

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

# **Anthelminthika-Resistenzsituation der gastrointestinalen Nematoden in nordostdeutschen Wiederkäuerbetrieben**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Paula Joséphine Ehnert  
Tierärztin  
aus St. Julien en Genevois, Frankreich

Berlin 2024

Journal-Nr.: 4449

Gedruckt mit Genehmigung

des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna
Zweite Gutachterin:	PD. Dr. Roswitha Merle
Dritte Gutachterin:	PD Dr. Carola Fischer-Tenhagen

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): nematodes, sheep, cattle, drug resistance, germany

Tag der Promotion: 19.06.2024

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>6</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>7</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>9</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>11</b>
<b>2 Literaturübersicht.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Die gastrointestinalen Nematoden der Wiederkäuer.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Krankheitsbild bei Schaf und Rind.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3 Übersicht anthelminthischer Wirkstoffe und Resistenzentwicklung.....</b>	<b>14</b>
2.3.1 Anthelminthische Wirkstoffe für das Schaf.....	15
2.3.2 Anthelminthische Wirkstoffe für das Rind.....	16
2.3.3 Benzimidazole.....	16
2.3.4 Makrozyklische Laktone.....	17
2.3.5 Imidazothiazole.....	18
<b>2.4 Anthelminthika-Resistenz.....</b>	<b>18</b>
2.4.1 Verbreitung von Anthelminthika-Resistenzen in Deutschland.....	19
<b>2.5 Nachweisdiagnostik.....</b>	<b>21</b>
2.5.1 Eizahlreduktionstest.....	21
2.5.2 Larvenmigrationshemmtest.....	25
2.5.3 Bestimmung der Spezieszusammensetzung mittels <i>Deep amplicon sequencing</i> .....	26
<b>2.6 Fragebogen Schaf- und Rinderbetriebe.....</b>	<b>27</b>
<b>2.7 Umfrage größtierpraktizierender Tierärzte.....</b>	<b>28</b>
<b>3 Material.....</b>	<b>29</b>
<b>4 Methoden.....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Überprüfung der Anthelminthika-Wirkung im Feld.....</b>	<b>34</b>
4.1.1 Feldstudie.....	34
4.1.2 Allgemeine Kriterien.....	34
<b>4.2 Durchführung Eizahl-Reduktionstest (EZRT).....</b>	<b>35</b>
4.2.1 Schaf.....	35
4.2.2 Rind.....	35
4.2.3 Mini-FLOTAC Untersuchungsverfahren zur Quantifizierung von Eiern.....	35
4.2.4 FLOTAC Untersuchungsverfahren zur Quantifizierung von Magen-Darm-Strongylideneiern.....	36
4.2.5 Statistische Auswertung.....	36
4.2.6 Eiisolierung zur Gewinnung von ersten Larvenstadien.....	37
4.2.7 Larvenkulturen zur Gewinnung von MDS-Drittlarven.....	38
<b>4.3 Larvenmigrationshemmtest.....</b>	<b>39</b>
4.3.1 Nematoden-Referenzisolate.....	39
4.3.2 Verdünnungsreihen Ivermectin.....	39
4.3.3 Verdünnungsreihe Levamisol.....	40
4.3.4 Durchführung der Larvenmigrationshemmtests.....	41
4.3.5 Auswertung der Larvenmigrationshemmtests.....	42
<b>4.4 Speziesbestimmung mittels <i>deep amplicon sequencing</i>.....</b>	<b>42</b>
4.4.1 DNA-Extraktion und 1. PCR.....	42
4.4.2 Prozessierung der PCR Produkte.....	43
4.4.3 Sequenzierung der ITS-2 PCR Produkte.....	44
4.4.4 Qualitätskontrolle und Auswertung der ITS-2 PCR Rohdaten.....	45

4.4.5	Biostatistische Auswertung .....	45
4.4.6	Fragebogen Schafbetriebe .....	46
<b>4.5</b>	<b>Fragebogen Rinderbetriebe .....</b>	<b>47</b>
<b>4.6</b>	<b>Umfrage großtierpraktizierender Tierärzte.....</b>	<b>48</b>
4.6.1	Statistische Auswertung.....	48
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
5.1	Versuchsbetriebe Schaf .....	50
5.2	Versuchsbetriebe Rind.....	50
5.3	Eizahlreduktionstest Schafbetriebe .....	50
5.4	Eizahlreduktionstest Rinderbetriebe .....	55
5.5	Larvenmigrationshemmtest der Schafnematoden .....	59
5.5.1	Eiisolierung und Larvenkulturen der Schafnematoden .....	59
5.5.2	Larvenmigrationshemmtest mit Levamisol und Ivermectin .....	60
5.6	Larvenmigrationshemmtest der Rindernematoden .....	62
5.6.1	Larvenkulturen Rindernematoden .....	62
5.6.2	Larvenmigrationshemmtest mit Levamisol.....	62
5.7	Speziesbestimmung mittels <i>Deep amplicon sequencing</i> .....	64
5.7.1	Ergebnisse der Sequenzierung von Schafnematoden .....	64
5.7.2	Ergebnisse der Sequenzierung von Rindernematoden .....	72
5.8	Fragebogen Schafbetriebe .....	74
5.9	Fragebogen Rinderbetriebe .....	76
5.10	Umfrage großtierpraktizierender Tierärzte.....	78
5.11	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	81
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>83</b>
6.1	Klinische Feldstudie zur Anthelminthika-Resistenz .....	83
6.1.1	Auswahl der Betriebe für den Eizahlreduktionstest.....	83
6.1.2	Ergebnisse der Eizahlreduktionstests von Schafbetrieben .....	86
6.1.3	Ergebnisse der Eizahlreduktionstests von Rinderbetrieben.....	87
6.2	Larvenmigrationshemmtest der Schafnematoden .....	88
6.3	Larvenmigrationshemmtest der Rindernematoden .....	90
6.4	<i>Deep amplicon sequencing</i> gastrointestinaler Nematoden Spezies .....	92
6.5	Fragebogen Schaf- und Rinderbetriebe .....	95
6.5.1	Weitere Tierspezies des Betriebes, Nachweiden der Schafe auf Rinderweiden .....	96
6.5.2	Ausübung des Berufs als Hauptberuf, Nebenerwerb oder Hobby .....	97
6.5.3	Haltungsform und Besatzdichte .....	97
6.5.4	Schafressen und Nutzungsrichtungen .....	99
6.5.5	Zukäufe und Quarantänemanagement .....	100
6.5.6	Entwurmungsmanagement.....	101
6.5.7	Anwendung der Anthelminthika .....	103
6.5.8	Diagnostik von Infektionsintensität und Anthelminthika-Resistenz .....	104
6.5.9	Informationsvermittlung und Entscheidungsverhalten der Tierhalter .....	105
6.6	Umfrage großtierpraktizierender Tierärzte.....	107
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>110</b>
<b>8</b>	<b>Summary.....</b>	<b>114</b>

<b>9</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>117</b>
<b>10</b>	<b><i>Anhang</i></b> .....	<b>136</b>
<b>11</b>	<b><i>Publikationsverzeichnis</i></b> .....	<b>162</b>
11.1	Vorträge.....	162
11.2	Poster .....	162
11.3	Publikationen.....	162
<b>12</b>	<b><i>Danksagung</i></b> .....	<b>163</b>
<b>13</b>	<b><i>Finanzierungsquellen – Funding Sources</i></b> .....	<b>164</b>
<b>14</b>	<b><i>Interessenkonflikte – Conflict of Interest</i></b> .....	<b>164</b>
<b>15</b>	<b><i>Selbstständigkeitserklärung</i></b> .....	<b>165</b>

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 4-1 Beispielhafte Durchführung eines Larvenmigrationsinhibitions-Test mit Betrieb 1 und 2
- Abb. 5-1 – 5-4 EPG Reduktion der Wirkstoffe Fenbendazol (FBZ), Ivermectin (IVM), Moxidectin (MOX) und Monepantel (MON) mit Median vor und nach Behandlung mit p-Werten nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test
- Abb. 5-5 – 5-7 EPG Reduktion mit Wirkstoffen Fenbendazol (FBZ), Ivermectin (IVM) und Eprinomectin (EPR) und Median vor und nach Behandlung mit p-Werten nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test
- Abb. 5-8 Konzentrations-Wirkungskurven im Larvenmigrationsinhibitions-Test für die Betriebe B1, B2, B4 und B5 vergleichend zu dem suszeptiblen *C. oncophora* Referenzwurmisolat
- Abb. 5-9 Konzentrations-Wirkungskurven im Larvenmigrationsinhibitions-Assay für die Betriebe B6, B7, B8 und B9 vergleichend zu dem suszeptiblen *C. oncophora* Referenzwurmisolat
- Abb. 5-10 Relative Spezieszusammensetzungen (in %) der Schafbetriebe vor der anthelminthischen Behandlung ohne Korrekturfaktoren
- Abb. 5-11 Relative Spezieszusammensetzungen (in %) der Schafbetriebe vor der anthelminthischen Behandlung mit Korrekturfaktoren
- Abb. 5-12 Abb. 5-12. Relative Spezieszusammensetzung (in %) des Schafbetriebs 5 vor und nach Behandlung
- Abb. 5-13 Abb. 5-12. Relative Spezieszusammensetzung (in %) des Schafbetriebs 7 vor und nach Behandlung
- Abb. 5-14 Abb. 5-12. Relative Spezieszusammensetzung (in %) des Schafbetriebs 9 vor und nach Behandlung
- Abb. 5-15 Abb. 5-12. Relative Spezieszusammensetzung (in %) des Schafbetriebs 10 vor und nach Behandlung
- Abb. 5-16 Relative Spezieszusammensetzungen (in %) der Rinderbetriebe vor der anthelminthischen Behandlung ohne Korrekturfaktoren
- Abb. 5-17 Relative Spezieszusammensetzungen (in %) der Rinderbetriebe vor der anthelminthischen Behandlung mit Korrekturfaktoren

## Tabellenverzeichnis

- Tab. 2-1 Einstufung der Wirksamkeit von Anthelminthika gemäß neuen W.A.A.V.P. Empfehlungen (Kaplan et al. 2023)
- Tab. 2-2 Vorherige Einstufung der Wirksamkeit von Anthelminthika gemäß W.A.A.V.P. Empfehlungen (Coles et al. 1992)
- Tab. 3-1 Anthelminthika
- Tab. 3-2 Chemikalien und Reagenzien
- Tab. 3-3 Puffer und Lösungen
- Tab. 3-4 Kits
- Tab. 3-5 Primer
- Tab. 3-6 Einwegartikel
- Tab. 3-7 Mehrwegartikel
- Tab. 3-8 Technische Geräte
- Tab. 3-9 Software
- Tab. 3-10 Nemaadenisolate
- Tab. 4-1 Herstellung der Verdünnungsreihe Ivermectin
- Tab. 4-2 Herstellung der Levamisol Verdünnungsreihe
- Tab. 4-3 NC1 und NC2 Gasser Primer mit Illumina Adaptern (fett)
- Tab. 4-4 Qualitätswerte ITS-2 Sequenzierung
- Tab. 4-5 Korrekturfaktoren Nematoden- Wirtsspezieskombination (Avramenko et al., 2015)
- Tab. 5-1 Schafbetriebe Nr. 1 – 12 mit Einsatz der Wirkstoffe Fenbendazol (FBZ), Ivermectin (IVM), Moxidectin (MOX) und Monepantel (MON) mit Eizahl-Reduktionswerten (EZR) und 90 % Konfidenzintervalls (KI)
- Tab. 5-2 Schafbetriebe Nr. 1 – 12 mit Wirkstoffen Fenbendazol (FBZ), Ivermectin (IVM), Moxidectin (MOX) und Monepantel (MON) und Median, 25 % und 75 % Quartile vor und nach Behandlung mit p-Werten nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test
- Tab. 5-3 Schafbetrieb Nr. 4. *Nematodirus* spp. Eizahl-Reduktionswerte (EZR) mit 90 % Konfidenzintervallen (KI)
- Tab. 5-4 Schafbetrieb Nr. 4 mit Wirkstoffen Fenbendazol (FBZ), Ivermectin (IVM) und Moxidectin (MOX) und Median, 25 % und 75 % Quartile vor und nach Behandlung mit p-Werten nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test
- Tab. 5-5 Rinderbetriebe Nr. 1 – 9 mit Einsatz der Wirkstoffe Fenbendazol (FBZ), Eprinomectin (EPR) und Ivermectin (IVM) mit Eizahl-Reduktionswerten (EZR) und 90 % Konfidenzintervallen (KI)
- Tab. 5-6 Rinderbetriebe Nr. 1 - 9 mit Wirkstoffen Fenbendazol (FBZ), Ivermectin (IVM) und Eprinomectin (EPR) und Median, 25 % und 75 % Quartile vor und nach Behandlung mit p-Werten nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test
- Tab. 5-7 Rinderbetrieb Nr. 6. *Nematodirus* spp. Eizahl-Reduktionswerte (EZR) mit 90 % Konfidenzintervall (KI)

- Tab. 5-8 Rinderbetrieb Nr. 6 mit Wirkstoffen Fenbendazol (FBZ), und Eprinomectin (EPR) und Median, 25 % und 75 % Quartile vor und nach Behandlung mit p-Werten nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test
- Tab. 5-9 Gewonnene L3 nach Eiaufreinigung mittels Zuckergradienten gefolgt von Kulturen in naivem Schafkot für 7 - 10 Tage.
- Tab. 5-10 EC<sub>50</sub>-Werte, KI und R<sup>2</sup> der Testreihe des LMHT mit Levamisol und *H. contortus* L3 *McMaster (McM)*
- Tab. 5-11 Durchführung des LMHT mit 25 µm Siebeinsätzen und inaktivierten *H. contortus* L3
- Tab. 5-12 Durchführung des LMHT mit 25 µm und 28 µm Siebeinsätzen und *H.c.*, *Tr. col.* und L3 der Betriebe 3, 5 und 11. Wanderung in Prozent
- Tab. 5-13 Gewonnene L3 nach Larvenkultivierung aus Sammelkotproben der Rinderbetriebe
- Tab. 5-14 EC<sub>50</sub>-Werte, 95 % KI und R<sup>2</sup> für die Larvenmigrationshemmtest der Rinderbetriebe 1, 2, und 4 – 9 vergleichend zum suszeptiblen Referenzisolat von *C. oncophora*
- Tab. 5-15 Spezieszusammensetzungen (in %) der Schafbetriebe vor der anthelminthischen Behandlung ohne Korrekturfaktoren
- Tab. 5-16 Spezieszusammensetzungen (in %) der Schafbetriebe vor der anthelminthischen Behandlung mit Korrekturfaktoren
- Tab. 5-17 Spezieszusammensetzung des Schafbetriebs 5 vor und nach Behandlung
- Tab. 5-18 Spezieszusammensetzung des Schafbetriebs 7 vor und nach Behandlung
- Tab. 5-19 Spezieszusammensetzung des Schafbetriebs 9 vor und nach Behandlung
- Tab. 5-20 Spezieszusammensetzung des Schafbetriebs 10 vor und nach Behandlung
- Tab. 5-21 Spezieszusammensetzungen (in %) der Rinderbetriebe vor Behandlung ohne Korrekturfaktoren
- Tab. 5-22 Spezieszusammensetzungen (in %) der Rinderbetriebe vor Behandlung mit Korrekturfaktoren
- Tab. 5-23 Übersicht der Anzahl Tiere und Gesamtfläche der Schafbetriebe
- Tab. 5-24 Übersicht der Anzahl Tiere und Gesamtfläche der Schafbetriebe

## Abkürzungsverzeichnis

ABZ	Albendazol
AMR	Antimikrobielle Resistenz
AH	Anthelminthikum, Anthelminthika
AR	Anthelminthika Resistenz
AVM	Avermectine
BZ	Benzimidazole
CLO	Closantel
COMBAR	Combating Anthelmintic Resistance in Ruminants
DOM	Doramectin
DAS	<i>Deep amplicon sequencing</i>
EC <sub>50</sub>	Mittlere effektive Wirkstoffkonzentration
EHT	Eischlupftest
EPG	Eier pro Gramm
EPR	Eprinomectin
EZ	Eizahl
EZR	Eizahlreduktion
EZRT	Eizahlreduktionstest
FBZ	Fenbendazol
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GIN	Gastrointestinale Nematoden
ITS-2	Internal transcribed spacer 2
IVM	Ivermectin
L1	Erstes Larvenstadium
L2	Zweites Larvenstadium
L3	Drittes Larvenstadium
L4	Viertes Larvenstadium
LDA	Larvenentwicklungshemmtest
LEV	Levamisol
LMHT	Larvenmigrationshemmtest
<i>McM</i>	<i>McMaster</i>
MDS	Magen-Darm-Strongyliden
MBZ	Mebendazol
ML	Makrozyklische Lactone
MLS	Merinolandschaf
MON	Monepantel
MOX	Moxidectin
NGS	<i>Next-generation</i> Sequenzierung
OXF	Oxfendazol
OXC	Oxyclozanid
PGE	Parasitäre Gastroenteritis

PZQ	Praziquantel
QTL	<i>Quantitative Trait-Locus</i>
SKF	Schwarzköpfiges Fleischschaf
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
<i>sus</i>	Suszeptibel
TA	Tierarzt, Tierärztin
TÄ	Tierärzte
TCBZ	Triclabendazol
TST	<i>Targeted selective treatment</i>
W.A.A.V.P.	World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

# 1 Einleitung

Gastrointestinale Nematoden (GIN) von Schafen und Rindern sind weltweit in Beständen verbreitet und verursachen das Krankheitsbild der parasitären Gastroenteritis (PGE). Zumeist erkranken die Jungtiere einer Herde symptomatisch, adulte Tiere infizieren sich in der Regel latent mit den Erregern. Klinisch manifestiert sich eine Enteritis in subakuter oder chronischer Diarrhoe, teils mit Meläna und Inappetenz (Craig 2018).

Leistungseinbußen, wie geringere Gewichtszunahmen und Milchproduktion, schlechtere Wollqualität und frühere Abgänge der Tiere beeinträchtigen zudem die wirtschaftliche Arbeitsweise der Schaf- und Rinderbetriebe. Die jährlichen monetären Verluste durch Helmintheninfektionen in der Europäischen Union wurden in einer Studie annäherungsweise mit 1,8 Milliarden Euro beziffert, wozu die GIN neben dem bovinen Lungenwurm *Dictyocaulus viviparus* und dem Leberegel *Fasciola hepatica* wesentlich beitragen (Charlier et al. 2020b). Laut der Autoren verursachen die Produktionseinbußen durch die Infektion der betroffenen Tiere in Deutschland einen jährlichen Verlust von rund 132,1 Millionen Euro und weitere 13,7 Mio Euro entstehen durch Behandlungskosten der Tiere mit Anthelminthika (AH), zusammen entsprechend 145,8 Mio Euro.

Dass die Behandlungskosten der Tiere mit nur rund 10 % der Gesamtkosten zu Buche schlagen weist auf ein systematisches Problem hin, welches sich in den letzten Dekaden zunehmend intensiviert hat. Denn der häufige und strategische Einsatz von AH, auch aufgrund geringer Behandlungskosten, führte zu der Entstehung von Resistenzen. Wann immer lebende Organismen bekämpft werden, muss in der Folge auch damit gerechnet werden, dass es zu einer Selektion gut angepasster zu ungünstigen empfänglicher Wurm-Individuen kommt. Dieses Phänomen weist Parallelen mit der weitaus bekannteren Antimikrobiellen Resistenz (AMR) auf, die inzwischen als die „stille Pandemie“ betitelt wird (Mahoney et al. 2021). Die Eindämmung von Anthelminthika-Resistenzen (AR) stellt die Beteiligten trotz des geringeren Bekanntheitsgrads vor ähnliche Herausforderungen und, wie bei komplexen Themenfeldern häufig der Fall, sind vielfache und weitreichende Anstrengungen nötig, um sich möglicher Lösungsansätze anzunähern.

Vor diesem Hintergrund ermittelte die vorliegende Studie die aktuelle Resistenzsituation gegen Anthelminthika in Weidebetrieben Nordost-Deutschlands und diente der Erfassung der derzeit noch spärlichen Datenlage zur Prävalenz der AR in Deutschland (Voigt et al. 2022).

Hierfür wurde bei teilnehmenden Rinder- und Schafbetrieben zuerst ein Eizahlreduktionstest (ERZT), basierend auf der GIN-Wurmeiausscheidung der behandelten Tiere, und eine Befragung der Schaf- und Rinderhalter durchgeführt. Weiterhin wurden aus von Kotproben aufgereinigten Wurmeiern angezüchtete Wurmlarven aus den Betrieben zur Bestimmung der Suszeptibilität gegenüber des AH Levamisol (LEV) *in vitro* mittels Larvenmigrationshemmtest

(LMHT) getestet. Die an der Resistenz beteiligten GIN-Spezies wurden mittels *deep amplicon sequencing* (DAS) analysiert. Zuletzt fand eine Befragung unter großtierpraktizierenden Tierärzten (TÄ) in Deutschland statt, die gängige Entwurmungspraxen identifizierten.

Ziel der Studie war es die aktuelle Wirksamkeit und den Einsatz der AH in Schaf- und Rinderbetrieben Nordost-Deutschlands zu untersuchen und Erkenntnisse über die an der Resistenz beteiligten Wurmspezies in diesen Betrieben zu erlangen. Weiterhin wurden Daten zu Anwendungspraktiken der AH unter großtierpraktizierenden TÄ in einer deutschlandweiten Studie erhoben.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Die gastrointestinalen Nematoden der Wiederkäuer

Die Infektion mit Nematoden der Überfamilie Trichostrongyloidea verursachen parasitäre Gastroenteritiden in Schaf- und Rinderbeständen und führen weltweit zu großen wirtschaftlichen Verlusten (Charlier et al. 2020b). Die einzelnen Spezies der Trichostrongyloidea besiedeln den Labmagen und den Dünndarm ihrer Wirte; ihnen gehören die Spezies *Ostertagia*, *Cooperia*, *Teladorsagia*, *Haemonchus* und *Trichostrongylus* an (Deplazes et al. 2012). Der breiter gefasste Begriff der Magen-Darm-Strongyliden (MDS) beinhaltet zusätzlich Arten anderer Gattungen wie *Nematodirus* spp. oder *Bunostomum* spp. sowie Vertreter, die speziell den Dickdarm besiedeln wie *Chabertia ovina* und *Oesophagostomum* spp. Mit weiteren Endoparasiten wie *Toxocara* spp. und *Trichuris* spp. werden diese Spezies unter dem Begriff der gastrointestinalen Nematoden (GIN) zusammengefasst. Bei Schafen finden sich vermehrt *Haemonchus*, *Teladorsagia*, *Trichostrongylus* und *Nematodirus* spp. (Morgan et al. 2012). Bei Rindern in Europa kommen hingegen vorwiegend Erreger der Gattungen *Ostertagia* und *Cooperia* vor (Demeler et al. 2009; Geurden et al. 2015), von regionaler Bedeutung können weiterhin *Trichostrongylus*, *Bunostomum*, *Oesophagostomum*, und *Nematodirus* spp. sein (Craig 2018).

Die Entwicklung der MDS erfolgt direkt: Die orale Infektion geschieht über die Aufnahme von Drittlarven (L3) beim Grasens (Charlier et al. 2020a). Im Wirtstier entwickeln sich diese zu adulten Würmern, heften sich an die Darmschleimhaut und zwar speziesspezifisch in jeweils bestimmten Abschnitten des Magen-Darmtrakts (Labmagen, Dünn- und Dickdarm) an. Dort üben sie eine ebenfalls je nach Wurmspezies unterschiedlich ausgeprägte pathophysiologische Wirkung auf den Wirt aus (Charlier et al. 2020a). Die Eier werden durch die adulten Weibchen in das Lumen des Magen-Darmtrakts abgegeben und mit den Faeces des Tieres in die Umwelt ausgeschieden. Dort erfolgt die Entwicklung der Eier über Larvenstadien 1 und 2 bis zur L3. Die Dauer der Entwicklung ist von der Umgebungstemperatur und -feuchtigkeit abhängig und beträgt im Sommer ca. eine bis zwei Wochen und sechs Wochen im Winter (Charlier et al. 2020a). Die L3 sind befähigt, milde Winter auf der Weide zu überleben, können jedoch auch im Wirtstier in eine Hypobiose verfallen und ihren Entwicklungszyklus erst bei wärmeren Frühlingstemperaturen fortsetzen (Charlier et al. 2020a).

### 2.2 Krankheitsbild bei Schaf und Rind

In der Regel treten MDS als Mischinfektionen auf und führen bei betroffenen Tieren zum Krankheitsbild der parasitären Gastroenteritis (PGE).

Aufgrund ihrer zunächst noch naiven Immunität sind von einer Nematodeninfektion primär erst- und zweitsömrrige Jungtiere betroffen. Als Infektionsquellen kommen jedoch auch adulte Tiere in Betracht, welche eine verringerte Immunität z.B. während einer Trächtigkeit, aufweisen (Besier et al. 2016; Craig 2018).

Bei Schafen tritt eine teils hochgradige Abmagerung infolge von Fress- und Bewegungsunlust, sowie wässrige Diarrhö auf (Zajac and Garza 2020). Ist der rote gedrehte Magenwurm *Haemonchus contortus* in eine Erkrankung bei Schafen involviert, wird häufig Diarrhö mit Meläna beobachtet, die eine Folge gastrointestinaler Blutungen ist. Sie kann bei entsprechender Infektionsintensität eine klinische Anämie herbeiführen und nicht selten tödlich enden (Besier et al. 2016). Bei schweren Infektionen entsteht teils ein submandibuläres Ödem am Kehleingang, ein sogenanntes „bottle jaw“ (Besier et al. 2016). *Haemonchus contortus* ist besonders pathogen, da pro Wurm im Schnitt ein Verlust von 50 µl Blut pro Tag erfolgt und im Feld Wurmbürden von mehreren Tausend Exemplaren anzutreffen sind (Besier et al. 2016). Das betroffene Tier erleidet bei hoher Wurmbürde somit täglich einen, insbesondere für Lämmer, substanziellen Blutverlust.

Bei der Infektion von Rindern mit MDS kommt es häufig zu einer chronisch unspezifischen Symptomatik, verbunden ebenfalls mit Inappetenz und subakuter, nichtblutiger Diarrhö mit der Folge von sowohl geringerem Wachstum als auch geringerer Produktionsleistung (Craig 2018).

In der Praxis ist es schwierig, die einzelnen Spezies getrennt zu betrachten, da sie den Wirt in der Regel co-infizieren und in der koproskopischen Diagnostik nicht unmittelbar zu differenzieren sind. Sie werden daher bei einer Bekämpfung als homogene Gruppe behandelt, obwohl es erhebliche Unterschiede in der Pathogenität, dem saisonalen Auftreten und dem Ansprechen auf AH gibt (Redman et al. 2019).

### **2.3 Übersicht anthelminthischer Wirkstoffe und Resistenzentwicklung**

Der Beginn des Einsatzes von AH ist eine Folge des medizinischen Fortschritts und der Entwicklung synthetischer Arzneimittel zu Beginn des 20. Jahrhunderts (Gilleard et al. 2021). Zu den ersten Vertretern zählten hier Phenothiazine und Piperazine, welche 1940 und 1954 auf dem Markt zugelassen wurden (Vande Velde et al. 2018b). 1961 wurde Thiabendazol als erster Vertreter der Klasse der Benzimidazole (BZ) zugelassen, die in rascher Folge bis in die 80er Jahre zum kommerziellen Einsatz entwickelt wurden. In dieser Klasse lag der Vorteil in einem breiten Wirkspektrum bei gleichzeitig hoher therapeutischer Breite und damit einfacherer Handhabung im Vergleich zu vorherigen Präparaten. Sie eignete sich nicht nur zur Behandlung klinisch erkrankter Tiere, sondern für die intensive Tierhaltung; im Rahmen der Gewinnmaximierung auch präventiv. Erste makrozyklische Laktone (ML), die das

Wirkspektrum in Richtung Ektoparasitenbehandlung noch einmal erweiterten, folgten in den späten 70er Jahren. Das letzte, neuzugelassene AH war Monepantel 2009.

Zur Behandlung von gastrointestinalen Wurminfektionen in Wiederkäuer-Nutztierbeständen stehen in Deutschland AH aus einer Reihe von Wirkstoffgruppen zur Verfügung. Hierbei kommen unter anderem drei große Gruppen, die BZ, die ML und die Imidazothiazole in der Praxis zum Einsatz (Voigt et al. 2022). Weiterhin kann auf ein Aminoacetonitril Derivat (Monepantel, MON) und ein Salicylsäureanilid (Closantel, CLO) als Mono- oder Kombinationspräparat zurückgegriffen werden (Voigt et al. 2022). Das Isochinolin-Derivat Praziquantel (PZQ) ist zur Behandlung von Bandwurminfektionen zugelassen. Die Haupt-Wirkstoffgruppen werden in den folgenden Kapitel detailliert beschrieben.

### **2.3.1 Anthelminthische Wirkstoffe für das Schaf**

Derzeit (Frühjahr 2023) sind folgende Wirkstoffe und Wirkstoffklassen für die anthelminthische Behandlung von Schafen in Deutschland zugelassen (Quelle Vetidata.de): Albendazol (ABZ, z.B. Valbazen®), Fenbendazol (FBZ, z.B. Panacur®) und Oxfendazol (OXF, z.B. Oxfenil®) zu der Benzimidazolgruppe gehörend, welche in höherer Dosierung auch zur Behandlung von Bandwürmern (*Moniezia* spp.) angewendet werden. Die Wirkstoffe sind in Pulverform und als Lösung erhältlich, FBZ zudem zur Langzeitapplikation als Bolus. Weiterhin sind aus der makrozyklischen Lactongruppe das Milbemycin Moxidectin (MOX, Cydectin®) und die Avermectine (AVM) Ivermectin (IVM, z.B. Alfamectin®), Doramectin (DOM, Dectomax®) und Eprinomectin (EPR, Eprecis®) verfügbar. Die AVM sind in Form von Aufguss- und in Injektionsformulierungen verfügbar, MOX nur als orale Lösung. Das Imidazothiazol LEV (Levamisol®) wird als Pulver oder Lösung oral oder als Injektionspräparat vermarktet und das Aminoacetonitril Derivat MON (Zolvix®) lediglich als Präparat zur oralen Gabe angewendet. Zusätzlich existiert ein Kombinationspräparat (Flukiver Combi®) aus Mebendazol (MBZ), einem BZ und CLO, einem Salicylanilid. Die Besonderheit von CLO ist hierbei die Wirksamkeit lediglich gegen *H. contortus*, sodass eine Kombination notwendig ist, um die weiteren GIN-Spezies ebenfalls zu eliminieren. Dieses Präparat wird als orale Lösung angewendet. Ein weiteres orales Kombinationspräparat besteht aus den Wirkstoffen MOX und Triclabendazol (TCBZ, TriclaMox®), welches neben den GIN eine Wirkung auf den großen Leberegel ausübt. Als Monopräparat zur Eliminierung von Bandwürmern ist zudem PZQ (Cestocur®) in Form einer oralen Suspension erhältlich (Voigt et al. 2022; Vetidata-Datenbank 2023).

Der einzige derzeit für Ziegen zugelassene Wirkstoff ist seit 2021 ein Eprinomectin-haltiges Präparat (Voigt et al. 2022).

### 2.3.2 Anthelminthische Wirkstoffe für das Rind

Für Rinder sind aktuell (Frühjahr 2023) ebenfalls folgende Wirkstoffe und Wirkstoffklassen für die anthelminthische Behandlung in Deutschland zugelassen: ABZ, FBZ und OXF, die in Pulverform, als orale Lösung oder als Bolusapplikation erhältlich sind. Weiterhin sind die ML IVM, DOM und EPR sowie MOX als Aufguss- und als Injektionsformulierungen verfügbar. Levamisol wird als Injektion oder orale Lösung verabreicht. Closantel (Flukiver®) ist als Monopräparat in Suspensionsform zur oralen Anwendung und als Kombinations-Aufgusspräparat mit Ivermectin zugelassen. Ein zweites Kombinations-Aufgusspräparat aus den Wirkstoffen MOX und TCBZ zur Bekämpfung des großen Leberegels ist daneben verfügbar. Monepantel und PZQ enthaltende Präparate sind für die Tierart Rind momentan nicht erhältlich (Voigt et al. 2022; Vetidata-Datenbank 2023).

### 2.3.3 Benzimidazole

Die sukzessive Einführung von Präparaten, die der Gruppe der BZ zugeordnet werden, begann in den 60er Jahren des vergangenen Jahrhunderts. Thiabendazol wurde 1961 auf den Markt gebracht (Brown et al. 1961), FBZ 1974 und ABZ folgte 1976 (Vande Velde et al. 2018b). Es handelt sich hierbei um eine Wirkstoffgruppe, welche in der Anwendung eine große therapeutische Breite besitzt, und damit einen großen Abstand zwischen der minimalen anthelminthischen Wirksamkeit und der minimalen toxischen Dosis auf das behandelte Tier aufweist. Diese sehr gute Verträglichkeit konnte die Anwendung in der Praxis fortan erheblich erleichtern und wird als Grund für die Ablösung der vergleichsweise schlechter verträglichen Wirkstoffe Piperazin und Phenothiazin sowie der vermehrten Anwendung in der Tierhaltung insgesamt genannt (Gilleard et al. 2021). Im Jahr 1964, also drei Jahre nach Markteinführung, folgte allerdings bereits die erste Beschreibung von Thiabendazol-Resistenz bei *H. contortus* in Schafen (Drudge et al. 1964). Bis in das Jahr 1998 waren für alle Wirkstoffe der BZ-Gruppe Resistenzen bei der Behandlung gegen GIN beschrieben worden (Vande Velde et al. 2018b). Der Wirkmechanismus dieser Substanzklasse besteht in einer Hemmung der Polymerisation der Mikrotubuli, welche zum Verlust der Mikrotubuli in den Parasitenzellen führt. Ursprünglich war der Mechanismus einer gehemmten intrazellulären Glukoseaufnahme durch die gestörte Mikrotubuli-Funktion mit folglichem Zerstörung des Zytoskeletts angenommen worden, welche letztlich das Absterben des Parasiten im Wirt induziert (Lacey 1988). Durch die gestörte Funktion der Mikrotubuli wird nach neueren Erkenntnissen jedoch die Transmitterausschüttung an v.a. cholingergen Neuronen blockiert (Gibson et al. 2022).

Unter allen Wirkstoffgruppen ist der Resistenzmechanismus am besten für die Wirkstoffgruppe der BZ bei MDS erforscht. Auf molekularer Ebene entsteht eine BZ-Resistenz bei den meisten betroffenen MDS-Populationen durch die Substitution des Phenylalanins durch Tyrosin am Codon 200 des Isotyp-1  $\beta$ -Tubulin Gens F200Y Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (engl. SNP

- single-nucleotide-polymorphism) (Kotze et al. 2014). Daneben wurde noch für weitere Polymorphismen in demselben Gen (F167Y, E198A, E198V und E198L, E198I, E198K, E198T und E198stop) eine Assoziation mit BZ-Resistenz der Nematoden beschrieben (Avramenko et al. 2019; Dilks et al. 2020; Dilks et al. 2021).

#### **2.3.4 Makrozyklische Laktone**

Präparate der ML-Wirkstoffgruppe wurden ab den späten 1970er Jahren, beginnend mit Abamectin, vermarktet. Später folgten IVM (1981), MOX (1991) und zuletzt EPR (1996). Jedoch resultierten auch hier bereits kurze Zeit nach Einführung des jeweiligen Wirkstoffs Resistenzen (Vande Velde et al. 2018b).

Die ML werden pharmakologisch in die AVM mit EPR, DOM, Selamectin und IVM sowie die Milbemycine Milbemyzinoxim und MOX eingruppiert. Letzteres weist vergleichsweise bessere pharmakokinetische Eigenschaften auf, darunter eine längere Halbwertszeit sowie ein verstärkt lipophiles Verteilungsmuster im Organismus, was insgesamt eine längere Kontaktzeit zwischen Wirkstoff und Zielstruktur (den Chloridkanälen) im Parasiten zur Folge hat. So kann MOX in der empfohlenen Dosierung noch imstande sein, bereits gegen AVM resistente Wurmpopulationen erfolgreich zu bekämpfen (Prichard and Geary 2019).

Hauptangriffspunkte der ML sind Glutamat- und in höherer Konzentration ebenfalls Gamma-Aminobuttersäure, (GABA)-gesteuerte Chloridionenkanäle in den Membranen der Neuronen der Parasiten. Die dauerhafte Öffnung dieser Kanäle führt zu einem Einstrom von Chloridionen mit der Folge einer dauerhaften Hyperpolarisation der Neuronen, was wiederum zu einer schlaffen Paralyse des Parasiten führt (Kotze et al. 2014).

Strukturelle Veränderungen der Kanaluntereinheiten sowie eine reduzierte oder erhöhte Expression der jeweiligen Gene führen beispielsweise zu verminderter Affinität oder dem Verlust von Rezeptorbindungsstellen und somit zu einer herabgesetzten Wirksamkeit des Pharmakons (Kotze and Prichard 2016). Eine Reihe von Kandidatengen, deren Vorkommen mit einer herabgesetzten Sensitivität für IVM in Verbindung gebracht wird, sind dabei Gegenstand der aktuellen Forschung. Darunter findet sich beispielsweise ein Allel des Hco-Igc-37 Gens, das für vier Aminosäuresubstitutionen in einer Untereinheit des GABA-gesteuerten Chloridkanals codiert. Des Weiteren kommt ein SNP im Codon 256 des GluCl $\alpha$ 3B Proteins in resistenten *Haemonchus* Stämmen vor und wurde mit einer herabgesetzten Affinität gegenüber ML als möglicher Auslöser verminderter Wirksamkeit in Zusammenhang gebracht (Whittaker et al. 2017). Ein weiteres Kandidatengen, das HCON\_00148840 (glc-3), codiert für den Glutamat-gesteuerten Chloridkanal, der von IVM direkt irreversibel gebunden wird und durch verminderte Expression die Wirksamkeit von IVM reduzieren könnte (Williamson et al. 2011; Khan et al. 2020).

Eine erhöhte Elimination des Wirkstoffs im Parasiten-Organismus durch vermehrte P-Glycoprotein Expression, welche in *H. contortus* ATP-gebunden den Wirkstoffmetabolit durch die Membran in den Gastrointestinaltrakt transportiert, wurde ebenfalls ursächlich für eine verminderte Wirksamkeit angesehen (Smith and Prichard 2002; Gerhard et al. 2021).

Auch die nach IVM-Exposition beobachtete Hochregulierung des Gens HCON\_00155390:cky-1 des Chromosom V, das im Pharynx der Helminthen exprimiert und der Regulierung der Nervenfunktion sowie dem Schutz vor Nervenschädigungen zugeordnet wird, kann als möglicher Resistenzmechanismus betrachtet werden (Laing et al. 2022). Auf dem Chromosom V wurde zuvor bereits eine genetische Adaption dieser Region unter Selektionsdruck in resistenten *H. contortus* Populationen beobachtet. Hier wurde ein genetisches Areal, ein quantitativer Trait-Locus (QTL) identifiziert, auf dem ein Abschnitt für die Resistenz des Parasitenorganismus codiert (Doyle et al. 2019). Diesem Locus scheint daher eine zentrale Bedeutung in der Entwicklung der IVM-resistenz zuzukommen, welche jedoch noch nicht abschließend geklärt ist.

### **2.3.5 Imidazothiazole**

Levamisol ist der Imidazothiazol-Gruppe zugeordnet, seit 1970 verfügbar und bis heute auf dem deutschen Markt für die anthelminthische Behandlung erhältlich. Die erste Resistenzbeschreibung erfolgte 1979 (Sangster et al. 1979). Levamisol bindet irreversibel an nikotinerge Acetylcholinrezeptoren der Ganglien und motorischen Endplatten der schräggestreiften Muskulatur und Nervenzellen der Nematoden. Der Einstrom von Na<sup>+</sup>-Ionen führt zu einer Depolarisation der Zelle und somit zu einer spastischen Lähmung des Parasiten. Der pentamere nikotinerge Acetylcholinrezeptor besteht aus fünf Untereinheiten. Als Ursache für die Resistenz gegenüber LEV werden eine herabgesetzte Expression spezifischer Acetylcholinrezeptor-Untereinheiten sowie der Einbau einer nicht funktionalen (trunkierten) Untereinheit in den Rezeptor diskutiert (Whittaker et al. 2017).

## **2.4 Anthelminthika-Resistenz**

Anthelminthika-Resistenzen wurden u.a. für *Haemonchus* spp., *Ostertagia* spp., *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp., *Teladorsagia* spp. und *Nematodirus* spp. weltweit für Schafe, Rinder und Ziegen nachgewiesen, mit teils hohen Prävalenzen und multiresistenten Stämmen (Kaplan 2004; Jabbar et al. 2006; Rose Vineer et al. 2020). Für BZ wurden Resistenzen von *H. contortus* bereits kurz nach ihrer Einführung in den Markt nachgewiesen (Conway 1964). Die baldige Entwicklung von Resistenzen kurz nach der Markteinführung erfolgte seither auch für die weiteren Anthelminthika-Klassen. Außerhalb Europas, speziell in Australien und Neuseeland, werden zur wirksamen anthelminthischen Behandlung inzwischen zunehmend Kombinationspräparate verwendet, da Monopräparate keinen ausreichenden Behandlungserfolg mehr erzielen können. Infolgedessen wurde bereits die erste

fehlgeschlagene Behandlung mit einem Kombinationspräparat aus den vier Wirkstoffen Abamectin, ABZ, CLO und LEV dokumentiert (Lamb et al. 2017).

Durch die häufige, routinemäßige Anwendung der AH auch in einigen Ländern Europas wurden neben den BZ-Resistenzen inzwischen teilweise auch hohe Prävalenzen für Resistenzen gegen ML und LEV beschrieben (Ploeger and Everts 2018; Rose Vineer et al. 2020). In einer Metaanalyse, die 535 Publikationen aus Europa seit 2010 inkludiert und in der Veröffentlichung einer Open Database mündete, bezifferten die Autoren AR der MDS in Schaf- und Ziegenbetrieben von 86 % für BZ-Präparate, 52 % für AVM-Vertreter und 48 % für LEV. Dabei wurden je nach Land und AH-Wirkstoffgruppe teilweise stark unterschiedliche relative Häufigkeiten resistenter Wurmpopulationen beschrieben. Die AR auf Rinderbetrieben lag zwischen 0 und 100 % für BZ und ML, zwischen 0 und 17 % für LEV und 0 - 73 % für MOX (Rose Vineer et al. 2020). In der Studie wird allerdings auf die großen regionalen Unterschiede in der Datenerhebung hingewiesen, welche die Aussagekraft insgesamt mindert.

