spulwurm des Hundes (*Toxocara canis*) und der Katze (*Toxocara cati*). Im Folgenden wird nur auf *Parascaris* spp., Auslöser einer der wichtigsten Jungtiererkrankungen bei Eseln, Pferden und anderen Equiden eingegangen (Deplazes et al. 2012).

Aus aktuellen Veröffentlichungen geht hervor, dass es sich bei der aktuell vorherrschenden Pferdespulwurmart nicht um *P. equorum* handelt. Vielmehr scheint *P. univalens*, vor 130 Jahren erstmals beschrieben, die dominante Spezies zu sein. So wurde in Untersuchungen in Kentucky ein Großteil der untersuchten Würmer als *P. univalens* identifiziert (Nielsen et al. 2014). Beide Spezies sind stark verwandt. *P. univalens* besitzt ein Chromosomenpaar und *P. equorum* zwei Chromosomenpaare. Zusätzlich zeigen diese beiden Spezies eine enge phylogenetische Verwandtschaft zu *A. suum* sowie *A. lumbricoides*, dem Spulwurm des Menschen (Jabbar et al. 2014).

2.1.1 Vorkommen/Epidemiologie von *Parascaris* spp.

Die Infektion mit diesem Parasiten ist weltweit verbreitet. In verschiedenen Studien und Ländern werden sehr unterschiedliche Prävalenzen angegeben. Bei Untersuchungen von Pferden mit einem breiten Altersspektrum wurden Prävalenzen von 15 % (Mfitilodze et al. 1989) und 5 % in Australien (Bucknell et al. 1995), 13,8 % (Eslami et al. 2005) und 12,2 % im Iran (Tavassoli et al. 2010), 26 % in Polen (Gawor 1995), 10 % in den USA (Lyons et al. 2000), 16,2 % in Äthiopien (Getachew et al. 2008), 21,6 % in Südafrika (Urban et al. 1982),

22 % der über zwei Jahre alten Pferde in Pakistan (Maung 1978) und 28,8 % in Saudi Arabien (Al Anazi et al. 2011) beschrieben.

Nach einer Infektion bildet sich in der Regel eine protektive Immunität aus, so dass diese Parasitose vor allem eine Jungtiererkrankung ist. In Untersuchungen von Pferden unter zwei Jahren wurde eine Prävalenz von 7 % bis 64 % angegeben (Maung 1978; Lyons et al. 2000; Lind et al. 2009; Slivinska et al. 2009; Kornas et al. 2010). Die Untersuchung von Pferdebeständen in Deutschland ergab einen höchstsignifikanten Befall mit Spulwürmern bei Pferden bis zu einem Jahr. In der Altersgruppe der ein- bis dreijährigen Pferde waren 2,1 % mit dem Spulwurm infiziert und über drei Jahren waren es noch 0,1 % der Pferdepopulation (Fritzen 2005).

In Mitteleuropa wurde eine Prävalenz von >70 % beobachtet, wobei vor allem große Zuchtbetriebe betroffen waren (Deplazes et al. 2012). In Großbritannien ergab die koproskopische Überwachung in 22 Gestüten, dass 80 % der Fohlen im Alter unter einem Jahr Ausscheider waren (Relf et al. 2013) und die Untersuchung von Russell (1948) zeigte bei allen 26 erfassten Fohlen die Ausscheidung von Spulwurmeiern.

In einer ähnlich aufgebauten Studie in den USA wurden von insgesamt 733 Fohlen aus 14 Gestüten zwischen Februar und Juli monatlich Kotproben genommen und untersucht. Die Fohlen waren zu Beginn der Beprobung mindestens zehn Tage alt und wurden, wenn möglich, in den Folgemonaten weiter untersucht. Die Fohlen waren zwischen 10 und 223 Tage alt. In den Ergebnissen wurde eine Prävalenz von 22,4 % für *P. equorum*-Eier ausscheidende Fohlen in 12 von 14 Betrieben (86 %) angegeben. Dabei variierte die Prävalenz in den verschiedenen Farmen zwischen 4 % und 79 % infizierten Tieren. Bei 10,2 % der Fohlen war eine kombinierte Ausscheidung von *P. equorum*- und Magen-Darm-Strongyliden-Eier (MDS-Eier) im Kot nachweisbar. Spulwurmeier wurden ab dem 30. Lebenstag in den Kotproben gefunden. Das Durchschnittsalter lag bei 130 Tagen und ein besonders starker Anstieg von Fohlen mit koproskopisch positiven Befund für *P. equorum* wurde ab dem 110. Lebenstag beobachtet (Lyons et al. 2004).

In Frankreich wurden in ähnlicher Weise 455 Fohlen in einem Alter von drei bis neun Monaten von insgesamt 15 Gestüten untersucht. Jedoch wurden die Kotproben von Juli bis Oktober genommen, nicht im monatlichen Intervall, sondern einmalig oder im Rahmen des Eizahlreduktionstests (EZRT) ungefähr zwei Wochen nach der Behandlung (Laugier et al. 2012). Für einen Eizahlreduktionstest werden Kotproben zum Zeitpunkt der Behandlung mit einem Entwurmungsmittel (Anthelminthikum) und circa zwei Wochen danach genommen. Die Anzahl der ausgeschiedenen Eier pro Gramm Kot (EpG) zum Zeitpunkt der Behandlung

werden mit der EpG-Zahl 14 Tage nach der Behandlung verglichen und so die Wirksamkeit eines Anthelminthikums beurteilt.

Die ermittelten Prävalenzen in Frankreich variierten von 6,9 % bis 76,2 % in den verschiedenen Gestüten und ergaben insgesamt einen Anteil von 30,5 % infizierten Fohlen. Lyons et al. (2004) sahen ebenso wie Laugier et al. (2012) eine kombinierte Eiausscheidung von Spulwurm- und MDS-Eiern bei 38,9 % der Fohlen.

In den Niederlanden wurde eine erwachsene Stute mit zweimalig koproskopisch positiven Befunden beschrieben. Koprophagie könnte die Ursache für diesen positiven Kotbefund sein (Boersema et al. 2002). Auch Lyons et al. (2006) wiesen in einer Prävalenzstudie in Kentucky Spulwurmeier im Kot und adulte Spulwürmer im Dünndarm bei einem 4-jährigem Pferd nach. Wiederum andere Prävalenzstudien zu gastrointestinalen Parasiten beim Pferd ergaben das Vorkommen von *P. equorum* bei Pferden unter zwei Jahren (Bucknell et al. 1995; Eslami et al. 2005; Tavassoli et al. 2010).

In den Untersuchungen zu Darmparasiten von Pferden, ausgenommen Strongyloiden, in Saudi-Arabien (Al Anazi et al. 2011) und Australien (Mfitilodze et al. 1989) wurde eine signifikante Altersabhängigkeit (unter fünf Jahren) und ein signifikanter Unterschied in der Saisonalität bei den betroffenen Pferden aufgezeigt. Bei Nekropsien von 45 Pferden in Saudi-Arabien über den Zeitraum September bis November des Folgejahres waren ein positiver Befund im Sommer, zwei positive Befunde im Frühling und zehn positive Befunde im Winter nachweisbar (Al Anazi et al. 2011).

In den 1996 bis 1999 durchgeführten Nekropsien von 92 Fohlen isolierten Lyons et al. (2001) Larven aus den Lungen und adulte Würmer aus dem Dünndarm. Zum Leberbefall wurde in dieser Untersuchung keine Angabe gemacht. Die größte Larvenanzahl in der Lunge wurde bei drei Monate alten Fohlen nachgewiesen.

Für die Jahreszeit wurde graphisch veranschaulicht, dass im Monat Mai mit Abstand die meisten reifen und juvenilen Stadien im Darm gefunden wurden. Zusätzlich kam aus Schweden die Feststellung, dass früher geborene Fohlen eine höhere Eiausscheidung aufwiesen als später im Jahr geborene Fohlen (Lindgren et al. 2008).

Eine mögliche Geschlechtsprädisposition wurde sehr unterschiedlich dargestellt. In vielen Veröffentlichungen wurde kein Unterschied in der Infektion von weiblichen oder männlichen Pferden gesehen (Lyons et al. 2004; Tavassoli et al. 2010), doch in einzelnen Studien ein bevorzugter Befall der männlichen Tiere (Bucknell et al. 1995; Southwood et al. 1998).

2.1.2 Morphologie

Der Spulwurm des Pferdes ist ein großer, gelblicher Nematode und kann bis zu 50 cm lang werden. Die Geschlechtsprodukte der adulten Ascariden aus dem Darm haben eine charakteristische Form und Eigenschaft. Es sind kugelige Eier mit einer Größe von 90-100 µm und einer sehr dicken Schale mit bräunlichen Proteinauflagerungen (Deplazes et al. 2012).

In einer Studie zum Aufbau der Eier von *A. suum* beschrieb Rogers (1956) eine 3-Schichtung der äußeren Hülle. Die drei Schichten werden im Uterus des weiblichen Wurmes nach und nach gebildet, wobei die äußere Schicht durch die Anlagerung von Uterussekreten entsteht. Innen befindet sich eine Lipidschicht, in der Mitte eine Chitin-ähnliche Schicht und außen ist eine Proteinschicht aufgelagert. Spulwurmeier, die frisch aus dem Uterus des Parasitenweibchens isoliert werden, sind farblos und transparent (Rogers 1956). Hingegen haben aus dem Pferdekot isolierte Eier eine charakteristische braune, dicke Schale (Koudela et al. 2006).

Bei rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Oberflächenstruktur der Schale fanden Enigk et al. (1976) Eindellungen an den Polen von *A. suum*-Eiern. Sie beschrieben die Auflagerungen der Schichten entlang des Uterus und fanden eine intrauterine Quellung der Hülle mit trichterförmigen Einziehungen an den Polen. Nach der Ausscheidung von reifen Spulwurmeiern in den Darm des Wirtes wird ein Entquellungsprozess beschrieben, so dass die Eihülle flacher wird. Die Einziehung an den Polen reduziert sich zu einer Eindellung und ist so schwerer sichtbar. Mit einem Gerbprozess wird eine Verhärtung und Braunverfärbung der Eischale erklärt. Diese verhärtete Eischale ist unempfindlich gegenüber Säuren und Laugen, mit Ausnahme von Natriumhypochlorit (5 - 6 %). Eier aus dem Uterus, denen diese Verhärtung der Schale noch fehlt, sind nicht durch diese Unempfindlichkeit gekennzeichnet (Enigk et al. 1976).

Wharton (1980) beschrieb den detaillierten Aufbau der Eischale bei *A. lumbricoides* und erkannte vier Schichten, wobei er eine Membran als zusätzliche Schicht zählt. Innen befindet sich eine Lipidschicht, die für die extreme Undurchlässigkeit verantwortlich ist. Es folgt die Chitin-Schicht, welche die dickste Eischicht darstellt und aus Chitin und Protein zusammengesetzt ist. Eine dünne Vitellin-Membran, auch Dotterhaut genannt, ist ein Anteil der ehemaligen Oozyte und die Grenze zu der letzten Schicht. Außen befindet sich eine Proteinschicht, die durch Auflagerung der Uterussekrete entsteht und somit auch „Uterus-Schicht“ genannt wird. Es wird vermutet, dass diese mehrschichtige Eischale verantwortlich

für die Adaptation an Umwelteinflüsse und die Unempfindlichkeit gegenüber Bekämpfungsmaßnahmen ist (Wharton 1980). So wird der Lipid- und Chitin-Schicht eine Schutzfunktion und der Proteinschicht eine Adhäsionsfunktion zugesprochen. Da dieser Parasit kein Stadium mit einer aktiven Beweglichkeit in der Umwelt besitzt, sind die langlebigen, dickschaligen Eier mit einem stark anheftenden Charakter und die hohe Fruchtbarkeit der adulten Würmer ein Kompensationsmechanismus (Clayton 1986).

Den Einfluss der Temperaturen auf die Lebendigkeit der umweltresistenten, dickschaligen Pferdespulwurm-Eiern untersuchten Koudela et al. (2006). Bei Temperaturen bis zu -20 °C für eine Woche überlebten 77 % der Parasiteneier, doch -80 °C hielten die Spulwurmeier nicht mehr unbeschadet aus. Bei hohen Temperaturen war eine Erhitzung von 60 °C für fünf Minuten notwendig, um die Eier abzutöten. Das Auffinden lebender Parasiteneier in Suspensionen, welche bei bis -20 °C gefroren waren, stellte eine wichtige Information im Hinblick auf die Epidemiologie und Bekämpfung dar.

2.1.3 Entwicklungszyklus

Eine transplazentare oder laktogene Infektion der Fohlen mit dem Pferdespulwurm kann ausgeschlossen werden (Anderson 2000). Die Fohlen infizieren sich je nach Infektionsdruck in den ersten Lebenswochen und beginnen nach der Präpatenz mit der Eiausscheidung. Folglich sind die Parasiteneier im Sommer und Herbst in den koproskopischen Untersuchungen zu finden. Der Entwicklungszyklus dieses Parasiten und der saisonale Reproduktionsrhythmus von Pferden begründen diese Gegebenheit (Relf et al. 2013). Nach Clayton (1986) hat der Spulwurm des Pferdes einen direkten Entwicklungszyklus. Unreife Parasiteneier werden über den Kot der Pferde in die Umwelt abgegeben, entwickeln sich dort bei optimalen Temperaturen zwischen 25 °C und 35 °C innerhalb von mindestens zehn Tagen zu dem infektiösen Stadium. Im Parasitenei finden zwei Häutungen zum dritten Larvenstadium, dem infektiösen Stadium, statt. Selbst unter ungünstigen Umweltbedingungen können die Eier aufgrund der dicken mehrschichtigen Eischale mehrere Jahre überleben. Werden die infektiösen larvenhaltigen Eier oral aufgenommen, gelangen sie in den Darm, wo die Larven aus den Parasiteneiern schlüpfen (Clayton 1986).

Bei Untersuchungen zur Migration von *A. suum* im Schwein konnten mikroskopisch leere Eischalen im Dünndarm gefunden werden, die einen dortigen Schlupf der Larven bewiesen (Douvres et al. 1969). In experimentellen Untersuchungen am Pferd wurde der Migrationsweg der Larven im Körper des Wirtes nachvollzogen (Clayton et al. 1979). Nach

dem Larvenschlupf und die Wanderung durch Darm und Portalvenensystem gelangten die Larven innerhalb von 24 Stunden nach der Infektion in die Leber. Dort wanderten sie rund eine Woche durch das Parenchym, bevor sie über das Blutsystem zur Lunge kamen. In der zweiten bis vierten Woche nach der Infektion waren die Spulwurmlarven im Lungenparenchym präsent. Anschließend gelangten die Parasitenlarven durch einen tracheoösophagealen Transport zurück in das Duodenum. Frühestens 14 Tage nach der Infektion war die Leber-Lungen-Wanderung abgeschlossen und die Larven begannen sich im Dünndarm zum adulten Spulwurm zu entwickeln. Bevorzugte Orte für diese Entwicklung waren das Duodenum und das proximale Jejunum des Wirtes (Clayton 1986).

In einer Studie zur Larvenmigration infizierten Clayton et al. (1979) experimentell acht Ponyfohlen mit 8.000 *P. equorum*-Eiern. Zwei Tage nach der Infektion wurden keine Larven in der Leber gefunden, jedoch hämorrhagische Spots an der Oberfläche der Leber. Sie begründeten den fehlenden Nachweis mit der sehr kleinen Größe der Larven und vermuteten in den sichtbaren Läsionen eine vorhandene Parasiteninvasion. Am siebenten Tag wurden Larven mit einer Größe von 0,58 bis 0,96 mm im Leberparenchym gefunden, in der Lunge jedoch noch nicht. Am 14. Tag wurden deutlich weniger Larven in der Leber, sehr viele 1,65 bis 2,44 mm lange Larven in der Lunge und wenige Larven gleicher Größe auch im Dünndarm entdeckt. Am 37. Tag nach der Infektion wurden keine Larven mehr in Leber oder Lunge nachgewiesen. Der größte Anteil (51 %) der Infektionsdosis wurde im Dünndarm wiedergefunden. In den Folgeuntersuchungen wurden sinkende Parasitenzahlen bei ansteigender Länge im Darm beschrieben und erste Abgänge von Würmern über den Kot ab dem 45. Tag erfasst (Clayton et al. 1979).

In früheren Untersuchungen zum Infektionsgeschehen wurden 26 Fohlen über den Zeitraum von einem Jahr beobachtet und regelmäßig Kotproben entnommen. Es wurden bei allen Fohlen Spulwurmeier im Kot nachgewiesen, jedoch kein Unterschied zwischen den im Januar und im April oder Mai geborenen Fohlen gefunden. Die ersten Parasiteneier wurden bei zwei Fohlen in der neunten Lebenswoche und bei den restlichen Fohlen in der 12. / 13. Lebenswoche nachgewiesen. Ein Höhepunkt der Eiausscheidung wurde in der 16. bis 18. Lebenswoche erreicht. Einige der überwachten Fohlen blieben bis zum sechsten Monat koproskopisch positiv und andere sogar bis zu einem Jahr (Russell 1948).

Die Zeit zwischen der Aufnahme der infektiösen Parasiteneier und dem Auftreten erster Parasiteneier im Kot wird als Präpatenz bezeichnet. Diese Zeit wurde experimentell ermittelt und beträgt bei *Parascaris*-Infektionen ca. 72 bis 110 Tage (Lyons et al. 1976; Clayton et al. 1979; Clayton 1986). Die Präpatenz ist durch eine Abhängigkeit vom Alter des Tieres und der

Infektionsdosis variabel. Bei einmaliger Infektion mit 8.000 Spulwurmeiern oder 160 Spulwurmeiern werden erste positive Kotbefunde am 83. bzw. 80. Tag nach der Infektion gefunden. Bei einer täglichen Gabe von 160 Eiern über zehn Tage wird keine patente Infektion bis zum 100. Tag nach der Infektion nachgewiesen. In dieser Studie zur experimentellen Infektion mit anschließender Nekropsie der infizierten Tiere wurde bei den Fohlen, die mit 160 Parasiteneiern infiziert wurden, eine geringere Anzahl längerer Würmer 40 Tage nach der Infektion im Darm gefunden. Hingegen wiesen Fohlen, die mit einmalig 8.000 Parasiteneiern oder wiederholt 160 Eiern infiziert wurden, quantitativ mehr, aber deutlich kürzere Würmer im Dünndarm auf (Clayton et al. 1977). Es schien als inhibierten sich die Parasiten bei einer zu großen Anzahl gegenseitig.

In weiteren Untersuchungen wiesen Fohlen bereits am 56. Lebenstag (Kornas et al. 2010) und ab einem Alter von 30 Tagen (Lyons et al. 2004) erste Spulwurmeier im Kot auf.

Eine Wanderung der Larven von *P. equorum* war in anderen Tierarten, wie Labornagern, möglich, doch zu einer Entwicklung zum fruchtbaren adulten Wurm kam es nur in der Familie der Equiden (Clayton 1978).

2.2 Parascariose

2.2.1 Pathogenese und Klinik

Parascaris-Infektionen sind bei Fohlen und Jährlingen assoziiert mit Lethargie, Appetitlosigkeit, vermindertem Wachstum, rauem Haarkleid, Hypoproteinämie, Husten und nasalem Ausfluss (Fairbairn 1961; Clayton et al. 1977; Clayton et al. 1978; Srihakim et al. 1978).

Nachdem der Lebenszyklus mit der Larvenwanderung durch Lunge und Leber beendet ist, entwickeln sich 10 bis 50 cm lange adulte Würmer im Duodenum und dem angrenzenden Jejunum (Southwood et al. 1998). So kann zwischen respiratorischen Symptomen aufgrund der Lungenwanderung der Larven und intestinalen Symptomen bedingt durch die Präsenz juveniler sowie adulter Würmer im Dünndarm unterschieden werden (Clayton 1986).

Die respiratorischen Symptome werden vor allem bei jungen Fohlen beobachtet und umfassen weißen bis gräulichen Nasenausfluss (serös bis seromukös), Husten in der dritten bis vierten Woche nach der Infektion (Clayton et al. 1978; Srihakim et al. 1978) und gehen einher mit endoskopisch nachweisbaren Mukus in den Atemwegen. Bei einer experimentellen

Infektion von Fohlen trat Husten 12 bis 17 Tage nach der Infektion mit einer großen Dosis (8.000 Eier) und 17 Tage bei wiederholter Infektion mit 160 Eiern auf (Clayton et al. 1977).

Die älteren Fohlen, beziehungsweise Jährlinge, weisen ein vielfältigeres Krankheitsbild mit einerseits respiratorischen und andererseits systemischen Symptomen wie Lethargie, Appetitlosigkeit und Gewichtsverlust auf (Clayton et al. 1978; Clayton 1986). Weiterhin ist in dieser Altersgruppe im Röntgenbild der Lunge eine interstitielle und parenchymatöse Reaktion sichtbar, die vermutlich mit der durch die Larvenwanderung assoziierten Immunreaktion in Zusammenhang gebracht werden kann (Clayton et al. 1978). Insgesamt war der Allgemeinzustand bei den jüngeren Fohlen nach den drei bis vier Wochen der Larvenwanderung deutlich schlechter als bei den älteren Tieren, so dass die Schwere der Erkrankungserscheinungen als altersabhängig betrachtet werden können (Clayton et al. 1978). Die intestinalen Symptome beruhen auf einem schnellen Wachstum zu adulten Würmern mit entsprechend hohem Energieverbrauch sowie der Bildung einer großen Menge von Fettsäuren im Zuge des parasitären Stoffwechsels. Es kommt zu einer reduzierten Futteraufnahme, Gewichtsverlust, Kolik (Clayton 1986) und schlussendlich zu einem Fohlen im reduziertem Entwicklungszustand (Clayton et al. 1978). Schwerwiegende klinische Folgen sind eine chronisch katarrhalische Enteritis aufgrund massiver Fettsäurenkonzentrationen bzw. Obstruktionen als Folge einer großen Wurmbürde im Darm. Über einen Zeitraum von drei Monaten wurden Gewichtsverluste bis zu 50 % bei Spulwurm-infizierten Fohlen nachgewiesen (Clayton et al. 1978). Weiterhin konnte in Untersuchungen eine Veränderung der Körperzusammensetzung zugunsten des „Körperwassers“ und eine Hypoalbuminämie gefunden werden. Der Albumingehalt im Serum wird offenbar durch die verminderte Bereitstellung der entsprechenden Aminosäuren beeinflusst, bedingt durch die reduzierte Futteraufnahme und der Nahrungskonkurrenz mit den Würmern im Darm. Mit einer Eingabe der markierten Aminosäure Methionin über das Futter konnte eine Aufnahme dieser Aminosäure von den Würmern nachgewiesen werden. Bei einer kleinen Wurmbürde spielt dies vermutlich keine große Rolle, doch bei einer hohen Wurmanzahl könnte es relevant sein. Die verminderte Futteraufnahme und Nahrungskonkurrenz mit den Würmern sowie die folgende Reduktion der Proteinanteile im Blut spielt wahrscheinlich eine entscheidende Rolle für das verminderte Wachstum (Clayton et al. 1980; Slocombe 1985). Eine schlechtere Konstitution wurde vor allem bei Fohlen gesehen, die experimentell einmalig eine kleine Infektionsdosis (160 Eier) bekamen (Clayton et al. 1977).

Im Fall hoher Wurmbürden im Darm kann es zur Koliksymptomatik kommen. Besonders gefürchtet ist in diesem Zusammenhang ein vollständiger Darmverschluss (Southwood et al.

1998). Es wurde ein Zusammenhang bei 72 % der ausgewerteten Kolikpatienten mit einer Entwurmung in den 24 Stunden vor der Kolik beschrieben (Cribb et al. (2006)). In dieser Studie wurden 25 *P. equorum*-assoziierte Obstruktionen bei 0,4 % der insgesamt 621 laparotomierten Pferde unter einem Lebensjahr in dem Zeitraum von 1985 bis 2004 festgestellt. Obstruktive Koliken, die durch Spulwürmer verursacht wurden, werden vor allem im Herbst beobachtet (Southwood et al. 1998; Cribb et al. 2006). In dieser Jahreszeit sind die Fohlen in dem Alter, in dem sie von den Stuten getrennt werden und noch keine ausreichende Immunabwehr gegen diese Parasitose entwickelt haben. Diese Altersgruppe weist die größte Akkumulation dieses Parasiten auf (Fairbairn 1961). Eine definitive Diagnose des Spulwurm-assoziierten Darmverschlusses ist nach Southwood et al. (1998) nur durch die Nekropsie oder eine Operation möglich. Spulwürmer im Kot oder dem Reflux des betroffenen Tieres sind nur Hinweise und werden sehr selten gefunden. Zusätzlich erschwert die Körpergröße (Baker et al. 1974) und die daraus folgende fehlende Möglichkeit der rektalen Untersuchung die Diagnose eines Spulwurm-bedingten Darmverschlusses bei Absetzern (Southwood et al. 1998). Als Komplikation wurde bei einem männlichen viereinhalb Monate alten Fohlen ein abdominaler Abszess mit einem adulten Spulwurm im Inneren gefunden. Die Adhärenz mit den umliegenden Darmabschnitten ließ eine Perforation des Darmes durch die starke Spulwurminfektion als Ursache vermuten (DiPietro et al. 1983).

In Laboruntersuchungen von Blutproben fanden Srihakim et al. (1978) eine Leukopenie am neunten Tag nach der experimentellen Infektion und anschließend einen langsamen Anstieg bis zum Normbereich am 23. Tag nach der Infektion. Weiterhin beschrieben sie eine milde Anämie und starke Eosinophilie. Bei anderen experimentellen Versuchen wurde ein signifikanter Anstieg der Eosinophilen bereits nach den ersten Tagen der Infektion gesehen (Clayton et al. 1977).

2.2.2 Pathologie

Die pathologischen Veränderungen, die assoziiert mit der *Parascaris*-Infektion beim Fohlen gefunden werden können, wurden in experimentellen Studien untersucht. In Feldstudien ist aufgrund anderer pathogener Erreger eine Zuordnung schwierig (Clayton 1986).

Es wurden zwei Typen der makroskopisch erfassbaren Veränderungen der Leber beschrieben. Einerseits waren weiße, runde 1 bis 3 mm große erhabene Knoten, die deutlich abgegrenzt waren, und andererseits weiße diffuse irreguläre Areale erkennbar. Mikroskopisch wurden Läsionen um die gefäßführenden Portalfelder gefunden, die eine Infiltration mit

Entzündungszellen und eine Fibrose aufwiesen (Brown et al. 1979). In einer Betrachtung mehrerer Fohlen zu verschiedenen Zeitpunkten zeigten Fohlen, die experimentell mit *P. equorum*-Eiern infiziert wurden, 40 Tage nach der Infektion multiple kleine (2 mm) weiße Narben unter der Leberkapsel. 95 Tage nach der Infektion wurden diese Veränderungen der Leber nicht gesehen, doch in der Lunge wurden rote, kollabierte Areale und multiple subpleurale Knoten bis zu einer Größe von 5 mm Durchmesser festgestellt. Diese Knoten waren durchsichtig, grau oder grünlich, etwas über die Oberfläche erhaben und kalzifiziert (Clayton et al. 1977). Histologisch wurde eine eosinophile Bronchitis und Bronchiolitis diagnostiziert, die später durch Lymphozyten ersetzt wurde. Weiterhin wurden viele subpleurale mit Lymphozyten infiltrierte Knoten und eine Pneumonie im kranialen Lungenlappen gefunden (Nicholls et al. 1978).

In einem weiteren Versuch konnten in der pathologischen Untersuchung der Lunge am 80. Tag nach einer Infektion fokale Areale mit einer interstitiellen Pneumonie und ein alveolares Lungenemphysem, vermutlich bedingt durch die Vorschädigung aus der Larvenwanderung, nachgewiesen werden. In den Lymphknoten von Leber und Bronchien konnten ebenso Larven gefunden werden (Srihakim et al. 1978).

Die Mesenteriallymphknoten waren ab dem 14. Tag nach der Infektion vergrößert, reaktiv und zum Teil mit Eosinophilen infiltrierte (Clayton et al. 1977; Nicholls et al. 1978).

Die pathologischen Veränderungen im Dünndarm waren auf lokalisierte oberflächliche Entzündungsareale mit Infiltration durch Eosinophile begrenzt (Jeffcott 1974; Clayton 1986).

2.2.3 Differentialdiagnosen

Zusammenfassend können die meisten der beschriebenen klinischen Erscheinungen im Rahmen einer *Parascaris*-Infektion in respiratorische und intestinale Symptome unterteilt werden.

Bei respiratorischen Symptomen wie Nasenausfluss und Husten von Fohlen und Absetzern muss differentialdiagnostisch an viele andere Erreger von Lungenerkrankungen gedacht werden. Potentielle virale Erreger sind Adeno-, Influenza- bzw. Herpesviren und das Equine Arteriitis-Virus. Bakteriell kommen Klebsiellen, Pasteurellen, *Actinobacillus equuli*, β -hämolyisierende Streptokokken, *Escherichia coli*, *Chlamydophila psittaci* und besonders *Rhodococcus equi* sowie Spross- und Schimmelpilze (*Pneumocystis*) in Betracht (Dietz et al. 2006).

Bei den intestinalen Symptomen Kolik, Enteritis und Abmagerung können einerseits Infektionserreger wie Rota- und Coronavirus, *Clostridium difficile/perfringens*, *Neorickettsia risticii*, *Lawsonia intracellularis*, *R. equi*, Kryptosporidien und Salmonellen eine Rolle spielen (Lavoie et al. 2000; Slovis et al. 2013), aber andererseits auch nicht infektiöse Ursachen (mechanisch, ulzerativ, diätetisch bedingt) nicht unbedeutend sein (Magdesian 2005).

Parasitologisch sind die Magen-Darm-Strongyliden, vor allem die kleinen Strongyliden, die zu Läsionen in der Darmwand des Blind- und Dickdarmes führen, zu beachten. Der Larvenschlupf der kleinen Strongyliden führt zur Zerstörung und Entzündung der Schleimhaut, so dass ein ausgeprägtes Darmwandödem entsteht. Bei einer verminderten Motorik und Barrierefunktion der Darmwand kommt es zu einer Endotoxämie des Tieres. Bei einer synchronen Reaktivierung kann dies zu plötzlich einsetzendem Durchfall, rapidem Gewichtsverlust und schlechtem Allgemeinbefinden führen, begleitet von milden Koliken sowie Fieber und wird als „Larvale Cyathostominose“ beschrieben (Fritzen 2005). Obwohl die großen Strongyliden aktuell weniger bedeutsam sind als die kleinen Strongyliden, spielen sie differentialdiagnostisch weiterhin eine wichtige Rolle. Die großen Strongyliden sind gekennzeichnet durch ihre parenterale Wanderung, z.B. *S. vulgaris* mit der Larvenwanderung durch die vordere Gekrösearterie. Diese Wanderungen verschaffen dieser Parasitengruppe eine besondere Pathogenität. Bei einer akuten Strongylose können klinische Erscheinungen wie thrombotisch-embolische Kolik (*S. vulgaris*), Lethargie und Fieber auftreten. Die chronische Verlaufsform ist mit Inappetenz, schlechter Kondition, Abmagerung, intermittierendem Durchfall und Koliksymptomatik durch ähnliche Symptome wie die Parascariose gekennzeichnet. Aufgrund des externen Entwicklungszyklus von Parasiteneiern zu infektiösen frei lebenden Larven L3 ist auch dies vorwiegend eine Weideinfektion (Deplazes et al. 2012). Eine weitere Weideinfektion ist die Infektion mit dem Pferdebandwurm (*Anoplocephala perfoliata*). Dieser Helminth nutzt die Moosmilbe als Zwischenwirt, so dass eine Infektion der Pferde durch Aufnahme dieser Moosmilben mit dem Weidegras erfolgt. Die Lokalisation dieses Parasiten an dem ileocecalen Übergang erschwert bei einem starken Befall die Ingestapassage an dieser Stelle und sorgt neben der mechanischen Behinderung zusätzlich für einen negativen Einfluss auf die Muskelschicht und Nervenweiterleitung in dieser Region. In Untersuchungen von Proudman et al. (1999) wurde ein Zusammenhang zwischen dem Pferdebandwurm und intestinalen Störungen sowie Kolik beschrieben.

2.3 Diagnostik und Bekämpfung

2.3.1 Diagnostik

Nach der Zeit der Präpatenz können die ausgeschiedenen Spulwurmeier koproskopisch mittels Flotationsverfahren nachgewiesen werden. Patente Infektionen werden gelegentlich auch durch Abgänge unreifer Würmer mit dem Kot gefunden. Der Nachweis einer Eosinophilie durch die Wanderung der Larven kann hinweisend sein (Deplazes et al. 2012).

2.3.1.1 FLOTAC-Verfahren

Das Auszählen der Eianzahl im Kot gehört zu einer weit verbreiteten parasitologischen Diagnostikmethode. Diese Technik wird zur Einschätzung der Prävalenz und Intensität bei epidemiologischen Studien, einer Quantifizierung der Effizienz von Entwurmungsmitteln und zum Nachweis von Resistenzen gegen entsprechende Medikamente genutzt. Zur Verbesserung der Genauigkeit im Nachweis von Parasiteneiern im Kot wurde eine neue Methode entwickelt, bei der die Sensitivität sehr viel höher ist als bei den bisher genutzten Flotationsverfahren. Alle koproskopischen Untersuchungen zum Einschätzen der Parasitenelemente, wie z.B. Eier, Larven oder Oozysten, basieren auf der mikroskopischen Untersuchung einer definierten Menge Kot. Nachdem 1930 die Stoll-Technik beschrieben wurde, folgten die McMaster-Technik, die Wisconsin-Flotationsmethode und die modifizierte Salz-Zucker-Flotationstechnik von Mes (Cringoli 2006). Die traditionellen McMaster- und Wisconsin-Techniken (Gordon 1939; Egwang et al. 1982) dienten als Grundlage in der Entwicklung der FLOTAC-Methode. Es wurde ein FLOTAC-Apparat entwickelt, mit dem nach Flotation, Zentrifugation und Überführen der oberen Schicht in ein Zählfenster, alle parasitären Elemente gesammelt werden. Ein Auszählen der Eier im Zählfenster ermöglicht eine Angabe der Ei-Anzahl pro Gramm Kot (EpG) und somit eine quantitative Angabe (Cringoli 2006). Aus der ursprünglichen Sensitivität von den üblichen 50 EpG bei der McMaster-Technik konnte eine Sensitivität von einem EpG erreicht werden, womit sich die Aussage in der koproskopischen Diagnostik deutlich verbessert.

Die FLOTAC-Technik besteht aus insgesamt elf Schritten. Eine Kotprobe (10 g) wird abgewogen und 1 : 10 mit Leitungswasser verdünnt. Anschließend wird die Suspension homogenisiert, über ein Sieb die festen Bestandteile entfernt und der Durchlauf in ein Reagenzglas gefüllt. Dieses wird zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das eihaltige Sediment wird in einer Flotationslösung resuspendiert und in die Kammern des FLOTAC-

Apparates pipettiert. Zur Zentrifugation befinden sich die Zählfenster mit dem Zählnetz am oberen Rand der Kammern. Die flotierenden Parasiteneier können während der Zentrifugation zum Zählnetz flutieren, während andere Bestandteile zum Boden sedimentieren. Nach der Zentrifugation wird der obere Anteil des FLOTAC-Apparates mit dem Zählnetz vorsichtig eine Position weiter gedreht, so dass das Auszählen der Eier unter dem Mikroskop unter guter Sicht möglich wird. Bei der Auszählung beider Kammern aus einer Kotprobe hat dieses Verfahren eine analytische Sensitivität von einem EpG und bei der simultanen Untersuchung von zwei Tieren in einem Apparat liegt die Sensitivität bei zwei EpG für jedes einzelne Fohlen (Cringoli 2006; Cringoli et al. 2010). Die Zahl der falsch negativen Ergebnisse war bei dieser Methode deutlich geringer und der EpG-Mittelwert war ähnlich oder höher als bei anderen Techniken. Dieser Technik, die zunächst für wissenschaftliche und spezialisierte Labore entwickelt wurde, wird eine hohe Präzision und akkurate Ergebnisse zugesprochen (Cringoli et al. 2010).

2.3.1.2 Einfluss auf die koproskopisch nachgewiesenen EpG-Werte

Die Spanne der bei Spulwurm-infizierten Pferden ermittelten EpG-Werte ist sehr groß. So wurden EpG-Zahlen von mehreren hundert *Parascaris*-Eiern beschrieben (Gawor 1995; Lyons et al. 2006) und ein Maximum von 6.200 EpG ermittelt (Kornas et al. 2010). Clayton und Duncan fanden 1979 in den USA ein Maximum von 17.500 EpG vier Monate nach einer experimentellen Infektion mit 8.000 Eiern. Dies entspricht einer täglichen Eiausscheidung von 50 Millionen Eiern. Die EpG-Zahlen variieren stark innerhalb des Tages und von Tag zu Tag und lassen keinen Rückschluss auf die Anzahl der Würmer im Darm zu (Clayton et al. 1979).

Einen Einfluss auf die EpG-Zahl hat die Infektionsdosis und das Alter der infizierten Tiere (Clayton et al. 1978). Höhere Prävalenz und EpG-Mittelwerte wurden bei drei bis vier Monate alten Fohlen beobachtet (Laugier et al. 2012). Schwankende EpG-Werte im Kot können nicht durch eine inhomogene Verteilung der Parasiteneier im Kot erklärt werden (Kuhnert-Paul et al. 2012).

Schlussendlich sollte eine Aussage zu dem EpG-Wert vorsichtig formuliert werden. Einerseits kann mittels der Kotuntersuchung eine große Anzahl unreifer Würmer ohne Eiablage nicht erfasst werden. Andererseits lässt die große Fruchtbarkeit der weiblichen adulten Würmer mit ihrer intermittierenden Ausscheidung keine Rückschlüsse auf die Intensität der Wurmbürde zu (Southwood et al. 1998). Laut Uhlinger (1993) werden bei einer Spulwurminfektion die

EpG-Werte eher unterschätzt, da die Parasiteneier mit der hohen Dichte schwerer flotieren als zum Beispiel Magen-Darm-Strongyliden-Eier mit einer geringeren Dichte. Niedrige EpG-Werte sind oft mit zahlreichen adulten Würmern im Darm von Fohlen vergesellschaftet (Uhlinger 1993). In der derzeitigen Diagnostik ist ein Nachweis der Larvenwanderung und der aktuellen Wurmbürde im Darm nicht möglich (Nielsen, Baptiste et al. 2010).

2.3.2 Bekämpfung

2.3.2.1 Maßnahmen in Haltung/Management

Russell (1948) beschrieb eine Unabhängigkeit des Managements von Spulwurminfektionen des Pferdes im Gegensatz zu Infektionen mit den Magen-Darm-Strongyliden. In neueren Veröffentlichungen wurde aufgrund der Widerstandsfähigkeit und Langlebigkeit der infektiösen Eier sowie der hohen Fruchtbarkeit der adulten Würmer als entscheidendes Ziel zur Parasitenkontrolle die Vermeidung der Umweltkontamination mit den Eiern genannt (Clayton 1986; Southwood et al. 1998). Zu den Managementmaßnahmen zählen dabei die Vermeidung einer zu hohen Tierdichte, Quarantänemaßnahmen bei der Einnistung neuer Pferde, keine Fütterung vom Boden, Kompostierung des Mists und regelmäßige Kontrollen des Behandlungserfolges mittels Kotproben (Brady et al. 2009).

Zu den Maßnahmen zur Reduktion der Umweltkontamination mit Eiern von *Parascaris* spp. gehören zweimal wöchentliches Absammeln der Kothaufen von Weide oder Paddock, eine Weiderotation sowie als wichtigste Maßnahme eine regelmäßige Stallreinigung mit einer wirksamen Desinfektion (Cribb et al. 2006; Brady et al. 2009). Ein Weidewechsel nach der Entwurmung ist kritisch zu betrachten, wenn die Tiere aufgrund einer Ineffizienz der Entwurmungsmittel Spulwurmeier weiter ausscheiden (Relf et al. 2013).

Zum Einfluss der Umgebung gibt es die Vermutung, dass Pferde aus der Stallhaltung weniger betroffen sind als Pferde mit Weideaufenthalt (Getachew et al. 2008). In der Studie von Mfitalodze et al. (1989) wurde ebenso ein signifikanter Unterschied in der Prävalenz zwischen den im Stall und auf dem Paddock gehaltenen Pferden gefunden. So sind Pferde vom Paddock eher mit dem Pferdespulwurm infiziert als im Stall gehaltene Pferde. Diese Untersuchungen bestätigen, dass durch die Möglichkeit einer wirksamen Oberflächendesinfektion im Stall, eine orale Aufnahme infektiöser, larvenhaltiger Eier deutlich reduziert werden kann, was auf dem Paddock oder der Weide nicht möglich ist. Eine regelmäßige Desinfektion mit einem wirksamen Präparat für *Parascaris* spp. führt zu einem verringerten Infektionsrisiko mit Spulwurmeiern (Fritzen et al. 2010).

Wenngleich eine Stallhaltung die Infektionsgefahr erheblich senken würde, widerspricht eine reine Haltung der Pferde im Stall der artgerechten Haltung. Pferde verbringen einen Großteil des Jahres auf dem Paddock/Auslauf, da die Weiden meist nur einige Monate im Frühling und Sommer genutzt werden können. So hat sich auch Ihler (1995) mit den Umgebungsbedingungen beschäftigt und den Einfluss verschiedener Böden auf den Anteil embryonierter Spulwurmeier und die Quantität der Parasiteneier in verschiedenen Bodenschichten untersucht. Nach 18 Monaten ohne Nutzung wurden noch Spulwurmeier in den oberen 15 cm des Bodens gefunden. Jedoch haben Sandböden eine bessere Drainage und es wurden weniger *Parascaris*-Eier in den oberen Schichten von diesem Bodentyp nachgewiesen. Der Anteil der embryonierten Eier an der Gesamtzahl der Eier bei Lehm Böden ist geringer, erklärbar durch eine geringere Sauerstoffverfügbarkeit.

Als zusätzliche Maßnahme könnte dem Boden der Paddocks vermehrt Sand zugesetzt werden oder dieser sogar komplett ausgetauscht werden. Ein Zusatz von Sand erhöht die Drainagefunktion und in Verbindung mit Regenwasser sickern mehr Eier in tiefere Schichten ein, wodurch die Wahrscheinlichkeit der oralen Aufnahme sinkt (Ihler 1995).

Eine weitere Maßnahme ist, den Mist nicht auf die Weide oder Felder zu verbringen, die der Erzeugung von Tierfutter dienen, da die im Mist enthaltenen Eier durch die Eigenschaften der Widerstandsfähigkeit und Langlebigkeit eine erneute Infektionsquelle darstellen (Pecson et al. 2007). Die Reduktion des infektiösen Stadiums in der Umwelt ist das entscheidende Kriterium zur Kontrolle der Infektion mit diesem Parasiten. Aufgrund der Eigenschaften ist es jedoch schwierig, wenn nicht sogar unmöglich, alle Eier zu eliminieren (Clayton 1986).

2.3.2.2 Anthelminthikaeinsatz

Ab welchem EpG-Wert eine Behandlung von Spulwürmern empfehlenswert ist, fragte Uhlinger (1993) verschiedene Parasitologen und kam zu dem Ergebnis, dass vier von fünf Autoren ab einem Spulwurmei die Fohlen behandeln würden und ein Autor ab 100 bis 200 EpG die Behandlung des betroffenen Fohlens empfiehlt.

Die Behandlung mit Anthelminthika in einem Intervall, welcher unter der Präpatenz des Parasiten liegt, soll die Reproduktion verhindern und zur Elimination führen. Es sind bereits einige Resistenzerscheinungen gegen die Wirkstoffgruppe der makrozyklischen Laktone beschrieben (Boersema et al. 2002; Hearn et al. 2003; Stoneham et al. 2006; Craig et al. 2007; Samson-Himmelstjerna et al. 2007; Schougaard et al. 2007; Slocombe et al. 2007; Lindgren et

al. 2008; Lyons et al. 2008; Veronesi et al. 2009; Reinerneyer et al. 2010; Nareaho et al. 2011).

Bei der Behandlung mit den auf dem Markt vorhandenen Entwurmungsmitteln zur Bekämpfung des Parasiten ist zu beachten, dass nicht vor dem 60. bis 70. Lebensstag begonnen, ein Abstand von zwei Monaten eingehalten und ein Kotprobenmonitoring zur Überwachung der Entwurmungseffizienz bei drei bis vier Monate alten Fohlen empfohlen wird (Reinemeyer et al. 2009; Deplazes et al. 2012; von Samson-Himmelstjerna 2012). Eine Entwurmung mit einer höheren Frequenz verstärkt die Selektion von Resistenzen gegen die verwendeten Entwurmungsmittel und es kommt zum Nachweis steigender Resistenzen gegenüber Entwurmungsmittel (siehe Kapitel 2.7). Die Ausbildung von Resistenzen und hohen postoperativen Komplikationen einer Operation bei einer obstruktiven Kolik (Southwood et al. 1998; Cribb et al. 2006) lassen die Notwendigkeit der Präventivmaßnahmen ansteigen.

2.3.2.3 Biologische Maßnahmen

In einer Studie mit *A. suum*-Eiern wurde der positive Einfluss von Ammonium und Einsatz von Branntkalk (Kalziumoxid) zur Bekämpfung von Spulwurmeiern ermittelt. Die Inaktivierung der Eier wird einer Erhöhung von pH- und Temperaturwert zugeschrieben. Mit steigender Ammoniumkonzentration und damit verbundenem pH-Anstieg im Misthaufen kommt es bereits bei bis zu 40 °C zu einer vermehrten Inaktivierung von Ascariden-Eiern (Pecson et al. 2007). In Untersuchungen mit *A. lumbricoides* wurde der Einsatz von Branntkalk näher beschrieben. Branntkalk in Verbindung mit Wasser führt zu einem Temperaturanstieg, der zur Inaktivierung der Eier führt (Polprasert et al. 1981). Bei Untersuchungen mit *Parascaris*-Eiern in Kentucky, USA, wurde die Kompostierung zur Reduktion der infektiösen Spulwurmeier bestätigt. In betroffenen Beständen sollte der Pferdemist in Form von Schwaden gestapelt werden. Dies ist eine effektive Methode zur Inaktivierung der im Mist enthaltenen Parasiteneier. Mit dieser Art der Lagerung kann der Infektionsdruck, bedingt durch den Pferdemist, gesenkt werden (Gould et al. 2013).

2.4 Immunologie

Die equine Spulwurminfektion ist in erster Hinsicht eine Jungtiererkrankung. Die Aufnahme maternalen Antikörper nach der Geburt (passive Immunität) spielt eine besondere Rolle für

die Infektion und Diagnostik. Im serologischen Nachweisverfahren zur Detektion der Infektion erschweren diese maternalen Antikörper im Fohlenserum die Aussage. Eine Unterscheidung zwischen maternal übertragenen und vom Fohlen endogen produzierten Antikörpern zur Detektion einer Parasiteninfektion ist daher notwendig.

2.4.1 Immunglobuline beim Pferd

Die Immunglobuline (Ig) sind aufgrund unterschiedlicher Antigenität in fünf Klassen unterteilt (IgG, IgM, IgA, IgE und IgD). Die Immunglobuline der Klasse IgG und IgA werden in weitere Unterklassen eingeteilt (Janeway et al. 2002).

Eine Studie beschreibt die Unterteilung der Immunglobulin der Klasse G in fünf Unterklassen, namens IgGa, IgGb, IgGc, IgG (T) und IgG (B) (Lewis et al. 2008). In neueren Untersuchungen mit IgG1 bis IgG7 werden insgesamt sieben Unterklassen von der Klasse G erfasst (Wagner 2006). Dabei reagieren im ELISA IgGa mit IgG1, IgGb mit IgG4 und IgG7, IgGc mit IgG6 und IgG(T) mit IgG5 sowie gering mit IgG2 und IgG3. Bei folgenden Untersuchungen mit dem polyklonalen IgG (H+L) wurden alle sieben Unterklassen des IgG erkannt (Lewis et al. 2008).

Der Immunglobulinklasse G wird eine besondere Rolle zugesprochen, da in Kolostrumproben der Stuten vor allem Immunglobuline der Klasse G und G (T), neben geringeren Anteilen von IgM und IgA gefunden wurden (Rouse et al. 1970). Diese Klasse scheint auch in der Immunabwehr eine besondere Rolle beim Pferd zu spielen. Anhand der Halbwertszeit, der Quantität, sowie der Rolle im Infektionsgeschehen beim Pferd ist die Unterklasse IgGb als kritisches Immunglobulin für die Resistenz gegenüber Infektionen zu betrachten, gefolgt von IgG (T) (Sheoran et al. 1997).

2.4.2 Antikörper in der Stutenmilch

Jeffcott (1974) beobachtete den Verlauf des Gehaltes an Totalproteinen im Blut bei trächtigen Stuten und fand einen deutlichen Abfall von Proteinen in dem Zeitraum von zwei bis drei Wochen vor bis zwei Wochen nach der Geburt. Es scheint eine selektive Konzentrierung von Globulinen, besonders den γ -Globulinen, in der Milchdrüse stattzufinden.

Vermutlich ist die Veränderung der Hormongehalte von Östrogen zum Progesteron am Ende der Trächtigkeit, wie dies bei der Kuh nachgewiesen wurde (Smith et al. 1971), ursächlich. Diese Konzentrierung von Globulinen ist so effektiv, dass in der ersten Muttermilch

(Kolostrum) Immunglobulingehalte nachgewiesen wurden, die der doppelten Menge der Gehalte im Serum der Stuten entsprechen. Bei einer folgenden Untersuchung von Stutenkolostrum wurde festgestellt, dass die höchsten Proteinwerte (25 g/100 ml) vor dem ersten Saugen des Fohlens im Kolostrum enthalten waren (Rouse et al. 1970; Jeffcott 1974; Sheoran et al. 2000) und es bereits 48 h nach der Geburt zu einem starken Abfall der Proteine auf 2,9 g/100 ml kam. Dieser niedrige Proteingehalt war bis zum zehnten Tag nach der Geburt nachweisbar. Erst nach dem zehnten Tag stieg die Proteinmenge in der Milch der Stuten langsam wieder an (Jeffcott 1974).

Innerhalb der ersten 24 h sanken die Antikörpergehalte um mehr als das 40-fache in der Milch ab. Bei den IgA-Werten war im Gegensatz zu den IgG-Unterklassen nur ein kurzer Abfall und anschließend langsamer Anstieg in den Wochen nach der Geburt sichtbar. Dies ließ Sheoran vermuten, dass IgA lokal in der Milchdrüse produziert wird und IgG aus dem Stutenserum in die Milchdrüsen gelangt (Sheoran et al. 2000).

2.4.3 Passive Immunität

Das Pferd hat eine diffuse epitheliochoriale Plazenta, die keinen signifikanten Übergang von Makromolekülen, wie Antikörpern, zum Fohlen ermöglicht (Martin et al. 1973; McGuire et al. 1973; Jeffcott 1975; Erhard et al. 2001). Aus diesem Grund können im Blut von neugeborenen Fohlen keine Globuline gefunden werden, es besteht eine Agammaglobulinämie und die Aufnahme der ersten Muttermilch (Kolostrum) ist für den Aufbau einer passiven Immunität in den ersten Lebenswochen essentiell (McGuire et al. 1973; Jeffcott 1974; Holznagel et al. 2003). Bei neugeborenen Fohlen wurde diese Agammaglobulinämie auch von Rouse (1971) und Jeffcott (1974) bestätigt. Andere Autoren berichteten jedoch von geringen Mengen von IgM (McGuire et al. 1973) oder IgGa im Serum (Sheoran et al. 2000; Erhard et al. 2001) von Fohlen vor der ersten Kolostrumaufnahme.

Saugt das Fohlen das erste Mal kurz nach der Geburt, so kommt es zur Aufnahme der essentiellen maternalen Antikörper aus der Stutenmilch in den Fohlenorganismus. Bei Untersuchungen zum Mechanismus der Antikörperaufnahme aus dem Kolostrum fand man spezialisierte Epithelzellen im Dünndarm des Neonaten, die diese Immunglobuline mittels Pinozytose aufnehmen (Jeffcott 1975). Hinsichtlich der Klasse G der Immunglobuline wurde eine schnellere Absorption festgestellt als bei IgA und IgM. So waren die IgG-Konzentrationen in untersuchten Seren der Fohlen doppelt so hoch wie im Kolostrum, doch

bei den Klassen M, A und (T) lagen die Werte unter den Werten aus dem Kolostrum (McGuire et al. 1973).

Ein Höchstwert der Immunglobuline im Serum wurde 12 bis 18 h (Jeffcott 1974; Erhard et al. 2001) bzw. 24 h nach der Geburt ermittelt (Rouse 1971; McGuire et al. 1973). Ein zweiter Höchstwert wurde nach sechs bis acht Monaten erfasst (Jeffcott 1974). Nach dem ersten Peak wurde ein Absinken des Antikörperspiegels ab 24 h nach der Geburt beobachtet (McGuire et al. 1973; Jeffcott 1974; Erhard et al. 2001). Dieser Abfall war bis in den ersten und zweiten Lebensmonat der Fohlen nachweisbar (Rouse 1971). Das Absinken der Globuline wird nach Jeffcott (1974) verursacht durch den Katabolismus der Antikörper und eine Verdünnung, bedingt durch das ansteigende Volumen des Plasmas. Der Immunglobulinwert sank bis zur vierten Lebenswoche auf 46 % des ursprünglichen Gehaltes ab. Untersuchungen von Erhard et al. (2001) wiesen ebenso am 35. Lebenstag die niedrigsten Werte (50 % der maximalen IgG-Werte) und einen anschließenden Anstieg durch die Eigensynthese nach. Als Anhaltspunkt zur Bewertung der Versorgung des Fohlen mit Antikörpern konnte eine positive Korrelation zwischen dem Serum von Stute und Fohlen gefunden werden, jedoch nicht zwischen Kolostrum und Fohlenserum (Erhard et al. 2001). Hingegen wurde in einer früheren Studie eine Korrelation des IgG-Gehaltes des Kolostrums der Stute mit dem IgG-Gehalt des Fohlenserums gefunden. Dies traf für die anderen Immunglobulinklassen jedoch nicht zu (Kohn et al. 1989). Insgesamt wird IgG als dominante Antikörperklasse bei Stute und Fohlen in Serum sowie Kolostrum beschrieben (Rouse 1971; Jeffcott 1974; Sheoran et al. 2000; Erhard et al. 2001). Zur Evaluierung der ausreichenden Serumkonzentration von IgG, die durch die Kolostrumqualität, die aufgenommene Menge und die Effizienz der Aufnahme im Darm bedingt sein kann, wurde eine Spanne von neun bis zwölf Stunden angegeben. In dieser Zeit ist eine Supplementierung von Kolostrum möglich (Erhard et al. 2001).

Die klinische Relevanz der ausreichenden Kolostrumaufnahme wurde bei zwei Fohlen untersucht, denen kein Zugang zum Kolostrum gegeben wurde. Das Serum dieser beiden Tiere blieb bis zur zweiten Lebenswoche agammaglobulinämisch. Ab der zweiten Lebenswoche kam es zu einem Anstieg der γ -Globuline durch die Entwicklung der aktiven Immunität. Nach der fünften Lebenswoche war eine Annäherung an den Immunglobulingehalt der normal saugenden Fohlen sichtbar. Eines dieser Fohlen ohne Kolostrumaufnahme zeigte im Alter von einem Lebensmonat klinische Erscheinungen mit geschwollenen Hinterbeinen und gefüllten Gelenken. In dieser Phase wurde ein sinkender Globulingehalt im Serum erfasst. Es kam jedoch zur klinischen Genesung und wieder ansteigenden Immunglobulingehalten im Blut (Jeffcott 1974).

2.4.4 Maternale Antikörper im Fohlen

Sheoran et al. (2000) beschäftigten sich mit den einzelnen Ig-Unterklassen (Isotypen) im Serum und Nasenausfluss beim Pferd sowie deren plazentaren Transfer und konnten in Blutproben vor der Kolostrumaufnahme keine nachweisbaren Mengen von IgGb, IgGc, IgG(T) und IgA finden, jedoch sehr geringe Mengen von IgGa. Es wurde ebenso ein Höchstwert von allen Isotypen am ersten Lebenstag und folgendes Absinken bis zum 28. bzw. 42. Tag beschrieben. Das Verhältnis der Immunglobuline IgGb, IgG(T) und IgGa war in der 1. Lebenswoche 3,7 : 2 : 1 und im Vergleich bei den erwachsenen Pferden 4,6 : 2,3 : 1 (Holznagel et al. 2003).

Die Halbwertszeiten der Immunglobuline im Serum der Fohlen wurden für IgGa mit 17,6 Tagen, für IgGb mit 32 Tagen, für IgG(T) mit 21 Tagen und für IgA mit 3,4 Tagen angegeben. So erwies sich IgGb in Anbetracht der Quantität und Halbwertszeit als dominanter Isotyp im Serum des Fohlens und dem Kolostrum sowie IgA zusätzlich im Kolostrum. Der Isotyp IgGc war bis zum 63. Lebenstag nicht nachweisbar. Bis zu diesem Tag war eine eher insuffiziente Eigensynthese, eventuell bedingt durch den langsamen Abbau, nachweisbar. Es scheint als wäre IgGb von der größten immunologischen Bedeutung in diesem Lebensalter (Sheoran et al. 2000).

Von Jeffcott (1974) wurde nicht zwischen den Isotypen der Antikörper im Fohlenserum unterschieden, jedoch in der zusätzlichen Verabreichung von Kolostrum. Die Halbwertszeit von IgG im Serum von Fohlen mit normaler Kolostrumaufnahme lag bei 23 Tagen. Bei einer zusätzlichen Kolostrumeingabe wurden höhere γ -Globulinspiegel erreicht und deren Halbwertszeit sank im Mittel auf 18 Tage.

Es wird eine Übergangsphase zwischen der zweiten Lebenswoche und dem vierten Monat beschrieben, in der die passive Immunität durch die maternalen Antikörper nachlässt und eine endogene Synthese ansteigt (Jeffcott 1974; Erhard et al. 2001). Eine aktive endogene Antikörpersynthese wurde bei Fohlen, die normal Kolostrum erhielten, ab der vierten Lebenswoche (McGuire et al. 1973; Jeffcott 1974) und bei Fohlen, die kein Kolostrum aufgenommen hatten, ab der zweiten Lebenswoche nachgewiesen (Jeffcott 1974).

Diese in der Literatur häufig als „immunologische Lücke“ bezeichnete Übergangszeit zwischen Abfall der maternalen Antikörper und dem Anstieg der ersten eigenen Antikörper liegt zwischen dem zweiten und vierten Lebensmonat (Rouse 1971).

Die Konzentrationen der Antikörper stiegen nachweislich an und erreichten bei IgGa in der achten Lebenswoche und bei IgG(T) und IgA in der zwölften Lebenswoche stabile Werte. Bei

dem Isotyp IgG₁, dem die größte Bedeutung in diesem Alter zugesprochen wurde, war ein stetiger Abfall bis zur 12. oder 16. Woche und anschließend ein langsamer Anstieg nachweisbar (Holznagel et al. 2003). Ab dem vierten Lebensmonat waren deutliche Anstiege aller Immunglobulinklassen zu verzeichnen (Rouse 1971).

Bei Vakzinierungsversuchen mit Tetanus-Toxoid und Influenza-Impfstoff von Fohlen wiesen Wilson et al. (2001) spezifische Antikörper postkolostral nach, die in den folgenden vier Wochen absanken. Eine Reaktion auf eine Vakzinierung im dritten Monat blieb aus und auch im sechsten Monat fiel die Reaktion auf die Vakzine geringer aus als bei Jährlingen. Dieser Verlauf ließ auf eine Präsenz der maternalen Antikörper bis zum sechsten Lebensmonat schließen.

2.4.5 Immunologische Reaktionen auf Parasiten-/Bakterieninfektionen

Experimentelle Studien zeigten, dass sich sogar bei einer fehlenden früheren Exposition mit *Parascaris* spp. eine signifikante altersabhängige Immunität ab einem Alter von sechs Monaten entwickelte. Die altersabhängige unterschiedliche Reaktion auf eine Larvenwanderung in der Lunge und die bessere Kondition sowie stetig kleine EpG-Zahlen verdeutlichen die Möglichkeit einer altersabhängigen Immunreaktion mit Abtötung von Larven in der Lunge (Clayton 1978; Clayton et al. 1979). Im Vergleich zu Fohlen hatten ältere Pferde weniger Lungen- und Leberläsionen nach einer Infektion, was einen Kontakt mit dem Immunsystem während dieser Organwanderung der Larven vermuten lässt (Clayton 1986). Obwohl es sich bei der Spulwurminfektion um eine typische Jungtiererkrankung handelt, wurden kleine Wurmbürden bei Pferden bis zu vier Jahren nachgewiesen (Lyons et al. 2006). In einer Untersuchung des Wurmbefalls in Brandenburg, Deutschland, war ein Anteil von 1 % positiv für *P. equorum* von 1294 untersuchten Kotproben der erwachsenen Pferde. Bei ein- bis zweijährigen Pferden waren es 6 % und bei der Altersgruppe unter einem Jahr waren es 33 % der Pferde. Diese Verteilung in der Altersstruktur entsteht durch die Fähigkeit, eine funktionierende Immunität gegenüber den Parasiten aufzubauen (Hinney et al. 2011).

Dem Immunglobulin IgE wurde eine wichtige Rolle bei der Reaktion des Immunsystems auf parasitäre Infektionen zugeschrieben. In Blutproben von Fohlen wurde IgE in den ersten Lebensmonaten nachgewiesen, doch handelte es sich um IgE maternalen Ursprungs (Wagner et al. 2006). Die Eigensynthese der Fohlen startet erst ab dem sechsten Lebensmonat (Marti et al. 2009) bzw. ab dem neunten bis elften Lebensmonat (Wagner et al. 2006).