Anthelminthika-Resistenzen der GIN des Rindes wurden zeitlich nach denen der Schafe entdeckt, sind heute aber ebenfalls für die beiden wichtigsten Wirkstoffgruppen, die BZ und die ML weltweit dokumentiert (Demeler et al. 2009; Sutherland and Leathwick 2011; Geurden et al. 2015; Waghorn et al. 2016). Bei den für Rinder relevanten *Cooperia* spp. sind am häufigsten Resistenzen gegenüber den ML und BZ beschrieben (Waghorn et al. 2006; Demeler et al. 2009; Sutherland and Leathwick 2011). Klinisch sind Resistenzen bei *Cooperia* spp., insbesondere der in Europa häufigsten Art *Cooperia oncophora*, aufgrund der niedrigeren Pathogenität im Vergleich zu *Ostertagia ostertagi*, von geringerer Bedeutung (Coop et al. 1979).

#### **2.4.1 Verbreitung von Anthelminthika-Resistenzen in Deutschland**

Zur Resistenzsituation in Deutschland sind einige publizierte Daten sowie Dissertationen verfügbar. Die beiden umfangreichsten Studien für Schafe wurden an der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt: Im Jahr 2005 wurde eine FBZ-Resistenz auf 11 von 28 untersuchten Betrieben festgestellt (Moritz 2005). Im Jahr 2008 wurde in 9 von 53 Betrieben eine MOX-Resistenz mittels Eizahlreduktionstest (EZRT) nachgewiesen (Perbix 2008). Drei weitere Studien untersuchten insgesamt fünf Betriebe mit unterschiedlichen Resultaten: In Süddeutschland ergaben sich reduzierte Wirksamkeiten für die getesteten Wirkstoffe ABZ, OXF, FBZ und MOX in zwei Betrieben (Scheuerle et al. 2009). Ebenfalls in Süddeutschland konnte eine Multiresistenz gegenüber IVM, ABZ sowie teilweise gegenüber LEV demonstriert werden (Voigt et al. 2012). Ein EPR-haltiges pour-on Tierarzneimittel (Eprinex pour on®) zeigte in zwei Betrieben an 196 Tieren eine volle Wirksamkeit (Hamel et al. 2017). Zum Vorkommen von Resistenzen in Rinderbetrieben wurde 2015 eine IVM- und MOX-Resistenz in einem von zwölf untersuchten Betrieben in Deutschland belegt (Geurden et al. 2015).

Weiterhin fanden sich im Untersuchungszeitraum 2006 bis 2007 IVM-Resistenzen in drei von acht untersuchten Beständen im zentralen Norddeutschland; in zwei der drei resistenten Nachbehandlungsproben konnte dabei *C. oncophora* nachgewiesen werden. Das in zehn Betrieben eingesetzte ABZ Präparat war dagegen vollständig wirksam (Demeler et al. 2009). Die Autoren vermuteten als Grund, dass die Landwirte fast ausschließlich ML und keine BZ verwendeten.

Eine weitere Analyse aus dem Jahr 2019 kam zu dem Ergebnis, dass in sechs von vierzehn Betrieben in Schleswig-Holstein beim Rind das jeweils eingesetzte ML nur noch unzureichende Wirksamkeit besaß (Schramm 2020). Hinweise auf IVM-Resistenzen bei Rindernematoden lagen in Niedersachsen für *Cooperia* spp. und *Ostertagia* spp. vor (Kleinschmidt et al. 2007). Albendazol war auch hier in allen Betrieben noch vollständig wirksam (Kleinschmidt et al. 2007).

Die neueste Erhebung von Resistenz-Daten mittels EZRT aus dem Zeitraum September 2019 bis Dezember 2020 wurde mit 218 Schaf- und 35 Ziegenbetrieben in 14 Bundesländern in Deutschland, exklusive Berlin und Bremen, durchgeführt (Voigt et al. 2022). Demnach lagen in 76 der 218 Schafbetriebe Resistenzen der getesteten AH vor: BZ-Präparate zeigten in 23 von 44 Betrieben eine EZR < 95 %, AVM in 3 von 5 Betrieben, MOX in 39 von 86 Betrieben, LEV in 6 von 41 Betrieben, MON in 3 von 25 Betrieben und CLO-MBZ als Kombinationspräparat in 2 von 17 Schafbetrieben. Von 35 Ziegenbetrieben wiesen 16 eine verminderte Wirksamkeit (< 95 % EZR) auf: BZ-Präparate wirkten in 6 von 12 Betrieben unzureichend, AVM in 3 von 3 Betrieben, MOX in 3 von 14 Betrieben, LEV in 3 von 3 Betrieben und MON in 1 von 3 Betrieben (Voigt et al., 2022).

Die Probensammlung beruhte auf der Einsendung von Sammelproben durch Landwirte, die ihre Herden mit oralen oder Injektions-Präparaten entwurmt. Die Auswertung erfolgte mittels McMaster Flotation. Auch war die Speziesdifferenzierung nach Behandlung lediglich durch Fluorescein-Isothiocyanat Anfärbung der Eier für *H. contortus* möglich. Diese Spezies blieb in Nachbehandlungsproben aller AH-Klassen erhalten, signifikante Reduktionen ergaben sich nur nach MON, LEV und der Behandlung mit MBZ-CLO als Kombinationspräparat. Die übrigen „Nicht-*Haemonchus*“ Spezies überlebten dagegen vermehrt nach MBZ-CLO Behandlung (Voigt et al., 2022).

In ihrem Review fassten die Autoren (Rose Vineer et al. 2020) u.a. auch die oben genannten Daten für Deutschland zusammen. Sie kamen in ihrer Untersuchung zu dem Ergebnis, dass die meisten Resistenzen bei Nematoden von Schafen und Ziegen gegenüber Vertretern der Substanzklasse der BZ beschrieben wurden. Für Rindernematoden dagegen scheinen Resistenzen gegenüber ML, einschließlich des Milbemycins MOX, die weitaus größere Rolle zu spielen (Rose Vineer et al., 2020).

Um die aktuelle AR-Situation in Deutschland besser bewerten zu können, soll die vorliegende Studie das Vorkommen von AR und beteiligter Wurmspezies für Brandenburg und angrenzende Bundesländer näher beleuchten.

## **2.5 Nachweisdiagnostik**

### **2.5.1 Eizahlreduktionstest**

Ursprünglich und bis heute als Goldstandard beschrieben, kam ein „kontrollierter Wirksamkeitstest“ zur Ermittlung des AH-Resistenzstatus zum Einsatz, in welchem natürlich infizierte oder bekannt wurmfreie Tiere mit einer definierten Larvendosis des fraglichen Betriebs infiziert und nach erfolgter Patenz anthelminthisch behandelt wurden. Eine weitere Tiergruppe diente parallel als unbehandelte Kontrollgruppe. Post mortem wurden dann die verbliebenen Würmer in den Darmabschnitten gezählt und bei einer Reduktion von weniger als 90 % eine Resistenz festgestellt (Wood et al. 1995).

Der Eizahlreduktionstest (EZRT, engl. *FECRT*) ist ein in der Praxis bewährter Test zum Nachweis von Resistenzen eines oder mehrerer anthelminthischer Medikamente auf Bestandesebene und kommt in Schaf-, Rinder- und Pferdehaltungen zum Einsatz.

Die Methodik beruht auf einem direkten Vergleich der Wurmeizahlen pro Gramm Kot (EPG), welche vor und nach anthelminthischer Behandlung aus rektalen Kotproben der Tiergruppe vergleichend untersucht werden. Die Reduktion der EPG-Werte wird anschließend in Prozent berechnet und eine Aussage zum Resistenzstatus getroffen.

Der EZRT stellt heute die in der Praxis am häufigsten genutzte Methode zur Ermittlung einer Anthelminthika-Resistenz dar (Borkowski et al. 2020), unter anderem, weil der Test ohne die Sektion von Versuchstieren auskommt, und im Betrieb leicht durch geschultes Personal durchgeführt werden kann. Der Arbeitsaufwand und die damit verbundenen Kosten sind allerdings gleichzeitig auch ein Nachteil des Tests (Gill et al. 1991; Gilleard et al. 2021). Hier stellen *in vitro*- und molekulare Nachweismethoden inzwischen eine kostengünstigere und sensitivere Alternative dar. Ein erstes *in vitro* Larvenentwicklungs-Assay wurde allerdings erst in den 1990er Jahren kommerziell auf den Markt gebracht (Lacey et al. 1990; Gilleard et al. 2021), während andere Verfahren bisher vor allem für wissenschaftliche Untersuchungen angewendet wurden. Insgesamt unterliegt der EZRT vielen Einflussfaktoren, welche die Sensitivität verringern, um AR korrekt detektieren zu können. Zum Einsatz kam der Test seit Beginn der 1990er Jahre (Coles et al. 1992). In der Literatur wurde die klare Erkennbarkeit einer Resistenz mittels des EZRT erst ab einer Infektion mit 25 % resistenten Parasiten genannt (Martin et al. 1989). Seither wurde die Methodik jedoch einigen Anpassungen zur Vereinheitlichung und Sensitivitätssteigerung unterzogen, welche sich in den Empfehlungen des COMBAR Projekts (EU COST action; <https://www.combar-ca.eu/>) zur Durchführung des EZRT wiederfinden (Combar-Cost-Action-Ca16230 2021) und innerhalb neuer W.A.A.V.P.

(engl. *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*) Leitlinien publiziert wurden (Kaplan et al. 2023).

Zunächst sollte pro Versuchsgruppe eine Mindestzahl von 10 Tieren getestet werden. Da eine höhere Tierzahl die Sensitivität des Tests verbessert, spielt die Größe der Stichprobe eine wichtige Rolle für seine spätere Aussagekraft (Geurden et al., 2015). Die Wurmeizahlen sind bei Jungtieren meist höher als bei adulten Tieren, weshalb erstere bevorzugt zu testen sind: Gerade bei adulten Rindern reichen die Eizahlen für ein aussagekräftiges Ergebnis oft nicht aus (Kaplan 2020). Zudem sollten die Tiere mindestens sechs, besser acht Wochen vor Versuchsbeginn nicht anthelminthisch behandelt worden sein, um die Wirksamkeit des Präparats in vollem Umfang testen zu können (Kaplan 2020).

Grundsätzlich können AH aller Wirkstoffklassen eingesetzt werden. Die Wartezeit zwischen der Behandlung und der zweiten Kotprobenuntersuchung unterscheidet sich jedoch: Für LEV liegt diese Wartezeit bei 7 - 10 Tagen, für BZ wie FBZ bei 10 - 14 Tagen, für ML wie IVM bei 14 - 17 Tagen und für MOX bei 17 - 21 Tagen. Werden mehrere AH gleichzeitig getestet, sind 14 Tage Wartezeit empfohlen (Kaplan 2020; Combar-Cost-Action-Ca16230 2021). Diese Wartezeit ist abhängig von der Wirkdauer des Medikaments, sollte aber ebenfalls nicht zu lange gewählt werden, da sonst das Risiko einer Reinfektion nach erfolgreicher Behandlung steigt. Zudem wurde bei ML wie IVM eine vorläufig gehemmte Eiausscheidung der GIN beschrieben. Auch aus diesem Grund sollte die Wartezeit nicht zu kurz gewählt werden (Le Jambre et al. 1995).

Bei der Behandlung ist die richtige Dosierung des Präparats entscheidend und sollte nach Ermittlung des Körpergewichts des Tieres erfolgen, da eine Unterdosierung des getesteten Präparats zu einem falsch positiven Testergebnis führen kann. Nach Möglichkeit wurden zudem Injektionspräparate Pour-on Aufgussformulierungen vorgezogen, da diese vorberichtlich bessere pharmakodynamische Eigenschaften aufwiesen (Sargison et al. 2009). Bei der topischen Anwendung von AH wird eine (unkontrollierte) Teilresorption des Wirkstoffs durch gegenseitiges Belecken der Tiere beschrieben (Bousquet-Mélou et al. 2011), welche das Ergebnis bei der parallelen Testung verschiedener Wirkstoffe in einer Tiergruppe verfälschen kann.

Für die Ermittlung der Anzahl von MDS Eiern werden diese mittels gesättigter Kochsalzlösung flotiert und mikroskopisch ausgezählt. Je nach Sensitivität der angewandten Flotationstechnik muss die unter dem Mikroskop gezählte Eizahl auf EPG umgerechnet werden, umso niedriger der Multiplikationsfaktor umso sensitiver ist die Methode. Zur Bestimmung der EPG werden Flotationsmethoden mit hoher Sensitivität empfohlen, gerade wenn die Gesamt-EPG Zahl vor Behandlung niedrig ist (Levecke et al. 2011). Flotationstechniken wie Mini-FLOTAC liegen bei einem Multiplikationsfaktor (Umrechnung beobachtete Eier auf EPG) von 5 und FLOTAC

sogar bei einem Multiplikationsfaktor von 1. Sie erlauben hier eine deutlich sensitivere Analyse im Vergleich zur Auszählung mittels modifizierter McMaster Technik (Multiplikationsfaktor 25 und 50). Zum Nachweis der Infektion beim Rind ist die höhere Sensitivität mittels der FLOTAC Methode interessant, da bei Rindern in Europa regelmäßig niedrigere Eizahlen in den Kotproben beobachtet werden, als bei Schafen (Geurden et al., 2015). Von Rinaldi et al., 2011 wurden verschiedene, diagnostische Verfahren verglichen und FLOTAC dabei aufgrund der hohen Nachweisgrenze als neuer Goldstandard für den EZRT mit GIN bezeichnet.

Um die Sensitivität weiter zu erhöhen sollte die ausgezählte Gesamteizahl vor der Behandlung mindestens 200 Eier betragen und eine doppelte Auswertung der Proben erfolgen, falls dies nicht der Fall sein sollte (Kaplan 2020; Combar-Cost-Action-Ca16230 2021). Im Fall von Mini-FLOTAC führt das zu einer Reduzierung des Multiplikationsfaktors von 5 auf 2,5.

Für die Berechnung des Eizahlreduktionswertes in Prozent kam ursprünglich die folgende Formel zur Anwendung:

$$PR(P\&P) = 100 \times (1 - (T_1/T_2) * (C_1/C_2))$$

PR: Prozentreduktion, P&P: Pre- and Post-Behandlung, T<sub>1</sub>: Behandelte Gruppe vor Behandlung, T<sub>2</sub>: Behandelte Gruppe 10 Tage nach Behandlung, C<sub>1</sub>: Kontrollgruppe Tag 0, C<sub>2</sub>: Kontrollgruppe Tag 10 (Martin et al. 1989).

Hier wird die behandelte Tiergruppe vor und nach AH-Gabe mit einer unbehandelten Kontrollgruppe multipliziert und die Prozentreduktion bestimmt. Allerdings werden mit dieser Berechnung die 90 % Konfidenzgrenzen nicht ausgegeben und müssen separat kalkuliert werden. Vereinfacht kann die Eizahlreduktion innerhalb eines gepaarten Studiendesigns, also der Eiausscheidung vor Behandlung mit der Eiausscheidung nach Behandlung verglichen werden. Damit entfällt die Notwendigkeit, eine unbehandelte Kontrollgruppe in das Studiendesign mitaufzunehmen (Calvete and Uriarte 2013; Geurden et al. 2022). Außerdem führt die Berechnung des arithmetischen Mittels der EZR gegenüber ihrem geometrischen Mittel zu einer höheren Genauigkeit des Ergebnisses (Dobson et al., 2009).

Für die Berechnung der EZRT-Ergebnisse wurde in klinischen Studien auf das *package* „eggCounts“ zurückgegriffen, das auf R ausgeführt wird (R Core Team 2009) und mit Hilfe des *interface* Stan Modelle für die Eizahlreduktion generiert (Carpenter et al. 2017; Wang and Furrer 2018). Diese Modelle basieren auf einer bayesianischen Inferenz, einem statistischen Ansatz zur Schätzung von Wahrscheinlichkeitsverteilungen von Parametern.

Die Ausgabe besteht aus der geschätzten Eizahlreduktion (EZR) und einem 95%-Kreditabilitätsintervall, welche als Modus mit dazugehöriger 95%-Quantil der posteriori Verteilung der Modellparameter angegeben wird. Diese Parameter werden aus den Markov-Chain-Monte-Carlo-Ketten (MCMC-Ketten) berechnet, die vom Programm zur Optimierung des Modells verwendet werden. Durch vielfaches Ziehen von Stichproben aus der posteriori

Grundgesamtheit wird eine Verteilung generiert, die die Unsicherheit in den geschätzten Parametern widerspiegelt.

Innerhalb dieser Anwendung werden zudem einige Besonderheiten des EZRT erfolgreich adressiert: So können die Parasiten-Eizahlen im EZRT in den meisten realen Szenarien auf einzelne Tiere der Gesamtgruppe aggregieren (Morgan et al. 2005; Wang and Furrer 2018). Außerdem entsteht durch das Stichprobenverfahren bei der Probenauswertung ein Poisson-Fehler. Damit ist die Differenz zwischen der gezählten Eizahl und der realen Eizahl gemeint; die Zählung weniger Eier ist dabei Poisson verteilt, höhere Eizahlen nähern sich einer Normalverteilung an (Torgerson et al. 2012). Diese Verteilungsannahmen werden in die Anwendung miteinbezogen. Zuletzt können in besonderen Szenarien, wie einer EZR von 100 % und wenn keine Standardabweichung der Eizahl vor und nach Behandlung vorhanden ist, dank des Modells dennoch Kredititätsintervalle ausgegeben werden (Wang and Furrer 2018).

Das Modell nutzt verschiedene Verteilungsannahmen für den Prozess der Probenauswertung. So wurde für die Reduktion der gepaarten EPG-Einzelwerte vor und nach Behandlung eine Gamma-Verteilung angenommen. Diese inkludiert auch aggregierte Werte von einzelnen Tieren. Für die gezählte Eizahl aus der zufällig gewählten Stichprobe wird eine Poisson-Verteilung und entsprechend für die Differenz von realer und gezählter Eizahl ein Poisson Fehler angenommen. Das Modell nimmt eine gleiche Sensitivität der Probenauswertung vor und nach Behandlung an, was durch die Anwendung der gleichen Auswertungsmethode (z.B. Mini-FLOTAC) umgesetzt wird. Individuen innerhalb einer Population sprechen unterschiedlich auf eine anthelminthische Behandlung an (Krücken et al. 2017; Wang et al. 2018). Das liegt an mehreren Faktoren: Im Falle einer Tierherde zum Beispiel an unterschiedlichem Futteraufnahmeverhalten oder an unterschiedlichen Zusammensetzungen der GIN-Spezies, welche im Einzeltier in die Infektion involviert sein können (Wang and Furrer 2018). Tierindividuelle Behandlungserfolge können im Modell entsprechend durch die Implementierung des Bayes-Ansatzes berücksichtigt werden. Insgesamt gibt dieses robuste EZR-Werte aus und eignet sich auch bei einem niedrigen Gesamt-EPG (Wang and Furrer 2018).

Zum Zeitpunkt der Untersuchung dienten die ehemaligen Leitlinien der W.A.A.V.P. (Coles et al. 1992; Kaplan et al. 2023) als Grundlage zur Interpretation der Wirksamkeit des jeweiligen Medikaments (siehe Tab. 2-2). Neue Leitlinien der W.A.A.V.P. legen eine neue Interpretation der Wirksamkeiten nach Durchführung des EZRT nahe, welche in Tab. 2-1 ersichtlich ist. Eine entsprechend dieser Empfehlungen ermittelte, geringere Wirksamkeit wurde demnach als resistent bzw. resistenzverdächtig gegenüber dem jeweiligen Wirkstoff eingestuft.

**Tab. 2-1. Einstufung der Wirksamkeit von Anthelminthika gemäß neuen W.A.A.V.P. Empfehlungen (Kaplan et al. 2023)**

Wirksamkeit	Ergebnisse
<b>Suszeptibel</b>	Untere 90 % Konfidenzgrenze $\geq$ 95 % und obere 90 % Konfidenzgrenze $\geq$ 99 %
<b>Resistent (Beginnend resistent)</b>	Obere 90 % Konfidenzgrenze $\leq$ 99 % (Obere 90 % Konfidenzgrenze $\leq$ 99 % und untere 90 % Konfidenzgrenze $\geq$ 95 %)
<b>Nicht eindeutig</b>	Untere 90 % Konfidenzgrenze $\leq$ 95 % und obere 90 % Konfidenzgrenze $\geq$ 99 %

**Tab. 2-2. Vorherige Einstufung der Wirksamkeit von Anthelminthika gemäß W.A.A.V.P. Empfehlungen (Coles et al. 1992)**

Wirksamkeit	Ergebnisse
<b>Reduziert</b>	Eizahlreduktion (EZR) $<$ 95 % und untere 95 % Konfidenzgrenze $<$ 90 %
<b>Vermutet reduziert</b>	Entweder EZR $<$ 95 % oder untere 95 % Konfidenzgrenze $<$ 90 %
<b>Normal</b>	EZR $\geq$ 95 % und unterer 95 % Konfidenzgrenze $\geq$ 90 %

## 2.5.2 Larvenmigrationshemmtest

Der Larvenmigrationshemmtest (LMHT) ermittelt den Einfluss von AH auf das Motilitätsvermögen von L3 gastrointestinaler Nematoden *in vitro*. Hierfür werden die isolierten L3 in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe des betreffenden Wirkstoffs für 24 Stunden inkubiert und anschließend die Migration durch Siebeinsätze bestimmter Maschenweite erlaubt. Aus der Ratio gewanderter zu den in Sieben zurückbleibenden Larven können Konzentrations-Wirkungskurven und die dazugehörigen EC<sub>50</sub> Werte (mittlere effektive Konzentration) berechnet werden. Diese Testform stellt neben weiteren, wie dem Eischlupfhemmtest (EHT, engl. *Egg hatch test*) und dem Larvenentwicklungshemmtest (LDA, engl. *Larval development test*), eine Nachweismöglichkeit dar, um nicht-invasiv AR festzustellen. Zudem werden *in vitro* Tests prinzipiell als eine kostengünstigere Alternative zu *in vivo* Verfahren wie dem EZRT beschrieben (Lacey et al. 1990). Im Fall der EHT und LDA wird für die Durchführung allerdings frisches Kotmaterial benötigt und damit ist ein Ansetzen des Tests am Tag der Probenentnahme oder nach kurzzeitiger Lagerung unter Ausschluss von Sauerstoff innerhalb weniger Tage notwendig. Da der LMHT mit kultivierten L3 arbeitet, ist eine zeitlich versetzte Durchführung des Tests zu weiteren Tests, wie beispielsweise dem EZRT, möglich. Die infektiösen L3 dienen als Grundlage, da sie sich bis zur Aufnahme durch

einen Wirt nicht weiterentwickeln, ohne Nahrungszufuhr überleben und daher über einige Monate gelagert werden können (Demeler et al., 2010). Damit besitzen sie die nötigen Eigenschaften zur reproduzierbaren Durchführung des Versuchs.

Der erste Test, der anhand der motilitätshemmenden Wirkung auf GI-Larven eine Aussage zum Resistenzstatus der Wurmspezies festlegte, wurde 1979 mit LEV und Morantel sowie *Teladorsagia* spp. durchgeführt (Martin and Le Jambre 1979). In diesem Ansatz wurden 300 Larven verdünnten Wirkstoffkonzentrationen (Levamisol 32,0 - 0,16 µg/ml, Morantel 3200 - 6,4 µg/ml) ausgesetzt und nach 24-stündiger Inkubation paralytisierte und bewegliche Larven mikroskopisch gezählt. Der Einsatz von Nylonsiebeinsätzen zur Wanderung der Larven mit aufsteigenden Wirkstoffkonzentrationen erfolgte erstmals 1992 in einem modifizierten Ansatz (Wagland et al. 1992). Getestet werden können im LMHT nur Wirkstoffe, die den Bewegungsapparat des Parasiten beeinträchtigen und eine Paralyse verursachen. Dazu zählen die ML, Imidazothiazole und Aminoacetonitril-Derivate, nicht jedoch die BZ. Der im Versuch durchgeführte LMHT wurde durch frühere Forschungsarbeiten mit IVM und LEV (Demeler et al. 2010b) und LEV (Aligusbi 2011) für *C. oncophora* und *O. ostertagi* validiert. Mit L3-Feldpopulationen aus einer klinischen Rinderstudie wurde der LMHT zudem mit IVM durchgeführt (Kleinschmidt 2010). Mit MON wurde der Test ebenfalls angewendet (Raza et al. 2016). Entscheidend für die Durchführung ist zudem die Wahl geeigneter Siebmaschengrößen. Diese wurden anhand inaktivierter Larven getestet, die bei zu großer Maschenweite passiv durch das Sieb hindurchfallen (Demeler et al. 2010b). Ein geeignetes Sieb sollte eine passive Barriere entstehen lassen und die aktive Migration der Larven dennoch hinderungsfrei erlauben. Von den getesteten 20, 25, 28 und 30 µm Sieben waren im Versuch 25 µm für Schafnematoden und 28 µm für Rindernematoden am besten geeignet (Demeler et al. 2010b).

### **2.5.3 Bestimmung der Spezieszusammensetzung mittels *Deep amplicon sequencing***

Neben der klassischen Sanger-Sequenzierung, welche die meistangewandte Methode zur DNA-Sequenzierung darstellt, werden unter dem Begriff *Next-generation-sequencing* (NGS) eine Reihe neuerer DNA-Analysemethoden zusammengefasst (Metzker 2010). Der Begriff umfasst die verbesserte Sequenzierung speziell aufbereiteter DNA-Proben durch die unmittelbare Amplifizierung einer vielfachen Menge von DNA in nur einem Sequenzierungsdurchlauf. Auf die Gesamtprobenzahl bezogen ist die Analyse kostengünstiger und liefert erheblich größere Datenmengen als die herkömmliche Sanger-Sequenzierung.

Zur Differenzierung der verschiedenen GIN-Spezies aus Poolproben kann die morphologische Unterscheidung der L3 nach Koprokultivierung durch darauf spezialisiertes Personal durchgeführt werden (Coles et al. 2006; Van Wyk and Mayhew 2013). Diese Vorgehensweise ist zeitaufwendig, und die Bestimmung der Nematoden benötigt eine erhebliche Expertise des

Laborpersonals. Zudem wird dafür lediglich eine Stichprobe und nicht die gesamte Probe ausgewertet. Weiterhin bieten artspezifische, sensitive real-time PCRs zur Detektion von GIN-Stadien, basierend auf bekannten Primer-sequenzen der Spezies eine verbesserte Nachweismöglichkeit (Von Samson-Himmelstjerna et al. 2002; Roeber et al. 2015).

Die *deep amplicon sequencing* (DAS)-Sequenzierungsmethode ist für Habitats mit großer ökologischer Diversität interessant, da die DNA von Spezies bestimmt und amplifiziert werden kann, ohne dass es der vorherigen Kenntnis einer bestimmten Gensequenz bedarf (Metzker 2010). So können auch seltene Genabschnitte in der DNA und post-translationale Modifikationen von Proteinen, zum Beispiel ein alternatives *Splicing* von Introns und Exons, detektiert werden (Metzker 2010), welche für die Entstehung von Medikamentenresistenzen entscheidend sein kann. Die identifizierten DNA-Sequenzen können über vorhandene Datenbanken bekannten Spezies zugeordnet werden. Erfolgreich wurde NGS bereits zur Analyse des menschlichen Mikrobioms verwendet und kann zur Analyse auf die zumeist kohabitierenden Multi-Spezies GIN im tierischen Wirt übertragen werden (Avramenko et al. 2015). In Anlehnung an das „Mikrobiom“ wurde die genomische Analyse der GIN durch die Autoren „*Nemabiome*“ getauft. Es wurde zunächst bei Schafen und Rindern etabliert, wird aber inzwischen auch zur Ermittlung der Diversität von Nematodenarten bei Wildwiederkäuern wie Bisons und bei Pferden eingesetzt (Avramenko et al., 2018; Mitchell et al., 2019). Die Methode basiert auf dem DAS des *internal transcribed Spacers-2* (ITS-2) der ribosomalen Nematoden-DNA, der ausreichend heterogen ist, um die beteiligten Spezies klar zu identifizieren (Avramenko et al., 2015; Gasser et al., 2008). Bei einem großen Probenaufkommen und für die routinemäßige Anwendung in Wiederkäuer-Betrieben bietet DAS einen interessanten Ansatz.

In der vorliegenden Studie wurde das DAS mit dem herkömmlichen EZRT kombiniert, um ein besseres Verständnis für die Häufigkeit der GIN-Spezies und ihre Beteiligung im anthelminthischen Resistenzgeschehen zu erlangen (Avramenko et al., 2015).

## **2.6 Fragebogen Schaf- und Rinderbetriebe**

Zur weiteren Erfassung möglicher AR-prädispositionierender Faktoren und einer hohen Prävalenz von GIN wurde studienbegleitend ein Fragebogen durch die schaf- und rinderhaltenden Landwirte ausgefüllt. In diesem wurden demographische, Betriebs- und anthelminthische Behandlungsdaten zusammengetragen. Der Besuch der Betriebe bot in diesem Kontext zudem den Vorteil, das individuelle Management der Landwirte kennenzulernen. Zur Entstehung der AR können Risikofaktoren gezählt werden, die grob den drei Hauptinflussgrößen Wirt, Parasit und Umwelt zugeordnet werden.

Der Fragebogen zielte auf die Umwelt als Stellgröße ab. Als relevante Faktoren wurden bei der Zusammenstellung der Fragen zum einen das Haltungsmanagement gewertet und

beispielsweise die Betriebsgröße, Haupteinkommensquelle, Art der Weidehaltung und zur Verfügung stehende Gesamtfläche für die Tiere erfragt. Ein weiterer Teil der Fragen widmete sich dem Entwurmungs- und AR-Nachweismanagement des Betriebs und behandelte auch mögliche Praktiken, die als Risiko- oder protektiver Faktor der AR-Entstehung gewertet wurden, z.B. Quarantäne zugekaufter Tiere. Ein letzter Teil beschäftigte sich mit den persönlichen Ansichten und dem Wissensstand des Landwirts, da dieser eine wichtige Einflussgröße im Entwurmungsmanagement und damit direkt oder indirekt zur AR-Entstehung beiträgt (Vande Velde et al. 2018b).

Die Art der AH-Anwendung durch die Landwirte wurde vor dem Hintergrund einer verbesserten Akzeptanz nachhaltiger Bekämpfungsansätze in den Fokus gerückt (Vande Velde et al. 2018b).

Da sich die Entwicklung von AR selten durch nur eine Ursache erklären lässt, sondern es sich in der Regel um ein multifaktorielles Geschehen handelt, sollen im Folgenden die vermutlich wichtigsten Risikofaktoren näher betrachtet werden und eine Gewichtung für die Schaf- und Rinderbetriebe erfolgen.

## **2.7 Umfrage großtierpraktizierender Tierärzte**

Durch die Befragung von TÄ wurde eine weitere Perspektive zur Implementierung nachhaltiger Entwurmungspraktiken eröffnet. Der zuständige TA stellt einen wichtigen positiven Einflussfaktor für die Umsetzung eines nachhaltigen Entwurmungsmanagement auf den Landwirt dar (Vande Velde et al. 2018b). Die einzunehmende Rolle ist auch insofern wichtig, da sich Landwirte selbst scheinbar gehäuft nicht für die Umsetzung nachhaltiger Bekämpfungsstrategien verantwortlich fühlen (Vande Velde et al. 2018b).

### 3 Material

Tab. 3-1 Anthelminthika

Bezeichnung	Hersteller
Panacur Suspension 2,5 % zum Eingeben für Schafe	MSD® Tiergesundheit, Deutschland
Panacur Suspension 10 % zum Eingeben für Rinder und Pferde	MSD® Tiergesundheit, Deutschland
Alfamectin 1 % Injektion für Rinder, Schafe und Schweine	Alfavet Tierarzneimittel GmbH, Deutschland
Eprecis 20 mg/ml Injektionslösung für Rinder, Schafe und Ziegen	Ceva Tiergesundheit GmbH, Deutschland
Cydectin 0,1 %, orale Lösung zum Eingeben für Schafe	Zoetis Inc., USA
Zolvix 25 mg/ml Lösung zum Eingeben für Schafe	Elanco GmbH, Deutschland

Tab. 3-2 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Agar-Agar	Carl Roth®, Deutschland
Bacto-Agar 1,5 %	Sigma-Aldrich®, USA
Dimethylsulfoxid 99,98 %	Carl Roth®, Deutschland
DNA Loading Dye (6x)	Fermentas/ Thermo Scientific®, USA
GR Green Nukleinsäure Gel Stain	Lab gene scientific SA, Switzerland
Ivermectin 93 %	Sigma-Aldrich®, USA
Levamisolhydrochlorid 98,6 %	Sigma-Aldrich® (16595-80-5), USA
Dinatriumhydrogenphosphat - Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth®, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat - NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck®, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich®, USA
Natriumhypochlorit	Carl Roth®, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth®, Karlsruhe
AmpureXP Beads	Beckman Coulter Life Sciences, USA
Qubit™ 1X dsDNA HS-Assay-Kit	Thermo Fisher® (Life Technologies), USA
Wasser LiChroSolv	Merck®, Deutschland
KAPA HiFi HotStart ReadyMix	Roche®, Schweiz
IDT-ILMN Nextera DU Index Set A	Illumina®, USA
MiSeq Reagent Kit V3	Illumina®, USA
1 M Tris HCl pH 8.0	Thermo Fisher®, USA

**Tab. 3-3 Puffer und Lösungen**

Bezeichnung	Hersteller
Natriumhydrochloridlösung, gesättigt	360 g NaCl in 100 ml dH <sub>2</sub> O, Carl Roth, Deutschland
Zuckerlösung, gesättigt	60 g Saccharose in 40 ml dH <sub>2</sub> O
Phosphatpuffer pH 7	5,77 ml 1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> + 4,23 ml 1M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , ad 1000 ml dH <sub>2</sub> O, Carl Roth, Deutschland

**Tab. 3-4 Kits**

Bezeichnung	Hersteller
KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit (2X)	KAPABiosystems®, Südafrika
NucleoSpin SOIL Kit	Macherey und Nagel, Deutschland

**Tab. 3-5 Primer**

Bezeichnung	Hersteller
NC1_0N: 101,2 nmol 5'- <b>TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG</b> ACG TCT GGT TCA GGG TTG TT -3'	Synthesized by IDT, Leuven, Belgien
NC1_1N: 95,6 nmol 5'- <b>TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG</b> NAC GTC TOG TTC AGO GTT GTT -3'	
NC1_2N: 98,5 nmol 5'- <b>TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG</b> NNA CGT CTG GTT CAG GGT TGT T -3'	
NC1_3N: 94,6 nmol 5'- <b>TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG</b> NNN ACG TCT GGT TCA GGG TTG TT -3'	
NC2_0N: 92,7 nmol 5'- <b>GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA</b> GTT AGT TTC TTT TCC TCC GCT -3'	
NC2_1N: 91 nmol 5'- <b>GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA</b> GNT TAG TTT CTT TTC CTC CGC T -3'	
NC2_2N: 97,1 nmol 5'- <b>GTC TCG TOG GCT COG AGA TGT GTA TAA GAG ACA</b> GNN TTA OTT TCG TTT CCT CCG CT -3'	
NC2_3N: 103,6 nmol 5'- <b>GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG</b> <b>ACA GNN NTT AGT TTC TTT TCC TCC GCT -3'</b>	

**Tab. 3-6 Einwegartikel**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Einmalhandschuhe	Kisker Biotech GmbH & Co KG, Deutschland
Rektalisierungshandschuhe	CuraVet® WDT, Deutschland
Holzspatel	Büttner-Frank GmbH, Deutschland
Gleitgel	Bovivet®, Provet AG, Schweiz
Gaze	Wilh. Weisweiler, Deutschland
Kanülen	Henke-Sass, Wolf GmbH, Deutschland
KimTech Wipes	Kimberley-Clark Professional, USA
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Deutschland
Pasteurpipetten	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Pipettenspitzen 1 – 1000 µl	Eppendorf SE, Deutschland
Reaktionsgefäße: 15 ml; 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Sägespäne	Peer-Span GmbH, Deutschland
Spritzen 5, 10, 20 ml	Injekt, B. Braun SE, Deutschland
Spritzen 30, 50 ml	Henke-Sass, Wolf GmbH, Deutschland
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
TC-Platte 24 Well, Suspension	Sarstedt AG & Co. KG, Deutschland
Lebensmittelfarben rot, gelb, blau	Edeka Stiftung & Co. KG, Deutschland

**Tab. 3-7 Mehrwegartikel**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Animeter® Maßband	Elanco®, Deutschland
Becherglas 250 ml, Plastik	Vitlab®, Deutschland
Honigglas mit Deckel	Deutscher Imkerbund e.V.
Haushaltssieb, Ø 18 cm	Fackelmann GmbH & Co. KG, Deutschland
Haushaltssieb, Ø 6,5 cm	Fackelmann GmbH & Co. KG, Deutschland
Mini-FLOTAC® Zählkammer	University of Napoli Federico II, Italien
FLOTAC® Zählkammer	University of Napoli Federico II, Italien
Mikroskopier-Aufsatz für FLOTAC®	University of Napoli Federico II, Italien
Plastikeimer, 10 l	Auer GmbH, Deutschland
Plastikspritflasche Kunststoff 500 ml	Vitlab®, Deutschland
Plastik-Trichter mit Schlauch	VWR International, USA
Petrischalen, Glas	Thermo Scientific GmbH, USA
Schlauchklemmen	VWR International, USA

Sieb: 50 µm	Eigenbau
TC-Platte Siebeinsatz 25 µm mit Meschpräzisionsgewebe	Eigenbau, Mesch aus Polyamid-Nylon (Sefar, Schweiz)
TC-Platte Siebeinsatz 28 µm mit Meschpräzisionsgewebe	Eigenbau, Mesch aus Polyamid-Nylon (Sefar, Schweiz)
Untergestell für Tierwaage	Eigenbau

**Tab. 3-8 Technische Geräte**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Digitaler Timer	TFA, Deutschland
Elektronische Präzisionswaage	Kern 440, Kern & Sohn GmbH, Deutschland
Handstückzähler	IVO
Inkubationsschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Deutschland
Inverses Mikroskop	Leica Camera AG, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica Camera AG, Deutschland
pH-Meter	Mettler Toledo
Speed Mill®	Analytik Jena GmbH, Deutschland
Tierwaage	Nohlex GmbH, Deutschland
Thermocycler	Gene Touch plus, Biozym Scientific GmbH, Deutschland
Tischzentrifuge	Biozym Scientific GmbH
Vortexer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Deutschland
Wasserwaage	Stabila Messgeräte, Deutschland
Zentrifuge	Zentrifuge 5424 R, Eppendorf AG, Deutschland
Zentrifuge (FLOTAC-Kammern)	Multifuge 1, Heraeus, Fischer Scientific GmbH, Deutschland
Zentrifuge	Megafuge 1.0, Heraeus Sepatech, Fischer Scientific GmbH, Deutschland
Mastercycler® nexus gradient PCR Thermocycler	Eppendorf®, Deutschland
Qubit 4	Thermo Fisher®, USA
MiSeq benchtop Sequenzer	Illumina®, USA

**Tab. 3-9 Software**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller/ Autoren/ Version</b>
Microsoft Excel, Microsoft Word	Microsoft®
R	4.0.2, 4.1.3, R <i>foundation package</i>
<i>eggCounts</i>	2.3-2, (Wang and Furrer 2018)
GraphPad Prism	5.03, GraphPad® Software, USA
Snap Gene	GSL Biotech LLC, USA
Endnote MacOS	20.2, Clarivate Analytics®,USA
Labfolder	Labfolder GmbH, Deutschland
Unipark.com	Tivian XI GmbH, Deutschland
FastQC	Babraham Bioinformatics®
DADA2 <i>package</i>	1.16, Benjamin Callahan
cutadapt	3.7, NBIS
ITS-2 Datenbank	1.3, (Workentine et al. 2020)

**Tab. 3-10 Nematodenisolate**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Haemonchus contortus</i> McMaster	Zur Verfügung gestellt vom Institut für Parasitologie, FU Berlin
<i>Trichostrongylus colubriformis</i> sus.	
<i>Cooperia oncophora</i> sus.	

## 4 Methoden

### 4.1 Überprüfung der Anthelminthika-Wirkung im Feld

Dieser Teil der vorliegenden Studie diente der Untersuchung der Anthelminthika-Resistenzsituation von MDS in Schaf- und Rinderweidebetrieben in Brandenburg und angrenzenden Bundesländern. Das erste Teilprojekt umfasste eine Feldstudie zur Ermittlung der AR mittels Eizahlreduktionstest (EZRT) in den ausgewählten Studienbetrieben mit Schaf- bzw. Rinderhaltungen.

Für die Studie wurden Tiere innerhalb der Versuchsbetriebe gewählt, welche den gewählten Kriterien (siehe 4.1.2) entsprachen. Diese wurden für jeden Betrieb in drei (Schafe), bzw. zwei (Rinder) Untergruppen à 20 Tiere aufgeteilt, die jeweils ein unterschiedliches AH erhielten. Aus Gründen der Dosierungsgenauigkeit wurde auf eine Drench-Applikation bei oralen Präparaten verzichtet und stattdessen eine Einmal-Spritze verwendet. Eine individuelle Kotprobe wurde zunächst am Tag der Behandlung, sowie ein zweites Mal 14 Tage später entnommen und mittels Mini-FLOTAC (Schafe) bzw. FLOTAC (Rinder) analysiert. Die Ergebnisse wurden innerhalb des gepaarten Studiendesigns mit der ersten Probe vor Behandlung verglichen. Damit entfiel die Notwendigkeit einer unbehandelten Kontrollgruppe zur Versuchsdurchführung (Calvete and Uriarte 2013). Die ermittelten EPG dienten zur Ermittlung der AH-Wirksamkeit vor Ort. Aus Sammelproben der Betriebe wurden Wurmlarven kultiviert, welche zur Wirksamkeits-Analyse weiterer AH *in vitro* innerhalb eines LMHT und zur Bestimmung der vorhandenen resistenten Wurmspezies mittels DAS genutzt wurden.

#### 4.1.1 Feldstudie

Für die Studie wurde die Stellungnahme zu den geplanten Untersuchungen an Schafen und Rindern von dem Landesamt für Arbeitsschutz, Verbraucherschutz und Gesundheit (LAVG) Brandenburg unter dem Aktenzeichen AZ-2340-9-2020 eingeholt, wonach es sich bei den geplanten Eingriffen nicht um ein Tierversuchshaben nach § 7 Abs. 2 TierSchG handelt. Eine Erweiterung folgte im Jahr 2021 für die Bundesländer Sachsen-Anhalt und Mecklenburg-Vorpommern mit dem AZ-7221.3-14163\_21.

#### 4.1.2 Allgemeine Kriterien

Zur optimalen Durchführung des EZRTs in der Praxis war an die Betriebsseite eine Reihe von Mindestanforderungen zu stellen, die auf den Empfehlungen des COMBAR Projekts (EU COST action; <https://www.combar-ca.eu/>) zur Durchführung des EZRT beruhten (Combar-Cost-Action 2021):

- Die Möglichkeit, die Tiere zweimalig durch einen Fangstand führen zu können

- Eine Mindestanzahl von 10 Tieren unter 24 Monaten (1. und 2. Weideperiode)
- Mindestens 6 Wochen lang durfte vor Versuchsbeginn keine anthelminthische Behandlung erfolgt sein.

## **4.2 Durchführung Eizahl-Reduktionstest (EZRT)**

### **4.2.1 Schaf**

Die bis zu 75 Studientiere je Betrieb wurden rektal beprobt, auf einer mobilen Tierwaage gewogen, um eine genaue Dosierung nach Gewicht durchführen zu können und anschließend randomisiert in drei Versuchsgruppen eingeteilt: Falls 75 Tiere zur Verfügung standen, erhielten je 25 Schafe folgende Wirkstoffe: das BZ FBZ, Panacur® Suspension 2,5 % in der Dosierung 5 mg/kg Körpergewicht (KGW) oral) sowie die ML IVM, Alfamectin® 1% in der Dosierung 200 µg/kg KGW subkutan) und MOX, Cydectin® 0,1% in der Dosierung 0,2 mg/kg KGW oral). Zur Überprüfung der Wirksamkeit wurde nach 14 (*range* 13 - 16) Tagen eine weitere Kotprobe der Studientiere analysiert.

### **4.2.2 Rind**

Die Durchführung des EZRTs in Rinderbetrieben erfolgte entsprechend der Schafbetriebe: Zwei rektale Kotproben wurden im Abstand von 14 Tagen von bis zu 20 Einzeltieren pro Behandlungsgruppe entnommen. Die Gewichtsbestimmung der Tiere zur Ermittlung der korrekten Behandlungsdosis erfolgte dabei mittels in dem jeweiligen Betrieb vorhandener Tierwaagen und - falls nicht vorhanden - über die Messung des Brustumfangs mittels Animeter®. Zum Einsatz kamen dabei das subkutane Injektionspräparat Eprecis® 20 mg/ml mit dem Wirkstoff EPR in einer Dosierung von 0,2 mg/kg KGW sowie, zur oralen Eingabe Panacur® Suspension 10 % mit dem Wirkstoff FBZ in einer Dosierung von 7,5 mg/kg KGW. Das eingesetzte IVM-Präparat Chanectin® 0,5 % Lösung wurde in Betrieb 2 nach Gewichtsermittlung mittels Tierwaage in einer Dosierung von 500 µg Ivermectin/kg KGW als pour-on Applikation verabreicht. Die so behandelte Tiergruppe wurde nach der Behandlung bis zur Kontrollbeprobung nach 14 (*range* 14) Tagen separat von nicht oder anders behandelten Tieren gehalten.

### **4.2.3 Mini-FLOTAC Untersuchungsverfahren zur Quantifizierung von Eiern**

Aus 5 g der tierindividuellen Kotproben wurde die MDS-EPG mittels Mini-FLOTAC Verfahren bestimmt (Cringoli et al. 2017). Dafür wurden diese zunächst in 45 ml gesättigter NaCl-Lösung suspendiert, durch Filtern durch ein Teesieb von größeren Partikeln befreit und beide Zählkammern einer Mini-FLOTAC Apparatur mit der Suspension gefüllt. Anschließend wurde 10 Minuten gewartet, damit die Eier in dieser Zeit flotieren konnten. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Zählkammern entlang der eingravierten Linien mit 400-facher Vergrößerung durchmustert und die Eier gezählt. Die Gesamtzahl der gefundenen Eier wurde für die

Bestimmung des EPG mit der Zahl fünf multipliziert. Zur Sensitivitätssteigerung bzgl. der Detektion von Anthelminthikaresistenzen erfolgte für jede Behandlungsgruppe, in der vor der Behandlung insgesamt weniger als 200 MDS-Eier für alle untersuchten Tiere zusammen in den Zählkammern gezählt wurden, eine zusätzliche Auswertung zweier weiterer Zählkammern eines zweiten Mini-FLOTAC Apparats für jedes Tier. In diesem Fall wurden auch die Proben nach der Behandlung durch Zählung von vier Kammern ausgewertet, während für diese weiteren Fälle wurden die gezählten Eier jeweils dann mit 2,5 multipliziert wurden, um die EPG jeden Tieres zu berechnen. Letzteres war für einen Betrieb (Schafbetrieb Nr. 10) der Fall.

#### **4.2.4 FLOTAC Untersuchungsverfahren zur Quantifizierung von Magen-Darm-Strongylideneiern**

Die mikroskopische Analyse der Rinderproben geschah mittels FLOTAC System (Cringoli et al. 2010) nach Anleitung des Herstellers: 10 g der Einzelkotproben wurden abgewogen und in 90 ml Leitungswasser suspendiert, über ein Teesieb gefiltert und 11 ml der so entstandenen Suspension in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Bei 170×g wurden die Proben für 2 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zentrifugenröhrchen mit Sediment wurde mit gesättigter NaCl-Lösung auf 11 ml aufgefüllt und das Sediment in der NaCl-Lösung resuspendiert. Der FLOTAC Apparat wurde zusammengesetzt, die Einzelteile befeuchtet, um die Bildung von Luftblasen zu vermeiden und mit der Suspension befüllt. Die FLOTAC Kammern wurden bei 120×g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden beide Kammern des FLOTAC Apparats unter dem Mikroskop ausgelesen. Ein gezähltes Ei unter dem Mikroskop entspricht dabei 1 EPG.

Bei der Auswertung wurde die Mindestanzahl von 200 Eiern in der Summe über alle Tiere der Anthelminthika-Testgruppen in jedem Betrieb erreicht. Bei einer Unterschreitung hätten die Proben ein weiteres Mal untersucht und die Summe der beiden Zählungen mit 0,5 multipliziert werden müssen, um so die Sensitivität zu erhöhen.

#### **4.2.5 Statistische Auswertung**

Zunächst wurden die Daten der Tierbetriebe in Papierform festgehalten und später tabellarisch in MS Excel® übertragen. Zur Ermittlung der EZR wurde ein zusammenfassendes Excel® Dokument erstellt, das die *raw egg counts* vor und nach anthelminthischer Behandlung für jedes Tier, geteilt nach Betrieben, aufführte.

Davon ausgehend wurde mittels R, Version 4.0.2 und des R Pakets „*eggCounts*“, Version 2.3-2, die EZR berechnet (Wang and Furrer 2018). Der R Befehl lautete:

```
> library("eggCounts")
```

```
> library("coda")
```

```

> library("readxl")

> EPGDaten <- read_excel("~/R Statistik/EPGDaten.xlsx")

> attach(EPGDaten)

> Farm1Fe_FECRT_model_paired_commonEff_noZeroInfl <- fecr_stan(na.omit(PreFe1),
na.omit(PostFe1), rawCounts = FALSE, preCF = 1, paired = TRUE, indEfficacy = FALSE, zeroInflation
= FALSE, nsamples = 2000, nburnin = 1000, thinning = 1, nchain = 2, ncore = 1, adaptDelta = 0.95,
saveAll = FALSE, verbose = FALSE)

> Farm1Fe_FECRT_model_paired_commonEff_noZeroInfl_mcmc <-
stan2mcmc(Farm1Fe_FECRT_model_paired_commonEff_noZeroInfl$stan.samples)

> HPDinterval(Farm1Fe_FECRT_model_paired_commonEff_noZeroInfl_mcmc, prob = 0.9)

```

Die Verteilung der EPGs vor und nach EZRT wurden getrennt für jeden untersuchten Wirkstoff in den Betrieben in GraphPadPrism® auf Signifikanz mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test untersucht.

Eine entsprechend der aktuellen W.A.A.V.P. Leitlinien (Coles et al. 1992; Kaplan et al. 2023) ermittelter Wert unter 99 % der oberen 90 % Konfidenzgrenze wurde demnach als resistent bzw. resistenzverdächtig gegenüber des jeweiligen Wirkstoffs und eine Wert über 95 % der unteren 90 % Konfidenzgrenze und über 99 % der oberen 90 % Konfidenzgrenze als suszeptibel eingestuft. Nicht eindeutig sind Ergebnisse, die einen Wert der unteren 90 % Konfidenzgrenze von unter 95 % und der oberen 90 % Konfidenzgrenze von über 99 % aufweisen, siehe Tab.2-2.

#### 4.2.6 Eiisolierung zur Gewinnung von ersten Larvenstadien

Die gewonnenen Kotproben der Schafe dienten neben der mikroskopischen Diagnostik der Gewinnung von L1, welche zur weiteren Analyse der Wurmspezies mittels *DAS* benötigt wurden.

Im Anschluss an die EZRT-Diagnostik wurde das verbliebene Kotprobenmaterial auf Betriebsebene für die Isolierung der MDS-Eier gepoolt. Zu diesem Zweck wurde die gesamte Probe zunächst manuell homogenisiert und in Leitungswasser ausreichend suspendiert, um durch ein Haushaltssieb mit > 250 µm Maschenweite in einen 5 L Plastikeimer gespült zu werden. Die gefilterte Suspension wurde portionsweise in 50 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt und 5 Minuten lang bei 1500×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 50 ml gesättigtem NaCl (relative Dichte: 1,2) resuspendiert. Die Röhrchen wurden erneut 5 Minuten lang bei 1500×g zentrifugiert. Die obersten 5-10 ml des Überstands wurden mit einer Pasteurpipette abgenommen und mit der 4-fachen Menge Leitungswasser versetzt. Dieses Ei-Wasser-Gemisch wurde wieder in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt und erneut 5 Minuten

bei 1500×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets zusammengeführt und in 10 ml deionisiertem Wasser (elektrische Leitfähigkeit von 250 µS) resuspendiert. Je nach Kontaminationsgrad der Probe und Anzahl vorhandener Eier wurde ein weiterer Aufreinigungsschritt über einen Zuckergradienten durchgeführt. Dafür wurde eine Zuckerstammlösung aus 60 g Saccharose in 40 ml dH<sub>2</sub>O hergestellt. Diese wurde mit destilliertem Wasser zu drei Lösungen mit 10 %, 25 % und 40 % der Stammlösung verdünnt und kühl gelagert. Die Lösungen wurden mit 1-2 Tropfen Lebensmittelfarbe unterschiedlich farbig markiert und je 10 ml untereinander in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet, beginnend mit der am wenigsten konzentrierten Zuckerlösung, sodass eine farblich sichtbare Schichtung entstand. Die Eissuspension wurde vorsichtig auf die obere 10 %ige Schicht gegeben und der Gradient 5 Minuten lang bei 1500×g zentrifugiert. Die Eier finden sich nach der Zentrifugation zwischen der 10 % und 25 % Schicht und wurden mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in einem erneuten Waschschrift auf einem 25 µm Sieb mit Leitungswasser gespült, um Reste der Zuckerlösung zu entfernen. Anschließend wurden die Eier erneut in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten bei 1500×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Eier in 10 ml deionisiertem Wasser resuspendiert. Die Eizahl wurde durch das Zählen von 3 × 10 µl der gut durchmischten Suspension unter dem Mikroskop bestimmt. Anschließend wurden die Eier in eine unbeschichtete Zellkulturflasche überführt und bei 25 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit unter mehrfacher Kontrolle 48 Stunden lang (min 24 - max 60 Stunden) inkubiert. Die geschlüpften L1 wurden zunächst mit 5 ml DEPC behandeltem Wasser in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gespült, 30 Minuten lang sedimentiert, der Überstand bis auf 5 ml entfernt. Dann wurden die Larven erneut gezählt und je 1.000 Larven in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen pipettiert, darin erneut sedimentiert und der wässrige Überstand bis auf 300 µl entfernt. Die so gewonnenen L1 Larvenproben wurden bei – 20 °C gelagert.

#### **4.2.7 Larvenkulturen zur Gewinnung von MDS-Drittlarven**

Die Rinder-Kotproben und ein Teil der Schafproben wurden für die weiteren Analysen und die Gewinnung der L3-Stadien auf Betriebsebene gepoolt und kultiviert. Dafür wurde an die EZRT-Diagnostik anschließend das restliche Kotmaterial für jeden Betrieb zusammengeführt, manuell homogenisiert und, im Fall der Rinderproben mit ihrer feuchten Konsistenz, mit Holzspänen vermengt. Mit dem Kotmaterial wurden leere Honiggläser bis zum Glasrand befüllt und ein Deckel lose auf jedes Honigglas aufgesetzt, bevor die Larvenkulturen bei 25 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80 % für 7-10 Tage (Schaf) und 10 Tage (Rind) inkubiert wurden.

Geerntet wurden die Larven, indem die Honiggläser mit Leitungswasser bis zum Rand aufgefüllt und auf dem Kopf, ohne Deckel, in eine Petrischale gestülpt wurden. Die Petrischale wurde anschließend ebenfalls bis an den Rand mit Wasser befüllt. Über Nacht wanderten die Larven aus der Kotkultur in die Petrischale aus und wurden mittels Pasteurpipette in 50 ml

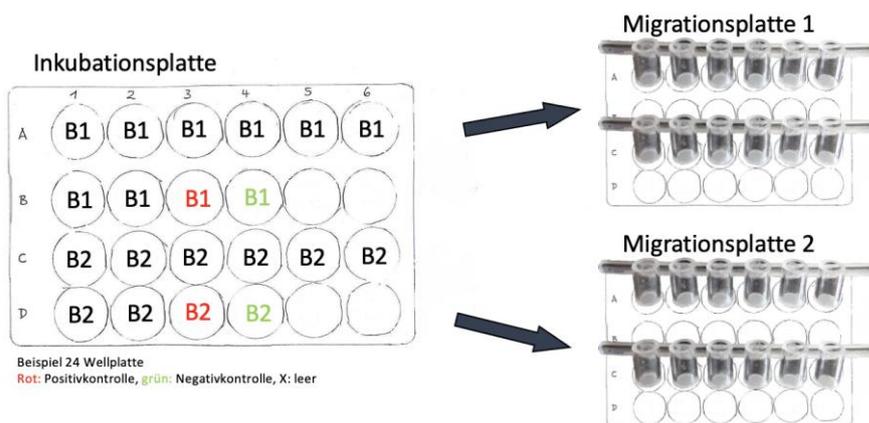
Zentrifugen-Röhrchen überführt. Die Zahl der Larven wurde nach 30-minütiger Sedimentation ermittelt: Der Inhalt des Zentrifugen-Röhrchens wurde bis auf 10 ml abgenommen, die Larven durch Schwenken gemischt und dreimal 10 µl der Suspension unter einem inversen Mikroskop gezählt. Die Gesamtzahl der in den 10 ml enthaltenen Larven wurde durch Multiplikation des Mittelwertes der Zählungen mit dem Faktor 1000 ermittelt.

### 4.3 Larvenmigrationshemmtest

Der *in vitro* Nachweis von AR erfolgte anhand der isolierten Drittlarven aus den Studienbetrieben. Der Test ermittelte die EC<sub>50</sub> Werte des getesteten AH in Anwesenheit der Larven, basierend auf einer aufsteigenden Wirkstoffkonzentrationsreihe, derer sie zunächst 24 Stunden ausgesetzt waren. Die Testreihen wurden in Doppelansätzen inkubiert und bei ausreichender Larvenmenge bis zu dreimal pro Betrieb wiederholt.

Schematisch ist der Versuchsaufbau in Abb. 4-1 dargestellt.

Abb. 4-1 Beispielhafte Durchführung eines Larvenmigrationshemmtest mit Betrieb 1 und 2



#### 4.3.1 Nematoden-Referenzisolate

Zur Validierung des LMHT wurde zuerst eine Testreihe mit bekannt suszeptiblen Larvenisolaten durchgeführt. Für die Schaf-LMHT geschah dies mit *H. contortus* McMaster und *T. colubriformis* sus. L3, welche bisher keiner Exposition mit IVM und LEV ausgesetzt waren. Desgleichen wurden die Rinder-LMHT zunächst mit *C. oncophora* L3 validiert, welche gegenüber allen AH bekannt suszeptibel sind. Die suszeptiblen Isolate wurden zur Aufrechthaltung der Vitalität in regelmäßigen Abständen in Infektionsversuchen durch naive Kälber bzw. Lämmer passagiert, und die nächste Generation der Würmer wiedergewonnen.

#### 4.3.2 Verdünnungsreihen Ivermectin

Zum Ansetzen der 10<sup>-2</sup> M Stammlösung wurden 8,71 mg Ivermectin in 1000 µl 99,98% DMSO gelöst. Die Stammlösung wurde zum Ansetzen der Verdünnungsreihen verwendet, siehe Tab. 4-1 (Algusbi 2011).

**Tab. 4-1 Herstellung der Verdünnungsreihe Ivermectin**

	<b>Ausgangsvolumen und Konzentration</b>	<b>DMSO</b>	<b>C2 DMSO Konz.</b>	<b>C3 Endkonz.</b>
K1	30 µl 10 <sup>-2</sup> M	120 µl	2 × 10 <sup>-2</sup> M	10 <sup>-5</sup> M
K2	50 µl 10 <sup>-2</sup> M	450 µl	10 <sup>-3</sup> M	5 × 10 <sup>-6</sup>
K3	200 µl 10 <sup>-3</sup> M	800 µl	2 × 10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-6</sup> M
K4	100 µl 10 <sup>-3</sup> M	900 µl	10 <sup>-4</sup> M	5 × 10 <sup>-7</sup> M
K5	20 µl 10 <sup>-3</sup> M	980 µl	2 × 10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-7</sup> M
K6	10 µl 10 <sup>-3</sup> M	990 µl	10 <sup>-5</sup> M	5 × 10 <sup>-8</sup> M
K7	20 µl 10 <sup>-4</sup> M	980 µl	2 × 10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-8</sup> M
K8	10 µl 10 <sup>-4</sup> M	990 µl	10 <sup>-6</sup> M	5 × 10 <sup>-9</sup> M
K9	20 µl 10 <sup>-5</sup> M	980 µl	2 × 10 <sup>-7</sup> M	10 <sup>-9</sup> M
K10	10 µl 10 <sup>-5</sup> M	990 µl	10 <sup>-7</sup> M	5 × 10 <sup>-10</sup> M

100 µl der C2 DMSO Konzentrationen wurden in 900 µl dH<sub>2</sub>O verdünnt und 90 µl der jeweiligen Konzentration in die 24-Well Platte mit dem Gesamtvolumen 1800 µl eingegeben, sodass die folgenden, in Tab. 4-1 gelisteten, Endkonzentrationen C3 der Verdünnungsstufen in den Vertiefungen der 24-Well Platte zustande kamen.

Für die Positivkontrolle wurden 90 µl der Stammlösung mit der Konzentration 10<sup>-2</sup> M verwendet, sodass C3 in der 24-Well Platte 5 × 10<sup>-4</sup> M aufwies, und für die Negativkontrolle wurden 90 µl des 14,1 M DMSO eingesetzt, sodass eine Endkonzentration von 70,5 mM verwendet wurde.

#### **4.3.3 Verdünnungsreihe Levamisol**

Zum Ansetzen der 10<sup>-1</sup> M Stammlösung wurden 24,1 mg LEV in 1000 µl dH<sub>2</sub>O gelöst. Die Stammlösung wird zum Ansetzen der Verdünnungsreihe verwendet, siehe Tab. 4-2 (Algusbi 2011).

**Tab. 4-2 Herstellung der Levamisol Verdünnungsreihe**

	<b>Ausgangsvolumen und Konzentration</b>	<b>dH<sub>2</sub>O</b>	<b>C2 dH<sub>2</sub>O Konz.</b>	<b>C3 Endkonz.</b>
K1	100 µl 10 <sup>-1</sup> M	900 µl	10 <sup>-2</sup> M	5 x 10 <sup>-4</sup> M
K2	200 µl 10 <sup>-2</sup> M	800 µl	2 x 10 <sup>-3</sup> M	10 <sup>-4</sup> M
K3	100 µl 10 <sup>-2</sup> M	900 µl	10 <sup>-3</sup> M	5 x 10 <sup>-5</sup> M
K4	20 µl 10 <sup>-2</sup> M	980 µl	2 x 10 <sup>-4</sup> M	10 <sup>-5</sup> M
K5	10 µl 10 <sup>-2</sup> M	990 µl	10 <sup>-4</sup> M	5 x 10 <sup>-6</sup> M
K6	400 µl 10 <sup>-4</sup> M	600 µl	4 x 10 <sup>-5</sup> M	2 x 10 <sup>-6</sup> M
K7	200 µl 10 <sup>-4</sup> M	800 µl	2 x 10 <sup>-5</sup> M	10 <sup>-6</sup> M
K8	100 µl 10 <sup>-4</sup> M	900 µl	10 <sup>-5</sup> M	2 x 10 <sup>-7</sup> M
K9	20 µl 10 <sup>-4</sup> M	980 µl	2 x 10 <sup>-6</sup> M	10 <sup>-7</sup> M
K10	10 µl 10 <sup>-4</sup> M	990 µl	10 <sup>-6</sup> M	2 x 10 <sup>-8</sup> M

Von der C2 wurden jeweils 90 µl in das Well eingegeben, sodass die in Tab. 4-2 gelisteten C3 der Verdünnungsstufen in den Vertiefungen der 24-Well Platte erreicht wurden.

Für die Positivkontrolle wurden 90 µl der Stammlösung mit der Konzentration 10<sup>-1</sup> M verwendet, sodass C3 im Well 5 x 10<sup>-3</sup> M aufwies und für die Negativkontrolle 90 µl dH<sub>2</sub>O verwendet.

#### **4.3.4 Durchführung der Larvenmigrationshemmtests**

Vorbereitend wurde in jede Vertiefung der 24-Well Platte 1690 µl des 10 mM Phosphatpuffers pH 7 gegeben. Die L3 wurden nach mehrmaligen Zählkontrollen von 10 µl der Gesamtmenge durch Verdünnung oder Aufkonzentration auf 120 L3 in 20 µl Flüssigkeit eingestellt und ebenfalls in die Vertiefung gegeben. Von den aufsteigenden Wirkstoffkonzentrationen sowie einer Positiv- und Negativkontrolle wurden jeweils 90 µl hinzupipettiert und der Ansatz für 24 Stunden bei 20 - 25°C inkubiert. Nach Ablauf wurden die Larven auf Siebe mit definierter Maschengröße (25 µm Schaf; 28 µm Rind) transferiert und ihnen weitere 24 Stunden die Möglichkeit gegeben aktiv zu migrieren. Nach Abstoppen des Assay wurden die gewanderten und die auf dem Sieb verbliebenen Larven gezählt. Zu diesem Zweck wurden die Larven auf dem Sieb zuvor in eine leere benachbarte Vertiefung der Migrationsplatte gespült. Zusätzlich wurden die Siebeinsätze auf zurückgebliebene Larven untersucht. Vor jeder Durchführung wurden die Siebeinsätze zudem auf ihre Intaktheit unter dem inversen Mikroskop geprüft.

### 4.3.5 Auswertung der Larvenmigrationshemmtests

Die Ratio gewanderter zu nicht gewanderten Larven wurde zunächst in MS Excel® dokumentiert und der Anteil gewanderter Larven an der Gesamtlarvenzahl in den Konzentrationen und der Positiv- und Negativkontrolle prozentual errechnet. Anschließend wurden die Werte mithilfe der Software GraphPadPrism® 5.03 tabellarisch als Y-Werte den Wirkstoffkonzentrationen (X-Werte) zugeordnet. Die Wirkstoffkonzentrationen wurden logarithmisch ( $\log_{10}$ ) transformiert, um die Werte in das vier-parameter logistische Konzentrations-Wirkungs-Modell einzupassen und die  $EC_{50}$ -Werte, deren Standardfehler, die oberen und unteren 95 % Konfidenzwerte der  $EC_{50}$ -Werte sowie der  $R^2$ -Wert zur Bewertung der Varianz ausgegeben.

Ein Vergleich der  $EC_{50}$ -Werte von *C. oncophora* mit dem jeweiligen Betrieb wurde mittels *Extra-sum of square F-test* zur Feststellung einer Signifikanz zwischen den Datensätzen ermittelt.

## 4.4 Speziesbestimmung mittels *deep amplicon sequencing*

Zum Zweck der Ermittlung der am Resistenzgeschehen beteiligten Wurm��pezies sollte mittels *DAS* die Sequenzierung der DNA, die aus den von den Betrieben gewonnenen Larvenproben gewonnen wurde, erfolgen. Hierfür wurden im Jahr 2020 L1 aus Sammelproben der Schafbetriebe isoliert und im darauffolgenden Jahr L3 aus gepoolten Larvenkulturen der Rinderbetriebe, entsprechend der Durchführung vorangegangener Publikationen für die jeweiligen Wirtsspezies (Avramenko et al. 2015; Redman et al. 2019). Aliquote aus ca. 1.000 L1 bzw. L3 wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  zwischengelagert.

### 4.4.1 DNA-Extraktion und 1. PCR

Vorbereitend fand eine DNA-Extraktion der Proben mit dem Macherey-Nagel® SOIL-Kit statt. Daran angeschlossen folgte eine erste PCR-Amplifizierung der ITS-2 Region. Dafür wurden spezifische Primer mit Illumina® Adaptern und einem DNA Barcode verwendet (Tab. 4-3). Der Barcode diente später zur bioinformatischen Zuordnung einzelner Sequenzen bestimmter Proben (Betriebe / Sammlungszeitpunkte).

Die DNA-Extraktion der ca. 1.000 Larven enthaltenden Poolproben erfolgte nach Anleitung des NucleoSpin® Soil Kits. Zunächst wurden 500  $\mu\text{l}$  der Probe mit 700  $\mu\text{l}$  SL1 Puffer in einem *MN Bead Tube Type A* vermengt und 150  $\mu\text{l}$  Enhancer SX hinzugefügt. Das Bead Tube wurde 8 Minuten in der Speed Mill homogenisiert. Zur Entfernung von Kontaminanten wurde die Probe bei  $11.000 \times g$  für 2 Minuten zentrifugiert, 150  $\mu\text{l}$  SL3 hinzugegeben, die Probe gevortext, 5 Minuten auf Eis gelagert und anschließend erneut bei  $11.000 \times g$  für 1 Minute zentrifugiert. In einem Filterschritt wurde der Überstand auf eine NucleoSpin® *Inhibitor Removal Column* gegeben und erneut bei  $11.000 \times g$  für 1 Minute zentrifugiert, anschließend

250 µl SB Puffer hinzugefügt, 5 Sekunden gevortext und 550 µl des Lysats erneut auf eine NucleoSpin® *Soil Column* gegeben. Hier erfolgten zwei Zentrifugationsschritte bei 11.000 × g für jeweils 1 Minute. Die Silica Membran wurde in vier Waschschrritten mit SB, SW1 und SW2 Puffer aufgereinigt und wiederum bei 11.000 × g für 2 Minuten zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die extrahierte DNA mit 50 µl dH<sub>2</sub>O anstelle eines Elutionspuffers gelöst.

Im Anschluss wurde eine erste ITS-2 PCR durchgeführt. Hierfür wurden je 4 spezifische, modifizierte NC1-Vorwärts- und NC2-Reverse-Primer mit Illumina®-Adaptoren verwendet. Die Primer binden an die ribosomalen Regionen 5.8 S und 28 S, wie in Tab. 4-3 dargestellt (Avramenko et al., 2015; Gasser et al., 2008).

Für die PCR wurden 12,5 µl 2× KAPA® Hifi HotStart Ready Mix, 0,75 µl NC1 Primermix (Endkonzentration: 0,3 µM), 0,75 µl NC2 Primermix (Endkonzentration: 0,3 µM), 10 µl dH<sub>2</sub>O und 1 µl der extrahierten DNA aus der jeweiligen Larvenprobe verwendet.

Der Mix wurde unter den folgenden Bedingungen amplifiziert: 95 °C für 3 min, und 34 Zyklen von 98 °C für 20 s, 62 °C für 15 s, 72 °C für 30 s und die abschließende Verlängerung von 72 °C für 2 min.

**Tab. 4-3 NC1 und NC2 Gasser Primer mit Illumina Adaptoren (fett)**

NC1_0N: 5'- <b>TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG</b> ACG TCT GGT TCA GGG TTG TT -3'
NC1_1N: 5'- <b>TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG</b> NAC GTC TOG TTC AGO GTT GTT -3'
NC1_2N: 5'- <b>TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG</b> NNA CGT CTG GTT CAG GGT TGT T -3'
NC1_3N: 5'- <b>TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG</b> NNN ACG TCT GGT TCA GGG TTG TT -3'
NC2_0N: 5'- <b>GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GTT</b> AGT TTC TTT TCC TCC GCT -3'
NC2_1N: 5'- <b>GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GNT</b> TAG TTT CTT TTC CTC CGC T -3'
NC2_2N: 5'- <b>GTC TCG TOG GCT COG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GNN</b> TTA OTT TCG TTT CCT CCG CT -3'
NC2_3N: 5'- <b>GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GNN</b> NTT AGT TTC TTT TCC TCC GCT -3'

Die erfolgreiche Quantifizierung der PCR Produkte wurde mittels Gelelektrophorese geprüft. Von den PCR Produkten wurden 10 µl in 1,5 ml Eppendorf Tubes aliquotiert und für den Probenversand zusätzlich mit Parafilm versiegelt und in einer Umverpackung bis zum Transport ins BVL (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) bei + 4 °C gelagert.

Im *DAS*-Labor des BVL fand die finale Librarypreparation und die *DAS*-Sequenzierung der Proben statt.

#### 4.4.2 Prozessierung der PCR Produkte

Die Sequenzierung der ITS-2 PCR Produkte auf einem MiSeq (Illumina®) Gerät wurde im Labor des BVL durchgeführt. Die folgenden Angaben beruhen auf persönlichen Mitteilungen durch Dr. Stefan Fiedler (BVL, Berlin).

Nach Erhalt wurden die ITS-2 PCR Produkte zunächst mittels AMPureXP® beads gereinigt. In diesem Schritt wurden überschüssige PCR Primer, Polymerase und Salze entfernt. Die Durchführung der AMPureXP® bead Reinigung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll in einer 96-Well Rundbodenplatte und einem Reaktionsvolumen von 25 und 50 µl. Die Waschschrte wurden mit frisch hergestelltem 80%igen Ethanol durchgeführt. Die finale Elution erfolgte in 40 µl, für die Molekularbiologie geeignetem Wasser. Es wurden 35 µl Eluat in eine 96-Well PCR Platte zur weiteren Lagerung bei 4 °C überführt.

Nach der Aufreinigung wurden die PCR Produkte aus der ITS-2 PCR mittels Qubit 3 Fluorometer quantifiziert. Hierzu wurde das Qubit® 1x dsDNA HS-Assay-Kits nach den Herstellerangaben verwendet.

Zur Vorbereitung der Sequenzierung musste 5'- und 3'-seitig ein Barcode mit Indexsequenz angehängt werden. Das sogenannte *barcoding* erfolgte mittels *limited cycle* PCR. Hierzu wurden 12,5 µl 2x KAPA® Hifi HotStart Ready Mix, 1,5 µl IDT-Illumina® Nextera dual-Adapter Primermix (10 mM, Endkonzentration: 0,4 µM), 8 µl dH<sub>2</sub>O und 3 µl (ca. 30 ng) gereinigtes PCR Produkt verwendet.

Die *limited cycle* PCR wurde unter den folgenden Bedingungen amplifiziert: 95 °C für 2 min, und 25 Zyklen von 98 °C für 20 s, 62 °C für 15 s, 72 °C für 15 s und die abschließende Verlängerung von 72 °C für 2 min.

Die verwendeten Adapter sind für die anschließende Sequenzierung, zum einen für die Bindung von Sequenzierprimern und zum anderen zur Zuordnung der jeweiligen Rohdaten zu der indexierten Probe notwendig.

Die ITS-2 PCR Produkte mit angehängten Adaptersequenzen wurden erneut mittels AMPureXP® beads gereinigt. Die Durchführung der AMPureXP® bead Reinigung erfolgte ebenfalls nach dem Herstellerprotokoll in einer 96-Well Rundbodenplatte und einem Reaktionsvolumen von 25 µl. Die Waschschrte wurden mit frisch hergestelltem 80igen Ethanol durchgeführt. Die finale Elution erfolgte in 40 µl dH<sub>2</sub>O. Es wurden 35 µl Eluat in eine 96-Well PCR Platte zur weiteren Lagerung bei 4°C überführt und mittels Qubit 4 und dem Qubit® 1X dsDNA HS-Assay-Kit quantifiziert.

#### **4.4.3 Sequenzierung der ITS-2 PCR Produkte**

Für die Sequenzierung der PCR Produkte wurden die Proben auf 4 nM in 10 mM Tris-HCl individuell vorverdünnt. Jeweils 5 µl vorverdünntes PCR-Produkt wurde gepoolt. 6 µl des ITS-2 Pools wurden anschließend für die Sequenzierung mit weiteren Sequenzierbibliotheken vorbereitet.

Vor der Sequenzierung musste die Sequenzierbibliothek denaturiert werden. Hierzu wurden 10 µl des Gesamtpools mit 10 µl 0,2 N NaOH gemischt und 5 min bei Raumtemperatur

inkubiert. 10 µl denaturierter Pool wurde anschließend mit 990 µl HT1 Puffer (Illumina® MiSeq Reagent Kit) auf 20 pM verdünnt. Als Kontrolle wurde 10 µl 20 pM PhiX *spike in* (1%) (Thermo Fisher Life Technologies®, USA) verwendet. Der finale denaturierte Pool wurde abschließend auf eine Arbeitskonzentration von 15 pM mit HT1 Puffer verdünnt und mit einer V3 Chemie 2x300 bp auf einem MiSeq benchtop Sequenzer sequenziert (Illumina®, USA). Es wurde eine Zielmenge von mindestens 10.000 *reads* pro ITS-2 PCR Produkt angestrebt.

#### 4.4.4 Qualitätskontrolle und Auswertung der ITS-2 PCR Rohdaten

Die erhaltenen demultiplexten Rohdaten wurden mittels der Software FastQC auf Rohdatenmenge, Rohdatenlänge, Q30 Wert und Adapterkontamination überprüft. Die Proben sollten dabei folgende Parameter einschließen, siehe Tab. 4-4:

Tab. 4-4 Qualitätswerte ITS-2 Sequenzierung

Parameter	Wert
Rohdatenmenge ( <i>paired end</i> )	10.000 <i>reads</i>
Mittlere Rohdatenlänge	295 bp
Mittlerer Q30 Wert (Fehlerrate 1:1000)	>80%
Adapterkontamination	<0,1%

#### 4.4.5 Biostatistische Auswertung

Die biostatistische Auswertung wurde ebenfalls im BVL durchgeführt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mittels des Nemabiom *workflow* (Avramenko et al. 2015; Workentine et al. 2020) basierend auf der DADA2 *pipeline* (Version 1.16, Benjamin Callahan) unter R und der ITS-2 Datenbank mit default Einstellungen (Workentine et al. 2020). Die finalen *amplicon sequence variant* (ASV) Tabellen enthielten eine Übersicht über die gefundenen Sequenzvarianten in Bezug zur Anzahl der passenden *Reads*. Die Sequenzvarianten konnten in der Regel einer distinkten Spezies zugeordnet werden und wurden anschließend nach den Anteilen in Prozent umgerechnet, um die relative Abundanz abzubilden. Für einzelne Nematoden- und Wirtsspezieskombinationen wurden die angegebenen Korrekturfaktoren einberechnet (siehe Tab. 4-5). Der Korrekturfaktor wurde für jede Spezies berechnet, indem die tatsächliche Larvenanzahl dieser Spezies, die zuvor in der Sammelprobe gezählt wurde, durch die nach acht Durchläufen durchschnittlich ausgegebenen Illumina-Sequenzen dieser Spezies geteilt wurde (Avramenko et al. 2015).

Tab. 4-5 Korrekturfaktoren Nematoden- Wirtsspezieskombination (Avramenko et al. 2015)

<b>Parasiten-Spezies Schaf</b>	<b>Korrekturfaktor</b>
<i>Cooperia curticei</i>	1,6107
<i>Teladorsagia circumcincta</i>	1,1885
<i>Trichostrongylus vitrinus</i>	1,0239
<i>Trichostrongylus axei</i>	0,9647
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	1,0239
<i>Haemonchus contortus</i>	0,697
<b>Parasiten-Spezies Rind</b>	
<i>Cooperia punctata</i>	2,7087
<i>Cooperia oncophora</i>	1,1545
<i>Haemonchus placei</i>	0,9339
<i>Nematodirus helvetianus</i>	0,7127
<i>Ostertagia ostertagi</i>	1,2592

#### 4.4.6 Fragebogen Schafbetriebe

Während der Betriebsbesuche wurde durch die Schafbesitzern eine begleitende Umfrage mit dem Ziel der Erhebung aktueller Behandlungspraktiken und zur Ermittlung von Risikofaktoren für den Einsatz der AH ausgefüllt. Dabei wurden folgende demographische Daten erhoben: Kontaktdaten, Name des zuständigen Veterinäramts und des zuständigen Tierarztes (TA), sowie Viehverkehrsverordnungs- (VVVO)-Nummer, gehaltene Schafrassen, weitere Tierarten des Betriebs, die Gesamtzahl der Schafe mit einer Aufgliederung in adulte Muttertiere und Böcke, Jungschafe (1-2 Jahre) und Lämmer (< 1 Jahr), die Hauptnutzungsrichtungen (Fleisch, Milch, Landschaftspflege), ob eine Haupt- bzw. Nebenerwerbstätigkeit vorlag, durchschnittliche Anzahl der Zukäufe pro Jahr und Herkunft der Zukäufe, sowie die Haltungform, in der die Tiere gehalten wurden. Darauf folgten Fragen zum Standort mit der Größe der beweideten Fläche(n), Dauer der Aufstallung der Tiere in den Wintermonaten, Zugang zu Waldrand oder Gewässern, das Nachweiden der Tiere auf Rinderweiden und die Art der Tränkung der Tiere auf den Weiden. Weiterhin wurden Daten zum Einsatz von AH im Betrieb erfasst und die Frage nach der Regelmäßigkeit von Entwurmungen, der Entwurmung einzelner Altersgruppen sowie ob eine gleichzeitige Entwurmung aller Tiere pro Behandlungsgruppe vorgenommen wurde, zum Einsatz einzelner Präparate und der für die Entwurmung zuständigen Person (TA vs. Schäfer) ermittelt. Es wurden außerdem die Häufigkeit des Einsatzes, der Erfolg der Behandlungen und des Einsatzes koproskopischer Kontrollen zur Diagnose von Wurminfektionen und zur Ermittlung des Behandlungserfolgs im Betrieb abgefragt. Schließlich wurde gefragt, inwieweit Daten z.B. durch Fleischschau zum Vorkommen von Wurminfektionen des Betriebes vorlagen. Zuletzt wurde die persönliche

Selbsteinschätzung des Landwirts zum angewendeten Entwurmungsregime ermittelt anhand von Fragen mit Abstufungssystem ermittelt.

Der Fragebogen ist im Anhang 10-2 zu finden.

#### **4.5 Fragebogen Rinderbetriebe**

Für die Ausfahrten auf die Rinderbetriebe wurde der für Schafhalter konzipierte Fragebogen grundsätzlich beibehalten und tierartspezifische Fragestellungen umformuliert oder getauscht. Der Text des verwendeten Fragebogens wird in Anhang 10-5 wiedergegeben.

Zu den erhobenen Daten zählten auch hier allgemeine Kontaktdaten, Name des zuständigen Veterinäramts und des betreuenden TA, sowie die VVVO-Nummer und gehaltene Rinderrassen. Zudem wurde erfragt, ob im Betrieb weitere Tierarten gehalten wurden, die Gesamtzahl der Rinder in Altersgruppen, die Hauptnutzungsrichtungen, ob eine haupt- oder nebenberufliche Erwerbstätigkeit vorliegt, die Zukäufe pro Jahr und die Herkunft der Zukäufe sowie die Haltungsform. Weiterhin wurden Daten zum Einsatz von Anthelminthika des Betriebes erfasst und die Frage nach der Regelmäßigkeit von Entwurmungen und der Entwurmung einzelner Altersgruppen gestellt, sowie die gleichzeitige Entwurmung aller Tiere pro Behandlungsgruppe (ja/nein), der Einsatz einzelner Tierarzneimittel und die zuständige behandelnde Person ermittelt. Zusätzlich abgefragt wurden Häufigkeit des Einsatzes, Erfolg der Behandlungen, Anzahl der koproskopischen Kontrollen nach Behandlung und die Diagnose von Wurminfektionen aufgrund der Fleischbeschau im Betrieb. Zuletzt wurde die persönliche Selbsteinschätzung des Landwirts zum Entwurmungsregime anhand von Fragen mit Abstufungssystem ermittelt.

Im Vergleich zum Fragebogen für Schafbetriebe ergaben sich Änderungen für die erfragten Nutzungsrichtungen der Rinderrassen: Fleisch-, Milch-, Mutterkuh- und Hobbyhaltung konnte gewählt werden. Die Weidehaltung und -art, sowie die Tränkungsmöglichkeiten wurden auf die Tierart angepasst, sodass zwischen ganzjähriger und saisonaler Haltung, Stand-, Umtriebs-, Portionsweide und Sonstiges sowie Tränkebecken, Trog, Weidepumpe oder natürlichen Wasserquellen ausgewählt werden konnte.

Im Abschnitt über die Entwurmung fand eine Anpassung auf Präparate für Rinder statt, zur Auswahl standen IVM, EPR, DOR, MOX, FBZ, ABZ, OXF, LEV und andere. Hinzugefügt wurde die Frage nach der bevorzugten Applikation: Hier gab es die Wahlmöglichkeit zwischen oral, subkutan, pour-on oder Verabreichung eines Bolus.

Im Bereich Erkrankungen wurde die Frage nach beobachteter Anämie gestrichen, da sie in der Wurmbefallsdiagnostik in Rinderbetrieben, im Gegensatz zu Schafbetrieben, als Kriterium nicht angewendet wird.

Die einzelnen Fragen sind im Detail im Anhang 10-5 aufgeführt.

## 4.6 Umfrage großtierpraktizierender Tierärzte

Zusätzlich zu der Befragung von an der Feldstudie teilnehmenden Schaf- und Rinderbetrieben war eine Befragung von großtierpraktizierenden TÄ zwischen dem 06.01.–30.04.2022 online auf der Unipark-Plattform unter [https://ww3.unipark.de/uc/anthelminthika\\_resistenz/](https://ww3.unipark.de/uc/anthelminthika_resistenz/) verfügbar. Der Fragebogen beinhaltete insgesamt 34 Fragen und zuletzt die Möglichkeit in „Sonstige Anmerkungen“ einen Kommentar abzugeben. Inhaltlich erfolgte zuerst eine Erfragung demographischer Daten des Antwortenden, indem Alter, Geschlecht, Bundesland, etc. erhoben wurde. In einem weiteren Abschnitt folgten spezifische Fragen zu betreuten Tierarten, den eingesetzten Anthelminthika und Fragen zu ihrem Einsatz.