Die Immunglobuline der Klassen IgG_b und IgE erfüllen wichtige Aufgaben für die Abwehr von bakteriellen, viralen und parasitären Infektionen. Eine späte Eigensynthese ab dem achten bzw. zehnten Lebensmonat nachzuweisen, war unter Beachtung der bereits bestehenden endogenen Abwehr bis zu diesem Alter überraschend (Wagner et al. 2006). Zu den Isotypen der Klasse IgG wurden Untersuchungen zum Verlauf bei einer Druse-Erkrankung durchgeführt. Der Isotyp IgG(T) hatte einen Anteil von 13 %, stieg bei den konvaleszenten Pferden erst ab der dritten Woche an und erreichte den höchsten Spiegel fünf Wochen nach Beginn der Erkrankung. Dieser Subtyp scheint im Gegensatz zu z.B. IgG_b ohne Bedeutung zu sein. Der Isotyp IgG_a hatte ein ähnliches Verlaufsmuster (Sheoran et al. 1997).

2.4.6 Untersuchungen zur Immunisierung mit *Ascaris suum*-Antigenen

Mit der Spezies *A. suum* wurden verschiedene Versuche durchgeführt, die eine Immunität von Schweinen erreichen sollten. Bereits in den 60er Jahren wurde somatisches und exkretorisch-sekretorisches Antigen (ES) von verschiedenen *A. suum*-Larvenstadien intraperitoneal appliziert. Die Reaktion des Immunsystems nach experimenteller Infektion wurde anhand der Lungenveränderungen bewertet. Bei einer hohen Gabe von ES-Antigen wurde eine gewisse „Immunität“ und damit verbundene Larvenreduktion in der Lunge beobachtet. Allerdings konnte keine protektive Immunität gegenüber dem Parasiten induziert werden (Guerrero et al. 1969; Guerrero et al. 1971). In weiteren Untersuchungen beschrieben Urban et al. (1985) den Aufbau einer möglichen protektiven Immunität durch die Eingabe von ES-Material. Es wurde eine Art Boostereffekt durch die orale Eingabe von embryonierten Eiern eine Woche nach der ersten intraperitonealen Injektion nachgewiesen. Um den Erfolg zu überprüfen wurden pathologische Veränderungen der Organe und die Serumantikörpertiter, die im Rahmen der Bildung einer protektiven Immunität gebildet werden, im ELISA erfasst. Weitere Tests wurden jedoch für notwendig erachtet. In den Folgestudien wurde mit Hilfe einer 24 kDa-Fraktion, die in der Hypodermis und dem Darmepithel von *A. suum*-Lungenstadien vorkommt, ein rekombinantes Antigen hergestellt und für Vakzinierungsversuche verwendet. Diesem Protein wurde eine wichtige Rolle bei der Häutung der Larven und in metabolischen Prozessen zugeschrieben. Die Seren der infizierten Mäuse enthielten hohe Titer von IgG und die Tiere entwickelten eine protektive Immunität (Islam et al. 2005). Bei Infektionsversuchen mit *A. suum* an Schweinen waren hohe Titer von IgM und IgG1 mit einer geringeren Anfälligkeit für eine *A. suum*-Infektion korreliert (Frontera et al. 2003).

Eine Immunantwort von Schweinen nach einer Immunisierung mit AsHb-Antigen wurde beobachtet. So wurden bei den immunisierten Schweinen mehr Milchspots, als Zeichen einer vermehrten Immunreaktion, nachgewiesen. Ein Unterschied in der Wurmanzahl im Darm zwischen immunisierten und nicht immunisierten Schweinen wurde jedoch nicht gefunden. Eine wirksame Protektion unter Verwendung des *A. suum*-Hämoglobin-Antigens (AsHb) zur Impfung der Schweine wurde nicht ermittelt (Vlaminck et al. 2011). Eine Reaktion des Immunsystems war nachweisbar, jedoch nicht wirksam gegen die Wurmbürde im Darm der Schweine. Zur weiteren Abklärung der Rolle des Immunsystems wurden Versuche mit wiederholter Eingabe von 100 *A. suum*-Eiern und einmaligen Eingaben von 5.000 Eiern durchgeführt. Die Immunreaktion im Darm wurde an getöteten Tieren untersucht. Es konnten erhöhte Zellzahlen von Eosinophilen in der Schleimhaut und geringere Wurmanzahlen bei den wiederholt infizierten Schweinen festgestellt werden. In einer *in vitro*-Kultivierung von *A. suum*-Larven und Eosinophilen wurde der Kontakt dieser Zellen mit den Spulwurmlarven nachgestellt. Die Eosinophilen waren in der Lage die migrierenden Schweinespulwurmlarven zu töten und so wurde diesen Zellen eine entscheidende Rolle in der Immunabwehr der Darmwand zugesprochen. Ein wirksamer Schutz vor einer Klinik und erhöhte Werte der Eosinophilen im Darm waren jedoch nur bei Tieren mit einer längeren Exposition nachweisbar. Immune Schweine wiesen in dieser Studie eine Reduktion der Larvenanzahl von 99,7 % auf (Masure et al. 2013).

2.5 In vitro-Kultivierung zur Gewinnung des exkretorisch-sekretorischen Antigens (ES)

2.5.1 Gewinnung von Ascariden-Eiern

Mit der Fragestellung, ob sich aus dem Uterus gewonnene *A. suum*-Eier genauso wie aus dem Kot isolierte Eier entwickeln, beschäftigten sich Oksanen et al. (1990). Drei verschiedene Medien zur Embryonierung wurden untersucht und anschließend die Infektiosität dieser entwickelten Eier an Schweinen getestet. Nach der Embryonierung in 0,1 N H₂SO₄ für drei Wochen waren die entwickelten Eier vergleichbar infektiös wie die in Wasser embryonierten *A. suum*-Eier. Einer Gewinnung von *Ascaris*-Eiern aus dem Uterus der weiblichen Würmer für experimentelle Zwecke stand somit nichts im Wege (Oksanen et al. 1990). Für weitere Versuche mit *A. suum* wurden aus frisch geschlachteten Schweinen weibliche adulte Spulwürmer aus dem Darm gewonnen. Die Schweinespulwürmer wurden mit Wasser

gewaschen, der Uterus zerkleinert und homogenisiert (Cleeland et al. 1962). Ähnlich wurde zur Gewinnung von *T. canis*-Eiern vorgegangen. Die geschlechtsreifen *T. canis*-Weibchen wurden nach erfolgreicher Entwurmung aus dem Kot oder bei der Sektion aus dem Dünndarm gesammelt und ebenso gewaschen (Annen et al. 1975). Zu der folgenden Gewinnung der Spulwurmeier aus den adulten Würmern wurden der distale Anteil (Cleeland et al. 1962; Annen et al. 1975; Oksanen et al. 1990) oder der gesamte Uterus (Alcantara-Neves et al. 2008) verwendet. Auffällig bei dieser Methode war der große Anteil unreifer Eier, was bei der folgenden Kultivierung zu einer größeren Menge von Eimaterial führte. Mit Hilfe mehrerer Zentrifugationsschritte und der Abnahme der oberen Schicht mit den unreifen Eiern verbesserte sich die Reinheit bei der Kultivierung. Es wurde mit dem dunkleren Sediment, das die vitalen Spulwurmeier enthält, gearbeitet (Cleeland 1963). Nach Zugabe einer NaOH/NaClO-Lösung (5 – 6 % freies Chlor) wurde die äußere Proteinschicht nach Inkubation für 16 bis 24 h bei 30 °C aufgelöst. Es folgte eine mikroskopische Kontrolle und ein Waschschrift (Cleeland et al. 1962). Die äußere Proteinschicht kann ebenso durch eine Inkubation in NaClO mit 0,5 % freiem Chlor unter Schütteln in wenigen Minuten gelöst werden. Auf den anschließendem Waschschrift folgt die Embryonierung zum infektiösen Stadium (Annen et al. 1975; Oksanen et al. 1990). Je nach Herkunft der *Ascaris*-Eier wird ein Waschprotokoll gewählt. *A. suum*-Eier aus dem Kot wurden in 5 % NaClO-Lösung und die *A. suum*-Eier aus dem Uterus in 0,5 % NaClO-Lösung für fünf Minuten inkubiert. Der gesammelte Kot wurde dafür mit Wasser suspendiert und über ein 190 µm, ein 115 µm und ein 25 µm Sieb gegeben, um die Eier von den restlichen Kotbestandteilen zu trennen (Oksanen et al. 1990).

2.5.2 Embryonierung

Während der Embryonierung entwickelt sich eine Larve im Ei, die schließlich das infektiöse Stadium darstellt. Es gibt verschiedene Lösungen in denen Ascariden-Eier zur Entwicklung gelagert werden können. So wurde z.B. eine Inkubation von *A. suum*-Eiern mit 2 % HCl für 21 Tage bei Raumtemperatur (RT) beschrieben (Guerrero et al. 1969; Levine et al. 1969) oder Eier von *A. lumbricoides* und *A. suum* in 1 %-igem Formalin über 30 Tage zum Embryonieren inkubiert (Cleeland et al. 1962; Pitts 1963). Allerdings wurde bei *A. lumbricoides*-Eiern eine schlechtere Schlupfrate nach Inkubation in 1 %-igem Formalin und eine deutlich höhere Schlupfrate nach Inkubation in 0,1 N H₂SO₄ nachgewiesen (Fairbairn 1961). Zum Vergleich von Schwefelsäure (0,1 N), Wasser und Formalin (1 %) für die

Embryonierung von *A. suum*-Eiern wurden 5.000 bis 10.000 Eier pro ml bei 25 °C für drei Wochen inkubiert. Die Embryonierung war bei der Inkubation in 1 %-igem Formalin deutlich langsamer (Oksanen et al. 1990).

Zum besseren Verständnis der Embryonierung bei Ascariden-Eiern wurden mit *A. suum* Untersuchungen durchgeführt. Beispielsweise wurden morphologische Veränderungen während der Entwicklung außerhalb eines Wirtes erfasst. Es wurden zwölf verschiedene Stadien unterschieden und eine minimale Embryonierungszeit von drei Wochen bestimmt. Der dritte Tag der Inkubation wurde als optimaler Zeitpunkt zur Erkennung eines vitalen, sich entwickelnden Eies angegeben (Cruz et al. 2012). Die Embryonierungszeit ist abhängig von der Außentemperatur und allgemein gilt, je wärmer desto schneller ist die Embryonierung abgeschlossen. Eine Schlupfrate von 80 % bei 30 °C wurde nach einer Embryonierungszeit von 19 Tagen erreicht (Fairbairn 1961). Bei Embryonierungsversuchen mit *A. suum* war der Schlupf beweglicher Larven ab dem 17. Tag möglich, jedoch starben die Larven kurz danach. Ab dem 36. Tag überlebte ein Großteil der Larven einen mechanisch ausgelösten Schlupf, sie waren gut beweglich und intakt. In folgenden Infektionsversuchen mit *A. suum* gelang eine Infektion nach einer Embryonierungszeit von zwölf Wochen (Geenen et al. 1999).

Zusammenfassend kann eine Embryonierung in 0,1 N H₂SO₄ (Fairbairn 1961; Annen et al. 1975; Eriksen 1990; Oksanen et al. 1990; Geenen et al. 1999) für circa 30 Tage bei mindestens Raumtemperatur (RT) und in einer Konzentration zwischen 5.000 bis 10.000 Eier/ml empfohlen werden. Bei einer zu hohen Dichte der Eier kann es zu einer temporären Inhibition der Entwicklung kommen (Eriksen 1990).

Die Frage nach dem infektiösen Larvenstadium bei den *Ascaris*- und *Toxocara* spp. wurde unterschiedlich beantwortet. Verschiedene Autoren beschrieben das Stadium der Larve 2 (L2) als infektiöse Larve (Levine et al. 1969; Annen et al. 1975; Savigny 1975; Oksanen et al. 1990) und andere das Stadium der Larve 3 (L3) als infektiöses Larvenstadium (Maung 1978; Geenen et al. 1999; Vlaminck et al. 2011). Maung (1978) und Geenen et al. (1999) verwiesen auf das Vorkommen der Häutungen bei *Ascaris*-Arten und fanden dabei eine erste Häutung zwischen dem 15. und 27. Tag zur L2 und eine weitere ab dem 17. bis 27. Tag der Embryonierung zur L3, welche dem infektiösen Stadium entspricht. In einer weiteren Untersuchung zur Morphologie der Larvenstadien von *A. suum* wurden mikroskopisch drei Häute bei 41 Tage alten Larven aufgezeigt. Es wurde daraus der Schluss gezogen, dass es die L3 ist, die aus dem Ei schlüpft und das infektiöse Stadium darstellt (Kirchgassner et al. 2008).

Für *Parascaris* spp. wurde in früheren Studien von der L2 (Clayton et al. 1977) und in jüngeren Studien von der L3 als infektiöses Stadium geschrieben (Austin et al. 1990; Koudela et al. 2006).

2.5.3 Schlupf der Larven

Der Schlupf der Larven kann induziert werden, sobald die Spulwurmeier embryoniert sind und eine lebende Larve enthalten. In den letzten Jahren und Jahrzehnten wurden verschiedene Techniken beschrieben. Die effektivste, aber auch aufwendigste Methode ist der natürliche Schlupf im Darm, der eine anschließende Tötung und Sektion des infizierten Versuchstieres voraussetzt (Rogers 1958; Fairbairn 1961). Bei Versuchen mit *A. suum*-Eiern aus dem Uterus mit einer weichen Eischale wurde ein Schlupf der Larven an beliebiger Stelle beobachtet. Bei den aus Kot gewonnenen Schweinespulwurmeiern mit einer härteren Eischale wurde ein Larvenschlupf überwiegend an den dünneren porösen Polbezirken sichtbar (Enigk et al. 1976). Zum Ablauf des Larvenschlupfes von *A. lumbricoides* *in vitro* und im Dünndarm von Mäusen wurden von Rogers (1958) zwei Möglichkeiten beschrieben. Die Larven produzieren bei entsprechenden Außenbedingungen Enzyme, die eine Auflösung der Schale bewirken. Bei der ersten Möglichkeit wölbt sich die Vitellin-Membran an einer Stelle, an der die Schale aufgeweicht wurde, aus dem Ei und durch die Larvenbewegung einer lebenden Larve bricht die Membran schließlich auf. In der zweiten selteneren Möglichkeit betrifft das Aufweichen die komplette Schale bei vorerst intakter Vitellin-Membran, die schließlich jedoch weit aufreißt und die Larve befreit.

In detaillierteren Untersuchungen zu diesen gebildeten Proteinasen im Zusammenhang mit dem Schlupf wiesen Hinck et al. (1976) eine Enzymaktivität im Schlupfmedium von *A. suum* nach und konnten zeigen, dass die Aktivität im Laufe der Embryonierung zunahm. Sie deuteten diese Proteinasen als Invasionsfaktor für die Penetration und Migration der Larven. Eine Vorbehandlung mit NaClO (5 – 6 %) zur Auflösung der äußeren Schale ist somit eine wichtige Voraussetzung zum erfolgreichen Schlupf von Spulwurmlarven. In vergleichenden Untersuchungen zum Larvenschlupf wurde ein schnellerer Larvenschlupf bei vorbehandelten im Vergleich zu unbehandelten *A. lumbricoides*-Eiern nachgewiesen. In dieser Studie mit *A. lumbricoides*-Larven wurden vier wichtige Kriterien für den Larvenschlupf aufgezeigt. Erstens sollte die Temperatur zwischen 37 °C und 43 °C liegen, zweitens ist ein gewisser Anteil CO₂ notwendig, drittens sollte der pH um sieben liegen und viertens werden

unspezifische Reagenzien mit reduzierenden Eigenschaft (z.B. Cystein oder Glutathion) benötigt (Fairbairn 1961).

Eine weitere Methode ist die Behandlung mit Glasperlen in einem Magnetrührer (Cleeland et al. 1962; Geenen et al. 1999), die einen rein mechanischen Reiz auf die larvenhaltigen Eier ausüben. Cleeland et al. (1962) erreichten dies, indem die embryonierten *Ascaris*-Eier in einem Medium in einer Konzentration von 10.000 bis 20.000 Eier/ml resuspendiert und in einem 37 °C warmen Wasserbad mittels Magnetrührer über mehrere Stunden gerührt wurden. Die Schlupfrate der *Ascaris*-Larven wurde bei dieser Methode als unabhängig von Temperatur, pH und Medium beschrieben (Cleeland et al. 1962). Wenige Jahre später wurde ein *A. suum*-Larvenschlupf durch CO₂ induziert geschildert, bei dem 90 % unbeschädigte lebende Larven geschlüpft waren (Levine et al. 1969).

Eine weitere mechanische Möglichkeit, die entwickelten Spulwurmlarven aus den Eiern schlüpfen zu lassen, ist die „Deckglas-Methode“. Bei dieser Methode wird eine Lösung mit embryonierten Spulwurmeiern auf einen Objektträger gegeben, ein Deckglas im 45 ° Winkel einseitig angelegt und schließlich auf die Flüssigkeit gelegt. Es kommt zu einer Öffnung der Eischale bedingt durch die Druckerhöhung, was jedoch viele beschädigte *A. suum*-Larven zur Folge hatte (Geenen et al. 1999). Weiterhin ist die Zahl der zu bearbeitenden Spulwurmlarven begrenzt und es besteht eine große Variabilität im Anteil schlüpfender Larven. Es wurde eine andere Methode entwickelt, mit der große Mengen intakter *T. canis*-Larven bereitgestellt werden konnten und die Verunreinigung durch Wirtskomponenten oder Chemikalien gering war (Annen et al. 1975). Bei diesem Verfahren wurden embryonierte *Toxocara*-Eier zur Vorbereitung mit einer Mischung aus gleichen Teilen NaOH (2 %) und NaClO (2 %) bei Raumtemperatur für 12 h inkubiert, wodurch die äußere Proteinhülle entfernt wurde. Nach mehrmaligem Waschen mit einer 37 °C warmen Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) befanden sich die Eier in PBS und der pH wurde auf 7 eingestellt. Diese Suspension wurde für wenige Sekunden (ca. sieben bis zehn Sekunden) in ein Ultraschallbad bei 100 Watt gehalten. Diese Behandlung öffnete die Eischale, wobei die *Toxocara*-Larven intakt blieben. Im nächsten Schritt wanderten die beweglichen vitalen Larven in 37 °C warmer PBS in einem modifizierten Baermann-Apparat durch ein 20 µm Sieb. Diese Larvensuspension konnte nun zur Kultivierung oder für andere Tests verwendet werden (Annen et al. 1975). Im Protokoll von Savigny (1975) wurden die geschlüpften *Toxocara*-Larven erst gewaschen und wanderten dann über ein fünf- bis achtschichtiges Papier über Nacht aus.

Die Literatur umfasst bis zum Jahr 2014 keine Angaben zum Larvenschlupf oder der Kultivierung von *Parascaris*. Erste Angaben zu Untersuchungen mit *P. equorum* wurden im

Sommer 2014 gemacht. Eine Kollegin aus Kentucky, USA, begann fast zeitgleich mit Kultivierungsversuchen zu *P. equorum*. In dieser Veröffentlichung wurde nach einer Inkubation mit NaClO (5,25 %) in einem Verhältnis 1 : 1 ein Waschschriff mit Salzlösung durchgeführt und die Suspension anschließend eine Woche bei Raumtemperatur gehalten. Eine erneute Inkubation mit NaClO (5,25 %) für ein bis zwei Minuten sollte vorhandene Bakterien eliminieren, bevor erneut mehrmals gewaschen wurde. Die *P. equorum*-Eier wurden mechanisch mit Glasperlen und einem Magnetrührer zum Schlüpfen gebracht. Die Wiederfindungsrate der *Parascaris*-Larven lag in dieser Studie bei 48,3 % (Burk et al. 2014).

2.5.4 Kultivierung von Ascariden-Larven

Eine Kultivierung von *Parascaris*-Larven war bis vor kurzem und zum Zeitpunkt der Versuche in der wissenschaftlichen Literatur nicht beschrieben. Die Untersuchungen für die verwandten Ascariden: *A. suum* und *T. canis* wurden als Anhaltspunkt verwendet.

In ersten Kultivierungsversuchen mit *A. suum* wurde das Kulturmedium 199 mit 20 bis 30 % bovinem Serum, Penicillin und Streptomycin versetzt. Bei einem pH zwischen 6,5 und 7 im Kulturmedium wurden die besten Ergebnisse erzielt (Cleeland et al. 1962). Eine Folgeuntersuchung ergab, dass Medium 199 durch Earle's Minimum Essential Medium (MEM) bei Supplementierung von Vitaminen und Aminosäuren ersetzbar ist (Cleeland 1963). Eine Studie mit MEM und 10 % Rattenserum, allerdings ohne Antibiotikazusätze, wurde zur erfolgreichen Kultivierung von *A. suum* verwendet (Pitts 1963). In anderen Kultivierungsversuchen mit *A. suum* wurde ebenso MEM als Grundmedium beschrieben. Eine Kultivierung von *A. suum* ohne Zusätze zum Medium gelang jedoch nicht länger als 21 Tage (Levine et al. 1969). Dieses Ergebnis bestätigte auch Savigny (1975) mit einer Kultivierung von *T. canis*-Larven bis zu 18 Monaten mit einer Verwendung von Eagle's Medium mit Hanks Salzen.

Urban et al. (1981) bestätigten die Ergebnisse von Cleeland (1963) in einem Versuch mit *A. suum*-Larven und einem modifizierten MEM mit Aminosäuren und Vitaminen bei dessen Einsatz sich die Larven besser entwickelten. Dabei konnten die aus der Lunge isolierten L3 *in vitro* kultiviert werden, so dass sie sich zur L4 häuteten. Im nächsten Schritt gelang den beiden Autoren eine *in vitro* Entwicklung von L2 zu geschlechtsreifen adulten Würmern. Jedoch wurden in diesem Kultivierungsversuch die Larven nicht selbst embryoniert und zum Schlupf gebracht, sondern aus der Lunge isoliert und es wurden abnormale Entwicklungen der *A. suum*-Würmer beobachtet (Douvres et al. 1983). Nach ersten Versuchen aerob zu

kultivieren, wurde ein partiell anaerobes Milieu als geeigneter für Wachstum und Überleben von *A. suum*-Larven beschrieben (Cleeland 1963).

Die Konzentration der Larven reichte von 150/ml Medium (Levine et al. 1969) bis 10000/ml Medium (Savigny 1975). Das Medium wurde einmal wöchentlich durch neues Medium ausgetauscht. (Pitts 1963; Savigny 1975; Urban et al. 1981; Speiser et al. 1984).

Diese verschiedenen Kultivierungsversuche von *A. suum* und *T. canis* zeigen die Problematik der abweichenden Bedürfnisse jeder Parasitenart zur erfolgreichen Kultivierung. Im Falle des Pferdespulwurmes ist bei der Gewinnung der Eier aus dem Kot mit einer erhöhten Kontaminationswahrscheinlichkeit mit Pilzen zu rechnen. Dies kann mit den Futtermitteln (vor allem Heu) und der Haltung (Boxen mit Stroh, sowie Sandpaddocks und Weiden) begründet werden. In den neuesten Untersuchungen aus Kentucky (USA) zu der Kultivierung von *P. equorum* wurden nach einem mechanisch induzierten Larvenschlupf mittels Glasperlen unter zur Hilfenahme eines Magnetrührers fast die Hälfte der Larven (48,3 %) vital in eine Kultur verbracht. Zusätzliche Wasch- und Bleichschritte verbesserten dabei die anfängliche Wiederfindungsrate der *P. equorum*-Larven von 3,2 % deutlich. Unter Verwendung des Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 Mediums, einer dreifach Antibiotikallösung und Proteinaseinhibitoren konnten die *P. equorum*-Larven kultiviert werden. Eine Überlebensdauer der *Parascaris*-Larven von bis zu drei Wochen wurde beschrieben (Burk et al. 2014).

2.5.5 Kultivierung von adulten Ascariden-Würmern

Die Gewinnung von Spulwurmeiern oder Herstellung eines exkretorisch-sekretorisches (ES) Antigens kann durch die Kultivierung von adulten Spulwürmern erfolgen. In zwei Studien mit adulten Spulwürmern wurden *T. cati*- und *A. lumbricoides*-Würmer nach mehrmaligen Waschen in körperwarmen APF-Medium (Weisblat et al. 1976) oder RPMI 1640 (Zibaei et al. 2009) kultiviert. In den ersten 24 h konnten bei der Kultivierung von *T. cati* 9.300 Eier/ml gewonnen werden, nach 48 h noch 9000 Eier/ml, doch dann sank der Gehalt der gewonnenen Eier deutlich ab. Insgesamt konnten die adulten *Toxocara*-Würmer für 19 Tage kultiviert und Eier gesammelt werden (Zibaei et al. 2009).

2.5.6 Isolierung von exkretorisch-sekretorischem Antigen (ES)

Zur Gewinnung des exkretorisch-sekretorischen Proteins (ES) war eine Kultivierung von Larven oder adulten Stadien nötig. In regelmäßigen Wechseln des Kulturmediums wurden Proteinfractionen aus den Sekreten und Exkreten der kultivierten Stadien gewonnen. Vor einem Mediumwechsel wurde die Kultur wenige Minuten ruhig stehen gelassen, so dass die lebendigen Larven sedimentieren konnten. Tote *A. suum*-Larven schwebten und konnten abpipetiert werden (Douvres et al. 1983). Das so gewonnene Medium sollte nach Urban et al. (1981) die metabolischen Substanzen der kultivierten *A. suum*-Larven enthalten, das sogenannte ES-Antigen.

In den Folgeschritten wurde das Medium mit der ES-Proteininfiltration zentrifugiert um restliche Larvenbestandteile abzutrennen und ultrafiltriert (Savigny 1975).

2.6 Antigene und serologische Reaktionen

2.6.1 ES-Antigen von Ascariden

Der Test des antigenetischen Potentials von *in vitro* erzeugten *A. suum*-ES-Proteinen wurde in einem *in vitro*-Test mit Lymphozyten verglichen, die im Voraus durch eine experimentelle Infektion sensibilisiert wurden. Zu diesem Zweck wurden Schweine experimentell, oral mit *A. suum*-Eiern infiziert, die zuvor mit UV-Strahlen behandelt wurden. Die *A. suum*-Eier wurden dazu mehrere Wochen lang mit kurzwelligem UV-Strahlen, mit einer Gesamtdosis von 150, 100 und 75 $\mu\text{W}\cdot\text{min}/\text{cm}^2$ bestrahlt und somit attenuiert. Aus den Blutproben dieser Schweine wurden die sensibilisierten Lymphozyten isoliert und im immunologischen Assay die Reaktion dieser Zellen auf das in der Kultur gewonnene Protein getestet. Dieser Test ergab ein vergleichbares antigenetisches Potential von *in vivo* und *in vitro* erzeugtem ES-Protein der *A. suum*-Larven (Urban et al. 1981).

Kennedy et al. (1987) zählten fünf Gründe für die Nutzung von ES-Antigenen gegenüber anderen Antigenformen auf. Erstens wurde davon ausgegangen, dass die ES-Antigene Ursache der Antikörperreaktion bei der Ascariose sind und die Immunantwort stärker als bei den somatischen Antigenen war. Zweitens sollten die ES-Produkte protektive Antigene enthalten. Drittens wurden Inhaltsstoffe wie Allergene und IgE potenzierende Stoffe vermutet. Viertens sollten Stoffe von den Larven abgegeben werden, die eine Detektion der invasiven Larven ermöglichten. Fünftens wurde den ES-Produkten eine bessere Spezifität zugeschrieben.

So wurden bei der Auftrennung der Proteine der L2 und des Lungenstadiums (L3/4) von *A. suum* und *A. lumbricoides* verschiedene Bandenmuster gefunden. Die L2 von *A. suum* zeigte Banden bei 14 und 60 kDa und die L2 von *A. lumbricoides* bei 14, 17 und 60 kDa. Das Lungenstadium dieser Parasiten wies mehrere Banden auf (Kennedy et al. 1987). Stadienspezifische Banden wurden im SDS-PAGE („Sodium-Dodecyl-Sulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese“) mit ES-Proteinen von *A. suum* dargestellt (Urban et al. 1985). Das Lungenstadium von den *A. suum/lumbricoides*-Spezies wurde als sehr ähnlich im ES-Muster und dem antigenetischen Potential beschrieben (Wossene et al. 2002). Erfasste Kreuzreaktionen, vor allem bei den Lungenstadien von *Ascaris*-Spezies, sind somit nachvollziehbar. Es wurden Kreuzreaktionen zwischen der *Toxocara*- und *Ascaris*-Familie nachgewiesen (Annen et al. 1975; Kennedy et al. 1989). Eine Kreuzreaktivität zur serologischen Diagnostik von *A. suum* infizierten Schweinen mit Hilfe des *A. suum*-Hämoglobin (AsHb) wurde von Vlaminck et al. (2012) beschrieben (siehe Kapitel 2.6.3).

Hinsichtlich des Nachweises der Toxocariasis des Menschen hat die Verwendung vom ES-Antigen der *T. canis*-Larven die serologische Diagnostik in der Sensitivität und Spezifität deutlich verbessert. Die Studie von Savigny et al. (1979) beschrieb die erste serologische Nutzung vom *Toxocara*-ES-Antigen im ELISA. Das ES-Antigen ist vermutlich besser geeignet zum Nachweis einer Infektion mit einem Parasiten als das somatische Antigen (Savigny et al. 1979; Gasser et al. 1992), da das Immunsystem des Wirtes vermutlich ausgeprägter auf die sekretierten Substanzen mit der Bildung von Antikörpern reagiert und diese serologisch nachgewiesen werden können.

In der Auftrennung des ES-Antigens der Spezies *T. canis* wurden Hauptbanden bei 32, 55, 70, 120 und 400 kDa gefunden. Bereits 1984 wurde von einem Problem der Spezifität berichtet und den Kreuzreaktionen große Bedeutung zugesprochen (Maizels et al. 1984). Diese Kreuzreaktionen zwischen dem Antigen von *T. canis* und Seren der mit anderen Spezies infizierten Tiere wurden von verschiedenen Autoren bestätigt (Boyce et al. 1988; Magnaval et al. 1991; Gillespie et al. 1993), jedoch werden diese Reaktionen für die Routinediagnostik mit Populationen, in der diese Erkrankungen keine große Rolle spielen, als vernachlässigbar beurteilt (Jacquier et al. 1991).

Eine Auftrennung des ES-Antigens im Western Blot und Klassifizierung in eine hochmolekulare (über 100 kDa) und eine niedrigmolekulare Gruppe ließ die Vermutung zu, dass die Kreuzreaktionen durch die hochmolekularen Banden bedingt sind, wogegen die niedrigmolekularen Banden eine höhere Spezifität für *T. canis* hatten (Magnaval et al. 1991). Dabei wurde außerdem eine Korrelation zwischen den immunologischen Methoden ELISA

und Western Blot bestätigt (Magnaval et al. 1991; Morales et al. 2002). Das Vorhandensein verschiedener Banden in der chromatographischen Auftrennung von ES-Proteinen gleicher Spezies könnte durch unterschiedliche Kultivierungsmethoden bedingt sein (Urban et al. 1985).

Zur Verbesserung der Spezifität des ES-Antigens wurde eine 57 kDa Fraktion nach der Auftrennung des ES-Proteins der *T. canis*-Larven in elf Banden isoliert und charakterisiert. Tests mit Seren mit *T. vitulorum*, *A. lumbricoides* und *Necator americanus* infizierten Tieren wiesen keine Kreuzreaktionen mit dieser isolierten Antigenfraktion nach. Dabei wurden im Western Blot die verschiedenen Bandenmuster bei den einzelnen Spezies sichtbar. Das Auftreten unterschiedlicher Bandenmuster der Spezies bestätigt, dass die Ausprägung der Proteine in den ES-Antigenen auf die Gattungsebene begrenzt ist (Iddawela et al. 2007).

Alternativ wurde zur Verbesserung der Spezifität ein rekombinantes Antigen verwandt und die höhere Spezifität dadurch begründet, dass es nur ein Molekül enthält und dieses nicht glykosyliert ist. Die ES-Antigene hingegen bestehen aus vielen Komponenten, die teilweise glykosyliert sind, wodurch die Wahrscheinlichkeit einer Kreuzreaktivität mit Antikörpern erhöht wird (Yamasaki et al. 2000).

Als mögliche Begründung für eine Einschränkung im antigenetischen Charakter der ES-Antigene wurde die Wirkung von Proteasen genannt. So könnten diese im ES-Medium enthaltenen Proteasen, welche in der Natur für Penetration und Migration der Larven verantwortlich sind, *in vitro* zur Zerstörung von entscheidenden Proteinen für die Immundiagnose führen (Guerrero et al. 1969; Morales et al. 2002).

Nach einer *in vitro*-Kultivierung von *A. suum*-Larven wurden stadienspezifische Bandenmuster in den ES-Proteinen beschrieben. Insgesamt wurden 106 Proteine im ES-Antigen der Larven mit Proteingrößen zwischen 30 und 150 kDa nachgewiesen. Es wurden Serpine, sogenannte Serinproteaseinhibitoren, in den ES-Medien der *A. suum*-Larven nachgewiesen. Der Präsenz dieser Enzyme in den ES-Antigenen wurde eine Schutzfunktion bei der Larvenwanderung und Maskierung der Oberfläche zugeschrieben (Wang et al. 2013).

In einer neuen Arbeit aus Kentucky wurden erstmals *P. equorum*-Larven kultiviert und ES-Proteine aus den Larvenkulturen gewonnen. Im Western Blot der gewonnenen ES-Antigene mit Seren von natürlich infizierten Pferden wurden Proteinbanden bei 19, 22, 26 und 34 kDa erfasst, von denen Kreuzreaktionen mit kleinen Strongylyden bei der 22 kDa Bande nachgewiesen wurden. Die höchste Detektionswahrscheinlichkeit wurde bei Reaktionen der 19 und 34 kDa ES-Proteinbanden sichtbar. Der Sekundärantikörper IgG (T) zeigte die stärksten Proteinbanden, doch wurden in den Untersuchungen mit Seren der Mutterstuten und

älteren Pferde ebenso erhöhte IgG (T)-Werte und ein maternaler Übergang dieses Antikörpers nachgewiesen. Die *Parascaris*-positiven Fohlen produzierten keine nachweisbaren Mengen von IgE oder IgM gegen das larvale ES-Protein. Das diagnostische Potential eines Antikörper-basierten Tests wurde als limitiert bewertet (Burk 2013).

2.6.2 Ganzwurmextrakt (somatisches Antigen)

Die somatischen Antigene von *A. suum* stellten sich im SDS-PAGE sehr viel komplexer dar als die ES-Antigene von *A. suum* (Urban et al. 1985).

In den Veröffentlichungen von Proudman et al. (1996) und Dowdall et al. (2003) wurden somatische Antigene durch die Homogenisation von adulten *Anoplocephala perfoliata* bzw. Ultraschallbehandlung von Larven der kleinen Strongyliden (Cyathostominae) hergestellt.

Nach der Gewinnung der somatischen Antigene von kleinen Strongyliden konnten vielversprechende Reaktionen mit Seren aufgezeigt werden, unter anderem eine spezifische Antwort vom IgG(T) mit Antigenen in der Größe von 20 und 25 kDa ab fünf Wochen nach der experimentellen Infektion. Dabei wurden keine Kreuzreaktionen zu *Parascaris* infizierten Pferden nachgewiesen (Dowdall et al. 2003). Die larvalen somatischen Antigene der kleinen Strongyliden waren dabei besser zur Unterscheidung zwischen infizierten Tieren und Kontrolltieren geeignet als die adulten somatischen Antigene. Im Vergleich zu den anderen Immunglobulinen wurden die höchsten OD-Werte mit IgG und IgG(T) erfasst. Eine Unterscheidung zwischen experimentell infizierten Pferden und Kontrolltieren gelang nur mit dem IgG(T). Eine spezifische Reaktion mit diesem Immunglobulin-Isotyp wurde ab der siebten Woche gefunden (Dowdall et al. 2002).

In Untersuchungen mit zwei Fraktionen eines larvalen somatischen Antigens der kleinen Strongyliden und dem Isotyp IgG(T) wurden keine Kreuzreaktionen mit großen Strongyliden gefunden (Dowdall et al. 2004). Die Entwicklung des hoch pathogenen *Strongylus vulgaris* aus der Gruppe der großen Strongyliden, ist gekennzeichnet durch eine Larvenwanderung im mesenterialen Arteriensystem des Pferdes. Als Folge einer Endarteritis oder Thrombose dieser Arterien besteht das Risiko eines nicht strangulationsbedingten Darminfarktes. Die auf den meisten Pferdebeständen durchgeführte regelmäßige Entwurmung während der vergangenen Jahrzehnte sorgte offenbar für eine niedrige Prävalenz der großen Strongyliden. Ein Nachweis der *S. vulgaris*-Infektion während der Präpatenz ist vorteilhaft, um Entwurmungsmittel gezielt einsetzen zu können. Ein rekombinantes Protein aus einem ES-Antigen von *S. vulgaris*-Larven wurde exprimiert, das nach Evaluierung im Western Blot und

ELISA, das antigenetische Potential eine präpatente *S. vulgaris*-Infektion nachzuweisen, besitzt. Im ELISA konnte unter Verwendung des IgG (T) eine Sensitivität von 73,3 % und eine Spezifität von 81,0 % erreicht werden (Andersen et al. 2013).

Zur serologischen Detektion der Bandwurm-Infektion beim Pferd wurden von Proudman et al. (1996) mittels Immunoblot Proteinbanden bei 12 und 13 kDa im ES-Antigen nachgewiesen, isoliert und im ELISA als Antigene verwendet. Eine Differenzierung zwischen den Seren von positiven und negativen Tieren im ELISA war mit den ES-Antigenen deutlicher als unter Verwendung der somatischen Antigene. Die Sensitivität des ELISA lag bei 68 % und die Spezifität sogar bei 95 %. Eine Klassifizierung in gering-, mittel- und hochgradigen Befall anhand der OD-Werte unter Verwendung des Isotypes IgG(T) konnte vorgenommen werden und es wurden keine Kreuzreaktionen der Seren von mit Strongyliden oder *P. equorum* infizierten Pferden nachgewiesen (Proudman et al. 1996). Bei Untersuchungen von Skotarek et al. (2010) konnte, unter Verwendung von IgG als Sekundäntikörper keine Korrelation zwischen dem Serum-Antikörper-Wert im ELISA und der Befallsintensität mit Bandwürmern im Blinddarm gefunden werden. Positive Werte im ELISA, bei Abwesenheit von Bandwürmern im Caecum, wurden durch eine vorübergehende Antikörperpersistenz nach aktiver Infektion begründet (Proudman et al. 1996; Skotarek et al. 2010).

2.6.3 Antigen aus der Körperflüssigkeit des *Ascaris suum*-Wurmes

Bei ES-Antigenen handelt es sich um ein Gemisch aus allen sekretierten und exkretierten Stoffen eines Spulwurmes. Alternativ wurde für *A. suum* ein aus dem Inneren des Wurmes gewonnenes Protein getestet. Dieses *A. suum*-Hämoglobin (AsHb) ist ein Protein aus der Pseudocoelomflüssigkeit adulter *A. suum*-Würmer. Zu diesem Zweck wurden die gesammelten Schweinespulwürmer aus dem Schlachthof gewaschen, die Spülwürmer längst eröffnet und die Flüssigkeit aus dem Inneren der Würmer aufgefangen. Wiederholte Waschschriffe durch die Präzipitation mit Ammoniumsulfat und Zentrifugation sowie die Dialyse gegen destilliertes Wasser oder Barbitalpuffer führten zur Aufreinigung der Proteine (Wittenberg et al. 1965).

In serologischen Tests wurde eine Korrelation des anti-AsHb IgG im Serum der infizierten Schweine mit den EpG-Werten und der Wurmbürde gefunden. Diese Schweine wurden experimentell mit diesem Protein immunisiert und nach 14, 28 und 56 Tagen die Wurmbürde im Darm und die Milchspots in der Leber quantifiziert. Dieses Proteingemisch soll einen

Hauptanteil der ES Proteine von L3, L4 und den adulten *A. suum*-Würmern ausmachen und aus 42, 90 und 250 kDa Banden bestehen (Vlaminck et al. 2011).

Hinsichtlich der zuverlässigen Identifizierung von *A. suum*-Infektionen bei Schweinen wurde häufig eine Diskrepanz in der Kot- und Schlachttieruntersuchungen beschrieben. Ein serologisches Verfahren sollte diesen Zustand verbessern. ELISA mit Antigenen aus adulten Würmern brachten eine hohe Sensitivität (90 – 100 %), jedoch niedrige Spezifität (0 – 2 %). Dabei korrelierten die OD-Werte der ELISA nicht mit der Wurmbürde oder den EpG-Werten, wie es mit dem AsHb-Antigen nachweisbar war (Vlaminck et al. 2011).

Positive OD-Werte trotz fehlender Wurmbürde oder EpG-Werte wurden durch eine vorangegangene Entwurmung und dadurch eliminierte Infektion oder Sensibilisierung des Immunsystems in der Präpatenz mit aktueller Larvenwanderung erklärt. Ein ständiger Kontakt mit dem Parasiten führte zu positiven Reaktionen, was den Einsatz dieses ELISA bei den adulten Tieren einschränkt. Es wurde vermutet, dass der Kontakt mit den Larvenstadien eine positive Antikörperreaktion bewirken könnte (Frontera et al. 2003).

2.7 Anthelminthikaresistenz

2.7.1 Definition

Eine Anthelminthikaresistenz (AR) beschreibt das Phänomen, dass nach einer Behandlung mit einem Wirkstoff in therapeutischer Konzentration mehr Individuen einer Population die Behandlung tolerieren als in einer sensiblen Population der gleichen Spezies. Ursächlich ist es eine genetisch bedingte Widerstandsfähigkeit des Parasiten. Demzufolge kommt es laut Prichard et al. (1980) zu einer verminderten Wirksamkeit eines Wirkstoffes. Allgemein wird zwischen einer einfachen AR (ein Wirkstoff betroffen), einer Klassen-AR (gesamte Wirkstoffklasse betroffen) und einer multiplen AR (mehrere Wirkstoffklassen betroffen) unterschieden (Samson-Himmelstjerna et al. 2011).

Zur Diagnose von AR dient im Falle der Nematoden des Pferdes eine koproskopische Untersuchung und der Nachweis von Parasiteneiern im Kot (Brady et al. 2009).

Die „World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAVVP)“ hat zur Bewertung von AR bei Strongyliden für verschiedene Tierarten einen Eizahlreduktionstests (EZRT) als Standardmethode empfohlen. Von einer kleinen Pferdegruppe werden dafür zweimalig Einzelkotproben genommen und quantitativ beurteilt. Zeitpunkte der Probenentnahme sind unmittelbar vor der Behandlung und abhängig vom Wirkstoff 10 bis

14 Tage danach. Es wird die jährliche Wiederholung dieses Tests für jede Wirkstoffgruppe empfohlen (Coles et al. 1992; Coles et al. 2006).

Da es für *Parascaris* spp. bisher keine Validierung dieser Methode gibt, schwankt die Bewertung in Abhängigkeit vom Autor. Generell wird eine Effizienz von > 90 % oder > 95 % in der Reduktion der nachweisbaren Parasiteneier im Kot nach einer Behandlung als wirksam angesehen (Reinemeyer 2009; Samson-Himmelstjerna et al. 2011).

2.7.2 Anthelminthika

Die auf dem Markt erhältlichen Entwurmungsmittel (Anthelminthika) zur Kontrolle von Nematoden bei Pferden können in vier Wirkstoffgruppen eingeteilt werden: Benzimidazole (BZ), makrozyklische Laktone (ML), Piperazin und Tetrahydropyrimidine mit dem Vertreter Pyrantel (PYR).

Das Piperazin ist das älteste Anthelminthikum, das nur gegen einige Nematoden, jedoch nicht gegen Cestoden und Trematoden wirkt. Es ist gut wirksam gegen *Parascaris* spp. und *Oxyuris equi*, jedoch sind nur wenige Strongyloiden empfindlich. Dieses schmale Wirkungsspektrum ist verantwortlich für einen geringen Einsatz dieses Wirkstoffes. Die anderen drei Wirkstoffgruppen sind wirksam gegen kleine und große Strongyloiden, Pflriemenschwänze, Spulwürmer und andere Nematoden. Als Besonderheit ist die Behandlung mit Fenbendazol aus der Gruppe der BZ an fünf aufeinanderfolgenden Tagen zu nennen. In dieser Anwendung hat dieser Wirkstoff eine larvizide Wirkung auf die Spulwurmlarven (Vandermyde et al. 1987).

Die ML sind die jüngste Wirkstoffgruppe und werden durch Avermectine mit dem Vertreter Ivermectin (IVM) und Milbemycine mit dem Vertreter Moxidectin (MOX) repräsentiert. Diese Gruppe ist durch ein breites Wirkungsspektrum gekennzeichnet. ML haben bei einmaliger Anwendung als einzige der drei Gruppen eine larvizide Wirkung auf die wandernden Spulwurmlarven (DiPietro et al. 1987; Reinemeyer 2009), was diese Gruppe als wirksame Bekämpfung der wandernden Larven im Hinblick auf die entstehende Schädigung und Klinik sehr bedeutsam macht. Eine gute Wirksamkeit auch gegen die Magendasseln (*Gasterophilus*) führte zum vermehrten Einsatz dieser Wirkstoffgruppe, unter anderem in Gestüten, in denen die larvizide Wirkung auf den Spulwurm besonders erwünscht war, da die Spulwurminfektion bekanntlich vor allem bei den Fohlen und Jährlingen eine Rolle spielt und so auch die migrierenden Larven von der Behandlung erfasst wurden. Zu beachten war dabei ein begrenzter Einsatz von MOX bei Fohlen unter vier Monaten, aufgrund der

charakteristischen Überdosierungserscheinungen mit Inappetenz, Salivation, Ataxie, Depression, Muskelzittern und Festliegen bei bereits doppelter Dosierung (Johnson et al. 1999; Ungemach et al. 2010). Diese Vergiftungserscheinungen sind mehrfach in der Literatur, vor allem bei jungen Fohlen beschrieben (Goehring et al. 1999; Johnson et al. 1999; Muller et al. 2005).

Insgesamt soll ein Entwurmungsintervall so gewählt werden, dass eine Umweltkontamination mit Eiern und eine zu häufige Nutzung mit möglicher Resistenzbildung verhindert wird (Reinemeyer 2012). Die Gruppe der ML wurde in den letzten Jahren verstärkt eingesetzt, was eine gesunkene Wirksamkeit gegen *P. equorum* aufgrund von Resistenzen zur Folge hatte (Boersema et al. 2002; Hearn et al. 2003; Stoneham et al. 2006; Craig et al. 2007; Samson-Himmelstjerna et al. 2007; Schougaard et al. 2007; Slocombe et al. 2007; Lindgren et al. 2008; Lyons et al. 2008; Veronesi et al. 2009; Reinemeyer et al. 2010; Nareaho et al. 2011).

Lyons et al. (1976) beschrieben eine parenterale Wirkung von Levamisol und somit eine mögliche Bekämpfungsmaßnahmen der migrierenden Larven in den ersten 14 Tagen nach der experimentellen Infektion mit Spulwurmeiern. Derart behandelte Tiere hatten erst am 112. Tag nach der Behandlung einen positiv koproskopischen Befund, wohingegen unbehandelte Tiere bereits am 35. Tag mit der Ausscheidung begannen (Lyons et al. 1976). Dieser Wirkstoff gehört zu einer weiteren Wirkstoffgruppe, den Imidazothiazolen. Aufgrund einer geringen therapeutischen Breite und der besonderen Empfindlichkeit von Pferden muss der Einsatz unter strenger Indikationsstellung erfolgen und schränkt die Anwendung stark ein. Es gibt momentan kein für das Pferd zugelassenes Präparat mit diesem Wirkstoff (Ungemach et al. 2010).

2.7.3 Ursachen und Vorkommen von Anthelminthikaresistenzen

Die häufige Verwendung eines Wirkstoffes oder einer Wirkstoffklasse, wie zum Beispiel bei den ML, spielt eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung von AR (Reinemeyer 2009; Samson-Himmelstjerna et al. 2011). Zusätzlich kann eine Unterdosierung durch eine falsche Einschätzung des Körpergewichtes oder Verlusten bei der oralen Verabreichung zu einer fehlenden Wirkung auf vorhandene Parasiten führen (Brady et al. 2009). Ein weltweiter Pferdehandel und -verkauf ist ein entscheidender Faktor bei der Verbreitung dieser entstanden AR (Schougaard et al. 2007; Nareaho et al. 2011).

Die ersten Berichte fehlender Wirkungen nach Behandlungen mit ML bei *P. equorum*-Infektionen kamen aus den Niederlanden (Boersema et al. 2002) und Kanada (Hearn et al.

2003; Slocombe et al. 2007). Es folgten Nachweise von ML-resistenten Populationen von *P. equorum* in England (Stoneham et al. 2006), Deutschland (Samson-Himmelstjerna et al. 2007), Dänemark (Schougaard et al. 2007), den USA (Craig et al. 2007; Lyons et al. 2008), Schweden (Lindgren et al. 2008), Italien (Veronesi et al. 2009) und Finnland (Nareaho et al. 2011). Auch erste Stämme mit einer kombinierten ML- und Pyrantel-Resistenz wurden in Kentucky (Lyons et al. 2008), Texas (Craig et al. 2007) und Australien (Armstrong et al. 2014) beschrieben. Dies konnten Reinemeyer et al. (2010) jedoch nicht bestätigen.

Eine eingeschränkte Effektivität gegen den Spulwurm und eine volle Wirksamkeit gegen die MDS wurde in Dänemark beschrieben (Schougaard et al. 2007).

Schlussendlich ist eine regelmäßige Evaluierung der Effizienz erfolgter Behandlungen dringend notwendig und kann mit dem EZRT mit einem überschaubaren Aufwand durchgeführt werden (Hearn et al. 2003; Craig et al. 2007; Nareaho et al. 2011; Samson-Himmelstjerna et al. 2011; Reinemeyer 2012). Die Unzuverlässigkeit in der Diagnose dieser parasitären Infektion, bedingt durch verschiedene Einflussfaktoren auf den EpG-Wert, sollte dabei beachtet werden. Es kann nach einer Bestimmung des EpG-Wertes keine Aussage zu der tatsächlichen Wurmbürde gemacht werden, was eine Einschätzung der Effektivität von Entwurmungsmitteln auf *P. equorum* einschränkt.

2.8 Zielsetzung

In der vorliegenden Studie wurden longitudinale Untersuchungen zum Auftreten vom Spulwurm bei Fohlen in einem großen Warmblutgestüt durchgeführt. Anhand der Ergebnisse sollten die jährliche Inzidenz, die Prävalenz und der Infektionsverlauf in einem Gestüt mit zahlreichen Fohlen bestimmt werden. Es wurde ein besonderes Augenmerk auf verschiedene Einflussfaktoren und die klinischen Folgen dieser Infektion gelegt. Die statistische Auswertung klinischer, koproskopischer und epidemiologischer Daten schloss sich an. Den immunologischen Parametern, wie maternale Antikörper und die Entwicklung einer aktiven Immunität in den ersten Lebensmonaten, wurden bei dieser typischen Jungtiererkrankung große Bedeutung zugeschrieben.

Zusätzlich wurde das Ziel der Etablierung einer *in vitro*-Kultivierung von Spulwurmlarven und die Gewinnung der ES-Antigene dieser kultivierten Larven verfolgt. Anhand dieser ES-Antigene sollten serologische Tests für eine frühzeitige Identifizierung *Parascaris*-infizierter Fohlen durchgeführt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Lösungen und Puffer

APS Ammoniumperoxidsulfat	10% (w/v)
APF-Medium nachgeahmte Bauchhöhlenflüssigkeit („artificial perienteric fluid“)	5 mM MgCl ₂ 6 mM CaCl ₂ 24 mM KCl 23 mM NaCl 110 mM NaHCO ₃ ⁻ 11 mM Dextrose 11 mM Tris pH 7,5 bei 37°C
ELISA-Blockingpuffer (2%)	2 g Milchpulver 100 ml PBS-Tween
ELISA-Coating-Puffer	1,31 g Na ₂ CO ₃ 3,163 g NaHCO ₃ in 950 ml Aqua bidest, pH 9,6 Aqua bidest ad 1 L
ELISA-Stopplösung (2,5M HCl)	104 ml 37%tiger HCl Aqua bidest ad 500 ml
ELISA-Substratlösung	1 OPD-Tablette (Ortho-Phenylendiamin-Tablette) 20ml ELISA-Zitratpuffer 10 µl Wasserstoffperoxid kurz vor Verwendung
ELISA-Zitratpuffer	7,3 g Zitronensäure 14,87 g Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O in 950 ml Aqua bidest, pH 5,0-5,2 Aqua bidest ad 1 L
Formalin 4%	57,2 ml Formalin 35% 442,8 ml Leitungswasser

3 Material und Methoden

NaCl-Lösung	gesättigt
NaClO 0,5%	21 ml NaClO 12% 483 ml Aqua bidest
NaClO 2%	50 ml NaClO 12% 250 ml Aqua bidest
NaOH 2%	2 g NaOH 100 ml Aqua bidest
NaCl-Zucker-Lösung	gesättigt
PBS Phosphat gepufferte Lösung („phosphat buffered solution“)	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,0 g Na ₂ HPO ₄ × 2H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ Aqua bidest ad 1 L, pH 7,4 pH 7,4
PBS-Tween	1 × PBS 0,05% Tween 20
Schwefelsäure (0,1N H ₂ SO ₄)	0,275 ml Schwefelsäure 95-99% auf 100 ml Aqua bidest
SDS-Laufpuffer (10×) Natriumdodecylsulfat („sodiumdodecylsulfat“)	75,7 g Tris 360,3 g Glycin 250 ml 10%ige SDS-Stammlösung Aqua bidest ad 2,5 l
SDS-Sammelgelpuffer (4×)	0,5 M Tris 0,4% (w/v) SDS pH 6,8
SDS-Trenngelpuffer (4×)	1,5 M Tris 0,4% (w/v) SDS pH 8,8
TS-Puffer (1×) (Tris-NaCl)	150 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 7,5
TST-Puffer (1×)	150 mM NaCl

(Tris-NaCl-Tween)	10 mM Tris-HCl 0,05% (v/v) Tween-20 pH 7,5
Transferpuffer (Tank-Blot)	192 mM Glycin 25 mM Tris 20% (v/v) Methanol pH 8,3

3.2 Antikörper, Medien, Reagentien, Reaktionskits

BIOMOL, Hamburg, Deutschland	Anti-Horse IgG (T), Horseradish Peroxidase conjugated [Goat]
DIANOVA, Hamburg, Deutschland	Anti-Horse IgG (H+L), Peroxidase-conjugated [Goat]
FERMENTAS, St. Leon-Rot, Deutschland	PageRuler™ Prestained Protein Ladder
G-BIOSCIENCES, St. Louis, USA	CB-X™ Protein Assay
IDEXX, Maine, USA	Snap Foal IgG Test®
INTERVET, Unterschleißheim, Deutschland	Panacur® (Fenbendazol)
KPL, Gaithersburg, USA	Anti-Horse IgM (μ), Peroxidase-labeled [Goat]
CARL-ROTH, Karlsruhe, Deutschland	Rotiphorese®NF-Acrylamid (30%); Roti®-Block (10×); Roti®-Load (4×) ; Nystatin-Dihydrat (>4400 IE/mg); TEMED
SERUMWERK BERNBURG AG, Bernburg, Deutschland	Hippoparex® (Pyrantelemonat)
SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Deutschland	Amicon Ultra centrifugal filter units, Ultra-50, MWCO 10 kDa; Antibiotic Antimycotic Solution (100×); L-Glutamin (99%-100%); Minimum Essential Medium Eagle W/L-Glutamine; Tosyl-L-Lysin-Chlormethyl-Keton-Hydrochlorid (TLCK), OPD-Tabletten (10mg), Wasserstoffperoxid-Lösung
THERMO SCIENTIFIC, Rockford, USA	GelCode® Blue Stain Reagent; SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrat

3.3 Gefäße, Geräte und Verbrauchsmaterialien

ANALYTIK JENA, Jena, Deutschland	TMix
BARLOWORLD SCIENTIFIC, Staffordshire, Großbritannien	Stuart Wipptisch Modell SSL3
BECKMAN COULTER, Brea, USA	Beckman® Model TJ-6 Zentrifuge
BEURER, Ulm, Deutschland	Küchenwaage KS22
BIO-RAD, München, Deutschland	Mini-PROTEAN® Tetra Cell; PowerPac™ Universal
BIOSTEP GmbH, Jahnsdorf, Deutschland	V20-Semi-Dry-Blotter
BIOTEK, Bad Friedrichshall, Deutschland	Synergy 4; Epoch
EPPENDORF, Hamburg, Deutschland	Centrifuge 5415 R; Centrifuge 5430 R; Pipetten: 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl; Mehrkanalpipette Research und Research pro (300)
G KISKER, Steinfurt, Deutschland	Thermoshaker PST-60HL-4
HERAEUS SEPATECH, Osterode, Deutschland	Biofuge pico, Multifuge 1.0
INTAS SCIENCE IMAGING INSTRUMENTS GmbH, Göttingen, Deutschland	Chemolumineszenz Imager CHEMOCAM HR 16 3200
IKA LABORTECHNIK, Staufen, Deutschland	Vortex Genius 3; VF2 Vortexer; Combimag RCT Heizrührer; Schüttler MTS 4
INTEGRA BIOSCIENCE, Fernwald, Deutschland	Pipetboy accu (Pipettierhilfe)
KNICK, Berlin, Deutschland	pH-Meter 761 Calimatic
MDH LIMITED, Hampshire, Großbritannien	Mikroflow Werkbank
MEMMERT, Schwabach, Deutschland	Wasserbad; Brutschrank

RETSCH, Haan, Deutschland	Test Sieves, 200 mm DIA × 25 mm, 50 µm, 80 µm, 150 µm
CARL-ROTH, Karlsruhe, Deutschland	Tissue Boxen; Handschuhe Rotiprotect-Latex; Autoklavierband; Bacillol Tissues; Parafilm; pH Indikatorpapier 5,0-9,0; Rotilabo®-Abdeckfolie für Mikrotestplatten; Rotilabo®-Blottingpapier; 500 ml Schottflaschen; Skalpellklingen; Multifrequenz Ultraschall-Reinigungsgerät ELMA Transsonic TI-H-10
SARSTEDT, Nümbrecht, Deutschland	EDTA-K Röhrchen; Filtropur BT50 0.2 Flaschenaufsatzfilter; Kulturflaschen 75 cm ² ; 10 µl Pipettenspitzen; 100 µl Pipettenspitzen; 1000 µl Pipettenspitzen; 10 ml Pipettenspitzen; 1,5 ml Reaktionsgefäße; 2 ml Reaktionsgefäße; 15 ml Röhrchen; 50 ml Röhrchen; 120 ml Gefäße; Transferpipetten 3,5 ml; Serologische Pipetten 25 ml und 10 ml
SARTORIUS LABORATORY, Göttingen, Deutschland	Waage PT 120
SEFAR, Heiden, Schweiz	SEFAR NITEX 20 µm
SONY, Berlin, Deutschland	Digital Graphic Printer UP-D897
SYNGENE, Cambridge, Großbritannien	Geldokumentation G:Box
Sysmex Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland	Blutanalysegerät Sysmex KX-21N
THERMO SCIENTIFIC, Rockford, USA	Heraeus Multifuge X3R; MSC-Advantage Sicherheitswerkbank (MSC1.2)
University of Naples Federico II, CRINGOLI, Naples, Italien	Flotac-Kammern, FLOTAC-100
VWR INTERNATIONAL GmbH, Darmstadt, Deutschland	Gewebehomogenisator Typ Potter Elvehjem; Gleitgel; 96 Well Nunc MaxiSorp® Mikrotiterplatten; Messbecher; Messzylinder; Zellkulturröhrchen Nunclon™Δ, Nunc™; Sieb Ø 70 mm

WDT, Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte eG, Garbsen, Deutschland	1,2 × 40 mm große Kanülen (18 G); Serumprobenröhrchen 10 ml; Spritzen 25 ml und 30 ml
WHATMAN GmbH, Dassel, Deutschland	Protran®Nitrocellulosemembran 0,2 µm
ZEISS, Jena, Deutschland	Stereomikroskop, Inversmikroskop (Televal 31)

3.4 Probanden

3.4.1 Probandengruppe

Zur Probenentnahme wurde ein sehr großes Warmblutgestüt in Deutschland ausgewählt, in dem vorberichtlich ein Befall mit *Parascaris* spp. und erste Resistenzen gegen Entwurmungsmittel bekannt waren.

Die Probenentnahme im Rahmen des gestütseigenen Monitorings fand in den Zeiträumen vom 11. April bis 30. September 2011 und vom 15. April bis 30. September 2012 statt. In der ersten Probenentnahme im Jahr 2011 wurden von insgesamt 188 Warmblutfohlen wöchentlich über insgesamt 25 Wochen Blut- und Kotproben genommen. In der zweiten Probenentnahme im Jahr 2012 wurden in den ersten neun Projektwochen wöchentlich Blutproben genommen. Ab der 10. bis zur 24. Projektwoche wurden wöchentlich Blut- und Kotproben von insgesamt 159 Fohlen gewonnen. Aufgrund der gestaffelten Aufnahme von Fohlen in den ersten Wochen war der Probenentnahmezeitraum nicht für alle Fohlen gleich lang. So wurden im Jahr 2011 über den Zeitraum von 17 bis 25 Lebenswochen bei den Fohlen Blut- und Kotproben genommen. Im Jahr 2012 wurden über 18 bis 24 Lebenswochen Blutproben und über 14 Lebenswochen Kotproben gewonnen.

Die Kotprobensammlung wurde wöchentlich jeweils ein bis maximal zwei Mal durchgeführt, dennoch konnten nicht von jedem Fohlen wöchentliche Kotproben gewonnen werden. Alle Probanden wurden unter gleichen Umweltbedingungen geboren und gehalten. Eine Übersicht zu den Probenentnahmedaten ist in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Übersicht der Probenentnahme beider Projektjahre

Durchgang	2011	2012
Beginn	11.04.11	15.04.12
Ende	30.09.11	30.09.12
Dauer in Wochen	25	24
Fohlenzahl	188	159
Lebensalter zu Beginn der Beprobung	3. Lebenswoche	1. Lebenswoche
Beginn der Blutprobenentnahme	1. Projektwoche	1. Projektwoche
Beginn der Kotprobenentnahme	1. Projektwoche	10. Projektwoche

3.4.2 Haltung der Probanden

Zur Abfohlung wurden die hochtragenden Stuten in Boxen in einem separierten, desinfizierten Stall aufgestellt, der nur über eine Hygieneschleuse zu erreichen war. Eine stetige Überwachung der Stuten durch geschultes Personal war rund um die Uhr vorhanden. Wenige Stunden nach der Geburt kamen die Stuten mit ihren Fohlen in frische Boxen, die gemistet, hochdruckgereinigt und desinfiziert wurden. Zur Desinfektion der Stallflächen wurde Neopredisan® (Menno Chemie-Vertrieb GmbH) verwendet. Acht bis zehn Stunden nach der Geburt wurde jeder Neonat durch einen Tierarzt klinisch untersucht und venöses Blut zur Bestimmung des Immunglobulin- und Leukozytengehaltes aus der Vena jugularis externa entnommen. Lag der Immunglobulingehalt, der mittels Snap Foal IgG Test® (IDEXX) bestimmt wurde, unter einem Wert von 800 mg/dL, wurde oral oder per Nasenschlundsonde Kolostrum eingegeben. Der IgG-Gehalt wurde anschließend zwei Stunden nach der Eingabe mit einem erneutem Snap-Test kontrolliert. War der Wert auch nach der Kolostrumeingabe noch < 800 mg/dL, wurde Plasma infundiert.

Nach sieben bis zehn Tagen in den Boxen wurden die Stuten mit ihren Fohlen in Laufställe umgestellt. Die Laufställe hatten eine Gruppengröße von 8 bis 14 Stuten mit ihren Fohlen, je nach Größe des Stalles. Jeder Stall war mit Stroh eingestreut und verfügte über einen betonierten Außenpaddock, der dreimal die Woche maschinell abgezogen wurde um den Kot zu entfernen. Es wurde dreimal die Woche mit Stroh übergestreut und regelmäßig komplett

entmistet, hochdruckgereinigt und desinfiziert. Alle Stuten mit Fohlen hatten freien Zugang zu Wasser, Heu ad libitum und zweimal täglich stand Mischfutter, bestehend aus Mais- und Grassilage, Hafer und Mineralstoffen zur Verfügung. Ab einem Alter von vier Wochen kamen die Fohlen, sofern keine klinischen Befunde auffällig waren, mit ihren Müttern ganztags auf die Weide. Jederzeit war der Kontakt zwischen den einzelnen Gruppen über die Begrenzung von Stall und Paddock möglich. Weiterhin wurde die Gruppenzusammensetzung, vor allem im höheren Fohlenalter, fast wöchentlich verändert.

3.4.3 Impfung und Entwurmung der Fohlen

Alle Stuten waren gegen EHV-1 und -4, Equine Influenza und Tetanus vakziniert. Die Fohlen wurden erstmals mit sechs Monaten geimpft. Die Entwurmung der Stuten mit Ivermectin (Ivomec®, MERIAL) fand kurz vor der Geburt und anschließend ungefähr alle drei bis vier Monate mit Moxidectin, Pyrantel oder Ivermectin statt. Die Fohlen wurden erstmals am 14. Lebensstag mit dem Wirkstoff Fenbendazol (Panacur®-Paste, INTERVET) entwurmt. Im weiteren Verlauf wurden sie im sechs bis acht Wochenrhythmus mit dem Wirkstoff Pyrantelmonat (Hippoparex®, SERUMWERK BERNBURG AG) entwurmt.

3.4.4 Klinische Untersuchung

Zum wöchentlichen Monitoring der Fohlen gehörte eine klinische Allgemeinuntersuchung sowie eine Blutprobenentnahme. Dabei wurde jedes Fohlen im Verhalten und der Haltung beurteilt sowie der Bewegungsapparat auf Verletzungen, klinische Auffälligkeiten und Umfangsvermehrungen kontrolliert. Es wurde die rektale Körpertemperatur gemessen und der Nabelstumpf beurteilt. Die respiratorische Untersuchung setzte sich aus der Auskultation von Trachea und Lunge zusammen, wobei auf Verschärfungen (gering-, mittel- und hochgradig) und Nebengeräusche wie Rasseln oder Giemen geachtet wurde. Weiterhin wurden die Mandibularlymphknoten auf Größe, Konsistenz und Schmerzhaftigkeit untersucht und eventueller Nasenausfluss beurteilt. Gab es Nasenausfluss, so wurde eine Unterteilung im Charakter (serös, seromukös, mukös, mukopurulent, purulent) und der Menge unternommen. Alle Befunde wurden in einem Untersuchungsprotokoll notiert (siehe Anhang Tabelle 13) und anschließend im Rahmen der statistischen Auswertung mittels des „klinischen Scores“ nach Ohnesorge et al. (1998) (siehe Tabelle 2) beurteilt. Die oben genannten respiratorischen

Parameter wurden mit Punktzahlen klassifiziert und zu einem Gesamtscore zusammengefasst, der die Einteilung in einen Erkrankungsgrad vereinfachen sollte:

- Gesamtscore zwischen 0 – 1: lungengesund
- Gesamtscore zwischen 2 – 3: geringgradig respiratorisch erkrankt
- Gesamtscore zwischen 4 – 5: mittelgradig respiratorisch erkrankt
- Gesamtscore ≥ 6 : hochgradig respiratorisch erkrankt

Eine Lungentherapie wurde in Abhängigkeit von verschiedenen Kriterien wie: Fieber, Alter des Fohlens bei auffälligen Symptomen, Abszessgröße, Allgemeinbefinden, Leukozytenwert, Nasenausfluss und abnormaler Atemfrequenz bzw. -typ begonnen. Die Therapie einer Nabelentzündung wurde bei einem auffälligen adspektorischen oder sonografischen Befund durchgeführt.

Tabelle 2: Klinischer Score nach Ohnesorge et al. (1998) zur Beurteilung des Schweregrades der klinischen respiratorischen Symptome beim Pferd

Merkmal	Befund	Punktzahl
Nasenausfluss	nein	0
	serös, seromukös	1
	purulent	2
Hustenauslösung	nicht auslösbar	0
	mehrfach	1
	spontan	2
Lnn. mandibulares	o.b.B.	0
	vergrößert	1
Ruhedyspnoe	nein	0
	Einsinken der Interkostalräume, Nüsternblähen	3
Lungenauskultation	vesikulär, vesikulär verschärft	0
	rasseln, knistern, giemen	2
Tracheaauskultation	o.b.B	0
	rasseln	2
Gesamtscore		0-12

3.4.5 Labordiagnostische Untersuchung

Im Rahmen des wöchentlichen Gestütsmonitorings wurde Blut aus der linken oder rechten Vena jugularis externa entnommen und die Blutleukozyten bestimmt. Dazu wurde mit einer 1,2 × 40 mm großen Kanüle (WDT) Blut in ein Kalium-EDTA beschichtetes Röhrchen (SARSTEDT) laufen gelassen und zur besseren Verteilung des Antikoagulans geschwenkt. Die Bestimmung der Leukozyten wurde mit einem Blutanalysegerät (SYSMEX DEUTSCHLAND GmbH) durchgeführt. Die Leukozytenwerte der Fohlen wurden jede Woche in die Untersuchungsprotokolle (siehe Anhang Tabelle 13) der einzelnen Fohlenakten eingetragen. Zur späteren statistischen Auswertung wurde eine Einteilung der Leukozytenwerte in drei Kategorien vorgenommen. Der Normbereich von Fohlen lag zwischen 5,5 und 11,5 G/l (Knottenbelt D. C. 2007) und stellte die mittlere Kategorie dar. Die Werte unter und über diesem Bereich wurden als erste und dritte Kategorie ausgewertet.

3.5 Kot- und Blutproben

3.5.1 Auswahl der Probanden

Das Geburtsdatum war das entscheidende Kriterium für die Auswahl der Probanden. In der Literatur wird eine Körperwanderung der *Parascaris* spp.-Larven in den ersten zwei bis vier Wochen nach einer Infektion angegeben (siehe Kapitel 2.1.3 Entwicklungszyklus). Bei zwei Wochen alten Fohlen hat es sich als schwierig erwiesen Kotproben zu gewinnen, da sie meist im Rahmen der Fohlenrosse Diarrhoe hatten, so dass im ersten Probenjahr 2011 bei Fohlen in der dritten Lebenswoche mit der Kot- und Blutprobengewinnung begonnen wurde. Es wurden ab dem 11.04.2011 in jeder Projektwoche 25 - 30 Fohlen im entsprechenden Alter in die Studie aufgenommen, so dass insgesamt acht Projektwochen benötigt wurden, um 188 Probanden zu sammeln, die dann bis zum 30.09.2011 beprobt wurden. Im Jahr 2011 wurden Blut- und Kotproben stets simultan entnommen. Kam es zu einer fehlenden Kotprobe, so konnte im Rahmen des erweiterten gestütseigenen Monitorings bei auffälligen klinischen oder Laborwerten ein zweiter Versuch der Kotprobengewinnung unternommen werden.

Im Jahr 2012 wurde zur selben Jahreszeit (Mitte April) mit der Probenentnahme begonnen, jedoch mit einigen Unterschieden zu dem ersten Projektjahr. Durch die lange Präpatenz des Parasiten wurden 2011 in den ersten neun Projektwochen in der koproskopischen Untersuchung keine *Parascaris*-Eier gefunden. Im Jahr 2012 wurde in den ersten neun Projektwochen auf die Kotprobenentnahme und -untersuchung verzichtet. Die

Blutprobenentnahme startete jedoch bereits im Alter von ca. einer Lebenswoche parallel zum gestütseigenen wöchentlichen Monitoring. Zusätzlich, in Kooperation mit einem anderen Projekt im Jahr 2012, wurde bei zwölf der 159 Fohlen Blut vor der ersten Kolostrumaufnahme und bei sechs der zwölf präkolostral getesteten Fohlen 48 h nach Kolostrumaufnahme Blut genommen. Bei zwei der zwölf präkolostral beprobten Fohlen wurden Serum und Kolostrum von den Stuten zum Zeitpunkt der Blutentnahme beim Fohlen genommen.

Insgesamt wurden über die ersten sechs Projektwochen jeweils 25-30 Fohlen wöchentlich aufgenommen und bis zur 24. Projektwoche im Rahmen der gestütseigenen tierärztlichen Betreuung untersucht.

3.5.2 Probenentnahme

Die im Rahmen der routinemäßig durchgeführten Gesundheitsüberwachung wöchentlich entnommenen Serumproben der Fohlen wurde in den Serumröhrchen (WDT) sechs bis zwölf Stunden aufrecht stehen gelassen und anschließend 10 min bei 1875g zentrifugiert (BECKMAN COULTER). Der Serumüberstand wurde in 1,5 ml bzw. 2 ml Eppendorfgefäße (SARSTEDT) pipettiert und bei -20 °C eingefroren.

Die Kotproben wurden wöchentlich gesammelt. Die frisch gewonnene Kotprobe wurde in ein 120 ml Gefäß (SARSTEDT) gegeben und im Kühlschrank bis zur koproskopischen Untersuchung für maximal vier Tage gelagert.

3.5.3 Koproskopische Untersuchung (FLOTAC-Verfahren)

Die Kotproben wurden in 120 ml Gefäßen (SARSTEDT) gesammelt und mit einer Küchenwaage (BEURER) abgewogen. Ein Probengewicht von 3 bis 12 g war Grundlage für die Untersuchung, da damit die Verdünnung der Probe im 120 ml Gefäß möglich war. Jede Probe wurde entsprechend des FLOTAC-Protokolls (siehe Kapitel 2.3.1.1 FLOTAC-Verfahren) bearbeitet. Nach einer Verdünnung mit Leitungswasser im Verhältnis 1 : 10 und Homogenisierung der Probe, wurde die Suspension über ein Teesieb (VWR) gegeben. Das aufgefangene Filtrat wurde in ein 15 ml Röhrchen (SARSTEDT) gegeben und 2 min bei 470g zentrifugiert (BECKMAN). Der Überstand wurde dekantiert und das Sediment mit gesättigter NaCl-Lösung aufgefüllt. Mit einer Transferpipette (SARSTEDT) wurde die Suspension durchmischt und luftblasenfrei in die FLOTAC-Kammern (Cringoli 2006) gefüllt. Die

Kammern wurden verschlossen und 5 min bei 200 g zentrifugiert. Nach dem vorsichtigen Entnehmen der Kammern aus der Zentrifuge wurden die Zählscheibe etwas gedreht und damit das Zählnetz gut sichtbar. Mit Hilfe des Mikroskop-Adapters wurden die Kammern auf dem Objektisch des Mikroskops (ZEISS) fixiert und konnten ausgezählt werden. Ein gezähltes Ei entsprach einem Ei pro Gramm Kot (EpG). Aufgrund der wöchentlich anfallenden großen Probenanzahl wurde pro Tier nur ein Feld pro Kammer gefüllt, mikroskopisch kontrolliert und das Ergebnis verdoppelt, um auf die EpG-Zahl für jedes Tier zu kommen. Die Sensitivität dieser Kotuntersuchungen lag somit bei zwei Eiern pro Gramm Kot.

3.5.4 Nachträgliche Untersuchung der Probanden

In beiden Jahren wurden über 25 bzw. 24 Projektwochen Proben im Rahmen des gestützeigenen Monitorings von den Fohlen genommen. Von insgesamt 80 der 347 Fohlen wurden im November beider Jahre nachträglich Proben gewonnen, um den koproskopischen Status dieser Tiere zu bestimmen. Einerseits könnten die Fohlen, die im Mai/Juni geboren wurden und zum Zeitpunkt der koproskopischen Untersuchung bis Ende September beider Jahre möglicherweise noch in der Präpatenz waren, fälschlicherweise als koproskopisch negativ betrachtet worden sein. Andererseits sollten Fohlen mit auffällig hohen EpG-Werten erneut getestet werden. Im Rahmen dieser Maßnahme wurden Kotergebnisse und Blutproben ausgewählter Fohlen circa acht Wochen nach Beendigung der Probenentnahme im Jahr 2011 und 2012 gewonnen.

3.6 Eiisolierung, Embryonierung und Kultivierung

Zur Gewinnung exkretorisch-sekretorischer Antigene (ES) der *Parascaris* spp.-Larven mussten diese *in vitro* kultiviert werden. Das infektiöse Stadium, das larvenhaltige Ei, war Ausgangspunkt für eine folgende Kultivierung. Spulwurmeier wurden aus gesammelten adulten weiblichen Würmern oder Kotproben von Pferden isoliert. Nach einer Embryonierung wurden die embryonierten Eier, welche eine lebende Larven enthielten, zum Larvenschlupf gebracht. Mit den lebenden intakten Larven wurden Larvenkulturen angelegt und die abgesonderten Ex- und Sekrete über einen Mediumwechsel gewonnen. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden keine *Parascaris* spp.-Kultivierungsversuche beschrieben. Ein Protokoll wurde mit Hilfe von veröffentlichten Kultivierungsmethoden von Spulwürmern (*A. suum/lumbricoides* sowie *T. canis*) anderer Tierarten ermittelt.

3.6.1 Aufreinigung von *Parascaris* spp.-Eiern aus dem Kot

Der gesammelte Kot wurde mit Leitungswasser homogenisiert und durch zwei 150 µm bzw. 80 µm Siebe (RETSCH) gespült, die übereinander lagen. Die Eier befanden sich aufgrund ihrer Größe von 90 bis 100 µm auf dem 80 µm Sieb. Mit etwas Leitungswasser wurde die auf dem Sieb verbleibende Suspension gleichmäßig in 50 ml Röhrchen (SARSTEDT) überführt und für 5 min bei 570 g und Raumtemperatur (RT) in der Heraeus Multifuge X3R (THERMO SCIENTIFIC) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit den enthaltenen Parasiteneiern mit gesättigter NaCl-Zucker-Lösung resuspendiert und erneut 5 min bei 570 g und RT zentrifugiert. Durch diesen Flotationsschritt gelangen die Parasiteneier in den Überstand, der anschließend über ein 50 µm Sieb (RETSCH) gegeben wurde und die gesättigte NaCl-Zucker-Lösung mit viel PBS ausgewaschen wurde. Die *Parascaris* spp.-Eier wurden von der Sieboberfläche erneut mit einer Pasteurpipette und etwas PBS abgenommen und gleichmäßig in 50 ml Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden gleichmäßig mit PBS aufgefüllt und für 5 min, bei RT und 570 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen oder vorsichtig abpipettiert. Für den nächsten Schritt wurden die 50 ml Röhrchen auf 20 ml mit Aqua bidest. aufgefüllt und 30 ml NaClO (5 – 6 %) hinzugegeben, um die „klebrige“ Proteinhülle der Eier aufzulösen. Diese Suspension wurde bei RT für 24 h inkubiert.

Vor dem Auswaschen wurde eine Sichtkontrolle unter dem Mikroskop durchgeführt, um zu überprüfen ob alle Eier intakt und eventuell enthaltene Larven vital waren. Schließlich wurde die Suspension über ein 50 µm Sieb gegeben und die NaClO-Lösung gründlich mit Aqua bidest. ausgewaschen. Die sauberen Eier wurden mit einer Pipette in eine unbelüftete Kulturflasche (SARSTEDT) geben. In 1 ml der Suspension sollten möglichst 10.000 – 20.000 Eier enthalten sein, um eine optimale Embryonierung zu ermöglichen. Im Folgenden wurde, wie im Kapitel 3.6.3 beschrieben, weiterverfahren.

3.6.2 Gewinnung von *Parascaris* spp.-Eiern aus adulten Weibchen

Weibliche Würmer wurden durch den spontanen Abgang nach einer Entwurmung auf dem Gestüt gewonnen oder aus einem Schlachthof in Krakau, Polen, gewonnen.

Tot oder lebend mussten die Würmer vor der weiteren Verwendung mehrmals mit PBS gewaschen werden. Die gesammelten lebenden adulten Würmer konnten in eine Kultur gebracht werden. Dazu wurden bis zu fünf adulte Würmer mit 500 ml 37 °C warmen APF-Mediums bedeckt in einen Erlenmeyerkolben oder eine Kulturflasche (250 ml Volumen)

gegeben. Die belüftete Kulturflasche bzw. der Erlenmeyerkolben wurde mit gelöchertem Parafilm abgedeckt und blieb in einem Brutschrank (MEMMERT) bei 37 °C für fünf Tage stehen. Ein Mediumwechsel wurde zweimal täglich durchgeführt. Anschließend wurden Spulwürmer und Medium getrennt. Das gewonnene Medium wurde sterilfiltriert, ultrazentrifugiert, aliquotiert und der Proteingehalt bestimmt (siehe Kapitel 3.6.6 Aufbereitung von *Parascaris* spp.-ES-Antigen). Nach dem Aliquotieren wurde das sterilfiltrierte Medium der adulten Würmer bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren. Die weiblichen Würmer, bei denen die weißen Uterusschläuche von außen gut sichtbar sind, wurden in ein Becherglas gegeben und zur Eiisolierung genutzt. Mit Hilfe einer Schere mit langen Schenkeln wurde der weibliche Wurm in 5 mm Stücke zerkleinert und mit etwas PBS homogenisiert. Diese Suspension wurde über ein grobmaschiges Sieb gegeben. Der Überstand wurde in einen Autoklavierbeutel verbracht und entsprechend entsorgt. Der Durchlauf wurde durch ein 100 µm Sieb filtriert. Die sauberen Eier waren mit vereinzelt Uterusbestandteilen im Durchlauf und wurden erneut über ein 50 µm Sieb gegossen. Die *Parascaris* spp.-Eier wurden von der Sieboberfläche abgenommen, in ein 50 ml Falcon gegeben und mit NaClO 0,5 % für 3 min geschüttelt. Diese Suspension wurde für 5 min, bei RT und 570 g zentrifugiert und anschließend der Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde mit sterilfiltriertem PBS gelöst, gut durchmischt und erneut zentrifugiert. Das Waschen mit sterilfiltriertem PBS und anschließendes Zentrifugieren wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Im Folgenden wurde, wie im folgenden Kapitel beschrieben, weiterverfahren.

3.6.3 Embryonierung von *Parascaris* spp.-Eiern

Die aus dem Kot oder adultem Wurm aufgereinigten Eier wurden nach dem letzten Waschschrift mit 0,1 N H₂SO₄ gelöst und in eine unbelüftete Kulturflasche (SARSTEDT) überführt. Die Konzentration der Eier sollte 10.000 - 20.000 Eier pro ml Suspension nicht übersteigen, um eine optimale Entwicklung zu gewährleisten.

Die Kulturflasche wurde für bis zu 30 Tage bei RT gelagert und zweimal wöchentlich mikroskopisch kontrolliert und unter einer Werkbank mit einer Pipette belüftet. Nach der abgeschlossenen Embryonierung befanden sich im Großteil der Eier vitale Larven. Je nach Reifegrad der Eier waren auch abgestorbene schwarze Eier in der Suspension. Dies war vor allem bei der Eigewinnung aus den Uterusschläuchen der adulten Weibchen der Fall. Nach einer Zentrifugation verblieben diese unreifen leichteren Eier im Überstand und wurden abgenommen.

Zum Ende der Embryonierung sollten 70 bis 80 % der Eier lebende Larven enthalten. Diese infektiösen Eier konnten sofort oder nach einer Lagerung bei 4 °C zur Larvengewinnung verwendet werden. In den vorliegenden Versuchen wurden Eier nach einer Lagerung von bis zu 12 Monaten erfolgreich kultiviert.

3.6.4 Gewinnung von *Parascaris* spp.-Larven

Die embryonierten Eier wurden viermal mit sterilfiltriertem PBS gewaschen und bei 470 g und RT für 3 min zentrifugiert. Anschließend wurde der pH-Wert der Eispension mit einem pH-Indikatorpapier 5,0 bis 9,0 (CARL-ROTH) kontrolliert. Der pH-Wert sollte bei 7,2 liegen. Diese Vorgehensweise war notwendig für die Wirksamkeit der folgenden Spülung mit einem alkalischen Gemisch. Gegebenenfalls wurde mit PBS weiter gespült, bis der neutrale pH-Wert erreicht war. Das Sediment wurde in dem 10-fachen Volumen eines Gemisches aus 2 % NaOH und 2 % NaClO (1 : 1) für 12 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die *Parascaris* spp.-Eier bei 470 g, 3 min und RT zentrifugiert und mit PBS gewaschen bis der pH-Wert der Suspension wieder bei 7,2 war. Zur Ultraschallbehandlung (CARL ROTH) wurde das Sediment aus Eiern mit 2 - 3 ml 37 °C warmen PBS versetzt, in Zellkulturröhrchen (VWR) gegeben und einer leichten Ultraschallbehandlung (25 W, 50 kHz für 6 – 7 sec) unterzogen. Die Zellkulturröhrchen sollten möglichst einen Flachboden und hervorragende optische Qualität haben, um die folgende mikroskopische Kontrolle der Öffnung der Schale und Intaktheit der Larven zu erleichtern.

Zur sterilen Herstellung des Mediums wurden 100 ml Minimum Essential Medium (MEM), entwickelt von Harry Eagle (SIGMA-ALDRICH), 1 ml Antibiotic-Antimycotic-Solution (SIDMA-ALDRICH) und 1 ml L-Glutamin (25 mg/ml) in eine Schottflasche pipettiert. Zur Vermeidung der Kontamination wurde die Herstellung unter einer Sicherheitswerkbank (THERMO SCIENTIFIC) durchgeführt.

Eine modifizierte Baermann-Apparatur wurde, wie zur Kultivierung von *T. canis* verwendet (Annen et al. 1975), zusammengesetzt: Ein 50 ml Röhrchen (SARSTEDT) bildet das äußere Gefäß. Der innere Teil besteht aus einer abgeschnittenen 25 ml Spritze (WDT), einer 20 µm-Filtermembran (SEFAR), die durch einen Ring aus einer 30 ml Spritze (WDT) an der kleineren Spritze fixiert ist. Dieser Apparat wurde vor der Benutzung autoklaviert. Die Larven-PBS-Suspension wurde in die Apparatur gegeben, mit 37 °C warmen Medium aufgefüllt und die Larven durch das 20 µm Sieb für 5 h bei 37 °C auswandern gelassen. Anschließend wurde das Sediment und Medium in eine unbelüftete Kulturflasche gegeben

und bei 37 °C gelagert. Bei einer erhöhten Larvendichte wurde ein zusätzlicher zweiter Ansatz durchgeführt, indem erneut Medium in den Apparat gegeben wurde, nachdem das erste Sediment abgenommen war.

3.6.5 *In vitro*-Kultivierung der *Parascaris* spp.-Larven

Im Medium war ein Indikator enthalten, der sich bei Verschiebung des pH-Wertes aufgrund der Verstoffwechslung durch die kultivierten Larven verfärbt. Die Larvenkultur wurde zweimal wöchentlich mikroskopisch kontrolliert. Sollte es nicht eher zu einer Verfärbung des Mediums gekommen sein, wurde zweimal wöchentlich das Medium nach Sedimentation der Larven unter der Werkbank gewechselt. Es musste ausreichend Zeit zur Sedimentation gegeben werden und gleichzeitig ein zu starkes Abkühlen der Kultur verhindert werden. Es wurde stets fünf bis zehn Minuten gewartet bis das Medium aus der Kultur mit neuem 37 °C warmen Medium ausgetauscht wurde. So konnte ein Austausch des verbrauchten Mediums mit den Ex- und Sekreten ohne Larvenverluste durchgeführt werden.

Aufgrund der Pilzkontamination einiger Kulturen wurde zusätzlich Nystatin-Dihydrat (CARL-ROTH) in einer Arbeitskonzentration von 50 µg/ml eingesetzt. Die betroffenen Larven waren aus Eiern geschlüpft, die aus dem Kot gewonnen wurden. Die Larvenkulturen wurden solange wie möglich zur Gewinnung der ES-Antigene der Larven im Kulturmedium gehalten. Bei einer Kontamination oder einem Anteil von weniger als 50 % vitale Larven wurde die Kultivierung beendet.

Das gewonnene Medium wurde in einem sterilen Gefäß gesammelt und bei 1400 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer sterilen 25 ml Plastikpipette abgenommen und in neues 50 ml Röhrchen überführt. Bis zur späteren Aufbereitung zur Antigengewinnung wurden das gewonnene Medium und das Sediment mit den Larven bei -20 °C eingefroren.

3.6.6 Aufbereitung von *Parascaris* spp.-ES-Antigen

Zur Proteinextraktion wurde das aus den Kulturen gewonnene Medium langsam aufgetaut und erneut bei 2000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in eine Schottflasche gegeben. Zur anschließenden Sterilfiltration wurde ein Filtropur Flaschenaufsatzfilter mit einer Porengröße von 0,22 µm (SARSTEDT) unter der Werkbank auf eine autoklavierte 500 ml Schottflasche geschraubt und 500 ml des Überstandes in den

Filter gegeben. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe wurde die Flüssigkeit nun durch die Filtermembran gesaugt. Bei der weiteren Arbeit unter der Werkbank wurde Medium zur Ultrazentrifugation in 50 ml Amicon Filter mit einer Porengröße von 10 Kilodalton (kDa) (SIGMA-ALDRICH) gegeben, die Filter in einer Mikrozentrifuge (5430R) mit dem Rotor F-35-630 (EPPENDORF) bei 4000 g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und eine Proteinbestimmung mittels CB-X™ Protein Assay (G-BIOSCIENCES) angeschlossen. Die optische Dichte (OD-Wert) der Probe wurde mit Hilfe des Epoch (BIOTEK) bestimmt und entsprechend der Tabelle aus dem Protokoll zur Proteinbestimmung der Proteingehalt pro Milliliter abgelesen.

3.6.7 Gewinnung weiterer *Parascaris* spp.-Antigene und Beschreibung des *Ascaris suum*-Hämoglobin-Antigens

3.6.7.1 ES-Antigen der adulten *Parascaris* spp.-Würmer

Aus adulten *Parascaris* spp.-Würmern wurde ES-Antigen in gleicher Weise gewonnen. Dazu wurden adulte *Parascaris* spp.-Würmer, die im Rahmen eines anderen Projektes aus einem Schlachthof beschafft wurden, kultiviert. Die adulten Pferdespulwürmer wurden fünf Tage lang in einem Medium (APF-Medium, „artificial perienteric fluid“), das die Bauchhöhlenflüssigkeit nachahmen soll (Weisblat et al. 1976), gehalten. Das mit Würmern und Medium gefüllte Gefäß wurde mit Parafilm abgedeckt, bei 37 °C und täglich zweimaligem Mediumwechsel kultiviert. Das resultierende Medium wurde sterilfiltriert und der Proteingehalt mittels des CB-X™ Protein Assay (G-BIOSCIENCE) bestimmt. Mittels SDS-PAGE wurden die enthaltenen Proteinfractionen der adulten ES-Antigene aufgetrennt. Im folgenden Western Blot und ELISA wurden einige aus dem Gestüt gewonnene Fohlenseren mit dieser Antigenpräparation getestet.

3.6.7.2 Somatisches Antigen der *Parascaris* spp.-Larven

Als weitere Vergleichskomponente zum ES-Antigen der *Parascaris* spp.-Larven sollte somatisches Antigen der *Parascaris* spp.-Larven dienen. Diese somatischen Antigene wurde nach der Methodik eines Protokolls von Proudman et al. (1996) hergestellt. Dazu wurde das Sediment mit den darin enthaltenen Larven nach der Zentrifugierung des Mediums aus der Larvenkultur (siehe Kapitel 3.6.5) genutzt. Zu dem Sediment wurde 1 µl TLCK (SIGMA-ALDRICH) gegeben und auf Eis in einem Homogenisator (VWR) für 5 min bearbeitet. Der

Versuch, die Larven im Ultraschallbad zu zerkleinern, führte zu keinem zufriedenstellenden Erfolg. Nach anschließender Zentrifugierung bei 2600 g, 4 °C und für 10 min wurde der Überstand abgenommen und eine Proteinbestimmung mittels CB-X™ Protein Assay (G-BIOSCIENCE) durchgeführt.

3.6.7.3 Somatisches Antigen der adulten *Parascaris* spp.-Würmer

Aus den adulten *Parascaris* spp.-Würmern wurde ein Ganzwurmextrakt hergestellt. Mit dieser somatischen Antigenpräparation der adulten Spulwürmer wurden weitere Tests durchgeführt. Nach einer mechanischen Zerkleinerung des adulten *Parascaris* spp.-Wurmes und der Homogenisierung wurde der Überstand nach dem Zentrifugieren abgenommen. Die Proteinbestimmung wurde mit dem CB-X™ Protein Assay (G-BIOSCIENCE) durchgeführt.

3.6.7.4 *Ascaris suum*-Hämoglobin-Antigen (Schweinespulwurm-Antigen)

Zum Nachweis von Kreuzreaktionen im ELISA wurde Fohlenserum mit *A. suum*-Antigen getestet. Die beschichteten Platten mit dem *A. suum*-Hämoglobin-Antigen (1 µg/ml) wurden von der Arbeitsgruppe um Herrn Professor Peter Geldhof aus dem parasitologischen Labor der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Gent (Belgien) bereit gestellt. Zur Gewinnung dieses Proteins wurden *A. suum*-Würmer aus natürlich infizierten Schweinen von einem Schlachthof gesammelt. Die Schweinespulwürmer wurden dreimal mit Leitungswasser gewaschen und die Pseudocoelomflüssigkeit aufgefangen, nachdem das Hinterteil der Würmer abgeschnitten wurde. Diese Flüssigkeit aus dem Körperinneren des Spulwurmes wurde zentrifugiert, der Überstand sterilfiltriert und zum Beschichten der ELISA-Platten genutzt (Wittenberg et al. 1965; Vlaminck et al. 2012).

3.7 Antigengewinnung

Zur Charakterisierung eines unbekanntes Proteins wird zur Auftrennung eine SDS-PAGE durchgeführt. Die Proteine werden im SDS-PAGE analytisch aufgetrennt und in einem weiteren Schritt direkt oder nach Bindung an Antikörper sichtbar gemacht. Im SDS-PAGE nach Laemmli (1970) werden die Proteine in vertikaler Richtung elektrophoretisch anhand ihrer Größe aufgetrennt. In einem nächsten Schritt kann eine unspezifische Färbung aller Proteine oder ein spezifischer Nachweis im Western Blot folgen. In der vorliegenden Studie

wurden Seren von Fohlen mit bekanntem koproskopischen Befund und ein selbstproduziertes Antigen getestet. Mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten sekundären Antikörpers, der spezifisch gegen bestimmte Bereiche des ersten Antikörpers im Fohlenserum gerichtet ist, kann eine Bindung an den Serumantikörper stattfinden. Die Detektion dieser Antigen-Antikörper-Bindungen wird durch das Hinzugeben des Enzymsubstrates und den photometrischen Nachweis einer folgenden Farbreaktion möglich.

3.7.1 SDS-PAGE

Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration der adulten somatischen, adulten ES und larvalen ES-Antigene der *Parascaris* spp. wurde eine weitere Aufbereitung für die folgende SDS-PAGE vorgenommen. Zu der benötigten Proteinmenge (10-30 µg) wurde die entsprechende Menge Ladungspuffer 4 × Roti®-Load (CARL-ROTH) gegeben und für 5 min bei 105 °C im TMix (ANALYTIK JENA) erhitzt, um eine Auftrennung der Disulfidbrücken sowie eine einheitliche negative Ladung zu erreichen. Der Protein-Puffer stabilisiert die Peptidbindungen, verhindert den Proteinabbau und sorgt für eine verbesserte Auftrennung im Gel. Nach der Erhitzung wurden die Antigene auf Eis abgekühlt. Die Proben konnten nun direkt auf das Gel aufgetragen werden.

Zur Auftrennung des Antigens diente ein 12,5%-iges SDS-Polyacrylamidgel (Trenngel), das nach der Polymerisierung mit einem 5%-igem SDS-Polyacrylamidgel (Sammelgel) übergossen wurde und so ein Gel mit den Maßen: 8 cm × 10 cm entstand. Nachdem das Gel in den Fixierahmen (BIO-RAD) eingespannt war, wurden 10 µg Protein in eine Geltasche gegeben, entsprechend einem Volumen von 20 µl 1 × Roti®Load. Als Größenstandard wurden 5 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder (FERMENTAS) in eine Geltasche gegeben. Für die folgende elektrophoretische Auftrennung wurde in den ersten 30 min eine Spannung von 50 Volt angelegt, so dass die verschiedenen Proteine im Sammelgel auf gleicher Höhe laufen. Anschließend kam es bei 80 Volt für circa 2 h zur eigentlichen Proteinauftrennung im Trenngel. Das Gel wurde nun entweder mittels Coomassie Blue angefärbt oder für einen Western Blot verwendet.

3.7.2 Proteinfärbung mittels Coomassie Blue

Nach dem Abschluss der Proteinauftrennung im SDS-PAGE wurde das SDS-Trenngel dreimal für 10 min in destilliertem Wasser gewaschen und anschließend für 60 min in der

Färbelösung GelCode (THERMO SCIENTIFIC) inkubiert. Eine gleichmäßige Verteilung der Färbelösung wurde durch die Nutzung eines Rotators (BARLOWORLD SCIENTIFIC) erreicht. Bereits während der Inkubation mit der Färbelösung wurden die Proteinbanden durch eine Blaufärbung sichtbar. Ein erneuter dreimaliger Waschvorgang mit destilliertem Wasser für 10 min sollte nicht gebundene Farbkomplexe entfernen, um so einen besseren Kontrast zwischen Umgebung und Proteinbanden zu erreichen. Das Gel wurde über Nacht bei Raumtemperatur in destilliertem Wasser gelagert und am nächsten Morgen fotografiert, da ein weiteres Auswaschen der unspezifischen Hintergrundfärbung einen besseren Kontrast erzeugte. Das Gel wurde in der Geldokumentation G:Box (SYNGENE) fotografiert und das Bild mit dem digitalen Grafikdrucker UP-D897 (SONY) ausgedruckt.

Alle Schritte wurden bei RT und in mit Parafilm abgedeckten Behältnissen durchgeführt, um ein Verflüchtigen der Flüssigkeiten zu verhindern.

3.7.3 Western Blot

Die Übertragung der Proteine vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran (WHATMAN GmbH) fand nach dem Semi-Dry-Blot-Verfahren in einer Blotkammer (BIO-RAD) statt.

In Vorbereitung für diesen Blot wurden sechs Filterpapiere (CARL ROTH) und eine Nitrocellulosemembran (WHATMAN GmbH) entsprechend der Größe des Gels zugeschnitten. Die Filterpapiere wurden in Transferpuffer und die Membran in Laufpuffer eingetaucht. Von dem SDS-Gel wurde vorsichtig das Sammelgel mit einer Skalpellklinge (CARL ROTH) abgeschnitten, das Trenngel in Transferpuffer gelegt und leicht geschwenkt. Die drei Transferpuffer-getränkten Filterpapiere wurden auf den Boden der Bloteinheit (Anode) gelegt. Darüber wurden die im Laufpuffer getränkte Blotmembran, das SDS-Trenngel sowie die restlichen drei getränkten Filterpapiere geschichtet und die Luftblasen mit einem Roller vorsichtig entfernt. Nachdem die zweite Elektrodenplatte (Kathode) obenauf gelegt wurde, konnten die Stromkabel angeschlossen und die Stromstärke von $0,8 \text{ mA pro cm}^2$ des Gels eingestellt werden. Nach 90 Minuten wurde der Proteintransfer beendet und die Membran vorsichtig in eine Schale mit $1 \times$ Roti®-Block-Lösung gelegt und mit Parafilm abgedeckt. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde mit $1 \times$ TST-Puffer eine $1 \times$ Roti®-Block-Lösung hergestellt. Die Inkubation mit $1 \times$ Roti®-Block-Lösung wurde über Nacht bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ auf einem Wippschüttler vorgenommen.

3.7.4 Immunodetektion

Nach dem Proteintransfer vom SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran im Western Blot wurden unspezifische Bindungsstellen mit 1 × Roti®-Block-Lösung über Nacht geblockt. Zum Nachweis der Antigenkomponenten wurde das gewonnene Fohlenserum aus dem Gestüt 1 : 400 mit 1 × Roti®-Block-Lösung verdünnt und unter ständigem Schwenken der Membran für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Darauffolgend wurde die Membran dreimal für 10 min mit 1 × TST-Puffer gewaschen und mit einem Peroxidase-konjugierten Anti-Horse IgG (DIANOVA) in einer Verdünnung von 1 : 5.000 (in 1 × Roti®-Block-Lösung) unter ständigem Schwenken der Membran für eine Stunde bei RT inkubiert. Im folgenden Schritt wurde zweimal für 10 min mit 1 × TST-Puffer und abschließend einmal 10 min mit 1 × TS-Puffer gewaschen.

3.7.5 Chemilumineszenz

Der Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper konnte mit Hilfe des SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrat (THERMO SCIENTIFIC) Chemilumineszenz erzeugen. Die Membran wurde in ein 50 ml Falcon (SARSTEDT) gelegt und mit zwei Detektionsreagenzien in einem Verhältnis 1 : 1 für 5 min unter ständigem Schwenken des Falcons inkubiert. Nach dem Entfernen der Membran aus dem Falcon wurde kurz mit 1 × TS-Puffer gewaschen und im Chemolumineszenz Imager (INTAS SCIENCE IMAGING INSTRUMENTS GmbH) fotografiert.

3.8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

3.8.1 Vorversuche

Mit dem produzierten larvalen ES-Antigenen und den im Gestüt gesammelten Serumproben der beiden Projektjahre wurden verschiedene ELISA durchgeführt. Im Serum enthaltene Antikörpern gegen den Parasiten *Parascaris* spp. sollten nachgewiesen werden. Ziele waren es, ein ELISA-Protokoll zu entwickeln und die Eignung zur *Parascaris* spp.-Diagnostik zu evaluieren.

In weiteren Vorversuchen wurden sowohl adultes ES-Antigen und larvales somatisches ES-Antigen von *Parascaris* spp. getestet, als auch verwandtes Schweinspulwurmantigen (*A. suum*-Hämoglobin-Antigen aus einer Kooperation mit dem parasitologischen Labor der

3 Material und Methoden

veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Gent, Belgien). Als Sekundärantikörper dienten Antikörper, die gegen equine Immunglobuline der Klassen IgM und IgG sowie einer Immunglobulin-Unterklasse IgG(T) gerichtet und mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt waren. Das Enzym setzt das Farbsubstrat 1,2-Diaminobenzol (OPD) um, was zu einer orangen Färbung führte und mit dem ELISA-Reader bei 492 nm gemessen wurde.

Zur besseren Übersicht ist in Tabelle 3 eine kurze Zusammenfassung zu den getesteten Kombinationen dargestellt.

Tabelle 3: Getestete Antigene und Sekundärantikörper (“+“ = erfolgter Test, “-“ = kein Test).

	Anti-Horse IgM	Anti-Horse IgG (H+L)	Anti-Horse IgG (T)
Larvales ES Ag	+	+	+
Adultes ES Ag	+	+	-
Larvales somatisches Ag	-	+	-
<i>Ascaris suum</i> -Hämoglobin-Ag	+	+	+

In jeder Kombination wurde zu Beginn eine Verdünnungsreihen-Titration durchgeführt und somit verschiedene Verdünnungen von Antigen, Serum und Sekundärantikörper gegeneinander getestet (Schachbrett). Es wurden Seren von koproskopisch positiven und negativen Fohlen aus dem Gestüt, zwei mit kleinen Strongyliden experimentell infizierten Ponys aus dem Institut sowie sechs monoinfizierten Pferden (Prof. Dr. Thomas Klei, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, USA) getestet. Alle Seren wurden, wenn nicht anders beschrieben, in einer Verdünnung von 1 : 200 im Doppelansatz verwendet.

3.8.2 ELISA-Protokoll

Nach den ersten Titrationsversuchen wurde folgendes ELISA-Protokoll für zukünftige Tests verwendet.

1. Beschichtung

- Proteinlösung mit ELISA-Coating-Puffer auf gewünschte Konzentration verdünnen
- 100 µl in jede Vertiefung der 96 Well Nunc MaxiSorp® Mikrotiterplatten (VWR) geben
- Inkubation: mit Folie (CARL ROTH) abgedeckt, 1 h bei RT auf Schüttler (IKA), dann über Nacht bei 4 °C

2. Waschen

- 3 × mit PBS-Tween

3. Blocken der unspezifischen Bindungsstellen

- 100 µl ELISA-Blocking-Puffer in jede Vertiefung geben
- Inkubation: mit Folie abgedeckt, 1 h bei 37 °C auf Schüttler

4. Waschen

- 3 × mit PBS-Tween

5. Primärantikörper

- Fohlenserum mit ELISA-Blocking-Puffer 1 : 200 verdünnen
- 100 µl pro Vertiefung (Doppelansatz)
- Inkubation: mit Folie abgedeckt, 1 h bei 37 °C auf Schüttler

6. Waschen

- 3 × mit PBS-Tween

7. Sekundärantikörper

- Sekundärantikörper mit ELISA-Blocking-Puffer verdünnen (Kapitel 3.8.3)
- 100 µl pro Vertiefung
- Inkubation: mit Folie abgedeckt, 1 h bei 37 °C auf Schüttler

8. Waschen

- 3 × mit PBS-Tween

9. Substrat

- ELISA-Substratlösung bereits nach Sekundärantikörperbeschichtung vorbereiten
- 10 µl Wasserstoffperoxid (SIGMA ALDRICH) kurz vor Verwendung hinzugeben
- 100 µl ELISA-Substratlösung pro Vertiefung
- Inkubation: im Dunkeln 15 min bei RT

10. Stoppen

- durch Zugabe von 50 µl ELISA-Stopplösung (2,5 M HCl) in jede Vertiefung

11. Ablesen der Farbreaktion

- als optische Dichte (OD) bei Wellenlänge von 492 nm im Epoch (BIOTEK)

3.8.3 Antigene im ELISA

3.8.3.1 Larvales ES-Antigen

Nach der Aufreinigung und Proteinbestimmung der gewonnenen ES-Antigene aus der Kultivierung von *Parascaris* spp.-Larven wurden zwei Fraktionen zur Durchführung eines ELISA (Protokoll Kapitel 3.8.2) mit den im Kapitel 3.8.1 beschriebenen Seren verwendet.

Aufgrund der Schachbrett-Titrationsen wurde eine Arbeitskonzentration von 1,25 µg/ml für eine erste Antigenfraktion und 2 µg/ml für eine zweite Antigenfraktion unter Verwendung von IgG (H+L) als Sekundärantikörper ausgewählt und damit verschiedene Pferdeseren getestet. Die Fraktionen unterschieden sich in den dafür verwendeten Kulturen, deren Medium anschließend gemeinsam aufgereinigt wurde. Die gewonnenen ES-Medien wurden in zwei Chargen gereinigt, so dass ES-Medien aus den ersten Larvenkulturen in einer ersten Charge und folgende ES-Medien in einer zweiten Charge gereinigt wurden.

Anti-Horse IgG (H+L):

Mit der ersten Antigenfraktion und einer Arbeitskonzentration von 1,25 µg/ml wurden zuerst die Seren von zwölf koproskopisch positiven Tieren zum Zeitpunkt der höchsten Eiausscheidung (siehe Anhang Fohlen 10, 11, 23, 70, 71, 76, 78, 107, 113, 146, 281 und 344) und von elf koproskopisch negativen Tieren zu Beginn der Beprobung (Fohlen 28, 30, 67, 69, 110, 119, 139, 157, 173, 179, und 346) mit dem Anti-Horse IgG (DIANOVA) in einer

Verdünnung von 1 : 10.000 getestet, um eine mögliche Unterscheidung in koproskopisch positive und negative Tiere zu untersuchen.

In der nächsten Untersuchung wurden Seren von jeweils fünf koproskopisch positiven (Nummer 10, 23, 70, 107, 113) bzw. negativen Fohlen (Fohlennummer 30, 28, 67, 69, 179), die ebenso im Western Blot untersucht wurden, im ELISA mit je zwei Antigenkonzentrationen und Sekundärantikörperverdünnungen getestet.

Mit der zweiten Antigenfraktion wurden die bereits in der Schachbrett-Titration genutzten Seren von koproskopisch positiven bzw. negativen Fohlen (Fohlennummer 10, 28, 68, 71, 76, 79, 93, 100, 139 und 173) an zwölf Zeitpunkten innerhalb des gesamten Projektverlaufes mit dem Sekundärantikörper in der Verdünnung 1 : 10.000 getestet.

Zur Untersuchung auf Kreuzreaktionen fand eine Prüfung mit Seren von experimentell monoinfizierten Pferden (Prof. Dr. Thomas Klei, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, USA) mit diesem Protokoll statt.

Anti-Horse IgM:

Mit dem Sekundärantikörper Anti-Horse IgM wurden mehrere Schachbrett-Titrations durchgeführt und die Arbeitskonzentration auf 0,5 µg/ml festgelegt. Anschließend wurde mit dem Serum eines koproskopisch positiven (Fohlen 23) und eines negativ getesteten Fohlens (Fohlen 173) eine Verlaufsuntersuchung des Projektjahres 2011, unter Verwendung einer Sekundärantikörperverdünnung von 1 : 750, durchgeführt.

Weiterhin wurde bei dem Test auf Kreuzreaktivität mit Seren der monoinfizierten Pferden aus den USA mit diesem Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1 : 400 gearbeitet.

Anti-Horse IgG (T):

Dieser Sekundärantikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen mit Seren von drei koproskopisch positiven (Nummer 10, 281, 344) und zwei koproskopisch negativen Fohlen (Nummer 28 und 100) sowie Seren von zwei Ponys untersucht, die experimentell mit kleinen Strongyliden im Institut für Parasitologie der Freien Universität Berlin infiziert wurden.

Weiterhin wurden Seren eines koproskopisch positiven (Fohlen 10) und negativen Fohlens (Fohlen 28) sowie der sechs monoinfizierten Pferde mit den Verdünnungen 1 : 10.000 und 1 : 20.000 getestet.

3.8.3.2 Adultes ES-Antigen

Als Vergleichskomponente zum larvalen ES-Antigen diente das ES-Antigen der adulten *Parascaris* spp.-Würmer. Aus der Schachbrett-Titration wurde eine Arbeitskonzentration von 1,25 µg/ml gewählt. Es wurden mit zwei Sekundärantikörpern und verschiedenen Fohlenseren mehrere ELISA (Protokoll Kapitel 3.8.2) durchgeführt.

Anti-Horse IgG (H+L):

Nach der üblichen Schachbrett-Titration und der daraus folgenden Kombination aus Antigenkonzentration, Serum- und Sekundärantikörperverdünnung wurde eine Platte mit Seren von zwei im Verlauf der Projektzeit koproskopisch positiv (Fohlen 10) und negativ (Fohlen 28) getesteten Fohlen beschichtet.

Nach der Wiederholung der Schachbrett-Titration wurden Seren von drei koproskopisch positiven Fohlen (Nummer 10, 70, 146) und eines koproskopisch negativen Fohlens (Nummer 28) an zwölf Zeitpunkten innerhalb des Projektverlaufes mit einer Sekundärantikörperverdünnung von 1 : 10.000 getestet.

Anti-Horse IgM:

Mit den aus den Schachbrett-Titrationsen ermittelten Verdünnungen (1 : 400 und 1 : 500) wurden mit diesem Sekundärantikörper die koproskopisch positiven und negativen Fohlen (Fohlen 10 und 28) getestet. Zusätzlich wurden Fohlenseren (Fohlennummer 10, 28, 68, 71, 76, 79, 93, 100, 173 und 139) an zwölf Zeitpunkten innerhalb des Projektjahres 2011, repräsentativ für diese Projektzeit, ausgewählt und mit einer Sekundärantikörperverdünnung von 1 : 750 und 1 : 400 getestet. Dies wurde zum Vergleich mit dem larvalen ES-Antigen auf einer Platte durchgeführt.

Zum weiteren Vergleich wurden die Seren der drei koproskopisch positiven Tieren (Nummer 10, 70, 146) und des einen koproskopisch negativen Fohlens (Fohlennummer 28) an zwölf Zeitpunkten, repräsentativ für den Projektverlauf, neben dem IgG (H+L)-Sekundärantikörper auch mit dem IgM-Sekundärantikörper (1 : 400) getestet.

3.8.3.3 Somatisches Antigen der Larven

Der ELISA mit dieser Antigenpräparation wurde nach der Antigenaufbereitung und Proteinbestimmung des Antigens mit IgG (H+L) als Sekundärantikörper nach dem Protokoll (Kapitel 3.8.2) durchgeführt.

Anti-Horse IgG (H+L):

Es wurde eine Schachbrett-Titration durchgeführt und anschließend jeweils Seren von fünf koproskopisch positiven (Nummer 10, 23, 70, 107, 113) und negativen Fohlen (Nummer 28, 30, 67, 69, 179), die bereits im Western Blot untersucht wurden, mit zwei Antigenkonzentrationen (1 µg/ml und 2 µg/ml) sowie zwei verschiedenen Serum- und Sekundärantikörperverdünnungen (1 : 200 und 1 : 10.000 sowie 1 : 100 und 1 : 20.000) getestet.

3.8.3.4 *Ascaris suum*-Hämoglobin-Antigen

In der Schachbrett-Titration mit dem *A. suum*-Antigen beschichteten und bereits geblockten ELISA-Platten aus Gent wurden die drei vorhandenen Sekundärantikörper in verschiedenen Verdünnungen mit Pferdeseren geprüft. Bei den getesteten Tieren handelte es sich um eine Stute und ihr Fohlen (Nummer 226) aus dem Gestüt. Im Projektzeitraum 2012 wurden im Rahmen der gestütseigenen tierärztlichen Betreuung Blutproben von vereinzelt Stuten und Fohlen ungefähr eine Stunde nach der Geburt bzw. vor der ersten Kolostrumaufnahme entnommen. Eine zweite Fohlenblutprobe wurde in der ersten Lebenswoche und somit einige Tage nach der Kolostrumaufnahme gewonnen. Von diesen Serumproben konnten wir einen Teil verwenden. Diese präkolostrale Seren einer Stute und ihres Fohlens wurde mit je vier verschiedenen Verdünnungen der drei Sekundärantikörper untersucht.

Weiterhin wurde das Serum eines der experimentell mit kleinen Strongyliden infizierten Ponys aus dem Institut der Parasitologie und Tropenveterinärmedizin des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin verwendet.

Auf der nächsten ELISA-Platte wurden Seren der monoinfizierten Pferde von Prof. Dr. Thomas Klei (kleine und große Strongyliden, *Strongyloides westeri* sowie *P. equorum*), jeweils drei Stuten kurz nach der Geburt und ihren drei Fohlen in der 18. Lebenswoche untersucht (Fohlennummer 226, 239, 305). Zu dieser Platte wurden die Sekundärantikörper IgM in der Verdünnung von 1 : 800 und 1 : 1.600 sowie IgG (H+L) in der Verdünnung 1 : 10.000 gegeben (siehe Tabelle 11).

3.8.4 Präkolostrale Seren

Während der Probensammlung im Jahr 2012 wurden für die gestütseigene Überwachung Blutproben von Stute und Fohlen kurz vor der ersten Milchaufnahme und von Fohlen 48 h nach der Geburt genommen. Von diesen Serumproben konnten wir einen Teil verwenden.

Diese Proben sollten zum besseren Verständnis der Rolle der kolostral übertragenen maternalen Antikörper verhelfen. Einen Teil der präkolostral gewonnenen Seren von insgesamt zwölf Fohlen (Nummer 7, 226, 239, 260, 290, 305, 319, 321, 332, 333, 334 und 335) konnten wir untersuchen. Zusätzlich waren Blut- und Kolostrumproben von zwei Stuten (Nummer 226 und 239) dieser zwölf Fohlen zu diesem Zeitpunkt vorhanden. Bei sechs der präkolostral beprobten Fohlen (Nummer 7, 321, 332, 333, 334 und 335) wurde eine zweite Blutentnahme postkolostral, ca. 48 h nach der Geburt, angeschlossen. Diese Fohlen- und Stutenserum wurden im ELISA gemäß dem Protokoll Kapitel 3.8.2 untersucht.

Mit den *Parascaris* spp.-ES-Antigenen wurden im ELISA vier präkolostrale Fohlenserum (Nummer 226, 260, 290 und 305) sowie fünf prä- und postkolostrale Fohlenserum (Nummer 7, 332, 333, 334 und 335) untersucht. Als Antigen wurde das larvale ES-Antigen in der Arbeitskonzentration von 2 µg/ml für den Sekundärantikörper IgG (H+L) in der Verdünnung 1 : 10.000 sowie 0,5 µg/ml für den Sekundärantikörper IgM in der Verdünnung 1 : 400 untersucht. Das adulte ES-Antigen mit einer Konzentration von 1,25 µg/ml wurde ebenso mit beiden Sekundärantikörpern in diesen Verdünnungen getestet.

In einer Verlaufsuntersuchung wurden Seren von zwei koproskopisch positiven Fohlen (Nummer 226 und 305) mit ihren Stuten und zwei koproskopisch negativen Fohlen (Nummer 7 und 332) an elf Zeitpunkten repräsentativ für den Projektverlauf 2012 ausgewählt und mit larvalem ES-Antigen (2 µg/ml) und dem Sekundärantikörper IgG (H+L) in der Verdünnung 1 : 10.000 untersucht.

Zum Ende des labordiagnostischen Abschnittes soll zur Verbesserung des Verständnisses der getesteten Komponenten eine kurze Übersicht gegeben werden (Tabelle 4). Hieraus wird auf einen Blick ersichtlich, welche Antigene und Sekundärantikörper in den beschriebenen Verfahren untersucht wurden. Die beiden ES-Antigene wurden in SDS-PAGE und Western Blot sowie im ELISA mit verschiedenen Pferdeseren untersucht. Das larvale somatische Antigene und das *A. suum*-Antigen wurden im ELISA getestet. Das adulte somatische Antigen wurde nur im SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Blue angefärbt. Sämtliche Sekundärantikörper wurden im ELISA und bis auf die Immunglobulin-Unterkategorie IgG (T) ebenso im Western Blot zum Nachweis verwendet.

Tabelle 4: Übersicht der Antigene und Sekundärantikörper in den labordiagnostischen Methoden (“+“ = erfolgter Test, “-“ = kein Test)

	SDS-PAGE	Western Blot	ELISA
Larvales ES Ag von <i>Parascaris</i> spp.	+	+	+
Adultes ES Ag von <i>Parascaris</i> spp.	+	+	+
Larvales somatisches Ag von <i>Parascaris</i> spp.	-	-	+
Adultes somatisches Ag von <i>Parascaris</i> spp.	+	-	-
<i>Ascaris suum</i> -Hämoglobin-Ag	-	-	+
Anti-Horse IgG(H+L)		+	+
Anti-Horse IgG(T)		-	+
Anti-Horse IgM		+	+

3.9 Statistische Auswertung

3.9.1 Fragestellungen für die statistische Auswertung

Zur Untersuchung von epidemiologischen und klinischen Zusammenhängen wurden verschiedene Fragestellungen zur statistischen Auswertung aufgestellt:

Frage 1: Waren in einem Projektjahr prozentual mehr Fohlen mit dem Parasiten *Parascaris* spp. infiziert?

Frage 2: War die Eiausscheidung im Mittel in einem Projektjahr höher?

Frage 3: War die Infektion mit *Parascaris* spp. unabhängig vom Geschlecht der Fohlen?

Frage 4: Erhielten *Parascaris* spp.-positive Tiere häufiger auch eine Nabeltherapie als koproskopisch negative Fohlen?

Frage 5: Zeigten *Parascaris* spp.-positive Tiere häufiger eine respiratorische Klinik sowie Lungenprobleme und benötigten eine Lungentherapie?

Frage 6: Hatten *Parascaris* spp.-positive Tiere häufiger einen zusätzlichen MDS-Befall?

Frage 7: Infizierten sich die Fohlen in den ersten Lebenstagen mit *Parascaris* spp.?

Frage 8: Begannen Fohlen vor der angenommenen Präpatenz des Parasiten von 72 bis 110 Tagen Eier auszuscheiden?

Frage 9: Zeigten *Parascaris* spp.-positive Fohlen vermehrt eine Leukozytose?

Frage 10: Waren Fohlen, die nach der Geburt eine Plasmainfusion benötigten, häufiger mit *Parascaris* spp. infiziert?

Frage 11: Sank die Ausscheidung von *Parascaris* spp.-Eiern bei einer höheren Entwurmungsfrequenz im Probenentnahmezeitraum?

Frage 12: War eine *Parascaris* spp.-Infektion bei Fohlen mit einem längeren Weideaufenthalt wahrscheinlicher?

Frage 13: Wurden die Fohlen im Jahr 2011 häufiger entwurmt?

Frage 14: Waren im März/April geborene Fohlen statistisch häufiger koproskopisch positiv für *Parascaris* spp. als im Mai/Juni geborene Fohlen?

Die Ergebnisse der mittels FLOTAC untersuchten Kotproben über die gesamte Projektzeit von 24 bzw. 25 Wochen mit anschließender Stichprobenentnahme im November beider Jahre dienten der Identifikation koproskopisch positiver Fohlen und weiterer epidemiologischer Analysen. Als weitere Parameter dienten die im Rahmen der wöchentlichen klinischen Untersuchung erfassten Daten der respiratorischen Untersuchung (Lungen- und Luftröhrenauskultation, Beurteilung der Mandibularlymphknoten sowie des Nasenausflusses) und die Leukozytenwerte aus dem Untersuchungsprotokoll. Aus den jeweiligen Fohlenakten wurden individuelle Daten wie Geschlecht, Geburtsdatum, erhaltene Plasmainfusionen, Nabel- und Lungentherapien entnommen. Weiterhin wurden aus der gestützeigenen Dokumentation Entwurmungs- und Weidedaten verwendet. Diese Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes R Version 2.15.0 (2012-03-30) und der Verwendung von RStudio ausgewertet. Mit diesem Programm wurden Tests auf Unabhängigkeiten verschiedener Parameter wie Geburtszeitpunkt, Geschlecht, Therapien, Entwurmungen, zusätzlicher Befall mit MDS, Weideaufenthalt und klinische Daten von einer Pferdespulwurminfektion der Fohlen anhand des Chi-Quadrat-Test, t-Test, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test und Regressionsgleichungen durchgeführt.

3.9.2 Test auf Unabhängigkeit verschiedener Einflüsse auf die Parasiteninfektion

Der Chi-Quadrat-Test ist ein Signifikanztest zur Beurteilung der Unabhängigkeit zweier Merkmale. Dazu werden zwei Merkmale in einer Kontingenztafel gegenüber gestellt. Die Skalierung der beiden Merkmale kann beliebig sein, doch ist eine Gruppenbildung bei dem Auftreten von vielen verschiedenen Ausprägungen notwendig, so dass es vier Beobachtungen bei einem Test mit zwei Merkmalen gibt, die verglichen werden sollen. Zu beachten ist dabei eine Mindestanzahl von fünf in den einzelnen Gruppen der Kontingenztafel.

Weiterhin wurde der t-Test genutzt, um den Unterschied der mittleren Eiausscheidung in verschiedenen Gruppen auf Signifikanz zu prüfen. Eine Normalverteilung der *Parascaris* spp.-EpG-Mittelwerte wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test bestätigt. Zur Beantwortung der Fragestellung 2 wurden die Mittelwerte der EpG-Werte jedes Fohlens einerseits in Abhängigkeit vom Projektjahr untersucht. Zur Ermittlung des Einflusses der Entwurmung auf die Eiausscheidung (Fragestellung 11) wurde ein t-Test mit der abhängigen Variable „*Parascaris* spp.-EpG-Mittelwert“ jedes Fohlens und der unabhängigen Variable „Entwurmungskategorie“ gerechnet.