Ein Aufruf zur Teilnahme wurde an die Tierärztekammern der Bundesländer sowie an 54 Großtierpraxen und -kliniken verschickt. Der Fragebogen ist im Anhang 10-7 zu finden.

### 4.6.1 Statistische Auswertung

Die Daten der Fragebögen wurden zunächst mit MS Excel zusammengefasst und auf fehlende Antworten geprüft. Für die Suche nach Korrelationen innerhalb der zuvor definierten Hauptfragestellungen, die vor allem auf mögliche Zusammenhänge zwischen der Anthelminthika-Wahl der jeweiligen Spezies (Schaf / Rind) und weiteren Faktoren abzielte, wurden die Daten in R Version 3.6.0 importiert und mittels nicht-parametrischer Analysen getestet.

Es erfolgte die Durchführung eines Wilcoxon-Tests zur Ermittlung der Signifikanz bei den nicht parametrischen, nicht-gepaarten Stichproben in R:

```
> pval[i]=wilcox.test(x,y,alternative="two.sided",paired=FALSE,var.equal= FALSE)$p.value
```

Unabhängige, multiple (> 2) Stichproben wurden mittels Kruskal-Wallis Test getestet und post-hoc mittels Dunn-Test auf Signifikanzen geprüft, in R:

```
> pval[i] = kruskal.test(antipar_schaf[,i]~bundesland)$p.value
```

```
> dunn.test(x, g=NA, method="bonferroni", kw=TRUE, label=TRUE, wrap=FALSE, table=TRUE, list=FALSE, rmc=FALSE, alpha=0.05, altp=FALSE)$p.value
```

Der Spearman rank correlation-Test untersuchte die Abhängigkeit zweier gepaarter Variablen:

```
> cor.test(parameter_[,i],varx_,alternative="two.sided",method="spearman") $p.value
```

Der Chi-Quadrat-Test und der Exakte Fisher-Test ermittelten die Signifikanz der Häufigkeitsverteilung nominaler Stichprobengrößen:

```
> library(ggstatsplot)
```

```
> a = matrix(nrow=x,ncol=y)
```

```
> pval = rep(x,y) for(i in x:y) {a[1,] = c(0,0)a[2,] = c(0,0)for(j in 1:n) {
```

```
if(parameter_kriterium[j,i] == 0 && parameter_herde[j] == 1) a[1,1] = a[1,1]+1
if(parameter_kriterium[j,i] == 1 && parameter_herde[j] == 1) a[1,2] = a[1,2]+1
if(parameter_kriterium[j,i] == 0 && parameter_herde[j] == 2) a[2,1] = a[2,1]+1
if(parameter_kriterium[j,i] == 1 && parameter_herde[j] == 2) a[2,2] = a[2,2]+1} pval[i] =
fisher.test(a)$p.value)round(pval,3)
> round(fisher.test(a)$p.value,3)
```

Das Signifikanzniveau alpha der statistischen Tests wurde auf 0,05 festgelegt und p-Werte < 0,05 als signifikant gewertet. Ein Trend wurde ab  $p < 0,1$  diskutiert.

Abschließend erfolgte die Zusammenfassung und anschließende deskriptive Darstellung der Ergebnisse.

## **5 Ergebnisse**

### **5.1 Versuchsbetriebe Schaf**

An den Untersuchungen in Schafbetrieben nahmen elf Betriebe aus Brandenburg und ein Betrieb aus Mecklenburg-Vorpommern teil. Die Beprobung der Betriebe erfolgte im Zeitraum 16.09.2020 - 24.02.2021.

Der Kontakt zu Schafhaltern kam über den Schafzuchtverband Berlin-Brandenburg zustande, in dessen Magazin ein Flyer mit detaillierten Angaben zum Vorhaben beigefügt wurde. Zusätzlich wurden die Teilnehmerinnen und Teilnehmer durch telefonische Kontaktaufnahme anhand der Mitgliederliste des Schafzuchtverbands kontaktiert.

Die Haltungsbedingungen der Schafe variierten zwischen rein-extensiver Weidehaltung und einer nächtlichen Aufstallung mit ganzjähriger Weidehaltung.

### **5.2 Versuchsbetriebe Rind**

An den Untersuchungen der Rinderbetriebe nahmen sieben Betriebe aus Brandenburg, ein Betrieb aus Mecklenburg-Vorpommern und ein Betrieb aus Sachsen-Anhalt teil. Die Beprobung erfolgte im Zeitraum 24.08. - 14.12.2021.

Die Kontaktaufnahme mit den Betrieben erfolgte über vorhandene Kontaktlisten aus einem Kooperationsprojekt zur Insektizidresistenz bei Fliegen, über eine veröffentlichte Liste über genehmigungspflichtige Tierhaltungsanlagen des Ministeriums für Landwirtschaft und Umwelt, Mecklenburg-Vorpommern und durch TÄ vermittelte Kontakte. Ein Aufruf zur Studienteilnahme wurde über den Biopark e.V., die ostdeutsche Ausgabe der Bauernzeitung und den RBB Rinderproduktion Berlin-Brandenburg Zuchtverband geteilt.

Die aufgesuchten Rinderhaltungen waren Extensivhaltungen mit und ohne Stallhaltung über die Wintermonate. Sieben Betriebe hielten Fleisch- bzw. Mastrinder und zwei Betriebe Milchrinder.

### **5.3 Eizahlreduktionstest Schafbetriebe**

In acht der zwölf untersuchten Betriebe wurden alle drei Wirkstoffe FBZ, IVM und MOX verwendet, in vier weiteren Betrieben wurde aufgrund niedriger Tierzahlen lediglich MOX getestet.

Resistenzen der MDS gegenüber FBZ waren in sieben der acht Betriebe nachweisbar (88 %), in Betrieb 6 blieb die Wirkung dagegen erhalten. Ivermectin-Resistenzen der MDS waren in allen acht Betrieben vorhanden (100%). Eine unzureichende Wirkung von MOX gegenüber MDS wurde in acht der zwölf beprobten Betriebe beobachtet darunter in drei Betrieben eine beginnende Resistenz (Betriebe 1, 7 und 10) und fünf Betrieben vollständig resistenten MDS

(Betriebe 2, 3, 4, 5 und 8). Gegenüber MOX suszeptibel waren die MDS-Populationen der Betriebe 6, 9, 11 und 12. In den Betrieben 2, 3, 4, 5, 7 und 10 wurde zudem eine Multiresistenz gegenüber aller drei untersuchten Wirkstoffen festgestellt. Eine gleichzeitige Resistenz gegenüber FBZ und IVM war in Betrieb 9 feststellbar. In Tab. 5-1 aufgelistet sind weiterhin die Gesamtzahl der Tiere in dem Betrieb, die Anzahl der Tiere, deren Alter weniger als 24 Monate betrug sowie die Testgruppengröße anhand derer die Werte der Eizahlreduktion ermittelt wurden. Die Reduktionswerte mit den 90 % Konfidenzlimits können hieraus ebenfalls entnommen werden.

In einem der Betriebe, die keine ausreichende Wirksamkeit der drei genutzten Tierarzneimittel gegenüber einer Infektion mit MDS aufwiesen, wurde an 20 positiven Tieren ein erneuter EZRT mit dem Wirkstoff MON durchgeführt. Zwischen der Durchführung beider Tests lag ein Zeitraum von über acht Wochen. Die mittlere Eizahl-Reduktion nach MON-Behandlung lag bei 99,3 %, die Konfidenzlimits betrugen 98,6 und 99,6. Damit war die Wirksamkeit des Wirkstoffs in diesem Betrieb gegenüber MDS gegeben.

**Tab. 5-1 Schafbetriebe Nr. 1 – 12 mit Einsatz der Wirkstoffe Fenbendazol (FBZ), Ivermectin (IVM), Moxidectin (MOX) und Monepantel (MON) mit Eizahl-Reduktionswerten (EZR) und 90 % Konfidenzintervalls (KI)**

Betrieb-Nr.	Sf 1	Sf 2	Sf 3	Sf 4	Sf 5	Sf 6
<b>Eingesetzte Wirkstoffe</b>	MOX	FBZ, IVM, MOX, MON	FBZ, IVM, MOX	FBZ, IVM, MOX	FBZ, IVM, MOX	FBZ, IVM, MOX
<b>Tage post Behandlung</b>	14	14	14	15	13	14
<b>Gesamtzahl Tiere</b>	48	450	475	953	1180	200
<b>davon &lt; 24 Monate</b>	20	120	175	517	400	77
<b>EZR FBZ (%)</b> 90 % KI <b>(n) Tiere</b>	n.a.	34,2 27,3 - 39,9 (16)	50,4 38,4 - 60,0 (15)	85,8 84,2 - 87,7 (20)	0,007 0,0 - 0,06 (38)	99,7 98,6 - 99,9 (20)
<b>EZR IVM (%)</b> 90 % KI <b>(n) Tiere</b>	n.a.	30,7 25,0 – 36,3 (17)	75,4 64,2 - 82,4 (16)	63,6 60,6 - 66,4 (20)	24,9 22,3 – 26,7 (40)	87,1 83,4 - 89,6 (20)
<b>EZR MOX (%)</b> 90 % KI <b>(n) Tiere</b>	97,8 97,1 - 98,1 (23)	58,5 53,9 - 62,0 (19)	89,3 84,1 - 93,5 (15)	95,7 94,8 – 96,4 (20)	94,1 93,6 - 94,6 (39)	99,3 97,4 - 99,9 (10)
<b>EZR MON (%)</b> 90 % KI <b>(n) Tiere</b>	n.a.	99,3 98,6 - 99,6 (20)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

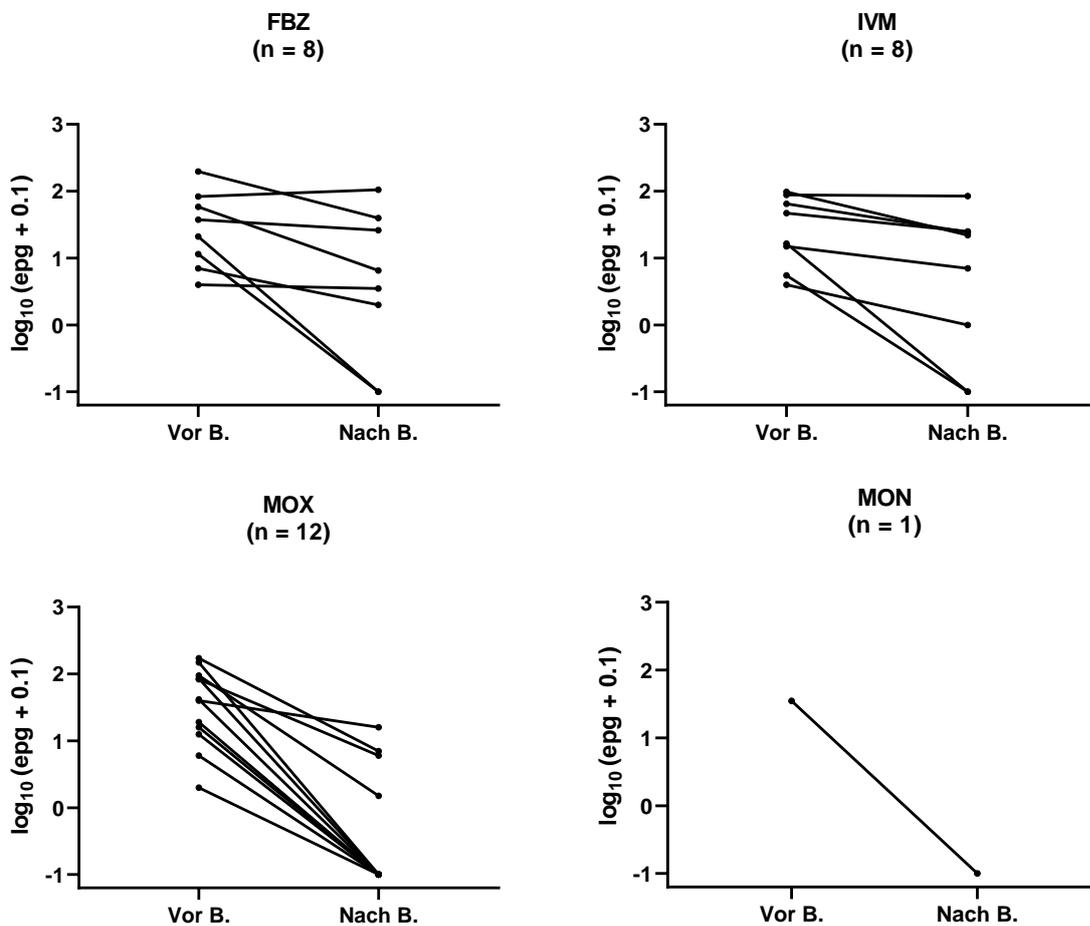
Betrieb-Nr.	Sf 7	Sf 8	Sf 9	Sf 10	Sf 11	Sf 12
<b>Eingesetzte Wirkstoffe</b>	FBZ, IVM, MOX	MOX	FBZ, IVM, MOX	FBZ, IVM, MOX	MOX	MOX
<b>Tage post Behandlung</b>	13	14	14	13	14	16
<b>Gesamtzahl Tiere</b>	2000	56	160	3500	200	530
<b>Davon &lt; 24 Monate</b>	400	26	70	1600	30	30
<b>EZR FBZ (%)</b>	70,0		74,4	96,0		
90 % KI	68,3 - 71,4		71,0 - 77,3	94,3 - 97,5		
<b>(n) Tiere</b>	(22)	n.a.	(22)	(20)	n.a.	n.a.
<b>EZR IVM (%)</b>	77,5		89,9	54,9		
90 % KI	75,5 - 79,1		87,4 - 92,0	48,0 - 61,1		
<b>(n) Tiere</b>	(19)	n.a.	(19)	(23)	n.a.	n.a.
<b>EZR MOX (%)</b>	96,6	92,9	98,2	98,1	99,8	99,3
90 % KI	96,2 - 97,1	90,4 - 94,9	96,4 - 99,3	96,5 - 98,9	99,7 - 99,9	99,1 - 99,6
<b>(n) Tiere</b>	(20)	(17)	(24)	(23)	(30)	(26)
<b>EZR MON (%)</b>						
90 % KI						
<b>(n) Tiere</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Die durchschnittlichen EPGs der Schafbetriebe sind in Tab. 5-2 dargestellt. Verglichen wurden hier die durchschnittlichen EPGs vor und nach dem EZRT für jeden Wirkstoff. In den Betrieben 2, 3 und 5 wurden 3 Nicht-Signifikanzen ( $p > 0,05$ ) nach FBZ-EZRT im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ausgegeben. Die durchschnittliche EZ aller Schafbetriebe lag bei 74,9 EPG. 13 von 1266 (1,0 %) Tieren waren vor Behandlung negativ.

Tab. 5-2 Schafbetriebe Nr. 1 – 12 mit EPG der Wirkstoffe Fenbendazol (FBZ), Ivermectin (IVM), Moxidectin (MOX) und Monepantel (MON) und Median, 25 % und 75 % Quartil (Q.) vor und nach Behandlung mit p-Werten nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test

Nr.	Wirkst.	Vor Behandlung			Nach Behandlung			p-Wert
		25 % Q.	Median	75 % Q.	25 % Q.	Median	75 % Q.	
Sf 1	MOX	24,5	85,0	200,0	0,0	0,0	0	< 0,001
Sf 2	FBZ	19,0	37,5	55,5	20,8	26,0	34,5	0,108
	IVM	31,0	47,0	72,0	5,0	25,0	61	0,011
	MOX	21,5	40,0	60,5	7,0	16,0	21	0,004
	MON	13,3	35,0	73,0	0,0	0,0	0,3	< 0,001
Sf 3	FBZ	5,0	7,0	13,0	1,0	2,0	8	0,059
	IVM	1,8	5,5	7,5	0,0	0,0	0,3	0,008
	MOX	3,0	6,0	10,5	0,0	0,0	0	0,002
Sf 4	FBZ	46,0	58,5	92,0	1,8	6,5	14,8	< 0,001
	IVM	54,8	65,0	107,5	10,5	24,5	44,8	< 0,001
	MOX	63,3	95,0	116,0	0,0	1,5	4	< 0,001
Sf 5	FBZ	57,5	83,0	125,8	44,5	105,5	146,8	0,330
	IVM	60,8	88,0	161,5	34,3	84,5	183	0,047
	MOX	57,0	83,0	150,5	2,0	6,0	9	< 0,001
Sf 6	FBZ	7,8	11,5	21,5	0,0	0,0	0	< 0,001
	IVM	8,0	16,5	28,5	0,0	0,0	0	< 0,001
	MOX	6,0	12,5	18,5	0,0	0,0	0	0,002
Sf 7	FBZ	121,0	197,5	300,3	27,3	39,5	79,3	< 0,001
	IVM	58,5	98,0	144,5	11,0	22,0	33	< 0,001
	MOX	152,8	171,5	220,0	2,0	7,0	11,5	< 0,001
Sf 8	MOX	9,0	19,0	32,0	0,0	0,0	0	< 0,001
Sf 9	FBZ	1,0	4,0	85,0	1,3	3,5	10,5	0,018
	IVM	2,0	4,0	41,0	0,0	1,0	3,5	< 0,001
	MOX	0,0	2,0	5,3	0,0	0,0	0	< 0,001
Sf 10	FBZ	12,3	21,0	30,3	0,0	0,0	1	< 0,001
	IVM	9,5	15,0	22,5	1,5	7,0	10,5	< 0,001
	MOX	7,0	16,0	28,0	0,0	0,0	1	< 0,001
Sf 11	MOX	104,0	149,0	223,5	0,0	0,0	0	< 0,001
Sf 12	MOX	3,8	41,5	161,0	0,0	0,0	2	< 0,001

Abb. 5-1, 2, 3 und 4 - Logarithmierte EPG Reduktion der Wirkstoffe Fenbendazol (FBZ), Ivermectin (IVM), Moxidectin (MOX) und Monepantel (MON) vor und nach Behandlung (B.), Anzahl der Betriebe (n)



Die Datenlage von Betrieb 4 reichte aus, um eine eigenständige EZR für *Nematodirus* spp. zu berechnen, da insgesamt mehr als 200 *Nematodirus*-Eier für alle Behandlungsgruppen gezählt wurden (FBZ: 657, IVM: 681, MOX: 569 raw egg counts). Die *Nematodirus*-Population in diesem Betrieb wies eine Resistenz gegenüber IVM auf, nicht jedoch gegenüber FBZ und MOX, wo eine signifikante EZR vorlag, siehe Tab. 5-3 u. 5-4. In den weiteren Schafbetrieben lagen in geringeren Mengen ebenfalls *Nematodirus*-Eier vor: Betrieb 6 wies ein durchschnittliches *Nematodirus*-EPG von 7 auf, Betrieb 1 ein EPG von 3, die Betriebe 2 und 8 von 1,5 resp. 1,1 EPG.

Tab. 5-3 Schafbetrieb Nr. 4. *Nematodirus* spp. Eizahl-Reduktionswerte (EZR) mit 90 % Konfidenzintervalls (KI)

Schafbetrieb Nr. 4	<i>Nematodirus</i> spp.
<b>EZR FBZ (%)</b>	98,3
90 % KI	97,4 - 99,0
<b>(n) Tiere</b>	(20)
<b>EZR IVM (%)</b>	77,6
90 % KI	74,2 - 80,7
<b>(n) Tiere</b>	(20)
<b>EZR MOX (%)</b>	99,6
90 % KI	99,1 - 99,9
<b>(n) Tiere</b>	(20)

Tab. 5-4 Schafbetrieb Nr. 4 - EPG der Wirkstoffe Fenbendazol (FBZ), Ivermectin (IVM) und Moxidectin (MOX) und Median, 25 % und 75 % Quartile (Q.) vor und nach Behandlung mit p-Werten nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test

Nr.		Vor Behandlung			Nach Behandlung			p-Wert
		25 % Q.	Median	75 % Q.	25 % Q.	Median	75 % Q.	
Sf 4	FBZ	19,3	32,5	45,3	0,0	0,0	0,3	< 0,001
	IVM	21,0	24,5	42,3	2,8	5,5	10,3	< 0,001
	MOX	17,8	27,0	36,5	0,0	0,0	0,0	< 0,001

#### 5.4 Eizahlreduktionstest Rinderbetriebe

In sieben der neun untersuchten Betriebe wurden beide Wirkstoffe FBZ und EPR eingesetzt, in Betrieb 2 wurde auf Wunsch des Besitzers IVM anstelle des EPR verwendet und in Betrieb 5 wurde aufgrund der Tierzahl lediglich EPR getestet.

Die Daten zur Wirksamkeit der verwendeten anthelminthischen Wirkstoffe sind in Tab. 5-5 zusammengefasst. In zwei von acht Betrieben (Betriebe 3 und 4) lag eine verminderte Wirksamkeit von FBZ vor. Eine Resistenz von EPR lag in drei der acht Betriebe vor (Betriebe 3, 4 und 8). Für das einmalig getestete IVM in Betrieb 2 lag eine Resistenz vor. Damit war die Wirksamkeit in Betrieben 3 und 4 für alle eingesetzten Wirkstoffe reduziert.

Tab. 5-5. Rinderbetriebe Nr. 1 – 9 mit Einsatz der Wirkstoffe Fenbendazol (FBZ), Eprinomectin (EPR) und Ivermectin (IVM) mit Eizahl-Reduktionswerten (EZR) und 90 % Konfidenzintervalls (KI)

Betrieb-Nr.	Rd 1	Rd 2	Rd 3	Rd 4	Rd 5	Rd 6
<b>Eingesetzte Wirkstoffe</b>	FBZ, EPR	FBZ, IVM	FBZ, EPR	FBZ, EPR	EPR	FBZ, EPR
<b>Tage post Behandlung</b>	14	14	14	14	14	14
<b>Gesamtzahl Tiere</b>	203	390	1000	1250	52	591
<b>Davon &lt; 24 Monate</b>	102	230	550	950	27	227
<b>EZR FBZ (%)</b>	99,9	99,5	96,9	95,0		99,9
90 % KI	99,2 - 99,9	99,2 - 99,4	94,1 - 98,4	91,9 - 97,2		99,7 - 99,9
<b>(n) Tiere</b>	(19)	(14)	(19)	(21)	n.a.	(20)
<b>EZR EPR (%)</b>	98,0		88,7	96,3	98,3	99,7
90 % KI	96,1 - 99,2		80,2 - 94,1	93,7 - 98,2	96,0 - 99,4	99,0 - 99,9
<b>(n) Tiere</b>	(19)	n.a.	(18)	(17)	(11)	(20)
<b>EZR IVM (%)</b>		95,1				
90 % KI		93,3 - 96,0				
<b>(n) Tiere</b>	n.a.	(8)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

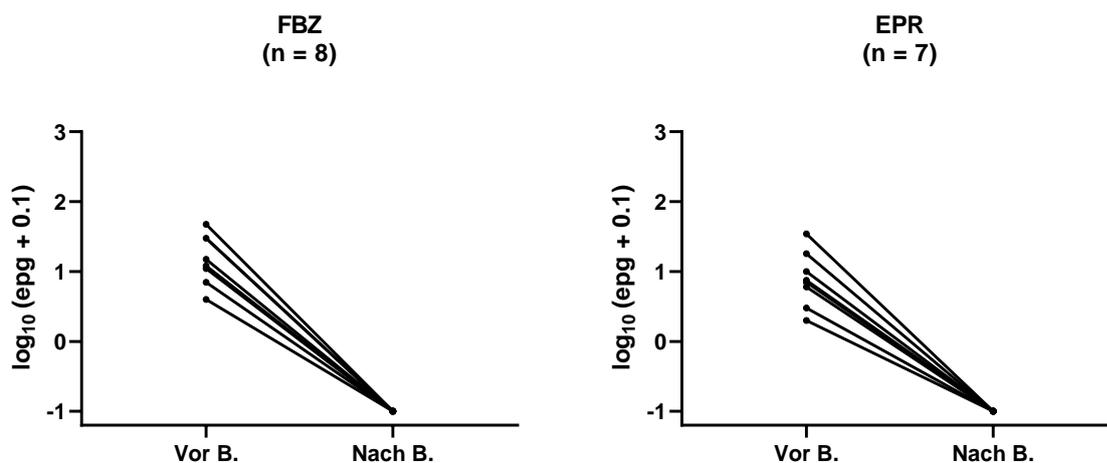
Betrieb-Nr.	Rd 7	Rd 8	Rd 9
<b>Eingesetzte Wirkstoffe</b>	FBZ, EPR	FBZ, EPR	FBZ, EPR
<b>Tage post Behandlung</b>	14	14	14
<b>Gesamtzahl Tiere</b>	n.a.	3521	450
<b>Davon &lt; 24 Monate</b>	n.a.	1432	200
<b>EZR FBZ (%)</b>	98,6	99,9	99,2
90 % KI	96,8 - 99,5	99,4 - 99,9	98,1 - 99,8
<b>(n) Tiere</b>	(20)	(20)	(19)
<b>EZR EPR (%)</b>	99,9	97,5	99,8
90 % KI	98,9 - 99,9	96,6 - 98,1	99,3 - 99,9
<b>(n) Tiere</b>	(20)	(20)	(22)
<b>EZR IVM (%)</b>			
90 % KI			
<b>(n) Tiere</b>	n.a.	n.a.	n.a.

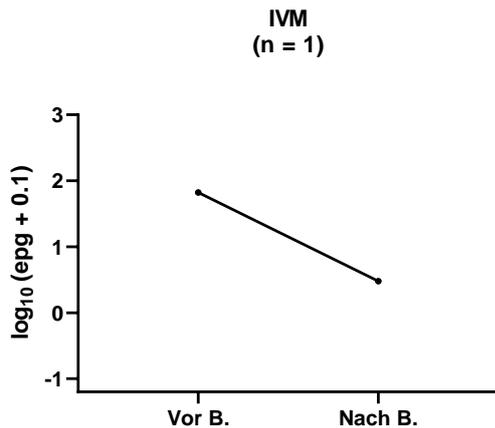
Die durchschnittlichen EPG der Rinderbetriebe sind in Tab. 5-6 vor und nach EZRT für jeden Wirkstoff dargestellt. Die durchschnittliche EZ vor Behandlung aller Rinderbetriebe lag bei 29,3 EPG. 17 von 614 (2,8 %) Tieren waren vor Behandlung negativ. Die Reduktion der durchschnittlichen EPG im EZRT war für alle Wirkstoff im Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test signifikant.

Tab. 5-6 Rinderbetriebe Nr. 1 - 9 mit EPG der Wirkstoffe Fenbendazol (FBZ), Ivermectin (IVM) und Eprinomectin (EPR) und Median, 25 % und 75 % Quartile (Q.) vor und nach Behandlung mit p-Werten nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test

Nr.		Vor Behandlung			Nach Behandlung			p-Wert
		25 % Q.	Median	75 % Q.	25 % Q.	Median	75 % Q.	
Rd 1	FBZ	6,0	15,0	20,5	0,0	0,0	0,0	< 0,001
	EPR	3,5	7,0	18,5	0,0	0,0	0,0	< 0,001
Rd 2	FBZ	10,8	47,5	112,0	0,0	0,0	0,8	< 0,001
	IVM	49,8	66,5	123,8	0,0	3,0	5,0	0,016
Rd 3	FBZ	2,0	4,0	8,5	0,0	0,0	0,5	< 0,001
	EPR	1,0	2,0	3,8	0,0	0,0	0,0	0,001
Rd 4	FBZ	4,0	7,0	13,0	0,0	0,0	1,0	< 0,001
	EPR	6,0	10,0	13,0	0,0	0,0	0,0	< 0,001
Rd 5	EPR	1,0	3,0	16,5	0,0	0,0	0,5	0,004
Rd 6	FBZ	14,3	30,0	55,3	0,0	0,0	0,0	< 0,001
	EPR	1,8	7,5	19,0	0,0	0,0	0,0	< 0,001
Rd 7	FBZ	4,8	11,0	15,0	0,0	0,0	0,0	< 0,001
	EPR	2,0	6,0	14,3	0,0	0,0	0,0	< 0,001
Rd 8	FBZ	13,0	30,0	38,5	0,0	0,0	0,0	< 0,001
	EPR	23,8	34,5	85,5	0,0	0,0	0,0	< 0,001
Rd 9	FBZ	7,0	12,0	18,0	0,0	0,0	0,0	< 0,001
	EPR	11,0	18,0	32,8	0,0	0,0	0,0	< 0,001

Abb. 5-5, 6 und 7 Logarithmierte EPG Reduktion mit Wirkstoffen Fenbendazol (FBZ), Ivermectin (IVM) und Eprinomectin (EPR) und Median vor und nach Behandlung (B.), Anzahl der Betriebe (n)





Auch in Rinderbetrieb 6 reichte die *Nematodirus*-Eizahl aus, um eine eigenständige Eizahlreduktion zu berechnen (FBZ: 392, EPR: 339 raw egg counts). Die *Nematodirus*-Population in diesem Betrieb war resistent gegenüber FBZ und suszeptibel gegenüber EPR, wo es zu einer signifikanten Reduktion des EPG kam (Wilcoxon Vorzeichen rang Test), siehe Tab. 5-7 u. 5-8. In weiteren Rinderbetrieben lagen in geringem Maße *Nematodirus*-Eier vor: Betrieb 5 wies ein durchschnittliches *Nematodirus*-EPG von 2,3 in und Betrieb 1 ein EPG von 1,2. In den weiteren Rinderbetrieben traten sporadisch einzelne Eier auf.

**Tab. 5-7 Rinderbetrieb Nr. 6. *Nematodirus* spp. Eizahl-Reduktionswerte (EZR) mit 90 % Konfidenzintervalls (KI)**

Rinderbetrieb Nr. 6	<i>Nematodirus</i> spp.
<b>EZR FBZ (%)</b>	90,8
90 % KI	87,3 - 93,8
<b>(n) Tiere</b>	(20)
<b>EZR EPR (%)</b>	99,9
90 % KI	99,3 - 99,9
<b>(n) Tiere</b>	(20)

**Tab. 5-8 Rinderbetrieb Nr. 6 mit EPG der Wirkstoffe Fenbendazol (FBZ), und Eprinomectin (EPR) und Median, 25 % und 75 % Quartile (Q.) vor und nach Behandlung mit p-Werten nach Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test**

Nr.		Vor Behandlung			Nach Behandlung			p-Wert
		25 % Q.	Median	75 % Q.	25 % Q.	Median	75 % Q.	
Rd 6	FBZ	0,0	2,5	17,3	0,0	0,0	0,0	< 0,001
	EPR	0,0	2,0	31,3	0,0	0,0	0,0	< 0,001

## 5.5 Larvenmigrationshemmtest der Schafnematoden

### 5.5.1 Eiisolierung und Larvenkulturen der Schafnematoden

Das gesammelte Kotmaterial diente neben der mikroskopischen Diagnostik der Anzucht von Larven zur Analyse der Suszeptibilität gegenüber IVM und LEV mithilfe von LMHT.

Dafür wurde zunächst, beginnend mit gepoolten Proben der Schafbetriebe, eine Larvenkultivierung der Eier zu L3 durchgeführt. Beginnend ab Betrieb 6 wurde jedoch offensichtlich, dass die Anzahl der L3, die mittels Larvenkultur geerntet wurden, in den Betrieben 1 - 6 zu gering für die Durchführung der geplanten Assays war. Da die Larvenkultivierung mindestens sieben bis zehn Tage benötigt und es weitere Tage bedarf, um die Larven aufzureinigen und zu zählen wurde dies erst in der Folge als systematisches Problem festgestellt. Die Betriebe 1 bis 6 wurden dabei innerhalb von 14 Tagen (16.09.-30.09.2020) angefahren. Die Larven des ersten Betriebs wurden zwei Tage vor und die des zweiten Betriebs einen Tag nach der Ausfahrt zu Betrieb 6 geerntet. Somit konnte die Methodik erst für die folgenden Betriebe angepasst werden. Beginnend ab Betrieb 7 wurden die Sammelproben zunächst über einen Zuckergradienten aufgereinigt, bis zu 48 Stunden in Zellkulturflaschen inkubiert und die entwickelten L1 anschließend in naivem Schafkot für weitere sieben bis zehn Tage inkubiert und im Anschluss geerntet. Die Betriebe 1 - 6 wurden erneut besucht, um Sammelproben der Tiere zur Eiaufreinigung gewinnen zu können. Anhand der neuen Vorgehensweise konnte von den Betrieben 2, 3 und 5 noch eine Mindestanzahl von 1.500 L3 erreicht werden, sodass Larven aus insgesamt sieben der 12 Schafbetriebe für die LMHT zur Verfügung standen.

Für die Betriebe, für die Larven gewonnen werden konnten, wurden Larvenzahlen zwischen 2.500 und 45.600 L3 erzielt, siehe Tab. 5-9.

**Tab. 5-9. Gewonnene L3 nach Eiaufreinigung mittels Zuckergradienten gefolgt von Kulturen in naivem Schafkot für 7 - 10 Tage**

<b>Betrieb-Nr.</b>	<b>Anzahl vitaler L3</b>
Sf 2	9.000
Sf 3	35.000
Sf 5	38.800
Sf 7	4.600
Sf 9	4.200
Sf 10	6.800
Sf 11	45.600
Sf 12	2.500

## 5.5.2 Larvenmigrationshemmtest mit Levamisol und Ivermectin

Das Testsystem wurde zunächst mit bekannt suszeptiblen *H. contortus* McMaster und *T. colubriformis* Referenzisolaten und dem Wirkstoff IVM evaluiert. Für die beim Schaf häufigen MDS-Spezies wurde eine Maschengröße von 25 µm für die Siebeinsätze gewählt. Das Wanderverhalten der Larven im Versuch entsprach allerdings nicht den zuvor publizierten Ergebnissen: Für die Positivkontrollen wurde in 10 duplizierten Versuchsdurchläufen eine durchschnittliche Migration von 22,1 % ± 2,9 % SE und für die Negativkontrollen Werte von durchschnittlich 95,9 % ± 0,8 % erzielt, die damit abwichen von den in der Literatur angegebenen Werten, die zwischen 0 - 1,2 % für die Positivkontrollen und 96-100 % für die Negativkontrollen betragen (Demeler et al. 2010a). Die Konzentrations-Wirkungskurven der IVM Testreihen sind im Anhang 10-8 abgebildet.

Eine weitere Testreihe mit LEV und *H. contortus* L3 zeigte gute Werte für die Kontrollgruppen: Die Positivkontroll-Werte lagen bei durchschnittlich 0,1 % +/- 0,0 % SF und die Negativkontroll-Werte bei 94,2 % +/- 1,7 % SF. Jedoch wichen die EC<sub>50</sub>-Werte hier mit Werten zwischen 54.000 und 220.000 nM von der einzigen vorherigen Untersuchung ab, bei der EC<sub>50</sub>-Werte im Bereich von 293 – 1.117 nM ermittelt wurden (Algusbi 2011).

**Tab. 5-10. Testreihe des LMHT mit Levamisol und *H. contortus* L3 McMaster Isolat mit EC<sub>50</sub>-Werten, 95 % KI und R<sup>2</sup>**

LEV LMHT	EC <sub>50</sub> [nM]	Unteres 95 % KI	Oberes 95 % KI	R <sup>2</sup>
1	220.000	169.200	286.400	0,984
2	177.000	129.400	243.200	0,971
3	86.000	63.140	118.200	0,988
4	74.500	54.490	101.900	0,982
5	99.500	53.180	186.100	0,943
6	67.200	47.790	94.490	0,982
7	54.000	32.000	91.250	0,975
8	83.000	67.030	102.800	0,991
9	69.300	49.320	97.330	0,984
10	93.400	69.590	125.200	0,918
11	108.000	91.940	126.100	0,985
12	114.000	100.300	129.800	0,994
13	166.000	131.100	209.600	0,993
14	166.000	138.300	200.200	0,996
15	156.000	125.500	193.500	0,994

Eine Durchführung des LMHT mit hitzeinaktivierten *H. contortus* L3 zur Eignungsprüfung der 25 µm Siebeinsätze ergab eine durchschnittliche passive Passierrate von 2,3 % +/- 0,4 % SE, was im Schnitt 2 - 3 passiv gewanderten Larven in einem Well von 120 L3 entspricht.

**Tab. 5-11. Durchführung des LMHT mit 25 µm Siebeinsätzen und inaktivierten *H. contortus* L3**

IVM-Konz.	Migrierte Larven (%)	
	A	B
<b>Positivkontrolle</b>	3,8	3,6
<b>1,E-05</b>	7,3	0,8
<b>5,E-06</b>	2,8	3,8
<b>1,E-06</b>	5,1	1,6
<b>5,E-07</b>	1,5	0,9
<b>1,E-07</b>	0,8	1,7
<b>5,E-08</b>	1,9	1,4
<b>1,E-08</b>	2,7	5,5
<b>5,E-09</b>	0,8	0,9
<b>1,E-09</b>	4,5	2,5
<b>5,E-10</b>	7,1	2,3
<b>Negativkontrolle</b>	3,1	3,0

Zuletzt wurde ein Versuch mit den L3 der Schafbetriebe 3, 5 und 11 und zwei Maschengrößen für die Migrationssiebe (25 µm und 28 µm) und ohne Wirkstoff getestet. Dafür wurden die Feldisolate zunächst für eine Stunde in einen Baermann-Trichter mit einer mehrfach-geschichteten Gaze-Barriere gegeben, durch die die vitalen L3 hindurchwanderten. Die Larven zeigten geringere Wanderungsraten als die suszeptiblen Referenzisolate *H. contortus* und *T. colubriformis*. Für die L3 der Schafbetriebe lagen die Werte zwischen durchschnittlich 73,5 % ± 5,4 % SE bei 25 µm und 77,7 % ± 4,7 SE bei 28 µm Maschenweite. In beiden Siebgrößen blieben die Larven der drei Betriebe sichtbar vermehrt in den Sieben zurück und wurden an der Migration gehindert.

**Tab. 5-12. Durchführung des LMHT mit 25 µm und 28 µm Siebeinsätzen und *H. contortus*, *T. colubriformis* und L3 der Betriebe 3, 5 und 11, Wanderung in %**

L3-Isolat	Migrierte Larven (%)	
	25 µm	28 µm
<b>B3</b>	89,6	91,4
<b>B5</b>	66,0	74,2
<b>B11</b>	64,9	67,5
<i>H. contortus</i>	98,6	91,7
<i>Tr. colubriformis</i>	100,0	98,8

## 5.6 Larvenmigrationshemmtest der Rindernematoden

### 5.6.1 Larvenkulturen Rindernematoden

Aus acht Rinderbetrieben konnten ebenfalls zwischen 4.400 und 64.000 L3 aus den kultivierten Sammelkotproben gewonnen werden, siehe Tab. 5-13.

Tab. 5-13. Gewonnene L3 nach Larvenkultivierung aus Sammelkotproben der Rinderbetriebe

Rinderbetrieb-Nr.	Anzahl vitaler L3
Rd 1	10.000
Rd 2	11.000
Rd 4	14.000
Rd 5	4.400
Rd 6	36.000
Rd 7	15.000
Rd 8	64.000
Rd 9	6.500

### 5.6.2 Larvenmigrationshemmtest mit Levamisol

Die LMHT wurden für die Larven der Rinderbetriebe mit LEV durchgeführt, da für die Betriebe nach der Durchführung des EZRT noch keine Resistenzdaten für diesen Wirkstoff zur Verfügung standen.

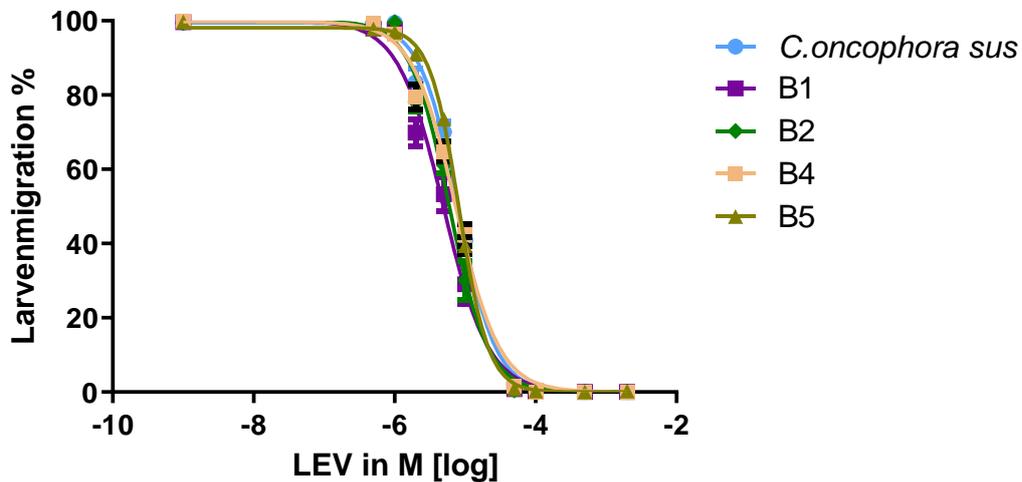
Zunächst wurden die LMHT mit gegenüber LEV bekannt suszeptiblen *C. oncophora* L3 durchgeführt. Die Positivkontrollen ergaben dabei Werte von durchschnittlich 0,1 % ± 0,1 % SE sowie die Negativkontrollen Werte von durchschnittlich 99,5 % ± 0,2 % SE Wanderung, welche damit die Wirkung des LEV auf die Motilität der Larven und eine Reproduzierbarkeit der LMHT bestätigten.

Um jeweils sechs Messpunkte für die isolierten L3 der Rinderbetriebe zu erhalten, wurden die LMHT im doppelten Ansatz bis zu dreimal wiederholt. Dies erfolgte für die Betriebe 2, 4, 6, 7 und 8, während für die Betriebe 1 und 5 nur zwei Duplikate und für Betrieb 9 nur ein Replikat des Versuchs aufgrund der vorhandenen geringen Larvenzahlen durchgeführt werden konnten. Versuchsansätze mit weniger als durchschnittlich 80 Larven pro Replikat blieben für die Auswertung unberücksichtigt. Die sich daraus ergebenden Konzentrations-Wirkungskurven sowie die durchschnittlichen EC<sub>50</sub> Werte sind für die einzelnen Betriebe sowohl in den Abb.5-8 und 5-9 als auch in Tab. 5-14 ersichtlich.