3.9.3 Regressionsgleichungen

Zur Berücksichtigung des Einflusses verschiedener Faktoren auf die Infektion mit *Parascaris* spp. sowie deren gegenseitige Abhängigkeit wurden zusätzlich Regressionsmodelle gerechnet. Regressionsanalysen dienen generell dazu, die Beziehung zwischen einer abhängigen und einer oder mehrerer unabhängiger Variablen festzustellen und zu quantifizieren. Sie ermöglichen es, Drittvariableneffekte zu kontrollieren und somit den interessierenden Einfluss einzuschätzen. Folglich war die Berechnung einer Unabhängigkeit der Spulwurminfektion von den oben genannten Eigenschaften möglich.

Werden Daten mit Messwiederholungen in einer einfachen linearen Regression berechnet, kommt es aufgrund der Korrelation zwischen den Untersuchungsobjekten zu verzerrten Standardfehlern. Zur Korrektur dieser Standardfehler und zur Berücksichtigung möglicher Zeiteffekte wurden zusätzlich Mehrebenenanalysen (gerichtete lineare Modelle) durchgeführt. Das Interesse lag in dieser Studie auf der Bestimmung des Einflusses von Geschlecht, Geburtsmonat, Weideaufenthalt, MDS-Befall und Plasmainfusion auf eine Parasiteninfektion sowie darauf eine mögliche Prädisposition für Nabel- und vor allem Lungenerkrankungen zu untersuchen. Aus diesem Grund wurde als abhängige Variable die Spulwurminfektion

gewählt, die zwischen infizierten und nicht infizierten Fohlen unterscheidet. Die geeignete Methode ist in diesem Fall eine logistische Regression (Logit-Modell). In diesem Logit-Modell wurden die unabhängigen Variablen: Geschlecht, Jahr, Geburtsmonat, Plasmainfusion, Nabel- und Lungentherapie, Weideaufenthalt und zusätzlicher MDS-Befall untersucht.

In einem weiteren Verfahren wurden, jeweils getrennt, die Zeiteffekte der Lebenswochen auf die wöchentlich erhobenen klinischen Parameter: Leukozyten, Nasenausfluss, Lungenbefunde und klinischer Score in einer Mehrebenenanalyse berechnet. Hierbei sollte ein möglicher Einfluss der Lebenswoche und des angenommenen Infektionsverlaufes während der Präpatenz auf diese klinischen Parameter untersucht werden. Zusätzlich wurde ein lineares Regressionsmodell mit den EpG-Werten der Fohlen als abhängige Variable und der Lebenswoche als unabhängige Variable gerechnet, um einen möglichen Zusammenhang der Eiausscheidung vom Lebensalter über den mehrwöchigen Probenentnahmezeitraum zu ermitteln.

Aufgrund der langen Präpatenz des Parasiten von 10 bis 16 Wochen und der Lungenwanderung der Spulwurmlarven wenige Tage nach der Infektion wurde der parameterfreie Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet, um den klinischen Parameter „Nasenausfluss“ eines Fohlens an zwei Zeitpunkten zu vergleichen. Die ordinale Variable „Nasenausfluss“ diente dabei als repräsentative klinische Variable für eine respiratorische Erkrankung und wurde in 3 Kategorien unterteilt. So wurde von jedem positiven Fohlen der Befund zum Zeitpunkt des ersten koproskopischen Befundes mit dem klinischen Befunden „Nasenausfluss“ zehn Wochen davor verglichen.

Zur Einschätzung der Abhängigkeit des klinischen Symptomes „Nasenausfluss“ vom Fohlenalter zum ersten koproskopisch positiven Befund wurde ein Regressionsmodell für ein ordinale Probit gerechnet.

In allen Analysen wurde $p < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet und auch die graphische Darstellung zur Auswertung genutzt. Nach Bestimmung der Unabhängigkeiten wurden mittels RStudio und Microsoft Excel 2010 verschiedene Grafiken erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Koproskopische, klinische und epidemiologische Auswertung in einem Pferdebestand

Die Probenentnahme bei 347 Fohlen über den Zeitraum April bis September in zwei aufeinanderfolgenden Jahren ergab eine Vielzahl von koproskopischen, klinischen und individuellen Daten. Diese Befunde wurden ausgewertet um zusätzliche Informationen zu Klinik und Verlauf der Infektion im Bestand bezüglich des Pferdespulwurmes, welcher eine wichtige Rolle innerhalb der Parasitosen von jungen Pferden spielt, zu erhalten.

4.1.1 Koproskopische Auswertung im Gestüt

Über die gesamte Projektzeit wurden insgesamt 5.375 Kotproben von 347 Fohlen untersucht. Die wöchentlich gesammelten Kotproben wurden koproskopisch mittels FLOTAC-Verfahren im Gestüt untersucht und die EpG-Werte für Strongyloiden- und Spulwurmeier tabellarisch notiert. Die *Parascaris* spp.-EpG-Werte in beiden Jahren hatten eine Spanne von 0 bis 10.008 EpG (StAbw = 316 EpG, KI = 76,5 – 77,1).

Im Jahr 2011 wurden von 188 in der Studie überwachten Fohlen durchschnittlich 158 Kotproben (84,3 %) pro Projektwoche untersucht. Im zweiten Jahr wurden von insgesamt 159 überwachten Fohlen durchschnittlich 130 wöchentliche Proben (81,9 %) gewonnen.

Im Jahr 2011 konnten anhand dieser Untersuchung 162 *Parascaris* spp.-infizierte Fohlen mit EpG-Werten zwischen 0 bis 10.008 EpG (StAbw = 227 EpG, MW = 51,3 EpG, KI = 51,0 – 51,6) nachgewiesen werden, was einem Anteil von 86,2 % entspricht. Im zweiten Jahr erwiesen sich mit 141 Fohlen 88,7 % der untersuchten Fohlen als mit dem Pferdespulwurm infiziert. So war kein signifikanter Unterschied ($p = 0,59$) des prozentuellen Anteils *Parascaris* spp-positiver Fohlen zwischen beiden Projektjahren, wie in der ersten Fragestellung vermutet wurde, nachweisbar. Jedoch war die Eiausscheidung 2012 im Jahresvergleich signifikant höher ($p < 0,05$), was in der zweiten Fragestellung untersucht wurde. Die *Parascaris* spp.-EpG-Werte im Jahr 2011 hatten eine Spanne von 0 bis 10.008 EpG und ein Maximum der EpG-Mittelwerte von 171 EpG (StAbw = 345 EpG). Im Jahr 2012 war eine kleineren Spanne von 0 bis 7.200 EpG (StAbw = 432 EpG, MW = 121,9, KI = 121,2 – 122,6), jedoch ein deutlich höherer EpG-Mittelwert von 446 EpG

4 Ergebnisse

(StAbw = 1.016 EpG) nachweisbar. Insgesamt waren 303 Fohlen der 347 in der Projektzeit untersuchten Fohlen infiziert, entsprechend einem Anteil von 87,3 %.

Mit MDS waren aus beiden Jahren 153 von 347 Fohlen und somit 44,1 % infiziert. Im ersten Jahr waren mit 64 Fohlen 34 % der untersuchten Probanden und im zweiten Jahr mit 89 Fohlen 56 % der untersuchten Probanden betroffen ($p < 0,05$). Zur Übersicht und Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Projektjahre eine kurze Zusammenfassung in Tabelle 5. Der Unterschied hinsichtlich des Startzeitpunktes der koproskopischen Untersuchungen beider Jahre ergab sich durch das sich in beiden Jahren entsprechend geänderte Vorgehen hinsichtlich des routinemäßigen Gesundheitsmonitorings bedingt durch die im Laufe dieser Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse. Im Jahr 2011 wurden in den ersten sieben Projektwochen wöchentlich Fohlen aufgenommen, so dass ab der 8. Woche 188 Fohlen wöchentlich beprobt wurden. Im Jahr 2012 wurden in den ersten sechs Wochen wöchentlich Fohlen in die Studie aufgenommen, jedoch begann die Kotprobenentnahme bei den 159 Fohlen erst ab der 9. Projektwoche. Begründet wurde diese Änderung in der ermittelten frühesten Spulwurmeiausscheidung ab der 9. Lebenswoche der Fohlen (Fohlennummer 105 und 333).

Tabelle 5: Jahresvergleich der koproskopischen Befunde (FLOTAC)

	2011	2012
Anzahl der Probanden	188	159
Anzahl der durchschnittlich untersuchten Kotproben pro Projektwoche	158,4	130,2
Anzahl <i>Parascaris</i> spp.-positiver Fohlen / Gesamtzahl (Prozentanteil)	162/188 (86,2 %)	141/159 (88,7 %)
<i>Parascaris</i> spp.-EpG-Mittelwert (StAbw) EpG-Bereich	171 (345) 0-10.008	446 (1.016) 0-7.200
Anzahl <i>Parascaris</i> spp.-infizierte Fohlen / Gesamtzahl (Prozentanteil)	303/347 (87,3%)	
MDS-positive Fohlen / Gesamtzahl (Prozentanteil)	64/188 (34,0 %)	89/159 (56,0 %)
MDS-infizierte Fohlen / Gesamtzahl (Prozentanteil)	153/347 (44,1 %)	

In beiden Projektjahren wurden im Herbst zusätzliche Kotproben im Rahmen des gestützeigenen EZRT gewonnen.

Im Jahr 2011 wurden von den abgesetzten Fohlen 53 Kotproben gewonnen und mittels FLOTAC-Verfahren untersucht. Bei sechs Fohlen wurde ein positiver *Parascaris* spp.-Kotbefund gestellt, wovon zwei Fohlen zusätzlich MDS-Eier ausschieden. Ein alleiniger Nachweis von MDS-Eiern wurde bei zehn Fohlen festgestellt. Folglich hatten 11,3 % nachweislich *Parascaris* spp.-Eier und 18,9 % der im November untersuchten Fohlen schieden MDS-Eier aus.

Im Jahr 2012 wurden im Rahmen des EZRT von 14 der 18 koproskopisch negativen Fohlen Kotproben gewonnen und untersucht (siehe Anhang). Die koproskopisch negativen Tiere der Projektzeit konnten somit erneut auf eine Spulwurminfektion untersucht werden.

Das Ergebnis der FLOTAC-Untersuchung ergab elf *Parascaris* spp.-positive Fohlen, ein Fohlen mit MDS-Eiern und zwei koproskopisch negative Fohlen. Insgesamt wurden in dem Jahr 2012 bei 152 von 159 Fohlen *Parascaris* spp. identifiziert, was einem Anteil von 95,6 % in diesem Jahr entspricht.

4.1.2 Spulwurmeiausscheidung und Lebensalter der Fohlen

Für eine Auswertung der koproskopischen Daten aus dem Gestüt wurde auch das Lebensalter der Fohlen berücksichtigt und unter folgender Fragestellung betrachtet: In welchem Alter beginnt die Ausscheidung der *Parascaris* spp.-Eier bei der Betrachtung einer so großen Anzahl von Tieren und wie ist der Verlauf der *Parascaris* spp.-EpG-Werte?

Zum Zeitpunkt der wöchentlichen Probenentnahmen waren die Fohlen zwischen 21 und 196 Lebenstage alt. In Abbildung 1 wurde der Anteil *Parascaris* spp.-koproskopisch positiver Fohlen an den untersuchten wöchentlichen Kotproben in Abhängigkeit von der Lebenswoche der Fohlen graphisch ausgewertet. Der erste koproskopisch *Parascaris* spp.-positive Befund war in der vierten Lebenswoche. Dieses Fohlen wies einen *Parascaris* spp.-EpG-Wert von zwei und darauffolgend mehrere Wochen negative Befunde auf.

Zwei Fohlen (Nummer 105 und 333) begannen ab der neunten Lebenswoche (2011 und 2012) mit der *Parascaris* spp.-Eiausscheidung. Bei beiden Fohlen war in den Folgewochen eine weitere Eiausscheidung nachweisbar. Ab der 15. Woche war ein steiler Anstieg in der Anzahl koproskopisch positiver Fohlen ersichtlich und in der 21. Lebenswoche das Maximum der Anzahl von Spulwurmeier ausscheidenden Fohlen ($n = 178$ Fohlen, $n = 58,5$ %) pro

Untersuchungswoche erreicht. Nach dieser Woche sank der Anteil der *Parascaris* spp.-positiven Tiere deutlich ab.

Der Zeitraum von bis zu 28 Lebenswochen, in denen die Fohlen maximal untersucht wurden, ergab sich daraus, dass die Fohlen zum Zeitpunkt der ersten Probenentnahmen drei Wochen alt waren und über den Projektzeitraum von 25 Wochen (2011) Proben untersucht wurden. Zu bedenken war in diesem Fall die intervallartige wöchentliche Aufnahme von 25 bis 30 Fohlen in den ersten Wochen beider Projektjahre. Im Jahr 2011 wurden während der ersten acht Projektwochen und im Jahr 2012 während der ersten sechs Projektwochen Fohlen in das Projekt aufgenommen.

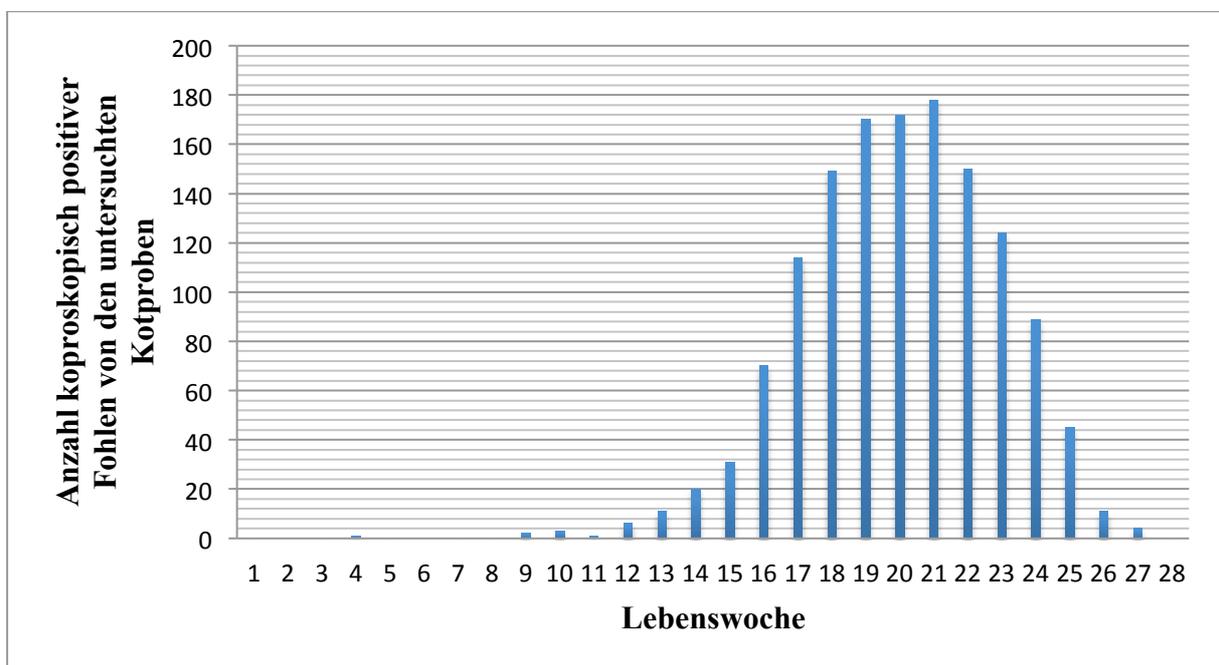


Abbildung 1: Anzahl der koproskopisch *Parascaris* spp.-positiven Fohlen (n = 303 Fohlen) an den untersuchten Proben in Abhängigkeit der Lebenswoche der Fohlen dargestellt. Insgesamt wurde bei 347 Fohlen an 24 bzw. 25 Wochen an zwei aufeinanderfolgenden Jahren wöchentlich Kotproben gesammelt.

In einer weiteren Darstellung (Abbildung 2) wird die wöchentliche Ausscheidungsintensität der Spulwurmeier graphisch dargestellt. Zu diesem Zweck wurden die *Parascaris* spp.-EpG-Werte aller Fohlen in jeder Lebenswoche mit Hilfe von Boxplots aufgeführt.

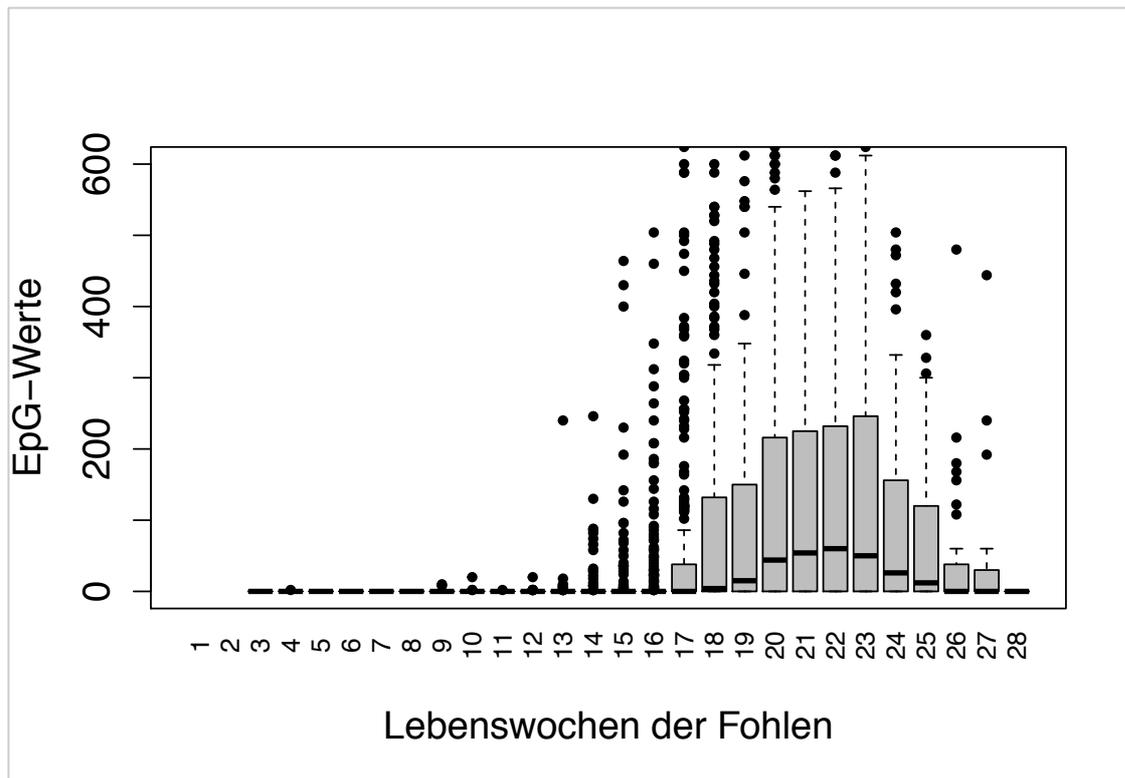


Abbildung 2: Boxplots der EpG-Werte der *Parascaris* spp.-positiven Fohlen (n = 303 Fohlen). Die wöchentlich untersuchten Kotproben wurden in Abhängigkeit vom Lebensalter der Fohlen betrachtet. Insgesamt wurden wöchentlich Kotproben über einen Zeitraum 24 bzw. 25 Wochen in den Jahren 2011 bzw. 2012 von 188 bzw. 159 Fohlen untersucht.

Die ersten positiven Befunde in der neunten Lebenswoche waren *Parascaris* spp.-EpG-Werte von acht und zehn EpG (StAbw = 0,82 EpG). In den Folgewochen war ein langsamer Anstieg der koproskopisch positiven Fohlen nachweisbar. In der 13. Lebenswoche waren es acht *Parascaris* spp.-positive Fohlen, die in den folgenden Wochen weiterhin Eier ausschieden und drei *Parascaris* spp.-positive Fohlen, die in den Folgewochen jedoch wieder koproskopisch negativ waren. Ab der 15. Lebenswoche stieg die *Parascaris* spp.-EpG-Ausscheidung deutlich an und erreichte den höchsten Mittelwert von 254,39 EpG (StAbw = 635 EpG) in der 20. Lebenswoche durch die Ausscheidung von 172 positiven Probanden. Ab der 18. Lebenswoche war der Median mit einem Wert von 4 erstmals > 0 und der Anteil von Fohlen mit *Parascaris* spp.-EpG-Werten über dem Median nahm wöchentlich bis zur 23. Lebenswoche zu. Im Zeitraum von der 19. bis zur 22. Lebenswoche stiegen die Mediane der EpG-Werte von 15 bis 60 EpG bei einer Höchstzahl von 178 positiven Fohlen in der 21. Lebenswoche (StAbw = 479 EpG). Der höchste *Parascaris* spp.-EpG-Wert von 10.008 EpG wurde in der 22. Lebenswoche (StAbw = 766 EpG) nachgewiesen. In der

23. Lebenswoche sank der Median auf 50 EpG, jedoch war der Anteil koproskopisch *Parascaris* spp.-positiver Fohlen mit Werten über dem Median in dieser Lebenswoche am größten (StAbw = 485 EpG). Ab der 24. Lebenswoche sanken die mittleren *Parascaris* spp.-EpG-Werte stark ab. In der 28. Lebenswoche wurden aufgrund des altersbedingten Absetzens der Fohlen von den Stuten nur zwei Fohlen untersucht, die koproskopisch negativ waren, so dass für diese Woche kein Balken einzutragen war. In einem linearen Regressionsmodell wurde die Abhängigkeit der EpG-Werte von der Lebenswoche der Fohlen berechnet. Die koproskopisch *Parascaris* spp.-positiven Fohlen zeigten in der 19. bis 24. Lebenswoche statistisch signifikant ($p < 0,05$) erhöhte EpG-Werte auf (siehe Anhang Zusammenhang Lebenswochen und *Parascaris* spp.-EpG-Werte).

4.1.3 Jahresvergleich von infizierten Fohlen und deren *Parascaris* spp.-Eiausscheidung

Der Anteil koproskopisch *Parascaris* spp.-positiver Fohlen war mit 86,2 % ($n = 162$ Fohlen) im Jahr 2011 und 88,7 % ($n = 141$ Fohlen) im Jahr 2012 sehr ähnlich ($p = 0,59$). In den Fragestellungen 1 und 2 zur statistischen Bewertung der epidemiologischen Daten (siehe Kapitel 3.9) wurden eine höhere Infektionsrate und Eiausscheidung der Fohlen im Projektjahr 2012 vermutet. Der zweiseitige Chi-Quadrat-Test auf Unabhängigkeit der Variablen „*Parascaris* spp.-infizierte Fohlen“ und „Projektjahr“ ergab $p > 0,05$, so dass kein statistisch signifikanter Unterschied der Infektionsrate zwischen den Projektjahren bestand.

Zur Beantwortung der 2. Fragestellung, in der die Eiausscheidung im Jahr 2012 im Mittel höher vermutet wurde, wurden Mittelwerte aus den *Parascaris* spp.-EpG-Werten von jedem Fohlen gebildet und als Parameter zur Bewertung der Eiausscheidung genutzt. Aufgeschlüsselt nach dem Projektjahr wurde die mittlere Eiausscheidung ermittelt und der Mittelwertunterschied mit dem t-Test auf Signifikanz überprüft ($p < 0,05$). Einen statistisch signifikanten Unterschied in der Eiausscheidung beider Projektjahre, wie im Vergleich der Maxima wöchentlicher *Parascaris* spp.-EpG-Mittelwerte vermutet wurde, wurde somit bestätigt (Abbildung 3). Die Maxima der *Parascaris* spp.-EpG-Mittelwerte lagen im Jahr 2011 bei 988 EpG und im Jahr 2012 bei 1.120 EpG (nicht in Grafik eingezeichnet). Die Mediane beider Jahre lagen mit 19,2 EpG (2011) und 39,4 EpG (2012) noch verhältnismäßig nahe beieinander. Doch in den Mittelwerten von 2011 (46,7 EpG) und 2012 (123,3 EpG) war bereits ein deutlicher Unterschied sichtbar. Zur besseren Nachvollziehbarkeit wurden die Mittelwerte als schwarze Quadrate in beiden Boxplots aufgenommen.

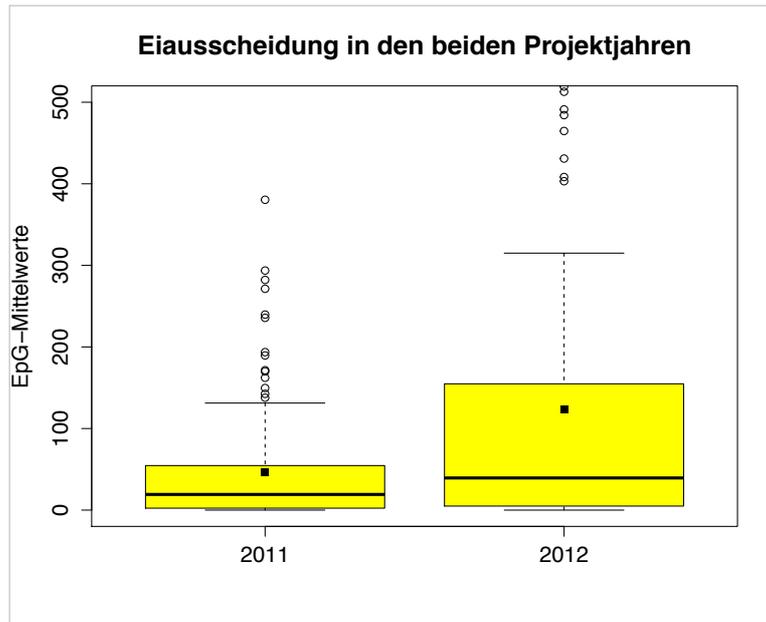


Abbildung 3: Jahresvergleich der *Parascaris*-EpG-Mittelwerte aller Fohlen im Projektjahr 2011 (n = 162 koproskopisch positive Fohlen) und im Projektjahr 2012 (n = 141 koproskopisch positive Fohlen). Insgesamt wurden wöchentlich Kotproben von 347 Fohlen über 24 bzw. 25 Wochen in zwei Jahren gesammelt (Median: schwarze Linie; Mittelwert: schwarzes Quadrat).

4.1.4 *Parascaris* spp. und das Geschlecht der Fohlen

Im Projektjahr 2011 waren insgesamt 100 männliche und 88 weibliche Fohlen in der Studie. Im darauffolgenden Jahr 2012 wurden im Rahmen der gestützeigenen Routineuntersuchungen wöchentlich 79 männliche und 80 weibliche Fohlen untersucht. Die Geschlechterverteilung in der Studie war somit sehr ausgeglichen. Es haben 179 männliche und 168 weibliche Fohlen aus dem Gestüt an der Studie teilgenommen. Demzufolge war ein Vergleich, ob ein Geschlecht möglicherweise empfänglicher ist, gut möglich (Fragestellung 3).

In beiden Jahren waren 151 männliche und 152 weibliche Fohlen koproskopisch nachweislich mit dem Parasiten *Parascaris* spp.-infiziert und 28 männliche und 16 weibliche Fohlen blieben in den Kotuntersuchungen über den Projektzeitraum negativ (siehe Abbildung 4). Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests wurde die Unabhängigkeit der infizierten Fohlen und des Geschlechts untersucht. Ein $p > 0,05$ bestätigt die Vermutung, dass zwischen der Infektion mit dem Parasiten *Parascaris* spp. und dem Geschlecht der Fohlen kein Zusammenhang bestand.

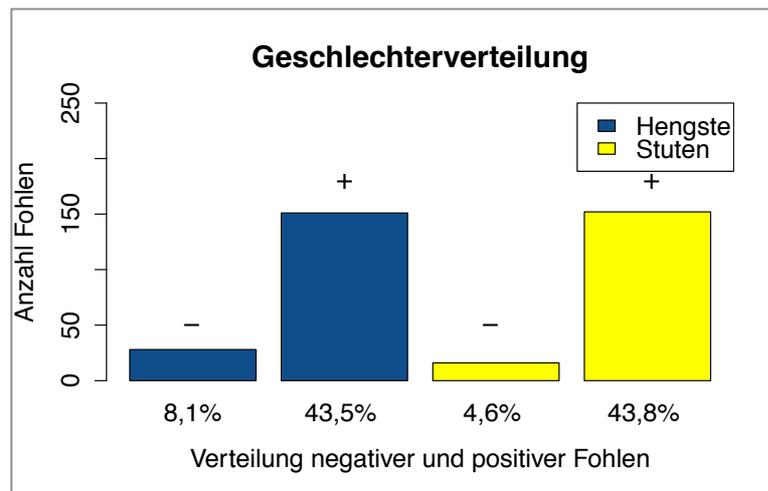


Abbildung 4: Anteil koproskopisch *Parascaris* spp.-negativer (n = 28) und *Parascaris* spp.-positiver (n = 151) Hengste sowie negativer (n = 16) und positiver (n = 152) Stuten an der Studie, bei denen über 24 bzw. 25 Wochen wöchentlich Kotproben entnommen wurden. Insgesamt wurden bei 347 Fohlen über 24 bzw. 25 Wochen Kotproben gesammelt.

4.1.5 Zeitpunkt der ersten Eiausscheidung und Präpatenz

Ein definierter Infektionszeitpunkt kann bei einer natürlichen Infektion mit dem Pferdespulwurm nur vermutet und so die Präpatenz nicht genau bestimmt werden. Der Lebenstag zum Zeitpunkt des ersten Nachweises von Geschlechtsprodukten der adulten *Parascaris* spp.-Würmer im Kot, wurde als Anhaltspunkt zur Einschätzung des Infektionszeitpunktes genutzt. In Abbildung 5 wird ersichtlich, wie viele Fohlen je 10-Tage-Abschnitt erstmalig FLOTAC-positiv wurden. Eine frühzeitige Infektion wurde in der 7. Fragestellung angenommen. Unter Berücksichtigung der experimentell erfassten Präpatenz von 72 bis 110 Tagen würde eine Infektion in den ersten Lebenstagen eine erwartete Eiausscheidung in diesem Zeitraum bedeuten. In Abbildung 5 wird deutlich, dass mit 19,1 % (n = 55 Fohlen) nur ein kleiner Anteil dieses Kriterium erfüllen würde. Mit 80,9 % (n = 233 Fohlen) wurde der Großteil der Fohlen erst nach dem 110. Tag erstmalig koproskopisch positiv. Die Fragestellung 7 wurde somit verworfen. Mit 71 Fohlen (24,7 %) wurde in dem Zeitraum zwischen dem 110. und 120. Lebenstag der größte Anteil erstmalig koproskopisch positiv. In den folgenden zehn Tagen wurden noch 57 Fohlen (19,8 %) erstmalig koproskopisch positiv. Wie in Fragestellung 8 angenommen wurde, begann die Eiausscheidung bei wenigen Fohlen sogar vor dem 72. Lebenstag wie in Abbildung 5 in

absoluten Zahlen dargestellt ist. Das Fohlen 105 wurde bereits am 60. Lebenstag koproskopisch positiv. Die Fohlen 333 und 233 begannen am 64. bzw. 69. Lebenstag mit der Ausscheidung von Spulwurmeiern. Die Fohlen 105, 233 und 333 schieden vor dem 72. Lebenstag *Parascaris* spp.-Eier aus und unterschritten so die beschriebene Präpatenzzeit von 72 bis 110 Tagen. Dies würde eine Infektion in den ersten Lebenstagen bedeuten, da eine pränatale Infektion bisher nicht beschrieben wurde. Das erste koproskopisch positive Fohlen wurde im April 2011 und die zwei anderen Fohlen wurden im Mai 2012 geboren.

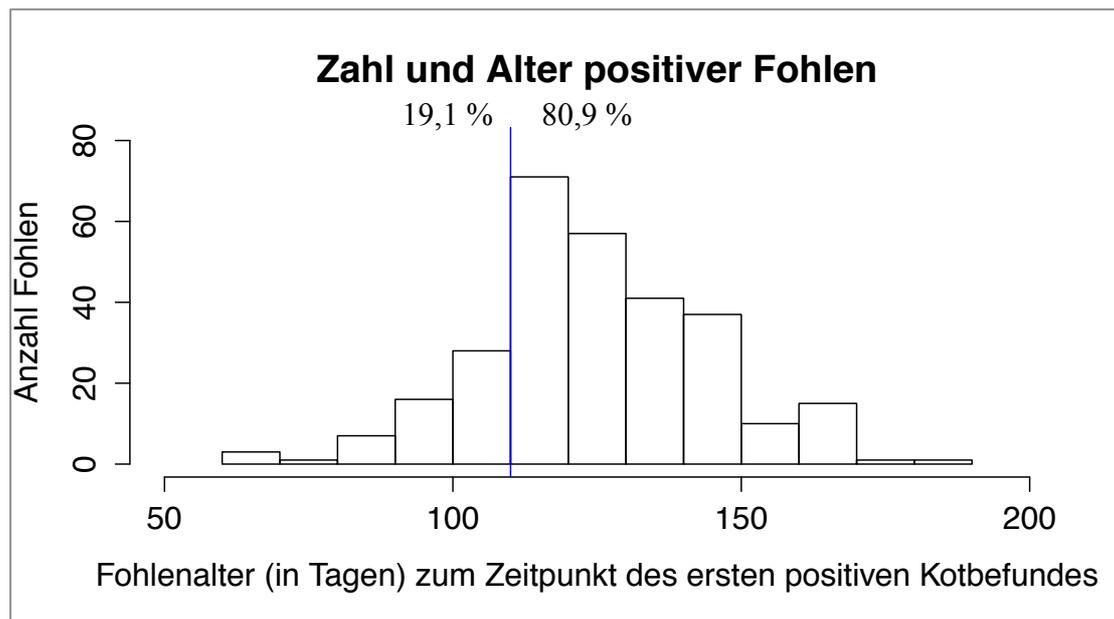


Abbildung 5: Zeitpunkt des ersten koproskopisch *Parascaris* spp.-positiven Befundes nach Lebenstagen gruppiert (n = 288 Fohlen). In den beiden aufeinanderfolgenden Jahren wurden jeweils über 24 bzw. 25 Wochen Kotproben gewonnen und untersucht.

Von den 303 nachweislich infizierten Fohlen konnte bei 288 die Dauer von der Geburt bis zur ersten Eiausscheidung in Tagen angegeben werden. Bei den fehlenden Tieren waren keine koproskopischen Befunde in den zwei Projektwochen vor dem ersten *Parascaris* spp.-positiven Befund vorhanden und damit der unbeobachtete Zeitraum zu groß. Maximal eine Woche vor dem positiven Befund durfte eine Kotprobe fehlen.

Das Durchschnittsalter dieser 288 Fohlen zum Zeitpunkt der ersten Spulwurmeiausscheidung war 125,4 Tage (StAbw = 19,5 Tage), wobei ein Zeitraum von \pm sieben Tagen aufgrund einer möglichen fehlenden Probe vor dem ersten positiven Kotbefund berücksichtigt werden muss.

In Abbildung 6 ist die Zunahme der *Parascaris* spp.-positiven Fohlen in additiver Art dargestellt. Es wird ein sigmoider Kurvenverlauf mit einem steilen Anstieg ab dem

120. Lebenstag sichtbar. Bis zum 190. Lebenstag waren die 288 positiv getesteten Fohlen aus dem Projektzeitraum identifiziert. Diese Auflistung wurde bewusst in Tagesabständen gemacht, obwohl bisher auf Lebens- und Projektwochen Bezug genommen wurde, da dadurch eine bessere Differenzierung zwischen den infizierten Fohlen möglich war.

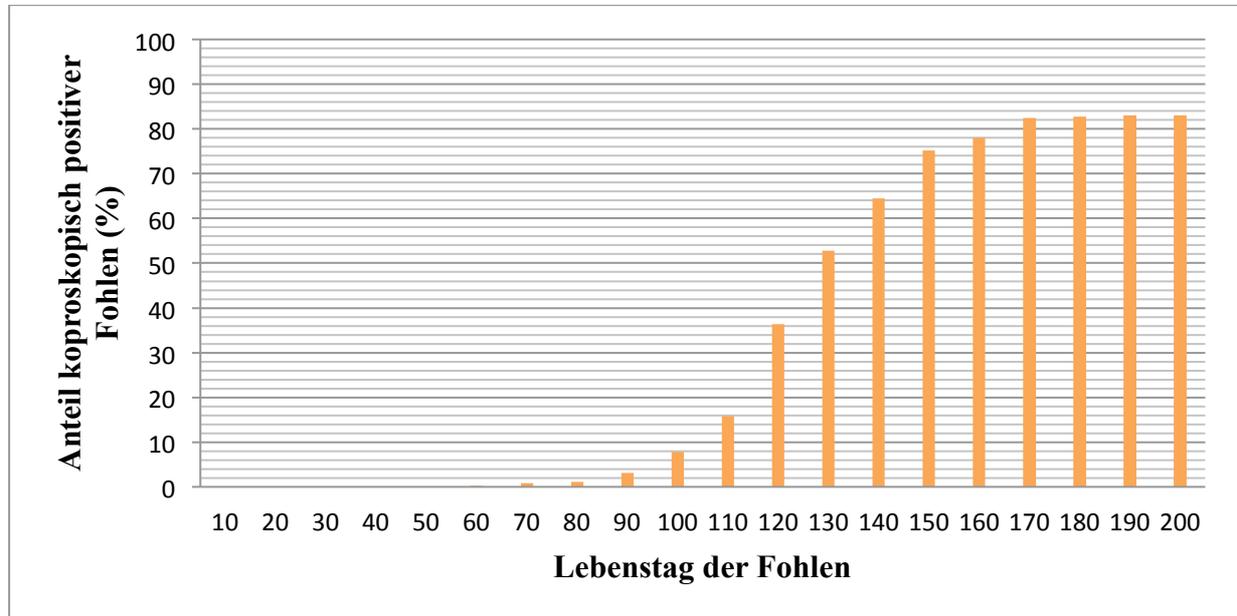


Abbildung 6: Lebenstag der Fohlen zum Zeitpunkt des ersten *Parascaris* spp.-koproskopischen Befundes. Anhand der Addition aller erstmals koproskopisch positiven Fohlen (n = 288) mit höchstens einer fehlenden Kotprobe vor diesem positiven Kotbefund wird ein Altersbereich von ca. 100 bis 150 Tagen ersichtlich, in denen 80 % der *Parascaris* spp.-positiven Fohlen nachgewiesen wurden.

4.1.6 Zusammenhang der *Parascaris* spp.-Infektion mit einer klinischen Erkrankung

Bei *Parascaris* spp.-infizierten Tieren war zu vermuten, dass eine Anfälligkeit für weitere Erkrankungen und Parasiten gegeben sein könnte. Aus diesem Grund wurden die Fragestellungen 4 bis 6 und 9 aufgestellt. Zur Ermittlung der Unabhängigkeit jeder einzelnen Variablen wurden mehrere Kontingenztafeln (Tabelle 6) angefertigt und mittels Chi-Quadrat-Test untersucht.

Von den 303 koproskopisch bekannt *Parascaris* spp.-infizierten Fohlen erhielten 45 Fohlen (14,9 %) eine Nabeltherapie und 131 Fohlen (43,2 %) eine Lungentherapie. Zum Vergleich

bekamen 25,0 % der koproskopisch negativen Tiere eine Nabeltherapie und 45,5 % eine Lungentherapie, was keine signifikante Unterscheidung von den koproskopisch Positiven ergab.

Zur Ermittlung der Leukozytose wurde ein Normbereich von 5,5 bis 11,5 G/l (Knottenbelt D. C. 2007) ausgewählt und mit einem Mittelwert der Leukozyten aus den einzelnen Lebenswochen für jedes Fohlen verglichen. War der Mittelwert der Leukozyten über diesem Normbereich, so wurde dieses Fohlen der Gruppe der Fohlen mit Leukozytose zugeordnet. Insgesamt 207 Fohlen hatten nach der Bildung von Mittelwerten einen erhöhten Leukozytenwert im Blut. Von diesen Fohlen waren 187 Fohlen (61,7 %) koproskopisch *Parascaris* spp.-positiv und nur 20 Fohlen (45,5 %) schieden keine Parasiteneier mit dem Kot aus (Fragestellung 9). Bei der Berechnung der Unabhängigkeit zwischen den Leukozyten-Mittelwerten und dem Anteil *Parascaris* spp.-infizierter Fohlen wurde ein p-Wert = 0,059 berechnet und somit als unabhängig gewertet (Tabelle 6).

Eine zusätzliche Parasiteninfektion der mit *Parascaris* spp.-infizierten Fohlen mit MDS wurde vermutet (Fragestellung 6). Von den 303 *Parascaris* spp.-infizierten Tieren waren 142 Fohlen (46,9 %) mit diesem sehr verbreiteten Pferdeparasiten infiziert. Nur ein Viertel der *Parascaris* spp.-negativen Tiere waren positiv für MDS-Eier und die restlichen Dreiviertel waren negativ für beides. Im Chi-Quadrat-Test wurde ein Wert von $p < 0,05$ ermittelt und damit keine Unabhängigkeit zwischen den Infektionen mit beiden Parasiten festgestellt, das heißt, in den *Parascaris* spp.-positiven Tieren wurden auch signifikant häufiger MDS-Eier gefunden. Auch das logistische Regressionsmodell belegte eine höhere Wahrscheinlichkeit der Pferdespulwurminfektion eines Fohlens bei vorhandenem MDS-Befall ($p < 0,05$). Somit ist die Chance einer Infektion bei einem MDS-Befall statistisch signifikant circa doppelt so hoch (OR = 2,23; siehe Anhang logit2).

Tabelle 6: Verteilung *Parascaris* spp.-Eier ausscheidender Fohlen, benötigte Nabel- und Lungentherapien, Leukozytose bzw. MDS-Befall dieser Fohlen (prozentuale Verteilung koproskopisch positiver und negativer Fohlen, n = 347).

		<i>Parascaris</i> spp.-Eiausscheidung		p-Wert
		– (n = 44)	+ (n = 303)	
Nabeltherapie	–	75 % (n = 33)	85,1 % (n = 258)	0,14
	+	25 % (n = 11)	14,9 % (n = 45)	
Lungentherapie	–	54,5 % (n = 24)	56,8 % (n = 172)	0,91
	+	45,5 % (n = 20)	43,2 % (n = 131)	
Leukozytose	–	54,5 % (n = 24)	38,3 % (n = 116)	0,059
	+	45,5 % (n = 20)	61,7 % (n = 187)	
MDS	–	75 % (n = 33)	53,1 % (n = 161)	0,010 *
	+	25 % (n = 11)	46,9 % (n = 142)	

Nur fünf der 347 Fohlen wurden mit Plasma infundiert. Diese fünf waren koproskopisch positiv (1,7 %), doch ist dies eine zu geringe Zahl betroffener Fohlen, um darüber eine sichere Aussage über einen Zusammenhang mit *Parascaris* spp. treffen zu können (Fragestellung 10). Ein veränderter Lungenultraschallbefund oder Nasenausfluss wurde als Ausdruck einer respiratorischen Erkrankung gewertet (Fragestellung 5). Ein eventueller Zusammenhang dieser respiratorischen Erkrankung zu erhöhten Leukozytenwerten sollte statistisch untersucht werden. In der Regressionsgleichung unter Beachtung der einzelnen Lebenswochen wurde eine signifikant positive Korrelation ($p < 0,05$) der klinischen Parameter „Nasenausfluss“ und „Lungenultraschallbefund“ mit den Leukozytenwerten belegt (siehe Anhang Seite 184 Modell 1).

Ein signifikanter Zusammenhang der *Parascaris* spp.-Infektion mit den Mittelwerten von Nasenausfluss und Ultraschallbefunden wurde in einer Regressionsgleichung nicht nachgewiesen (siehe Anhang Seite 182 Logit3). Zusammenfassend wurde kein statistisch signifikanter Zusammenhang einer Spulwurminfektion mit einer Nabel- oder Lungentherapie, Plasmainfusion oder einer Leukozytose ermittelt. Zusätzlich ließen die Mittelwerte der Nasenausfluss- und Lungenultraschallbefunde keinen Zusammenhang zu einer Spulwurminfektion erkennen. Jedoch haben *Parascaris* spp.-positive Fohlen ein 2,6-fach höheres Risiko auch mit MDS infiziert zu sein.

Klinische Veränderungen der Lunge wurden durch die Parameter Nasenausfluss und Lungenultraschallbefund charakterisiert. Zusätzlich wurde zur genaueren Bewertung der Lungengesundheit die Ermittlung eines klinischen Scores nach Ohnesorge et al. (1998) vorgenommen. Dieser Score setzt sich aus Befunden zu Nasenausfluss, Husten, mandibulare Lymphknoten, Dyspnoe sowie der Auskultation von Lunge und Trachea zusammen. Demnach sind Fohlen bei einer Summe von 0 bis 1 lungengesund, gelten ab einem Gesamtscore > 2 als respiratorisch erkrankt und ab einem Wert > 6 sogar als hochgradig respiratorisch erkrankt (siehe Tabelle 2 in Kapitel 3.4.4).

Bei der Betrachtung des klinisch erfassten respiratorischen Scores und den im Gestüt ermittelten EpG-Werten für *Parascaris* spp. sollte ein möglicher Zusammenhang untersucht werden. Zur Vergleichbarkeit der *Parascaris* spp.-EpG-Werte aus mehreren Projektwochen von 347 Fohlen wurden *Parascaris* spp.-EpG-Mittelwerte pro Lebenswoche gebildet. Der Score wurde zunächst mit sowohl in gleicher Weise Medianen als auch Mittelwerten jeder Lebenswoche untersucht, doch wurden Ausprägungen mit beiden Varianten nicht deutlich. Somit wurde eine zusätzliche graphische Auswertung (Abbildung 7) mit Hilfe von Boxplots der Score-Werte für jede Lebenswoche erstellt.

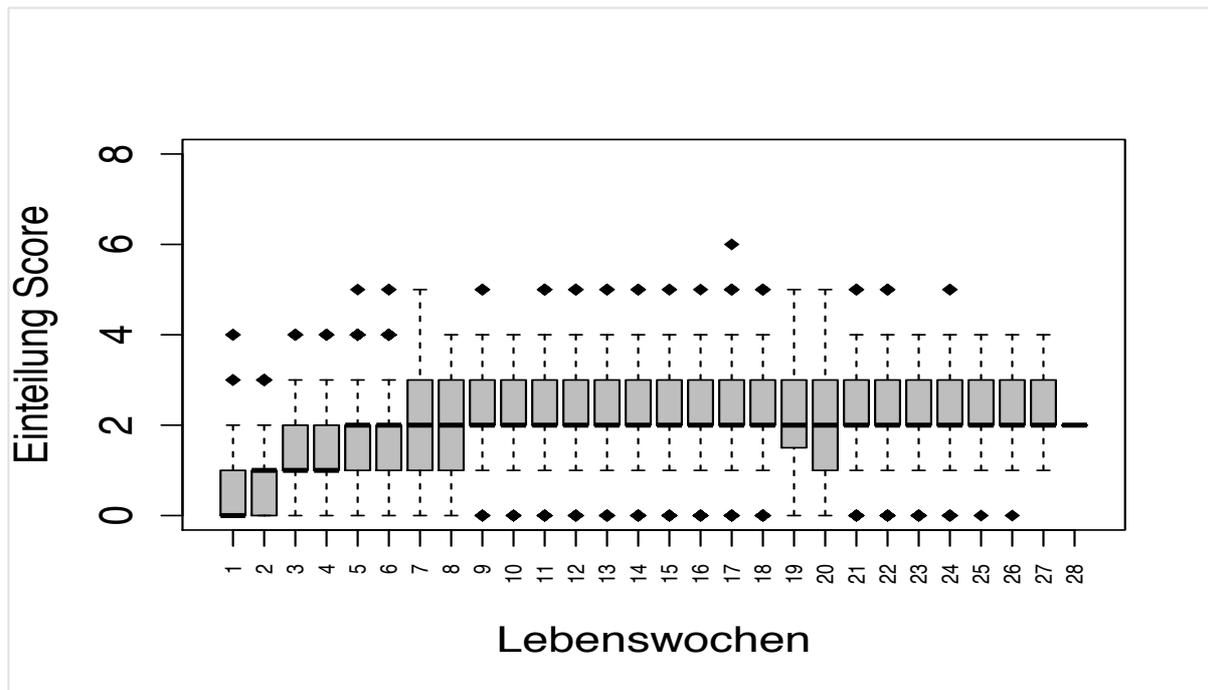


Abbildung 7: Klinischer Score der gesamten Fohlen pro Lebenswoche. Die Verteilung der Score-Werte aller Fohlen ($n = 347$) wurde in jeder Lebenswoche dargestellt und somit ab einem Alter von neun Wochen eine Mehrheit bei den Werten 2 und 3 ersichtlich. Gesamtwerte bis 1 wurden als lungengesund gewertet. Ein Fohlen mit einen Score von 2 bis 3 galt als geringgradig, 4 bis 5 mittelgradig und über 6 hochgradig respiratorisch erkrankt.

In dieser Grafik wird ein Ansteigen der Score-Mediane bis zur fünften Lebenswoche sichtbar. Anschließend lag der Median stets bei einem Wert von ca. 2. Der Medianwert war ab der Woche fünf erstmals bei zwei, aber die Spanne in Woche fünf und sechs unter dem Median größer als darüber. In der siebten und achten Lebenswoche war die Spanne über und unter dem Median gleich. Ab der neunten Woche war die Spanne über dem ermittelten Median größer. Lediglich in den Wochen 19 und 20 nahm dieser Abstand einen Bereich zwischen eins und drei an. Das Minimum und das Maximum lagen in dieser Zeit bei null und fünf. Nach dieser Zeit stellte sich ein ähnliches Bild dar, wie in den Wochen zuvor. Ab der neunten Lebenswoche hatte die Mehrheit der Fohlen einen Score-Wert von \geq zwei und galt somit als respiratorisch erkrankt, was in Anbetracht der Anzahl der Fohlen mehr Tiere betraf als erwartet. Das 25 %- bzw. 75 %-Quantil fällt teilweise mit dem Median zusammen, da der Score in ganzen Zahlen angegeben wird.

In der Auswertung der Abbildung 7 sollte die Anzahl der Fohlen pro Lebenswochen beachtet werden (Tabelle 7). In den ersten und letzten vier Wochen lag das Maximum bei einem Score

von 4. Interpretiert würde dies bedeutet, dass wenige Tiere eine geringgradige oder keine Erkrankung aufwiesen, nur vereinzelt gab es mittelgradige Erkrankungen. In den letzten vier Lebenswochen sank die Anzahl der untersuchten Fohlen jedoch deutlich ab, so dass ein Vergleich mit den Wochen zuvor nicht zweifelsfrei möglich war. Die Fohlen waren in den ersten Lebenswochen vermutlich noch lungengesund. Die Fohlen ab einem Alter von 25 Wochen waren wahrscheinlich ähnlich respiratorisch erkrankt wie in den Lebenswochen zuvor, doch ist dies aufgrund der sinkenden Anzahl nicht repräsentativ darstellbar.

Tabelle 7: Anzahl der untersuchten Fohlen pro Lebenswoche (n = 347)

Lebenswoche	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Fohlenanzahl	347	347	347	347	347	347	347	347	347	347	347	347	347	346
Lebenswoche	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Fohlenanzahl	345	345	345	339	335	312	291	265	223	179	109	57	24	5

In der Abbildung 8 sind die Verläufe der koproskopisch *Parascaris* spp.-positiven Fohlen und der Mittelwerte des „klinischen Score“ aller Fohlen über die Lebenswochen dargestellt. Der Anteil der koproskopisch positiven Fohlen nach der 15. Lebenswoche hatte in der 21. Woche seinen Höhepunkt und sank in den Folgewochen deutlich ab. Der Score-Mittelwert stieg deutlich früher bereits ab der ersten Lebenswoche an. In der fünften Woche gab es eine erste kleine Spitze bei einem Wert von 1,9 bevor es zu den Höchstwerten von 2,4 in der 14. Lebenswoche kam. In den folgenden Wochen lag der Score-Mittelwert auf einem recht konstanten Niveau zwischen 2,1 und 2,4. Im Vergleich beider Kurven fiel ein deutlich früherer Anstieg der Score-Mittelwerte gegenüber den koproskopisch *Parascaris* spp.-positiven Fohlen auf. Nach Erreichen des Niveaus zwischen 2 und 2,5 blieben die Werte konstant. In der Bewertung des klinischen Score nach Ohnesorge et al. (1998) bedeutet ein Wert zwischen 2 und 3 laut Tabelle 2 eine geringgradig respiratorische Erkrankung. In der Darstellung mit Boxplots wird eine obere Grenze von bis zu 5 ersichtlich, was nach Ohnesorge et al. (1998) einer mittelgradigen respiratorischen Erkrankung entspricht. In der 17. Lebenswoche war ein Ausreißer bei einem Wert von 6 zu finden, was nach Ohnesorge et al. (1998) sogar auf eine hochgradige respiratorische Erkrankung dieses Fohlens schließen ließe.

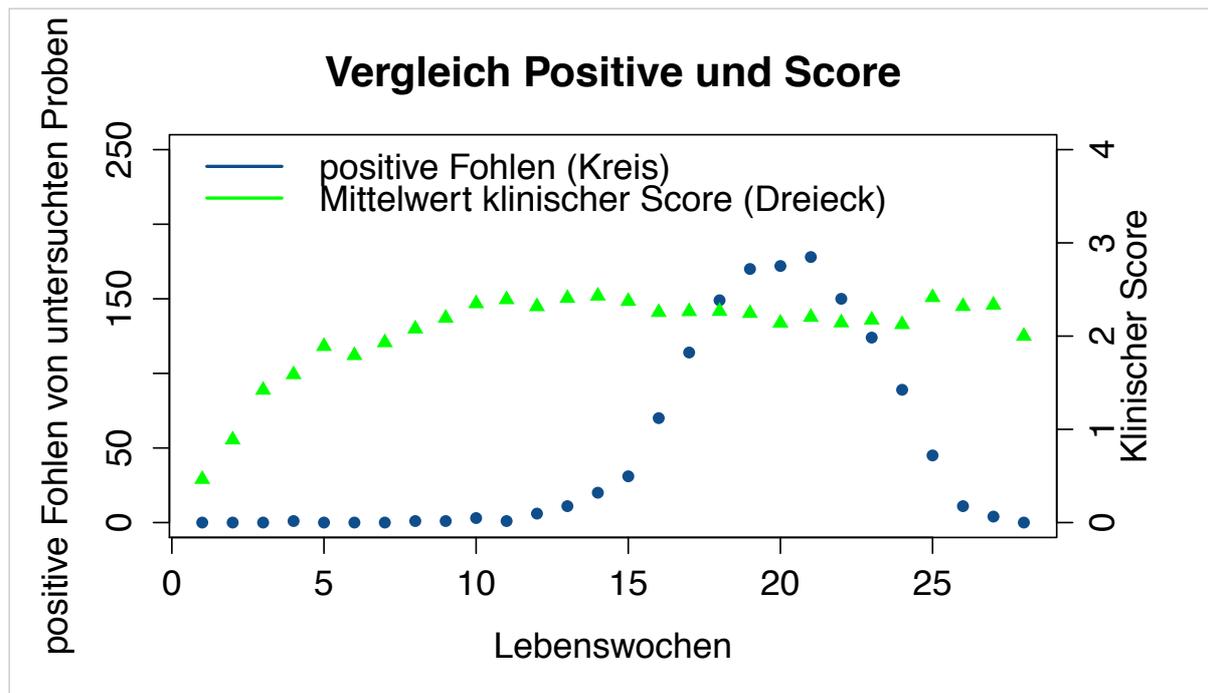


Abbildung 8: Vergleich des Verlaufes der koproskopisch positiven Fohlen für *Parascaris* spp. (n = 303) und der Mittelwerte des klinischen Scores nach Ohnesorge über die Lebenswochen der Fohlen (n = 347).

Die Verwendung des klinischen Scores als Wert zur Repräsentation für die Lungengesundheit erschien, aufgrund der beteiligten respiratorischen Parameter, am sinnvollsten. Durch die Mittelwertbildung wurde dieser Effekt zwar deutlich abgeschwächt, doch ist die Hauptaussage eines steilen Anstieges circa zehn Lebenswochen vor einem deutlichen Anstieg der *Parascaris* spp.-koproskopischen Fohlen weiterhin sichtbar. Eine Verbindung dieser respiratorischen Klinik mit einer Larvenwanderung durch die Lunge kann zu Beginn der Präpatenz von 10 bis 16 Wochen vermutet werden.

Mittels einer weiteren statistischen Methode sollte der Einfluss des Fohlenalters auf die klinischen Parameter überprüft werden. Nach den Ergebnissen eines Regressionsmodells (siehe Anhang Seite 184 Modell 4) hat das Alter der Fohlen einen Effekt auf die Veränderung des klinischen Scores jeder Lebenswoche. Hierbei kam der respiratorischen Komponente, das heißt Nasenausfluss und Lungenschallbefund, eine besondere Bedeutung zu. Bei der Betrachtung der Schallbefunde der Lunge, des Nasenausflusses und der Leukozyten in jeder Lebenswoche wurde ein positiver Effekt auf die Score-Werte der Folgewochen beobachtet. Der Score-Wert nahm einen höheren Wert an, wenn zwei der entsprechenden Befunde erhöht waren. Dies zeigte eine respiratorische Erkrankung an. Zusätzlich hatte eine Lungentherapie oder Plasmainfusion einen negativen Effekt auf den Score-Wert in den

Folgewochen. Ein negativer Effekt der Lungentherapie auf den Score, den Nasenausfluss und den Lungenschallbefund konnte mit einem Behandlungserfolg der Therapie begründet werden. Diese Begründung traf ebenso auf eine sinkende Leukozytenzahl nach einer Nabeltherapie zu. Zusammenfassend wurden zunehmend klinische Auffälligkeit der Komponenten Nasenausfluss, Leukozyten und Lungenschallbefund bei den älteren Fohlen beobachtet.

Leukozytenwerte könnten aus vielen Ursachen erhöht sein und die Lungenschallbefunde boten nur eine begrenzte Sicht auf subpleurale Lungenveränderungen, so dass vor allem der Nasenausfluss als klinischer Indikator einer respiratorischen Schädigung diene. In einem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test wurde anhand dieses Indikators ein Einfluss der Lungenwanderung der Spulwurmlarven auf dieses klinische Merkmal untersucht. Zur Abschätzung des Zeitpunktes einer möglichen Larvenwanderung fungierte die Woche des ersten koproskopischen *Parascaris* spp.-Befundes als erster Wert und der Nasenausflussbefund aus der Lebenswoche zehn Wochen zuvor als zweiter Wert. Diese Zeitpunkte wurden aus der in der Literatur angegebenen Präpatenz von 10 bis 16 Wochen und dem Zeitpunkt der Lungenwanderung von zwei bis vier Wochen nach der Parasiteninfektion auserwählt. Eine mittlere Präpatenzzeit von 13 Wochen abzüglich einer angenommenen Larvenwanderungszeit zur Lunge von drei Wochen ergab eine ungefähre Zeit von zehn Wochen als vermuteten potenziell klinisch relevanten Infektionszeitpunkt. Der statistische Test (Wilcoxon-Mann-Whitney-Test) auf einen Zusammenhang des Nasenausflussbefundes mit einer potentiellen Lungenwanderung der Parasitenlarven zehn Wochen vor dem ersten koproskopisch positiven Befundes ergab ein $p > 0,05$, so dass kein Zusammenhang detektiert werden konnte. Bei weiteren Untersuchungen eines Zusammenhanges der neunten und elften Woche vor dem ersten koproskopisch positiven Befund wurde ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p < 0,05$) des Nasenausflussbefundes elf Wochen vor dem ersten koproskopisch *Parascaris* spp.-positiven Befund ermittelt und der Zusammenhang zur Larvenwanderung durch die Lunge zu dieser Zeit vermutet.

Zum Test des Einflusses vom Infektionszeitpunkt auf den Nasenausflusses wurde ein Regressionsmodell mit ordinalen Daten gerechnet. Diese Untersuchung zeigte, dass nur in der Woche des ersten positiven Kotbefundes ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p < 0,05$) zwischen dem Alter des Fohlens und klinischen Befund „Nasenausfluss“ bestand (siehe Anhang Seite 187). Betrachtet man den Nasenausfluss der Folgewochen, so ist der Effekt nicht mehr signifikant. Es wurde jedoch sichtbar, dass je älter das Fohlen beim ersten koproskopisch positiven Befund war, desto geringer war der Nasenausflussbefund.

4.1.7 Entwurmungsdaten und Einfluss der Entwurmungshäufigkeit auf die Eiauscheidung bzw. Infektion mit dem Parasiten

Die untersuchten Fohlen wurden im Untersuchungszeitraum von 24 bzw. 25 Wochen ein- bis sechsmalig entwurmt. Die mittlere Entwurmungsfrequenz lag bei 3,4 Entwurmungen für die Projektzeiträume beider Jahre. Im Jahr 2011 war die mittlere Entwurmungsfrequenz 3,7 in den 25 Projektwochen. Im darauffolgenden Jahr 2012 lag dieser Wert bei 3,0 in den untersuchten 24 Wochen.