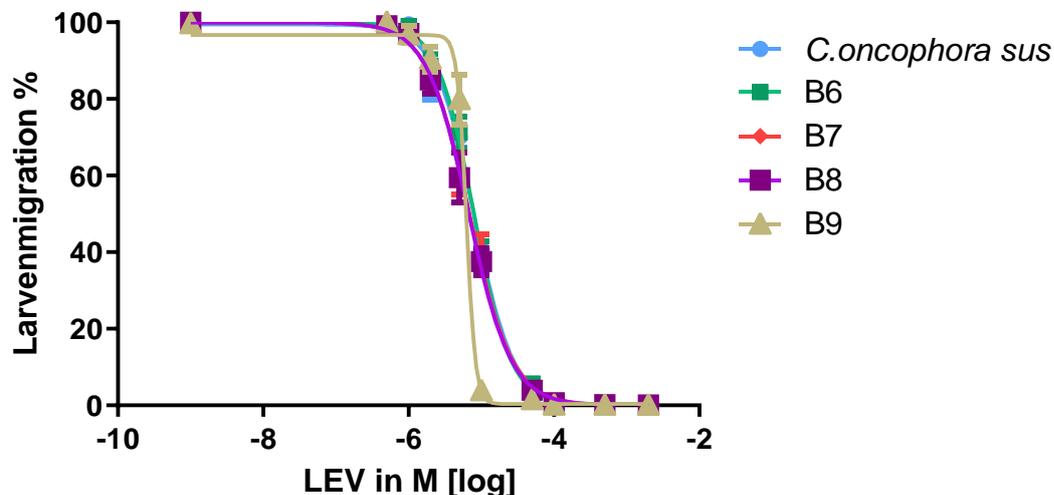
Der durchschnittliche EC<sub>50</sub>-Wert aller LMHT-Wiederholungen für das suszeptible *C. oncophora* Isolat lag bei 7.957 nM (7.368 – 8.593 nM 95 % KI) und der Rinderbetriebe im

Bereich 4.931 und 8.293 nM. Die  $R^2$ -Werte von über 0,98 in allen Betrieben zeigen eine gute Homogenität der Datensätze an. Ein Vergleich der durchschnittlichen  $EC_{50}$ -Werte von *C. oncophora* mit dem jeweiligen Betrieb mittels *Extra-sum of square F-test* diente zur Feststellung einer Signifikanz zwischen den Datensätzen. Für die Betriebe 4, 5 und 6 liegt keine Signifikanz vor ( $p$ -Werte  $> 0,05$ ), das heißt die  $EC_{50}$ -Werte der Betriebe sind vergleichbar mit dem Referenzisolat. Für die Betriebe 1, 2, 7, 8 und 9 liegt eine Signifikanz ( $p$ -Werte  $< 0,05$ ) vor, entsprechend sind die  $EC_{50}$ -Werte nicht vergleichbar mit dem Referenzisolat, denn sie weichen nach unten ab (reagieren LEV-empfindlicher im LMHT als das susceptible Referenzisolat).

**Abb. 5-8. Konzentrations-Wirkungskurven im Larvenmigrationshemmtest für die Betriebe B1, B2, B4 und B5 vergleichend zu dem susceptible (sus.) *C.oncophora* Referenzwurmisolat**



**Abb. 5-9. Konzentrations-Wirkungskurven im Larvenmigrationshemmtest für die Betriebe B6, B7, B8 und B9 vergleichend zu dem susceptible *C.oncophora* Referenzwurmisolat**



Tab. 5-14. EC<sub>50</sub>-Werte, 95 % KI und R<sup>2</sup> für die Larvenmigrationshemmtest der Rinderbetriebe 1, 2, und 4 – 9 vergleichend zum suszeptiblem Referenzisolat von *C. oncophora*

Isolierte L3	EC <sub>50</sub> [nM]	unteres 95 % KI [nM]	oberes 95 % KI [nM]	R <sup>2</sup>	Extra-sum of square f-test [p-Wert]	Anzahl Replikate
<i>C. oncophora</i> <i>sus.</i>	7.957	7.368	8.593	0,983		6
Rd 1	4.931	4.147	5.862	0,980	< 0,001	2
Rd 2	5.987	5.375	6.669	0,984	< 0,001	3
Rd 4	7.419	6.651	8.276	0,987	0,461	3
Rd 5	8.293	7.883	8.704	0,997	0,635	2
Rd 6	7.911	7.222	8.664	0,987	0,718	3
Rd 7	6.886	6.250	7.587	0,984	0,028	4
Rd 8	6.752	5.949	7.663	0,980	0,010	3
Rd 9	6.245	5.651	6.902	0,994	< 0,001	1

## 5.7 Speziesbestimmung mittels *Deep amplicon sequencing*

Das gewonnene Larven-Probenmaterial aus den vorangegangenen Feldstudien in Schaf- und Rinderbetrieben diente der Ermittlung der Nematodenspezies mittels DAS. Für die Speziessequenzierung der Schaf-Larven wurden Aliquots zwischen 1.000 - 2.100 (Ø 1.440, +/- 268 SD, *standard deviation*) L1 aus Eisolierungen und anschließender Inkubation gewonnen. Von elf der zwölf Schafbetriebe waren Larvenproben vor Behandlung vorhanden und insgesamt neun Proben nach Behandlung aus vier Betrieben. Die Rinderbetriebe wurden in 1.000 L3 Aliquots nach Larvenkultivierung portioniert und gemeinsam mit den Schaf-Aliquots bei - 20°C für die weitere Analyse gelagert. Hier waren von allen neun Betrieben Larvenproben vor der Behandlung vorhanden aber keine Larven nach Behandlung.

Zur Sequenzierung gelangten insgesamt 29 Proben: Die Identifizierung der Nematodenspezies wurde für elf Schaf- und neun Rinderbetriebe vor der Behandlung, sowie für drei Schafbetriebe nach FBZ-Behandlung, für vier Schafbetriebe nach IVM-Behandlung, sowie für zwei Schafbetriebe nach MOX-Behandlung vorgenommen.

### 5.7.1 Ergebnisse der Sequenzierung von Schafnematoden

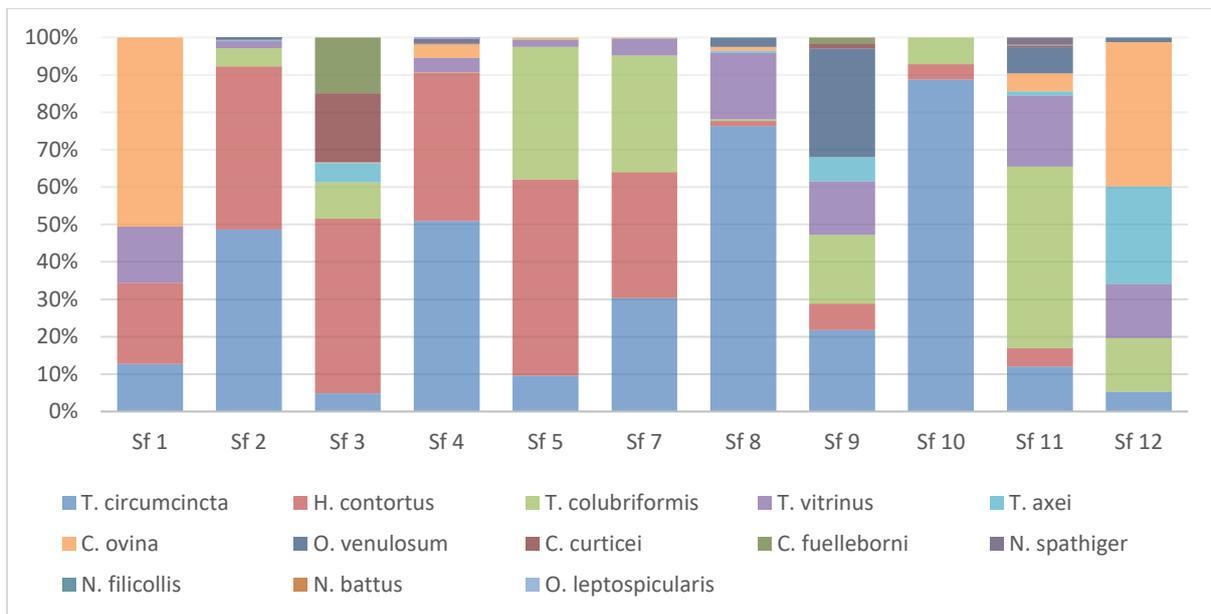
Die Ergebnisse liegen in relativer Häufigkeit des Vorkommens für die einzelnen Spezies in der Probe vor. In den 11 untersuchten Schafproben traten vor einer anthelminthischen Behandlung am häufigsten auf: *T. circumcincta* (in 11 Betrieben), *H. contortus* (10), *T. colubriformis* (10), *T. vitrinus* (9), *T. axei* (8), *Chabertia ovina* (8), *Oesophagostomum venulosum* (6) *Cooperia spp.* (4) und *Nematodirus spp.* (3).

Tab. 5-15. Relative Spezieszusammensetzungen (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Schafbetrieben vor der anthelminthischen Behandlung ohne Korrekturfaktoren

Spezies in %	Sf 1	Sf 2	Sf 3	Sf 4	Sf 5	Sf 7
<i>T. circumcincta</i>	12,5	48,0	4,7	50,9	9,5	30,1
<i>H. contortus</i>	21,2	43,0	45,2	39,6	52,4	33,5
<i>T. colubriformis</i>	0,0	4,8	9,4	0,1	35,3	31,0
<i>T. vitrinus</i>	14,7	1,8	0,0	3,8	1,9	4,5
<i>T. axei</i>	0,0	0,4	4,9	0,0	0,1	0,1
<i>Ch. ovina</i>	49,6	0,0	0,2	3,6	0,5	0,2
<i>O. venulosum</i>	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0
<i>C. curticei</i>	0,0	0,0	17,8	0,0	0,0	0,0
<i>C. fuelleborni</i>	0,0	0,0	14,4	0,1	0,0	0,0
<i>N. spathiger</i>	0,0	0,5	0,0	1,1	0,0	0,0
<i>N. filicollis</i>	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>N. battus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>O. leptospicularis</i>	0,0	0	0,0	0,4	0,0	0

Spezies in %	Sf 8	Sf 9	Sf 10	Sf 11	Sf 12
<i>T. circumcincta</i>	75,0	21,2	88,6	11,8	5,2
<i>H. contortus</i>	1,4	6,9	4,1	4,8	0,0
<i>T. colubriformis</i>	0,4	17,9	7,1	47,4	14,1
<i>T. vitrinus</i>	17,5	14,0	0,0	18,6	14,3
<i>T. axei</i>	0,5	6,3	0,0	1,1	25,6
<i>Ch. ovina</i>	1,0	0,0	0,0	4,7	38,0
<i>O. venulosum</i>	2,5	28,3	0,0	6,9	1,2
<i>C. curticei</i>	0,0	1,4	0,0	0,4	0,0
<i>C. fuelleborni</i>	0,0	1,5	0,0	0,2	0,0
<i>N. spathiger</i>	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0
<i>N. filicollis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>N. battus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>O. leptospicularis</i>	0,0	0	0,0	0,0	0,0

**Abb. 5-10. Relative Spezieszusammensetzungen (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Schafbetrieben vor der anthelminthischen Behandlung ohne Korrekturfaktoren**



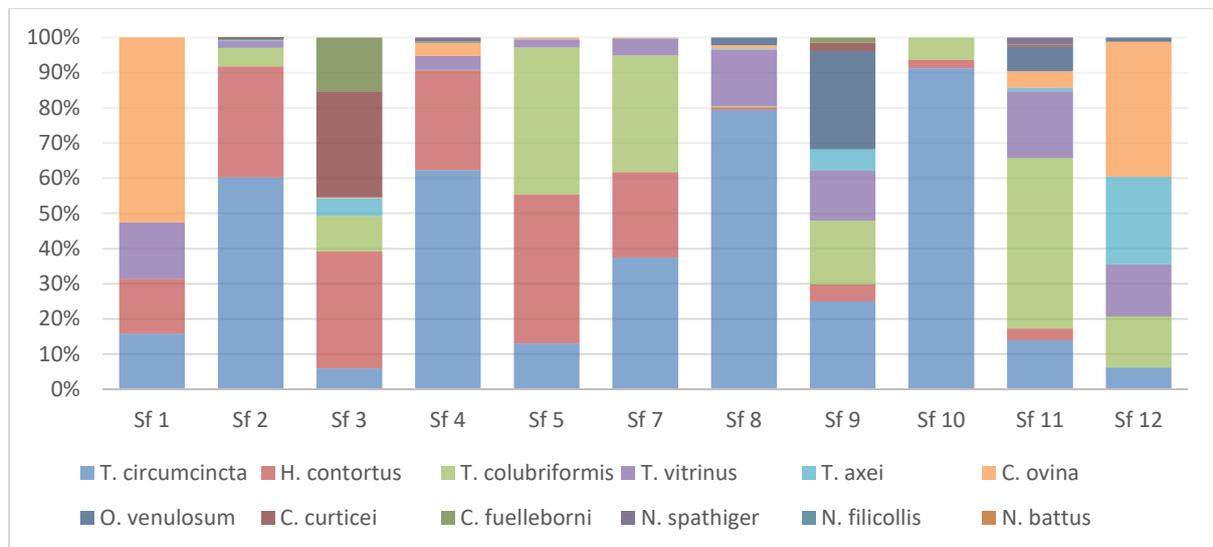
Die Korrekturfaktoren sind in Tab. 4-5 für die Schafnematoden ersichtlich.

**Tab. 5-16. Relative Spezieszusammensetzungen (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Schafbetrieben vor der anthelminthischen Behandlung mit Korrekturfaktoren**

<b>Spezies in %</b>	<b>Sf 1</b>	<b>Sf 2</b>	<b>Sf 3</b>	<b>Sf 4</b>	<b>Sf 5</b>	<b>Sf 7</b>
<i>T. circumcincta</i>	15,5	59,3	5,8	62,0	13,0	37,2
<i>H. contortus</i>	15,3	31,2	32,1	28,3	42,1	24,2
<i>T. colubriformis</i>	0,0	5,1	9,8	0,1	41,6	32,9
<i>T. vitrinus</i>	15,6	1,9	0,0	4,0	2,3	4,8
<i>T. axei</i>	0,0	0,4	4,8	0,0	0,1	0,1
<i>C. ovina</i>	51,5	0,0	0,2	3,7	0,5	0,2
<i>O. venulosum</i>	0,0	0,0	0,1	0,2	0,0	0,0
<i>C. curticei</i>	0,0	0,0	29,2	0,0	0,0	0,0
<i>C. fuelleborni</i>	0,0	0,0	14,7	0,1	0,0	0,0
<i>N. spathiger</i>	0,0	0,5	0,0	1,2	0,0	0,0
<i>N. filicollis</i>	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>N. battus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

<b>Spezies in %</b>	<b>Sf 8</b>	<b>Sf 9</b>	<b>Sf 10</b>	<b>Sf 11</b>	<b>Sf 12</b>
<i>T. circumcincta</i>	78,1	24,4	91,1	13,6	6,1
<i>H. contortus</i>	0,8	4,7	2,5	3,3	0,0
<i>T. colubriformis</i>	0,4	17,7	6,3	47,3	14,3
<i>T. vitrinus</i>	15,7	13,9	0,0	18,6	14,5
<i>T. axei</i>	0,4	5,9	0,0	1,0	24,5
<i>C. ovina</i>	0,8	0,0	0,0	4,6	37,7
<i>O. venulosum</i>	2,2	27,3	0,0	6,7	1,2
<i>C. curticei</i>	0,0	2,3	0,0	0,6	0,0
<i>C. fuelleborni</i>	0,0	1,5	0,0	0,2	0,0
<i>N. spathiger</i>	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0
<i>N. filicollis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>N. battus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

**Abb. 5-11. Relative Spezieszusammensetzungen (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Schafbetrieben vor der anthelminthischen Behandlung mit Korrekturfaktoren**



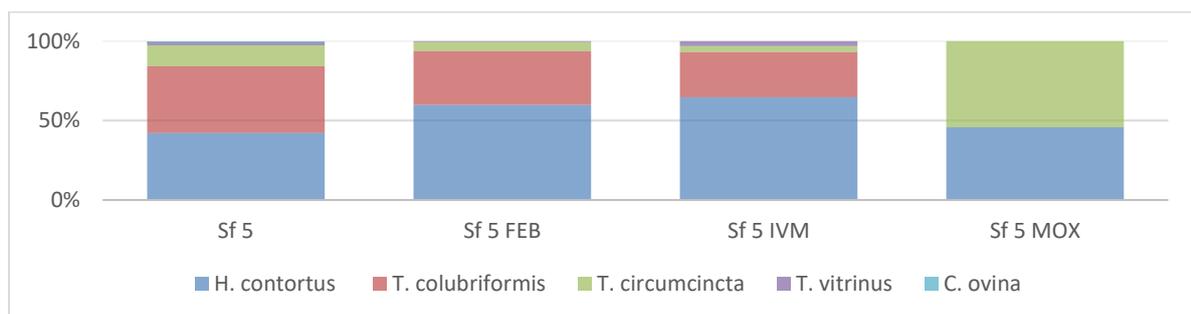
In den neun Nachbehandlungs-Schafproben der vier Betriebe waren vermehrte Häufigkeiten von *T. circumcincta*, *H. contortus* und *Trichostrongylus* spp. zu beobachten. Zusätzlich war in Betrieb 9 ein geringer Prozentsatz an *Cooperia* spp. in das Resistenzgeschehen involviert.

Die Tab. 5-17 - 5-20 zeigen die Zusammensetzungen der Nematodenarten in Kotproben der Schafbetriebe 5, 7, 9 und 10 vor und nach einer Behandlung:

**Tab. 5-17. Relative Spezieszusammensetzung (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Schafbetrieb 5 vor und nach Behandlung**

Spezies in %	Sf 5	Sf 5 FBZ	Sf 5 IVM	Sf 5 MOX
<i>H. contortus</i>	42,1	59,7	63,5	45,8
<i>T. colubriformis</i>	41,6	34,0	28,1	0
<i>T. circumcincta</i>	13,0	5,6	3,5	54,2
<i>T. vitrinus</i>	2,3	0,5	3,1	0
<i>C. ovina</i>	0,5	0	0	0

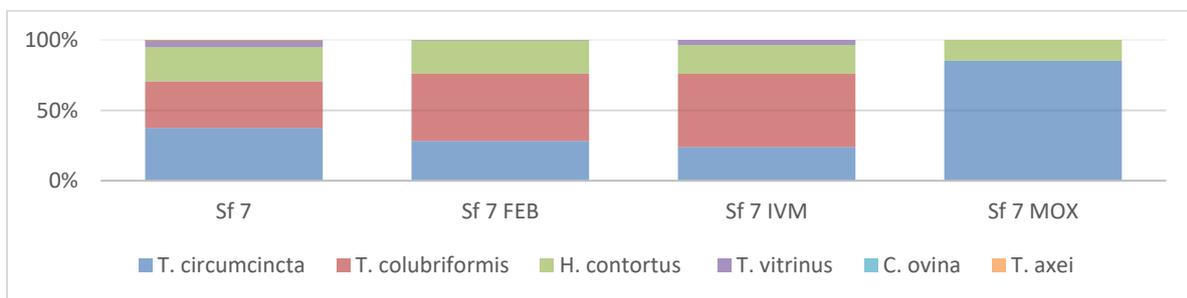
**Abb. 5-12. Relative Spezieszusammensetzung (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Schafbetrieb 5 vor und nach Behandlung**



**Tab. 5-18. Relative Spezieszusammensetzung (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Schafbetrieb 7 vor und nach Behandlung**

Spezies in %	Sf 7	Sf 7 FBZ	Sf 7 IVM	Sf 7 MOX
<i>T. circumcincta</i>	37,2	28,2	23,7	85,1
<i>T. colubriformis</i>	32,9	47,7	52,0	0
<i>H. contortus</i>	24,2	23,6	20,3	14,6
<i>T. vitrinus</i>	4,8	0,3	3,6	0
<i>C. ovina</i>	0,2	0	0	0
<i>T. axei</i>	0,1	0	0	0

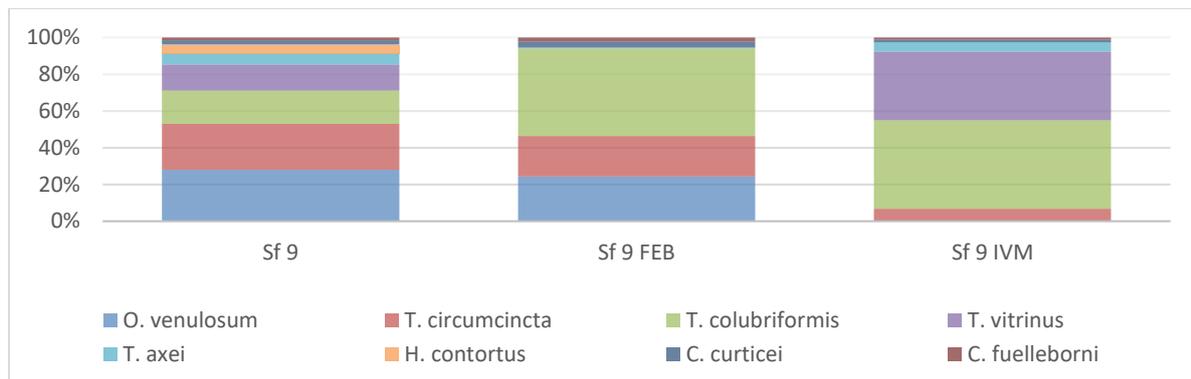
**Abb. 5-13. Relative Spezieszusammensetzung (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Schafbetrieb 7 vor und nach Behandlung**



**Tab. 5-19. Relative Spezieszusammensetzung (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Schafbetrieb 9 vor und nach Behandlung**

Spezies in %	Sf 9	Sf 9 FBZ	Sf 9 IVM
<i>O. venulosum</i>	27,3	24,2	0
<i>T. circumcincta</i>	24,4	21,8	6,4
<i>T. colubriformis</i>	17,7	47,4	45,7
<i>T. vitrinus</i>	13,9	0	35,5
<i>T. axei</i>	5,9	0,5	4,9
<i>H. contortus</i>	4,7	0	0
<i>C. curticei</i>	2,3	3,2	1,5
<i>C. fuelleborni</i>	1,5	2,2	1

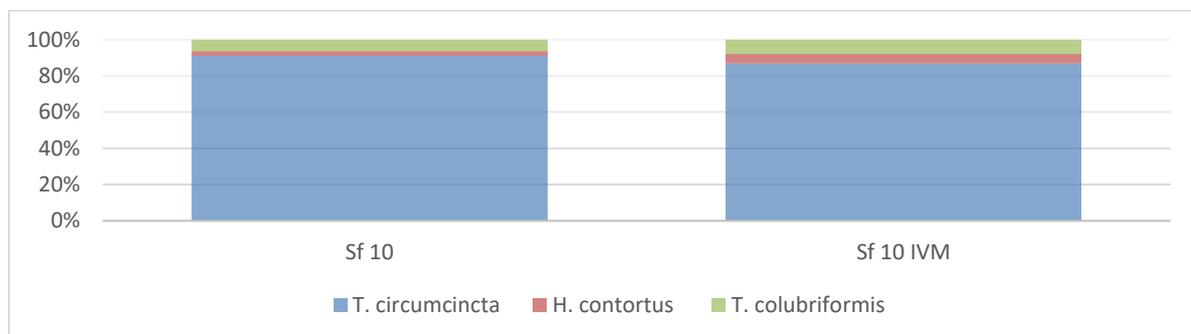
**Tab. 5-14. Relative Spezieszusammensetzung (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Schafbetrieb 9 vor und nach Behandlung**



**Tab. 5-20. Relative Spezieszusammensetzungen (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Schafbetrieb 10 vor und nach Behandlung**

Spezies in %	Sf 10	Sf 10 IVM
<i>T. circumcincta</i>	91,1	86,7
<i>H. contortus</i>	2,5	5,3
<i>T. colubriformis</i>	6,3	7,9

**Tab. 5-15. Relative Spezieszusammensetzung (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Schafbetrieb 10 vor und nach Behandlung**



Schafbetrieb 5 zeigte keine bzw. keine ausreichende Wirksamkeit gegenüber allen eingesetzten AH mit folgenden mittleren Reduktionswerten: FBZ 18,7 %, IVM 47,6 % und MOX 94,9 %. Die Proportionen vor und nach Behandlung verschoben sich hier zugunsten von *H. contortus* und *T. circumcincta*, sodass für diese beiden Spezies von einer Resistenz gegen alle drei eingesetzten Wirkstoffe ausgegangen werden kann. *Trichostrongylus colubriformis* blieb nach IVM und FBZ-Behandlung, nicht aber nach MOX-Behandlung erhalten, weshalb auch hier eine verminderte Wirksamkeit gegen zwei der drei Wirkstoffe anzunehmen ist. Der starke prozentuale Anstieg von *T. circumcincta* nach MOX-Behandlung im Gegensatz zur IVM-Behandlung liegt an der Beteiligung weiterer Spezies am Resistenzgeschehen. So bleiben nach IVM-Behandlung *H. contortus*, *T. colubriformis* und *T. vitrinus* erhalten. Nach MOX liegen in gleichen Anteilen lediglich *H. contortus* und *T. circumcincta* vor, welche damit im gleichen

Maße resistent gegen MOX wirken. Der Anteil von *T. vitrinus*-Larven blieb nach IVM Behandlung hoch und reduzierte sich nach FBZ Behandlung nur teilweise, sodass auch hier ein geringer Anteil resistenter Individuen vorliegen dürfte.

Schafbetrieb 7 wies folgende mittleren Reduktionswerte auf: FBZ 77,3 %, IVM 77,5 % und MOX 94,6 %. Hier verschoben sich die Verhältnisse nach Behandlung zugunsten von *T. colubriformis* nach FBZ und IVM-Behandlung, sowie *T. circumcincta* nach MOX-Behandlung. *H. contortus* reduzierte sich ebenfalls nicht nach der Behandlung, sodass diese drei Spezies hauptverantwortlich für die verminderten Wirksamkeiten in diesem Betrieb sein dürften. Ein geringer Anteil von *T. vitrinus* blieb ebenfalls nach IVM Behandlung erhalten, sodass diese Spezies in diesem Betrieb vermutlich ebenfalls als resistent gegen IVM zu betrachten ist.

Schafbetrieb 9 wies Resistenzen mit mittleren Reduktionswerten von 57,0 % für FBZ und 81,4 % für IVM auf, MOX war in Betrieb 9 wirksam mit 99,9 % Reduktion. Nach FBZ Behandlung erhöhte sich hier der Anteil von *T. colubriformis*, während *T. circumcincta* und *O. venulosum* auf gleichem Niveau verblieben. Nach IVM Behandlung fanden sich vor allem *T. colubriformis* und *T. vitrinus* Spezies in der Probe.

Schafbetrieb 10 wies lediglich eine Resistenz gegenüber IVM mit einem Reduktionswert von 63,8 % auf. Hier verblieben *T. colubriformis*, *T. circumcincta* und *O. venulosum* zu gleichen Anteilen in der Nachbehandlungs-Probe.

Zusammenfassend für die vier Schafbetriebe mit insgesamt 13 Proben vor und nach Behandlung lassen sich folgende Angaben zu den involvierten Wurm��pezies machen: Nach der Behandlung waren in jeder Probe resistente *T. circumcincta* vorhanden. *Trichostrongylus colubriformis* war in 100 % der IVM und FBZ Nachbehandlungsproben vorhanden, jedoch nicht in den Proben nach MOX-Behandlung. *Haemonchus contortus* wurde in den Nachbehandlungsproben in drei der vier Betriebe (B5, B7 und B10) nicht eliminiert, lediglich in Schafbetrieb 9 zeigte sich eine 100-prozentige Wirksamkeit nach FBZ- und IVM-Behandlung. MOX war in Betrieb 9 zu 99,9 % wirksam, sodass keine Larven nach der Behandlung gewonnen werden konnten. *Trichostrongylus vitrinus* war vor Behandlung mit einem Anteil von 2,3 % in B5, 4,8 % in B7 und 13,9 % in B9 in drei der vier Proben vorhanden. Diese Art war resistent nach IVM-Behandlung und verblieb in B5 bei 3,1 %, in B7 bei 3,6 % und erhöhte den prozentualen Anteil in der Probe nach Behandlung in B9 auf 35,5 %. Die FBZ-Behandlung war nur in einem von drei Fällen erfolgreich: In B5 verblieben 0,5% und in B7 0,3 % *T. vitrinus*. Gegenüber MOX war diese Spezies jedoch noch suszeptibel. *Trichostrongylus axei* war in geringem Maße ebenfalls in zwei Betrieben vorhanden, und das Vorkommen dieser Spezies reduzierte sich nach IVM-Behandlung nur in einem der beiden Fälle. Das Vorkommen von *C. ovina* reduzierte sich in 100 % der Nachbehandlungsproben. In Betrieb 9 fanden sich

vor Behandlung geringe Anteile von *C. curticei* und *C. fuelleborni*, die nach IVM- und FBZ-Behandlung erhalten blieben.

### 5.7.2 Ergebnisse der Sequenzierung von Rindernematoden

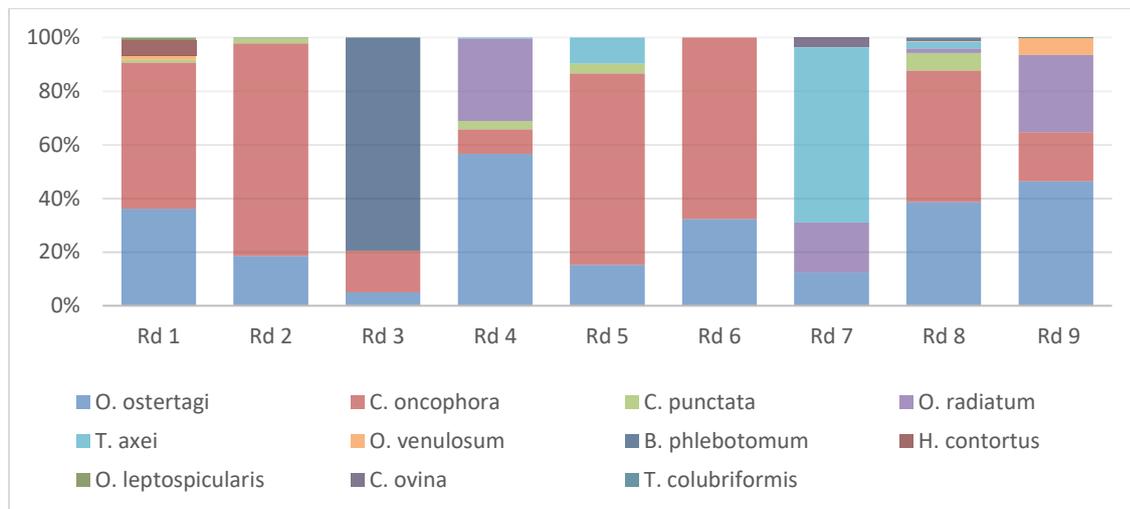
Für die Rinderbetriebe 1-9 lagen aus der eigenen Feldstudie Proben vor der Behandlung vor. Hier zählten zu den häufigsten Spezies: *O. ostertagi* (in allen 9 Betrieben), *C. oncophora* (8), *Cooperia punctata* (5), *Oesophagostomum radiatum* (4), *T. axei* (4), *O. venulosum* (4), *Bunostomum phlebotomum* (3), *H. contortus* (2), *Ostertagia leptospicularis* (2), *C. ovina* (1) und *T. colubriformis* (1). Die Tab. 5-21 schlüsselt die relative Verteilung der Spezies in den Rinderbetrieben 1-9 auf.

**Tab. 5-21. Relative Spezieszusammensetzungen (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Rinderbetrieben vor Behandlung ohne Korrekturfaktoren**

Spezies in %	Rd 1	Rd 2	Rd 3	Rd 4	Rd 5
<i>O. ostertagi</i>	35,9	18,2	5,0	55,8	14,8
<i>C. oncophora</i>	54,2	78,0	15,6	9,1	69,6
<i>C. punctata</i>	1,1	1,9	0,0	3,0	3,6
<i>O. radiatum</i>	0,0	0,0	0,0	30,3	0,0
<i>T. axei</i>	0,0	0,0	0,0	0,4	9,4
<i>O. venulosum</i>	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>B. phlebotomum</i>	0,0	0,2	79,3	0,0	0,0
<i>H. contortus</i>	5,7	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>O. leptospicularis</i>	1,0	0,0	0,1	0,0	0,0
<i>Ch. ovina</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>T. colubriformis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Spezies in %	Rd 6	Rd 7	Rd 8	Rd 9
<i>O. ostertagi</i>	32,3	12,3	36,6	45,9
<i>C. oncophora</i>	67,5	0,0	46,3	18,2
<i>C. punctata</i>	0,0	0,0	6,2	0,0
<i>O. radiatum</i>	0,0	18,7	1,6	28,5
<i>T. axei</i>	0,0	65,3	2,4	0,0
<i>O. venulosum</i>	0,0	0,0	0,2	6,2
<i>B. phlebotomum</i>	0,0	0,0	1,3	0,0
<i>H. contortus</i>	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>O. leptospicularis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Ch. ovina</i>	0,0	3,6	0,0	0,0
<i>T. colubriformis</i>	0,0	0,0	0,0	0,2

**Tab. 5-16. Relative Spezieszusammensetzungen (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Rinderbetrieben vor Behandlung ohne Korrekturfaktoren**



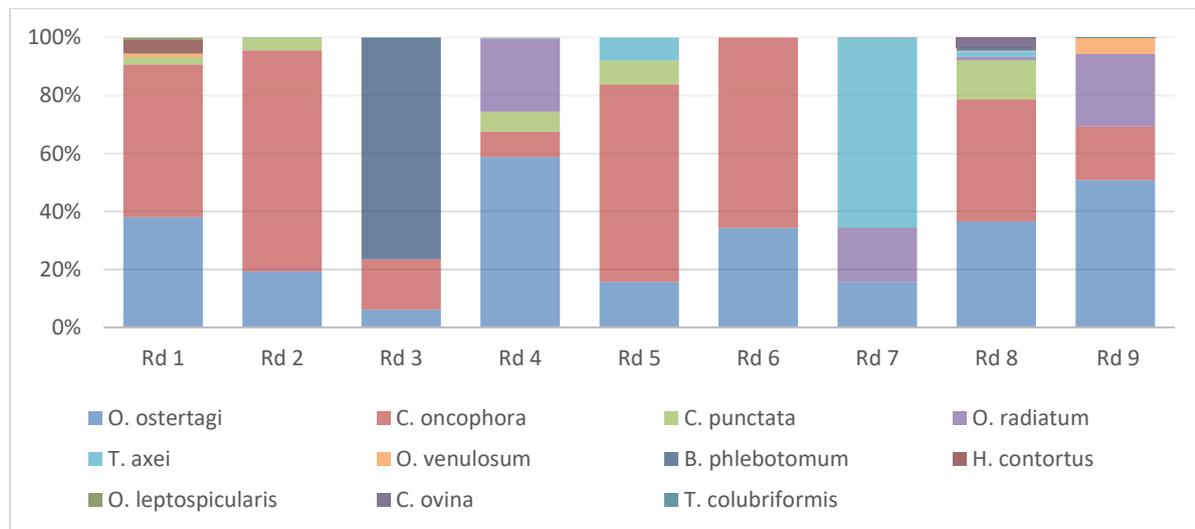
Die Korrekturfaktoren sind in Tab. 4-5 für die Rindernematoden ersichtlich.

**Tab. 5-22. Spezieszusammensetzungen (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Rinderbetrieben vor Behandlung mit Korrekturfaktoren**

Spezies in %	Rd 1	Rd 2	Rd 3	Rd 4	Rd 5
<i>O. ostertagi</i>	37,8	19,1	6,1	58,1	15,4
<i>C. oncophora</i>	52,3	75,0	17,4	8,7	66,5
<i>C. punctata</i>	2,5	4,3	0,0	6,7	8,0
<i>O. radiatum</i>	0,0	0,0	0,0	25,0	0,0
<i>T. axei</i>	0,0	0,0	0,0	0,3	7,8
<i>O. venulosum</i>	1,2	0,0	0,0	0,02	0,0
<i>B. phlebotomum</i>	0,0	0,1	76,4	0,0	0,0
<i>H. contortus</i>	4,7	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>O. leptospicularis</i>	0,8	0,0	0,1	0,0	0,0
<i>C. ovina</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>T. colubriformis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Spezies in %	Rd 6	Rd 7	Rd 8	Rd 9
<i>O. ostertagi</i>	34,3	15,1	36,2	50,4
<i>C. oncophora</i>	65,6	0,0	41,9	18,3
<i>C. punctata</i>	0,0	0,0	13,3	0,0
<i>O. radiatum</i>	0,0	18,1	1,2	24,8
<i>T. axei</i>	0,0	63,2	1,9	0,0
<i>O. venulosum</i>	0,0	0,0	0,2	5,4
<i>B. phlebotomum</i>	0,0	0,0	1,0	0,0
<i>H. contortus</i>	0,0	0,03	0,0	0,0
<i>O. leptospicularis</i>	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Ch. ovina</i>	0,0	0,0	3,5	0,0
<i>T. colubriformis</i>	0,0	0,0	0,0	0,2

**Abb. 5-17. Spezieszusammensetzungen (in %) der gastrointestinalen Nematoden auf Rinderbetrieben vor Behandlung mit Korrekturfaktoren**



## 5.8 Fragebogen Schafbetriebe

Eine die AR-Untersuchungen begleitende Umfrage wurde am ersten Tag des EZRT durch die Landwirte ausgefüllt. Die Daten wurden somit zeitgleich vom 16.09.2020 - 24.02.2021 erhoben.

Die Gesamtzahl der gehaltenen Schafe betrug durchschnittlich 813 Tiere (48 - 3.500). Zwei der 12 Betriebe besaßen weitere Tierarten, einmal Rinder und Ziegen, sowie einmal nur Ziegen. Die Anzahl der Tiere getrennt nach Geschlecht und Alter ergab durchschnittlich 495 Muttertiere pro Betrieb, neun Böcke, 141 Zutreter im Alter zwischen ein und zwei Jahren und 162 Lämmer unter zwölf Monaten. Folgende Schafrassen wurden mehr als einmal gehalten: Fünfmal Schwarzköpfige Fleischschafe, zweimal Bentheimer Landschafts, zweimal Rauwollige Pommersche Landschafts und zweimal Skudden. Die Nutzungsrichtungen Fleisch und Landschaftspflege wurden am häufigsten genannt (elf, resp. sieben), Wollhaltung sechsmal, Milchhaltung, Hobbyhaltung je einmal. Unter den Schäfern übten fünf den Beruf als Hauptberuf, sechs weitere in Nebentätigkeit oder hobbyhaltend aus. Die Zukäufe pro Jahr variierten von 0 bis 50 Tieren (neun ausschließlich Böcke, einmal beide Geschlechter und zweimal keine Zukäufe). Die Haltungsformen variierten in der Mehrfachauswahl zwischen einmal Kurzrasenweide, einmal Wanderschäferi, einmal Portionsweide (auch Rationsweide; eine in Tagesabschnitte unterteilte Einzelkoppel) und Wanderschäferi, zweimal Umtriebsweide und Wanderschäferi, zweimal reine Umtriebs- und zweimal reine Portionsweide, sowie dreimal Mischungen aus Portions-, Stand- und Umtriebsweide. Ein Betrieb gab an, die Schafe zum Nachweiden auf Rinderweiden zu halten. Die zur Verfügung stehende Weidefläche betrug durchschnittlich 79 Hektar und variierte zwischen einem und 260 Hektar. Tab. 5-23 listet die verfügbare Weidefläche pro Tier auf.

**Tab. 5-23. Übersicht der Anzahl Tiere und Gesamtfläche der Schafbetriebe**

Schafbetrieb	Anzahl Tiere gesamt	Gesamtfläche in ha	ha / Tier
Sf 1	48	14,5	0,3021
Sf 2	450	130	0,2889
Sf 3	475	n.a.	n.a.
Sf 4	953	270	0,2833
Sf 5	1180	n.a.	n.a.
Sf 6	200	35	0,1750
Sf 7	2000	120	0,0600
Sf 8	56	7	0,1250
Sf 9	160	2,5	0,0156
Sf 10	3500	9	0,0026
Sf 11	200	1	0,0050
Sf 12	530	156	0,2943

Wasserzufuhr erhielten die Tiere elfmal über Trog und Tränke, sowie einmal ausschließlich über natürliche Wasserquellen und viermal zusätzlich über natürliche Wasserquellen.

Elf Betriebe führten regelmäßige Entwurmungen durch (92 %), ein Betrieb entwurmt nur bei Bedarf (8 %), wobei neun eine gemeinsame Behandlung aller Tiere einer bestimmten Altersgruppe durchführten (75 %) und drei nicht (25 %). Die Frequenz der Entwurmungen variierte zwischen einem Rhythmus von keiner, also lediglich bei Bedarf durchgeführt, bis zu der Behandlung in einem Fünf-Wochen Intervall. Acht Betriebe lagen bei einer Frequenz von ein bis fünf Entwurmungen pro Jahr (67 %). Zwölfmal führte der Tierhalter selbst die Entwurmung durch (100 %). Dabei bestimmten zehn der zwölf Betriebe das Tiergewicht zur Dosierung der Medikamente mittels Schätzung und verzichteten auf die Verwendung einer Waage (83 %).

Bei der Frage zum Einsatz von AH war eine Mehrfachnennung von Wirkstoffen möglich. Dabei wurden Vertreter der ML am häufigsten genannt: IVM siebenmal (58 %), MOX elfmal (92 %) und DOM zweimal (17 %). An zweiter Stelle folgten die BZ mit FBZ (dreimal, 25 %) und ABZ (dreimal, 25 %). Levamisol und MON wurden je zweimal genannt (17 %).

Acht der zwölf Betriebe gaben im Fragebogen an, in der Vergangenheit keine Kotuntersuchung durchgeführt zu haben (67 %). Dennoch hielten neun Betriebe Untersuchungen der Kotproben für sinnvoll (75 %).

Die Planung der Wurmkontrolle wurde zwölfmal durch den Tierhalter vorgenommen (100 %), es erfolgte dabei achtmal eine Absprache mit dem TA oder dem Tiergesundheitsdienst (67 %). Die Beratung durch den TA oder den Tiergesundheitsdienst wurde zehnmal als ausreichend gut bewertet (83 %), zweimal wurde angegeben, dass die Beratung nicht ausreiche (17 %).

Auf die allgemein gehaltene Frage "Wie sicher sind Sie sich bei Entscheidungen rund um die Entwurmung Ihrer Schafe?" antworteten die Befragten überwiegend (elfmal, 92 %) mit "Sicher". Aufgrund der vagen Formulierung ist dabei jedoch nicht klar ersichtlich, ob die generelle Entscheidung zur Entwurmung der Tiere oder die Auswahl des richtigen Wirkstoffs gemeint ist.

Dazu gaben acht der zwölf Betriebe an, sich zusätzliche Informationen zum Thema Entwurmung zu wünschen (67 %).

Der Binominaltest ergab, dass der Anteil der Schafbesitzer, die sich überwiegend sicher bei der Auswahl des AH fühlten, signifikant höher ( $p < 0,05$ ) war, als der Anteil der Schafbesitzer, die sich eher unsicher waren. Das Gleiche galt für den Anteil der Schafbesitzer, die sich bzgl. der Entwurmungsentscheidung gut informiert fühlten verglichen mit jenen, die sich eher schlecht informiert fühlten ( $p < 0,05$ ).