Tabelle 8: Entwurmungsfrequenz der untersuchten Fohlen (n = 347) in den Projektzeiträumen 2011 (25 Wochen) und 2012 (24 Wochen)

Anzahl der Entwurmungen	1 ×	2 ×	3 ×	4 ×	5 ×	6 ×
untersuchte Fohlen 2011 (n=188)	1	13	66	75	28	5
untersuchte Fohlen 2012 (n=159)	13	27	69	50	-	-

Hinsichtlich der Entwurmungsfrequenz wurden drei Kategorien gebildet:

1. Das Fohlen wurde 0 - 1 × im Projektzeitraum von 24 bzw. 25 Wochen entwurmt
2. Das Fohlen wurde 2 - 3 × im Projektzeitraum von 24 bzw. 25 Wochen entwurmt
3. Das Fohlen wurde $\geq 4 \times$ im Projektzeitraum von 24 bzw. 25 Wochen entwurmt

Alle Fohlen (n = 347) wurden einer dieser drei Kategorien zugeordnet und der Anteil jeder Gruppe bestimmt. In der Gruppe 1 waren 14 Fohlen (4,1 %), in der Gruppe 2 waren 178 Fohlen (51,4 %) und in der Gruppe 3 waren 154 Fohlen (44,5 %). Die Gruppe mit einer Entwurmungszahl von 2 - 3 × im Projektzeitraum war mit 51 % die Gruppe, in der sich die meisten Fohlen befanden (Abbildung 9). Bei einer Projektzeit von ungefähr sechs Monaten entsprach dies einem Entwurmungsabstand von 2 bis 3 Monaten.

Als Erstes wurde ein Test auf Unabhängigkeit der *Parascaris* spp.-Infektion von der Entwurmungsfrequenz mit dem Chi-Quadrat-Test durchgeführt und ergab einen p-Wert = 0,37, was die Unabhängigkeit der Infektion von der Entwurmungshäufigkeit bedeutet. Zur Ermittlung des Einflusses der Entwurmungsfrequenz auf die Eiausscheidung wurde ein t-Test mit der abhängigen metrischen Variable „*Parascaris* spp.-EpG-Mittelwert“ von jedem Fohlen und der unabhängigen Variable „Entwurmungskategorie“ gerechnet. Es wurden für diesen Test die Kategorien $\leq 3 \times$ und $> 3 \times$ für die Projektzeit von 24 (2012) und 25 (2011) Wochen gewählt. Ein ermittelter p-Wert $< 0,05$ weist darauf hin, dass die beiden Merkmale nicht unabhängig voneinander waren und eine häufige Entwurmung einen Einfluss auf die mittlere *Parascaris* spp.-Eiausscheidung hatte (Fragestellung 11).

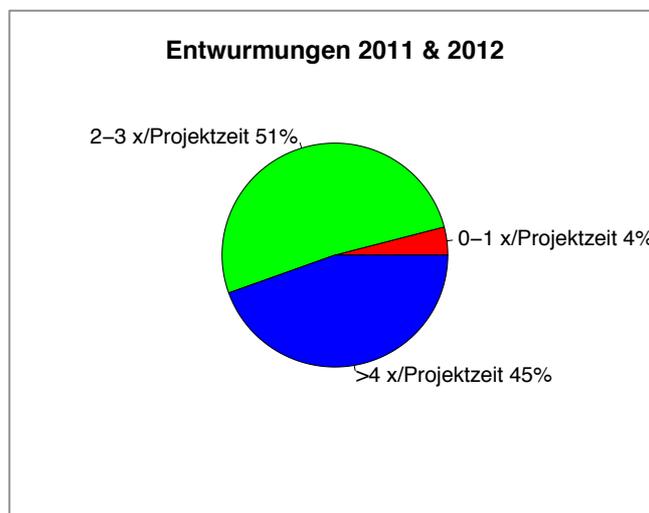


Abbildung 9: Anteil der Fohlen (n = 347) an den drei Entwurmungskategorien in einem Zeitraum von 24 (2011) bzw. 25 Wochen (2012) an zwei aufeinander folgenden Jahren

Der Vergleich der Entwurmungsfrequenz beider Jahre (Tabelle 9) wurde anhand der Merkmale „Projektjahr“ und „Entwurmung“ mittels der Kontingenztafel berechnet. Im Jahr 2011 wurden mit 103 Fohlen (55,1 %) mehr als die Hälfte der Fohlen 4 \times und öfter in der untersuchten Zeit entwurmt. Hingegen galt das im Jahr 2012 nur für 32 % und es gab einen größeren Anteil von 8 % bei einer Frequenz von 0 - 1 \times in der gesamten Untersuchungszeit. Diese höhere Entwurmungsfrequenz war vermutlich ein entscheidender Grund für die geringere Eiausscheidung im Jahr 2011.

Tabelle 9: Anzahl der Fohlen (n = 347) in den drei Kategorien der Entwurmung über einem Zeitraum von 24 (2011) bzw. 25 Wochen (2012) in zwei aufeinander folgenden Jahren

Entwurmungen in Projektzeit	0 - 1 ×	2 - 3 ×	≥ 4 ×
Fohlen 2011 (n = 188)	1 (0,5 %)	83 (44,4 %)	103 (55,1 %)
Fohlen 2012 (n = 159)	13 (8,2 %)	95 (59,7 %)	51 (32,1 %)
Anzahl der Fohlen (Prozentanteil)	14 (4,1 %)	178 (51,4 %)	154 (44,5 %)

4.1.8 *Parascaris* spp.-infizierte Fohlen und die Weidezeit

Ein möglicher Einfluss der Weidezeit auf die Infektion mit dem Parasiten war ein weiterer interessanter Einflussfaktor. In Fragestellung 12 wurde angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit einer *Parascaris* spp.-Infektion bei einer längeren Weideperiode zunimmt. Zur Überprüfung wurde die Unabhängigkeit zwischen den infizierten Fohlen und der Weidezeit mit dem Chi-Quadrat-Test untersucht. Die Variable „Weidezeit“ setzte sich aus drei Kategorien zusammen:

1. 0 - 4 Wochen
2. 5 - 8 Wochen
3. > 8 Wochen

Der Test auf Unabhängigkeit beider Merkmale ergab ein Wert von $p < 0,05$ und somit konnte davon ausgegangen werden, dass die Infektion mit dem Pferdespulwurm nicht unabhängig von der Weidezeit war. Zur Veranschaulichung wurde in Abbildung 10 eine Grafik abgebildet, in der die drei Kategorien dargestellt sind und deren Anteil der koproskopisch positiven und negativen Fohlen. Mit 159 Fohlen (45,8 %) war fast die Hälfte der Fohlen in der zweiten Kategorie und davon waren 91,8 % koproskopisch positiv. In der ersten und dritten Kategorie waren mit 96 Fohlen (27,7 %) und 92 Fohlen (26,5 %) ähnlich viele Fohlen, doch es war ein deutlicher Unterschied in der Anzahl koproskopisch positiver Fohlen nachweisbar. In der dritten Kategorie waren 90,2 % und in der ersten Kategorie 77,1 % koproskopisch positiv. Der Aufenthalt auf der Weide schien bei dieser Parasitose einen

positiven Einfluss auf das Infektionsgeschehen zu haben. Bei einer Weidezeit von mehr als vier Wochen stieg der Anteil der infizierten Fohlen von 77,1 % auf 91,8 % an.

In der logistischen Regression unter Kontrolle anderer Kovariaten (Projektjahr, Geburtsmonat, gleichzeitige Infektion mit MDS) wurde dieses Ergebnis durch ein $p = 0,02$ bestätigt. Der ermittelte Koeffizient beschrieb eine 10 % höhere Chance der Infektion mit jeder auf der Weide verbrachten Woche (OR = 1,10; siehe Anhang logit2). Damit konnte anhand dieses Tests der Weidezeit bei der Pferdespulwurminfektion ein Einfluss zugesprochen werden, der unabhängig von einem zusätzlichen MDS-Befall war.

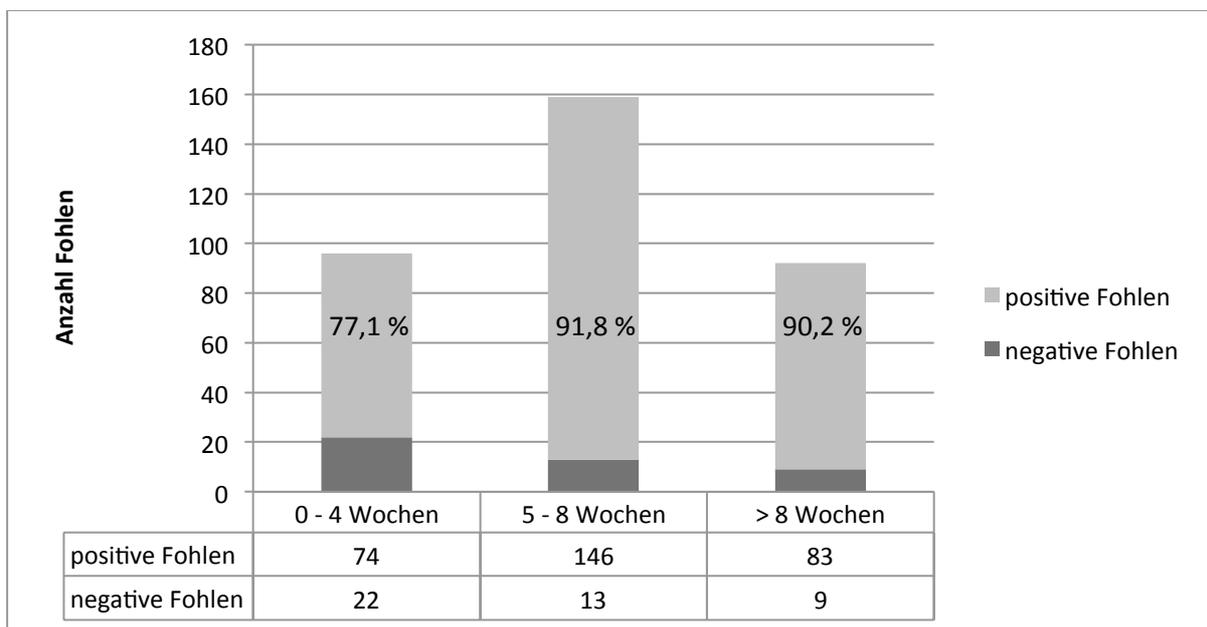


Abbildung 10: Darstellung der drei Kategorien unterschiedlicher Weideaufenthalte (in Wochen) und der Anteil koproskopisch *Parascaris* spp.-positiver und *Parascaris* spp.-negativer Fohlen

4.1.9 Einfluss des Geburtsmonats auf die Parasiteninfektion

In beiden Projektjahren wurde zur selben Jahreszeit mit der Probenentnahme bei den Fohlen begonnen. Ein Einfluss des Geburtszeitpunktes im Jahr auf die Spulwurminfektion wäre denkbar (Fragestellung 14). Anhand der Geburtsdaten wurde in die Geburtsmonate März/April (früh) und Mai/Juni (spät) eingeteilt. Je nach Geburtsmonat wurde eine unterschiedliche Präpatenz und Infektionsanfälligkeit vermutet. Es wurden 253 Fohlen (72,9 %) der untersuchten Fohlen in den Monaten März oder April und 94 Fohlen (27,1 %) in

4 Ergebnisse

den Monaten Mai oder Juni geboren. Der Anteil *Parascaris* spp.-positiver Fohlen war bei den März/April-Fohlen 89,7 % und lag bei den Mai/Juni-Fohlen bei 80 % (Abbildung 11). Unter Verwendung des Chi-Quadrat-Tests wurde in dieser Kombination ein Wert von $p < 0,05$ ermittelt. Die Abhängigkeit zwischen dem Infektionsgeschehen und dem Geburtsmonat konnte somit belegt werden. Die Regression bestätigte diese Annahme mit einem $p < 0,05$, so dass die Wahrscheinlichkeit einer *Parascaris* spp.-Infektion für im März oder April geborene Fohlen signifikant höher war. Die Chance der im Mai/Juni geborenen Fohlen sich zu infizieren lag bei 40 % der im März/April geborenen Fohlen (OR = 0,41; detaillierte Ergebnisse siehe Anhang Seite 181 logit2).

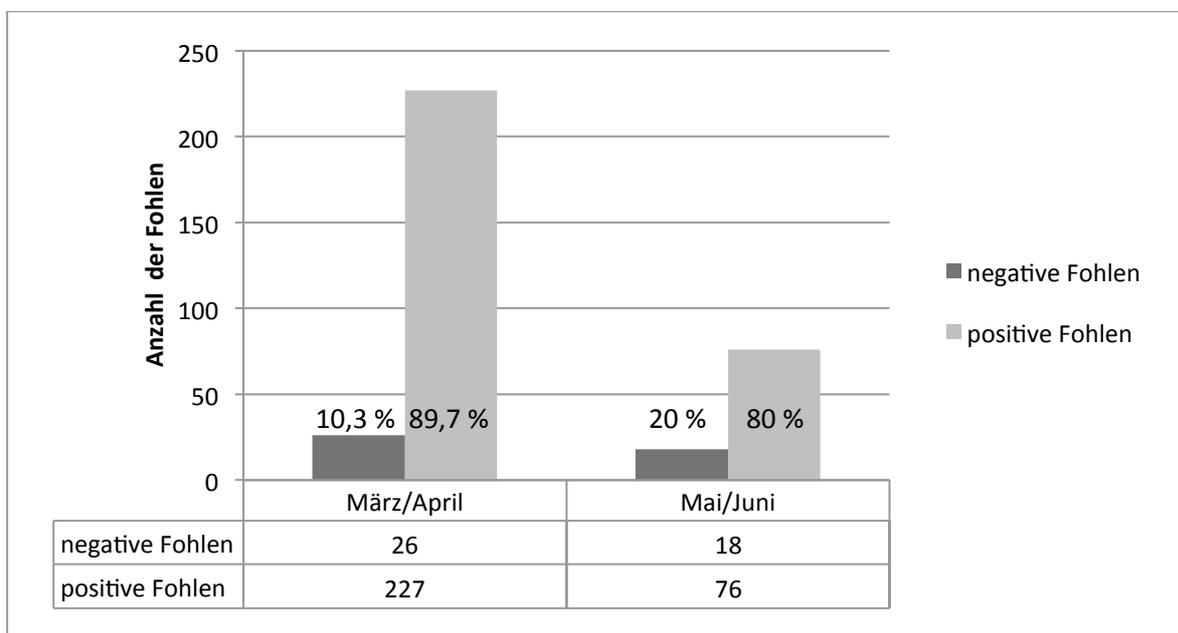


Abbildung 11: Einteilung der Fohlen nach ihrem Geburtsmonat und Anteil der koproskopisch *Parascaris* spp.-positiven und *Parascaris* spp.-negativen Tiere im Untersuchungszeitraum von 24 bzw. 25 Wochen.

Zur Bewertung eines Unterschiedes in der Präpatenzdauer bei im März/April oder im Mai/Juni geborenen Fohlen wurde im t-Test ein p-Wert von $p < 0,05$ ermittelt. Wie auch die graphische Auswertung in Abbildung 12 zeigte, dass früher im Jahr geborene Fohlen eine größere Zeitspanne bis zum ersten *Parascaris* spp.-positiven Kotbefund hatten. Die Eiausscheidung der infizierten Fohlen ist laut t-Test in den beiden Gruppen statistisch signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$). Die früher geborenen Fohlen hatten höhere Mittelwerte der *Parascaris* spp.-EpG-Zahlen als die später im Jahr geborenen Fohlen.

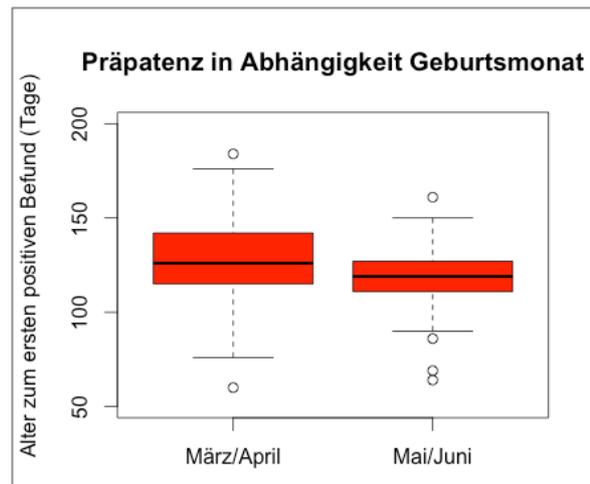


Abbildung 12: Alter zum Zeitpunkt der ersten koproskopisch *Parascaris* spp.-positiven Befund in Abhängigkeit vom Geburtsmonat in einem Boxplot dargestellt.

4.2 Antigenetische und serologische Untersuchungen

Zur Charakterisierung des mittels Kultivierung gewonnenen larvalen Antigens wurden SDS-PAGE und Western Blot durchgeführt. Im Folgeschritt wurden ELISA zum Nachweis serologischer Komponenten im Zusammenhang mit einer Parasiteninfektion und deren Verlauf durchgeführt.

4.2.1 Embryonierung und Schlupf der Larven

Es wurden einerseits Spulwurmeier aus dem Kot der untersuchten Fohlen gewonnen und andererseits Eier aus dem Uterus von weiblichen Wurmern, die nach der Entwurmung der entsprechenden Fohlen ausgeschieden wurden, verwendet. Die Eier zeigten sowohl eine bräunliche Farbe als auch durchscheinenden Charakter (Abbildung 13).



Abbildung 13: Darstellung eines Spulwurmeies nach Isolierung aus dem Kot.

Nachdem die Eier, wie in den Kapiteln 3.6.1 und 3.6.2 beschrieben, vorbereitet wurden, wurden sie in H_2SO_4 bei RT für mindestens drei Wochen inkubiert. Die sich im Ei entwickelnden Larven wurden als reif betrachtet, sobald sie sich in der mikroskopischen Kontrolle stark bewegten und 90 % der Eier Larven enthielten. Bei aus dem Uterus gewonnenen Eiern ist zu beachten, dass dort ein Großteil unreifer Eier aus den vorderen Abschnitten des Uterus enthalten waren, die sich nicht zu Larven entwickelten sondern degenerierten. Diese toten Eier stellten sich dunkler dar als die sich entwickelnden Eier und sedimentierten nicht so schnell wie die intakten Eier. Nachdem die Embryonierung abgeschlossen war, konnte mittels mehrfacher Zentrifugation und Abnahme des Überstandes ein Trennen der unreifen von den intakten Eiern vorgenommen werden. Bei aus dem Uterus gewonnenen *Parascaris* spp.-Eiern waren mehrere Zentrifugationsschritte nötig um einen reifen Anteil von ca. 50 % zu isolieren.

Der ultraschallinduzierte Schlupf führte nach mehrfachen Optimierungsschritten von Zeit und Stärke zu einer Schlupfrate von ca. 80 bis 90 %. Jedoch sollte darauf geachtet werden, dass die larvenhaltigen Eier vor dem Schlupf bei 37 °C gelagert werden, denn dies erhöhte die Beweglichkeit der Larven im Spulwurmei (ca. 90 % der reifen Larven). Die Intensität der Beweglichkeit der in den Eiern enthaltenen Larven war ein wichtiger Faktor für den Larvenschlupf. Sehr bewegliche Larven schlüpften leichter und benötigten nur eine Beschallung mit geringerer Ultraschallleistung zur Schlupfinduktion. Das Auswandern durch das Sieb gelang bei diesen Larven ebenfalls besser. Eine vermehrte Anzahl der verwendeten

Spulwurmeier und der daraus folgende höher Anteil der Eischalenreste im Sieb erschwerte das Auswandern der Larven. Weiterhin führte ein erhöhter Anteil von Schalen, besonders bei der Gewinnung der Eier aus dem Kot, trotz Behandlung mit NaClO zu einem erhöhten Pilzbefall der Kulturen. Insgesamt konnten rund 13,2 Millionen *Parascaris* spp.-Eier aus Kot und geschlechtsreifen Würmern gewonnen werden, von denen ein Großteil (ca. 70 %) embryonierte. Es wurden circa 50 Versuche durchgeführt, um ein Protokoll zum Larvenschlupf mit Hilfe von Ultraschall zu ermitteln.

4.2.2 *In vitro*-Kultivierung der *Parascaris* spp.-Larven

Nach dem ultraschallinduzierten Schlupf der *Parascaris* spp.-Larven wurden Kulturen der Larve 3 angelegt und das Medium dieser Kulturen gesammelt. Nach der Proteinextraktion des gesammelten Mediums wurden knapp 10 mg larvales Protein isoliert. Die Dauer der Kultivierung variierte zwischen 5 und 56 Tagen und lag im Mittel bei 30 Tagen. Vor allem die ersten Kulturen zeigten eine Pilzkontamination. Als Reaktion darauf wurde mit dem Antimykotikum Nystatin gearbeitet. Bei einem Pilzbefall der Kultur oder einem Anteil von < 50 % lebender Larven wurde die Kultivierung beendet. Pilzbefall wurde vor allem bei Kulturen beobachtet, deren Larven aus Eiern kamen, die aus dem Kot der Fohlen isoliert wurden. Kurz nach dem Schlupf und in den ersten Kulturtagen war die Motilität der Larven sehr gut sichtbar, besonders nach kurzer Zeit unter dem Mikroskop, womöglich aufgrund von Licht- und Wärmereiz. Nach einer Woche nahm die Motilität der Larven deutlich ab. Als Kriterium für die Lebendigkeit galt somit in erster Linie „Motilität“. Starre gerade Larven, die während der mikroskopischen Kontrolle nicht auf den Boden der Kulturflasche sanken, wurden als „nicht lebendig“ gewertet. So wurden circa fünf bis sechs Millionen Larven über einen Zeitraum bis zu 56 Tagen kultiviert und das Kulturmedium gesammelt. Aus dem Medium wurde das Protein extrahiert, welches das larvale ES-Antigen enthält. Insgesamt ergaben 70 Kulturen eine Mediummenge von 34,63 Litern. Nach der Proteinextraktion wurden 9,63 mg Protein aus ca. 34 Litern Medium gewonnen.

4.2.3 Charakterisierung der larvalen Antigene

Aus der *in vitro*-Kultivierung von *Parascaris* spp.-Larven wurde ES-Antigen gewonnen, mittels Steril- und Ultrafiltration aufgereinigt und der Proteingehalt im CB-X Assay mit photometrischer Messung bestimmt. Der Proteingehalt der verschiedenen Fraktionen larvalen

4 Ergebnisse

ES-Antigens lag zwischen 2 µg/ml vor der Konzentration und 264 µg/ml nach der Proteinkonzentration. Es wurden mehrere Kulturen kombiniert, um eine große Menge Protein zu erhalten. Für die antigenetischen Untersuchungen im SDS-PAGE und Western Blot wurden jeweils 10 µg larvales ES-Protein in jede Geltasche gegeben.

Zuerst wurde das Antigen mittels SDS-PAGE mit anschließender Proteinfärbung auf die einzelnen Komponenten und deren Größe untersucht. Diese Auftrennung wurde wiederholt bevor sieben Western Blot-Untersuchungen angeschlossen wurden. In Abbildung 14 ist das Ergebnis dieser Auftrennung von 10 µg Protein und einem Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder) zum Größenvergleich zu sehen. Es wurden eine breite Bande bei ca. 12 kDa und drei schmalere Banden bei ca. 13 kDa, 21 kDa sowie 100 kDa nachgewiesen.

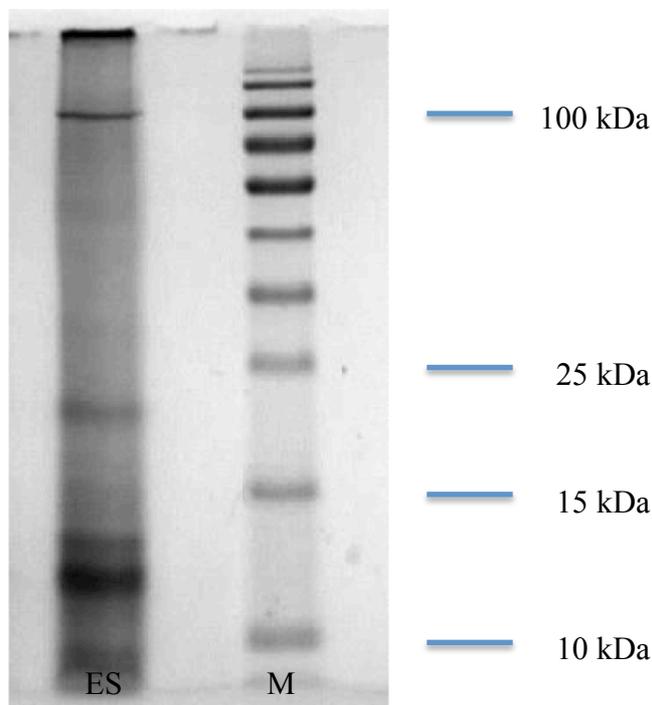


Abbildung 14: SDS-PAGE mit larvalem ES-Antigen (10 µg) und Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder). Auf der rechten Seite befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden (M) in der Einheit Kilodalton (kDa).

4.2.3.1 Larvales ES-Antigen mit IgG (H+L) Sekundärantikörper

Im nächsten Schritt wurde ein Western Blot mit Seren eines koproskopisch positiven Tieres aus dem Gestüt zum Zeitpunkt der höchsten Eiausscheidung (Fohlen 10) und eines über dem gesamten Projektverlauf koproskopisch negativ getesteten Fohlens zu Beginn der

Probenentnahme (Fohlen 69) durchgeführt. Alle Fohlen sind im Anhang in der Tabelle „Fohlenliste“ aufgeführt. Es wurde das Protokoll, welches im Kapitel 3.7.4 beschrieben wurde, verwendet und ergab folgendes Bild:

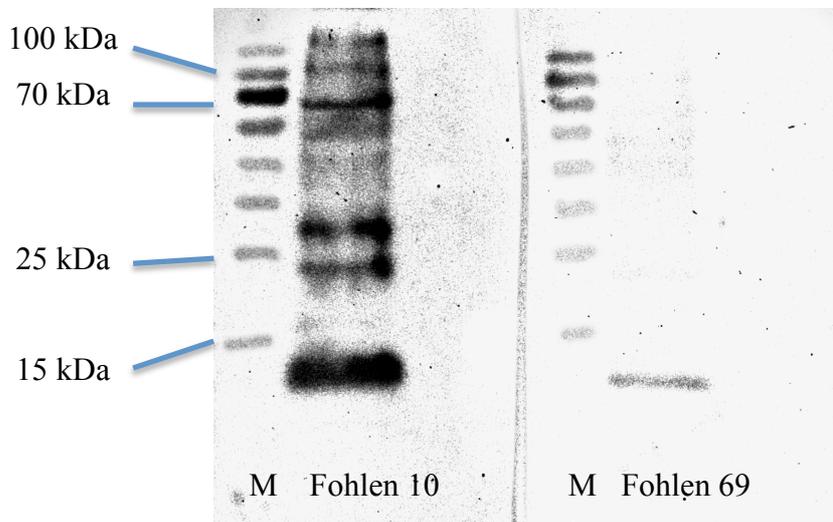


Abbildung 15: Western Blot des larvalen ES-Antigens (10 μ g) mit Seren von einem positiven (Fohlen 10) und negativen Fohlen (Fohlen 69). Jeweils links in der Spur befindet sich der Marker (PageRuler). Auf der linken Seite befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden (M) in der Einheit Kilodalton (kDa).

Das Serum des Fohlens 10 (1 : 200) detektierte mehrere Banden des ES-Antigens der Larven, wobei die stärkste Bande bei ca. 12 bzw. 13 kDa ebenso bei dem koproskopisch negativen Tier (Fohlen 69) zu sehen war. Weitere etwas schwächere Banden bei ca. 21, 25, 57 und 100 kDa bei dem koproskopisch positiven Fohlen 10 waren Folge einer Reaktion des Antigens und Komponenten aus dem Fohlenserum (Abbildung 15).

Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde der Western Blot mit einer stärkeren Serumverdünnung von 1 : 400 und einer Kontrolle ohne Serumschritt wiederholt (nicht gezeigt). Auch in diesem Blot war eine stärkere Reaktion mit mehreren Banden bei dem Fohlen 10 sichtbar und ebenso die 12 bzw. 13 kDa Bande bei dem koproskopisch negativen Fohlen 69. In der Kontrolle ohne Seruminkubation wurde keine Bande gefunden, was eine unspezifische Reaktion des Sekundärantikörpers mit dem Antigen ausschloss.

Im Folgenden wurden Seren von jeweils fünf koproskopisch positiven und negativen Fohlen aus dem Gestüt im Western Blot getestet. Dazu blieb die Antigenmenge pro Spur bei 10 μ g, der Sekundärantikörper wurde 1 : 5.000 und die Seren 1 : 400 verdünnt.

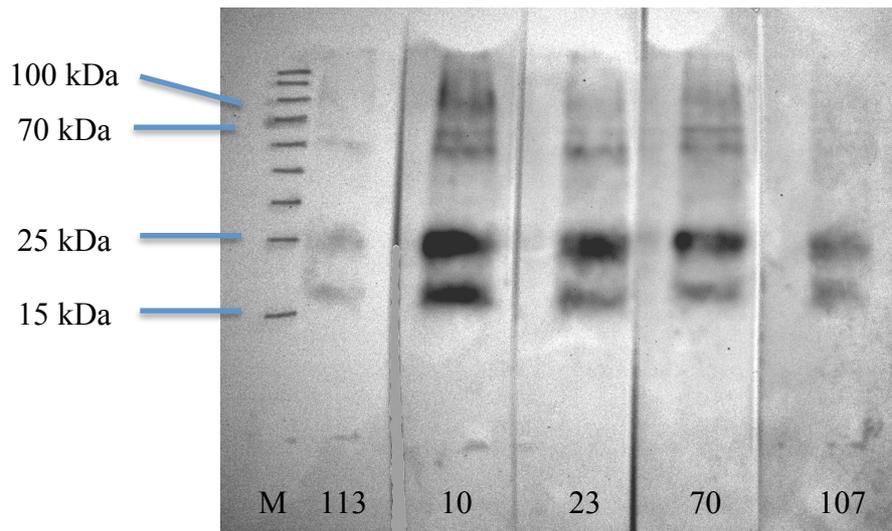


Abbildung 16: Western Blot mit Seren von fünf koproskopisch positiven Fohlen (Fohlen 10, 23, 70, 107 und 113) zum Zeitpunkt höchster Eiausscheidung und Marker (PageRuler). Auf der linken Seite befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden (M) in der Einheit Kilodalton (kDa).

Als Resultat wurden sehr ähnliche Banden nach der Chemielumineszenz bei den fünf koproskopisch positiven Tieren sichtbar (Abbildung 16). Die Bindung des Antigens zu dem Antikörper der Seren von fünf positiven Fohlen zum Zeitpunkt der höchsten Eiausscheidung (Fohlen 10, 23, 70, 107 und 113) ergab zwei starke Banden bei ca. 21 und 25 kDa sowie zwei schwache Banden bei ca. 57 und 70 kDa.

Das Serum von Fohlen 113 zeigte sehr schwache Banden und war im Projektjahr 2011 das Fohlen mit der höchsten Eiausscheidung und einem maximalen EpG-Wert von 10.008 EpG. Das Fohlen war zur Zeit der höchsten Eiausscheidung in der 22. Lebenswoche und hatte in der 18. Woche den ersten koproskopisch positiven Befund. Fohlen 10 und 23 waren gleichfalls in der 22. Lebenswoche und hatten EpG-Werte von 2.200 EpG und 1.224 EpG. Die ersten positiven Kotbefunde wurden bei dem Fohlen 10 in der 17. Lebenswoche und bei dem Fohlen 23 in der 18. Lebenswoche erfasst.

Die Fohlen 70 und 107 waren 24 Wochen alt und hatten EpG-Werte von 2.064 EpG bzw. 708 EpG. Das Fohlen 70 schied zu dieser Zeit über acht Wochen Eier aus und Fohlen 107 war in der fünften Woche der Eiausscheidung. Die Tiere befanden sich in diesem Zeitraum auf dem Höhepunkt der Eiausscheidung und detektierten starke und identische Bandenmuster.

Die Seren der koproskopisch negativen Fohlen (Fohlen 30, 28, 67, 69 und 173) in Abbildung 17 zeigten im Western Blot diffuse Reaktionsmuster. Das Serum des Fohlens 69 ergab zwei

schmale Banden bei ca. 57 und 70 kDa. Mit dem Serum des Fohlens 30 wurden Banden bei ca. 25, 57 und 70 kDa sichtbar. Die Seren der Fohlen 28 und 173 zeigten nur eine Bande bei ca. 57 kDa und das Fohlen 67 wies drei Banden bei 21, 25 und 57 kDa auf. Alle Fohlen waren zu diesem Zeitpunkt zwischen drei und sechs Wochen alt und blieben über den gesamten Projektzeitraum koproskopisch negativ im Test auf Spulwurmeier mittels FLOTAC-Verfahren. Fohlen 28 und 30 hatten jedoch einen positiven Befund für MDS-Eier in diesem Zeitraum.

Zum möglichen Einfluss des Geburtsmonat wurde beachtet, dass Fohlen 23, 107 sowie 113 im April und Fohlen 10 und 70 im März des Jahres 2011 geboren wurden. Die Fohlen 28, 30, 67 und 69 wurden im März geboren, lediglich Fohlen 173 der koproskopisch negativen Fohlen war Anfang April des Jahres 2011 geboren.

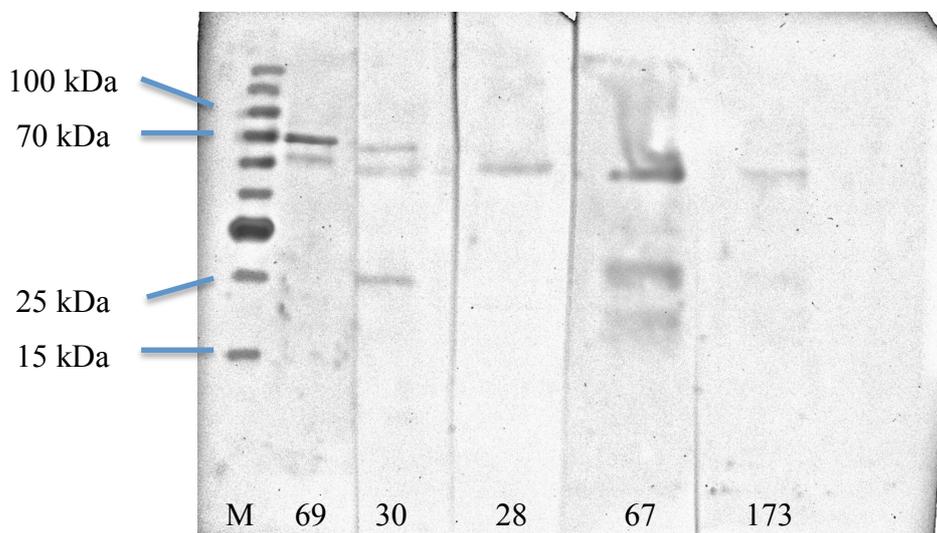


Abbildung 17: Western Blot mit Seren der fünf koproskopisch negativen Fohlen (Fohlen 28, 30, 67, 69 und 173) zum Zeitpunkt der ersten Kotprobenentnahme und Marker (PageRuler). Auf der linken Seite befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden (M) in der Einheit Kilodalton (kDa).

4.2.3.2 Larvales ES-Antigen mit IgM Sekundärantikörper

Im Western Blot mit dem Immunglobulin der Klasse M wurden Seren des Fohlens 23 aus der koproskopisch positiven Gruppe und des Fohlens 173 der koproskopisch negativ getesteten Gruppe aus dem Kapitel 4.2.3.1 untersucht. Die Reaktion der Seren dieser beiden Fohlen zeigten die deutlichsten Unterschiede und sollte zum Vergleich der Sekundärantikörpern

genutzt werden. Im Protokoll wurde das Serum 1 : 400 und der Sekundärantikörper 1 : 500 verdünnt. Als Resultat wurde eine Bande bei ca. 70 kDa sowohl bei Fohlen 23 als auch Fohlen 173 (Abbildung 18) abgelesen. Eine Differenzierung zwischen koproskopisch positiven und negativen Tieren war somit nicht möglich und dieser Sekundärantikörper für weitere Tests ausgeschlossen. Der Marker zwischen den beiden Fohlenbanden wurde entfernt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu schaffen. Es handelte sich um einen Western Blot. Die unterschiedliche Hintergrundfarbe kam durch die Inkubation in den verschiedenen Fohlenseren zustande.

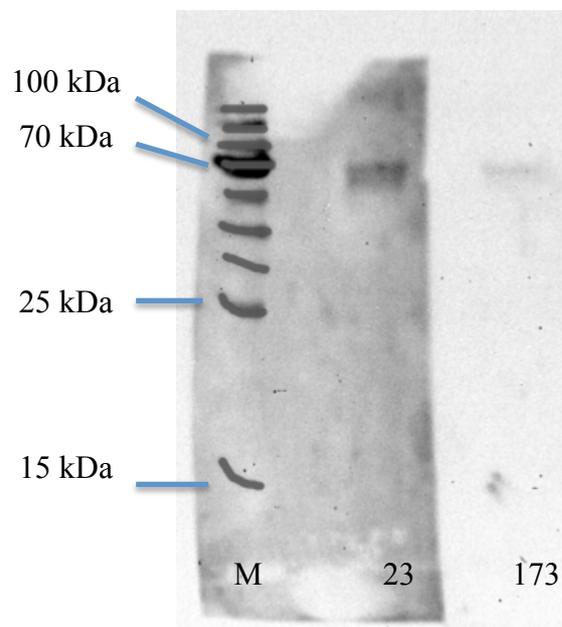


Abbildung 18: Western Blot mit Seren eines koproskopisch positiven (Fohlen 23) und negativen (Fohlen 173) Fohlens und dem IgM Sekundärantikörper zur Detektion. Daneben befindet sich der Marker (PageRuler). Auf der linken Seite befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden (M) in der Einheit Kilodalton (kDa).

4.2.3.3 Larvales somatisches ES-Antigen

Mehrere Versuche einer Fällung des Proteins in Vorbereitung zum SDS-PAGE mittels CB-X-Assay und eine Trichloressigsäurefällung scheiterten. Die Proteine im somatischen Antigen konnten nicht gefällt werden. Ursächlich dafür könnte die Zugabe von Proteinaseinhibitor TLCK sein, welcher bei der Herstellung des Antigenes hinzugegeben wurde. Im Folgenden wurden ELISA-Versuche unternommen, jedoch keine weitere Darstellung angestrebt. Der Proteingehalt des somatischen Antigenes der *Parascaris* spp.-Larven war 84 µg/ml.

4.2.4 Charakterisierung der Antigene aus adulten *Parascaris* spp.-Würmern

Zur Darstellung der Komponenten der ES-Antigene der adulten Pferdespulwürmer wurde ein SDS-PAGE nach dem im Kapitel 3.7.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt. In Abbildung 19 ist das Ergebnis dargestellt. Bei den ES-Proteinen wurde eine starke Bande bei ca. 12 kDa und mehrere schwache Banden bei ca. 25 kDa, 34 kDa, 40 kDa und 55 kDa detektiert. Die Auftrennung des somatischen Antigens von adulten *Parascaris* spp. im SDS-PAGE zeigte eine Vielzahl von Komponenten auf und wurde in weiteren Tests mit Seren aus dem Gestüt nicht verwendet. Zum Vergleich wurden das somatische und ES-Antigen der adulten Würmer sowie das larvale ES-Antigen von *Parascaris* spp. im SDS-PAGE dargestellt (Abbildung 19). Beide ES-Proteine zeigten eine gemeinsame Bande bei ca. 12 kDa, doch die weiteren detektierten Banden unterschieden sich. In den ES-Proteinen der Spulwurmlarven waren weitere Banden bei ca. 13 kDa, 21 kDa und 100 kDa in der SDS-PAGE sichtbar.

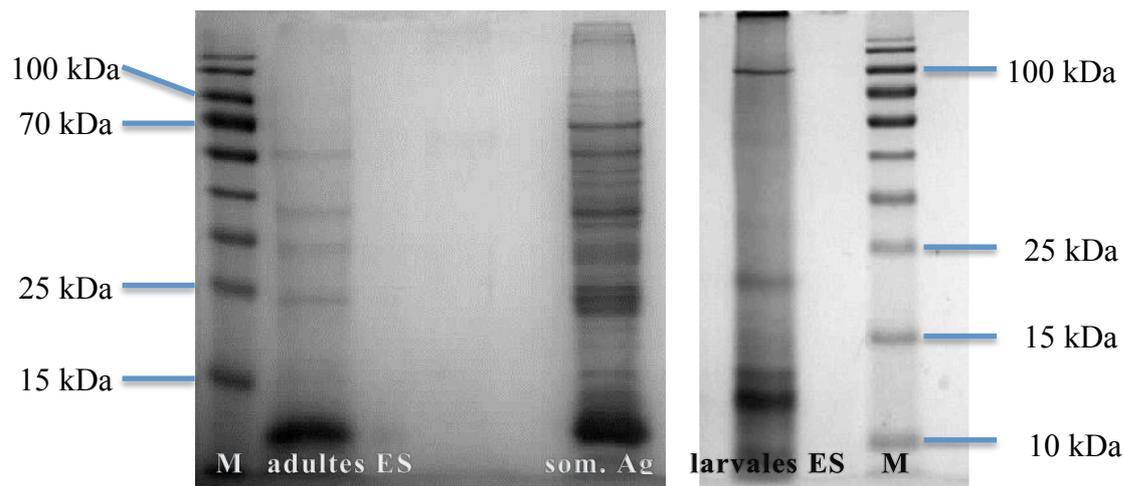


Abbildung 19: Links wurden der Marker (PageRuler), die adulten ES-Antigene (10 μ g) und adulten somatischen Antigene (10 μ g) im SDS-PAGE aufgetrennt. Im rechten Bild wurden die larvalen ES-Antigene und ein Marker (PageRuler) im SDS-PAGE aufgetrennt. Jeweils außen befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden (M) in der Einheit Kilodalton (kDa).

Im Western Blot der adulten ES-Antigene, Sekundärantikörper IgG und 1 : 400 verdünnten Seren der Fohlen 10 (koproskopisch positiv) und 28 (koproskopisch negativ) wurde bei dem Serum des Fohlens 10 eine Bande bei ca. 21 kDa sichtbar, wogegen bei dem Serum des

negativen Tieres 28 und der Sekundärantikörperkontrolle nach dem Nachweis mit dem IgG (H+L)-Sekundärantikörper keine Bande sichtbar wurde. Anschließend wurden die Seren der fünf koproskopisch positiven (Fohlen 10, 23, 70, 107 und 113) und negativen Fohlen (Nummer 28, 30, 67, 69 und 173) mit den ES-Antigenen der adulten Würmer getestet. Die Ergebnisse dieser Western Blots mit den zehn Fohlenseren werden in Abbildung 20 und Abbildung 21 dargestellt. Es wurde bei Seren der Fohlen 10, 23, 70 und 107 eine schwache gemeinsame Bande bei ca. 34 kDa gefunden. Zusätzlich hatte das Serum des Fohlens 10 eine Bande zwischen 55 kDa und 70 kDa. Die Seren der Fohlen 70 und 107 zeigten zusätzlich eine Bande bei ca. 12 kDa und das Fohlen 107 eine dritte Bande bei ca. 21 kDa. Mit dem Serum des Fohlens 113 wurden nicht die gemeinsame Bande bei 34 kDa und keine weitere Proteinbande gefunden. Die Seren der koproskopisch negativen Fohlen 28, 69 und 173 zeigten ebenfalls keine Reaktionen mit den adulten ES-Antigenen. Nur die Seren der Fohlen 30 und 67 hatten eine Bande zwischen 40 kDa bis 55 kDa und Fohlen 30 zusätzlich eine Bande bei ca. 12 kDa.

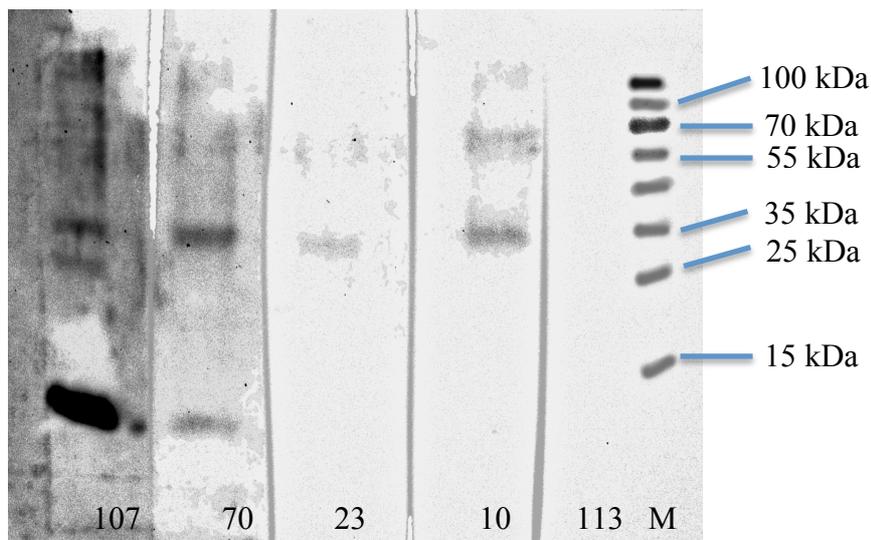


Abbildung 20: Western Blot des adulten ES-Antigens (10 µg) mit Seren der fünf koproskopisch positiven Fohlen (10, 23, 70, 107 und 113) in einer 1 : 400 Verdünnung und dem IgG-Sekundärantikörper in einer 1 : 5.000 Verdünnung (entsprechend Protokoll aus Kapitel 3.7.4). Auf der rechten Seite befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden (M) in der Einheit Kilodalton (kDa).

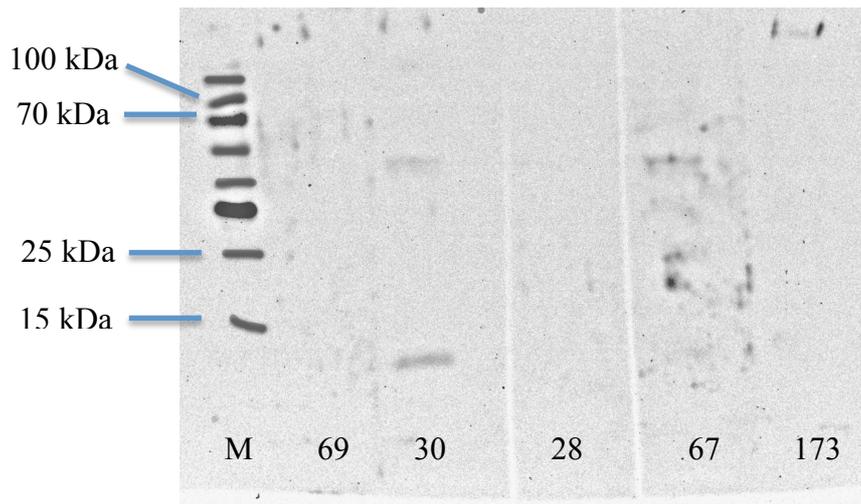


Abbildung 21: Western Blot mit den adulten ES-Antigenen (10 µg), Seren der fünf koproskopisch negativen Fohlen (69, 30, 28, 67 und 173 in einer 1:400 Verdünnung und dem IgG-Sekundärantikörper in einer 1:5.000 Verdünnung (entsprechend Protokoll aus Kapitel 3.7.4). Auf der linken Seite befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden in der Einheit Kilodalton (kDa).

Zusammenfassend konnte eine gemeinsame Bande bei vier der fünf koproskopisch positiven Fohlen detektiert werden. Das fünfte Fohlen dieser Gruppe zeigte jedoch keine Banden. Eine Unterscheidung zwischen koproskopisch positiven und negativen Fohlen war somit nicht zuverlässig möglich.

Ein Western Blot der adulten ES-Antigene, Sekundärantikörper IgM und Seren von einem koproskopisch positiven (Fohlen 23) und negativen Tier (Fohlen 173) wies keine Banden auf (nicht gezeigt).

4.2.5 Serologische Untersuchungen mittels ELISA

In der Projektzeit wurden insgesamt 7.505 Serumproben von 347 Fohlen genommen. Nachdem die Komponenten einiger Antigene im SDS-PAGE aufgetrennt und angefärbt oder geblottet wurden, konnten serologische Tests mit einigen dieser Fohlenserumproben angeschlossen werden. Hierbei wurden im ELISA Antigene, Sekundärantikörper und Pferdeserum miteinander getestet, wie in Tabelle 10 aufgelistet wurde.

Tabelle 10: Durchgeführte Kombinationen der verschiedenen ELISA

	Negative und positive Fohlenserum			Präkolostrale Seren			Kontrollseren von monoinfizierten Pferden		
	IgG	IgM	IgG(T)	IgG	IgM	IgG(T)	IgG	IgM	IgG(T)
ES-Ag von <i>Parascaris</i> spp.-Larven	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ES-Ag von <i>Parascaris</i> spp.-Adulten	+	+	-	+	+	-	-	-	-
Somatisches Ag von <i>Parascaris</i> spp.-Larven	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. suum</i> -Ag	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4.2.5.1 ES-Antigen der *Parascaris* spp.-Larven

Für den ELISA wurde eine Fraktion mit einer Proteinkonzentration von 100 µg/ml genutzt.

Nach einer Schachbrett-Titration wurde eine Antigenkonzentration von 2 µg/ml als Arbeitskonzentration für folgende ELISA verwendet.

Erste Versuche wurden mit einem equinen Immunglobulin der Klasse G als Sekundärantikörper durchgeführt. Stichprobenartige Untersuchungen mit Seren ergaben für die koproskopisch positiven Tiere (Fohlen 10, 11, 23, 70, 71, 76, 78, 107, 113, 146, 281 und 344) zum Zeitpunkt hoher Eiausscheidung OD-Werte zwischen 0,147 bis 1,227 und für die koproskopisch negativen Tiere (Fohlen 28, 30, 67, 68, 100, 119, 139, 157, 173, 179 und 346) zu Beginn der Probenentnahme OD-Werte zwischen 0,087 und 0,617.

Die Seren der zehn Fohlen, die im Western Blot verwendet wurden, wurden ebenso im ELISA mit dem larvalen ES-Antigen und IgG (1 : 10.000) untersucht. Es wurden OD-Werte im Bereich von 0,450 bis 1,289 mit Seren der fünf koproskopisch positiven Fohlen und 0,462 bis 1,129 mit Seren der fünf koproskopisch negativen Tieren ermittelt (siehe Abbildung 22).

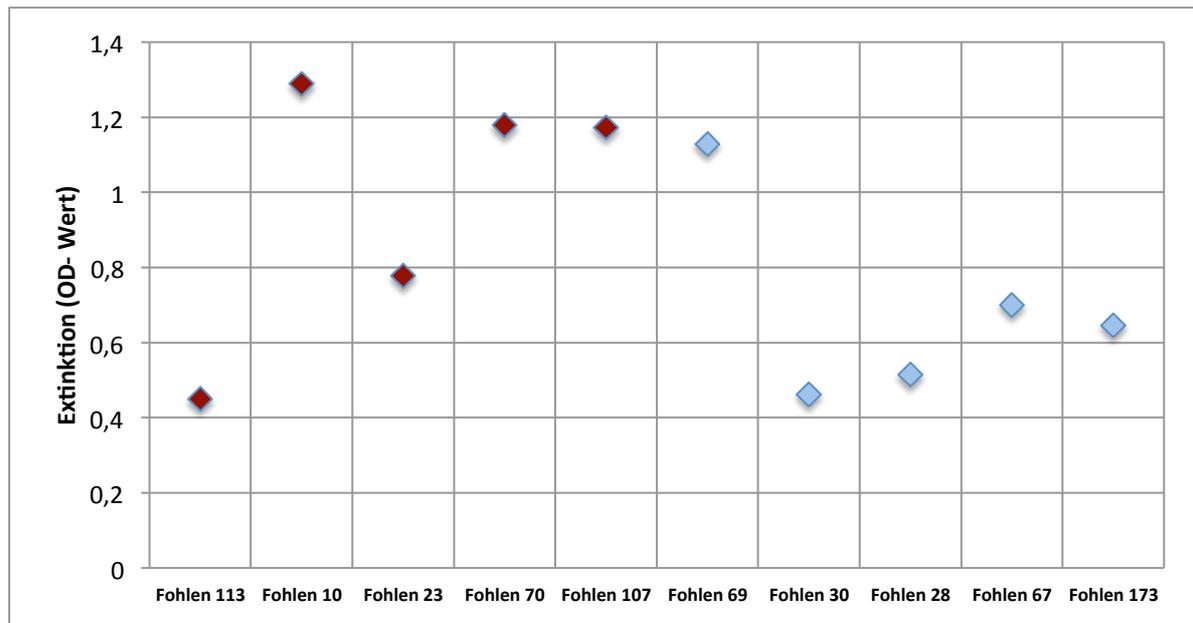


Abbildung 22: Extinktionen im ELISA von larvalem ES-Antigen und IgG (1 : 10.000) mit den Seren von fünf koproskopisch positiven Fohlen (rot) und fünf koproskopisch negativen Fohlen (blau). Fohlen 10, 23, 70, 107 und 113 hatten zu diesem Zeitpunkt die maximale Eiausscheidung von Spulwurmeiern. Die koproskopisch negativen Fohlen 28, 30, 67, 69 und 173 befanden sich zu diesem Zeitpunkt am Anfang des Probenentnahmezeitraumes.

Untersuchungen zu den OD-Werten koproskopisch positiver und negativer Fohlen während der Projektzeit ergaben unterschiedliche Kurven. Es wurden Fohlen mit einem Abfall der Werte ab einem OD-Wert von 0,7 bis 2,0 in den ersten Lebenswochen und wiederum andere mit gleichbleibenden Werten zwischen 0,2 und 0,3 über die ersten Lebenswochen hinweg erfasst. In einem Zeitraum zwischen der 13. und 18. Lebenswoche begannen die koproskopisch positiven Fohlen mit der Eiausscheidung und es kam zum Anstieg der OD-Werte bei Tieren, die im Verlauf der Untersuchung koproskopisch positiv wurden. Fohlen 10 und 93 wurden in der 17. Lebenswoche, das Fohlen 79 in der 18. Lebenswoche und die Fohlen 71 und 76 in der 13. Lebenswoche koproskopisch positiv (Abbildung 23). In der Darstellung der OD-Werte der Seren der koproskopisch negativen Fohlen (Abbildung 24) waren ansteigende OD-Werte ab der 15. Woche (Fohlen 173) und 18. bzw. 19. Woche (Fohlen 100 bzw. 68) nachweisbar. Es konnten keine einheitlichen Verläufe der ausgewerteten Fohlenserum in den ersten Lebenswochen und nach einem Alter von drei Monaten erfasst werden, die eine Unterscheidung in koproskopisch positive und negative Fohlen ermöglichten.

4 Ergebnisse

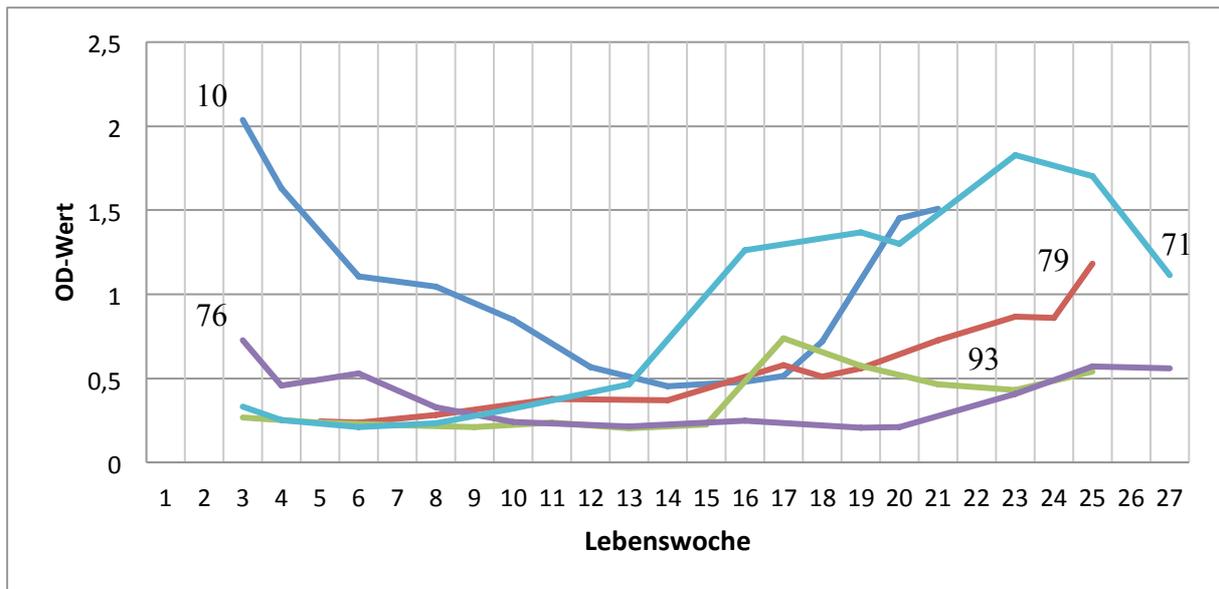


Abbildung 23: OD-Werte im Verlauf des Untersuchungszeitraumes der in Abbildung 22 gezeigten fünf koproskopisch positiven Fohlen (10, 71, 76, 79 und 93).

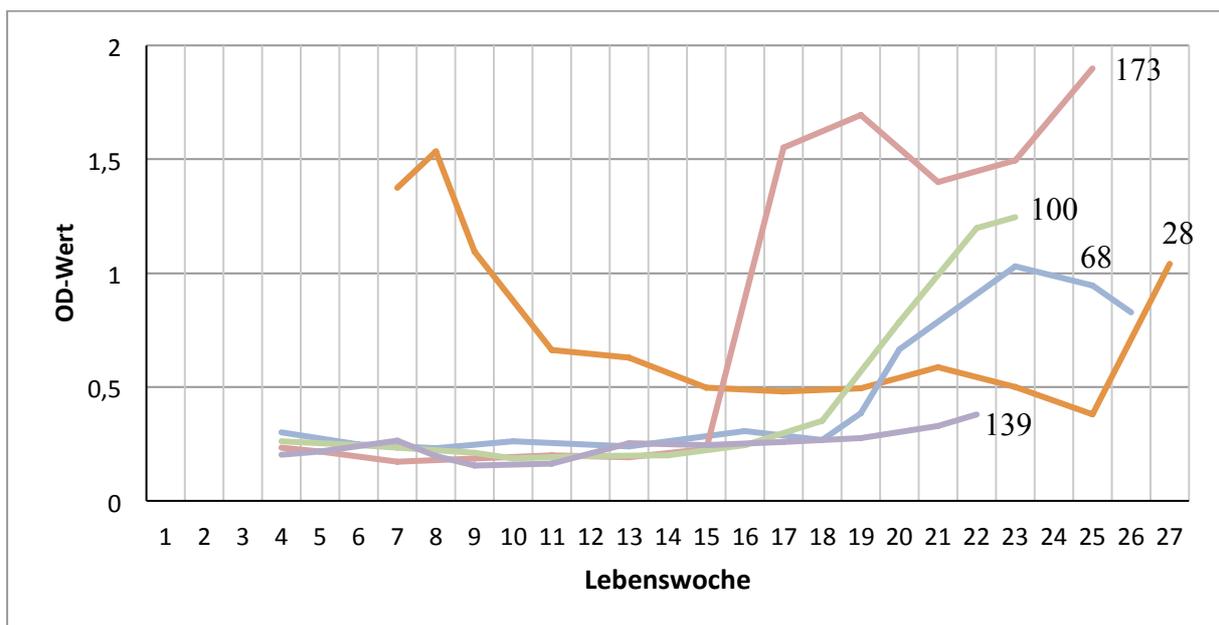


Abbildung 24: OD-Werte im Verlauf des Untersuchungszeitraumes der in Abbildung 22 gezeigten fünf koproskopisch negativen Fohlen (28, 68, 100, 139 und 173).

Unter Verwendung des Sekundärantikörpers Anti IgG (T) in der Verdünnung 1 : 20.000 wurde ein ELISA mit koproskopisch positiven Fohlen zum Zeitpunkt der maximale Eiausscheidung von Spulwurmeiern und koproskopisch negativen Fohlen zu Beginn des

Probenentnahmezeitraumes durchgeführt. Es wurden OD-Werte um 0,2 bei zwei koproskopisch negativen Fohlen (Fohlen 28 und 100) und OD-Werte zwischen 0,1 und 0,8 bei drei koproskopisch positiven Fohlen (10, 281 und 344) aus dem Gestüt festgestellt. Weitere Ergebnisse aus Untersuchungen mit diesem Sekundärantikörper und Seren von monoinfizierten Pferden sind im Kapitel 4.2.5.5 aufgelistet.

Zur Überprüfung eines möglichen Einflusses kolostral übertragener maternaler Antikörper in den ersten Lebenswochen wurden die prä- und postkolostralen Blutproben der Fohlen genutzt. Die Ergebnisse sind im Kapitel 4.2.5.6 beschrieben.

In den letzten ELISA-Untersuchungen wurden Seren von experimentell monoinfizierten Pferden (Prof. Dr. Thomas Klei, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, USA) mit den drei Sekundärantikörpern getestet. Die Ergebnisse dieser ELISA sind als Mittelwerte in Tabelle 11 für alle sechs monoinfizierten Pferde aufgelistet.

4.2.5.2 ES-Antigen der *Parascaris* spp.-Adulten

Das ES-Antigen der adulten *Parascaris* spp.-Würmer hatte einen Proteingehalt von 510 µg/ml und wurde zum Vergleich mit dem larvalen ES-Antigen mit einem Teil der Fohlenseren in einer Arbeitskonzentration von 1,25 µg/ml getestet. Diese Konzentration wurde in einer zuvor durchgeführten Schachbrett-Titration ermittelt.

In Untersuchungen zum Infektionsverlauf mit dem Sekundärantikörper IgG wurden bei vier koproskopisch positiven Tieren (Fohlen 10, 70, 76 und 146) unterschiedliche Verläufe gefunden. Die OD-Werte zweier Fohlen (10 und 76) stiegen erst nach dem ersten positiven Kotbefund an. Bei Fohlen 70 begann der Anstieg im OD-Wert zum Zeitpunkt des positiven Befundes und bei dem Fohlen 146 bereits zwei Wochen vor dem Nachweis erster Eier im Kot. Das koproskopisch negative Tier 28 blieb in der Projektzeit, bis zur 25. Lebenswoche, unter einem OD-Wert von 0,3. Das zweite koproskopisch negative Fohlen 100 hatte einen schwankenden Verlauf um den Wert 0,4 und zwei Anstiege auf 0,6 in der 7. und 20. Lebenswoche. Eine deutliche Unterscheidung zwischen positiven und negativen Fohlen war aus dieser Untersuchung nicht abzuleiten (Abbildung 25). Weitere ELISA mit dem Antikörper IgM ermöglichten ebenso keine deutliche Unterscheidung in koproskopisch positive und negative Tiere.

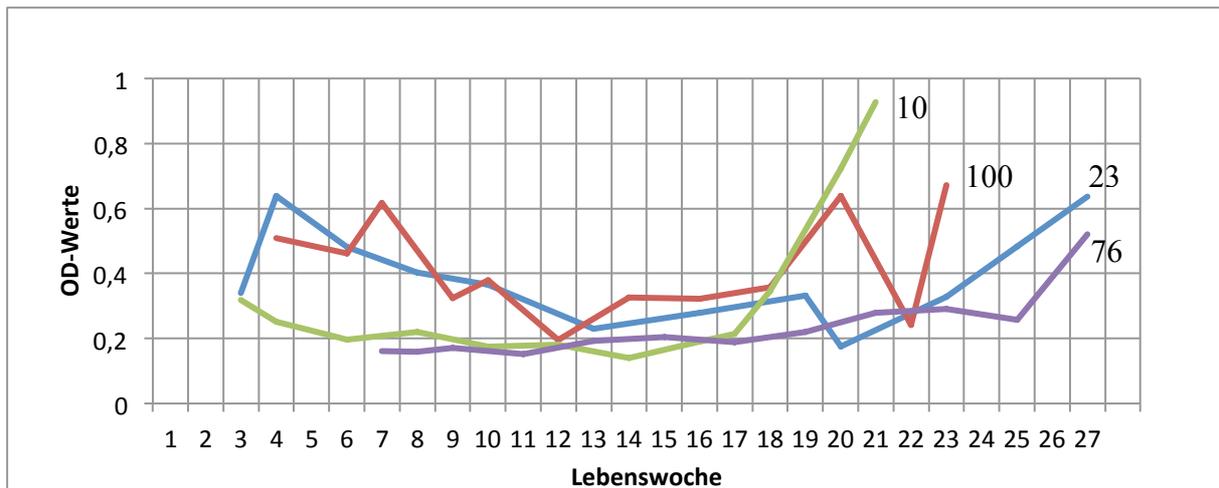


Abbildung 25: OD-Werte koproskopisch positiver (Fohlen 10 und 76) und negativer Tiere (Fohlen 23 und 100) im Verlauf des Untersuchungszeitraumes unter Verwendung des adulten ES-Antigens.

4.2.5.3 Somatisches Antigen der *Parascaris* spp.-Larven

In dem ELISA aus jeweils fünf Seren von koproskopisch positiven (Fohlen 10, 23, 70, 107 und 113) und negativen Tiere (Fohlen 28, 30, 67, 69 und 173) sowie dem IgG (H+L) Sekundärantikörper in den verschiedenen Verdünnungen wurden OD-Werte in den Bereichen von 0,217 bis 0,928 bei den positiven Tieren und 0,274 bis 0,795 bei den negativen Tieren abgelesen. Eine Unterscheidung in koproskopisch positive und negative Fohlen war nicht möglich. Diese Ergebnisse und ein erwarteter sensitiverer Nachweis mit dem ES-Antigen ließen keine weiteren Untersuchungen mit diesem Antigen folgen.

4.2.5.4 Seren von monoinfizierte Pferden

Zum Test auf mögliche Kreuzreaktionen mit anderen Nematoden beim Pferd wurden das ES-Antigen der *Parascaris* spp.-Larven sowie das *A. suum*-Antigen mit Seren von experimentell infizierten Pferden aus den USA (Prof. Dr. Thomas Klei, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University) untersucht. Diese Pferde wurden isoliert in Käfigen gehalten um andere Parasiteninfektionen auszuschließen. Sie wurden mit einer Parasitenart experimentell infiziert und anschließend wurde Serum der Tiere gewonnen. Bei der experimentellen Infektion eines Pferdes mit kleinen Strongyloiden handelte es sich nicht um eine Monoinfektion, sondern um eine Infektion mit mehreren Parasitenarten dieser Gruppe.

In der Tabelle 11 sind die Mittelwerte der erhaltenen OD-Werte bei 492 nm Wellenlänge dargestellt. Es wurden vor allem bei Seren der Pferde, die mit Vertretern der Familie der großen Strongyliden infiziert waren, hohe Extinktionswerte zwischen 1,266 und 3,706 gefunden. Bei dem Pferd, das mit den kleinen Strongyliden infiziert war, variierten die OD-Werte zwischen 0,661 und 2,397. Einzig die Reaktion des *S. westeri*-infizierten Tieres blieb in den Extinktionswerten zwischen 0,166 und 0,294 und somit unter den OD-Werten von 0,402 bis 0,532 des *Parascaris* spp.-infizierten Tieres.

Tabelle 11: OD-Mittelwerte aus den ELISA-Untersuchungen verschiedener Antigene und Sekundärantikörper mit Seren der monoinfizierten Pferde

Antigen	ES-Ag der <i>Parascaris</i> spp.- Larven		<i>A. suum</i> - Antigen
	IgG 1 : 10.000	IgG (T) 1 : 20.000	IgG 1 : 10.000
Kleine Strongyliden positiv	0,661	2,397	1,221
Kleine Strongyliden negativ	0,4986	0,68	1,05
<i>S. edentatus</i>	1,308	1,266	1,819
<i>S. westeri</i>	0,166	0,200	0,294
<i>Parascaris</i> spp.	0,402	0,541	0,532
<i>S. vulgaris</i>	2,859	3,624	3,706

4.2.5.5 *Ascaris suum*-Hämoglobin-Antigen

Bei den mit *A. suum*-Hämoglobin Antigen (AsHb) beschichteten und geblockten Platten aus Gent wurde eine Arbeitskonzentration von 1 µg/ml für ELISA-Untersuchungen angegeben.

Nachdem sich im Titrationsversuch der Sekundärantikörper das IgG (T) als ungeeignet herausstellte, wurden die Seren von monoinfizierten Pferden mit den im Western Blot genutzten IgG (H+L) und IgM untersucht. In der Auswertung stellte sich IgM ebenso als ungeeignet heraus, da alle OD-Werte der einzelnen infizierten Tiere bis auf das des *Strongyliodes westeri*-infizierten Pferdes über dem Wert des *Parascaris* spp.-infizierten Tieres lagen. In der Detektion mit IgG (H+L) lag ebenso ausschließlich das *S. westeri*-infizierte Pferd unter dem OD-Wert des *Parascaris* spp.-infizierten Tieres (Tabelle 11).

4.2.5.6 Präkolostrale Blutproben der Fohlen

Die serologische Untersuchung der vor der ersten Kolostrumaufnahme der Fohlen gewonnenen Fohlenblutproben mit dem ES-Antigen der *Parascaris* spp.-Larven ergab OD-Werte zwischen 0,059 und 0,081 (Tabelle 12) mit dem Sekundärantikörper IgG (H+L) sowie Werte zwischen 0,182 und 0,237 für die Untersuchungen mit IgM. Nach der Kolostrumaufnahme in den ersten Stunden nach der Geburt stiegen die OD-Werte in ca. 48 h um das sechs- bis 23-fache bei den ELISA-Untersuchungen mit dem Sekundärantikörper IgG (H+L) und um das drei- bis neunfache bei Untersuchungen mit IgM an. Im t-Test ergaben die Anstiege der OD-Werte von prä- und postkolostralen Fohlenseren eine Signifikanz ($p = 0,019$). Zum Zeitpunkt der präkolostralen Blutentnahme wurde von Fohlen 226 auch die Stute getestet. Das Serum der Mutterstute zeigte zu diesem Zeitpunkt einen OD-Wert von 1,677, was 26-fach höher war als der Ausgangswert des Fohlensersums zum Zeitpunkt der Geburt. Die Anstiege der OD-Werte im Serum der Fohlen nach Kolostrumaufnahme waren sehr variabel. Ein Anstieg um das 23-fache nach Kolostrumaufnahme war jedoch vergleichbar mit dem ELISA-Ergebnis des Serums der Stute zum Zeitpunkt der Geburt, was einen passiven Immunitätstransfer belegte.

Tabelle 12: OD-Werte der präkolostralen Serumproben bei Fohlen 226, 260, 290 und 350 sowie prä- und postkolostrale Serumproben der Fohlen 7, 332, 333, 334 und 335 im ELISA mit IgG (1 : 10.000). Rechts die Standardabweichungen der OD-Werte der prä- bzw. postkolostralen Fohlenseren.

Fohlen	226	305	260	290	332	7	333	334	335	StAbw
präkol.	0,064	0,061	0,06	0,065	0,06	0,059	0,062	0,059	0,081	0,006
postkol.	-	-	-	-	0,506	0,718	1,417	0,342	0,888	0,371
Anstieg					8 ×	12 ×	23 ×	6 ×	11 ×	

4.3. Schlussfolgerungen

Die Auswertung der epidemiologischen und klinischen Daten ergab eine mittlere Prävalenz des Pferdespulwurmes von 87,3 % koproskopisch positiver Fohlen im Probenentnahmezeitraum. Der Anteil der Spulwurm-positiven Tiere war mit 86,2 % im Jahr 2011 und 88,7 % im Jahr 2012 sehr ähnlich. Die ersten beiden koproskopisch positiven

Fohlen waren in der neunten Lebenswoche. Bis zum 110. Lebenstag erwies sich knapp ein Fünftel der Tiere, die zum Abschluss der Untersuchung als koproskopisch positiv detektiert wurden, als Eiausscheider. Anschließend kam es zu einem starken Anstieg und am 190. Lebenstag waren alle, in der Projektzeit erfassten koproskopisch positiven Fohlen, aufgefunden. Aufgrund der in der Literatur beschriebenen Präpatenz von 72 bis 110 Tagen wurde eine Infektion in den ersten Lebenstagen vermutet. In der statistischen Untersuchung war eine Infektion der im März oder April geborenen Fohlen 40 % wahrscheinlicher als bei den im Mai und Juni geborenen Fohlen. Dieser Sachverhalt ergab sich vermutlich aus dem Probenentnahmezeitraum von April bis September beider Projektjahre. Im November 2012 wurden zusätzliche Proben der bis September koproskopisch negativen verbliebenen Fohlen genommen. Der Prozentsatz der koproskopisch positiven Fohlen korrigierte sich anschließend auf 95,6 %. Es wurde somit eine *Parascaris* spp.-Infektion jedes Fohlens in diesem großem Warmblutgestüt vermutet. Die EpG-Werte zeigten im Jahr 2011 ein Maximum von 10.008 EpG, bei einem wöchentlichen Mittelwert von 171 EpG. Hingegen wiesen die EpG-Werte im Jahr 2012 ein Maximum von 7.200 EpG, bei einem wöchentlichen Mittelwert von 446 EpG auf. Bei einer gleichmäßigen Verteilung der Geschlechter in dieser Studie konnte keine Disposition für ein Geschlecht nachgewiesen werden. Es wurde jedoch ein statistisch positiver Einfluss der Weidezeit und gleichzeitigen MDS-Infektion auf eine *Parascaris* spp.-Eiausscheidung belegt, die unabhängig voneinander waren. Die Wahrscheinlichkeit Pferdespulwurmeier auszuscheiden stieg demnach um 10 % pro Weidewoche. Bei einer MDS-Infektion stieg die Wahrscheinlichkeit einer zusätzlichen *Parascaris* spp.-Eiausscheidung um das Doppelte an.

Ein direkter Zusammenhang einer Lungenerkrankung mit einer *Parascaris* spp.-Infektion konnte nicht belegt werden. Es wurde dennoch ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer klinischen Verschlechterung des Nasenausflussbefundes der Probanden und einem elf Wochen daraufhin folgenden, erstmalig koproskopisch positiven Befund nachgewiesen. Zusätzlich wurde eine Verschlechterung des klinischen Scores dieser Fohlen, als Zeichen einer klinisch relevanten respiratorischen Erkrankung in dieser Zeit, nachgewiesen.

Für die labordiagnostischen Untersuchungen wurden 13,2 Millionen *Parascaris* spp.-Eier isoliert und in H₂SO₄ für drei Wochen embryoniert. Nach dem Ultraschall induzierten Larvenschlupf und deren Auswanderung wurden ca. fünf bis sechs Millionen *Parascaris* spp.-Larven in insgesamt 70 Kulturen kultiviert. Aus den Kulturmedien wurde larvales ES-Protein

extrahiert. Insgesamt wurden ca. 10 mg larvales Protein isoliert. Die Dauer der Kultivierung im MEM-Medium variierte zwischen 5 und 56 Tagen und lag im Mittel bei 30 Tagen.

In dem ES-Medium aus *Parascaris* spp.-Larven waren im SDS-PAGE Proteinbanden bei 12 kDa, 13 kDa, 21 kDa und 100 kDa sichtbar. Die Bandenmuster der Seren jeweils fünf koproskopisch positiver und negativer Fohlen im Western Blot waren vielversprechend, um eine Unterscheidung dieser beiden Gruppen vorzunehmen. Die koproskopisch positiven Fohlen zeigten Banden bei 21 kDa, 25 kDa, 57 kDa und 70 kDa. Hingegen reagierte im Serum der koproskopisch negativen Fohlen jedes Fohlen bei der 57 kDa Bande, aber zwei Fohlen bei der 25 kDa bzw. 70 kDa Bande und ein Fohlen bei der 21 kDa Bande. Die Verwendung des ES-Antigens der adulten *Parascaris* spp.-Würmer ergab keine Bandenmuster die eine Unterscheidung ermöglichten.

In den folgenden serologischen Untersuchungen wurden unter Verwendung von IgG (H+L) OD-Werte zwischen 0,450 und 1,289 bei den koproskopisch positiven Fohlen und OD-Werte zwischen 0,462 und 1,129 bei den koproskopisch negativen Tieren erfasst. Anhand der Untersuchungen mit experimentell monoinfizierten Pferdeseren und *A. suum*-Antigen beschichteten Platten wurden Kreuzreaktionen speziesübergreifend und zwischen verschiedenen Pferdehelminthen nachgewiesen.

In weiteren serologischen Untersuchungen mit präkolostralen Pferdeseren wurde das Fehlen der Antikörperklassen G und M vor der ersten Kolostrumaufnahme belegt. Die Antikörpertiter stiegen in den ersten 48 Stunden auf das 23-fache (IgG) und das 9-fache (IgM) an. Der Einfluss dieser maternalen Antikörper war bei der Interpretation zu beachten.

5 Diskussion

In einer wöchentlichen Probensammlung bei insgesamt 347 Fohlen in den ersten Lebensmonaten wurden 7.505 Serumproben gewonnen und 5.375 Kotproben mittels FLOTAC-Verfahren untersucht. Eine unerwartet hohe Prävalenz des Pferdespulwurmes sowie der Nachweis einer respiratorischen Klinik bei infizierten Fohlen in dem beprobten Pferdebestand unterstrich die Notwendigkeit eines frühzeitigen Nachweises der *Parascaris* spp.-Infektion. Die erfolgreiche *in vitro*-Kultivierung von *Parascaris* spp.-Larven zur Gewinnung von ES-Antigen der Larven ermöglichte vielversprechende serologische Untersuchungen.

Eine Studie mit einer entsprechend hohen Fohlenanzahl, frequente Serum- und Kotprobenuntersuchung sowie vielseitige Erfassung klinischer Daten wurde bisher nicht durchgeführt, so dass die Ergebnisse das Wissen zum Infektionsverlauf dieses Parasiten erweitern.

5.1 Koproscopische Auswertung

Eine wöchentliche Entnahme und Untersuchung der Kotproben von Fohlen in den Monaten April bis September zwei aufeinanderfolgender Jahre sollte einen Überblick über die Epidemiologie des Pferdespulwurmes in einem großen Warmblutgestüt und weitere Informationen zu dem Infektionsverlauf der Spulwurminfektion geben.

5.1.1 Prävalenz

Die Prävalenzen bei Untersuchungen von Pferden verschiedenen Alters variieren in verschiedenen Ländern von 5 % bis 64 %. Bei der ausschließlichen Betrachtung von Fohlen waren bis zu 30,5 % der untersuchten Fohlen koproskopisch positiv und mit zwölf der 14 untersuchten Gestüte 86 % von der Infektion betroffen (siehe Kapitel 2.1.1). Diese veröffentlichten Prävalenzen liegen deutlich unter den in der vorliegenden Untersuchung ermittelten 87,3 %, doch könnte dies z.B. am Land, an einer weniger frequentierten Probenentnahme, der Untersuchung in ständig wechselnden und kleineren Beständen liegen. Lediglich Russell (1948) fand bei 100 % der 26 untersuchten Fohlen Spulwurmeier im Kot. Dies kommt dem Ergebnis aus der vorliegenden Studie in einem großen Warmblutgestüt in Deutschland nahe. Im ersten Jahr wurden bei 86,2 % und im zweiten Jahr bei 88,7 % der

untersuchten Fohlen koproskopisch diese Parasiteninfektion nachgewiesen. Insgesamt waren somit 87,3 % der 347 Fohlen nachweislich infiziert, die über einen Zeitraum von April bis einschließlich September untersucht wurden.

Obwohl nicht wöchentlich bei jedem Fohlen eine Probe gewonnen werden konnte, so konnten im Mittelwert 85,6 % im Jahr 2011 und 82,7 % im Jahr 2012 der Probanden wöchentlich untersucht werden. Diese einerseits hochfrequente sowie regelmäßige Entnahme sollte einen möglichst genauen Überblick über eine Infektion und deren Verlauf geben.

In nachträglichen Proben im Herbst konnten von 14 der 18 koproskopisch negativen Fohlen des Projektjahres 2012 erneut Kotproben gewonnen und untersucht werden. Elf dieser Pferdekotproben enthielten *Parascaris* spp.-Eier. Im Jahr 2012 stieg die Zahl der koproskopisch positiven Fohlen somit von 141 auf 152 der untersuchten 159 Fohlen an, entsprechend einer Prozentzahl von 95,6 %. Schlussfolgernd wurde der Erregerkontakt und die Infektion jedes Fohlens aus dem Gestüt vermutet. In der nachträglichen Untersuchung im Herbst konnte von vier Fohlen keine Probe gewonnen werden und die drei negativ getesteten Fohlen könnten sich in der Präpatenz befunden haben bzw. durch die intermittierenden Eiausscheidung des Erregers könnte dies ein falsch negativer Befund gewesen sein (Uhlinger 1993).

5.1.2 Einfluss von Alter/Geschlecht und Jahreszeit auf die Infektion

Die Entwicklung einer Immunität ab dem 6. Lebensmonat (Clayton 1986) lässt diesen Parasiten vor allem eine Fohlen- und Jährlingsinfektion sein.

Während vereinzelt wenige Stunden postpartum gewonnene Blutproben verwendet werden konnten, waren die Fohlen zum Zeitpunkt der Kotprobengewinnung mindestens drei Wochen alt. Das Alter der Fohlen zur Probenentnahme lag somit zwischen 21 bis 196 Lebenstagen. In einer Studie aus den USA waren die Fohlen mit 10 bis 223 Tagen in einem ähnlichen Alter wie in der vorliegenden Studie, doch wurde eine deutlich niedrigere Prävalenz von 22,4 % festgestellt. Dabei ist zu beachten, dass dort in einem Zeitraum von Februar bis Juli monatlich Proben untersucht wurden, aber nicht immer von denselben Fohlen (Lyons et al. 2004). Unter Beachtung der Präpatenz des Parasiten (Clayton 1986) und der Jahreszeit (Lyons et al. 1994) waren einige Fohlen vermutlich in der Präpatenz, so dass falsch negative Ergebnisse möglich waren.

Lyons et al. (2001) fanden die größte Larvenanzahl in der Lunge in drei Monate alten, natürlich infizierten Fohlen. Der Altersunterschied der Fohlen und der damit ergebende

längere Entwicklungszeitraum des Parasiten im Wirt verursacht vermutlich einen größeren Prozentsatz infizierter Fohlen im März und April. Dies könnte den statistisch signifikanten Unterschied in der Infektionswahrscheinlichkeit der im März oder April geborenen Fohlen gegenüber den im Mai oder Juni geborenen Fohlen erklären. Doch sollte diese höhere Wahrscheinlichkeit unter Beachtung der ungleichen Gruppenverteilung und der Präpatenz bewertet werden. So waren Anfang Juni geborene Fohlen zum Ende der Projektzeit Ende September gerade einmal 16 Wochen alt, was nach Clayton (1986) die obere Grenze der experimentell ermittelten Präpatenz war. Die Ergebnisse der Proben aus dem Herbst, in denen 11 von 14 zuvor koproskopisch negativ getesteten Fohlen als koproskopisch positiv identifiziert wurden, stützen diese Vermutung. Andererseits wurde eine durchschnittlich kürzere Präpatenz bei den Mai- bzw. Juni-Fohlen als statistisch signifikant belegt. Ursächlich könnte ein erhöhter Infektionsdruck in der Umgebung durch eine starke Eiausscheidung bereits patent infizierter Fohlen gewesen sein. Aus Schweden wurde berichtet, dass früher geborene Fohlen eine höhere Eiausscheidung aufwiesen (Lindgren et al. 2008), was die ermittelten Ergebnisse dieser Studie ebenfalls untermauert.

Einen höheren Parasitenbefall eines Geschlechtes konnte in dieser Studie bei ausgeglichener Geschlechterverteilung nicht festgestellt werden, was sich mit früheren Untersuchungen deckt (Lyons et al. 2004; Tavassoli et al. 2010).

5.1.3 Abhängigkeit der Pferdespulwurminfektion von Weide und Entwurmung

Bereits Mitte des 20. Jahrhunderts beschrieb Russell (1948) die Unabhängigkeit einer Infektion der Fohlen mit *Parascaris* spp. vom Management im Gegensatz zu z.B. einer Infektion mit MDS. Die Kombination aus hoher Widerstandsfähigkeit, Langlebigkeit und großer Fruchtbarkeit der weiblichen Würmer lassen diesen Parasiten zu einem schwer zu eliminierenden Erreger werden (Clayton 1986; Southwood et al. 1998). Durch die lange Präpatenz, in der es bereits zu ersten Schäden durch die Körperwanderung der Larven kommt, ist bislang nur ein sehr später Nachweis des Parasitenbefalles möglich. Dieser Sachverhalt lässt die Vermeidung der Umweltkontamination mit den infektiösen Eiern zum entscheidenden Ziel der Bekämpfung des Spulwurmes beim Pferd werden. So wird dem Management doch eine erhebliche Beachtung zuteil.

Statistisch wurde ein Einfluss des Weideaufenthaltes auf eine Infektion mit dem Parasiten nachgewiesen. Von den Fohlen, die in dem beobachteten Zeitraum von ca. sechs Monaten

mehr als vier Wochen auf der Weide waren, waren über 90 % nachweislich mit dem Parasiten infiziert. Dies bestätigte die Vermutung von Getachew et al. (2008), dass die Umgebung und insbesondere der Weideaufenthalt ein erhöhtes Risiko für eine Infektion bedeutet. Aus diesem Grund sollte eine Düngung der Weide mit Pferdemit unterlassen werden, da aufgrund der Widerstandsfähigkeit und Langlebigkeit der Eier eine zusätzliche Infektionsquelle geschaffen würde (Pecson et al. 2007).

Weiterhin wurde ein statistisch signifikanter Unterschied in der Inzidenz zwischen ausschließlich im Stall gehaltenen Pferden und Pferden mit Paddockauslauf von Mfutilodze et al. (1989) nachgewiesen. Es ist verständlich, dass ein Hygienemanagement im Stall leichter durchführbar ist als auf dem Paddock oder der Weide. Eine regelmäßige Desinfektion der Pferdeboxen mit wirksamen Desinfektionsmitteln senkt nachweislich die Prävalenz (Fritzen et al. 2010). Als mögliche Maßnahme in der Gestaltung von Paddocks könnte Sand als Boden oder Zusatz gewählt werden, da Ihler (1995) eine Drainagefunktion in Verbindung mit Regenwasser nachwies. So wurden weniger Eier in den oberen Schichten gefunden und die Möglichkeit einer oralen Aufnahme infektiöser Stadien gesenkt.

Die statistische Berechnung der Abhängigkeit der Infektion und Eiausscheidung von der Entwurmung ergab einen Einfluss der Entwurmungshäufigkeit auf die mittlere Eiausscheidung, jedoch nicht auf eine Infektion per se. Eine frühzeitige serologische Erkennung und der Einsatz von ML mit einer parenteralen Wirkung (DiPietro et al. 1987) würde die Ausscheidung neuer infektiöser Stadien verhindern. Im Jahresvergleich könnte die höhere Entwurmungsfrequenz im Jahr 2011 eine geringere Eiausscheidung in diesem Jahr verursacht haben. Die Varianz in den Entwurmungen zwischen ein und sechs Behandlungen im Projektzeitraum von 24 bzw. 25 Wochen war Management verursacht. Die Fohlen befanden sich ab dem Zeitpunkt des Verlassens des Abfohlstalles in Gruppen, die regelmäßig entwurmt wurden. Aufgrund einer Erkrankung von Stute oder Fohlen sowie abhängig vom Reproduktionsstatus der Stute wurden stetig neue Gruppen gebildet. Die Entwurmungsschemata gerieten damit durcheinander und verursachten die Differenz der Entwurmungsfrequenz der Fohlen in den ersten Lebensmonaten. Die Entwurmungsfrequenz in dem betreuten Bestand war insgesamt hoch. Mehr als die Hälfte der Fohlen wurden zwei bis drei Mal in den sechs Monaten entwurmt, was einem Intervall von ca. zwei Monaten entsprach. Dieser Abstand wurde von Reinemeyer et al. (2009) und Deplazes et al. (2012) ebenso empfohlen, wie eine beginnende Entwurmung frühestens ab dem 60. bis 70. Lebenstag.

Wie im Kapitel 2.7 beschrieben, wurden im Einsatz von ML bei *Parascaris* spp.-Infektionen aus den Niederlanden (Boersema et al. 2002), Kanada (Hearn et al. 2003; Slocombe et al. 2007), England (Stoneham et al. 2006), Deutschland (Samson-Himmelstjerna et al. 2007), Dänemark (Schougaard et al. 2007), den USA (Craig et al. 2007; Lyons et al. 2008), Schweden (Lindgren et al. 2008), Italien (Veronesi et al. 2009) und Finnland (Nareaho et al. 2011) Resistenzerscheinungen beobachtet. Ein unüberlegter Einsatz dieser Anthelminthikagruppe, die durch eine parenterale Wirkung ausgezeichnet ist, würde diese Entwicklung weiter vorantreiben. Eine wirkungsvolle Therapie der Spulwurminfektion wäre somit gefährdet. Ein positiver koproskopischer Befund ist grundsätzlich aufgrund der fehlenden Korrelation zwischen Eiausscheidung und Parasitenanzahl eine Indikation zur Behandlung (Clayton et al. 1979; Uhlinger 1993; Altuvia et al. 1997).

Der MDS-Befall der Fohlen war mit einer mittleren Prävalenz von 46,9 % nicht so hoch wie die Spulwurm-Prävalenz, doch handelt es sich dabei auch nicht um eine typische Jungtiererkrankung. Dieser zusätzliche Befall ist statistisch signifikant abhängig von einem Spulwurmbefall der untersuchten Fohlen. Dies wird vor allem mit dem Weidegang in Zusammenhang gebracht, bei dem es zur Aufnahme von infektiösen Stadien beider Parasiten und zur Infektion kommt. Die Strongyliden benötigen die externe Entwicklungsphase und sind vorwiegend eine Weideinfektion. Der Spulwurm wiederum ist auf der Weide aufgrund der hohen Widerstandsfähigkeit der Eier außerhalb der Stallungen besonders schwer zu bekämpfen. Diese Gegebenheiten lassen der Weide als Parameter eine entscheidende Rolle zu kommen. Ein Einfluss dieses Parameters „Weide“ auf die Spulwurminfektion konnte in der Regressionsanalyse bestätigt werden. So waren Fohlen mit langer Weidezeit statistisch signifikant häufiger infiziert.

5.1.4 Präpatenz der untersuchten Fohlen

Die beschriebene Präpatenz von 72 bis 110 Tagen (Clayton 1986) wurde von drei Fohlen unterschritten. Das jüngste Fohlen (Fohlnummer 105) war zum Zeitpunkt der ersten Ausscheidung von Spulwurmeiern 60 Tage alt. Von einer früheren Eiausscheidung als in der Literatur angebenen, berichteten auch Kornas et al. (2010) und Lyons et al. (2004). Doch wurde darauf hingewiesen, dass es sich dabei vermutlich um Koprophagie handelte. Auch in der vorliegenden Studie wurden erste Spulwurmeier bei vier Wochen alten Fohlen nachgewiesen, welche in den Folgewochen jedoch wieder koproskopisch negativ waren. Dies wurde als Koprophagie interpretiert. Eine Eiausscheidung in den Folgewochen bei dem

60 Tage alten Fohlen lies die Vermutung einer patenten Infektion ab diesem Alter zu. Wenige Tage später begannen auch andere Fohlen mit einer kontinuierlichen Ausscheidung von Spulwurmeiern. Russell (1948) erfasste ebenso zwei Fohlen, die in der neunten Lebenswoche begannen, *Parascaris* spp.-Eier mit dem Kot auszuschleiden, obwohl der Großteil erst ab der 13. Woche mit der Ausscheidung von Eiern begann. Sie vermutete eine pränatale Infektion, wie sie bei Spulwurmarten vom Hund und Kalb zu dieser Zeit beobachtet wurden. Eine transplazentare oder laktogene Infektion der Fohlen mit *Parascaris* spp. findet jedoch laut Anderson (2000) nicht statt.

Nach den Infektionsversuchen von Clayton et al. (1977) wäre eine Ursache für eine kurze Präpatenz in der Infektionsdosis und der Frequenz zu sehen. Die einmalige orale Eingabe niedriger Parasiteneizahlen führte zu der frühesten Ausscheidung von Parasiteneiern. Bei der Nekropsie der betroffenen Tiere wurde bei einer geringen Infektionsdosis eine kleine Anzahl größerer Würmer und bei einer höheren Infektionsdosis eine größere Anzahl kleinerer Würmer im Darm gefunden. Es schien eine Art „Overcrowding-Effekt“ zu geben, der zu einer gegenseitigen Wachstumshemmung bei einer zu großen Anzahl von Individuen führt, was die Anzahl und unterschiedliche Größe der verschiedenen Würmer erklärt. In der Folgestudie von Clayton et al. (1979) wurden im Darm im Laufe der Entwicklung sinkende Wurmzahlen bei steigender Länge nachgewiesen, da es zu ersten Wurmabgängen ab 45 Tagen nach der Infektion kam.

Bei einer Infektion mit einer geringen Eizahl war eine kürzere Präpatenz nachweisbar, doch im Vergleich zur hohen Dosis mit nur wenigen Tagen Unterschied und die Präpatenz lag jeweils in der beschriebenen Zeit (Clayton et al. 1978).

Früher im Jahr geborene Fohlen infizieren sich in der Regel mit einer geringeren Dosis infektiöser Eier aus der Umwelt und beginnen demnach schneller Geschlechtsprodukte auszuschleiden. Dies war in der vorliegenden Studie nur bedingt der Fall, da zwar das Fohlen mit der frühesten Ausscheidung im April geboren wurde, doch die beiden folgenden Fohlen, die unter der beschriebenen Zeit blieben, im Mai geboren wurden. Insgesamt war jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied der Mai- und Junifohlen gegenüber März- und Aprilfohlen hinsichtlich der *Parascaris* spp.-Präpatenz nachweisbar. Eine Aufnahme von infektiösen Eiern in den ersten Lebensstunden oder -tagen wurde für alle Fohlen angenommen. Die Abfohlsaison in diesem Gestüt ging von Januar bis August, wodurch die Altersspanne der Fohlen aus einem Jahr weit war. In der Studie wurden Fohlen aus dem Geburtsmonaten März bis Juni untersucht. Eine kürzere Präpatenzdauer der Mai-/Junifohlen könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die ersten geborenen Fohlen aus dem

Monat Januar vermutlich schon im April bzw. Mai anfangen, Geschlechtsprodukte der adulten Würmer mit dem Kot abzugeben. Diese Eier embryonieren bei den wärmeren Temperaturen im Frühjahr in zehn bis 14 Tagen (Clayton 1986), so dass nach dieser Zeit eine erhöhte Anzahl infektiöser Stadien in der Umwelt zu finden sein könnte. Später im Jahr geborene Fohlen hatten demnach ein höheres Risiko sich schneller zu infizieren. Einerseits steigt die Anzahl der infektiösen Eier und somit die Wahrscheinlichkeit einer Aufnahme von infektiösen Eiern stark an. Andererseits könnten die Hygienemaßnahmen für früher abfohlende Stuten besser gewesen sein. Nach der Geburt kamen Stute und Fohlen in eine frisch desinfizierte Box. Doch könnte die Zeit vor der Umstallung in einer neuen sauberen Box womöglich ausreichend gewesen sein, dass sich das frisch geborene Fohlen mit den infektiösen Stadien in der Umgebung infizierte. Die Fohlen begannen, sobald sie stehen können, die Zitzen der Mutter zu suchen und leckten dabei auch an den Boxenwänden.

Insgesamt begannen 19,1 % der Fohlen mit einer Ausscheidung der Eier bis zum 110. Lebenstag und der Großteil der untersuchten Fohlen erst danach. So war ab dem 120. Lebenstag ein starker Anstieg der ersten koproskopisch positiven Befunde bis zum 150. Tag sichtbar und am 190. Lebenstag waren alle koproskopisch positiv ermittelten Fohlen aus der Projektzeit erfasst. Das ermittelte Durchschnittsalter beim Zeitpunkt der ersten Spulwurmeiausscheidung betrug 125,4 Tagen \pm 7 Tagen. Die Abweichung von sieben Tagen kam durch den Sachverhalt zustande, dass maximal eine fehlende Kotprobe in der Woche vor dem ersten positiven Kotbefund toleriert wurde. Dieses Kriterium erfüllten 288 der 303 koproskopisch positiven Fohlen. Die Differenz beinhaltet die Fohlen, von denen mindestens zwei Wochen vor der ersten positiven Kotprobe keine Probe gewonnen werden konnte. Vergleichbare Ergebnisse wurden in einer Studie von Lyons et al. (2004) gefunden, die einen starken Anstieg nach dem 110. Lebenstag und ein Durchschnittsalter der untersuchten Fohlen von 130 Tagen aufzeigten.

5.1.5 Koproskopischer Infektionsverlauf

Die ersten Spulwurm-Eier (2 EpG) wurden bei einem Fohlen in der vierten Lebenswoche nachgewiesen. Es handelte sich vermutlich nur um eine Darmpassage nach oraler Aufnahme von *Parascaris* spp.-Eiern (Koprophagie). Zu diesem Zeitpunkt könnte es zur Infektion des Fohlens gekommen sein, da dieses Fohlen 18 Wochen später begann, Spulwurm-Eier mit dem Kot auszuscheiden. Die ersten koproskopisch positiven Fohlen waren in der neunten bzw.

zehnten Lebenswoche. Ein starker Anstieg der koproskopisch positiven Fohlen war ab der 15. Lebenswoche nachweisbar.

Das Maximum der *Parascaris* spp.-EpG-Mittelwerte wurde in der 20. Lebenswoche und der größte Anteil positiver Kotbefunde wurde in der Woche darauf erfasst. Es folgte ein starker Abfall beider Parameter in den Folgewochen. Der Infektionsverlauf der Fohlen stellte sich in der Studie von Russell (1948) in ähnlicher Weise dar. Erste Fohlen wurden in der neunten Lebenswoche und der Großteil in der 12. und 13. Lebenswoche koproskopisch positiv.

Der Abfall der Anzahl koproskopisch *Parascaris* spp.-positiver Fohlen der untersuchten Proben nach der 21. Lebenswoche in dieser Studie könnte einerseits darin begründet sein, dass aufgrund der intermittierenden Aufnahme der Fohlen in die Studie, die ältesten Fohlen schon von der Stute abgesetzt waren und nicht weiter untersucht werden konnten. Andererseits kann dieser Verlauf auch durch eine sich entwickelnde aktive Immunabwehr der Fohlen bedingt sein.

Laugier et al. (2012) beschrieben bei Untersuchungen zu *Parascaris* spp. von drei bis neun Monate alten Fohlen einen ähnlichen Mittelwert wie in der vorliegenden Studie. Trotz der erhöhten Eiausscheidung im Jahre 2012 war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Anteil der koproskopisch positiven Fohlen beider Projektjahre nachweisbar. Der höchste *Parascaris* spp.-EpG-Wert wurde in dem Jahr mit dem geringeren Mittelwert (2011) bei einem im April geborenen männlichen Fohlen nachgewiesen. Gawor (1995) und Lyons et al. (2006) beschrieben EpG-Zahlen von mehreren hundert Eiern pro Gramm Kot. Bei Kornas et al. (2010) wurde ein Maximum von 6.200 EpG und bei Clayton et al. (1979) sogar ein Maximum von 17.500 EpG vier Monate nach einer *Parascaris* spp.-Infektion angegeben. Der Höchstwert dieser Studie war zwischen den bislang veröffentlichten Höchstwerten zu finden. Das Fohlen mit dieser höchsten EpG-Ausscheidung war zu der Zeit im ca. fünften Lebensmonat und somit etwas über der beschriebenen Altersgruppe von drei bis vier Monaten mit der höchsten Prävalenz und Eiausscheidung (Laugier et al. 2012).

Durch die hohe Fruchtbarkeit der weiblichen Würmer sowie die Präsenz noch unreifer Würmer im Darm ist die Ausscheidung intermittierend und anhand der EpG-Werte aus dem Kot kann keine Aussage zum Wurmbefall gemacht werden (Southwood et al. 1998). Bei niedrigen Werten können zahlreiche Würmer im Darm gefunden werden (Uhlinger 1993).

Nach Southwood et al. (1998) und Cribb et al. (2006) kommt es erst im Herbst zur größten Akkumulation der adulten Würmer im Darm, was auch erhöhte EpG-Werte in dieser Phase erwarten ließe, vorausgesetzt diese große Akkumulation der Würmer im Darm beeinträchtigt nicht die Fertilität der Weibchen. Höchstwerte im Herbst würden demnach bedeuten, die

Fohlen wären im Mai bzw. Juni geboren worden und hätten entsprechend fünf Monate später die nachgewiesenen Akkumulationen im Darm.

Der Verlauf der *Parascaris* spp.-EpG-Werte bestätigte diese Erwartung nicht. Es kam zum Abfall der Werte nach der 23. Lebenswoche bzw. dem fünften Lebensmonat, vermutlich durch die Entwicklung der aktiven Immunität verursacht. Bei der Bewertung dieser Werte ist stets zu beachten, dass verschiedene Studien, wie oben genannt, auf eine fehlende Korrelation der ermittelten *Parascaris* spp.-EpG-Werte mit der im Darm enthaltenen Wurmbürde hinweisen. Bei Versuchen mit experimentell infizierten Tieren variierten die EpG-Werte somit stark von Tag zu Tag (Clayton et al. 1979). Ein Rückschluss von den wöchentlich ermittelten EpG-Werten auf die tatsächliche Zahl der Würmer im Darm ist somit nicht möglich. Es kann keine verlässliche Aussage über die Stärke des Wurmbefalles eines Fohlens und der vorangegangenen Larvenwanderung, in der es vermutlich zum Kontakt mit dem Immunsystem kam, gemacht werden. Dieser Sachverhalt erschwert die Auswertung koproskopischer und serologischer Untersuchungen. Letztlich ist, beim momentanen Stand der Wissenschaft, der qualitative Nachweis im Kot die einzige Möglichkeit *Parascaris* spp.-infizierte Fohlen zu identifizieren. Alternativ wäre nur eine Nekropsie, wie sie in vielen experimentellen Studien genutzt wurde, zum genauen Quantitätsnachweis des Parasitenbefalls möglich.

5.1.6 Klinische Parameter

Insgesamt wurden 347 Fohlen in beiden Jahren über mehrere Wochen untersucht. Im Jahr 2011 waren es 188 Fohlen, von denen 100 Fohlen männlich und 88 Fohlen weiblich waren. Im zweiten Jahr (2012) wurden insgesamt 159 Fohlen wöchentlich beprobt, von denen 79 männlich und 80 weiblich waren. Somit waren es jeweils 10% mehr männliche Fohlen. In der Auswertung beider Jahre zeigte sich, dass 151 männliche und 152 weibliche Fohlen koproskopisch positiv waren. Somit herrschte ein gleichmäßiges Verhältnis in der Geschlechterverteilung der infizierten Fohlen.

In diesem Kapitel sollen die klinischen Erscheinungen, die in einen Zusammenhang mit der Parasiteninfektion gebracht werden könnten, diskutiert werden.

Die Diagnose einer obstruktiven Kolik hätte einen deutlichen Zusammenhang zu einer Spulwurminfektion, wurde jedoch bei den beobachteten Fohlen in dem Zeitraum von April bis September beider Jahre nicht beobachtet. Im Jahr 2012 fiel ein Fohlen in dem Gestüt mit

Kolik auf, das intraoperativ hochgradigen Wurmbefall aufwies. Da dieses Fohlen nicht in der Probandengruppe war, konnte keine Aussage zu EpG-Werten getroffen werden.

In dieser Studie waren, neben den serologischen Aspekten, vor allem die respiratorischen Symptome von Interesse. In den wöchentlichen klinischen Untersuchungen wurde neben der Kontrolle von Nabel und Temperatur ein besonderes Augenmerk auf die respiratorische Klinik gelegt. So wurden die Lunge und Trachea auskultiert, die Mandibularlymphknoten und der Nasenausfluss bewertet, sowie als Zeichen einer möglichen Entzündungsreaktion die Leukozytenwerte aus einer Blutprobe überprüft. Eine Beurteilung hinsichtlich möglichen Hustens in den ersten drei bis vier Wochen nach einer erfolgten Infektion (Clayton et al. 1978; Srihakim et al. 1978) war aufgrund der großen Anzahl der Tiere und den verschiedenen Untersuchern nicht zuverlässig möglich.

Bei der Betrachtung der koproskopisch *Parascaris* spp.-positiven Fohlen und der Nabel- bzw. Lungentherapie sowie den Leukozytenmittelwerten wurde kein statistisch signifikanter Zusammenhang ermittelt. Dies war etwas verwunderlich, da 61,7 % der koproskopisch positiven Fohlen eine Leukozytose im Mittelwert der untersuchten Lebenswochen zeigten und mit 43,2 % der koproskopisch positiven Fohlen fast jedes zweite Tier eine Lungentherapie erhielt. Es folgte eine detaillierte Betrachtung der wöchentlich erfassten Parameter im zeitlichen Verlauf. Bei dieser statistischen Berechnung mit Hilfe der Regression unter Beachtung des Zeitraumparameters wurde ein Zusammenhang zwischen Nasenausfluss und Lungenultraschallbefund mit den Blutleukozytenwerten festgestellt. Zusätzlich wurde ein statistischer Zusammenhang zwischen Nasenausfluss und Lungenschallbefund belegt. Ein veränderter Charakter des Nasenausflusses könnte somit zum Nachweis von Lungenveränderungen behilflich sein. Eine röntgenologische Untersuchung jedes Fohlens, um mögliche interstitielle und parenchymatöse Reaktionen in der Lunge (Clayton et al. 1978) festzustellen, war nicht möglich. Es wurde jedoch eine Ultraschalluntersuchung der Lunge durchgeführt.

Clayton et al. (1978) sowie Srihakim et al. (1978) beschrieben, neben Husten drei bis vier Wochen nach der Spulwurminfektion, weißen bis gräulichen Nasenausfluss als weiteres Symptom einer respiratorischen Erkrankung bei jungen Fohlen. Zur Untersuchung eines Zusammenhanges des Auftretens von Nasenausfluss und der Wanderung von Spulwurmlarven durch die Lunge wurde ein Wilcoxon-Mann-Whitney-Test gerechnet. Hierbei wurde der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Nasenausfluss bei koproskopisch positiven Fohlen und dem Zeitpunkt des ersten koproskopisch positiven Befundes bzw. zehn Wochen zuvor untersucht. Bei einer experimentell ermittelten Präpatenz

des Parasiten von 10 bis 16 Wochen (Clayton 1986) und unter Berücksichtigung der Larvenwanderung in der Lunge, zwei bis vier Wochen (Clayton 1986) nach einer Spulwurminfektion, ergibt sich ein Zeitraum von circa zehn Wochen vor dem ersten positiven Kotbefunden, in dem eine Immunreaktion auf die Larvenwanderung in der Lunge erwartet werden könnte.

Es wurde kein Zusammenhang zwischen vermehrtem Nasenausfluss und einer vermuteten Larvenwanderung zehn Wochen vor dem ersten Kotbefund festgestellt. Die angrenzenden Zeiträume von neun, elf und zwölf Wochen vor dem ersten koproskopisch positiven Befund wurden ebenfalls untersucht. Bei diesem durchgeführten Wilcoxon-Mann-Whitney-Test konnte eine statistisch signifikante Abhängigkeit zwischen dem ersten positiven Kotbefund und dem Auftreten von Nasenausfluss elf Lebenswochen zuvor festgestellt werden. Dies lässt eine mögliche Indikatorfunktion des Nasenausflusses für eine Larvenwanderung durch die Lunge vermuten. Zusätzlich wurde ein statistisch signifikanter Effekt des Infektionszeitpunktes auf den Nasenausfluss in Abhängigkeit vom Lebensalter in der Woche des ersten koproskopisch positiven Befundes beobachtet. Ältere Fohlen zeigten seltener das Symptom Nasenausfluss zu Beginn der Eiausscheidung als junge Fohlen. Als Erklärung wäre eine bessere Immunsituation bei älteren Fohlen denkbar, so dass mehr Larven während der Körperwanderung eliminiert wurden und daher die Ausprägung der klinischen Folgen geringer war.

Zur Bewertung des Krankheitsgrades eines Pferdes wurde von Ohnesorge et al. (1998) ein Score veröffentlicht, der sich in der vorliegenden Studie aus der Bewertung der Auskultation von Lunge und Trachea, dem Charakter des Nasenausflusses und der Größe der Mandibularlymphknoten zusammensetzt. Dieser Score sollte die Einteilung in vier Gruppen und die Bewertung der Schwere der respiratorischen Erkrankung in gesund, gering-, mittel- und hochgradig erkrankte Tiere vereinfachen. In der statistischen Berechnung wurde ein positiver Zusammenhang zwischen klinischem Score und dem Leukozytenwert, dem Auftreten von Nasenausfluss, den Lungenschalldbefunden sowie der Durchführung einer Lungentherapie bestätigt. Hierbei ist der Zusammenhang zum Nasenausfluss verständlich, da dieser Parameter ein Teil vom Score darstellt. Hingegen unterstreicht die Verbindung mit erhöhten Leukozytenwerten, den Lungenschalldbefunden und der Lungentherapie den Aussagewert dieser Einteilung zur Schwere der respiratorischen Erkrankung.

Zur weiteren Auswertung wurde der klinische Score als Mittelwert im Vergleich zum Anteil der koproskopisch positiven Fohlen an den untersuchten Kotproben in einer Grafik in Abbildung 8 (Seite 88) dargestellt. Diese Kurve steigt bis zur fünften Lebenswoche deutlich

an und bleibt anschließend nahezu konstant bei einem Wert von 2, der eine geringgradige respiratorische Erkrankung anzeigt. Die Kurve der koproskopisch positiven Fohlen weist erst ab der 15. Lebenswoche einen starken Anstieg auf, so dass sich eine Differenz von ca. zehn Wochen ergibt, was der Präpatenz von *Parascaris* spp. entsprechen würde. Dies lässt vermuten, dass es einen Zusammenhang mit der Lungenwanderung der Larven und dem ermitteltem Score kurz nach einer erfolgten Infektion gibt. Differentialdiagnostisch sind unter anderem bakterielle Lungenerkrankungen wie z. B. mit *Rhodococcus equi* zu berücksichtigen. Diese Bakterieninfektion war auf dem Gestüt nachweisbar und ließe durch abzedierende Pneumonien ebenfalls einen erhöhten klinischen Score erwarten.

In der detaillierten Betrachtung der Score-Mittelwerte als Boxplots (Abbildung 7 auf Seite 86) wird der Anstieg in den ersten Wochen und das folgende konstante Niveau der Fohlen bei 2 gut sichtbar. Weiterhin wird in der 19. und 20. Woche eine breitere Streuung und damit verbunden das Auftreten von Fohlen, die einen Score von 5 haben, deutlich. In der Beurteilung bedeutet ein Score von 2 bis 3 eine geringgradige und Werte von 4 bis 5 eine mittelgradige respiratorische Erkrankung. Beachtet man nun, dass es sich dabei um Mittelwerte aller Fohlen in der jeweiligen Lebenswoche handelt, so ist dies ein deutlicher Hinweis auf respiratorische Erkrankungen in diesen Lebenswochen. Einen Zusammenhang zwischen Pferdespulwurminfektion mit entsprechender Larvenwanderung und der damit vermuteten Gewebeschädigung zu sehen, scheint auf der Hand zu liegen und ist doch schwer nachweisbar.

Es wurden definitiv respiratorische Erkrankungen in dieser Probandengruppe nachgewiesen, was anhand der Mittelwerte der Score-Werte deutlich wurde. Bei einem gleichzeitigen Spulwurmbefall der untersuchten Population von nachweislich 95,6 % im Jahr 2012 ist dieses Erkrankungsniveau fast aller Fohlen nicht verwunderlich. Ein deutlicher Beweis der Parasitenwanderung als Grund der Vorschädigung und folglich die Verursachung einer Prädisposition ist aufgrund der langen Präpatenz und den verschiedenen Sekundärerregern nicht möglich. Einzig die serologische Reaktion des Immunsystems zur Zeit der Larvenwanderung wäre ein wichtiger Hinweis auf eine nicht unerhebliche Gewebeschädigung durch größere Larvenmengen und eine Reaktion des Immunsystems. Bei Untersuchungen von Clayton et al. (1978) wurde eine Verdichtung des Lungengewebes im Röntgenbild bei älteren Fohlen durch eine Larvenwanderung assoziierte Immunreaktion interpretiert. Eine solche Reaktion nach der Infektion bei jüngeren Fohlen nachzuweisen, war Ziel der serologischen Untersuchung. Der Einfluss des Alters und dementsprechend der Entwicklung des

Immunsystems war hierbei zu klären. Die hohe Prävalenz in diesem Gestüt erschwerte die Interpretation dieser Ergebnisse.

5.2 In vitro-Kultivierung und ES-Antigen

Zur Gewinnung von ES-Antigen der *Parascaris*-Larven wurde ein Protokoll aus den bisherigen Beschreibungen zur Kultivierung verwandter Parasitenarten erstellt. Danach konnte ein Antigen aus den Ex- und Sekreten der geschlüpften Larven von *Parascaris* spp. gewonnen werden. Die Reaktion zwischen den Seren von infizierten Fohlen mit diesem Antigen wurde getestet, um eine möglichst spezifische Detektionsmöglichkeit zu ermitteln.

5.2.1 Embryonierung und Larvenschlupf

Ein differenziertes Aussehen der *Parascaris* spp.-Eier, verursacht durch eine unterschiedliche Verweildauer im Kot, konnte gut nachvollzogen werden. So wurden bräunliche Eier durch Auflagerungen von Kotbestandteilen auf die klebrige Oberfläche und helle, fast durchscheinende Eier, die wahrscheinlich frisch aus dem Uterus der Würmer abgegeben wurden (Rogers 1956), aus dem Kot der Fohlen isoliert.

Nach der Embryonierung in H_2SO_4 für ca. drei Wochen enthielten die Eier lebende Larven, wobei kein Unterschied in der Larvenentwicklung zwischen den unterschiedlich gefärbten Eiern gesehen wurde. Die Inkubationszeit in NaClO variierte in Abhängigkeit der Herkunft und dementsprechenden Auflagerungen der Spulwurmeier. Frisch aus dem Uterus kommende Eier hatten kaum störende Proteinauflagerungen im Gegensatz zu solchen, die bereits eine starke Braunfärbung durch aufgelagerte Kotbestandteile aufwiesen (Oksanen et al. 1990) und dementsprechend eine längere Inkubationszeit benötigten. Weiterhin wurde in der Bearbeitung der *Parascaris* spp.-Eier nach der Isolation aus den adulten weiblichen Wurmern ein hoher Anteil unreifer Eier vorgefunden. Bei der Verwendung der aus dem Uterus isolierten reifen und unreifen Eier behinderte ein erhöhter Anteil von Schalenmaterial die Larvenauswanderung. Zusätzliche Zentrifugationsschritte zur Trennung von sedimentierten reifen und schwebenden unreifen Eiern, wie bereits von Cleeland (1963) beschrieben, verbesserten die Reinheit erheblich.

Die Embryonierung wurde in Schwefelsäure durchgeführt, da bei einer Inkubation in Wasser die Reinheit der aus dem Pferdekot isolierten Eier schlechter war, obwohl dies nach Oksanen et al. (1990) vergleichbar wäre. Weiterhin wiesen Fairbairn (1961) und Oksanen et al. (1990)

eine deutlich höhere Schlupfrate und schnellere Embryonierung bei Inkubation in Schwefelsäure im Vergleich zur Inkubation in Formalin nach.

Da im Rahmen der *in vitro*-Kultivierung der Schlupf der Larven möglichst zeitgleich angestrebt wurde, war eine Vorbehandlung der Schale erforderlich.

Von Fairbairn (1961) und Hinck et al. (1976) wurde nachgewiesen, dass es eine Enzymaktivität in den ES-Antigenen der Larven gibt. Dabei soll es sich um Enzyme handeln, die von den Larven produziert werden um die Penetration der Schale und die Migration zu erleichtern. Zur Vorbereitung des Larvenschlupfes und der folgenden Kultivierung ist eine Synchronisation aller Larven notwendig. Zur Vorbereitung des Larvenschlupfes *in vitro* wurden die Schalen im Voraus mit NaClO behandelt, um die Schale zu erweichen und den Schlupf zu erleichtern.

Die verschiedenen Methoden, einen Larvenschlupf zu induzieren, haben sämtliche Vor- und Nachteile. Bei mechanischen Methoden mit Hilfe eines Magnetrührers oder der Deckglas-Methode wurde ein hoher Anteil beschädigter Larven erfasst. Diese Larven konnten nicht mehr kultiviert werden. Eine mechanische Methode wäre für die Gewinnung des somatischen Antigens zu empfehlen. Zur Vermeidung einer Verunreinigung mit Chemikalien oder Wirtskomponenten, sowie zur Bereitstellung größerer Larvenmengen wurde von Annen et al. (1975) ein Protokoll mit einer Ultraschallbehandlung beschrieben. Mit dieser Methode konnte der Großteil der Larven vital und synchron aus den Eiern gewonnen werden. Bei dieser Art des Larvenschlupfes kommt es nach der Auflösung der Proteinhülle mittels einer Mischung aus NaOH und NaClO zu einem „Anknacksen“ der Lipidhülle, wobei die Larve intakt bleibt und leichter selbstständig aus der Schale schlüpfen kann. Eine folgende Auswanderung der intakten Larven durch einen modifizierten Baermann-Apparat führte zur Separation von den Eibestandteilen, nicht geschlüpfen oder unreifen Eiern. Die vitalen Larven wanderten, von körperwarmen Medium umgeben, in Richtung der Schwerkraft aktiv durch ein Sieb und sanken zu Boden. Anschließend konnte das Sediment mit den lebenden und beweglichen Larven in einer *in vitro*-Kultur kultiviert werden.

5.2.2 *In vitro*-Kultivierung

In ersten Kultivierungsversuchen von *A. suum*-Larven von Levine et al. (1969) gelang eine Kultivierung ohne Zusätze über 21 Tage. Einige Jahre später wurde von Savigny (1975) zur Kultivierung von *T. canis*-Larven ein „Eagle's Minimal Essential Medium mit Hanks' Salzen“ beschrieben, das eine Kultivierung bis zu 18 Monaten ermöglichte. Unter

Verwendung dieses Mediums gelang die Kultivierung von *Parascaris* spp.-Larven in der vorliegenden Studie zwischen 5 und 56 Tagen und lag im Mittelwert bei 30 Tagen. Die Motilität der *Parascaris* spp.-Larven in den Kulturen nahm nach einer Woche deutlich ab. Möglicherweise waren die aus den Kultivierungsbeschreibungen der verwandten Spulwurmart abgeleiteten Bedingungen nicht optimal für die Kultivierung von *Parascaris* spp.-Larven. Im Nachhinein wäre eine regelmäßige Proteinbestimmung der abgenommenen Medien empfehlenswert gewesen, um Werte der abgegebenen ES-Proteine und der Vitalität der Larven erfassen zu können.

Die Pilzkontamination, besonders der ersten Kulturen, erschwerte die Gewinnung von ES-Material der *Parascaris* spp.-Larven. Diese Kontamination könnte als Ursache eine ungestörte Entwicklung der Pilzsporen aus dem Pferdekot aufgrund optimaler Kulturbedingungen für Pilze oder unsauberes Arbeiten bei der Aufarbeitung oder den Medienwechseln haben. Da bei Kulturen der Larven aus Eiern, die aus dem Uterus der Würmer isoliert wurden, eine deutlich längeren pilzfreie Kultivierung möglich war, als bei den aus dem Kot isolierten Eiern, wurden die im Kot enthaltenen Pilzsporen der Pflanzenfresser als wichtige Kontaminationsquelle interpretiert.

Eine Kultivierung bis zu 56 Tagen und Proteingewinnung von fast einem Gramm zeigen, dass die Larven des Pferdespulwurmes erfolgreich kultiviert werden konnten.

5.2.3 ES-Antigen der *Parascaris* spp.-Larven

Bei der Untersuchung von 10 µg des larvalen ES-Antigens im SDS-PAGE wurden Banden bei ca. 12 kDa, 13 kDa, 21 kDa und 100 kDa nach einer Färbung der Proteine mit Coomassie Blue sichtbar.

Im Vergleich dazu gaben Kennedy et al. (1987) im ES-Protein von infektiösen *A. suum*-Larven Banden bei 14 kDa und 60 kDa sowie im ES-Antigen von *A. lumbricoides*-Larven Banden bei 14 kDa, 17 kDa und 60 kDa an. Das ES der Lungenstadien dieser beiden Spulwurmart zeigte noch mehr Banden auf, so dass es stadienspezifische Bandenmuster zu geben scheint.

Im ES-Antigen der *T. canis*-Larven wurden Hauptbanden bei 32 kDa, 55 kDa, 70 kDa, 120 kDa und 400 kDa erfasst (Maizels et al. 1984). Iddawela et al. (2007) isolierten eine 57 kDa Fraktion und Magnaval et al. (1991) beschrieben wiederum andere Banden im ES-Protein nach der Kultivierung von *T. canis*. Unterschiedliche Banden in der

chromatographischen Auftrennung von ES-Proteinen gleicher Spezies können laut Urban et al. (1985) auch durch unterschiedliche Kultivierungsbedingungen verursacht sein.

Insgesamt ist eine Gemeinsamkeit im Bandenmuster dieser drei Unterfamilien auf den ersten Blick nicht zu erkennen. Iddawela et al. (2007) stellten fest, dass ein unterschiedliches Bandenmuster der Spezies auf eine differenzierte Ausprägung der ES-Proteine auf Gattungsebene hinwiesen.

In den Western Blot-Untersuchungen dieser Studie wurde vorrangig der Sekundärantikörper IgG genutzt. In Anbetracht der Tatsache, dass unter Verwendung von IgM als Sekundärantikörper im Western Blot keine Differenzierung zwischen dem koproskopisch positiven und negativen Tier möglich war (Abbildung 18 auf Seite 102), wurden auch keine weiteren Versuche durchgeführt. Frontera et al. (2004) gaben ebenfalls an, dass das Immunglobulin der Klasse M bei der Detektion einer Larvenwanderung des Spulwurmes im Schwein keinen Nachweis dieser Infektion ermöglichten.

In der Reaktion des larvalen ES-Antigens mit Seren von koproskopisch positiven und negativen Tieren im Western Blot (Abbildung 15 auf Seite 99) wurden Banden bei ca. 13 kDa, 21 kDa, 25 kDa, 57 kDa und 100 kDa bei dem positiven Tier sichtbar. Im Serum des koproskopisch negativen Tieres wurde eine starke Bande bei ca. 13 kDa sichtbar, die als unspezifische Reaktion gedeutet wurde.

In einem weiteren Western Blot, der die Reaktion der Seren von fünf koproskopisch positiven Fohlen (Abbildung 16 auf Seite 100) mit der von fünf koproskopisch negativen Fohlen (Abbildung 17 auf Seite 101) verglich, wurde ein einheitliches Bandenmuster bei den Seren der koproskopisch positiven Fohlen und unterschiedliche Reaktionen bei den Seren der koproskopisch negativen Tiere abgelesen. Es wurde bei den koproskopisch positiven Probanden jeweils eine Bande bei 21 kDa, 25 kDa und 57 kDa sichtbar und zusätzlich noch eine Bande bei 70 kDa erfasst. Die koproskopisch positiven Fohlen waren zu dieser Zeit 22 bis 24 Wochen alt, zeigten die höchste Eiausscheidung von *Parascaris* spp.-Eiern und es wurden keine MDS-Eier in dem Untersuchungszeitraum nachgewiesen. Im Kot der koproskopisch positiven Fohlen wurden EpG-Werte von mehreren Tausend Eiern erfasst, lediglich Fohlen 107 zeigte geringere EpG-Werte.