Zwei Betriebe separierten zugekaufte Tiere nicht von der Herde (17 %) und vier Betriebe entwurmt zugekaufte Tiere in der Regel nicht (33 %), die restlichen Betriebe hingegen befürworteten diese Praxis für ihre Tierbestände (67 %). Die Relevanz des Weidemanagements für ein erfolgreiches Entwurmungsmanagement war vorwiegend (elfmal, 92 %) bekannt, einen Weidewechsel nach der Entwurmung führten sieben der zwölf Betriebe durch (58 %).

Auch Alternativen zu Entwurmungsmedikamenten waren bei 100 % der Tierhalter bereits bekannt. Dagegen waren in lediglich drei von zwölf Betrieben alternative Entwurmungsmittel bereits eingesetzt worden (25 %). Die Umfrage ist im Anhang 10-3 vollständig aufgeführt.

## **5.9 Fragebogen Rinderbetriebe**

In den besuchten Rinderbetrieben wurde im Zeitraum der Beprobung vom 24.08. - 14.12.2021 ebenfalls eine Umfrage mit den Landwirten ausgefüllt.

Die Gesamtzahl der pro Betrieb gehaltenen Rinder betrug durchschnittlich 932 Tiere (52 – 3.521). Ein Betrieb besaß zusätzlich 400 Schafe und 12 Ziegen sowie ein weiterer 70 Pferde. Die Anzahl der Tiere ergab, getrennt nach Geschlecht und Alter durchschnittlich 424 Adulte pro Betrieb, 24 Bullen, 165 Jungrinder im Alter zwischen ein und zwei Jahren, sowie 286 Kälber unter zwölf Monaten. Für Betrieb 7 lagen dabei keine auswertbaren Angaben vor. Folgende Rinderrassen wurden mehr als einmal gehalten: Dreimal Uckermärker, zweimal Angus und zweimal Holstein-Frisian Rinder.

Die meistgenannte Nutzungsrichtung war die Mutterkuhhaltung, die sechsmal genannt wurde, danach folgte mit dreimal die Fleisch- und zweimal die Milchproduktion. In allen Betrieben stellte die Rinderhaltung die Haupterwerbstätigkeit dar. Die Zukäufe pro Jahr variierten von 0 bis 150 Tiere, wobei meist ausschließlich Bullen zugekauft wurden und drei Betriebe keine

Zukäufe tätigten. Sieben Betriebe hielten ihre Tiere ganzjährig auf Weiden, nur zwei Betriebe gaben eine saisonale Weidehaltungsform an. Die Größe der beweideten Flächen variierte dabei von 7 – 1800 Hektar Gesamtfläche, wobei vier Betriebe angaben, gewässernahe Flächen zu beweiden. Vier Betriebe sagten aus, als Haltungsform eine Umtriebsweide zu nutzen, dreimal nutzten sie eine Standweide und zweimal eine Portionsweide. Tab. 5-24 beschreibt die verfügbare Weidefläche pro Tier für die Betriebe auf.

**Tab. 5-24. Übersicht der Anzahl Tiere und Gesamtfläche der Rinderbetriebe**

Rinderbetriebe	Anzahl Tiere	Gesamtfläche in ha	ha / Tier
<b>Rd 1</b>	203	120	0,5911
<b>Rd 2</b>	390	230	0,5897
<b>Rd 3</b>	1000	60	0,0600
<b>Rd 4</b>	1250	400	0,3200
<b>Rd 5</b>	52	40	0,7692
<b>Rd 6</b>	591	7	0,0118
<b>Rd 7</b>	n.a.	30	n.a.
<b>Rd 8</b>	3521	1800	0,5112
<b>Rd 9</b>	450	60	0,1333

Eine Wasserzufuhr erhielten die Tiere viermal über Tränkebecken oder eine Wasserpumpe und zweimal stand ein Trog zur Verfügung.

Sieben der neun Betriebe führten regelmäßige Entwurmungen durch (78 %), zwei Betriebe entwurmten nur bei Bedarf (22 %), wobei acht der neun eine gemeinsame Behandlung aller Tiere einer bestimmten Altersgruppe durchführten. Die Frequenz der Entwurmung variierte zwischen einem Rhythmus von keiner - also lediglich bei Bedarf durchgeführt, bis zur zweimaligen Behandlung im Jahr. Die Entwurmung wurde auf vier Betrieben vom Tierhalter und in vier Betrieben von einem TA vorgenommen, ein Betrieb gab beide Personengruppen als Ausführende an.

Der meistgenannte Wirkstoff war IVM, das achtmal angegeben wurde (89 %), DOM zweimal (22 %) sowie EPR und FBZ je einmal (11 %). Eine Mehrfachnennung von Wirkstoffen war bei dieser Frage möglich.

Die Dosierung wurde zweimal nach Ermittlung des Gewichts auf einer Tierwaage durchgeführt (22 %), die restlichen Betriebe gaben an lediglich zu schätzen (selbst wenn eine Tierwaage in dem Betrieb vorhanden war). Acht Betriebe gaben Pour-on als bevorzugte Applikationsart an, und lediglich ein Betrieb hatte Kotproben bereits einmal zu koproskopischen Untersuchungen eingesandt (11 %), allerdings zum Nachweis von Leberegeleiern, wofür ein anderes Verfahren als zur Detektion der Eier parasitischer Nematoden verwendet wird. Auf die Frage, ob

regelmäßige Kotkontrollen für sinnvoll erachtet werden, antworteten jedoch acht der neun Betriebe mit ja (89 %).

Bereits in den Betrieben aufgetretene Erkrankungen waren Lahmheiten, Klauen- und Eutererkrankungen, Nabel- und Gelenksentzündungen. Ein Betrieb gab Clostridiose sowie ein weiterer Kryptosporidien an. In fünf der neun Betriebe spielten Durchfallerkrankungen eine Rolle (55 %) und in vier dieser Betriebe hatte es Tierverluste durch Durchfallerkrankungen gegeben (44 %). Ein Betrieb gab zusätzlich an, vermehrt Kümmerer in der Herde zu haben.

Die Planung der Wurmkontrolle wurde dreimal durch den Tierhalter allein (33 %), dreimal vom Tierhalter gemeinsam mit dem TA (33 %) und zweimal ausschließlich durch den TA vorgenommen (22 %). Dieses Ergebnis unterscheidet sich damit erheblich von den Schafbetrieben, auf denen die Planung ausschließlich durch den Tierhalter erfolgte. Von ihrem TA ausreichend gut beraten fühlten sich acht der Betriebe und fühlten sich zudem zum Thema Entwurmung gut informiert (89 %). Lediglich ein Betrieb gab an, sich beim Entwurmungsmanagement der Tiere überwiegend unsicher zu sein (11 %). Drei Betriebe wünschten sich keine weiteren Informationen zum Thema Entwurmung (33 %), wodurch sich ebenfalls ein Unterschied zum Ergebnis der Schafhalter herausstellte.

Zu Praktiken des Herdenmanagements wurde erfragt, ob zugekaufte Tiere von der Herde separiert werden, worauf lediglich drei Betriebe mit „Ja“ antworteten (33 %). Fünf Betriebe gaben allerdings an, zugekaufte Tiere vor dem ersten Weidezugang zu entwurmen (55 %). Auf die Frage, ob eine Entwurmung aller Tiere einer Herde für sinnvoll gehalten wird, bejahten dies mit acht von neun fast alle Betriebe (89 %). Einen Weidewechsel nach der Entwurmung hielt hier lediglich ein Betrieb für sinnvoll (11 %).

Insgesamt nahm das Weidemanagement für acht der Betriebe eine eher wichtige Rolle ein. Zuletzt wurde erfragt, ob Alternativen zur klassischen Entwurmung bekannt seien, worauf lediglich drei Betriebe „Weidemanagement“ nannten (33 %) und ein Betrieb „Futtermittel“ (11 %). Angewendet hatte diese Alternativen ein einzelner Betrieb, der „Weidemanagement und -hygiene“ als durchgeführte Praxis nannte (11 %). Dieser Betrieb hatte jedoch ein vermehrtes Vorkommen von Kryptosporidien-Erkrankungen aufgewiesen. Als Folge waren diese Maßnahmen dem zuständigen TA angeordnet worden. Es lag in diesem Fall vermutlich keine intrinsische Motivation des Rinderhalters vor.

Die vollständigen Ergebnisse der Umfrage sind tabellarisch aus Anhang 10-6 ersichtlich.

## **5.10 Umfrage größtierpraktizierender Tierärzte**

Die Testprobandinnen und Testprobanden benötigten zur vollständigen Bearbeitung der Umfrage zwischen 10 und 15 Minuten.

Diese wurde zwischen dem 06.01.–30.04.2022 236 mal geöffnet und von 48 TÄ vollständig ausgefüllt. Aus den 48 vollständigen Datensätzen lagen 39 für die Tierart Schaf und 47 für die Tierart Rind vor. Die meisten TÄ kamen aus den Bundesländern Bayern (11 TÄ), Baden-Württemberg (9 TÄ) und Brandenburg (8 TÄ). Einunddreißig TÄ waren weiblichen und 17 männlichen Geschlechts. Das durchschnittliche Alter betrug 41 Jahre, die größte Gruppe an TÄ (27 %) besaß weniger als 5 Jahre Berufserfahrung (13 TÄ), und für die höchste veterinärmedizinische Qualifikation wurde von 76 % der TÄ die Approbation angegeben. Hier war eine Mehrfachnennung jedoch möglich, und unter „Sonstiges“ gaben sieben Personen Zusatzbezeichnungen, ihren Doktorengrad oder nicht aufgeführte Fachtierarztbezeichnungen an (z.B. FTA für Schweine oder FTA für Zoo- und Wildtiere). In gleichen Teilen arbeiteten die TÄ in einer Fahrpraxis für Großtiere (21 TÄ) oder in einer Gemischttier-Fahrpraxis (21 TÄ). Nur ein TA gab an, über 50 % Schafbetriebe zu betreuen, 34 TÄ betreuten mehr als 50 % Rinderbetriebe. Häufig wurden zudem Ziegen (34 TÄ) und Neuweltkameliden (28 TÄ) betreut. Bei Nichtangabe der Betreuung von Schafen bzw. von Rindern wurden die im Fragebogen folgenden, tierarztspezifischen Fragen jeweils nicht eingeblendet.

Bei den schafspezifischen Fragen gaben 30 TÄ an, zwischen 0 und 50 % biologisch akkreditierte Schafbetriebe zu betreuen. Da Schafe in der Regel extensiv gehalten werden, entfiel die Frage nach dem Anteil der Tiere mit extensiver Weidehaltung.

Die meistgenannten AH-Wirkstoffe waren MOX mit 13 „sehr häufig“ und neun „häufig“ Angaben, gefolgt von PZQ mit zwei „sehr häufig“ und zehn „häufig“ Angaben. Auf Plätzen drei und vier folgten IVM mit fünf „sehr häufig“ und sechs „häufig“ Angaben und FBZ mit zwei „sehr häufig“ und sechs „häufig“ Angaben. „Selten“ bis „nie“ kamen hier Oxfendazol (28 TÄ), LEV (27 TÄ), EPR (26 TÄ), CLO (25 TÄ) und TCBZ (23 TÄ) zum Einsatz.

Als Hauptkriterien zur Auswahl des geeigneten AH wurde hier die koproskopische Untersuchung (28 TÄ), die Umweltverträglichkeit (19 TÄ) sowie die Applikationsform (15 TÄ) genannt. Die bevorzugte Applikationsform war die orale Gabe von Medikamenten (32 TÄ), welche 86 % der TÄ angaben.

Bei den rinderspezifischen Fragen gaben 43 TÄ an zwischen 0 und 50 % biologisch akkreditierte Rinderbetriebe, sowie 40 TÄ zwischen 0 und 50 % Anteil an Rinderbetrieben mit extensiver Weidehaltung zu betreuen.

Die eingesetzten AH konnten in einer Abstufung von „sehr häufig“ bis „nie“ gewählt werden. IVM war hier der meistgenannte Wirkstoff, den 20 TÄ „sehr häufig“ und 16 TÄ „häufig“ einsetzten. EPR und MOX folgten mit je 5 „sehr häufig“ und 15 resp. 16 „häufig“-Angaben. „Selten“ bis „nie“ eingesetzt wurden OXF (38 TÄ), LEV (36 TÄ), Oxyclozanid (OXC, 36 TÄ) und CLO (30 TÄ).

Auf biologisch akkreditierten Rinderbetrieben fiel die Wahl vermehrt auf folgende AH, welche „sehr häufig“ bis „gelegentliche“ eingesetzt wurden (in Klammern die Signifikanz des Spearman'schen Korrelationskoeffizienten): ABZ ( $p = 0,004$ ), LEV ( $p = 0,026$ ), CLO ( $p = 0,018$ ), TCBZ ( $p = 0,001$ ) und OXC ( $p = 0,014$ ).

Die meistgenannten Kriterien zur Auswahl des geeigneten AH waren die Applikationsform (72 %), einzuhaltende Wartezeiten (64 %) und die Kosten (53 %) für die Rinder-TÄ. Weitere Auswahlmöglichkeiten wurden seltener genannt, die für die Wirkstoff-Wahl von Bedeutung waren, darunter in absteigender Reihenfolge eine „zusätzliche Wirksamkeit gegen Ektoparasiten“ (49 %), eine „zuverlässige Wirksamkeit“ des Medikaments (32 %) und der Einsatz von „koproskopischen Untersuchungen“ im Vorfeld der Behandlung (30 %). Ein Zusammenhang bestand zudem zwischen einzelnen Wirkstoffen, die gehäuft gemeinsam mit einem entsprechenden Auswahl-Kriterium genannt wurden. So wurden die Wirkstoffe CLO ( $p = 0,005$ ), TCBZ ( $p = 0,002$ ) und OXC ( $p = 0,011$ ) im Wilcoxon Test vermehrt nach „koproskopischen Untersuchungen“ eingesetzt und IVM ( $p = 0,021$ ) und ABZ ( $p = 0,027$ ) kamen bevorzugt aus Kostengründen zum Einsatz. Weiterhin wurde CLO mit dem Einhalten von Wartezeiten ( $p = 0,035$ ), ABZ mit zusätzlicher Wirksamkeit gegen Leberegel ( $p = 0,047$ ) und FBZ mit einer zuverlässigen Wirksamkeit assoziiert ( $p = 0,002$ ). Nach Bonferroni-Korrektur der p-Werte wegen multiplen Testens sind diese Zusammenhänge jedoch nicht mehr als signifikant anzusehen.

Die meistgenannte Applikationsform war das Pour-on (45 der TÄ) mit insgesamt 96 %.

Zwischen den Tierarten war ein deutlicher statistischer Unterschied bei den Kriterien zur Wahl des geeigneten AH sowie der bevorzugten Applikationsform ersichtlich (p-Wert im Chi-Quadrat-Test jeweils  $< 0,0001$ ): Die „einzuhaltenden Wartezeiten“ variierten zwischen Schaf und Rind mit 5 % und 17 % der Antworten, die Kosten als Kriterium wurden beim Rind doppelt so häufig genannt (7 % resp. 15 %), und die Umweltverträglichkeit und die koproskopische Untersuchung spielten vor allem bei Schafen eine Rolle (15,4 % resp. 0,6 %) sowie (23 % resp. 8 %). Während als bevorzugte Applikationsform für das Schaf mehrheitlich die orale Applikation gewertet wurde (82 %), hielten die betreuenden Rinder-TÄ die Pour-on Applikation bei dieser Tierart für geeigneter (96 %).

Die Frage nach Kriterien zur Entscheidung eine Entwurmung durchzuführen wurde erneut tierart-übergreifend abgefragt: Die vier Antwortmöglichkeiten „Festgelegter Zeitpunkt“ (28 TÄ), „Einzeltier-Symptomatik“ (25 TÄ), „Bestandsproblematik“ (26 TÄ) und „Koproskopische Untersuchung“ (34 TÄ) wurden nahezu gleich häufig genannt. Wurde zudem das Kriterium „koproskopisches Untersuchungsergebnis“ genannt, wurde in 85 % der Fälle ebenfalls angegeben, die gesamte Herde zusammen zu entwurmen, bei Nicht-Nennung nur in 45 %. Wurde der „festgelegte Zeitpunkt“ angegeben, bezog sich dieser in 38 % der Fälle auf die

Entwurmung der gesamten Herde. Insgesamt hielten es 24 TÄ für sinnvoll, die gesamte Herde zusammen zu entwurmen, das entspricht 50 %. Alle Tiere einer Altersgruppe zusammen zu entwurmen hielten 69 % der TÄ für angebracht. Eine Altersgruppe wurde bei existierender Bestandsproblematik in 62 % der Fälle zusammen entwurmt. Im Fisher-Exakt-Test war hier ein statistischer Trend ( $p = 0,083$ ) ersichtlich, der sich jedoch nach Bonferroni-Korrektur aufhebt.

Insgesamt 98 % der TÄ berieten ihre Kunden hinsichtlich der Entwurmung, und 83 % der TÄ hatten mindestens vorwiegend den Eindruck, dass ihre Empfehlung von den Betrieben umgesetzt wurde. Zirka 67 % der TÄ empfahl die parasitologische Untersuchung als Diagnostikum für eine Entwurmung. 18 % gab dagegen an, dass die Tierbesitzer eine Untersuchung in der Regel nicht wünschten. Eine parasitologische Untersuchung zur Kontrolle einer erfolgreichen Entwurmung wurde von 48 % der TÄ „meist nicht“ bzw. „nicht“ durchgeführt. Ein Weidewechsel wird von 58 %, ein jährlicher Wirkstoffwechsel von 45 % und eine Quarantäne zugekaufter Tiere von 75 % der TÄ empfohlen. Den Einfluss der tierärztlichen Empfehlung auf die Entwurmungsentscheidung schätzen 74 % der TÄ zwischen 50 und 100 % ein. Damit decken sich die Antworten zu den beiden Fragestellungen, die die Selbsteinschätzung der TÄ zur Umsetzung von Empfehlungen abfragten, signifikant ( $p = 0,00004$ , Spearman-Korrelation). Die Relevanz des Themas der AR in Schafbetrieben wurde von 60 % der TÄ als „eher relevant“ oder „sehr relevant“, in Rinderbetrieben dagegen von 63 % der TÄ als „eher nicht relevant“ oder „nicht relevant“ eingeschätzt, dieser Unterschied war signifikant ( $p < 0,0001$ , Chi-Quadrat Test). Den eigenen Informationsgrad zum Thema AR empfanden 50 % der TÄ als „ausreichend gut“ und 35 % als „nicht ausreichend“, 15 % nutzten die Kommentarleiste und brachten Zweifel an einem vollständigen Wissensstand zum Ausdruck. Als Hauptinformationsquelle dienten den TÄ vor allem Fortbildungen (50 %); das Internet (31 %), Veröffentlichungen (21 %) und Lehrbücher (20 %) wurden ebenfalls herangezogen. Auf die abschließende Frage, ob mehr Informationen zum Thema Entwurmung gewünscht werden, antworteten 83 % TÄ mit „Ja“ und 15 % mit „Nein“.

### **5.11 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Anthelminthika-Resistenzen der MDS waren in insgesamt zehn der zwölf getesteten Schafbetriebe nachweisbar und dabei weit häufiger als in Rinderbetrieben. Gegenüber FBZ waren 88 % der getesteten Betriebswurmpopulationen, gegenüber IVM 100% resistent. Eine unzureichende Wirkung von MOX wurde dagegen nur in 67 % der beprobten Schafbetriebe beobachtet. Anthelminthika-Resistenzen der MDS lagen in vier der neun teilnehmenden Rinderbetriebe vor. Dabei waren EPR-Resistenzen der MDS in rund 44 % nachweisbar, FBZ-Resistenzen nur in 25 % der Fälle. Das einmalig getestete IVM wies gegenüber MDS eine Resistenz auf. Aus Betriebssammelproben der Rinderbetriebe entwickelte MDS-Larven

wurden zusätzlich *in vitro* auf die Suzeptibilität gegenüber LEV getestet, welche für alle getesteten Betriebe gegeben war. In *Schafbetrieben* wurden am häufigsten *T. circumcincta*, *H. contortus* und *Trichostrongylus spp.* und in *Rinderbetrieben* *O. ostertagi* und *C. oncophora* nachgewiesen. In einzelnen Betrieben waren diese jedoch nicht am häufigsten vorkommend, so wies Rinderbetrieb 3 beispielsweise 79,3 % *B. phlebotomum* auf.

Weiterhin wurden in einer deutschlandweiten Studie Daten zu Anwendungspraktikender AH unter großtierpraktizierenden TÄ erhoben. Hier wurden vor allem tierartspezifische Unterschiede herausgestellt. In *Schafbetrieben* waren dabei MOX und PZQ meisteingesetzt, in *Rinderbetrieben* jedoch IVM und EPR. Zur Entwurmung der Schafe waren orale, für Rinder hingegen Pour-on Applikationsformen der Präparate bevorzugt. Bei der Wahl des geeigneten AH fielen vorherige koproskopische Untersuchungen und die Umweltverträglichkeit für Schafhalter, für Rinderhalter vor allem die geeignete Applikationsform, einzuhaltende Wartezeiten und Behandlungskosten ins Gewicht. Die Relevanz des Themas AR wurde durch schafbetreuende gegenüber rinderbetreuenden TÄ dabei diametral als relevant geltend eingeschätzt und war somit für Erstere eher relevant, für Letztere eher nicht relevant.

## 6 Diskussion

Zur Ermittlung aktueller AR-Prävalenzdaten in Deutschland wurden die Wirksamkeit und der Einsatz häufig angewendeter AH in Schaf- und Rinderbetrieben Nordost-Deutschlands untersucht und die an der Resistenz beteiligten Wurm��pezies in diesen Betrieben identifiziert. Weiterhin wurden Daten zu Anwendungspraktiken der AH unter großtierpraktizierenden TÄ in einer deutschlandweiten Studie erhoben. Anthelminthika-Resistenzen der MDS waren dabei in Schafbetrieben prävalenter als in Rinderbetrieben und nachweisbar für alle eingesetzten Wirkstoffe mit Ausnahme von MON. Aus Betriebssammelproben der Rinderbetriebe entwickelte MDS-Larven wurden zusätzlich *in vitro* auf die Suzeptibilität gegenüber LEV getestet, welche sich für alle getesteten Betriebe als gegeben erwies. In Schafbetrieben wurden am häufigsten *T. circumcincta*, *H. contortus* und *Trichostrongylus spp.* und auf Rinderbetrieben *O. ostertagi* und *C. oncophora* nachgewiesen.

### 6.1 Klinische Feldstudie zur Anthelminthika-Resistenz

#### 6.1.1 Auswahl der Betriebe für den Eizahlreduktionstest

Zur Ermittlung anthelminthischer Resistenzen auf Bestandsebene wurde der EZRT nach den aktuellen Empfehlungen für Schaf- und Rinderbetriebe der COMBAR durchgeführt (Kaplan 2020; Combar-Cost-Action-Ca16230 2021).

Die Anzahl der Tiere pro Testgruppe sollte mindestens 10 betragen. Dies war bis auf einen Betrieb für alle Schaf- und Rinderbetriebe der Fall. In Rinderbetrieb 2 wurde IVM als letzter Wirkstoff angewendet, und der dortige Landwirt hatte die Gesamtanzahl der Jungrinder überschätzt, sodass lediglich 8 Tiere getestet werden konnten. Die Größe der Stichprobe ist ein wichtiger Faktor für die statistische Stärke des Tests (Geurden et al. 2015; Kaplan et al. 2023)

Da Erkrankungen nach GIN-Infektion maßgeblich immunologisch-naive Jungtiere betreffen, wurden lediglich Tiere der ersten und zweiten Weidesaison in die Studie miteinbezogen. Dies konnte für alle Betriebe umgesetzt werden, da dieses Kriterium bereits bei der Suche nach geeigneten Betrieben kommuniziert worden war, und Betriebe ohne ausreichende Anzahl an Jungtieren entsprechend ausgeschlossen wurden.

Die Kotproben wurden nicht pro Betrieb gepoolt, sondern dem Einzeltier zugeordnet und die Eizahl individuell pro Kotprobe ausgewertet, was ebenfalls ein genaueres Messergebnis lieferte (Calvete et Uriarte, 2013).

Die Wahl des AH war bei der Planung der Studie im Voraus festgelegt worden. Dies geschah einerseits, um Daten für Vertreter der wichtigsten Wirkstoffgruppen für jeden Betrieb zu generieren. Die Wartezeit und die Möglichkeit der Anwendung für milchliefernde Tiere spielten

ebenfalls eine Rolle, um Milchbetriebe in die Studie miteinbeziehen zu können. Weiterhin sollte die Dosierung nach Gewicht erfolgen und durch die TÄ durchgeführt werden, um einen adäquaten Wirkstoffspiegel im Tier sicherstellen zu können und damit eine sichere Aussagekraft des EZRT zu erhalten. Aus diesem Grund wurden auch Injektions- und orale Präparate den Aufgussformulierungen vorgezogen, da sie bei korrekter Anwendung die Konzentration des Wirkstoffs im Tierkörper sicherstellen. Bei der topischen Anwendung von AH wurde zuvor die partielle Resorption des Wirkstoffs durch gegenseitiges Belecken der Tiere beschrieben (Bousquet-Mélou et al. 2011). Theoretisch hätten die Behandlungen in der Studie auch ohne TÄ allein durch die Landwirte durchgeführt werden können, wie es in einer weiteren, kürzlich durchgeführten Studie der Fall war (Voigt et al. 2022). Vorteile einer vollständigen Durchführung der Behandlung durch die Landwirte und des postalischen Versands von Sammelkotproben wären ein verringerter Aufwand der Durchführung, die vor Ort gewohnte Wahl und Dosierung der eingesetzten AH und damit realitätsnahe Studienbedingungen sowie eine höhere Rücklaufquote durch die Teilnehmenden zu nennen. Damit fallen jedoch wichtige, zuvor genannte Kontrollmöglichkeiten für die korrekte Durchführung des Tests weg. Auch sollten die richtige Lagerung und der zeitige Transport der Kotproben zur analysierenden Einrichtung sichergestellt sein, da sich die MDS-Eier temperaturabhängig nach 24 Stunden bereits zu Larven entwickeln können. Dieses Vorgehen macht eine sehr gute Aufklärung und ein überdurchschnittliches Engagement der Landwirte notwendig. Für die DAS Analyse der GIN-Spezies, bzw. die ungehinderte Entwicklung der Eier zu Larven, war zudem eine ungekühlte Verarbeitung der Proben am Tag der Probenentnahme notwendig, sodass der Betriebsbesuch für diesen Versuchsteil unerlässlich war. Insgesamt wurde durch die Anwendung der zahlreichen Vorgaben beim EZRT eine Selektion der Betriebe bewirkt, sodass sich das Bestreben der korrekten Durchführung negativ auf die Rücklaufquote und Anzahl der Teilnehmenden ausgewirkt haben dürfte. Zusätzlich ist davon auszugehen, dass die Teilnahmebereitschaft von Betrieben, die bereits ein Problem im Bereich der AR bei sich festgestellt oder dies vermutet hatten, höher war als die anderer Betriebe. Durch die oben beschriebenen Überlegungen zur Durchführung des EZRT und zur Speziesanalyse mittels DAS wurde die Anwesenheit eines TAes im Betrieb notwendig, womit ein erhöhter Arbeitsaufwand verbunden war, welcher sich zusätzlich negativ auf die Betriebsanzahl der Studie ausgewirkt haben wird. Aufgrunddessen waren eine randomisierte Auswahl der Betriebe und das damit repräsentative Studiendesign nicht möglich.

Vorberichtlich sind die MDS-Eizahlen bei adulten Rindern für ein aussagekräftiges Ergebnis des EZRT oft nicht ausreichend (Kaplan 2020). Die durchschnittliche Eizahl für die einzelnen Testgruppen war in der vorliegenden Studie tatsächlich auch bei ausschließlicher Beprobung der prädisponierten Altersgruppe in den Rinderbetrieben sehr niedrig. Lediglich ein Rinderbetrieb (B2) wies eine durchschnittliche EPG nahe der 100 auf (FBZ Gruppe: 86,7 und

IVM Gruppe: 107). Die durchschnittliche EPG aller Schafbetriebe lag bei 74,9 EPG und die der Rinderbetriebe bei 29,3 EPG. Diese speziesabhängigen Infektionsintensitäten waren erwartbar und führten zur Empfehlung sensitiverer Flotationsmethoden zur Bestimmung der EPG von Rinderkotproben (Leveck et al. 2011; Geurden et al. 2015; Kaplan 2020). Dieser Empfehlung wurde durch Verwendung der FLOTAC Methode bei Rindern im Vergleich zur Mini-FLOTAC Methode bei Schafen gefolgt. Tatsächlich wäre es mit der Mini-FLOTAC Methode in der Regel nicht möglich gewesen, in den meisten Betrieben auf 200 gezählte MDS-Eier je Betrieb vor Behandlung zu kommen. Letztlich ist die niedrige Eizahl in den Rinderbetrieben schwerlich auf nur eine Ursache zurückzuführen. Vielmehr spielt auch das individuelle Entwurmungs- und Beweidungsmanagement des Landwirts eine Rolle. Wichtig ist weiterhin das involvierte Speziesspektrum: So sorgen *Haemonchus spp.* in Schafherden für hohe EPGs im Vergleich zu Spezies, die in Rindern parasitieren. Dazu kommen Tierfaktoren wie die Suszeptibilität des Wirts, die Ausbildung von Immunität und Parasitenfaktoren wie die Angepasstheit der GIN-Spezies an den Wirt, das Überleben in der Umwelt und die Möglichkeit der Übertragung als Einflussfaktoren infrage. Auch die Möglichkeit des sicheren Nachweises ist wichtig (Geurden et al. 2015). Für letzteren könnte zum Beispiel die variable Nahrungsdurchfluss- und Kotabsatzmenge bei Rindern eine diskontinuierliche Eiausscheidung hervorrufen, welche auf die nachgewiesene Eizahl in der Probe einen Einfluss haben (Sangster and Dobson 2002). Nicht zuletzt unterliegt die Ausscheidung der GIN-Eier mit den Faezes natürlichen Schwankungen, die zwar geringer sind als die bei anderen Endoparasiten, wie dem großen Leberegel (Kahl et al. 2021), die jedoch mit zu berücksichtigen ist (Sangster and Dobson 2002).

1 % der Schafe und 2,8 % der Rinder waren vor Behandlung negativ. Idealerweise sollten nur positive Tiere in den EZRT inkludiert werden. Um dies zu vermeiden, hätten die Betriebe ein weiteres Mal aufgesucht werden müssen, um zuerst die Eizahlen der Tiere individuell zu bestimmen und sie, basierend auf den Ergebnissen, in hierarischer Abstufung in die Behandlungsgruppen einzuteilen. Dies erwies sich jedoch als inpraktikabel, denn es bedeutete einerseits einen nicht-verhältnismäßigen bzw. nicht durchführbaren Mehraufwand für einige Landwirte, die die fragliche Tiergruppe nicht an drei Tagen einfangen und einen Fangstand bereitstellen konnten (der für die Studie teilweise ausgeliehen werden musste). Andererseits war die dreimalige Anfahrt aus organisatorischer Sicht schwer zu bewältigen, weil die Kultivierung der Proben am Tag der Ausfahrt durchgeführt werden musste und speziell die Isolierung der Eier über den Zuckergradienten zeitaufwendig war. Die Flotationsauswertung mittels Mini-FLOTAC nahm für 60 der Proben zusätzliche 6 - 7 Stunden Zeit in Anspruch, für 40 Proben, die mittels FLOTAC ausgewertet wurden, ca. 5 - 6 Stunden mehr. Wurden weniger als 200 Eier gezählt, mussten die Proben erneut gezählt werden. So stellte es sich als schwierig heraus, die Flotationsergebnisse rechtzeitig für die zweite Ausfahrt auszuwerten.

Die Partizipationsbereitschaft zur Teilnahme an der Studie sank dadurch zusätzlich, sodass diese Vorgehensweise verworfen wurde und die Tiere ohne vorherige Kenntnis der Eizahl auf die Testgruppen verteilt wurden.

### **6.1.2 Ergebnisse der Eizahlreduktionstests von Schafbetrieben**

Insbesondere im EU-weiten Vergleich sind Studien zur AR-Situation in Deutschland rar (Voigt et al. 2022). Die Ergebnisse des EZRT wiesen eine hohe Häufigkeit des Vorkommens von AR in den Schafbetrieben nach. Der Großteil der Betriebe wies Resistenzen gegen FBZ (sieben der acht Schafbetriebe) und IVM in (acht der acht Schafbetriebe) auf. Eine unzureichende Wirkung von MOX wurde in acht der zwölf beprobten Betriebe beobachtet. Fünf dieser Betriebe waren zudem resistent gegenüber aller drei untersuchten Wirkstoffe. MON zeigte in einem multiresistenten Betrieb anschließend noch die volle Wirksamkeit.

Unter den kleinen Wiederkäuern scheint es besonders bei Ziegen zu einer schnellen Entstehung AH-resistenter Wurmpopulationen zu kommen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich Schafe und Ziegen zwar die gleichen Parasiten teilen, Ziegen jedoch einen bedeutend wirksameren Xenobiotika-Stoffwechsel haben. Da i.d.R. Präparate nur für Schafe zugelassen sind und für Ziegen off-label in der Dosierung für Schafe verwendet werden (Brunt et al. 2019), während eigentlich eine 1,5- bis 2-fach höhere Dosierung nötig wäre (Hennessy et al. 1993a; Hennessy et al. 1993b; Escudero et al. 1999; Gokbulut et al. 2014), kommt es im Feld vermutlich oft zu Unterdosierungen bei Ziegen und somit zur Selektion resistenter Parasiten. Das konnte sehr gut an der Entwicklung von MON-Resistenz beobachtet werden, die zunächst in Ziegenbeständen auftrat (Jackson et al. 2012).

Die neueste Erhebung weiterer Resistenz-Daten mittels EZRT, aus dem Zeitraum September 2019 bis Dezember 2020, wies in 52,3 % der Schafbetriebe BZ-Resistenzen nach, auf 60 % Avermectin-Resistenzen und auf 45,3 % MOX-Resistenzen. MON-Resistenzen kamen in 12 % der Schafbetriebe vor (Voigt et al. 2022). Diese Zahlen ergänzen die vorliegende Studie, die die aktuelle Datenlage in Deutschland verbessern soll (Voigt et al. 2022). In ihr wurden die Behandlung und Beprobung durch die Landwirte bzw. Betriebsangehörige durchgeführt. Das für den Betrieb gängige AH, meist ein Aufgusspräparat, wurde ohne vorherige Gewichtsbestimmung eingesetzt, die Proben vor und nach Behandlung anschließend zur Analyse mittels McMaster Flotation versandt (Voigt et al. 2022).

In einem europäischen Review aus dem Jahr 2020 bezifferten die Autoren AR für MDS in Schaf- und Ziegenbetrieben, auf 86 % für BZ-Präparate und 52 % für Avermectin-Vertreter (Rose Vineer et al. 2020). In der aktuellen Studie wiesen die MDS-Populationen gegenüber ML in den Schafbetrieben geringgradig mehr Resistenzen als die BZ auf. Obwohl die Erhebungen nicht direkt auf einzelne Betriebe übertragbar sind, weisen sie tendenziell ein erhöhtes Vorkommen von AR in Deutschland auf, das sich zeitlich betrachtet zu intensivieren

scheint. Auch die Autoren des o.a. Review kamen zu dem Schluss, dass sich das Vorkommen von AR nach vorhandener Datenlage ausgeweitet hat (Rose Vineer et al. 2020). Weitere Studien, die bereits rund 20 Jahre zurückliegen, wiesen schon zu dieser Zeit in 39 % (11 von 28 Betrieben) Resistenzen gegen FBZ auf (Moritz 2005) und in 17 % (9 von 53 Betrieben) Resistenzen gegen MOX (Perbix 2008). Eine direkte Aussage zur Entwicklung der AR in Deutschland ist mit den vorliegenden Daten allerdings nicht möglich. Für eine direkte, zeitliche Übertragbarkeit wäre die erneute Beprobung der Studienbetriebe in der Zukunft interessant, die die weitere Entwicklung nachvollziehbarer machte. Außerhalb Europas werden vermehrt Kombinationspräparate zur wirksamen anthelminthischen Behandlung verwendet, da Monopräparate keinen ausreichenden Behandlungserfolg mehr erzielen können (Lamb et al. 2017). An diesem Punkt scheint die AR in Europa und speziell Deutschland aktuell noch nicht angelangt zu sein, jedoch sind Kombinationspräparate, mit Ausnahme eines MBZ-CLO und eines MOX-TCBZ Präparats, in der Europäischen Union aktuell noch nicht zugelassen. Eine Intensivierung des AR-Vorkommens scheint jedoch auch in Deutschland, parallel zur globalen Entwicklung, wahrscheinlich.

### **6.1.3 Ergebnisse der Eizahlreduktionstests von Rinderbetrieben**

Vorberichtlich sind AR bei den GIN des Rindes weniger verbreitet als bei den GIN von Schafen (Demeler et al. 2009; Sutherland and Leathwick 2011; Geurden et al. 2015; Waghorn et al. 2016). Die Ergebnisse des EZRT aus der vorliegenden Studie zeigten dennoch das Vorkommen von AR auf mehreren Betrieben. So lag in zwei von acht Betrieben eine verminderte Wirksamkeit von FBZ und eine Resistenz von EPR sogar in drei der acht getesteten Betriebe vor. Für das einmalig getestete IVM in Betrieb 2 lag ebenfalls eine Resistenz vor. Die vergleichsweise bessere Wirksamkeit des FBZ in den Rinderbetrieben deckt sich zudem mit der Feststellung, dass Resistenzen gegenüber ML, einschließlich des Milbemycins MOX, die weitaus größere Rolle in Rinderbetrieben spielen (Rose Vineer et al. 2020). Allerdings fehlt auch hier eine umfassende Erhebung von Prävalenzdaten für Deutschland. Die letzte Untersuchung stellte im Jahr 2019 Resistenzen von ML in rund 43 % (6 von 14 Betrieben) der in Schleswig-Holsten untersuchten Rinderbetriebe fest (Schramm 2020). Dieses hohe Vorkommen konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden. Jedoch ist eine direkte Übertragbarkeit auch hier, schon angesichts der unterschiedlichen geographischen Umstände, nicht möglich, sodass es weiterer Bemühungen bedarf, um ein Gesamtbild der AR-Situation in Rinderbetrieben in Deutschland zu erhalten.

Ein möglicher Grund für die im Vergleich zur Situation bei kleinen Wiederkäuern erst später auftretende Resistenzproblematik, könnte die geringere Pathogenität der Rinder-MDS und der damit verbundene weniger intensive Einsatz von AH sein (Sutherland and Leathwick 2011).

## 6.2 Larvenmigrationshemmtest der Schafnematoden

Mithilfe des LMHT wurde der Einfluss von IVM und LEV auf das Motilitätsvermögen von L3 aus Schaf- und Rinderbetrieben *in vitro* ermittelt. Dafür wurde zunächst aus gepoolten Proben der Schafbetriebe eine Larvenkultivierung der Eier zu L3 durchgeführt, welche jedoch nicht die benötigten Larvenzahlen erbrachte und im Verlauf ab Betrieb 7 auf eine Eiaufreinigung über einen Zuckergradienten mit anschließender Inkubation zu L3 umgestellt wurde. Die Eiaufreinigung anhand der neuen Vorgehensweise war in den Betrieben 2, 3 und 5 nachträglich erfolgreich, für Betriebe 1, 4 und 6 jedoch erneut nicht zufriedenstellend, sodass die LMHT nur mit Larven aus sieben der zwölf Betriebe durchgeführt werden konnten.

Grund für die fehlgeschlagene Kultivierung könnten die geringen EPG-Werte in den Betrieben sein. Probleme in der Anzucht der Larven, u.a. aufgrund geringer EPGs in den gewonnenen Proben waren vormalig bereits beschrieben worden (Kleinschmidt 2010). Betrieb 6 wies vor Behandlung ein durchschnittliches EPG von 17 auf. In Betrieb 1 wurde initial zwar ein EPG von 112 ermittelt. Im Rahmen des EZRT wurden jedoch alle Tiere des Betriebs mit MOX behandelt. Bei einem erneuten Besuch 12 Wochen später wurden die Tiere wiederum einzeln auf GIN untersucht, und das durchschnittliche EPG lag nur noch bei 18. Für Schafbetrieb 4 könnte ein möglicher Grund für die zweimalig misslungene Larvengewinnung ein hoher Anteil *Nematodirus* spp. in der Sammelprobe sein, welche sich bis zur L3 innerhalb des Eis entwickeln, und die dafür bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) durchschnittlich 46 Tage (Spannweite von 15 bis 98 Tagen, Median von 42 Tagen) benötigen (Melville et al. 2020), sodass sie beim Ernten der Larven durch Auswanderung aus dem Honigglas nicht miterfasst wurden.

Der LMHT wurde zunächst mit IVM und dem suszeptiblen *H. contortus*-McMaster Isolat bei einer Maschengröße von 25 µm für die Siebeinsätze getestet. Die durchschnittlichen Migrationen der Positivkontrollen von 22,1 % +/- 2,9 % SE wichen konstant von den in der Literatur angegebenen Werten ab, die zwischen 0 - 1,2 % lagen (Demeler et al. 2010b). Die Negativkontroll-Werte lagen bei durchschnittlich 95,9 % +/- 0,8 % SE und wichen damit ebenfalls geringfügig von den publizierten Werten von 96-100 % ab (Demeler et al. 2010a). In der Positivkontrolle wanderten die L3 damit trotz der höchsten IVM-Wirkdosis des Assay von  $5 \times 10^{-4}$  M und ließen somit keine Aussage zum Resistenzverhalten zu.

Ursächlich dafür könnte ein passives Migrieren (Durchfallen) der Larven aufgrund einer ungeeigneten Maschenweite der Siebeinsätze sein. Daher wurden in einem weiteren Versuchsaufbau die Larven zunächst durch Hitzeexposition abgetötet und der LMHT ohne Wirkstoff mit 25 µm Siebeinsätzen durchgeführt. Die passive Wanderungsrate lag bei 2,3 % und war somit nicht primäre Ursache der vermehrten Wanderung durch die Siebeinsätze in der Positivkontrolle.

Da die Verdünnungsreihen mit IVM bereits von unterschiedlichen Autoren validiert wurden und zu reproduzierbaren Ergebnissen in den Publikationen führten (Demeler 2005; Demeler et al. 2010b; Kleinschmidt 2010), stand die fehlerfreie Herstellung der IVM-Verdünnungsreihe im Vordergrund der Fehlersuche. Hierfür wurden alle verwendeten Chemikalien erneut angesetzt und die korrekte Herstellung des Phosphatpuffers und das Ansetzen der Verdünnungsreihe überprüft. Die Verwendung des Phosphatpuffers unterschied sich von vorherigen Versuchsreihen, in denen die Autoren dH<sub>2</sub>O anstelle des Phosphatpuffers verwendet hatten (Demeler 2005; Demeler et al. 2010b; Kleinschmidt 2010). In einem Ringversuch zur Standardisierung des EHT, eines verwendeten Assay, wurde das Leitungswasser als ein störender Einflussfaktor identifiziert (Von Samson-Himmelstjerna et al. 2009). Im Zuge dessen wurde auch für den LMHT der Einsatz von Phosphatpuffer zur Sicherstellung von konstantem pH-Wert und Ionen-Leitfähigkeit im Versuch verwendet (Algusbi 2011).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der LMHT mit dem suszeptiblen *H. contortus*-McMaster Isolat und LEV durchgeführt. Hier waren die Positiv- und Negativkontrollreihen zufriedenstellend, jedoch waren die EC<sub>50</sub> Werte (zwischen 54.000 und 220.000 nM) verglichen mit einer bereits vorhandenen Publikation, die EC<sub>50</sub>-Werte für LEV im Bereich von 293 – 1.117 nM ermittelte (Algusbi 2011), sehr hoch. Das suszeptible Isolat zeigte somit ein gesteigertes Wanderungsverhalten und erlaubte keine reproduzierbare Aussage des Assay.

Für die Standardisierung des Assay wurden drei Faktoren als essentiell beschrieben: Die Maschengröße der verwendeten Siebe, die Kontaktzeit der Larven mit dem Wirkstoff (Inkubationszeit) und die Zeit, welche den Larven zur Migration zur Verfügung steht (Demeler 2005). Diese Faktoren wurden bei der Durchführung eingehalten. Für die Inkubation wurde das Assay allerdings im Dunkeln gelagert und zur Migration der Larven im Hellen (Gill et al. 1991; Demeler 2005). Die im Laufe der vorliegenden Arbeit durchgeführten LMHT wurden sowohl für die Inkubation als auch zur Migration im dunklen Inkubationsschrank gelagert, vor allem um die Temperatur von 20 - 25°C einzuhalten, welche einen weiteren Faktor für die erfolgreiche Durchführung darstellt, da die Migration der Larven mit der Temperatur steigt (Gatongi et al. 2003).

In einer letzten Versuchsreihe wurden L3 der Schafbetriebe zusammen mit den suszeptiblen Referenzisolaten *H. contortus*-McMaster und *T. colubriformis* und unterschiedlichen Siebeinsätzen (25 und 28 µm) ohne Wirkstoff getestet. Hier wiesen die Feldisolate geringere Wanderungsraten im Vergleich zu den Referenzisolaten auf. Hierfür verantwortlich dürfte zum einen das Alter der gewonnenen Feld-L3 sein, da die Durchführung des EZRT und LMHT im Abstand von mehreren Monaten erfolgte. Zumindest wurden die Isolate vor ihrem Einsatz für eine Stunde in einen Baermann-Trichter gegeben und nur die vitalen L3 daraus entnommen. Zum anderen handelt es sich bei den Feldisolaten um GI-Larven unterschiedlicher Spezies, welche in vorangegangenen Assays unterschiedliche Motilitätseigenschaften aufwiesen

(Demeler 2005; Kleinschmidt et al. 2007). *Trichostrongylus* spp. L3 besitzen eine durchschnittliche Länge von 710 µm, wohingegen L3 von *H. contortus* durchschnittlich 730 µm und einen 2,5-fachen Durchmesser auf Höhe der Drittlarven-Bescheidung im Vergleich zu *Trichostrongylus* spp aufweisen. Die L3 von *C. curticei* haben eine durchschnittliche Länge von 780 µm sowie einen 1,5-fachen Durchmesser; die L3 von *C. oncophora* besitzen eine durchschnittliche Länge von 865 µm und einen 2,4-fachen Durchmesser von *Trichostrongylus* spp (Van Wyk and Mayhew 2013). Für Betrieb 3 wurden mikroskopisch vermehrt in den Siebeneinsätzen steckengebliebene L3, vor allem für die Maschenweite 25 µm, beobachtet. Hierfür könnte der Anteil von 44 % *Cooperia* spp. (*C. curticei*, *C. fuelleborni*) verantwortlich sein, welcher mittels *deep amlicon sequencing* identifiziert wurde. Für die unterschiedlichen Isolate wurden ebenfalls voneinander abweichende EC<sub>50</sub>-Werte von *Cooperia* spp. und *Ostertagia* spp. ermittelt (Demeler et al. 2010b).

### 6.3 Larvenmigrationshemmtest der Rindernematoden

Weiterhin wurden LMHT mit den auf Betriebsebene gepoolten Rinder-L3 zur Ermittlung des Resistenzstatus gegenüber LEV durchgeführt. Die Kultivierung der Larven gelang in ausreichendem Maß aus acht der neun Betriebe. Auch hier kann eine geringe Eizahl der Proben von durchschnittlich 8,0 EPG als Ursache für die einmalig nicht gelungene Larvenkultivierung in Betrieb 3 angesehen werden. Je nach gewonnener L3-Anzahl wurden der LMHT bis zu dreimal in doppeltem Ansatz wiederholt, für Betriebe 1 und 5 und 9 waren aufgrund der Larvenzahl lediglich zwei bzw. eine Wiederholung im doppelten Ansatz möglich.

Für das suszeptible Referenzisolat *C. oncophora* wurden mit LEV in den Positiv- und Negativkontrollen reproduzierbare Wanderungsraten von durchschnittlich 0,1 % +/- 0,1 % SE resp. 99,5 % +/- 0,2 % SE erreicht. Damit eignete sich das Isolat als bekannt suszeptible Referenz zur Aussage über den Referenzstatus der Rinder-Feldisolate. Der durchschnittliche EC<sub>50</sub>-Wert für LEV aller LMHT-Wiederholungen für das suszeptible *C. oncophora* Isolat lag bei 7.957 nM (7.368 – 8.593 nM 95 % KI) und der der isolierten MDS-Larven der Rinderbetriebe im Bereich 4.931 und 8.293 nM. Die Werte weichen damit von publizierten Ergebnissen einer vorausgegangenen Studie, die mit suszeptiblen *C. oncophora* und *O. ostertagi* Isolaten durchgeführt wurde, ab. Diese gab EC<sub>50</sub>-Werte für LEV im Bereich von 293 – 1.117 nM an (Algusbi 2011). Da kein direkter Vergleich zu den ermittelten Werten und den vorangegangenen publizierten Werten gezogen werden kann, wurden die Feldisolat Werte mit dem suszeptiblen Referenzisolat verglichen und vergleichbare und niedrigere Werte als suszeptibel angesehen. Zur Ermittlung der Signifikanz zwischen den EC<sub>50</sub>-Werten wurde ein *Extra-sum of square F-test* durchgeführt. Nicht-Signifikanzen wurden für die Betriebe 4, 5 und 6 ermittelt, somit sind die EC<sub>50</sub>-Werte der Betriebe ähnlich suszeptibel wie das bekannt suszeptible Referenzisolat. Entsprechend liegt für die Betriebe 1, 2, 7, 8 und 9 eine Signifikanz vor, die EC<sub>50</sub>-Werte sind

nicht vergleichbar mit dem Referenzisolat und weichen nach unten ab. Somit reagierten die getesteten Isolate sogar empfindlicher als das eingesetzte susceptible Referenzisolat.

Auch hier könnten unterschiedliche Motilitätseigenschaften der verschiedenen gastrointestinalen Spezies von Relevanz sein. Da es sich jedoch um Mischproben handelt, ist es schwer, den Einfluss auf das Wanderungsverhalten auf einzelne Spezies zurückzuführen.

Aus dem gewonnenen Probenmaterial der Feldstudie bei Schaf- und Rinderbetrieben liegen zusätzliche Informationen zur Spezieszusammensetzung pro Betrieb vor, welche mittels DAS analysiert wurden. Bis auf Betrieb 7, der vorwiegend *T. axei* aufwies (63 %) und mit einem EC<sub>50</sub>-Wert von 6.996 nM (6.250 - 7.587 nM) im mittleren Bereich lag, sowie Betrieb 4, der 25 % *O. radiatum* aufwies mit dem EC<sub>50</sub>-Wert 7.419 nM (7.883 - 8.704 nM), besaßen alle weiteren Betriebe im Wesentlichen prozentuale Anteile *O. ostertagi* und *C. oncophora*. Betrieb 1 wies mit dem niedrigsten durchschnittlichen EC<sub>50</sub>-Wert von 4.931 nM (4.147 - 5.862 nM) vorwiegend *C. oncophora* (52 %) und einen geringeren Anteil *O. ostertagi* (38 %) sowie 5 % *H. contortus* auf. Betrieb 2 mit 5.987 (5.375 - 6.669 nM) wies einen noch höheren Anteil *C. oncophora* (75 %) im Vergleich zu *O. ostertagi* (19 %) auf. Allerdings war dies auch der Fall für Betrieb 5 mit dem höchsten durchschnittlichen EC<sub>50</sub>-Wert von 8.293 nM (7.883 - 8.704 nM). 67 % *C. oncophora* und 15 % *O. ostertagi* kamen dort vor, allerdings auch 8 % *C. punctata* und 8 % *T. axei*. In vorangegangenen Studien wurde für *C. oncophora* mit 452 nM (385 - 532 nM) ein niedrigerer EC<sub>50</sub>-Wert ermittelt als für *O. ostertagi* mit 832 nM (710 - 975 nM) (Demeler et al. 2010b). In einer weiteren Studie wurde ebenfalls ein Unterschied zwischen den EC<sub>50</sub>-Werten der susceptible Spezies festgestellt: *C. oncophora* 989 nM (854 - 1144 nM) und *O. ostertagi* 1117 nM (964 - 1295 nM) (Albusbi 2011). Dass Betriebe mit einem hohen *O. ostertagi* Anteil ebenfalls einen höheren EC<sub>50</sub>-Wert hatten, kann mit den vorliegenden Zahlen nicht bestätigt werden. Betrieb 4 mit 58 % *O. ostertagi* und 7.419 nM (6.651 - 8.276 nM) sowie Betrieb 9 mit 50 % *O. ostertagi* und 6.245 nM (5.651 - 6.902 nM) wiesen keine nennenswert höheren EC<sub>50</sub>-Werte gegenüber den weiteren Betrieben auf. Für den deutlichen reproduzierbaren Unterschied zwischen den aktuell erhobenen und den vorpublizierten Daten konnte, trotz akurater Durchführung des Assay, keine einzelne Ursache ausgemacht werden. Vielmehr kommen die gleichen Überlegungen, wie bereits für die Schaf-LMHT diskutiert, für die abweichenden Ergebnisse in Betracht. In der Literatur wird die Reproduzierbarkeit des LMHT, im Gegensatz zu anderen *in vitro* Tests wie dem LDA, angezweifelt (George et al. 2018). Aufgrund der vergleichbaren Werte zum gegenüber LEV bekannt susceptible *C. oncophora* Referenzisolats und der guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse über die Versuchsdurchläufe hinweg wird dennoch von einer Suszeptibilität aller Feldisolate gegenüber LEV ausgegangen.

#### **6.4 Deep amplicon sequencing gastrointestinaler Nematoden Spezies**

Das Larvenprobenmaterial der Feldstudie über Schaf- und Rinderbetriebe wurde zur Ermittlung der Spezieszusammensetzung pro Betrieb erhoben, welche mittels DAS analysiert wurden.

Die Autoren der „Nemabiome“ Studien, nach deren Vorbild die Speziessequenzierung durchgeführt wurde, wählten die unterschiedlichen Larvenstadien L1 und L3 für Schaf- bzw. Rindernematoden (Avramenko et al. 2015; Redman et al. 2019). Die Wahl der unterschiedlichen Larvenstadien wird dabei als vernachlässigbar eingestuft und die unterschiedliche Vorgehensweise damit begründet, dass in der Regel unterschiedlich hohe durchschnittliche EPG für MDS von Rind und Schaf erreicht werden, sodass die L3 Larvenkultivierung für Rinderspezies mit niedrigeren EPG weniger Arbeitskraft benötigt und die L1 Eisolierung für Schafspezies aufgrund höherer EPG einfacher durchzuführen ist (Redman et al. 2019). Für die Verwendung von L1 für Schafnematoden und L3 für Rindernematoden stehen zudem Korrekturfaktoren zur Verfügung, welche die prozentualen Anteile der Spezies nach der Sequenzierung bereinigen (Avramenko et al. 2015; Workentine et al. 2020). Da Rinder meist geringere Wurmeizahlen aufweisen als Schafe, kultivieren die Autoren die Larven bevorzugt in Larvenkulturen, die eine höhere Larvenausbeute erlauben. Bei der Verwendung von L1 werden innerhalb der Eisolierung nur ca. 30 -40 % der tatsächlich im Kot enthaltenen Eier gewonnen, sie bietet jedoch den Vorteil, dass die L1 bereits nach 48 Stunden zur Verfügung stehen (Avramenko et al. 2015).

Allerdings können durch die Aufreinigung und Anzucht der Eier zu Larven durchaus Veränderungen der prozentualen Verteilung auftreten, wie bereits durch das Ausscheiden der *Nematodirus*-Eier demonstriert wurde. Eine optimale Entwicklung der Eier zur L3 in Bezug auf Temperatur und Feuchtigkeit ist für die einzelnen Spezies verschieden (Roeber and Kahn 2014). Da die Larvenkulturen zwischen 20-25 °C und 80 % Luftfeuchtigkeit inkubiert wurden, könnte dies zu einer verbesserten Entwicklung von *T. circumcincta* und *T. colubriformis* Eiern im Vergleich zu *H. contortus* geführt haben. Die Rindernematoden *O. ostertagi* und *C. oncophora* sind auf höhere Feuchtigkeitslevel für eine optimale Entwicklung angewiesen als bspw. *T. vitrinus* (Rossanigo and Gruner 1995; Roeber and Kahn 2014). Idealerweise sollte die Speziessequenzierung mit isolierten GIN-Eiern durchgeführt werden, um die Variabilität bei der Larvenentwicklung zu umgehen. Allerdings stehen hierfür aktuell noch keine Korrekturfaktoren zur Verfügung. Der größte Vorteil der DAS Speziesanalyse im Vergleich zu Verfahren der real-time PCR sind die Möglichkeit der Analyse von GIN auf Spezieslevel und die nicht mehr erforderlichen speziesspezifischen Primersequenzen für die Analyse. Selbst bei einem vergleichsweise großen Probenaufkommen kann die Speziesdifferenzierung innerhalb eines Sequenzierdurchlaufs erfolgen (Metzker 2010). Die Kosten einer Sequenzierung sind aktuell sehr hoch, sinken jedoch bei vermehrtem Probenaufkommen, da viele Proben in nur

einem Sequenzierdurchlauf analysiert werden können (Metzker 2010). Für die anschließende biostatistische Auswertung wird zudem spezialisiertes Personal benötigt.

Aktuell existieren nur wenige Daten zum Vorkommen von GIN-Spezies in Deutschland. Das Vorliegen von Daten der Speziesdifferenzierung in Kombination mit Resistenzdaten ist gleichfalls begrenzt.

Aus den Vorbehandlungsproben der Schafbetriebe liegen 11 Datensätze (außer Betrieb 6) vor. In den Betrieben waren *T. circumcincta*, *H. contortus* und *Trichostrongylus* spp. am prävalentesten. Interessanterweise fanden sich die Dickdarmparasiten *C. ovina* und *O. venulosum* jeweils in über der Hälfte der Betriebe und waren damit deutlich häufiger aufzufinden als *Cooperia* spp. (33 %).

*Nematodirus* spp. konnten nur für vier Betriebe nachgewiesen werden. Dieser niedrige Nachweis von *Nematodirus* spp. könnte allerdings mit der Prozessierung der Poolproben zusammenhängen. Bei der Larvengewinnung der L1 für die Schafbetriebe wurden die *Nematodirus*-Eier, welche sich bis zur L3 innerhalb des Eis entwickeln und für das Schlüpfen teils auf einen Kältereiz angewiesen sind, nicht miterfasst. Bei der Anzucht der L3 in Larvenkulturen für die Rinderbetriebe kam der längere Entwicklungszyklus der *Nematodirus*-Larve zum Tragen, welcher innerhalb des Eis bis zum Erreichen des L3-Stadiums bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) durchschnittlich 46 Tage (Spannweite von 15 bis 98 Tagen, Median von 42 Tagen) benötigt (Melville et al. 2020). Dies könnte der Grund für den geringen Nachweis mittels DAS sein. In Schafbetrieb 4 und Rinderbetrieb 6 konnten mikroskopisch zudem eine ausreichende Menge *Nematodirus*-Eier identifiziert werden, um einen eigenständigen EZRT mit *Nematodirus* spp. In diesen Betrieben durchzuführen. Da für *Nematodirus* spp. EPG nach Behandlung vorliegen, kann eine Aussage zum Resistenzstatus somit unabhängig von der molekularbiologischen Differenzierung erfolgen, muss aber bei der Interpretation der Daten mitberücksichtigt werden. So dürfte der Anteil der *Nematodirus* spp. auch in den Schafbetrieben 1, 2 und 8 und den Rinderbetrieben 1 und 5 falsch niedrig sein.

In der letzten Erhebung von AR in deutschen Schafbetrieben fand zur Speziesdifferenzierung eine Einteilung in *H. contortus* und übrige „Nicht-*Haemonchus*“ Spezies nach Fluorescein-Isothiocyanat Anfärbung der Eier statt (Voigt et al. 2022). *Haemonchus contortus* konnte dabei in Nachbehandlungsproben aller beprobten Anthelminthikaklassen nachgewiesen werden, während die „Nicht-*Haemonchus*“ Spezies vorwiegend nach einer Behandlung mit einem MBZ-CLO Präparat überlebten.

In vorherigen Untersuchungen von 53 Schafbetrieben, in denen EZRT mit MOX durchgeführt wurden, konnte mit acht von 53 Betrieben, die sämtlich gegenüber MOX suszeptibel waren, eine real-time PCR zum Nachweis vier verschiedener GIN (*Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Ostertagia* spp. und *Cooperia* spp.) auf Gattungslevel vorgenommen

werden (Perbix 2008). *Haemonchus* spp. und *Cooperia* spp. waren am häufigsten vertreten. *Haemonchus* spp. und *Cooperia* spp. (Pfüller 1990; Dorn 1997) sowie *Teladorsagia* spp. und *Trichostrongylus* spp. (Hertzberg and Bauer 2000) wurden in Deutschland bereits als prävalenteste Vertreter der GIN beschrieben.

Die weitere Aufteilung der involvierten Spezies ist relevant, da sich diese sich in Punkten wie Pathogenität, klinischer Symptomatik, Epidemiologie und Arzneimittelresistenz unterscheiden können (Besier et al., 2016; Redman et al., 2019). Zudem ermöglicht die Kombination von EZRT und DAS-Daten eine höhere Genauigkeit und Interpretierbarkeit von Ergebnissen zur Arzneimittelresistenz in den Betrieben (Kotze et al., 2020). Da die Daten Informationen zum Vorkommen der GIN auf Spezieslevel liefern, sind sie zudem erstmalig in dieser Form für deutsche Betriebe verfügbar.

Nach Behandlung lagen neun L1-Proben aus vier Schafbetrieben vor. In das Resistenzgeschehen dieser Betriebe waren bei allen *T. circumcincta* und *T. colubriformis* sowie auf drei der Betriebe *H. contortus* involviert. Diese Häufigkeiten ähneln Untersuchungen aus Kanada, wo *H. contortus* zwar die häufigste gefundene Spezies war, aber darauf bereits *T. circumcincta* und *T. colubriformis* folgten (Queiroz et al. 2020). Die erfolgreiche Ausbreitung von *H. contortus* in der nördlichen Hemisphäre wird von den Autoren auf das Überleben durch Hypobiose im Wirtstier während kälterer Temperaturen zurückgeführt. Zuletzt wurde in Deutschland ein Anteil von 38,9 % *H. contortus* in Sammelproben auf 223 Schafbetrieben mittels McMaster Flotation und Speziesdifferenzierung durch Fluorescein-Isothiocyant-Anfärbung nach Behandlung festgestellt (Voigt et al. 2022). Anders als in Kanada erwiesen sich in der vorliegenden Studie *T. circumcincta* und *T. colubriformis* in gleicher Weise FBZ- und IVM-resistent wie *H. contortus* (Queiroz et al. 2020). Auch wurden nach Behandlung zwei MOX-resistente Spezies detektiert, nämlich *H. contortus* und *T. circumcincta*, welche in Kanada nach MOX-Behandlung erfolgreich eliminiert werden konnten (Queiroz et al. 2020).

*Trichostrongylus colubriformis* und *T. vitrinus* wurden nach MOX-Behandlung zwar eliminiert, überlebten aber ebenfalls größtenteils nach FBZ und IVM-Behandlung. Auf Betrieb 9 fanden sich vor Behandlung geringe Anteile von *C. curticei* und *C. fuelleborni*, die nach IVM und FBZ-Behandlung erhalten blieben. *O. venulosum* blieb nach FBZ-Behandlung erhalten, nicht jedoch nach IVM Behandlung. *Trichostrongylus axei* blieb in diesem Betrieb ebenfalls vorhanden, war allerdings in Schafbetrieb 7 vollständig eliminiert. Bei diesen Spezies kann ein gewisses Maß an Resistenz vorausgesetzt werden. Dies deckt sich mit weiteren Studien aus dem Vereinigten Königreich, welche ebenfalls eine Beteiligung weiterer GIN-Spezies am Resistenzgeschehen in geringerem Maß feststellten (Mcintyre et al. 2018). Das Vorkommen von *C. ovina* reduzierte sich in allen Nachbehandlungsproben auf 0 %.

Bei einer Reduzierung aller GIN nach Behandlung im gleichen Maße kann dies entweder für eine Resistenz aller beteiligten Spezies sprechen oder auf einen Behandlungsmisserfolg, z.B. durch eine Unterdosierung, hindeuten (Kotze et al. 2020). Durch die Befolgung der vorgeschriebenen Maßnahmen zur korrekten Dosierung der Medikamente nach Gewicht und oraler oder subkutaner Applikation kann Letzteres bei der Interpretation der Ergebnisse in diesem Fall allerdings ausgeschlossen werden.

Von den Rinderbetrieben liegen 9 Datensätze vor Behandlung vor. Hier waren *O. ostertagi* und *C. oncophora* erwartungsgemäß die häufigsten Erreger. Diese, sowie die weiteren in den Betrieben vorkommenden Spezies *C. punctata*, *O. radiatum*, *T. axei*, *O. venulosum*, *B. phlebotomum*, *H. contortus*, *O. leptospicularis*, *C. ovina* und *T. colubriformis* waren allesamt suszeptibel gegenüber der FBZ- und EPR-Behandlungen. Überraschend war jedoch das hohe Vorkommen von Hakenwürmern *B. phlebotomum* mit rund 80 %, welche in Betrieb 3 nachgewiesen wurden. Dies war einer der drei Betriebe mit verminderter Effektivität von EPR nach EZRT (EZR: 88,7 %, KI: 80,2 - 94,1 %). Aufgrund geringer EZ in den Proben gelang für diesen Betrieb jedoch keine Anzucht der Larven nach Behandlung. Die Überprüfung einer Beteiligung von *B. phlebotomum* an dem vorliegenden Resistenzgeschehen wäre interessant, ist aber jedoch eher als unwahrscheinlich anzunehmen. Eher kommen die weiteren 15 % *C. oncophora* und 5 % *O. ostertagi* als resistente Populationen für diesen Betrieb in Betracht, denn gerade Erstere wurden häufiger als prädominierende Spezies nach Behandlung in Rinderbetrieben angetroffen (Waghorn et al. 2006; Demeler et al. 2009; El-Abdellati et al. 2010; Geurden et al. 2015). Grund hierfür ist u.a. die Dosis limitierende (engl. „dose-limiting“) Eigenschaft von *C. oncophora*, welche bei der Entwurmung beachtet werden muss (Geurden et al. 2015; Verschave et al. 2016). Mit dieser Spezies wird im Vergleich zu *O. ostertagi* jedoch eine geringere Pathogenität assoziiert (Coop et al. 1979).

## 6.5 Fragebogen Schaf- und Rinderbetriebe

Neben dem EZRT wurde ein begleitender Fragebogen durch die Landwirte der betroffenen Betriebe ausgefüllt, der die Untersuchung des Vorhandenseins von Risikofaktoren für die Entstehung von AR und einer hohen Prävalenz der GIN ermöglichen sollte. Der Besuch der Betriebe bot in diesem Kontext den Vorteil, das individuelle Management der Landwirte besser beurteilen und die Vor-Ort Situation mit den Landwirten evaluieren zu können. Zudem belief sich durch das Ausfüllen des Fragebogens in Präsenz der TÄ die Rücklaufquote auf 100 %.

Zur Entstehung der AR zählen Risikofaktoren, die grob den drei Haupteinflussgrößen Wirt, Parasit und Umwelt zugeordnet werden. Der Fragebogen zielte auf die Umwelt als Stellgröße ab. Da sich die Entwicklung von AR selten durch nur eine Ursache erklären lässt, sondern es sich in der Regel um ein multifaktorielles Geschehen handelt, sollen im Folgenden die wichtigsten vermuteten Risikofaktoren näher betrachtet werden und eine Gewichtung für die

Schaf- und Rinderbetriebe erfolgen. Die nachfolgenden Aspekte sollen dabei in Bezug auf die Entstehung der AR und eine hohe Prävalenz von GIN, entsprechend eines hohen nachgewiesenen EPG im Betrieb, diskutiert werden.

### **6.5.1 Weitere Tierspezies des Betriebes, Nachweiden der Schafe auf Rinderweiden**

Das Zusammenleben von Rindern und Schafen wird in der Literatur widersprüchlich mal als Risikofaktor, mal auch als protektive Maßnahme zum Schutz vor der Entstehung von AR beschrieben (Falzon et al. 2014). Zwei Schafbetriebe (B3, B12) hielten zusätzlich Ziegen, ein Betrieb Rinder (B3). Schafbetrieb 3 wies Resistenzen gegenüber der 3 eingesetzten Wirkstoffe auf, besaß aber ein niedriges durchschnittliches EPG von 9,5. Die häufigsten Spezies auf Schafbetrieb 3 waren *H. contortus*, *C. curticei* und *C. fuelleborni*, welche typischerweise Schafe infizieren. Schafbetrieb 12 wies keine MOX-Resistenz auf, die weiteren Wirkstoffe wurden nicht getestet. Das durchschnittliche EPG lag bei 139,7. In Schafbetrieb 12 kamen *C. ovina*, *T. colubriformis*, *T. vitrinus* und *T. axei* am häufigsten vor, wovon letztgenannter gleichfalls Rinder infiziert. Schafbetrieb 12 gab zudem als einziger an, die Schafe zum Nachweiden auf Rinderweiden zu halten.

Ein Rinderbetrieb (Betrieb 1) gab an, Schafe und Ziegen sowie ein weiterer (Betrieb 8), Pferde zu besitzen. In Rinderbetrieb 1 waren das eingesetzte FBZ und EPR wirksam. In Rinderbetrieb 8 wurden FBZ als suszeptibel und EPR beginnend resistent gegenüber den dortigen MDS eingestuft. Die EPG lagen bei 13 resp. 46, und die dort dominierenden Spezies waren *O. ostertagi* und *C. oncophora*. Hier konnte kein Zusammenhang zwischen der Infektionsintensität, dem Resistenzlevel und dem Zusammenleben weiterer Tierarten beobachtet werden.

Grundsätzlich ist ein Übertragungsrisiko von resistenten Wurmpopulationen bei gleichzeitigem Weiden oder bei der Nachweidung mehrerer Wiederkäuer-Spezies denkbar und wurde mehrfach als Risikofaktor identifiziert (Suter et al. 2004; Lawrence et al. 2006; Hughes et al. 2007). In einer weiteren Studie jedoch bewirkte die Nachweidung von Rindern auf Schafweiden über sechs Wochen eine hochgradige Reduktion von *H. contortus* und *T. colubriformis*; allerdings konnten posthum vermehrt Infektionen der Rinder mit diesen beiden Parasiten nachgewiesen werden. Bei der Nachweidung von Schafen auf Rinderweiden war ebenfalls eine Reduktion von *O. ostertagi* und *C. oncophora* ersichtlich, allerdings erst nach mindestens 24 Wochen (Southcott and Barger 1975).

Ein Risiko bei der gemeinsamen Haltung von Schafen und Ziegen besteht im häufigerem Auftreten resistenter Wurmpopulationen bei letzteren, welche durch Unterdosierung von Ziegen aufgrund eines höheren Xenobiotika-Stoffwechsel bei gleicher Medikamentendosierung hervorgerufen werden kann (Hennessy et al. 1993a; Hennessy et al.

1993b; Escudero et al. 1999; Gokbulut et al. 2014). Inzwischen ist ein EPR-haltiges Präparat in Deutschland allerdings auch für Ziegen zugelassen und muss nicht mehr umgewidmet werden, hierfür liegen ebenfalls bereits Resistenzdaten aus Österreich vor (Hinney et al. 2022).

Die vier betroffenen Betriebe weisen keinen relevanten Unterschied in der Infektionsintensität oder Vorkommen von AR gegenüber den anderen Schaf- und Rinderbetrieben auf. Das Vorkommen von *T. axei* in Schafbetrieb 12 könnte auf einen Zusammenhang mit der Nachweidung auf Rinderweiden hindeuten.

### **6.5.2 Ausübung des Berufs als Hauptberuf, Nebenerwerb oder Hobby**

Alle Rinderbetriebe waren die Haupteinkommensquelle der jeweiligen Landwirte. In den Schafbetrieben war dies nur bei fünf Landwirten der Fall, weitere sieben übten die Schafhaltung als Nebentätigkeit oder hobbyhaltend aus.

Bei wirtschaftlich fokussierten Betrieben kann von einer negativen Bewertung eines nachhaltigen Entwurmungsmanagements ausgegangen werden, wenn dieses mit einer weniger intensiven und kosteneffizienten Tierhaltung einhergeht. Äußere, wirtschaftliche Faktoren, wie der Marktpreis von Medikamenten und Tieren, und die Marktnachfrage spielen eine wichtige Rolle und beeinflussen wesentlich das Entscheidungsverhalten (Vande Velde et al. 2018b). Dabei gibt es unterschiedliche Motivatoren, denn interessanterweise sind Management-Entscheidungen wie die AH-Behandlung vorwiegend kostenmotiviert. Die Entscheidung, mehr Diagnostik im Betrieb durchzuführen, wird eher als moralisch-motiviert verortet (Vande Velde et al. 2018a). Für Nebenerwebs- und Hobbyhaltungen stehen monetäre Belange weniger im Vordergrund und könnten daher eine höhere intrinsische Motivation für die Entscheidungsfindung im Entwurmungsmanagement der LW fördern. Jedoch bergen kleine Tierhaltungen das Risiko eines uninformaten Entscheidungsverhaltens aufgrund mangelnder wirtschaftlicher Konsequenz und Kontrollen. Für professionalisierte Tierhaltungen würde sich ab einer gewissen Größe die Implementierung eines Managementsystems lohnen, welches in jedem Fall ein wichtiger Einflussparameter zur Erkennung und Minimierung von AR auf dem Betrieb wäre. Allerdings wurde bei keinem der teilnehmenden Betriebe ein solches System angewendet.

### **6.5.3 Haltungsform und Besatzdichte**

Für den Infektionsdruck bei der Weidehaltung ist die Besatzdichte der Tiere wichtig. Die meisten Schafrassen weiden zwar gedrängt in einer Herdenformation (Ausnahme sind Texelschafe, die mit hohem Individualabstand weiden und so speziell für die flächige Beweidung von Deichen zum Einsatz kommen), allerdings sinkt bei höherer Tierdichte der Abstand zwischen Weide- und Defäkationsbereichen. Die Verteilung der geschlüpften GIN-

Larven erfolgt dabei aktiv (Migration) und passiv (z.B. Versprenklung durch Regentropfen oder Klauen) in die Umgebung (Rose et al. 2015; Knapp-Lawitzke 2016).

Aufgrund einer wirtschaftlichen Fokussierung ist anzunehmen, dass die Bereitstellung von  $m^2$  Fläche für Tiere in Haupterwerbs-Tierhaltungen geringer ausfällt als in Hobbyhaltungen. In den erhobenen Daten wiesen nebenerwerbstätige Schafbetriebe jedoch eine geringere Weidefläche von durchschnittlich 0,1302 ha pro Tier gegenüber den vorhandenen Daten der haupterwerblichen Schafbetriebe auf, wo pro Tier durchschnittlich 0,1601 ha zur Verfügung standen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Betrieb 11 vermutlich nicht die Gesamthektarzahl, sondern das abgesteckte Weidestück als Gesamtfläche angegeben hat. Wird dieses nicht miteinberechnet, ergeben sich durchschnittlich 0,1511 ha, welche jedem Tier in nebenerwerbstätigen Schafbetrieben zur Verfügung standen. Betrieb 12 weist mit 0,2943 ha pro Tier eine der niedrigeren Besatzdichten, jedoch ein hohes durchschnittliches EPG von 139,7 auf. Die Betriebe 2 (0,2889 ha/Tier) und 4 (0,2833 ha/Tier) wiesen die niedrigsten Besatzdichten auf. In ihnen wurden jeweils Resistenzen der MDS gegenüber aller eingesetzten AH-Wirkstoffe nachgewiesen. Für die Betriebe 3 und 5 liegen keine Daten vor. Auch in den Rinderbetrieben korreliert die Besatzdichte nicht mit EPG oder nachgewiesenen Resistenzen: In Betrieb 6, welcher pro Tier die höchste Besatzdichte mit einer Fläche von 0,0118 ha aufwies, wurden keine Resistenzen der MDS gegenüber der eingesetzten AH nachgewiesen; das durchschnittliche EPG von 34 gehörte zu den drei höchsten. In Betrieben 3 und 4, wo jeweils Resistenzen bei MDS gegenüber beiden AH festgestellt wurden, waren mittlere bis niedrige Besatzdichten von 0,06 ha resp. 0,32 ha vorhanden und die durchschnittlichen EPG mit 8 und 10,9 niedrig.

Für das nachhaltige Entwurmungsmanagement sind zudem Weidemanagement-Strategien entscheidend. Dazu gehört neben der Besatzdichte der Weide eine systematische Rotation der Weideflächen. Für den Infektionsdruck auf der Weide sind folgende Haltungsformen in absteigender Reihenfolge nach verfügbarem Platz für das Einzeltier prädisponierend: Standweide und Koppelschafhaltung, offene Stallhaltung, Portionsweide, Umtriebsweide, Hütehaltung, Deichschäferei und Wanderschäferei. Bei letzterer steht den Tieren mutmaßlich am meisten Fläche zur Verfügung. Dazu kommt eine „automatische“ Weideruhe durch die Wanderung zustande.

Der häufige Weidewechsel, bzw. eine Rotation der Abschnitte, erfordert in der Regel mehr Personal und Arbeitszeit für das Umsetzen der Herde und Installieren der Zäune. Auch das Bereitstellen von mehr  $qm$  Fläche pro Tier stellt einen negativen Kostenpunkt dar und ist nicht jedem Betrieb möglich (Vande Velde et al. 2018b). Daher ist das Weidemanagement zwar ein wichtiges Instrument für die AR-Prävention, allerdings auch mit höherem Einsatz von Ressourcen verbunden. Da in der Umfrage jedoch eine Mehrfachauswahl an Haltungsformen

möglich war, ist eine reelle Unterscheidung der Weideformen und eine Aussage über die Besatzdichte auf Grundlage der Angaben des Fragebogens nicht möglich.

Bei den Rinderhaltungen war die Mutterkuhhaltung meistgenannt (sechsmal), gefolgt von der Fleisch- und Milchproduktion. In der Literatur wird für die extensive Haltung und Aufzucht der Kälber zusammen mit den Muttertieren ein moderater, konstanter Infektionsdruck beschrieben, bei dem die Adulten durch das Gras einen „Verdünnungseffekt“ auf die aufgenommene Wurmbürde der Kälber haben (Coles 2002). Einige Autoren sehen sogar von der Behandlung der Kälber im ersten Weidejahr bei extensiver Aufzucht ab, sofern Lungenwürmer nicht am Infektionsgeschehen beteiligt sind (O'shaughnessy et al. 2014). Für die Ausbildung der Immunität der Jungtiere ist die Mutterkuhhaltung gut geeignet, da diese eine konstant niedrige Menge an GIN-Eiern ausscheiden, die von den Kälbern nach und nach aufgenommen wird. Ein Zusammenhang zwischen Mutterkuhhaltung mit dem Vorkommen von AR liegt in den Rinderbetrieben nicht vor. Jedoch war das durchschnittliche EPG in den Rinderbetrieben mit Mutterkuhhaltung (Betriebe 1, 4, 5, 7, 8 und 9) mit 19,8 niedriger als in den drei weiteren Betrieben 2, 3 und 6 mit 45,4 EPG.

#### **6.5.4 Schafrassen und Nutzungsrichtungen**

Im Bereich der Schaf- und Rinderzucht gibt es vermehrt Ansätze, die auf eine Selektion hin zu resistenteren (keine Infektion) oder resilienteren (Toleranz einer Infektion) Rassen abzielen. Resistenzmerkmale scheinen dabei eine größere vererbliche Basis zu besitzen als Resilienzmerkmale (Bisset et al. 2001). Zwischen einigen Schafrassen wurden Unterschiede in der Empfänglichkeit gegenüber GIN-Spezies festgestellt, die aufsteigend an Suszeptibilität zunehmen: Red Masai, Persicher Schwarzkopf, Merino, Dorper, Corriedale und Hampshire (Preston and Allonby 1979). In der Studie verstarben alle Hampshire-Schafe innerhalb von 26 Wochen nach der Exposition mit *H. contortus*. Bei den weiteren Schafrassen gab es sporadische Todesfälle, bis auf die Red Masai, welche am wenigsten empfänglich gegenüber der Infektion mit GIN waren. In der vorliegenden Studie wurden in einem Betrieb (Betrieb 4) ausschließlich Merinolandschafe (MLS) gehalten. Hier wiesen die involvierten MDS Spezies Resistenzen gegenüber FBZ, IVM und MOX auf. Von den multiresistenten Betrieben hielten zwei Schwarzköpfige Fleischschafe (SKF) bzw. SKF-Kreuzungen, eine Rasse, die ursprünglich aus der Einkreuzung von Hampshire- und Oxfordshires mit heimischen Rassen zur Verbesserung der Gewichtszunahmen bei der Fleischgewinnung entstand. Die bisherigen Ansätze vermehrter Selektion auf hereditäre Infektionsresistenz gegenüber Wurminfektionen der Rassen scheinen sich allerdings eher negativ auf wünschenswerte Eigenschaften, wie Gewichtszunahmen und Milchproduktion, auszuwirken (Pollott and Greeff 2004). Es bedarf daher weiterer Bemühungen, welche die Co-Selektion von Produktionsleistung und Infektionsresistenz ins Auge fassen (Pollott and Greeff 2004). Bei den weiteren Schafrassen

Bentheimer Landschaf, Rauwolliges Pommersches Landschaf und Skudden, die in der Studie auf mindestens zwei Betrieben involviert waren, handelt es sich um robuste Rassen, die weniger zur maximierten Fleischgewinnung, als vermehrt zur Landschaftspflege und historisch der Wollproduktion dienten. In vier Betrieben, war MOX wirksam gegenüber der dortigen Wurmspezies: In Betrieb 6 wurden ausschließlich Rauwollige Pommersche Landschaften, in Betrieb 9 vor allem SKF und Suffolk und in Betrieb 11 Coburger Fuchsschafe, Suffolk und Bergschafe verschiedener Rassen zusammengehalten.

Bisher basiert die Resistenzzucht vorwiegend auf dem Monitoring der Wurmeiausscheidung. Eine Alternative dazu könnte die Messung der wurmspezifischen IgA aus Speichelproben der Tiere darstellen (Gilleard et al. 2021). Ein Großteil der Schafbetriebe gaben Fleischproduktion und Landschaftspflege bei der Nutzungsrichtung an. Bei Fokus auf Fleischproduktion wird über eine erhöhte Behandlungsfrequenz mit AH berichtet, da diese zu verbesserten Gewichtszunahmen führt (Borges et al. 2013). Bei Fleischrindern wurde aufgrund der Behandlungsfrequenz bereits über ein vermehrtes Resistenzgeschehen im Vergleich zu Milchrindern berichtet (El-Abdellati et al. 2010). Damit unterscheidet sich die AH-Nutzung für verschiedene Nutzungsrichtungen, und es ist nicht die Spezialisierung auf Fleisch- oder Milchproduktionsrassen Grund für die AR-Entwicklung. In den Rinderbetrieben wurden folgende Rassen mehr als einmal gehalten: Dreimal Uckermärker, zweimal Angus und zweimal Holstein-Frisian Rinder. Betriebe 1, 4 und 5 hielten vorwiegend Uckermärker Rinder, davon waren in Betrieb 1 und 5 keine Resistenzen und in Betrieb 4 zweifach Resistenzen der MDS nachweisbar. In den Betrieben 2 und 7, welche Angus Rinder hielten, wurden einmal FBZ-suszeptible und IVM-resistente sowie FBZ und EPR als wirksam ermittelt. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem Resistenzgeschehen in den jeweiligen Betrieben und den gehaltenen Schaf- bzw. Rinderrassen festgestellt werden.

### **6.5.5 Zukäufe und Quarantänemanagement**

Ein wichtiger Risikofaktor für die Verbreitung der AR stellen Zukäufe und ein mangelhaftes bzw. fehlendes Quarantänemanagement dar. Mit der Häufigkeit zugekaufter Tiere steigt das Risiko der Einschleppung resistenter Wurmpopulationen aus anderen Herden. Dem kann durch die konsequente Separation der Tiere und Entwurmung entgegengewirkt werden. Neun der Betriebe kauften ausschließlich Böcke zu und einer, Betrieb 11, Tiere beider Geschlechter. Nur zwei Betriebe (Betriebe 7 und 12) kauften keine Tiere zu. In beiden war ein hohes durchschnittliches EPG von 185 resp. 139,7 EPG nachweisbar, in ersterem wurden AR der eingesetzten AH nachgewiesen, in letzterem waren die dortigen MDS suszeptibel gegenüber MOX. Zwei Betriebe (Betriebe 6 und 8) separierten zugekaufte Tiere zunächst nicht von der restlichen Herde. Sie wiesen niedrige durchschnittliche EPG von 17 und 23,2 auf, AR der MDS waren in Betrieb 6 gegenüber IVM und in Betrieb 8 gegenüber MOX nachweisbar. Insgesamt

entwurmten vier Betriebe (Betriebe 2, 3, 8 und 11) zugekaufte Tiere nicht vor der Zusammenführung. Abgesehen von Betrieb 11 (192,1 EPG) wiesen diese moderate EPGs < 100 auf und waren gegenüber allen getesteten AH resistent.