Ein gleiches Bandenmuster mit deutlich schwächeren Banden des Tieres 113, könnte mit einem geschwächten Immunsystem in Zusammenhang gebracht werden, welches den sehr hohen EpG-Wert von über 10.000 EpG erklären könnte. Dieses Fohlen hatte über mehrere Wochen eine Leukozytose mit einem Maximum von mehr als 25.000 Zellen pro Mikroliter und erhielt eine Lungentherapie. Es kann angenommen werden, dass dieses Fohlen an einer

respiratorischen Erkrankung mit einem erhöhten Aufkommen von Entzündungszellen sowie einer verminderten Abwehrkraft des Immunsystems litt. Genauere Schlussfolgerungen können jedoch erst nach den serologischen Untersuchungen im ELISA getroffen werden. Insgesamt waren alle Fohlen in der fünften bis achten Woche der Eiausscheidung und zeigten ähnliche Antigen-Antikörper-Reaktionen im Western Blot.

Die Seren der koproskopisch negativen Fohlen zeigten eine Bande bei 57 kDa. Bei Fohlen 28 und 173 war dies die einzige Bande. Die drei anderen Fohlen wiesen zusätzliche Banden bei 21 kDa, 25 kDa und 70 kDa auf. Ein Auftreten der 57 kDa Bande bei allen fünf koproskopisch negativen Tieren und der 25 kDa Bande bei zwei der fünf koproskopisch negativen Probanden führte dazu, dass diese Banden in den Hintergrund der Differenzierungsmöglichkeiten rückten. Eine Isolierung der 57 kDa Fraktion zur Verbesserung der Spezifität bei der Diagnostik der Toxocariasis (Iddawela et al. 2007) scheint im Falle des Pferdespulwurmes nicht diesen Effekt zu haben.

Die Größe der Proteinbestandteile ist das einfachste Merkmal, das im ES-Protein zur Charakterisierung bestimmt werden konnte und bei der Differenzierung zwischen koproskopisch positiven und negativen Tieren vergleichbar war, wenngleich aus der Größe nicht abgeleitet werden kann, dass zwei Proteine gleicher Größe auch die gleiche Antigenität besitzen.

Weiterhin ist zu bedenken, dass in der untersuchten Fohlenpopulation ein Befall von 87,3 % nachgewiesen wurde, der nach einer zusätzlichen Probenentnahme im Herbst auf 95,6 % korrigiert wurde. Eine Infektion fast jedes Fohlens konnte angenommen werden und aufgrund der Epidemiologie dieses Parasiten wurde ein Erregerkontakt jedes Fohlens in dem Bestand vermutet.

5.2.4 ES-Antigen der adulten *Parascaris* spp.-Würmer

Bei Verwendung des ES-Antigens adulter Pferdespulwürmer wurde im Western Blot mit Seren der fünf koproskopisch positiven und negativen Fohlen keine Übereinstimmung im Bandenmuster der koproskopisch positiven oder negativen Fohlen festgestellt.

Es ist anzunehmen, dass die Spulwurmlarven, die auch die Wanderung durch die Organe vollziehen, zu einer Antikörperreaktion des Wirtes führen (Kennedy et al. 1987). Eine fehlende Antikörperreaktion auf das ES-Antigen adulter Würmer wäre demnach nachvollziehbar. Dowdall et al. (2002) beschrieben eine bessere Unterscheidung der infizierten Tiere von den Kontrolltieren bei Nutzung des somatischen Antigens der Larven im

Vergleich zum somatischen Antigen der adulten Parasiten bei Versuchen mit kleinen Strongyliden, bei denen es die Besonderheit der hypobiotischen Larvenstadien in der Darmwand gibt.

Die Auftrennung des adulten Ganzwurmextraktes im SDS-PAGE (Abbildung 19 auf Seite 103) ergab viele unterschiedlich ausgeprägte Banden. Im Vergleich zu dem ES-Antigen ist das somatische Antigen, wie von Urban et al. (1985) für *A. suum* beschrieben, sehr viel komplexer. Für die folgende serologische Untersuchung zum Nachweis einer Spulwurminfektion lässt diese Komplexität in der Proteinzusammensetzung eine geringere Sensitivität und Spezifität erwarten. Vermutlich reagieren verschiedene Proteinanteile des Antigens mit Seren der Fohlen, so dass keine eindeutige Unterscheidung in Spulwurm-positive und negative Fohlen möglich wäre.

5.3 Serologische Reaktionen untersuchter Fohlen im ELISA

Die vorliegenden Untersuchungen wurden in den Jahren 2011 und 2012 in einem großen Pferdebestand mit bekannter Spulwurmproblematik durchgeführt. In der Literatur wurden bis zum Jahr 2013 (Burk 2013) keine serologischen Untersuchungen von *Parascaris* spp.-infizierten Pferden veröffentlicht. Die Larvenwanderung und klinische Relevanz bei Fohlen wurde hingegen mehrfach beschrieben. Ursachen dafür könnten sein, dass die bisher erhältlichen Anthelminthika noch gut wirksam waren (Andersen et al. 2013) und somit kein Handlungsbedarf hinsichtlich einer verbesserten Diagnostik bestand. Bisher wurde aufgrund der späten Erkennung der Spulwurminfektion präventiv entwurmt. Die Resistenzentwicklung durch diesen Einsatz wurde bei anderen Parasiten (MDS) belegt. Ziel dieser Untersuchungen war es einerseits zwischen koproskopisch positiven und negativen Fohlen zu unterscheiden. Eine Prävalenz von > 90 % in dem Bestand schränkte die Aussagekraft dieser Untersuchungen jedoch deutlich ein. Andererseits sollte der serologische Infektionsverlauf über mehrere Wochen beobachtet werden.

5.3.1 ELISA unter Verwendung von ES-Antigenen adulter und larvaler *Parascaris* spp.-Stadien

Bei Verwendung von *A. suum* L2- bzw. L3-ES-Proteinen im Vergleich zu Antigenen aus der Körperflüssigkeit adulter Würmer wurden vielversprechende Reaktionen im ELISA von Lind et al. (1993) beobachtet. Bedingt durch den Kontakt zwischen den Spulwurmlarven und dem

Immunsystems des Wirtes während der Körperwanderung wird eine bessere Speziesspezifität in der Reaktion mit dem ES-Protein der Larven erwartet (Kennedy et al. 1987). Das antigenetische Potential dieser *in vitro* erzeugten ES-Proteine kann mit den *in vivo* vorhandenen ES-Proteinen der Larven verglichen werden (Urban et al. 1981).

Nach Magnaval et al. (1991) und Morales et al. (2002) können vergleichbare Ergebnisse der Antigen-Antikörper-Reaktionen zwischen den Methoden ELISA und Western Blot erwartet werden. Nach den vielversprechenden Ergebnissen des Western Blot mit Seren der jeweils fünf *Parascaris* spp.-koproskopisch positiven und negativen Fohlen schlossen sich serologische Untersuchungen an. Im ELISA der Seren dieser zehn Fohlen zu mehreren Zeitpunkten über den gesamten Probenentnahmezeitraum mit dem ES-Antigen der Larven wurden unterschiedliche Verlaufskurven (Abbildung 23 auf Seite 108) nachgewiesen. Dieser Sachverhalt könnte durch den unterschiedlichen Status von Fohlenalter, Immunsystementwicklung und Infektionszeitpunkten verursacht sein. Die Verläufe der serologischen Reaktionen dieser Fohlen unter Verwendung von IgG als Sekundärantikörper umfasste OD-Werte von 0,3 bis 2,0 bei den koproskopisch positiven und 0,3 bis 1,9 bei den koproskopisch negativen Fohlen. Eine Unterscheidung auf den ersten Blick war nicht möglich. Bei vier der fünf koproskopisch negativen Fohlen waren die OD-Werte bis zur 15. Lebenswoche sehr niedrig und ein Anstieg dieser OD-Werte folgte erst in den Folgewochen. Die negativen Fohlen waren gleich alt oder zum Teil älter als die koproskopisch positiven Tiere, die zu dieser Zeit bereits mehrere Wochen Eier ausschieden. Es könnte zu einer späteren Infektion dieser Fohlen gekommen sein, was eine verlängerte Präpatenz der früher im Jahr geborenen Fohlen wie in Fragestellung 14 der statistischen Auswertung angenommen und als statistisch signifikant belegt wurde, bestätigen würde. Diese Fohlen könnten einen besseren Immunstatus nach der Geburt gehabt haben, durch z. B. ein Kolostrum mit hohem Immunglobulingehalt und gutes Saugverhalten in den ersten Stunden nach der Geburt. Dieser bessere Immunstatus hätte zu einer späteren Infektion dieser Fohlen führen können.

Im Vergleich konnte, wie auch von Frontera et al. (2003) bei Versuchen mit Schweinen beschrieben wurde, keine Korrelation der OD-Werte aus dem ELISA mit den EpG-Werten festgestellt werden. Dies ist unter Beachtung einer fehlenden Korrelation der *Parascaris* spp.-EpG-Werten mit der Spulwurmbürde im Darm nicht verwunderlich.

Eine Reaktion des Immunsystems des Wirtes auf die adulten Würmer sollte durch Untersuchungen mit dem ES-Antigen der adulten Parasiten getestet werden. In der Verwendung des ES-Antigens der adulten Würmer mit den jeweils fünf Fohlenserum von koproskopisch positiven und negativen Tieren im Western Blot wurden keine einheitlichen

Bandenmuster der Fohlen sichtbar. Auch in den ELISA-Versuchen war zwischen den koproskopisch positiven und negativen Fohlen keine Unterscheidung möglich. Es ist anzunehmen, dass die adulten Würmer weniger mit dem Immunsystem des Wirtes in Kontakt kommen als die migrierenden Larvenstadien, wie es bereits für *S. vulgaris*-Infektionen beobachtet wurde (Andersen et al. 2013).

In früheren Veröffentlichungen wurde der Sekundärantikörper der Immunglobulinklasse G verwendet, da IgG als dominante Antikörperklasse bei Stute und Fohlen im Serum sowie Kolostrum beschrieben wurde (Rouse 1971; Jeffcott 1974; Sheoran et al. 2000; Erhard et al. 2001). Diese Angabe wurde durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt. Es scheint, als spiele das Immunglobulin der Klasse M eine untergeordnete Rolle in der Immunantwort des Wirtes auf diesen Parasiten, wie es auch von Frontera et al. (2004) beschrieben wurde. In Versuchen mit dem IgG (T) und dem larvalen ES-Protein war eine Differenzierung zwischen koproskopisch positiven und negativen Tieren schlechter möglich als unter Verwendung des IgG. Die koproskopisch negativen Fohlen wiesen OD-Werte um 0,2 auf, aber die koproskopisch positiv getesteten Fohlen variierten in den OD-Werten zwischen 0,1 und 0,8. Bei Nachweis von kleinen Strongyliden beim Pferd von Dowdall et al. (2003) gelang mit der Klasse IgG (T) jedoch die Differenzierung in infizierte Pferde und Kontrolltiere, allerdings wurde dabei ein somatisches Antigen der Larven verwendet. Die Klasse der Immunglobuline G (T) wurde weiterhin zum erfolgreichen Nachweis von Bandwürmern bei Pferden unter Verwendung von ES-Antigen im ELISA (Proudman et al. 1996) genutzt. Allerdings gaben Skotarek et al. (2010) an, dass Western Blot die sensitivere Methode in der Identifizierung von Bandwürmern im Caecum vom Pferd war.

Zusammenfassend wurden steigende OD-Werte auch erst zum oder nach dem ersten positiven Kotbefund erhalten, so dass mit dem larvalen ES-Proteingemisch und dem IgG als Sekundärantikörper eine frühzeitige Detektion der Infektion vor dem ersten EpG-Befund für *Parascaris* spp. nicht möglich war. Eine mögliche Begründung für ein vermindertes antigenetisches Potential des ES-Antigens könnten darin enthaltene Proteasen sein (Guerrero et al. 1969; Morales et al. 2002). Die Penetration und Migration der Larven *in vivo* unterstützend, könnten sie *in vitro* zur Zerstörung der entscheidenden Proteinfractionen führen, was zu einer Einschränkung der Diagnostik führen würde.

5.3.2 ELISA unter Verwendung der präkolostralen Serumproben

Pferde haben einen Plazentatyp, der eine Übertragung maternaler Antikörper zum Fohlen nicht ermöglicht (Martin et al. 1973; McGuire et al. 1973; Jeffcott 1975; Erhard et al. 2001). Die Fohlen kommen aus diesem Grund mit einer Agammaglobulinämie zur Welt und sind auf die rechtzeitige Kolostrumaufnahme mit adäquatem Immunglobulingehalt angewiesen (McGuire et al. 1973; Jeffcott 1974; Holznagel et al. 2003). Zum besseren Verständnis des Einflusses maternaler Antikörper auf die serologischen Reaktionen wurden zusätzlich präkolostrale Seren von zwölf Fohlen untersucht. Das Immunglobulin der Klasse G wurde als dominanter Antikörper bei Stute und Fohlen im Serum und Kolostrum beschrieben (Rouse 1971; Jeffcott 1974; Sheoran et al. 2000; Erhard et al. 2001) und in den Vorversuchen mit IgG und IgM wurde dies zusätzlich deutlich, so dass im Folgenden nur auf die ELISA mit IgG als Sekundärantikörper eingegangen wird.

Die präkolostralen Blutproben der Fohlen wurden circa eine Stunde nach der Geburt gewonnen, als die Fohlen bereits standen und begannen, nach dem Euter der Stute zu suchen. Die OD-Werte dieser präkolostralen Werte lagen zwischen 0,059 und 0,081, was als agammaglobulinämisch zu bewerten ist. Nach der Aufnahme von Kolostrum sollten laut Literatur die Immunglobulinwerte in den ersten 24 h auf ein Maximum ansteigen und anschließend wieder abfallen (McGuire et al. 1973; Jeffcott 1974; Erhard et al. 2001). Zum Zeitpunkt der zweiten und postkolostralen Blutprobe waren die Fohlen ca. 48 h alt. Der Vergleich zu den präkolostralen OD-Werten ergab sechs bis 23-fache Anstiege. Die realen Höchstwerte lagen nach 24 h vermutlich noch deutlich höher. Der Übergang von maternalen Antikörpern aus dem Kolostrum über die Darmschranke des Fohlens und die folgende Interaktion dieser Antikörper mit dem zu testenden ES-Antigen konnte nachgewiesen werden. Der Abfall des maternalen Antikörperspiegels in den ersten beiden Lebensmonaten (Rouse 1971) konnte in den Verlaufskurven der OD-Werte nachvollzogen werden. Ein langsamer Katabolismus, begründet in den Halbwertszeiten von 17,6 bis 32 Tagen (Sheoran et al. 2000) bzw. 23 Tagen (Jeffcott 1974) für die Immunglobuline der Klasse G war ersichtlich. Diese Tiere wurden nicht isoliert gehalten und ein ständiger Kontakt mit Antigenen aus der Umwelt lässt Reaktionen des Immunsystems vermuten. Eine insuffiziente Eigensynthese von Antikörpern in den ersten Lebenswochen sorgt jedoch dafür, dass diese nicht sofort erkannt werden können. Ein Anstieg des Antikörperspiegels, repräsentiert durch die OD-Werte, war zwischen dem zweiten und vierten Lebensmonat der Fohlen nachweisbar, wobei der Kurvenverlauf dieser OD-Werte jedes Fohlens sehr unterschiedlich war. Die Übergangsphase,

welche als „immunologische Lücke“ bezeichnet wird, befindet sich zwischen dem zweiten und vierten Lebensmonat (Rouse 1971). In dieser Zeit sinken die maternalen Antikörper ab und die endogene Synthese von Antikörpern der Fohlen steigt an. Die früheste Eigensynthese ab der zweiten Lebenswoche wurde von Jeffcott (1974) bei Fohlen, die kein Kolostrum erhielten, beobachtet. Bei einer normalen Kolostrumaufnahme wurde eine endogene Synthese ab der vierten Lebenswoche festgestellt (Jeffcott 1974).

Bei Versuchen zum Antikörpernachweis nach einer Infektion mit Parasiten wurden Reaktionen ab der dritten Lebenswoche bei Ferkeln und einer *A. suum*-Infektion beobachtet (Eriksen et al. 1980). Diese Zeitangabe einer immunologischen Reaktion von Jungtieren ist identisch mit der von Jeffcott (1974) beschriebenen Antikörper-eigensynthese ab der vierten Lebenswoche.

Eine serologische Reaktion auf eine Infektion mit *Parascaris* spp. wäre demnach bei Fohlen ab einem Alter von ca. einem Lebensmonat nachweisbar. Bis zu diesem Zeitraum sinkt der Gehalt der maternalen Antikörper um ca. 50 % ab (Jeffcott 1974; Erhard et al. 2001), so dass die restlichen 50 % dennoch eine Rolle in der serologischen Detektion spielen und eine Differenzierung zwischen infizierten und nicht infizierten Fohlen erschweren.

Mit der Entwicklung einer altersabhängigen Immunabwehr kommt es zu einer Abtötung der wandernden Larven (Clayton 1978; Clayton et al. 1979), doch sind die maternalen und ersten endogen synthetisierten Antikörper nicht ausreichend, um eine Infektion der Fohlen mit mehrwöchigen Eiausscheidungen zu verhindern. Es wurden auch geringe Wurmbürden bei älteren Pferden beschrieben (Fritzen 2005; Lyons et al. 2006; Reinemeyer 2009). Eine intermittierende Infektion der Stuten mit folgender Antikörperbildung wäre auch in dem untersuchten Gestüt denkbar. So könnte eine Übertragung der in dieser Zeit zirkulierenden Antikörper über das Kolostrum eine passive Immunität einiger Fohlen in den ersten Wochen verursachen. Somit wäre der Status quo an Abwehrmechanismen, mit denen sich die Fohlen zum Zeitpunkt der Infektion mit dem Erreger auseinandersetzen, individuell sehr unterschiedlich, was die unterschiedlichen koproskopischen Daten der Fohlen während der gesamten Probenentnahme begründen könnte.

5.3.3 Weitere Antigene und Sekundärantikörper im ELISA

In der Diagnostik der kleinen Strongyliden war das somatische Antigen der larvalen Stadien besser geeignet als das adulter Stadien (Dowdall et al. 2002). Ähnliche Reaktionen wurden bei ELISA-Versuchen mit dem somatischen Antigen der larvalen Stadien von *Parascaris* spp.

erwartet. Ähnliche OD-Werte bei koproskopisch positiven und negativen Fohlen ermöglichten jedoch keine Unterscheidung.

Es wurden verschiedene Sekundärantikörper getestet. Unter Verwendung von IgM mit präkolostralen Seren waren die OD-Werte höher als bei der Verwendung von IgG (H+L), aber im Vergleich zu der postkolostralen Probe wurden geringere Anstiege nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung wäre die Produktion geringer Mengen dieses Immunglobulins bereits vor der Geburt, wie es von McGuire et al. (1973) und Jeffcott (1975) beschrieben wurde. Damit wären geringere Anstiege nachvollziehbar und eine schnellere Absorption von IgG aus dem Kolostrum (McGuire et al. 1973) wäre eine zusätzliche Erklärung dieser unterschiedlichen Anstiege. Nach 48 h spielt dieses Argument jedoch vermutlich keine Rolle mehr. Weiterhin konnte unter Verwendung von IgM im Immunoblot sowie im ELISA keine Differenzierung zwischen koproskopisch positiven und negativen Fohlen erfolgen. Zusammenfassend kann IgM eine verminderte Bedeutung in der serologischen Reaktion auf parasitäre Infektionen, wie bereits in anderen Untersuchungen festgestellt wurde (Dowdall et al. 2002; Frontera et al. 2004), zugesprochen werden.

Wie bei Versuchen mit kleinen Strongyliden von Dowdall et al. (2002) wurden die beste Differenzierung bei der Verwendung der Immunglobuline der Klasse G erreicht. Es wurde keinem der beiden Subtypen eine Präferenz gegeben, da bei beiden Subtypen Probleme hinsichtlich der Sensitivität zu verzeichnen waren. Die Infektion konnte bisher nicht sicher zum Zeitpunkt der Larvenwanderung erkannt werden. Sheoran et al. (1997) weisen nach Untersuchungen mit *Streptococcus equi* darauf hin, dass IgG (T) in der ersten Reaktion des Immunsystems (akute Phase) ohne Bedeutung ist.

Dem Immunglobulin der Klasse E wird die größte Bedeutung in der Reaktion des Immunsystems auf die parasitäre Infektion zugeschrieben. Doch wurden mit diesem Immunglobulin keine Tests durchgeführt, da eine Eigensynthese erst ab dem sechsten Lebensmonat (Wagner et al. 2006) beschrieben wurde. Für die Spulwurmdiagnostik eines Fohlens wäre dies ungeeignet.

5.3.4 Kreuzreaktivität im ELISA

Für Untersuchungen auf Kreuzreaktionen wurden freundlicherweise Seren von experimentell monoinfizierten Pferden mit kleinen und großen Strongyliden, *Strongyloides westeri* sowie *Parascaris* spp. (Prof. Dr. Thomas Klei, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University, USA) und AsHb-beschichteten Platten (*A. suum*-Hämoglobin) aus einer

Arbeitsgruppe um Herrn Professor Peter Geldhof, Universität Gent, Belgien zu Verfügung gestellt.

Mit diesen Seren konnte eine starke Kreuzreaktivität zwischen Seren von mit *Parascaris* spp. bzw. Strongyliden, insbesondere den großen Strongyliden, infizierten Pferden nachgewiesen werden. Von Dowdall et al. (2003) wurden keine Kreuzreaktionen bei der Verwendung von IgG (T) und einem somatischen Antigen aus kleinen Strongylidenlarven festgestellt. Jedoch wurde für diese ELISA- und Western Blot-Untersuchungen eine 20 kDa und 25 kDa Fraktion aus dem Antigen aufgereinigt. Der Nachweis unspezifischer Reaktionen, wie sie vermutlich in unseren Versuchen vorkommen, wäre dadurch vermindert. Es scheint die Möglichkeit eines spezifischeren Tests unter Verwendung des ES-Antigens zu geben, wenn isolierte Proteinbanden gesondert getestet werden können.

Auch bei ELISA-Versuchen mit den *A. suum*-beschichteten Platten mit den Seren monoinfizierter Tiere wurden, wie bei der Verwendung des larvalen ES-Antigens von *Parascaris* spp., Kreuzreaktionen nachgewiesen. Dies könnte auf ein ähnliches Muster der ES-Proteine der Lungenstadien von verwandten Spulwurm-gattungen (Annen et al. 1975; Kennedy et al. 1989) herrühren. Da das AsHb vermutlich ein Hauptanteil der ES-Proteine ist (Vlaminck et al. 2011), wäre eine ähnliche Reaktion im ELISA erklärbar. Hohe OD-Werte der Pferdeseren, die mit kleinen und großen Strongyliden experimentell infiziert waren, mit den ES-Proteinen von *Parascaris* spp.-Larven wären zu erwarten. Doch sogar das Tier, das als Negativkontrolle für die kleinen Strongyliden galt, zeigte höhere OD-Werte als das Spulwurmpositive Pferdeserum, was eine unspezifische Reaktion an dieser Stelle vermuten lässt.

Nichol et al. (1987) beschrieben einen hohen Grad an Kreuzreaktivität zwischen *S. vulgaris* und *Parascaris* spp., begründet in einer Homologie der oberflächlichen Strukturen zwischen diesen Spezies. Den Beleg einer Ähnlichkeit zwischen dem Oberflächenantigen und den ES-Antigenen brachten schließlich Maizels et al. (1990) bei einer Studie zu Oberflächen-assoziierten Glykoproteinen der Spezies *T. canis*. Die Ursache für die Kreuzreaktionen vermuteten Magnaval et al. (1991) in den hochmolekularen Banden.

6 Zusammenfassung

In der epizootiologischen Längsschnittuntersuchung eines großen Gestütes in Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland wurden insgesamt 347 Fohlen in den ersten Lebensmonaten koproskopisch und klinisch überwacht. In zwei aufeinanderfolgenden Jahren wurden im Zeitraum von April bis September wöchentlich Proben von Fohlen im Rahmen des gestütseigenen Gesundheitsmonitorings untersucht. Die wöchentliche koproskopische Auswertung über den Zeitraum von 24 (2012) bzw. 25 Projektwochen (2011) ergaben bei insgesamt 303 der 347 getesteten Fohlen positive Befunde für *Parascaris* spp. (87 %). Nach einer zusätzlichen Probenentnahme sieben bzw. neun Wochen nach Beendigung der wöchentlichen Probenentnahme im Herbst 2012 waren nachweislich 95,6 % der Fohlen mit dem Parasiten *Parascaris* spp. infiziert. Es kann angenommen werden, dass tatsächlich jedes Fohlen im Bestand infiziert war. Es wurden bis zu 10.008 *Parascaris* spp.-Eier pro Gramm Kot (EpG) in der Projektzeit nachgewiesen. In beiden Projektjahren waren die ersten koproskopisch positiven Fohlen in der neunten Lebenswoche festzustellen. Entsprechend der beschriebenen Präpatenz von mindestens zehn Wochen muß in diesen Fällen von einer Infektion in den ersten Lebenstagen ausgegangen werden. Der Großteil der Fohlen wurde erst in der 15. Lebenswoche koproskopisch positiv. Der Höhepunkt hinsichtlich der wöchentlich ermittelten koproskopischen *Parascaris* spp.-Prävalenz wurde schließlich in der 21. Lebenswoche erreicht, anschließend sank die Prävalenz wieder.

Bei 153 Fohlen (44 %) der insgesamt 347 untersuchten Fohlen wurden koproskopisch zusätzlich Eier von Magen-Darm-Strongyloiden (MDS) gefunden. Eine Infektion mit MDS oder eine längere Weidezeit korrelierten statistisch signifikant mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einer *Parascaris* spp.-Eiausscheidung. Die früher im Jahr geborenen März- oder Aprilfohlen hatten eine statistisch höhere Wahrscheinlichkeit Spulwurmeier auszuschleiden und anschließend höhere *Parascaris* spp.-EpG-Werte aufzuweisen als im Mai oder Juni geborenen Fohlen. Dabei zeigten die früher im Jahr geborenen Fohlen eine längere Präpatenz.

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Parameter zur Erfassung der Möglichkeit einer frühzeitigen Erkennung der Infektion herangezogen. Anhand eines klinischen Scores zur Lungengesundheit wurden gering- bis mittelgradige respiratorische Erkrankungen fast aller Fohlen ab der fünften Lebenswoche nachgewiesen. Es konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer klinischen Verschlechterung des Nasenausflussbefundes der Probanden und einem elf Wochen daraufhin folgenden, erstmalig koproskopisch positiven

Befund nachgewiesen werden. Unter Beachtung der Präpatenz von *Parascaris* spp. und dem starken Anstieg des Anteils positiver Fohlen ab der 15. Lebenswoche war ein Zusammenhang zwischen Spulwurminfektion und respiratorischer Erkrankungerscheinungen aufgrund der Schädigung des Gewebes der Lunge durch wandernde Spulwurmlarven zu vermuten. Die von Letzteren verursachte Vorschädigung könnte eine Prädisposition für Erkrankungen mit Sekundärerregern ergeben.

Neben den o.a. epizootiologischen Untersuchungen wurden auch Versuche zur Etablierung eines serologischen Nachweises von *Parascaris* spp.-Infektionen unternommen. Ein Protokoll zur Kultivierung von *Parascaris* spp.-Larven wurde entwickelt und exkretorisch-sekretorische (ES) Proteine der Larven gewonnen. Nach Auftrennung des ES Medium mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde eine breite Bande bei ca. 12 kDa und drei schmalere Banden bei ca. 13 kDa, 21 kDa sowie 100 kDa sichtbar. Bei Verwendung von Seren koproskopisch *Parascaris* spp.-positiver Fohlen wurde mittels Western Blot die o.a. 21 kDa Bande detektiert. Diese war jedoch auch bei einem koproskopisch negativen Tier zu finden. Eine eindeutige Differenzierung oder ein Nachvollziehen des Infektionsverlaufes gelang letztlich nicht. Zudem wurden Kreuzreaktionen mit Seren von jeweils experimentell ausschließlich mit großen bzw. kleinen Strongyliden infizierten Pferden detektiert, so dass keine zuverlässige Identifizierung der *Parascaris* spp.-positiven Fohlen möglich war.

Die kolostrale Übertragung maternalen Antikörper konnte in serologischen Tests mit dem ES-Antigen larvaler Stadien von *Parascaris* spp. nachvollzogen werden. Nach der Kolostrumaufnahme wurde ein Antikörperanstieg im Serum der Fohlen bis um das 23-fache in den ersten 48 Stunden nachgewiesen. Diese mit dem Kolostrum übertragenen Antikörper der Stute erschwerten den Nachweis spezifisch vom Fohlen als Reaktion auf eine Spulwurminfektion gebildeter Antikörper. Für die eventuelle zukünftige Entwicklung eines serologischen *Parascaris* spp.-Infektionsnachweises wären einerseits die Gewinnung von bisher nicht verfügbaren Seren von sicher nicht infizierten Kontrolltieren sowie die molekulare Identifizierung *Parascaris* spp.-spezifischer Antigene erforderlich.

7 Summary

“Parasitological, clinical and serological examinations of the progress of *Parascaris* infections in foals”

In epizootiological examinations in a large stud farm in Mecklenburg-Vorpommern, Germany, data from 347 foals obtained during the routine clinical health monitoring including coproscopical examinations were obtained beginning in the first weeks of the foals life. In two consecutive years from April to September weekly samples were examined. The copromicroscopic analysis showed a *Parascaris* spp. infection rate of approximately 87 per cent (303 foals) in the 24 (2012) and 25 (2011) project weeks. After an additional collection seven respectively nine weeks after the end of the above mentioned study weeks in total 95.6 per cent of the foals showed a *Parascaris* spp. infection. It can thus be assumed that practically each foal in this stud farm got infected by this parasite. The faecal egg per gram (epg) counts raised up to 10,008 epg in one foal. The weekly epg counts started to become positive in foals nine weeks of age. This is earlier than expected according to the previously described prepatency period of at least ten weeks and indicates that foals are being exposed to *Parascaris* spp. eggs directly after birth. The majority of the foals become coproscopically positive during the 15th week of life. The peak of positive foals of the examined samples was in the 21st week of life.

In the faecal samples of 153 foals (44%) some strongyles eggs (MDS) were additionally found. An infection with MDS or a longer time on pasture correlated significantly with a higher probability of the expulsion of *Parascaris* spp. eggs.

Foals born earlier during the year (i.e. in March or April) had a higher risk of *Parascaris* spp. egg shedding than the foals which are born in May or June. Furthermore, in foals born in March or April the *Parascaris* spp. prepatency was significantly longer. In the present study different parameters were examined as possible early indicators of *Parascaris* spp. infection. With the aid of a clinical pulmonary health low- to middle-grade respiratory disease status was observed in each foal from the fifth week onwards. A statistically significant correlation between the deterioration of rhinorrhea findings and a first positive *Parascaris* spp. coproscopical result eleven weeks later was detected. According to the prepatency of *Parascaris* spp. and the strong rise of the proportion of coproscopically positive foals from the 15th week of life onwards, a correlation between parasite infection and the respiratory

disease was presumed. A damage of the respiratory tissue is possibly caused by the migrating larvae and could be a predisposition for further diseases caused by secondary pathogens.

In addition to epizootiological examinations the establishment of serological tools for the detection of *Parascaris* spp. infections were attempted. Cultivation of *Parascaris* spp. larvae and collection of excretory-secretory (ES) proteins were implemented. After characterization of the larval ES proteins with Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis (SDS PAGE) a prominent band at 12 kDa and three smaller bands at approximately 13 kDa, 21 kDa and 100 kDa were seen. Using serum samples from *Parascaris* spp. positive foals the 21 kDa band was detected. However, using serum of a coproscopic negative foal the same line was detected too. Additionally, serums of horses experimentally mono-infected with large or small strongyles reacted with the above mentioned *Parascaris* spp. ES antigen. Accordingly, no specific method for the serological identification of *Parascaris* spp. infected horses was obtained.

Nevertheless, the serological examinations allowed to demonstrate the transfer of maternal antibodies directed to *Parascaris* spp. larvae ES antigen in newborn foals following uptake of colostrum. After 48 hours the antibody levels in serum of the newborn foals rose up to 23-fold. These maternal antibodies further complicate the serological diagnosis of *Parascaris* spp. infections in foals. Further studies aiming at the development of a specific serological method for the detection of *Parascaris* spp. infection will require the molecular identification of parasite specific antigens.

8 Literaturverzeichnis

Al Anazi, A. D., Alyousif, M. S. (2011): Prevalence of non-strongyle gastrointestinal parasites of horses in Riyadh region of Saudi Arabia.
Saudi J Biol Sci. 18, 299-303.

Alcantara-Neves, N. M., dos Santos, A. B. et al. (2008): An improved method to obtain antigen-excreting *Toxocara canis* larvae.
Exp Parasitol. 119, 349-351.

Altuvia, Y., Sette, A. et al. (1997): A structure-based algorithm to predict potential binding peptides to MHC molecules with hydrophobic binding pockets.
Hum Immunol. 58, 1-11.

Andersen, U. V., Howe, D. K. et al. (2013): SvSXP: a *Strongylus vulgaris* antigen with potential for prepatent diagnosis.
Parasit Vectors. 6, 84.

Andersen, U. V., Howe, D. K. et al. (2013): Recent advances in diagnosing pathogenic equine gastrointestinal helminths: the challenge of prepatent detection.
Vet Parasitol. 192, 1-9.

Anderson, R. C. (2000): Nematode Parasites of Vertebrates: Their Development and Transmission.
CABI Publishing. - ISBN 0-85199-421-0
(2. Auflage), 298

Annen, J. M., Eckert, J. et al. (1975): Simple method for obtaining *Toxocara canis* antigen for the indirect immunofluorescence technic.
Acta Trop. 32, 37-47.

Armstrong, S. K., Woodgate, R. G. et al. (2014): The efficacy of ivermectin, pyrantel and fenbendazole against *Parascaris equorum* infection in foals on farms in Australia.
Vet Parasitol. 205, 575-580.

Austin, S. M., Dipietro, J. A. et al. (1990): *Parascaris equorum*-Infections in Horses.
Comp Cont Educ Pract. 12, 1110-1119.

Baker, G. J., Dodman, N. H. et al. (1974): Foreign body obstruction of the small intestine of a foal.
Vet Rec. 95, 293-295.

Boersema, J. H., Eysker, M. et al. (2002): Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones.
Vet Rec. 150, 279-281.

Boyce, W. M., Branstetter, B. A. et al. (1988): Comparative analysis of larval excretory-secretory antigens of *Baylisascaris procyonis*, *Toxocara canis* and *Ascaris suum* by Western blotting and enzyme immunoassay.
Int J Parasitol. 18, 109-113.

Brady, H. J., Nichols, W. T. (2009): Drug Resistance in Equine Parasites: An Emerging Global Problem.
J Equine Vet Sci. 29, 285-295.

Brown, P. J., Clayton, H. M. (1979): Hepatic Pathology of Experimental *Parascaris equorum*-Infection in Worm-Free Foals.
J Comp Pathol. 89, 115-123.

Bucknell, D. G., Gasser, R. B. et al. (1995): The Prevalence and Epidemiology of Gastrointestinal Parasites of Horses in Victoria, Australia.
Int J Parasitol. 25, 711-724.

Burk, S. V. (2013): Detection of antibodies against *Parascaris equorum* excretory-secretory antigens.
Kentucky, University of Kentucky. 89-111

Burk, S. V., Dangoudoubiyam, S. et al. (2014): In vitro culture of *Parascaris equorum* larvae and initial investigation of parasite excretory-secretory products.
Parasitol Res. 113, 4217-4224.

Clayton, H. M. (1978): Ascariasis in foals.
Vet Rec. 102, 553-556.

Clayton, H. M. (1986): Ascarids. Recent advances.
Vet Clin North Am Equine Pract. 2, 313-328.

Clayton, H. M., Duncan, J. L. (1977): Experimental *Parascaris equorum* Infection of Foals.

Res Vet Sci. 23, 109-114.

Clayton, H. M., Duncan, J. L. (1978): Clinical Signs Associated with *Parascaris equorum* Infection in Worm-Free Pony Foals and Yearlings.
Vet Parasitol. 4, 69-78.

Clayton, H. M., Duncan, J. L. (1979): The development of immunity to *Parascaris equorum* Infection in the foal.
Res Vet Sci. 26, 383-384.

Clayton, H. M., Duncan, J. L. (1979): The migration and development of *Parascaris equorum* in the horse.
Int J Parasitol. 9, 285-292.

Clayton, H. M., Duncan, J. L. et al. (1980): Pathophysiological Changes Associated with *Parascaris equorum* Infection in the Foal.
Equine Vet J. 12, 23-25.

Cleeland, R. (1963): The effects of different atmospheres and various supplements on the in vitro survival and growth of *Ascaris suum* larvae.
J Parasitol. 49, 64-68.

Cleeland, R., Laurence, K. A. (1962): In vitro cultivation of *Ascaris lumbricoides* var. *suum* larvae.
J Parasitol. 48, 35-38.

Coles, G. C., Bauer, C. et al. (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., Jackson, F. et al. (2006): The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance.
Vet Parasitol. 136, 167-185.

Craig, T. M., Diamond, P. L. et al. (2007): Evidence of ivermectin resistance by *Parascaris equorum* on a Texas horse farm.
J Equine Vet Sci. 27, 67-71.

Cribb, N. C., Cote, N. M. et al. (2006): Acute small intestinal obstruction associated with *Parascaris equorum* infection in young horses: 25 cases (1985-2004). *N Z Vet J.* 54, 338-343.

Cringoli, G. (2006): FLOTAC, a novel apparatus for a multivalent faecal egg count technique. *Parassitologia.* 48, 381-384.

Cringoli, G., Rinaldi, L. et al. (2010): FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat Protoc.* 5, 503-515.

Cruz, L. M., Allanson, M. et al. (2012): Morphological Changes of *Ascaris* spp. Eggs during Their Development Outside the Host. *J Parasitol.* 98, 63-68.

Deplazes, P., Eckert, J. et al. (2012): *Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin.* Stuttgart: Enke Verlag. - ISBN 978-3-8304-1072-0 (2. Auflage), 308 - 324

Dietz, O., Huskamp, B. (2006): *Handbuch Pferdepraxis.* Stuttgart: Enke Verlag. - ISBN 3-8304-1028-X (3. Auflage), 347-349

DiPietro, J. A., Boero, M. et al. (1983): Abdominal abscess associated with *Parascaris equorum* infection in a foal. *J Am Vet Med Assoc.* 182, 991-992.

DiPietro, J. A., Lock, T. F. et al. (1987): Evaluation of Ivermectin Paste in the Treatment of Ponies for *Parascaris equorum* Infections. *J Am Vet Med Assoc.* 190, 1181-1183.

Douvres, F. W., Tromba, F. G. et al. (1969): Morphogenesis and migration of *Ascaris suum* larvae developing to fourth stage in swine. *J Parasitol.* 55, 689-712.

Douvres, F. W., Urban, J. F., Jr. (1983): Factors contributing to the in vitro development of *Ascaris suum* from second-stage larvae to mature adults. *J Parasitol.* 69, 549-558.

Dowdall, S. M., Proudman, C. J. et al. (2004): Characterisation of IgG(T) serum antibody responses to two larval antigen complexes in horses naturally- or experimentally-infected with cyathostomins.

Int J Parasitol. 34, 101-108.

Dowdall, S. M. J., Matthews, J. B. et al. (2002): Antigen-specific IgG(T) responses in natural and experimental cyathostominae infection in horses.

Vet Parasitol. 106, 225-242.

Dowdall, S. M. J., Proudman, C. J. et al. (2003): Purification and analyses of the specificity of two putative diagnostic antigens for larval cyathostomin infection in horses.

Res Vet Sci. 75, 223-229.

Egwang, T. G., Slocombe, J. O. (1982): Evaluation of the Cornell-Wisconsin centrifugal flotation technique for recovering trichostrongylid eggs from bovine feces.

Can J Comp Med. 46, 133-137.

Enigk, K., Dey-Hazra, A. (1976): Surface structure and function of the outer protein cover of eggs of *Ascaris suum* (Nematoda).

Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 89, 276-281.

Erhard, M. H., Luft, C. et al. (2001): Assessment of colostral transfer and systemic availability of immunoglobulin G in new-born foals using a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system.

J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 85, 164-173.

Eriksen, L. (1990): *Ascaris suum*: influence of egg density on in vitro development from embryonated egg to infective stage.

Acta Vet Scand. 31, 489-491.

Eriksen, L., Andersen, S. et al. (1980): Experimental *Ascaris suum*-infection in pigs. Serological response, eosinophilia in peripheral blood, occurrence of white spots in the liver and worm recovery from the intestine.

Nord Vet Med. 32, 233-242.

Eslami, A., Bokai, S. et al. (2005): Equine parasites in Iran.

J Equine Vet Sci. 25, 143-144.

Fairbairn, D. (1961): In Vitro Hatching of *Ascaris lumbricoides* Eggs.

Can J Zool. 39, 153-162.

Fritzen, B., Rohn, K. et al. (2010): Endoparasite control management on horse farms - lessons from worm prevalence and questionnaire data.
Equine Vet J. 42, 79-83.

Fritzen, B. M. (2005): Untersuchungen zum Vorkommen von Anthelminthika-Resistenz in nordrhein-westfälischen Pferdebeständen.
Hannover, Tierärztliche Hochschule Hannover. 6-100

Frontera, E., Carron, A. et al. (2003): Specific systemic IgG, IgG2 and IgM responses in pigs immunized with infective eggs or selected antigens of *Ascaris suum*.
Parasitology. 127, 291-298.

Frontera, E., Roepstorff, A. et al. (2004): Presence of immunoglobulins and antigens in serum, lung and small intestine in *Ascaris suum* infected and immunised pigs.
Vet Parasitol. 119, 59-71.

Frontera, E., Serrano, F. et al. (2003): Serological responses to *Ascaris suum* adult worm antigens in Iberian finisher pigs.
J Helminthol. 77, 167-172.

Gasser, R. B., Jenkins, D. J. et al. (1992): Use of *Echinococcus granulosus* worm antigens for immunodiagnosis of *E. granulosus* infection in dogs.
Vet Parasitol. 45, 89-100.

Gawor, J. J. (1995): The Prevalence and Abundance of Internal Parasites in Working Horses Autopsied in Poland.
Vet Parasitol. 58, 99-108.

Geenen, P. L., Bresciani, J. et al. (1999): The morphogenesis of *Ascaris suum* to the infective third-stage larvae within the egg.
J Parasitol. 85, 616-622.

Getachew, A. M., Innocent, G. T. et al. (2008): Equine parascariosis under the tropical weather conditions of Ethiopia: a coprological and postmortem study.
Vet Rec. 162, 177-180.

Gillespie, S. H., Bidwell, D. et al. (1993): Diagnosis of human toxocariasis by antigen capture enzyme linked immunosorbent assay.
J Clin Pathol. 46, 551-554.

- Goehring, L. S., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M. (1999): Moxidectin poisoning in a foal?
Tijdschr Diergeneeskd. 124, 412-414.
- Gordon, H. M., Whitlock, H. V. (1939): A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces.
J Counc Sci Ind Res. 12, 50-52.
- Gould, J. C., Rossano, M. G. et al. (2013): The effects of windrow composting on the viability of *Parascaris equorum* eggs.
Vet Parasitol. 191, 73-80.
- Guerrero, J., Silverman, P. H. (1969): *Ascaris suum*: immune reactions in mice. I. Larval metabolic and somatic antigens.
Exp Parasitol. 26, 272-281.
- Guerrero, J., Silverman, P. H. (1971): *Ascaris suum*: immune reactions in mice. II. Metabolic and somatic antigens from in vitro cultured larvae.
Exp Parasitol. 29, 110-115.
- Hearn, F. P., Peregrine, A. S. (2003): Identification of foals infected with *Parascaris equorum* apparently resistant to ivermectin.
J Am Vet Med Assoc. 223, 482-485, 455.
- Hinck, L. W., Ivey, M. H. (1976): Proteinase activity in *Ascaris suum* eggs, hatching fluid, and excretions-secretions.
J Parasitol. 62, 771-774.
- Hinney, B., Wirtherle, N. C. et al. (2011): Prevalence of helminths in horses in the state of Brandenburg, Germany.
Parasitol Res. 108, 1083-1091.
- Holznagel, D. L., Hussey, S. et al. (2003): Onset of immunoglobulin production in foals.
Equine Vet J. 35, 620-622.
- Iddawela, R. D., Rajapakse, R. P. et al. (2007): Characterization of a *Toxocara canis* species-specific excretory-secretory antigen (TcES-57) and development of a double sandwich ELISA for diagnosis of visceral larva migrans.
Korean J Parasitol. 45, 19-26.

Ihler, C. F. (1995): The Distribution of *Parascaris equorum* Eggs in the Soil Profile of Bare Paddocks in Some Norwegian Studs.
Vet Res Commun. 19, 495-501.

Islam, M. K., Miyoshi, T. et al. (2005): Vaccination with recombinant *Ascaris suum* 24-kilodalton antigen induces a Th1/Th2-mixed type immune response and confers high levels of protection against challenged *Ascaris suum* lung-stage infection in BALB/c mice.
Int J Parasitol. 35, 1023-1030.

Jabbar, A., Littlewood, D. T. et al. (2014): The mitochondrial genome of *Parascaris univalens*-implications for a "forgotten" parasite.
Parasit Vectors. 7, 428.

Jacquier, P., Gottstein, B. et al. (1991): Immunodiagnosis of toxocarosis in humans: evaluation of a new enzyme linked immunosorbent assay kit.
J Clin Microbiol. 29, 1831-1835.

Janeway, C. A., Travers, P. et al. (2002): Immunologie.
Spektrum Akademischer Verlag. - 3827410797
(5. Auflage), 101-108

Jeffcott, L. B. (1974): Studies on passive immunity in the foal.
1. Gamma-globulin and antibody variations associated with the maternal transfer of immunity and the onset of active immunity.
J Comp Pathol. 84, 93-101.

Jeffcott, L. B. (1975): The transfer of passive immunity to the foal and its relation to immune status after birth.
J Reprod Fertil Suppl 727-733.

Jeffcott, L. B. (1975): The transfer of passive immunity to the foal and its relation to immune status after birth.
J Reprod Fertil Suppl 727-733.

Johnson, P. J., Mrad, D. R. et al. (1999): Presumed moxidectin toxicosis in three foals.
J Am Vet Med Assoc. 214, 678-680.

Kennedy, M. W., Qureshi, F. et al. (1989): Antigenic relationships between the surface-exposed, secreted and somatic materials of the nematode parasites *Ascaris lumbricoides*, *Ascaris suum* and *Toxocara canis*.
Clin Exp Immunol. 75, 493-500.

Kennedy, M. W., Qureshi, F. et al. (1987): Homology and heterology between the secreted antigens of the parasitic larval stages of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*.
Clin Exp Immunol. 67, 20-30.

Kirchgassner, M., Schmahl, G. et al. (2008): What are the infectious larvae in *Ascaris suum* and *Trichuris muris*?
Parasitol Res. 103, 603-607.

Knottenbelt D. C., H. N., Madigan J. (2007): *Neonatologie der Pferde*.
München: Elsevier GmbH. - (1. Auflage), 14

Kohn, C. W., Knight, D. et al. (1989): Colostral and serum IgG, IgA, and IgM concentrations in Standardbred mares and their foals at parturition.
J Am Vet Med Assoc. 195, 64-68.

Kornas, S., Cabaret, J. et al. (2010): *Parascaris* and cyathostome nematodes in foals: parasite in transit or real infection?
Pol J Vet Sci. 13, 713-717.

Koudela, B., Bodecek, S. (2006): Effects of low and high temperatures on viability of *Parascaris equorum* eggs suspended in water.
Vet Parasitol. 142, 123-128.

Kuhnert-Paul, Y., Schmäschke, R. et al. (2012): Effect of distribution of eggs of strongyles and *Parascaris equorum* in faecal samples of horses on detection with a combined sedimentation-flotation method.
Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere. 40, 21-26.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature. 227, 680-685.

Laugier, C., Sevin, C. et al. (2012): Prevalence of *Parascaris equorum* infection in foals on French stud farms and first report of ivermectin-resistant *P. equorum* populations in France.
Vet Parasitol. 188, 185-189.

Lavoie, J. P., Drolet, R. et al. (2000): Equine proliferative enteropathy: a cause of weight loss, colic, diarrhoea and hypoproteinaemia in foals on three breeding farms in Canada.
Equine Vet J. 32, 418-425.

Levine, H. S., Silverman, P. H. (1969): Cultivation of *Ascaris suum* larvae in supplemented and unsupplemented chemically defined media.
J Parasitol. 55, 17-21.

Lewis, M. J., Wagner, B. et al. (2008): The different effector function capabilities of the seven equine IgG subclasses have implications for vaccine strategies.
Mol Immunol. 45, 818-827.

Lind, E. O., Christensson, D. (2009): Anthelmintic efficacy on *Parascaris equorum* in foals on Swedish studs.
Acta Vet Scand. 51, 45.

Lind, P., Eriksen, L. et al. (1993): Response to Repeated Inoculations with *Ascaris suum* Eggs in Pigs during the Fattening Period.2. Specific IgA, IgG and IgM Antibodies Determined by Enzyme Linked Immunosorbent Assay.
Parasitol Res. 79, 240-244.

Lindgren, K., Ljungvall, O. et al. (2008): *Parascaris equorum* in foals and in their environment on a Swedish stud farm with notes on treatment failure of ivermectin.
Vet Parasitol. 151, 337-343.

Lyons, E. T., Drudge, J. H. et al. (1976): Studies on the Development and Chemotherapy of Larvae of *Parascaris equorum* (Nematoda: Ascaridoidea) in Experimentally and Naturally Infected Foals.
J Parasitol. 62, 453-459.

Lyons, E. T., Swerczek, T. W. et al. (2000): Prevalence of selected species of internal parasites in equids at necropsy in central Kentucky (1995-1999).
Vet Parasitol. 92, 51-62.

Lyons, E. T., Tolliver, S. C. (2004): Prevalence of parasite eggs (*Strongyloides westeri*, *Parascaris equorum* and strongyles) and oocysts (*Eimeria leuckarti*) in the feces of Thoroughbred foals on 14 farms in central Kentucky in 2003.
Parasitol Res. 92, 400-404.

Lyons, E. T., Tolliver, S. C. et al. (2006): Prevalence of large endoparasites at necropsy in horses infected with Population B small strongyles in a herd established in Kentucky in 1966.
Parasitol Res. 99, 114-118.

Lyons, E. T., Tolliver, S. C. et al. (2001): Transmission of endoparasites in horse foals born on the same pasture on a farm in central Kentucky (1996-1999).

Vet Parasitol. 97, 113-121.

Lyons, E. T., Tolliver, S. C. et al. (2008): Evaluation of parasiticidal activity of fenbendazole, ivermectin, oxibendazole and pyrantel pamoate in horse foals with emphasis on ascarids (*Parascaris equorum*) in field studies on five farms in Central Kentucky in 2007. Parasitol Res. 103, 287-291.

Lyons, E. T., Tolliver, S. C. et al. (1994): Transmission of some species of internal parasites in horses born in 1990, 1991 and 1992 in the same pasture on a farm in central Kentucky. Vet Parasitol. 52, 257-269.

Magdesian, K. G. (2005): Neonatal foal diarrhea. Vet Clin North Am Equine Pract. 21, 295-312.

Magnaaval, J. F., Fabre, R. et al. (1991): Application of the western blotting procedure for the immunodiagnosis of human toxocariasis. Parasitol Res. 77, 697-702.

Maizels, R. M., de Savigny, D. et al. (1984): Characterization of surface and excretory-secretory antigens of *Toxocara canis* infective larvae. Parasite Immunol. 6, 23-37.

Maizels, R. M., Page, A. P. (1990): Surface associated glycoproteins from *Toxocara canis* larval parasites. Acta Trop. 47, 355-364.

Marti, E., Ehrensperger, F. et al. (2009): Maternal transfer of IgE and subsequent development of IgE responses in the horse (*Equus caballus*). Vet Immunol Immunopathol. 127, 203-211.

Martin, B. R., Larson, K. A. (1973): Immune response of equine fetus to coliphage T2. Am J Vet Res. 34, 1363-1364.

Masure, D., Vlaminck, J. et al. (2013): A role for eosinophils in the intestinal immunity against infective *Ascaris suum* larvae. PLoS Negl Trop Dis. 7, 1-7.

Maung, M. (1978): The occurrence of the second moult of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. Int J Parasitol. 8, 371-378.

McGuire, T. C., Crawford, T. B. (1973): Passive immunity in the foal: measurement of immunoglobulin classes and specific antibody.
Am J Vet Res. 34, 1299-1303.

Mfitilodze, M. W., Hutchinson, G. W. (1989): Prevalence and Intensity of Non-Strongyle Intestinal Parasites of Horses in Northern Queensland.
Aust Vet J. 66, 23-26.

Morales, O. L., Lopez, M. C. et al. (2002): Identification of toxocara canis antigens by Western blot in experimentally infected rabbits.
Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 44, 213-216.

Muller, J. M., Feige, K. et al. (2005): The use of sarmazenil in the treatment of a moxidectin intoxication in a foal.
J Vet Intern Med. 19, 348-349.

Nareaho, A., Vainio, K. et al. (2011): Impaired efficacy of ivermectin against *Parascaris equorum* and both ivermectin and pyrantel against strongyle infections in trotter foals in Finland.
Vet Parasitol. 182, 372-377.

Nichol, C., Masterson, W. J. (1987): Characterisation of surface antigens of *Strongylus vulgaris* of potential immunodiagnostic importance.
Mol Biochem Parasitol. 25, 29-38.

Nicholls, J. M., Clayton, H. M. et al. (1978): Pathological study of Lungs of Foals infected Experimentally with *Parascaris equorum*.
J Comp Pathol. 88, 261-274.

Nielsen, M. K., Wang, J. et al. (2014): *Parascaris univalens* - a victim of large scale misidentification?
Parasitol Res. 113, 4485-4490.

Ohnesorge, B., Trötschel, C. et al. (1998): Bestimmung von Totraum und expiratorischem Mischluftvolumen zur Diagnostik chronischer Lungenerkrankungen beim Pferd
Pferdeheilkunde. 14, 450-455.

Oksanen, A., Eriksen, L. et al. (1990): Embryonation and infectivity of *Ascaris suum* eggs - a comparison of eggs collected from worm uteri with eggs isolated from pig faeces.
Acta Vet Scand. 31, 393-398.

Pecson, B. M., Barrios, J. A. et al. (2007): The effects of temperature, pH and ammonia concentration on the inactivation of *Ascaris* eggs in sewage sludge.
Water Res. 41, 2893-2902.

Pitts, T. D. (1963): In Vitro Cultivation of Newly Hatched Larvae of *Ascaris* from Man and Swine.
J Parasitol. 49, 1034-1035.

Polprasert, C., Valencia, L. G. (1981): The Inactivation of Fecal Coliforms and *Ascaris* Ova in Feces by Lime.
Water Res. 15, 31-36.

Prichard, R. K., Hall, C. A. et al. (1980): The problem of anthelmintic resistance in nematodes.
Aust Vet J. 56, 239-251.

Proudman, C. J., Trees, A. J. (1996): Correlation of antigen specific IgG and IgG(T) responses with *Anoplocephala perfoliata* infection intensity in the horse.
Parasite Immunol. 18, 499-506.

Proudman, C. J., Trees, A. J. (1996): Use of excretory-secretory antigens for the serodiagnosis of *Anoplocephala perfoliata* cestodosis.
Vet Parasitol. 61, 239-247.

Proudman, C. J., Trees, A. J. (1999): Tapeworms as a cause of intestinal disease in horses.
Parasitol Today. 15, 156-159.

Reinemeyer, C. R. (2009): Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*.
Parasit Vectors. 2, 1-6.

Reinemeyer, C. R. (2012): Anthelmintic resistance in non-strongylid parasites of horses.
Vet Parasitol. 185, 9-15.

Reinemeyer, C. R., Nielsen, M. K. (2009): Parasitism and colic.
Vet Clin North Am Equine Pract. 25, 233-245.

Reinemeyer, C. R., Prado, J. C. et al. (2010): Efficacy of pyrantel pamoate and ivermectin paste formulations against naturally acquired *Oxyuris equi* infections in horses.
Vet Parasitol. 171, 106-110.

Reinerneyer, C. R., Prado, J. C. et al. (2010): Efficacy of pyrantel pamoate against a macrocyclic lactone resistant isolate of *Parascaris equorum* in horses.
Vet Parasitol. 171, 111-115.

Relf, V. E., Morgan, E. R. et al. (2013): Helminth egg excretion with regard to age, gender and management practices on UK Thoroughbred studs.
Parasitology. 140, 1-12.

Rogers, R. A. (1956): A Study of Eggs of *Ascaris Lumbricoides* Var *Suum* with the Electron Microscope.
J Parasitol. 42, 97-108.

Rogers, W. P. (1958): Physiology of the Hatching of Eggs of *Ascaris lumbricoides*.
Nature. 181, 1410-1411.

Rouse, B. T. (1971): The immunoglobulins of adult equine and foal sera: a quantitative study.
Br Vet J. 127, 45-52.

Rouse, B. T., Ingram, D. G. (1970): The total protein and immunoglobulin profile of equine colostrum and milk.
Immunology. 19, 901-907.

Russell, A. F. (1948): The development of helminthiasis in thoroughbred foals.
J Comp Pathol Ther. 58, 107-127.

Samson-Himmelstjerna, G. v., Fritzen, B. et al. (2007): Cases of reduced cyathostomin egg-reappearance period and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment as well as survey on pyrantel efficacy on German horse farms.
Vet Parasitol. 144, 74-80.

Samson-Himmelstjerna, G. v., Ilchmann, G. et al. (2011): Empfehlung zur nachhaltigen Kontrolle von Magen-Darminfektionen beim Pferd in Deutschland.
Pferdeheilkunde. 27, 127-140.

Savigny, D. H. (1975): In vitro maintenance of *Toxocara canis* larvae and a simple method for the production of *Toxocara* ES antigen for use in serodiagnostic tests for visceral larva migrans.
J Parasitol. 61, 781-782.

Savigny, D. H., Voller, A. et al. (1979): Toxocariasis: serological diagnosis by enzyme immunoassay.
J Clin Pathol. 32, 284-288.

Schougaard, H., Nielsen, M. K. (2007): Apparent ivermectin resistance of *Parascaris equorum* in foals in Denmark.
Vet Rec. 160, 439-440.

Sheoran, A. S., Sponseller, B. T. et al. (1997): Serum and mucosal antibody isotype responses to M-like protein (SeM) of *Streptococcus equi* in convalescent and vaccinated horses.
Vet Immunol Immunopathol. 59, 239-251.

Sheoran, A. S., Timoney, J. F. et al. (2000): Immunoglobulin isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses.
Am J Vet Res. 61, 1099-1105.

Skotarek, S. L., Colwell, D. D. et al. (2010): Evaluation of diagnostic techniques for *Anoplocephala perfoliata* in horses from Alberta, Canada.
Vet Parasitol. 172, 249-255.

Slivinska, K., Gawor, J. et al. (2009): Gastro-intestinal parasites in yearlings of wild Polish primitive horses from the Popielno Forest Reserve, Poland.
Helminthologia. 46, 9-13.

Slocombe, J. O. (1985): Pathogenesis of helminths in equines.
Vet Parasitol. 18, 139-153.

Slocombe, J. O., de Gannes, R. V. et al. (2007): Macrocyclic lactone resistant *Parascaris equorum* on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate.
Vet Parasitol. 145, 371-376.

Slovis, N. M., Elam, J. et al. (2013): Infectious agents associated with diarrhoea in neonatal foals in central Kentucky: A comprehensive molecular study.
Equine Vet J. 46, 311-313.

Smith, K. L., Muir, L. A. et al. (1971): Selective transport of IgG1 into the mammary gland: role of estrogen and progesterone.
Journal of dairy science. 54, 1886-1894.

Southwood, L. L., Baxter, G. M. et al. (1998): Ascarid impaction in young horses.

Comp Cont Educ Pract. 20, 100-106.

Speiser, F., Gottstein, B. (1984): A collaborative study on larval excretory - secretory antigens of *Toxocara canis* for the immunodiagnosis of human toxocariasis with ELISA. *Acta Trop.* 41, 361-372.

Srihakim, S., Swerczek, T. W. (1978): Pathologic changes and pathogenesis of *Parascaris equorum* infection in parasite-free pony foals. *Am J Vet Res.* 39, 1155-1160.

Stoneham, S., Coles, G. (2006): Ivermectin resistance in *Parascaris equorum*. *Vet Rec.* 158, 572.

Tavassoli, M., Dalir-Naghadeh, B. et al. (2010): Prevalence of gastrointestinal parasites in working horses. *Pol J Vet Sci.* 13, 319-324.

Uhlinger, C. A. (1993): Uses of Fecal Egg Count Data in Equine Practice. *Comp Cont Educ Pract.* 15, 742-749.

Ungemach, F. R., Kroker, R. et al. (2010): *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. Stuttgart: Enke. - 3830411235 (8. Auflage), 316-323

Urban, J. F., Jr., Douvres, F. W. (1981): In vitro development of *Ascaris suum* from third- to fourth-stage larvae and detection of metabolic antigens in multi-well culture systems. *J Parasitol.* 67, 800-806.

Urban, J. F., Jr., Romanowski, R. D. (1985): *Ascaris suum*: protective immunity in pigs immunized with products from eggs and larvae. *Exp Parasitol.* 60, 245-254.

Urban, J. F., Jr., Tromba, F. G. (1982): Development of immune responsiveness to *Ascaris suum* antigens in pigs vaccinated with ultraviolet-attenuated eggs. *Vet Immunol Immunopathol.* 3, 399-409.

Vandermyde, C. R., DiPietro, J. A. et al. (1987): Evaluation of fenbendazole for larvacidal effect in experimentally induced *Parascaris equorum* infections in pony foals. *J Am Vet Med Assoc.* 190, 1548-1549.

Veronesi, F., Moretta, I. et al. (2009): Field effectiveness of pyrantel and failure of *Parascaris equorum* egg count reduction following ivermectin treatment in Italian horse farms. *Vet Parasitol.* 161, 138-141.

Vlaminck, J., Martinez-Valladares, M. et al. (2011): Immunizing pigs with *Ascaris suum* haemoglobin increases the inflammatory response in the liver but fails to induce a protective immunity. *Parasite Immunol.* 33, 250-254.

Vlaminck, J., Nejsum, P. et al. (2012): Evaluation of a serodiagnostic test using *Ascaris suum* haemoglobin for the detection of roundworm infections in pig populations. *Vet Parasitol.* 189, 267-273.

von Samson-Himmelstjerna, G. (2012): Anthelmintic resistance in equine parasites - detection, potential clinical relevance and implications for control. *Vet Parasitol.* 185, 2-8.

Wagner, B. (2006): Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. *Dev Comp Immunol.* 30, 155-164.

Wagner, B., Flaminio, J. B. et al. (2006): Occurrence of IgE in foals: evidence for transfer of maternal IgE by the colostrum and late onset of endogenous IgE production in the horse. *Vet Immunol Immunopathol.* 110, 269-278.

Wang, T., Van Steendam, K. et al. (2013): Proteomic analysis of the excretory-secretory products from larval stages of *Ascaris suum* reveals high abundance of glycosyl hydrolases. *PLoS Negl Trop Dis.* 7, 1-14.

Weisblat, D. A., Russell, R. L. (1976): Propagation of Electrical-Activity in Nerve Cord and Muscle Syncytium of Nematode *Ascaris lumbricoides*. *J Comp Physiol.* 107, 293-307.

Wharton, D. (1980): Nematode egg-shells. *Parasitology.* 81, 447-463.

Wilson, W. D., Mihalyi, J. E. et al. (2001): Passive transfer of maternal immunoglobulin isotype antibodies against tetanus and influenza and their effect on the response of foals to vaccination. *Equine Vet J.* 33, 644-650.

Wittenberg, B. A., Okazaki, T. et al. (1965): The hemoglobin of *Ascaris perienteric* fluid. I. Purification and spectra. *Biochim Biophys Acta.* 111, 485-495.

Wossene, A., Tsuji, N. et al. (2002): Lung-stage protein profile and antigenic relationship between *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum*. *J Parasitol.* 88, 826-828.

Yamasaki, H., Araki, K. et al. (2000): Development of a highly specific recombinant *Toxocara canis* second-stage larva excretory-secretory antigen for immunodiagnosis of human toxocariasis. *J Clin Microbiol.* 38, 1409-1413.

Zibaei, M., Sadjjadi, S. M. et al. (2009): In vitro cultivation of *Toxocara cati* adult worms for production of eggs and evaluation of oviposition. *Helminthologia.* 46, 28-30.

9 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

9.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Probenentnahme beider Projektjahre.....	47
Tabelle 2: Klinischer Score nach Ohnesorge et al. (1998) zur Beurteilung des Schweregrades der klinischen respiratorischen Symptome beim Pferd.....	49
Tabelle 3: Getestete Antigene und Sekundärantikörper (“+“ = erfolgter Test, “-“ = kein Test).	62
Tabelle 4: Übersicht der Antigene und Sekundärantikörper in den labor diagnostischen Methoden (“+“ = erfolgter Test, “-“ = kein Test)	69
Tabelle 5: Jahresvergleich der koproskopischen Befunde (FLOTAC).....	74
Tabelle 6: Verteilung <i>Parascaris</i> spp.-Eier ausscheidender Fohlen, benötigte Nabel- und Lungentherapien, Leukozytose bzw. MDS-Befall dieser Fohlen (prozentuale Verteilung koproskopisch positiver und negativer Fohlen, n = 347).....	84
Tabelle 7: Anzahl der untersuchten Fohlen pro Lebenswoche (n = 347)	87
Tabelle 8: Entwurmungsfrequenz der untersuchten Fohlen (n = 347) in den Projektzeiträumen 2011 (25 Wochen) und 2012 (24 Wochen).....	90
Tabelle 9: Anzahl der Fohlen (n = 347) in den drei Kategorien der Entwurmung über einem Zeitraum von 24 (2011) bzw. 25 Wochen (2012) in zwei aufeinander folgenden Jahren	92
Tabelle 10: Durchgeführte Kombinationen der verschiedenen ELISA	106
Tabelle 11: OD-Mittelwerte aus den ELISA-Untersuchungen verschiedener Antigene und Sekundärantikörper mit Seren der monoinfizierten Pferde.....	111
Tabelle 12: OD-Werte der präkolostralen Serumproben bei Fohlen 226, 260, 290 und 350 sowie prä- und postkolostrale Serumproben der Fohlen 7, 332, 333, 334 und 335 im ELISA mit IgG (1 : 10.000). Rechts die Standardabweichungen der OD-Werte der prä- bzw. postkolostralen Fohlenserumproben	112
Tabelle 13: Untersuchungsprotokoll	165
Tabelle 14: "Fohlentabelle"	167
Tabelle 15: Regressionsergebnisse.....	181

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anzahl der koproskopisch <i>Parascaris</i> spp.-positiven Fohlen (n = 303 Fohlen) an den untersuchten Proben in Abhängigkeit der Lebenswoche der Fohlen dargestellt. Insgesamt wurde bei 347 Fohlen an 24 bzw. 25 Wochen an zwei aufeinanderfolgenden Jahren wöchentlich Kotproben gesammelt.	76
Abbildung 2: Boxplots der EpG-Werte der <i>Parascaris</i> spp.-positiven Fohlen (n = 303 Fohlen). Die wöchentlich untersuchten Kotproben wurden in Abhängigkeit vom Lebensalter der Fohlen betrachtet. Insgesamt wurden wöchentlich Kotproben über einen Zeitraum 24 bzw. 25 Wochen in den Jahren 2011 bzw. 2012 von 188 bzw. 159 Fohlen untersucht.	77
Abbildung 3: Jahresvergleich der <i>Parascaris</i> -EpG-Mittelwerte aller Fohlen im Projektjahr 2011 (n = 162 koproskopisch positive Fohlen) und im Projektjahr 2012 (n = 141 koproskopisch positive Fohlen). Insgesamt wurden wöchentlich Kotproben von 347 Fohlen über 24 bzw. 25 Wochen in zwei Jahren gesammelt (Median: schwarze Linie; Mittelwert: schwarzes Quadrat).	79
Abbildung 4: Anteil koproskopisch <i>Parascaris</i> spp.-negativer (n = 28) und <i>Parascaris</i> spp.-positiver (n = 151) Hengste sowie negativer (n = 16) und positiver (n = 152) Stuten an der Studie, bei denen über 24 bzw. 25 Wochen wöchentlich Kotproben entnommen wurden. Insgesamt wurden bei 347 Fohlen über 24 bzw. 25 Wochen Kotproben gesammelt.....	80
Abbildung 5: Zeitpunkt des ersten koproskopisch <i>Parascaris</i> spp.-positiven Befundes nach Lebenstagen gruppiert (n = 288 Fohlen). In den beiden aufeinanderfolgenden Jahren wurden jeweils über 24 bzw. 25 Wochen Kotproben gewonnen und untersucht.	81
Abbildung 6: Lebenstag der Fohlen zum Zeitpunkt des ersten <i>Parascaris</i> spp.-koproskopischen Befundes. Anhand der Addition aller erstmals koproskopisch positiven Fohlen (n = 288) mit höchstens einer fehlenden Kotprobe vor diesem positiven Kotbefund wird ein Altersbereich von ca. 100 bis 150 Tagen ersichtlich, in denen 80 % der <i>Parascaris</i> spp.-positiven Fohlen nachgewiesen wurden.	82
Abbildung 7: Klinischer Score der gesamten Fohlen pro Lebenswoche. Die Verteilung der Score-Werte aller Fohlen (n = 347) wurde in jeder Lebenswoche dargestellt und somit ab einem Alter von neun Wochen eine Mehrheit bei den Werten 2 und 3 ersichtlich. Gesamtwerte bis 1 wurden als lungengesund gewertet. Ein Fohlen mit einen Score von 2	

bis 3 galt als geringgradig, 4 bis 5 mittelgradig und über 6 hochgradig respiratorisch erkrankt.....	86
Abbildung 8: Vergleich des Verlaufes der koproskopisch positiven Fohlen für <i>Parascaris</i> spp. (n = 303) und der Mittelwerte des klinischen Scores nach Ohnesorge über die Lebenswochen der Fohlen (n = 347).....	88
Abbildung 9: Anteil der Fohlen (n = 347) an den drei Entwurmungskategorien in einem Zeitraum von 24 (2011) bzw. 25 Wochen (2012) an zwei aufeinander folgenden Jahren	91
Abbildung 10: Darstellung der drei Kategorien unterschiedlicher Weideaufenthalte (in Wochen) und der Anteil koproskopisch <i>Parascaris</i> spp.-positiver und <i>Parascaris</i> spp.-negativer Fohlen	93
Abbildung 11: Einteilung der Fohlen nach ihrem Geburtsmonat und Anteil der koproskopisch <i>Parascaris</i> spp.-positiven und <i>Parascaris</i> spp.-negativen Tiere im Untersuchungszeitraum von 24 bzw. 25 Wochen.....	94
Abbildung 12: Alter zum Zeitpunkt der ersten koproskopisch <i>Parascaris</i> spp.-positiven Befund in Abhängigkeit vom Geburtsmonat in einem Boxplot dargestellt	95
Abbildung 13: Darstellung eines Spulwurmeies nach Isolierung aus dem Kot.....	96
Abbildung 14: SDS-PAGE mit larvalem ES-Antigen (10 µg) und Marker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder). Auf der rechten Seite befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden (M) in der Einheit Kilodalton (kDa).....	98
Abbildung 15: Western Blot des larvalen ES-Antigens (10µg) mit Seren von einem positiven (Fohlen 10) und negativen Fohlen (Fohlen 69). Jeweils links in der Spur befindet sich der Marker (PageRuler). Auf der linken Seite befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden (M) in der Einheit Kilodalton (kDa).....	99
Abbildung 16: Western Blot mit Seren von fünf koproskopisch positiven Fohlen (Fohlen 10, 23, 70, 107 und 113) zum Zeitpunkt höchster Eiausscheidung und Marker (PageRuler). Auf der linken Seite befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden (M) in der Einheit Kilodalton (kDa).....	100
Abbildung 17: Western Blot mit Seren der fünf koproskopisch negativen Fohlen (Fohlen 28, 30, 67, 69 und 173) zum Zeitpunkt der ersten Kotprobenentnahme und Marker (PageRuler). Auf der linken Seite befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden (M) in der Einheit Kilodalton (kDa).....	101
Abbildung 18: Western Blot mit Seren eines koproskopisch positiven (Fohlen 23) und negativen (Fohlen 173) Fohlens und dem IgM Sekundärantikörper zur Detektion.	

Daneben befindet sich der Marker (PageRuler). Auf der linken Seite befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden (M) in der Einheit Kilodalton (kDa).	102
Abbildung 19: Links wurden der Marker (PageRuler), die adulten ES-Antigene (10 µg) und adulten somatischen Antigene (10 µg) im SDS-PAGE aufgetrennt. Im rechten Bild wurden die larvalen ES-Antigene und ein Marker (PageRuler) im SDS-PAGE aufgetrennt. Jeweils außen befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden (M) in der Einheit Kilodalton (kDa).	103
Abbildung 20: Western Blot des adulten ES-Antigens (10 µg) mit Seren der fünf koproskopisch positiven Fohlen (10, 23, 70, 107 und 113) in einer 1 : 400 Verdünnung und dem IgG-Sekundärantikörper in einer 1 : 5.000 Verdünnung (entsprechend Protokoll aus Kapitel 3.7.4) Auf der rechten Seite befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden (M) in der Einheit Kilodalton (kDa).	104
Abbildung 21: Western Blot mit den adulten ES-Antigenen (10 µg), Seren der fünf koproskopisch negativen Fohlen (69, 30, 28, 67 und 173 in einer 1:400 Verdünnung und dem IgG-Sekundärantikörper in einer 1:5.000 Verdünnung (entsprechend Protokoll aus Kapitel 3.7.4). Auf der linken Seite befindet sich die Größenbeschriftung der Markerbanden in der Einheit Kilodalton (kDa).	105
Abbildung 22: Extinktionen im ELISA von larvalem ES-Antigen und IgG (1 : 10.000) mit den Seren von fünf koproskopisch positiven Fohlen (rot) und fünf koproskopisch negativen Fohlen (blau). Fohlen 10, 23, 70, 107 und 113 hatten zu diesem Zeitpunkt die maximale Eiausscheidung von Spulwurmeiern. Die koproskopisch negativen Fohlen 28, 30, 67, 69 und 173 befanden sich zu diesem Zeitpunkt am Anfang des Probenentnahmezeitraumes.	107
Abbildung 23: OD-Werte im Verlauf des Untersuchungszeitraumes der in Abbildung 22 gezeigten fünf koproskopisch positiven Fohlen (10, 71, 76, 79 und 93).	108
Abbildung 24: OD-Werte im Verlauf des Untersuchungszeitraumes der in Abbildung 22 gezeigten fünf koproskopisch negativen Fohlen (28, 68, 100, 139 und 173).	108
Abbildung 25: OD-Werte koproskopisch positiver (Fohlen 10 und 76) und negativer Tiere (Fohlen 23 und 100) im Verlauf des Untersuchungszeitraumes unter Verwendung des adulten ES-Antigens.	110

10 Anhang

Tabelle 13: Untersuchungsprotokoll

	Datum	T°	T°K	Lunge	Trachea	Nasenausfluss	Lnn	Hu	Nabel	Durchfall	Leukos	A/Pn	Therapie	Sonstiges
Wochen														
1				obB 0	verschärft h=1 rasseln/geräuschen 2	ohne 0 Serös/mukös 1	obB 0 vergrößert 1 purulent 2							
2														
3														
4														
5														
6														
7														
8														
9														
10														
11														
12														
13														
14														
15														
16														
17														
18														

Tabelle 14: "Fohlentabelle"

Fohlennummer	Geburts-tag	Geburts-jahr	Geschlecht	Nabel-therapie	Lungen-therapie	Kopros-kopisch positiv <i>Parascaris</i> spp.	MDS	Weide-wochen	Präpatenz-tage	Lebenswoche bei erstem positiven EpG-Wert	Unter-suchte Lebens-wochen	EpG-MW	EpG-StAbw
1	10.05.	2012	w	nein	Ja	ja	ja	6	118	17	21	53	132
2	09.05.	2012	w	nein	Ja	ja	ja	4	132	19	22	5	12
3	09.05.	2012	w	ja	Ja	ja	ja	2	119	17	22	244	496
4	03.05.	2012	w	nein	nein	ja	nein	8	97	14	25	673	1200
5	02.05.	2012	m	nein	Ja	ja	nein	7	119	17	19	71	104
6	01.05.	2012	m	nein	Ja	ja	ja	9	141	20	24	2	7
7	29.05.	2012	w	nein	nein	nein	nein	6		0	25	0	0
8	04.04.	2011	w	ja	nein	ja	nein	8	149	21	22	4	8
9	30.03.	2011	m	nein	nein	ja	nein	16	140	20	24	23	63
10	29.03.	2011	w	nein	nein	ja	nein	10	120	17	23	294	561
11	27.03.	2011	w	nein	nein	ja	nein	10		0	19	171	245
12	19.03.	2011	w	nein	Ja	ja	ja	6	109	16	22	28	81
13	24.04.	2012	w	nein	Ja	ja	nein	5	120	17	19	21	35
14	20.04.	2012	m	nein	nein	ja	ja	8	131	19	23	103	247
15	17.04.	2012	w	nein	nein	ja	ja	13	120	17	22	239	354
16	24.04.	2012	w	nein	nein	ja	ja	16	120	17	24	200	283
17	24.04.	2012	w	nein	Ja	ja	ja	3	92	13	24	491	934
18	12.04.	2012	m	nein	Ja	ja	nein	5	132	19	21	170	377
19	27.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	7	126	18	23	22	38
20	17.04.	2011	w	nein	nein	ja	nein	11		0	23	42	132
21	22.04.	2011	w	nein	nein	ja	nein	13	159	23	27	16	60
22	14.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	13	167	24	26	0	1
23	10.04.	2011	m	nein	nein	ja	nein	11	122	17	25	240	467

Fohlen- nummer	Geburts- tag	Geburts- jahr	Geschlecht	Nabel- therapie	Lungen- therapie	Kopros- kopisch positiv <i>Parascaris</i> spp.	MDS	Weide- wochen	Präpatenz- tage	Lebenswoche bei erstem positiven EpG-Wert	Unter- suchte Lebens- wochen	EpG- MW	EpG- StAbw
24	28.03	2011	m	nein	nein	ja	nein	9	135	19	26	108	157
25	05.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	4	169	24	21	15	49
26	19.03.	2011	m	nein	nein	ja	nein	4	102	15	22	112	281
27	18.03.	2011	w	nein	nein	ja	nein	13	110	16	24	106	223
28	20.03.	2011	w	nein	nein	nein	ja	16		0	18	0	0
29	21.03.	2011	w	nein	nein	ja	nein	16	93	13	22	236	347
30	21.03.	2011	m	nein	nein	nein	ja	9		0	24	0	0
31	18.03.	2011	m	nein	nein	ja	ja	15	131	19	25	44	97
32	18.03.	2011	w	nein	nein	ja	nein	7	103	15	23	1	5
33	18.03.	2011	m	nein	nein	ja	ja	10		0	21	52	118
34	19.03.	2011	w	nein	nein	ja	nein	7	123	18	26	22	36
35	18.03.	2011	w	nein	nein	ja	nein	16	114	16	23	81	204
36	19.03.	2011	m	nein	nein	ja	ja	4		0	25	53	134
37	19.03.	2011	w	nein	nein	ja	nein	5	116	17	25	19	49
38	07.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	9	132	19	23	150	228
39	03.05.	2011	m	nein	nein	nein	ja	6		0	18	0	0
40	01.05.	2011	w	nein	nein	ja	ja	10	128	18	22	76	195
41	17.05.	2012	m	nein	Ja	ja	ja	5	124	18	19	6	21
42	24.03.	2011	m	nein	nein	ja	nein	9	111	16	27	19	42
43	21.03	2011	w	nein	nein	ja	ja	8	132	19	26	138	235
44	27.03.	2011	w	nein	Ja	ja	nein	3	108	15	24	143	209
45	26.03.	2011	w	nein	nein	ja	ja	10	109	16	26	98	116
46	25.03.	2011	w	nein	nein	ja	ja	9	110	16	25	170	383
47	27.03.	2011	m	nein	nein	ja	ja	12	101	14	22	380	680
48	28.03.	2011	w	nein	Ja	ja	nein	10	100	14	23	85	149

Fohlen- nummer	Geburts- tag	Geburts- jahr	Geschlecht	Nabel- therapie	Lungen- therapie	Kopros- kopisch positiv <i>Parascaris</i> spp.	MDS	Weide- wochen	Präpatenz- tage	Lebenswoche bei erstem positiven EpG-Wert	Unter- suchte Lebens- wochen	EpG- MW	EpG- StAbw
49	28.03	2011	w	nein	nein	ja	ja	10	121	17	25	62	179
50	24.03.	2011	w	nein	nein	ja	nein	9	90	13	19	95	143
51	06.05.	2011	m	nein	nein	ja	nein	12	110	16	24	5	11
52	05.05.	2011	m	nein	Ja	nein	nein	3		0	20	0	0
53	05.05.	2011	w	nein	Ja	ja	nein	0	111	16	22	28	46
54	04.05.	2011	w	ja	Ja	ja	nein	4	126	18	24	22	61
55	01.05.	2011	m	nein	Ja	ja	nein	8	150	21	19	28	113
56	01.05.	2011	m	nein	nein	ja	nein	13	143	20	21	19	50
57	30.04.	2011	m	nein	nein	ja	nein	4	137	20	25	19	53
58	30.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	5	144	21	23	1	4
59	30.04.	2011	w	nein	Ja	nein	nein	0		0	24	0	0
60	30.04.	2011	w	nein	nein	nein	nein	12		0	24	0	0
61	30.04.	2011	m	nein	nein	nein	ja	6		0	25	0	0
62	29.03.	2011	m	nein	nein	ja	nein	16	106	15	26	15	39
63	30.03.	2011	m	nein	nein	ja	nein	6	126	18	21	11	97
64	29.03.	2011	w	nein	Ja	ja	ja	6	155	22	24	26	27
65	29.03.	2011	m	nein	nein	ja	ja	13		0	25	56	61
66	29.03.	2011	m	nein	Ja	ja	nein	5	176	25	21	7	31
67	28.03.	2011	m	nein	nein	nein	nein	14		0	23	0	0
68	27.03	2011	m	nein	nein	nein	nein	0		0	24	0	0
69	22.03	2011	w	nein	Ja	nein	nein	0		0	17	0	0
70	23.03.	2011	w	nein	Ja	ja	nein	4	119	17	24	271	523
71	23.03.	2011	m	nein	nein	ja	ja	12	91	13	26	190	329
72	23.03.	2011	m	nein	nein	ja	nein	4	126	18	22	1	3
73	22.03.	2011	w	nein	ja	ja	nein	9	113	16	26	59	86

Fohlen- nummer	Geburts- tag	Geburts- jahr	Geschlecht	Nabel- therapie	Lungen- therapie	Kopros- kopisch positiv <i>Parascaris</i> spp.	MDS	Weide- wochen	Präpatenz- tage	Lebenswoche bei erstem positiven EpG-Wert	Unter- suchte Lebens- wochen	EpG- MW	EpG- StAbw
74	22.03.	2011	m	nein	ja	ja	nein	0	127	18	20	5	13
75	21.03.	2011	w	nein	ja	ja	nein	0	184	26	19	2	7
76	24.03.	2011	m	nein	nein	ja	nein	1	90	13	22	46	89
77	24.03.	2011	w	nein	nein	ja	nein	14	111	16	24	67	150
78	24.03.	2011	w	nein	ja	ja	nein	5	111	16	24	131	229
79	09.04.	2011	w	nein	ja	ja	ja	8	123	18	22	282	656
80	09.04.	2011	m	nein	nein	ja	nein	10	123	18	22	36	68
81	09.04.	2011	m	nein	ja	ja	nein	11	123	18	25	28	58
82	08.04.	2011	m	nein	nein	ja	nein	14	124	18	26	117	187
83	11.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	14	114	16	25	71	123
84	11.04.	2011	m	nein	nein	ja	nein	12	156	22	23	2	6
85	30.03.	2011	m	nein	ja	ja	nein	5	154	22	25	10	27
86	01.04.	2011	m	nein	ja	ja	nein	6	146	21	27	7	16
87	31.03.	2011	w	nein	ja	ja	nein	0	167	24	25	10	33
88	31.03.	2011	w	nein	nein	ja	nein	6	153	22	21	1	3
89	01.04.	2011	m	nein	nein	nein	ja	14		0	24	0	0
90	30.03.	2011	m	nein	ja	ja	nein	3	147	21	20	22	52
91	30.03.	2011	w	nein	nein	ja	nein	10	126	18	23	69	131
92	30.03.	2011	w	nein	nein	ja	ja	8	147	21	20	108	285
93	29.03.	2011	m	nein	nein	ja	nein	5	113	16	23	18	28
94	02.05.	2011	m	nein	nein	nein	nein	7		0	25	0	0
95	04.05.	2011	m	nein	ja	ja	nein	4	133	19	24	1	3
96	04.05.	2011	w	nein	nein	ja	nein	6	119	17	23	17	37
97	03.05.	2011	m	ja	nein	ja	nein	13		0	17	102	265
98	04.05.	2011	w	ja	nein	ja	ja	4	131	19	22	2	8

Fohlen- nummer	Geburts- tag	Geburts- jahr	Geschlecht	Nabel- therapie	Lungen- therapie	Kopros- kopisch positiv <i>Parascaris</i> spp.	MDS	Weide- wochen	Präpatenz- tage	Lebenswoche bei erstem positiven EpG-Wert	Unter- suchte Lebens- wochen	EpG- MW	EpG- StAbw
99	19.04.	2011	m	nein	nein	ja	nein	2	162	23	22	28	113
100	18.04.	2011	m	ja	nein	nein	ja	14		0	24	0	0
101	17.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	14	115	16	26	31	118
102	17.04.	2011	w	nein	nein	nein	nein	16		0	24	0	0
103	17.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	7	136	19	25	27	56
104	16.04.	2011	w	nein	ja	ja	nein	13		0	25	4	16
105	16.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	8	60	9	24	162	405
106	15.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	12	117	17	25	19	40
107	16.04.	2011	w	nein	nein	ja	nein	10	130	19	22	131	231
108	12.04.	2011	w	ja	nein	ja	nein	8	127	18	27	23	45
109	12.04.	2011	m	ja	nein	ja	nein	5	141	20	25	24	61
110	11.04.	2011	m	ja	nein	nein	nein	13		0	21	0	0
111	11.04.	2011	w	nein	ja	ja	nein	3	128	18	26	99	202
112	11.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	5	163	23	22	8	34
113	10.04.	2011	m	nein	ja	ja	nein	4	122	17	22	987	1946
114	10.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	13	143	20	22	21	45
115	19.04.	2011	w	nein	ja	ja	nein	5	162	23	25	0	2
116	21.04.	2011	m	nein	ja	ja	nein	5	146	21	24	18	52
117	09.05.	2011	m	nein	ja	ja	nein	2	149	21	26	14	54
118	22.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	9	129	18	24	117	324
119	20.04.	2011	m	nein	ja	nein	nein	1		0	24	0	0
120	18.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	13	121	17	25	80	157
121	18.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	11	142	20	19	17	46
122	18.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	11	114	16	25	6	14
123	17.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	12	136	19	24	1	2

Fohlen- nummer	Geburts- tag	Geburts- jahr	Geschlecht	Nabel- therapie	Lungen- therapie	Kopros- kopisch positiv <i>Parascaris</i> spp.	MDS	Weide- wochen	Präpatenz- tage	Lebenswoche bei erstem positiven EpG-Wert	Unter- suchte Lebens- wochen	EpG- MW	EpG- StAbw
124	18.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	11	128	18	17	19	34
125	06.05.	2011	m	nein	nein	ja	nein	7	124	18	24	16	32
126	30.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	13	130	19	23	48	113
127	28.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	0	146	21	22	36	131
128	28.04.	2011	w	nein	nein	ja	nein	4	142	20	26	3	7
129	29.04.	2011	m	nein	ja	ja	nein	3	138	20	26	41	136
130	25.04.	2011	w	ja	nein	nein	nein	10		0	24	0	0
131	23.04.	2011	m	nein	ja	nein	nein	0		0	27	0	0
132	22.04.	2011	w	ja	nein	ja	nein	13	124	18	25	1	3
133	27.04.	2011	m	nein	nein	ja	nein	14	126	18	21	4	14
134	27.04.	2011	m	nein	nein	ja	nein	14	98	14	24	14	56
135	27.04.	2011	m	ja	ja	ja	nein	8	154	22	25	1	2
136	27.04.	2011	m	nein	ja	ja	nein	3	112	16	19	0	1
137	27.04.	2011	m	nein	nein	ja	nein	10	147	21	24	3	9
138	27.04.	2011	w	nein	nein	ja	nein	7	126	18	24	10	24
139	26.04.	2011	m	ja	ja	nein	nein	0		0	26	0	0
140	26.04.	2011	w	nein	nein	ja	nein	14	99	14	19	66	146
141	01.04.	2011	m	ja	ja	ja	nein	2	166	24	26	5	15
142	02.04.	2011	m	nein	nein	ja	nein	10	165	24	27	2	7
143	04.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	11	135	19	22	52	102
144	31.03.	2011	m	nein	nein	ja	nein	11		0	22	36	90
145	01.04.	2011	w	nein	nein	ja	nein	2	166	24	27	4	11
146	01.04.	2011	w	nein	ja	ja	nein	3	145	21	21	55	97
147	01.04.	2011	m	ja	ja	ja	nein	3	166	24	25	2	7
148	02.04.	2011	w	nein	nein	ja	nein	15	137	20	27	58	147

Fohlen- nummer	Geburts- tag	Geburts- jahr	Geschlecht	Nabel- therapie	Lungen- therapie	Kopros- kopisch positiv <i>Parascaris</i> spp.	MDS	Weide- wochen	Präpatenz- tage	Lebenswoche bei erstem positiven EpG-Wert	Unter- suchte Lebens- wochen	EpG- MW	EpG- StAbw
149	16.04.	2011	w	nein	nein	ja	nein	15	116	17	23	3	7
150	17.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	14	143	20	24	58	162
151	16.04.	2011	m	ja	ja	ja	ja	3	148	21	24	4	17
152	15.04.	2011	m	nein	nein	ja	nein	13	131	19	26	13	42
153	12.04.	2011	m	nein	ja	ja	nein	7	134	19	27	19	41
154	15.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	12		0	22	37	70
155	15.04.	2011	w	nein	nein	ja	nein	11	110	16	25	55	175
156	15.04.	2011	w	ja	nein	ja	nein	12	138	20	23	83	216
157	12.04.	2011	w	nein	nein	nein	nein	6		0	19	0	0
158	07.04.	2011	w	ja	nein	ja	ja	11	132	19	22	23	39
159	05.04.	2011	m	ja	nein	ja	nein	15	162	23	24	2	6
160	05.04.	2011	m	nein	ja	ja	nein	3	162	23	24	6	20
161	06.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	8	133	19	26	117	250
162	06.04.	2011	m	nein	ja	ja	nein	8	133	19	26	30	61
163	06.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	13	140	20	24	45	77
164	12.04.	2011	w	nein	nein	ja	nein	15	141	20	25	7	24
165	08.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	9	145	21	23	1	6
166	07.04.	2011	w	nein	nein	ja	nein	16	146	21	28	2	6
167	04.04.	2011	m	nein	ja	ja	nein	5	135	19	25	21	77
168	05.04.	2011	w	nein	ja	ja	nein	2	141	20	26	24	62
169	06.04.	2011	m	ja	ja	ja	ja	4	154	22	23	3	14
170	24.04.	2011	m	nein	nein	ja	nein	10	150	21	23	4	14
171	06.05.	2011	w	nein	ja	ja	nein	5	138	20	24	22	61
172	11.04.	2011	m	nein	ja	ja	nein	9	149	21	21	1	3
173	02.04.	2011	m	nein	nein	nein	nein	15		0	20	0	0

Fohlen- nummer	Geburts- tag	Geburts- jahr	Geschlecht	Nabel- therapie	Lungen- therapie	Kopros- kopisch positiv <i>Parascaris</i> spp.	MDS	Weide- wochen	Präpatenz- tage	Lebenswoche bei erstem positiven EpG-Wert	Unter- suchte Lebens- wochen	EpG- MW	EpG- StAbw
174	27.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	5	112	16	25	30	64
175	29.04.	2011	w	nein	ja	ja	nein	4	131	19	17	12	31
176	08.04.	2011	m	ja	ja	nein	ja	1		0	22	0	0
177	09.04.	2011	w	nein	nein	ja	nein	16	137	20	20	3	10
178	28.03.	2011	w	nein	nein	ja	nein	9	107	15	24	15	31
179	04.05.	2011	m	nein	ja	nein	nein	6		0	25	0	0
180	29.03.	2011	m	nein	ja	ja	nein	2	134	19	25	58	101
181	20.04.	2011	m	nein	nein	ja	nein	6	147	21	25	31	104
182	08.04.	2011	w	nein	nein	ja	nein	15	145	21	26	2	6
183	01.05.	2011	w	nein	nein	ja	nein	13	122	17	24	5	17
184	08.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	16	117	17	25	35	143
185	04.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	0	149	21	23	34	90
186	06.04.	2011	m	nein	nein	ja	ja	0	133	19	24	46	85
187	14.04.	2011	w	nein	ja	ja	nein	8	146	21	20	17	47
188	24.03.	2011	m	nein	nein	ja	nein	10	97	14	20	38	66
189	20.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	1	147	21	23	1	2
190	26.03.	2011	w	nein	nein	ja	ja	11	151	22	22	21	44
191	20.03.	2011	w	nein	nein	ja	ja	7	164	23	24	19	56
192	12.04.	2011	m	nein	ja	ja	nein	2	155	22	22	14	32
193	05.04.	2011	m	nein	ja	ja	ja	6		0	24	68	289
194	26.03.	2011	m	nein	nein	ja	ja	15	102	15	22	79	186
195	03.05.	2012	w	nein	nein	ja	ja	10	111	16	25	20	52
196	03.05.	2012	w	nein	ja	ja	ja	8	118	17	25	513	603
197	03.05.	2012	w	nein	nein	ja	ja	8	90	13	20	61	124
198	02.05.	2012	w	ja	nein	ja	nein	13	112	16	21	105	154

Fohlen- nummer	Geburts- tag	Geburts- jahr	Geschlecht	Nabel- therapie	Lungen- therapie	Kopros- kopisch positiv <i>Parascaris</i> spp.	MDS	Weide- wochen	Präpatenz- tage	Lebenswoche bei erstem positiven EpG-Wert	Unter- suchte Lebens- wochen	EpG- MW	EpG- StAbw
199	08.04.	2011	w	nein	ja	ja	nein	4	121	17	22	49	138
200	03.05.	2012	w	nein	ja	ja	ja	5	97	14	21	116	190
201	25.04.	2012	m	ja	ja	ja	nein	5	147	21	26	7	52
202	02.05.	2012	w	ja	ja	ja	nein	4	119	17	24	27	804
203	03.05.	2012	m	ja	ja	ja	nein	8	110	16	24	686	74
204	02.05.	2012	m	nein	ja	ja	nein	6	126	18	23	25	1312
205	02.05.	2012	w	nein	nein	ja	ja	9	98	14	27	1065	784
206	02.05.	2012	m	ja	ja	ja	ja	8	98	14	21	689	16
207	09.04.	2012	m	ja	ja	ja	nein	1	121	17	20	12	240
208	10.05.	2012	m	ja	ja	ja	ja	3	104	15	22	110	93
209	18.04.	2012	m	nein	ja	ja	nein	7	112	16	21	47	100
210	09.04.	2012	w	nein	ja	ja	nein	6	156	22	23	46	10
211	19.05.	2012	m	ja	ja	ja	nein	4	123	18	23	3	134
212	10.04.	2012	m	nein	nein	ja	ja	13	148	21	21	59	101
213	24.04.	2012	w	nein	ja	ja	nein	0	127	18	25	51	1
214	09.04.	2012	w	nein	nein	ja	nein	11	121	17	25	0	153
215	18.04.	2012	m	nein	nein	ja	nein	12	119	17	25	83	261
216	21.04.	2012	w	nein	ja	ja	ja	8	109	16	19	137	2072
217	24.04.	2012	m	ja	nein	ja	ja	14	113	16	23	896	30
218	10.04.	2012	m	nein	ja	ja	nein	4	120	17	27	23	0
219	24.04.	2012	w	nein	ja	nein	nein	3		0	21	0	62
220	23.04.	2012	w	nein	nein	ja	nein	8	121	17	23	32	226
221	10.04.	2012	w	nein	ja	ja	nein	9	120	17	21	157	7
222	17.05.	2012	w	ja	nein	ja	ja	10	161	23	24	2	23
223	09.04.	2012	w	nein	ja	ja	nein	4	128	18	22	15	454

Fohlen- nummer	Geburts- tag	Geburts- jahr	Geschlecht	Nabel- therapie	Lungen- therapie	Kopros- kopisch positiv <i>Parascaris</i> spp.	MDS	Weide- wochen	Präpatenz- tage	Lebenswoche bei erstem positiven EpG-Wert	Unter- suchte Lebens- wochen	EpG- MW	EpG- StAbw
224	01.05.	2012	m	ja	ja	ja	ja	13	114	16	24	261	239
225	24.04.	2012	w	ja	nein	ja	ja	13	120	17	24	142	1727
226	26.04.	2012	w	nein	ja	ja	nein	8	104	15	23	1120	45
227	09.05.	2012	w	nein	ja	ja	ja	6	126	18	19	22	332
228	20.04.	2012	m	nein	nein	ja	nein	10	90	13	23	310	398
229	02.05.	2012	w	nein	nein	ja	nein	13	112	16	27	276	172
230	20.04.	2012	w	nein	ja	ja	ja	6	103	15	20	112	290
231	09.05.	2012	m	nein	ja	ja	nein	8	112	16	25	147	4
232	10.05.	2012	w	nein	ja	ja	ja	6	125	18	21	2	2
233	17.05.	2012	m	nein	ja	ja	ja	4	69	10	22	1	11
234	25.04.	2012	w	nein	ja	ja	nein	9	119	17	22	7	8
235	02.05.	2012	m	nein	nein	ja	ja	9	147	21	19	2	11
236	17.04.	2012	w	nein	ja	ja	ja	5	148	21	23	6	249
237	09.04.	2012	m	nein	nein	ja	ja	11	114	16	24	234	457
238	01.05.	2012	m	nein	ja	ja	ja	9	99	14	26	315	214
239	07.05.	2012	m	nein	nein	ja	ja	13	107	15	27	110	109
240	24.04.	2012	m	ja	ja	ja	nein	5	106	15	20	72	18
241	23.04.	2012	m	ja	ja	ja	ja	6	149	21	23	3	7
242	18.04.	2012	w	ja	ja	ja	nein	9	119	17	27	118	193
243	18.04.	2012	w	nein	nein	ja	nein	11	119	17	23	144	218
244	20.04.	2012	w	nein	ja	ja	nein	6		0	21	5	16
245	17.05.	2012	w	nein	ja	ja	nein	5	97	14	24	2	4
246	19.04.	2012	m	nein	ja	ja	nein	6	118	17	23	465	527
247	04.05.	2012	w	nein	nein	ja	ja	9	96	14	25	519	692
248	10.04.	2012	m	nein	ja	ja	nein	4	127	18	24	4	11

Fohlen- nummer	Geburts- tag	Geburts- jahr	Geschlecht	Nabel- therapie	Lungen- therapie	Kopros- kopisch positiv <i>Parascaris</i> spp.	MDS	Weide- wochen	Präpatenz- tage	Lebenswoche bei erstem positiven EpG-Wert	Unter- suchte Lebens- wochen	EpG- MW	EpG- StAbw
249	09.04.	2012	w	nein	nein	ja	ja	8	128	18	22	56	167
250	13.04.	2012	m	nein	ja	ja	ja	10	117	17	24	431	551
251	10.04.	2012	m	nein	ja	ja	ja	10	120	17	25	190	294
252	04.04.	2012	w	nein	ja	ja	ja	4	125	18	25	0	1
253	02.05.	2012	w	nein	ja	ja	ja	4	119	17	22	189	424
254	17.05.	2012	w	nein	nein	ja	ja	1	90	13	25	207	570
255	09.04.	2012	m	nein	ja	nein	nein	7		0	26	0	0
256	10.05.	2012	m	nein	nein	ja	nein	3	111	16	26	2	4
257	18.04.	2012	w	nein	nein	ja	ja	14	112	16	24	119	193
258	01.05.	2012	w	nein	nein	ja	ja	10	120	17	17	885	1803
259	23.04.	2012	m	nein	nein	ja	ja	4	135	19	25	36	85
260	17.05.	2012	m	nein	ja	ja	ja	8		0	22	14	45
261	17.04.	2012	w	nein	nein	ja	ja	10	99	14	22	170	385
262	09.04.	2012	m	ja	ja	ja	nein	9	163	23	27	5	18
263	09.04.	2012	m	ja	nein	ja	ja	6	114	16	25	140	202
264	25.04.	2012	w	nein	nein	ja	ja	12	140	20	26	39	84
265	17.05.	2012	m	nein	ja	ja	ja	6	125	18	27	15	47
266	10.05.	2012	w	nein	ja	ja	ja	8	132	19	20	8	23
267	09.05.	2012	w	nein	nein	ja	ja	14	119	17	24	154	237
268	20.04.	2012	w	nein	ja	nein	ja	4		0	26	0	0
269	17.05.	2012	w	nein	nein	ja	ja	7	125	18	21	1	1
270	25.04.	2012	m	ja	nein	ja	ja	14	111	16	19	10	17
271	12.04.	2012	w	nein	ja	ja	nein	4		0	24	110	216
272	09.05.	2012	w	nein	ja	ja	nein	4	126	18	24	10	25
273	11.04.	2012	m	ja	nein	ja	ja	15	133	19	22	61	115

Fohlen- nummer	Geburts- tag	Geburts- jahr	Geschlecht	Nabel- therapie	Lungen- therapie	Kopros- kopisch positiv <i>Parascaris</i> spp.	MDS	Weide- wochen	Präpatenz- tage	Lebenswoche bei erstem positiven EpG-Wert	Unter- suchte Lebens- wochen	EpG- MW	EpG- StAbw
274	18.04.	2012	m	nein	nein	ja	ja	14	119	17	27	93	133
275	09.04.	2012	m	ja	ja	ja	ja	10	121	17	23	408	603
276	01.05.	2012	m	nein	nein	ja	ja	9	100	14	22	74	103
277	20.04.	2012	w	nein	ja	ja	ja	8	110	16	24	236	368
278	10.05.	2012	m	nein	ja	ja	nein	6	118	17	26	63	167
279	09.05.	2012	w	nein	nein	ja	nein	4	140	20	22	0	1
280	09.04.	2012	m	nein	nein	ja	ja	11	128	18	23	46	69
281	17.04.	2012	m	ja	ja	ja	nein	6	120	17	17	484	777
282	14.04.	2012	w	nein	ja	ja	nein	4	123	18	26	149	238
283	24.04.	2012	m	ja	nein	ja	ja	14	120	17	24	16	26
284	21.04.	2012	m	nein	nein	nein	nein	3		0	19	0	0
285	23.04.	2012	w	nein	ja	ja	nein	8	76	11	18	238	391
286	10.04.	2012	w	nein	ja	ja	nein	5	134	19	23	26	49
287	13.04.	2012	m	nein	ja	ja	ja	9	117	17	23	149	201
288	13.04.	2012	m	nein	ja	ja	nein	7	145	21	24	4	7
289	20.04.	2012	w	ja	ja	ja	ja	4	110	16	24	180	202
290	17.05.	2012	w	nein	ja	ja	ja	3	125	18	20	15	43
291	08.04.	2012	m	nein	ja	ja	ja	3	150	21	24	7	15
292	23.04.	2012	w	ja	nein	ja	ja	16	128	18	23	202	362
293	09.04.	2012	w	nein	ja	ja	nein	5	135	19	20	38	55
294	18.04.	2012	m	nein	nein	ja	ja	13	119	17	22	39	60
295	17.04.	2012	m	nein	ja	ja	ja	5	120	17	22	164	214
296	18.04.	2012	w	nein	ja	ja	ja	3	103	15	20	213	313
297	19.04.	2012	m	nein	ja	ja	ja	4	118	17	23	26	38
298	10.05.	2012	w	nein	ja	ja	ja	9	118	17	23	16	36

Fohlen- nummer	Geburts- tag	Geburts- jahr	Geschlecht	Nabel- therapie	Lungen- therapie	Kopros- kopisch positiv <i>Parascaris</i> spp.	MDS	Weide- wochen	Präpatenz- tage	Lebenswoche bei erstem positiven EpG-Wert	Unter- suchte Lebens- wochen	EpG- MW	EpG- StAbw
299	01.05.	2012	w	nein	nein	ja	nein	10	127	18	20	3	7
300	09.05.	2012	m	nein	nein	nein	nein	4		0	25	0	0
301	03.05.	2012	w	ja	ja	nein	nein	0		0	20	0	0
302	10.05.	2012	m	nein	nein	ja	nein	12	113	16	21	32	103
303	10.05.	2012	w	nein	ja	ja	ja	6	111	16	22	403	574
304	10.05.	2012	m	nein	nein	ja	ja	8	111	16	19	36	76
305	16.04.	2012	w	nein	nein	ja	ja	7	128	18	22	140	187
306	21.04.	2012	w	ja	ja	ja	nein	7	116	17	21	147	249
307	21.04.	2012	w	nein	ja	ja	nein	5	109	16	19	235	458
308	23.04.	2012	w	nein	nein	ja	ja	11	107	15	23	50	59
309	12.04.	2012	w	nein	ja	ja	ja	9	104	15	24	13	20
310	10.04.	2012	m	ja	ja	ja	nein	0	119	17	21	9	10
311	12.04.	2012	w	nein	ja	ja	ja	5	118	17	22	156	180
312	09.04.	2012	m	nein	ja	nein	ja	9		0	23	0	0
313	03.05.	2012	w	nein	nein	ja	ja	8	90	13	24	21	39
314	08.04.	2012	m	nein	nein	ja	ja	10	122	17	19	197	268
315	25.04.	2012	m	ja	ja	nein	nein	0		0	21	0	0
316	17.05.	2012	w	nein	nein	nein	nein	4		0	24	0	0
317	24.04.	2012	m	nein	ja	ja	ja	8	106	15	24	102	146
318	10.04.	2012	m	nein	ja	ja	ja	4	120	17	23	62	109
319	17.05.	2012	w	nein	nein	nein	ja	8		0	23	0	0
320	19.05.	2012	m	ja	ja	nein	nein	6		0	14	0	0
321	01.06.	2012	w	nein	nein	nein	nein	6		0	23	0	0
322	19.05.	2012	m	nein	nein	ja	nein	7	123	18	22	10	34
323	18.05.	2012	m	nein	ja	ja	nein	5	131	19	21	7	27

Fohlen- nummer	Geburts- tag	Geburts- jahr	Geschlecht	Nabel- therapie	Lungen- therapie	Kopros- kopisch positiv <i>Parascaris</i> spp.	MDS	Weide- wochen	Präpatenz- tage	Lebenswoche bei erstem positiven EpG-Wert	Unter- suchte Lebens- wochen	EpG- MW	EpG- StAbw
324	19.05.	2012	m	nein	ja	nein	ja	4		0	23	0	0
325	19.05.	2012	m	ja	nein	nein	nein	4		0	20	0	0
326	18.05.	2012	m	nein	nein	ja	ja	8	131	19	21	3	8
327	19.05.	2012	w	nein	nein	ja	ja	3	130	19	21	2	6
328	17.05.	2012	m	nein	nein	ja	ja	7	118	17	24	40	95
329	18.05.	2012	m	nein	ja	ja	nein	2	131	19	23	17	53
330	18.05.	2012	w	nein	nein	ja	nein	10	119	17	24	2	8
331	18.05.	2012	w	nein	nein	nein	nein	1		0	24	0	0
332	29.05.	2012	m	ja	ja	nein	nein	0		0	21	0	0
333	22.05.	2012	m	nein	nein	ja	ja	2	64	9	22	1	3
334	22.05.	2012	w	ja	nein	ja	ja	10	127	18	19	33	106
335	21.05.	2012	m	nein	ja	ja	nein	0	86	12	21	38	69
336	25.03.	2011	m	nein	ja	ja	nein	0	110	16	21	27	78
337	14.04.	2011	w	nein	nein	ja	ja	14	132	19	17	32	94
338	19.05.	2012	m	ja	ja	nein	nein	4		0	20	0	0
339	24.03.	2011	m	nein	nein	ja	ja	8		0	22	56	110
340	10.05.	2012	m	nein	nein	ja	nein	11	132	19	22	1	2
341	01.05.	2011	m	nein	ja	nein	nein	0		0	19	0	0
342	01.05.	2011	m	nein	ja	nein	nein	4		0	13	0	0
343	11.04.	2012	m	nein	ja	ja	ja	1	126	18	23	46	58
344	23.03.	2011	m	nein	nein	ja	ja	3	119	17	21	194	268
345	18.04.	2012	m	ja	nein	ja	nein	15	126	18	20	185	300
346	01.04.	2011	m	nein	nein	nein	nein	15		0	20	0	0
347	20.04.	2012	w	ja	ja	ja	ja	7		0	19	211	348

Tabelle 15: Regressionsergebnisse

Signifikanz-Code: 0 ‘****’ 0.001 ‘***’ 0.01 ‘**’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

Verwendete Abkürzungen in den statistischen Berechnungen:

Epg	EpG-Wert für <i>Parascaris</i> spp.
Geschl	Geschlecht
Klin_score	Klinischer Score
Leuko	Leukozytenwert
Lt	Lungentherapie
Luks	Lungenultraschallbefund
Luks_mi	Mittelwert des Scores zum Lungenultraschallbefund
Lw	Lebenswoche
Lw_pos	Lebenswoche zum ersten koproskopisch positiven Spulwurmbefund
Mds	Magen-Darm-Strongyliden
Monat	Geburtsmonat (März/April oder Mai/Juni)
Na	Nasenausflussscore
Na_mi	Mittelwert des Nasenausflussscores
Nt	Nabeltherapie
Para	Datensatz aller Parameter beider Projektjahre nach Chipnummern der Fohlen sortiert
Paras	koproskopisch <i>Parascaris</i> spp. positives Fohlen
Pi	Plasmainfusion
Prap_d	Lebenstag zum ersten positiven Kotbefund
Weide	Weideaufenthalt (Kategorie 1 < 4 Wochen; Kategorie 2 4 - 6 Wochen; Kategorie 3 > 8 Wochen)
Weide_wo	Anzahl der Weidewochen
Zeit_sortiert	Datensatz aller Fohlen in beiden Projektjahren nach Lebenswochen sortiert

10 Anhang

logit1<-glm(paras~geschl+jahr+monat+pi+nt+lt, data=para,family=binomial(link="logit"))

	Schätzwert	Standardfehler	z-Wert	Pr(> z)	Signifikanz	Odds Ratio
Schnitt- punkte	1.85290	0.29794	6.219	5e-10	***	6.378262e+00
Geschlecht	0.51968	0.34325	1.514	0.13003		1.681492e+00
Jahr	0.77218	0.39547	1.953	0.05087	‘.’	2.164488e+00
Monat	-1.06471	0.38808	-2.744	0.00608	**	3.448277e-01
Plasma- infusion	14.61880	1048.68577	0.014	0.98888		2.232867e+06
Nabel- therapie	-0.66488	0.40423	-1.645	0.10001		5.143343e-01
Lungen- therapie	-0.05144	0.34755	-0.148	0.88234		9.498599e-01

logit2<-glm(paras~weide_wo+mds+monat+jahr,data=para,family=binomial(link="logit"),
control=glm.control(maxit=70))

	Schätzwert	Standardfehler	z-Wert	Pr(> z)	Signifikanz	Odds Ratio
Schnitt- punkte	1.082769	0.35591	3.056	0.00224	**	2.9674051
Weidewochen	0.09151	0.05113	2.225	0.02609	*	1.0958311
MDS	0.80325	0.38465	2.088	0.03677	*	2.2327884
Monat	-0.90350	0.38574	-2.342	0.01917	*	0.4051473
Jahr	0.50585	0.38686	1.308	0.19102		1.6583956

```
logit3<-glm(paras~geschl+jahr+monat+na_mi+luks_mi,
data=para,family=binomial(link="logit"))
```

	Schätzwert	Standardfehler	z-Wert	Pr(> z)	Signifikanz	Odds Ratio
Schnitt- punkte	3.0094	2.0806	1.446	0.14806		20.2753750
Geschlecht	0.5792	0.3385	1.711	0.08712		1.7845728
Jahr	0.6543	0.3826	1.710	0.08725		1.9238090
Monat	-1.0356	0.3864	-2.680	0.00735	**	0.3550002
Mittelwert Nasenausfluss	-0,6187	1.0956	-0,565	0.57227		0.5386307
Mittelwert Lungen- ultraschall	-0.3923	0.6221	-0,631	0.52835		0.6755321

```
Logit5<-glm(paras~mds, data=parasit,family=binomial(link="logit"))
```

```
Logit6<-glm(paras~weide, data=parasit,family=binomial(link="logit"))
```

```
Logit7<-glm(paras~monat, data=parasit,family=binomial(link="logit"))
```

	Schätzwert	Standardfehler	z-Wert	Pr(> z)	Signifikanz	Odds Ratio
Schnitt- Punkt logit5	1.5849	0.1911	8.294	< 2e-16	***	4.878788
MDS	0.9730	0.3667	2.654	0.00797	**	2.645963
Schnitt- Punkt logit6	0.7664	0.4361	1.757	0.07890	.	2.151921
Weide	0.6238	0.2318	2.691	0.00713	**	1.866087
Schnitt- Punkt logit7	2.1669	0.2070	10.466	< 2e-16	***	8.7307691
Monat	-0.7265	0.3340	-2.175	0.0296	*	0.4836025

Statistische Berechnungen der Zeiteffekte

```
modell<-lmer(leuko~geschl+pi+nt+lt+prap_d+mds+na+luku+lw+(1|chip), data=zeit_sortiert)
```

	Schätzwert	Standardfehler	t-Wert	Pr(> z)	Signifikanz
Schnittpunkt	8.558262	0.661452	12.94	< 2e-16	***
Geschlecht	0.184924	0.187666	0.99	0.325	
Plasmainfusion	-0.739046	0.716518	-1.03	0.303	
Nabeltherapie	-0.667391	0.264077	-2.53	0.012	*
Lungentherapie	0.247389	0.191563	1.29	0.198	
Tag erster positiver Befund	-0.002317	0.004823	-0.48	0.631	
MDS	0.123607	0.191210	0.65	0.519	
Nasenausfluss	0.306033	0.067952	4.50	6.8e-06	***
Lungenultraschall	1.386686	0.049752	27.87	< 2e-16	***
Lebenswoche	0.225267	0.004694	47.99	< 2e-16	***

```
model2<-
```

```
lmer(epg~nt+lt+prap_d+mds+leuko+na+luku+klin_score+lw+(1|chip),data=zeit_sortiert)
```

	Schätzwert	Standardfehler	t-Wert	Pr(> z)	Signifikanz
Schnittpunkt	330.8582	72.7061	4.551	7.07e-06	***
Nabeltherapie	33.5444	27.1728	1.234	0.21806	
Lungentherapie	30.8898	19.8818	1.554	0.12138	
Tag erster positiver Befund	-3.0078	0.4914	-6.121	3.37e-09	***
MDS	30.7667	19.5635	1.573	0.11697	
Leukozyten	-5.7399	1.9001	-3.021	0.00254	**
Nasenausfluss	-9.5310	12.2516	-0.778	0.43665	
Lungenultraschall	-9.9784	8.0026	-1.247	0.21250	
Klinischer Score	-14.3908	5.5427	-2.596	0.00945	**
Lebenswoche	16.2942	0.9592	16.988	< 2e-16	***

```
model3<-lmer(na~geschl+pi+nt+lt+prap_d+mds+leuko+luks+lw +(1|chip), data=zeit_sortiert)
```

	Schätzwert	Standardfehler	t-Wert	Pr(> z)	Signifikanz
Schnittpunkt	1.8293687	0.0655036	27.928	< 2e-16	***
Geschlecht	0.0447789	0.0179785	2.491	0.013325	*
Plasmainfusion	-0.0817217	0.0685889	-1.191	0.234486	
Nabeltherapie	0.0596522 -	0.0254047	2.348	0.019548	*
Lungentherapie	-0.0777452	0.0184607	-4.211	3.38e-05	***
Tag erster positiver Befund	-0.0015344	0.0004611	-3.327	0.000994	***
MDS	-0.0004111	0.0183205	-0.022	0.982117	
Leukozyten	0.0094136	0.0021404	4.398	1.11e-05	***
Lungenultraschall	0.0279582	0.0094739	2.951	0.003177	**
Lebenswoche	0.0053499	0.0009815	5.451	5.19e-08	***

```
model4<-lmer(klin_score~geschl+pi+nt+lt+prap_d+mds+na+leuko+luks+lw+(1|chip),
data=zeit_sortiert)
```

	Schätzwert	Standardfehler	t-Wert	Pr(> z)	Signifikanz
Schnittpunkt	-0.5927843	0.1366605	-4.34	1.82e-05	***
Geschlecht	0.1157843	0.0356973	3.24	0.00133	**
Plasmainfusion	-0.3060667	0.1361480	-2.25	0.02537	*
Nabeltherapie	0.0910999	0.0504235	1.81	0.07188	.
Lungentherapie	-0.0829921	0.0366661	-2.26	0.02436	*
Tag erster positiver Befund	-0.0013467	0.0009161	-1.47	0.14271	
MDS	-0.0118269	0.0363603	-0.33	0.74523	
Nasenausfluss	1.0496051	0.0236743	44.34	< 2e-16	***
Leukozyten	0.0359510	0.0041347	8.69	< 2e-16	***
Lungenultraschall	0.1312067	0.0182344	7.20	6.91e-13	***
Lebenswoche	0.0304939	0.0018918	16.12	< 2e-16	***

Zusammenhang Lebenswochen und *Parascaris* spp.-EpG-Werte

(Lebenswoche 3 ist Referenzwoche):

```
lmer(as.numeric(zeit_sortiert$epg)~as.factor(zeit_sortiert$lw)+(1|chip),
data=zeit_sortiert,REML=TRUE)
```

	Schätzwert	Standardfehler	t-Wert	p-Wert	Signifikanz
(Intercept)	12.067	47.471	0.254	0.799352	
Lebenswoche 4	17.306	52.746	0.328	0.742842	
Lebenswoche 5	11.780	51.473	0.229	0.818994	
Lebenswoche 6	11.694	50.749	0.230	0.817776	
Lebenswoche 7	5.814	50.467	0.115	0.908290	
Lebenswoche 8	-4.905	50.240	-0.098	0.922229	
Lebenswoche 9	-4.360	50.235	-0.087	0.930843	
Lebenswoche 10	-8.031	49.804	-0.161	0.871907	
Lebenswoche 11	-16.544	49.717	-0.333	0.739333	
Lebenswoche 12	-11.980	49.673	-0.241	0.809420	
Lebenswoche)13	-9.809	49.622	-0.198	0.843303	
Lebenswoche 14	-8.245	49.571	-0.166	0.867900	
Lebenswoche)15	6.270	49.751	0.126	0.899716	
Lebenswoche 16	31.332	49.580	0.632	0.527454	
Lebenswoche 17	71.775	49.659	1.445	0.148417	
Lebenswoche 18	156.554	49.690	3.151	0.001639	**
Lebenswoche 19	213.025	49.727	4.284	1.87e-05	***
Lebenswoche 20	239.196	49.853	4.798	1.65e-06	***
Lebenswoche 21	191.967	49.985	3.840	0.000124	***
Lebenswoche 22	211.929	50.502	4.196	2.76e-05	***
Lebenswoche 23	206.437	51.141	4.037	5.50e-05	***
Lebenswoche 24	179.610	52.304	3.434	0.000600	***
Lebenswoche 25	146.327	55.934	2.616	0.008922	**
Lebenswoche 26	45.669	66.454	0.687	0.491968	
Lebenswoche 27	70.979	86.534	0.820	0.412118	
Lebenswoche 28	52.105	285.060	0.183	0.854974	

Zusammenhang erster koproskopisch positiver Befund und Nasenausfluss

```
olog0 <- clm(as.factor(na)~lw_pos, data=data0, link="logit")
```

Woche nach Ersten koproskopisch positiven Befund	Schätzwert	Standardfehler	p-Wert
0	-0,094	0,043	0,028*
1	-0,037	0,046	0,421
2	-0,063	0,052	0,227
3	-0,054	0,052	0,295
4	0,018	0,059	0,761
5	0,006	0,062	0,918
6	0,006	0,068	0,931
7	-0,084	0,085	0,323
8	0,024	0,093	0,798
9	-0,099	0,103	0,337
10	0,028	0,143	0,847

Publikationsverzeichnis

M. Völlger, J. Demeler, M. Lämmer, G. von Samson-Himmelstjerna (2012), Parasitological, clinical and serological examination on the progress of *Parascaris equorum* infections in foals, 9th International Conference on Equine Infectious Diseases (ICEID), Lexington, USA, 21.-26. October 2012

M. Köhler, J. Demeler, J. Krücken, M. Lämmer, G. von Samson-Himmelstjerna (2016), Klinische Untersuchungen zum Verlauf von *Parascaris*- Infektionen bei Fohlen, Tagung der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG), Berlin, Deutschland, 02.-04. Mai 2016

Danksagung

Als Erstes möchte ich Herrn Prof. v. Samson-Himmelstjerna für die Überlassung des Dissertationsthemas, die gute Zusammenarbeit und Geduld für meinen unkonventionellen Schreibstil danken. Die praktische Arbeit hat mir sehr viel Spaß bereitet und praktische Fertigkeiten für die Arbeit in der Pferdemedizin vermittelt. Bei Fragen und Problemen standen mir Herr Jürgen Krücken und besonders Frau Janina Demeler stets zur Seite. Ich bekam die Chance meine ersten Ergebnisse im Oktober 2012 in Lexington, USA, vorzustellen. Das war eine fantastische Erfahrung.

Dem ganzen Team der Parasitologie der FU Berlin gilt mein Dank, sei es für die Hilfe mit den *Parascaris*-Eiern, der Erlernung der FLOTAC-Methode, den ELISA- sowie Western Blot-Untersuchungen oder dem Fotografieren von *Parascaris*-Eiern. Es war eine schöne Zeit, die ich dort erleben durfte.

Die Arbeit und Probensammlung im Gestüt Lewitz wäre nicht ohne das tolle Team von Kollegen und Helfern vor Ort zu schaffen gewesen. Der damalige Gestütsleiter Herr Dr. Marc Lämmer ermöglichte mir die Zusammenarbeit und Probensammlung bei so vielen Fohlen. Jeden aufzuzählen wäre zu viel, doch ich möchte mich auf diese Weise für die unvergessliche Zeit und Unterstützung herzlich bedanken.

Ich möchte mich herzlich bei meiner Familie und engen Freunden bedanken, die mich stets unterstützten und ein offenes Ohr für mich hatten.

Während der „Laborzeit“ in Berlin hatte ich eine tolle Zeit und nach einem erfolgreichen oder –losen Tag im Institut stets einen schönen Feierabend.

Weiterhin möchte ich Werner Köhler für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die investierte Zeit danken.

Besonders danke ich Christian für seine grenzenlose Unterstützung und Hilfe bei den Tücken der Formatierung.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 25.10.2016

Melanie Köhler