Sechs der neun Rinderbetriebe kauften Tiere zu, separierten diese aber meist nicht von der Herde, sondern führten eine Entwurmung bei Zukauf ohne Separation durch. Diese Vorgehensweise kann zur Ausscheidung resistenter Wurmpopulationen nach der Entwurmung auf die Weide führen, welche zur Quelle neuer Infektionen werden kann (Leathwick et al. 2009). Rinderbetriebe 3, 7 und 8 separierten zugekaufte Tiere zunächst von der restlichen Herde, führten in zwei von drei Fällen dann jedoch keine Entwurmung durch. Insgesamt konnte kein Zusammenhang zwischen dem Separationsverhalten, der Infektionsintensität und dem Vorkommen von AR für die Schaf- und Rinderbetriebe festgestellt werden.

Nach einer Quarantänebehandlung sollte eine Kontrolluntersuchung aus Kotproben der zugekauften Tiere eingeleitet werden, um den Eintrag resistenter MDS Populationen zu verringern.

#### **6.5.6 Entwurmungsmanagement**

Das Entwurmungsmanagement beinhaltet wesentliche Faktoren für die Entstehung von AR. Für die Studie wurde die Entwurmung durch eine TA durchgeführt. In der Realität werden die verschreibungspflichtigen Entwurmungspräparate durch den verantwortlichen TA meist nur bereitgestellt und durch die Landwirte selbst appliziert. Dies war in 100 % der Schafbetriebe der Fall und in rund der Hälfte der Rinderbetriebe. Damit wird die Verantwortlichkeit der richtigen Anwendung vom TA auf den Landwirt übertragen, und es geht die Möglichkeit einer regelmäßigen Beratung zur Durchführung vorheriger Diagnostik, zur Wahl des richtigen Entwurmungszeitpunkts und zur richtigen Entwurmungsfrequenz verloren.

Im besten Fall sollte die Entwurmung nach Indikation, d.h. nach positivem Wurmeibefund in (Sammel-)proben in Kombination mit einer klinischen Symptomatik, und nicht metaphylaktisch nach festgelegtem Schema erfolgen. Allerdings führte in der Realität lediglich ein einzelner Schafbetrieb (Betrieb 5) die Entwurmungen nur bei Bedarf durch, alle weiteren bevorzugten regelmäßige Behandlungen. Dieser Schafbetrieb wies neben Resistenzen gegenüber allen eingesetzten AH auch ein hohes EPG von 160 auf. Da Betrieb 5 allerdings keine Diagnostik vor der Behandlung betrieb, könnte das Infektionsgeschehen in der Herde falsch beurteilt worden sein und in der Folge die Entwurmung nicht häufig und nicht gezielt genug stattgefunden haben. Hier scheint die Behandlung bei Bedarf eher nicht zielführend gewesen zu sein, da das weitere Entwurmungsmanagement nicht konsequent durchgesetzt wurde. Die Verminderung des AH-Einsatzes ist zwar eine wichtige Maßnahme, sollte jedoch augenscheinlich nicht als alleiniges Mittel zur AR-Prävention genutzt werden. Auch bei den Rinderbetrieben führten nur zwei der neun (Betriebe 3 und 5) eine Behandlung bei Bedarf

durch. Unter diesen wurde in Betrieb 3 eine EPR-Resistenz nachgewiesen. Das Gesamt-EPG war mit 6,4 in Betrieb 3 bzw. 46 in Betrieb 5 moderat.

Weiterhin entwurmten 75 % der Schafbetriebe und 89 % der Rinderbetriebe alle Tiere einer Altersgruppe gemeinsam. Diese Vorgehensweise kann bei vorhandener Symptomatik und zusätzlich positivem Eibefund durchgeführt werden, sollte jedoch im besten Fall ausschließlich auf die betroffenen Tiere mit vorhandener Symptomatik, z.B. bei schlechten Gewichtszunahmen, angewendet werden. Diese Vorgehensweise wird als gezielt selektive Behandlung (engl. *Targeted selective treatment*, TST) bezeichnet (Charlier et al. 2014). Die Entscheidung, bei welchen Tieren eine Entwurmung durchgeführt werden soll, kann dabei von verschiedenen Faktoren abhängig gemacht werden und so ein bestimmter Prozentsatz der Herde, welcher in dieser Kategorie gut abschneidet, unbehandelt bleiben. Dazu zählen regelmäßige Kontrollen der Lebendgewichte auf Grundlage von Gewichtsmessungen, der Body conditioning score, die Evaluierung der Verschmutzung der Afterregion mithilfe des „dag score“, welche hinweisend für Diarrhoe ist oder das FAMACHA, mit welchem die Konjunktiven von Lämmern nach ihrer Farbintensität in Kategorien von klinisch gesund bis zu anäm unterteilt werden (Charlier et al. 2014). Um betroffene Tiere zu detektieren und für ein Monitoring der Lebendgewichte ist allerdings wiederum ein vermehrter Arbeits- und Zeitaufwand notwendig. Für die Schafhalter kann ein solches gezieltes Monitoring schwer umsetzbar sein, wenn die Tiere nur wenige Male innerhalb der Weidesaison individuell erfasst werden.

Eine häufige Entwurmung führten die Betriebe 9 und 12 mit viermal pro Jahr durch. Am häufigsten allerdings führte Betrieb 7, in dem ebenfalls eine Multiresistenz gegenüber allen Wirkstoffen festgestellt wurde, die Entwurmung durch. Sie fand für die Jungtiere alle 5-6 Wochen statt. Diese hohe Frequenz ist ein starker Treiber von AR (Sargison et al. 2007). Der wiederholte, langjährige Einsatz von ABZ auf diesem Betrieb kann als ein weiterer Risikofaktor gesehen werden, erklärt allerdings nicht die Multiresistenz gegenüber weiteren Wirkstoffen in diesem Betrieb. Empfehlenswert wäre eine Rotation der Entwurmung zwischen verschiedenen Wirkstoffgruppen, um resistente Wurmpopulationen durch einen anderen Wirkmechanismus in der Folgebehandlung miterfassen zu können. Das nachgewiesene durchschnittliche EPG in diesem Betrieb war mit 185 zudem erhöht, sodass das frequente Entwurmungsintervall hier offensichtlich nicht zielführend war. Einen weiteren prädisponierenden Faktor stellte die oben beschriebene hohe Besatzdichte dar, welche bei 0,06 ha pro Tier lag.

Die Entwurmung in Rinderbetrieben wurde maximal zweifach pro Jahr durchgeführt und lag damit deutlich niedriger als in den Schafbetrieben, was damit ein Grund für die langsamere Entwicklung von AR für diese Betriebe sein könnte.

### 6.5.7 Anwendung der Anthelminthika

Für die korrekte Entwurmung ist die richtige Dosierung nach Ermittlung des Gewichts entscheidend. In der Studie wurde das Gewicht vor Dosierung aber lediglich von zwei Betrieben (B1, B10) mittels Tierwaage bestimmt, alle weiteren schätzten das Gewicht ihrer Tiere. Auch unter den Rinderbetrieben wurde lediglich in zweien das Gewicht zuvor mittels Waage bestimmt. Die inkorrekte Dosierung des Entwurmungspräparats hat einen großen Einfluss auf die Entstehung resistenter Wurmpopulationen, da bei Unterdosierungen der Wirkstoff nicht in ausreichendem Maße im Tierkörper wirken kann, um alle Wurm-Individuen zu erfassen. Auch sollten Drench-Pistolen vor der Anwendung auf die richtige Dosierung überprüft werden, um Unterdosierungen zu vermeiden. In den Rinderbetrieben wurden vorwiegend (89 %) Pour-on Präparate eingesetzt, welche leicht zu unzureichenden Wirkstoffspiegeln im Tierkörper () und damit ebenfalls zum teilweisen Überleben von Würmern führen können. Die Wirkstoffaufnahme in den Tierkörper auf diese Weise scheint nicht gesichert zu sein (Bousquet-Mélou et al. 2011). Daher sind Injektions- oder orale Präparate vorteilhafter, die die Wirkstoffdosis im Tierkörper bei richtiger Applikation sicherstellen. Applikationsfehler bei der Entwurmung sowie damit oft einhergehende Unterdosierungen sind ein wichtiger Risikofaktor für AR und können nur durch einen personellen und zeitlichen Mehraufwand vermieden werden. Allerdings kann sich z.B. die Eingabe oraler Medikamente an extensiv gehaltene Weiderinder bei widerstrebendem Abwehrverhalten in der Realität als schwierig erweisen und bietet für manche Betriebe keinen praktikablen Ansatz. Durch eine inkorrekte Anwendung können EZ im EZRT auch missinterpretiert werden (El-Abdellati et al. 2010), d.h. zu falsch positiven Ergebnissen führen, was bei der vorliegenden Studie durch die Befolgung der korrekten Dosierungsbestimmung und Anwendung der Präparate vermieden werden sollte.

In den Schafbetrieben wurden vermehrt Wirkstoffe aus der ML-Gruppe eingesetzt, am häufigsten dabei MOX (92 %). Die BZ folgten mit weniger Einsätzen an zweiter Stelle. In Rinderbetrieben wurden fast ausschließlich ML angewendet, darunter am häufigsten IVM. Fenbendazol wurde lediglich einmal als Mehrfachauswahl zusammen mit IVM genannt (B2). Bei der Anwendung von ML kommt zum einen die Wirkdauer und der Schutz vor Reinfektion über zwei Wochen (Campbell and Benz 1984) sowie die zusätzliche Wirkung gegen Arthropoden wie *Oestrus ovis*, *Gasterophilus* spp, *Psoroptes* spp., *Sarcoptes* spp. und verschiedene Läuse Spezies zum Tragen (Sutherland 1990). Diesen Eigenschaften steht allerdings eine erhöhte Biotoxizität durch Akkumulation des Wirkstoffs in Gewässern und nachgewiesener Toxizität für Fischembryos gegenüber (Muniz et al. 2021), die bei der Anwendung auf Weiden bedacht werden muss. Die Anwendung von BZ-Präparaten in doppelter Dosierung wird zur zusätzlichen Behandlung von Bandwürmern durchgeführt. Damit sinkt das Risiko der Unterdosierung bei der Anwendung gegen GIN. Die Umweltverträglichkeit

von BZ ist hierbei ebenso Gegenstand aktueller Forschung. Ein embryotoxischer Effekt konnte auch nach BZ-Exposition auf Zebrafische nachgewiesen werden (Zhang et al. 2020).

Dass MON in zwei Schafbetrieben (B5, B12) eingesetzt wurde, kann als direkte Folge einer gesteigerten Wahrnehmung von AR-Problematik in diesen Betrieben gewertet werden, da beide Betriebe vorberichtlich bereits weitere Wirkstoffe anwenden und eine subjektiv verminderte Wirksamkeit (ohne diagnostische Kontrollen) festgestellt wurde. Betrieb 5 gab in der Mehrfachauswahl an, neben MON auch ABZ, MOX und LEV einzusetzen. B12 hatte außer MON bereits ABZ, IVM, MOX und LEV verwendet.

Ob Betriebe eine Rotation von Wirkstoffen in aufeinanderfolgenden Jahren durchführten, wurde teilweise durch die Angabe der verwendeten Medikamente beantwortet. Diese Vorgehensweise wird inzwischen empfohlen, um resistente Populationen gegen eine Wirkstoffgruppe durch einen alternativen Wirkstoffmechanismus mitzuerfassen. In den Betrieben 4 und 10, in denen Resistenzen der MDS gegenüber IVM ausgeprägter waren als gegenüber FBZ, wurden als eingesetzte Wirkstoffe ausschließlich IVM und MOX angegeben. Für diese beiden Betriebe wäre eine Rotation der Wirkstoffe besonders interessant, um die noch geringfügig bessere Wirksamkeit der BZ in ihren Betrieben nutzen zu können.

#### **6.5.8 Diagnostik von Infektionsintensität und Anthelminthika-Resistenz**

Bei der Nachweisdiagnostik können Kotproben einerseits zur Aussage über die aktuelle Wurmbelastung und andererseits, zeitlich versetzt nach der Entwurmung, zur Aussage über die erfolgreiche Behandlung eingeschickt werden. Mit der regelmäßigen Überprüfung der Infektionslast kann zudem der richtige Zeitpunkt für die Entwurmung festgelegt werden (Mcarthur and Reinemeyer 2014). Acht der zwölf Betriebe gaben im Fragebogen an, in der Vergangenheit generell keine Kotuntersuchung durchgeführt zu haben (67 %). Dennoch hielten neun Betriebe Untersuchungen der Kotproben für sinnvoll (75 %). Bei den Rinderbetrieben hatte lediglich ein Betrieb bereits einmal Kotproben zu koproskopischen Untersuchungen eingesandt (11 %), allerdings zum Nachweis von Leberegeleiern, wofür ein Sedimentationsverfahren zur Detektion der Eier und damit nicht für den Nachweis von MDS verwendet wird. Auf die Frage, ob regelmäßige Kotprobenkontrollen als sinnvoll erachtet werden, antworteten jedoch auch hier acht der neun Rinderbetriebe mit ja (89 %). Damit ergibt sich eine sehr ähnliche Diskrepanz wie zuvor in den Schafbetrieben beobachtet. Eine wahrscheinliche Erklärung sind ökonomische Restriktionen. Aber auch ein Mangel an verfügbarer Arbeitskraft, Zeit oder Motivation können ursächlich sein. Die Motivation, vermehrt eine Diagnostik durchzuführen zu lassen, scheint vor allem moralisch verortet (Vande Velde et al. 2018a). Dieser Studie nach hielten sich die Landwirte selbst als nicht verantwortlich für die Umsetzung nachhaltiger Bekämpfungsstrategien und nannten ihren zuständigen TA als wichtigsten Bezugspunkt (Vande Velde et al. 2018a). Der TA scheint hier der zentrale

Ansatzpunkt zu sein, um gezielt aufzuklären und zu vermehrter Diagnostik und regelmäßiger Überprüfung der Wirksamkeit eingesetzter Wirkstoffe zu raten.

Die zusätzliche Auswertung von Einzelproben wäre zudem geeignet, um Behandlungen in Form eines TST gezielter anzuwenden, was eine wichtige Maßnahme zur AR-Prävention darstellt (Charlier et al. 2014).

### **6.5.9 Informationsvermittlung und Entscheidungsverhalten der Tierhalter**

Eine wichtige Stellschraube im Entwurmungsmanagement ist der Landwirt selbst. Für die langfristige Umsetzung alternativer Bekämpfungsstrategien ist die Partizipationsbereitschaft ausschlaggebend. Diese ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Das Entscheidungsverhalten des Landwirts wird durch Intuition einerseits und Umweltfaktoren andererseits beeinflusst (Vande Velde et al. 2018b). Der Umwelt gehören soziopsychologische Faktoren (andere Landwirte, Familie, TA), ökonomische Faktoren und gesetzliche Regulationen an (Vande Velde et al. 2018b).

Ein grundsätzliches Interesse der Landwirte an aktueller Forschung kann durch die Teilnahme an der Studie unterstellt werden. Allerdings gaben vier Schafbetriebe (B1, B3, B6 und B7) und drei Rinderbetriebe (B4, B5 und B9), und damit jeweils 33 %, an, sich keine zusätzlichen Informationen zum Thema Entwurmung erhalten zu wollen. Dies könnte ein Indiz sein, dass der Wunsch nach Beibehaltung des *status quo* besteht. Um diese Betriebe für alternative Bekämpfungsstrategien einzunehmen, benötigt es erweiterter Anstrengungen.

Als hinderlich für die Adaption alternativer Maßnahmen wurde ein geringes Problembewusstsein für das Risiko von AR und eine positive Einstellung zur derzeitigen Entwurmungspraxis festgestellt (Morgan et al. 2012; Vande Velde et al. 2018b). Das generelle Wissen über Entwurmungspraktiken und Alternativen mit der Übertragung der Entscheidungskontrolle auf den Landwirt wird dabei als wichtiger Faktor für die Adaption alternativer Entwurmungspraktiken eingestuft (Jack et al. 2017). Auch schon das „wahrgenommene Wissen“ verleiht eine gefühlte Kontrolle und kann die Absicht, präventive Entwurmungspraktiken zu adaptieren, erhöhen (Rose Vineer et al. 2017). Es existieren jedoch auch Studien, die keinen Zusammenhang zwischen dem Wissensstand zur AR und einer verbesserten Bekämpfungsstrategie feststellten (Moore et al. 2016). Hier wurden Behandlungsfehler durch den Landwirt wiederum nicht als innerhalb der eigenen Verantwortung liegend erkannt (Moore et al. 2016; Vande Velde et al. 2018b).

Elf der 12 Schafbesitzer waren alternative Entwurmungsmittel bekannt und alle gaben an, sich gut zum Thema Entwurmung informiert zu fühlen. Anders verhielt es sich in den Rinderbetrieben, wo zwar ebenfalls acht von neun Rinderhaltern angaben sich gut informiert zu fühlen, jedoch lediglich in einem Fall Alternativen zur herkömmlichen Entwurmung bekannt

waren. Hinsichtlich alternativer Entwurmungsmethoden liegt für die verschiedenen Wiederkäuerspezies offenbar eine Diskrepanz zwischen Wissensstand und getroffener Aussage vor, ein Unterschied im Vorkommen von AR war zwischen diesen Betrieben nicht feststellbar.

Zwischen der Umsetzung von vermittelten Informationen, der Absicht der Umsetzung und der tatsächlichen Umsetzung von Praktiken wurde in der Verhaltenspsychologie eine sogenannte „Absichts-Verhaltens Lücke“ (engl. „*intention-behaviour gap*“) entdeckt (Sniehotta et al. 2005; Gilleard et al. 2021). Gemeint ist die nicht automatische Umsetzung von als richtig erkannten Verhaltensweisen. In Bezug auf die Landwirte ist damit die tatsächliche Umsetzung und Aufrechterhaltung von Maßnahmen selbst nach erfolgreicher Wissensvermittlung und Absicht der Umsetzung von Maßnahmen zu verstehen. Diese Diskrepanz gilt es bei der erfolgreichen Umsetzung alternativer Behandlungsmaßnahmen zu berücksichtigen. Als potenzielle „Lückenfüller“ könnten weitere Akteure, z.B. Landwirte, die Familie oder TÄ, fungieren, aber auch Gewohnheiten und kulturelle Gepflogenheiten (Vande Velde et al. 2018b).

Umso mehr scheinen eine stringente Wissensvermittlung und Aufklärung durch die zuständigen TÄ ein wichtiges Mittel für die AR-Prävention zu sein. In den Schafbetrieben wurde die Wurmkontrolle in 100 % durch die Landwirte vorgenommen, es erfolgten aber in 77 % Absprachen mit den TÄ. Die Qualität der Beratung wurde von einer überwiegenden Mehrheit, von 83 %, als ausreichend gut bewertet.

In den Rinderbetrieben stellte sich die Situation leicht unterschiedlich dar: Hier waren die TÄ in einem Drittel der Fälle ausschließlich für die Planung der Wurmkontrolle verantwortlich und wurden von einem weiteren Drittel konsultiert. Lediglich das letzte Drittel plante das Entwurmungsmanagement eigenständig. Nahezu alle Rinderhaltenden (89 %) fühlten sich dabei ausreichend beraten.

Bei der Kommunikation der TÄ mit den Tierhaltern können durch Fehlkommunikationen, wie der Vermittlung von unverständlichen Kontrollmaßnahmen und Fehleinschätzungen des benötigten Zeit- und Arbeitsaufwands zur Umsetzung neuer Vorgehensweisen, zusätzliche Barrieren geschaffen werden (Vande Velde et al. 2018b). Eine positive Einflussnahme und informiertes Vorgehen von Seiten der TÄ sind hier zielführend. Die Übernahme des Entwurmungsmanagement durch TÄ bietet zudem die Möglichkeit der regelmäßigen Beratung zur Durchführung vorheriger Diagnostik, zur Wahl des richtigen Entwurmungszeitpunkts, der richtigen Entwurmungsfrequenz sowie zur richtigen Anwendung der Medikamente, welche einen großen Beitrag zur AR-Prävention leisten. Zwischen Informationsgrad der Landwirte, durchschnittlichen EPG sowie AR Vorkommen der Schaf- und Rinderbetriebe konnte kein Zusammenhang festgestellt werden.

## 6.6 Umfrage größtierpraktizierender Tierärzte

Durch die Befragung von TÄ wurde eine weitere Perspektive zur Implementierung nachhaltiger Entwurmungspraktiken eröffnet. Die zuständigen TÄ stellen einen wichtigen, positiven Einflussfaktor für die Umsetzung eines nachhaltigen Entwurmungsmanagement auf den Landwirt dar (Vande Velde et al. 2018b). Die einzunehmende Rolle ist auch insofern wichtig, da sich Landwirte selbst scheinbar gehäuft nicht für die Umsetzung nachhaltiger Bekämpfungsstrategien verantwortlich fühlen (Vande Velde et al. 2018b).

In der Umfrage betreuten 34 TÄ vorwiegend Rinderbetriebe und ein TA gab an, über 50 % Schafbetriebe zu betreuen. Tatsächlich wird die Anzahl praktizierender TÄ in Deutschland nur für Wiederkäuer insgesamt, und nicht unterteilt in Schaf- und Rinder-TÄ, erfasst (Tierärzteblatt 2022). Damit ergibt sich eine potenzielle Teilnehmerzahl von 3.979 TÄ, welche reine Nutztierpraktiker (n = 864) und Gemischtpraktiker (n = 3.115) umfasst. Mit der Gesamtteilnehmerzahl von 48 vollständigen Datensätzen lag die Rücklaufquote damit bei 1,21 %. Fast alle TÄ (98 %) berieten ihre Kunden zu Entwurmungsstrategien und waren der Ansicht, dass ihre Anweisungen überwiegend befolgt wurden. Diese Angaben bestätigen den wichtigen Einfluss, den TÄ auf die Entscheidung der Landwirte nehmen können.

Eine gute Informationslage der TÄ ist zur Beurteilung der geeigneten Maßnahmen für die einzelnen Betriebe wichtig. Ihren eigenen Informationsgrad hielten allerdings nur 50 % der TÄ für ausreichend. Durch die Studienteilnahme kann jedoch ein grundsätzliches Interesse an der Thematik angenommen werden, das durch den vermehrten Wunsch nach weiteren Informationen zum Thema Entwurmung bei 83 % der TÄ seinen Ausdruck fand. Aufgrund unzureichender Kenntnis alternativer Entwurmungsoptionen können diese allerdings nicht an die Landwirte weiterempfohlen werden, womit ein Teil der Verantwortlichkeit auf die TÄ zurückfällt (Mcarthur and Reinemeyer 2014). Da die TÄ vermehrt Fortbildungen zur Verbesserung des Wissensstands nutzen, böte sich hier ein geeigneter Ansatzpunkt zur Auffrischung und Ergänzung des Wissens.

Ein großes Problem stellt die Kommunikation konträrer Praktiken (selektive versus generalisierte Entwurmung) dar, die schon durch neuere Forschung widerlegt wurden, was jedoch erst nach und nach zu den TÄ vordringt (Vande Velde et al. 2018b). Dazu gehört der obsoletere Weidewechsel direkt nach Entwurmung. Dieser wurde noch von 58 % der TÄ empfohlen. Eine Quarantäne zugekaufter Tiere wurde immerhin von 75 % der TÄ als sinnvoll erachtet. Einen jährlichen Wirkstoffwechsel hielten dagegen nur 45 % für richtig. Insgesamt hielten noch 50 % der TÄ die Entwurmung der gesamten Herde für sinnvoll, und alle Tiere einer Altersgruppe zusammen zu entwurmen, hielt mehr als zwei Drittel für angebracht. Dass TÄ an Entwurmungspraktiken festhalten, die nach aktuellem Stand der Forschung nicht mehr empfohlen werden, wurde bereits als problematisch erkannt (Kenyon et al. 2017). Ein Grund

für das Festhalten an der strategischen Entwurmungspraxis könnten voneinanderabweichende Lehrmeinungen sein. So ergab eine Umfrage von fünf Professoren tiermedizinischer Hochschulen in Deutschland an Lehrstühlen der Parasitologie ein widersprüchliches Bild (Meyer et al. 2020). Nach Entwurmungsempfehlungen bei Pferden gefragt, erhielt die Autorin fünf voneinander abweichende Antworten. Darunter empfahlen zwei Experten strategische Entwurmungen beizubehalten. Aufgrund dieser uneinheitlichen Expertenmeinungen ist es nachvollziehbar, dass neue Behandlungsansätze durch fehlende Unterrichtung der TÄ nicht umgesetzt werden können. Das über lange Zeit praktizierte und etablierte System aus regelmäßigen Entwurmungsschemata, das vorrangig die Landwirte als Kunden im Blick hat, bleibt damit weiterbestehen, bis eine einheitliche und klar verständliche Alternative zur Umsetzung dieses ablösen kann. Dieser Punkt kann als ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von AR in den durch die TÄ betreuten Betrieben betrachtet werden.

Die Applikation der AH wurde in 63 % der Fälle durch den Landwirt durchgeführt. Da die Anwendung offensichtlich häufig nicht durch TÄ erfolgt, wären hier gezielte Schulungen zur richtigen Anwendung sinnvoll, um Unterdosierungen bei der Behandlung zu vermeiden. Von den TÄ wurden für Rinder dabei vorwiegend Pour-on und für Schafe dagegen meist orale Präparate verschrieben. Die wahrscheinlichste Erklärung für diesen Unterschied ist die schwierige Anwendung oraler Präparate bei einem höheren Körpergewicht und Abwehrverhalten der Tiere. Die Angaben zum Einsatz von Anthelminthika deckten sich mit Angaben aus der Befragung der Rinder- und Schafhalter, wonach ML die Liste mit IVM, EPR und MOX für die Rinder und MOX und IVM für die Schafe anführten. BZ wurden durch die TA seltener abgegeben. Da Schafe häufig für die Landschaftspflege eingesetzt werden und dabei auf naturnahen Flächen weiden, ist die Umweltverträglichkeit als Auswahlkriterium für die geeignete Entwurmung eher nicht nachvollziehbar, da Landschaftspflege häufig in naturnahen Gebieten betrieben wird und ML in der Umwelt persistieren, akkumulieren und biotoxisch sind (Muniz et al. 2021). Die seltene Anwendung von LEV kann mit der erforderlichen Umsicht bei der Handhabung des Medikaments durch eine geringere therapeutische Breite und strikter Dosierung nach Gewicht des Tieres zusammenhängen. Vorteile, die der Einsatz von ML gegenüber BZ bietet, wurde in der Umfrage der LW bereits angesprochen und wurden durch Angaben der TÄ bestätigt, die als relevant für die Wirkstoff-Auswahl „eine zusätzliche Wirksamkeit gegen Ektoparasiten“ und die „zuverlässige Wirksamkeit“ angaben. Da die BZ zu den älteren Präparaten auf dem Markt gehören, und FBZ bspw. 1975 zugelassen wurde, MOX, EPR und DOM aber erst 1991, 1993 und 1996 (Vande Velde et al. 2018b), könnten ML als „neuere“ Präparate den Eindruck einer weniger verbreiteten Resistenz suggerieren. IVM-Resistenzen waren allerdings in gleichem Maße verbreitet wie FBZ-Resistenzen. Tatsächlich wurde IVM nur sechs Jahre (1981) nach FBZ auf den Markt gebracht (Vande Velde et al. 2018b).

Rund ein Fünftel der TÄ gibt an, dass koproskopische Untersuchungen auf Seiten der Tierhalter nicht gewünscht waren und weist damit auf die begrenzte Einflussnahme hin, die bspw. hohe Kosten für Diagnostik nicht kompensiert. Für die Umsetzung von Empfehlungen ist die nachvollziehbare Vorgehensweise und eine Instruktion der Landwirte wichtig (Vande Velde et al. 2018b). Letztlich können TÄ schwerlich Empfehlungen aussprechen, die sie selbst nicht als relevant erachten. Für Rinderbetriebe wurde die Thematik von zwei Drittel der TÄ als „eher nicht relevant“ oder „nicht relevant“ eingestuft. Die Relevanz für Schafbetriebe wurde dagegen von der Mehrheit als „eher relevant“ oder „sehr relevant“ eingeschätzt. Eine mögliche Erklärung könnte die spätere AR-Entwicklung in Rinderbetrieben sein. Allerdings sollte der richtige Zeitpunkt zur Prävention einer sich intensivierenden AR-Situation auch in Rinderbetrieben nicht versäumt werden, und die Entwicklung alternativer Entwurmungsstrategien strategische Anwendung finden. Außerhalb Europas, vor allem in Südamerika, den USA, Neuseeland und Australien, nimmt die AR in Rinderbetrieben inzwischen ähnlich einschneidende Ausmaße an, wie für die Schafbetriebe berichtet (Waghorn et al. 2006; Edmonds et al. 2010; Rendell 2010; Ramos et al. 2016).

## 7 Zusammenfassung

Das aktuelle Forschungsvorhaben diente der Ermittlung des aktuellen Anthelminthika-Resistenzstatus in ausgewählten Wiederkäuerbetrieben in Brandenburg, Sachsen-Anhalt und Mecklenburg-Vorpommern. In den Jahren 2020 und 2021 wurde eine Feldstudie in 12 Schaf- und 9 Rinderbetrieben durchgeführt. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf Eizahlreduktionstests (EZRT) und der Ermittlung des Resistenzstatus der eingesetzten Anthelminthika (AH) in den Betrieben. In den Schafbetrieben lagen Resistenzen der Magen-Darm-Strongyliden (MDS) gegenüber allen eingesetzten AH vor: Fenbendazol (FBZ)-Resistenz war in sieben der acht Betriebe nachweisbar (88 %), in Betrieb 6 blieb die Wirkung dagegen erhalten. Ivermectin (IVM)-Resistenzen waren in allen acht Betrieben vorhanden (100%). Eine unzureichende Wirkung von Moxidectin (MOX) wurde in acht der zwölf beprobten Betriebe beobachtet. Gegenüber MOX suszeptibel waren die MDS-Populationen der Betriebe 6, 9, 11 und 12. In den Betrieben 3, 4, 5, 7 und 10 wurde zudem eine Multiresistenz gegenüber aller drei untersuchten Wirkstoffen festgestellt. Eine gleichzeitige Resistenz gegenüber FBZ und IVM war in Betrieb 9 feststellbar. Ein in Betrieb 2 zeitlich versetzt durchgeführter EZRT mit Monepantel (MON) wies eine vollständige Wirksamkeit des Wirkstoffs auf, mit einer Reduktion von 99,3 % und Konfidenzlimits von 98,6 und 99,6 %. Die AR-Resistenzsituation der getesteten Rinderbetriebe stellte sich weniger ausgeprägt dar: In zwei von acht Betrieben (Betriebe 3 und 4) lag eine verminderte Wirksamkeit von FBZ vor. Eine Resistenz von EPR lag in drei der acht Betriebe vor (Betriebe 3, 4 und 8). Für das einmalig getestete IVM in Betrieb 2 lag eine Resistenz vor. Damit war die Wirksamkeit in Betrieben 3 und 4 für alle eingesetzten Wirkstoffe reduziert.

Die durchgeführten Larvenmigrationshemmtests (LMHT) der getesteten Rinder-Nematodenlarven sprechen für die noch vorhandene Suszeptibilität des Imidazothiazols Levamisol (LEV) in allen acht eingeschlossenen Rinderbetrieben.

Mittels *deep amplicon sequencing* (DAS) gelang die Sequenzierung der DNA angezüchteter Larven der Rinder- und Schafbetriebe mit insgesamt 29 Proben: Die Identifizierung der GIN-Spezies wurde für 11 Schaf- und 9 Rinderbetriebe vor der Behandlung, sowie in drei Schafbetrieben nach FBZ-Behandlung, in vier Schafbetrieben nach IVM-Behandlung, sowie in zwei Schafbetrieben nach MOX-Behandlung vorgenommen.

In den untersuchten Schafbetrieben waren *T. circumcincta*, *H. contortus* und *T. colubriformis* am häufigsten vertreten. Resistenzen gegenüber FBZ, IVM und MOX wurden für *H. contortus* und *T. circumcincta* nachgewiesen, *T. colubriformis* wies Resistenzen gegenüber FBZ und IVM auf. Weitere Spezies blieben ebenfalls nach FBZ und IVM Behandlungen erhalten,

darunter *T. axei*, *T. vitrinus*, *C. curticei* und *C. fuelleborni*. Die häufigsten Vertreter in den untersuchten Rinderbetrieben waren *O. ostertagi* und *C. oncophora*.

Für die vier Schafbetriebe mit insgesamt neun vorhandenen Proben, entsprechend der jeweils vor bzw. teilweise nach der Behandlung MDS-Eier aufweisenden Proben, waren in jeder Probe verbleibende *T. circumcincta* vorhanden. *Trichostrongylus colubriformis* war in 100 % der IVM- und FBZ-Nachbehandlungsproben vorhanden, jedoch nicht in den Proben nach MOX-Behandlung. *Haemonchus contortus* war in den Nachbehandlungsproben in drei der vier Betriebe (B5, B7 und B10) weiterhin vorhanden, lediglich in Schafbetrieb 9 zeigte sich eine 100-%ige Reduktion nach FBZ- und IVM-Behandlung. *Trichostrongylus vitrinus* war vor Behandlung mit einem Anteil von 2,3 % in Betrieb 5, 4,8 % in Betrieb 7 und 13,9 % in Betrieb 9 in drei der vier Proben vorhanden. Diese Art verblieb nach IVM-Behandlung in Betrieb 5 bei 3,1 %, in Betrieb 7 bei 3,6 % und erhöhte den prozentualen Anteil in der Probe nach Behandlung in Betrieb 9 in 35,5 %. Die FBZ-Behandlung war nur in einem von drei Fällen erfolgreich: In Betrieb 5 verblieben 0,5 % und in Betrieb 7 0,3 % *T. vitrinus*. Gegenüber MOX war diese Spezies jedoch noch suszeptibel. Das Vorkommen von *C. ovina* war in allen Nachbehandlungsproben nicht mehr nachweisbar. *Trichostrongylus axei* war in geringem Maße ebenfalls in zwei Betrieben vorhanden und das Vorkommen dieser Spezies reduzierte sich nach IVM-Behandlung nur in einem der beiden Fälle. In Betrieb 9 fanden sich vor Behandlung geringe Anteile von *C. curticei* und *C. fuelleborni*, die nach IVM und FBZ-Behandlung erhalten blieben.

Ein begleitender Fragebogen für die teilnehmenden Betriebe gab Aufschluss über die anthelminthische Behandlungsmaßnahmen: Unter Schafhaltern waren die makrozyklischen Lactone (ML) in folgender Abstufung meistgenannt: MOX (92 %) IVM (58 %) und Doramectin (DOM, 17 %). Ein Viertel der Schafbesitzer setzte zudem Benzimidazole mit FBZ (25 %) und Albendazol (ABZ, 25 %) sowie die Wirkstoffe LEV und MON (je 17 %) ein. ML beginnend mit IVM (89 %), gefolgt von DOM (22 %), EPR (11 %) und FBZ (11 %) waren von den Rinderhaltern ebenfalls am häufigsten eingesetzt.

Auf eine metaphylaktische Behandlung aller Tiere einer Herde verzichteten lediglich zwei von neun Rinderhaltern (22 %) und einer der zwölf Schafhalter (8 %). Sie gaben an, die Tiere nur nach Bedarf, d.h. nach Indikationsstellung, zu behandeln. Auch offenbarten sich durch die Befragung Defizite bei der Durchführung der Behandlung. So wurden Kotproben der Tiere nur von wenigen Tierhaltern im Vorfeld einer Behandlung zur Untersuchung eingeschickt (11% der Rinderhalter und 23 % der Schafhalter) und die Dosierung des eingesetzten Medikaments mittels einer Tierwaage und nicht nach einfacher Schätzung des Gewichts erfolgte lediglich in 22 % der Rinderbetriebe und 17 % der Schafbetriebe.

Insgesamt zeigen die Angaben der Tierhalter eine unterschiedliche Bereitschaft zu einem alternativen Entwurmungsverhalten, basierend auf den Umfragedaten konnte hier zwar kein direkter Zusammenhang zum AR Vorkommen festgestellt werden. Jedoch scheint gleichfalls bei einem Großteil ein generelles Interesse an der Thematik vorhanden zu sein: 67 % der Rinder- und 67 % der Schafhalter wünschten sich auf Nachfrage mehr Informationen zum Entwurmungsmanagement.

Aus dem Fragebogen für großtierpraktizierende Tierärzte (TÄ) in Deutschland liegen 47 Datensätze für das Rind und 39 Datensätze für das Schaf vor. Insgesamt stellte sich hinsichtlich der bei den zwei Tierarten angewendeten anthelmintischen Behandlungen ein verschiedenes Vorgehen dar. Tierartspezifisch kamen unterschiedliche AH zum Einsatz: Rinderbetreuende TÄ verschrieben ML mit großem Abstand vor anderen Wirkstoffgruppen. Der Wirkstoff IVM war dabei der am häufigsten eingesetzte anthelminthische Wirkstoff, 77 % der TÄ gaben an IVM sehr häufig oder häufig einzusetzen. Danach folgte der Einsatz von MOX (45 %) und EPR (43 %). Schafbetreuende TÄ verschrieben Wirkstoffe gefächerter aus allen zur Verfügung stehenden Wirkstoffgruppen. Sehr häufig oder häufig wurden MOX (56 %), gefolgt von Praziquantel (PZQ, 31 %), IVM (28 %) und FBZ (21 %) genannt. Auch die Auswahl des geeigneten AH beruhte auf speziesspezifischen Auswahlkriterien: Unter den Landwirten, welche Rinder hielten, spielten die Applikationsform, die Wartezeit und die Kosten des AH die größte Rolle, wohingegen für schafhaltende Landwirte das AH basierend auf koproskopischen Voruntersuchungen und der Umweltverträglichkeit verordnet wurde. Insgesamt lassen sich diese Unterschiede auf eine unterschiedliche Gewichtung des Themas AR zurückführen: Mehr als die Hälfte (63 %) der Rinder-TÄ hielt dieses Thema in den von ihnen betreuten Betrieben für wenig bis nicht relevant. Diese Einschätzung weicht diametral von den schafbetreuenden TÄ ab, die das Thema mehrheitlich als relevant einstufen (60 %).

Die vorliegenden Ergebnisse aktualisieren die bisherige Prävalenzdatenlage von AR in Deutschland und ergänzen diese um in das Resistenzgeschehen involvierte MDS Spezies in Schaf- und Rinderbetrieben. Sie geben nicht nur klare Hinweise auf eine Verschlechterung der Gesamtsituation in Deutschland, sondern zeigen auf, dass entschiedene Maßnahmen notwendig sein werden, um trotz einer weiteren Zunahme des Resistenzgeschehens das zentrale Ziel eines gesunden Tierbestands erhalten zu können. Diese umfangreichen Maßnahmen müssen insbesondere Schafbetriebe erreichen, da sich hier, aufgrund der besonders auffälligen Entwicklung der Resistenzsituation, anderenfalls ein Engpass an Handlungsmöglichkeiten ergeben wird, wie sie heute bereits außerhalb Europas zu finden ist. Hier wird die Frage nach wirtschaftlicher und dennoch gesunder Tierhaltung eine wichtige Zukunftsfrage werden.

Zu den Maßnahmen, die ergriffen werden können, gehört nach diesen Ergebnissen grundsätzlich auch eine verbesserte Detektionsmöglichkeit der AR, wie die Kombination von

EZRT und weiterer Sequenzierung. Jedoch sind weitere Forschungsbemühungen notwendig, um diese Methodik für die praktische Anwendung nutzbar zu machen. Der Ansatz, eine weitere Aufspaltung der Spezies vorzunehmen und diese innerhalb der Resistenzentwicklung zu betrachten, wird ein verbessertes Verständnis der Resistenzdynamik einzelner Spezies auf Betriebsebene zur Folge haben, welche dadurch besser in der Behandlung angesprochen werden und den Einsatz der möglichen AH verringern können.

## 8 Summary

### **Anthelmintic resistance situation of gastrointestinal nematodes in north-east German ruminant farms**

The present research project determined the current anthelmintic resistance (AR) status on selected ruminant farms in Brandenburg, Saxony-Anhalt, and Mecklenburg-Vorpommern. In 2020 and 2021, a field study was conducted on 12 sheep and 9 cattle farms. It focused on egg count reduction tests (ECRT) to determine the resistance status of the anthelmintics (AH) used. On the sheep farms, gastrointestinal nematode (GIN) resistance was present to all AH used: Fenbendazole (FBZ) resistance was detectable on seven of the eight farms (88 %) but remained effective on farm 6. Ivermectin (IVM) resistance was present on all eight farms (100 %). Insufficient efficacy of moxidectin (MOX) was verified on eight of the twelve sheep farms, susceptible to MOX were the GIN populations on farms 6, 9, 11 and 12. Multiple-resistance to all three anthelmintic drugs was found on farms 3, 4, 5, 7 and 10, while simultaneous resistance to FBZ and IVM was detected on farm 9. An EZRT with monepantel (MON) subsequently performed on farm 2 proved full efficacy of the active ingredient, with a reduction of 99.3% and confidence limits of 98.6 and 99.6%.

The AR situation on the tested cattle farms was less pronounced: Reduced efficacy of FBZ was present on two of eight farms (farms 3 and 4). Eprinomectin resistance was demonstrated on three of the eight farms (farms 3, 4 and 8). Resistance was proven for IVM tested once on farm 2. Thus, efficacy was reduced on farms 3 and 4 for all active ingredients used.

Larval migration inhibition tests (LMHT) performed on the tested bovine nematode larvae support the susceptibility of the imidazothiazole levamisole (LEV) being still present on all eight cattle farms included.

Deep amplicon sequencing (DAS) was used to determine species of cultured larvae from cattle and sheep farms with a total of 29 samples: Identification of GIN species was performed for 11 sheep and 9 cattle farms before treatment, as well as in three sheep farms after FBZ treatment, in four sheep farms after IVM treatment, and in two sheep farms after MOX treatment.

On the sheep farms studied, *T. circumcincta*, *H. contortus*, and *T. colubriformis* were the most abundant GIN species. Resistance to FBZ, IVM, and MOX was detected for *H. contortus* and *T. circumcincta*, in addition, *T. colubriformis* was resistant to FBZ and IVM. Other species also persisted after FBZ and IVM treatments, including *T. axei*, *T. vitrinus*, *C. curticei* and *C. fuelleborni*. The most common GIN representatives on the cattle farms studied were *O. ostertagi* and *C. oncophora*.

For the four sheep farms with a total of nine samples, corresponding to each sample having strongyle eggs before or partially after treatment, residual *T. circumcincta* were present in each

sample. *Trichostrongylus colubriformis* was found in 100% of the IVM and FBZ post-treatment samples, but not in the samples obtained post MOX treatment. *Haemonchus contortus* continued to be present in the post-treatment samples on three of the four farms (farms 5, 7, and 10), with only sheep farm 9 showing a full elimination after FBZ and IVM treatment. *Trichostrongylus vitrinus* was present in three of the four samples before treatment with a proportion of 2.3% on farm 5, 4.8% on farm 7 and 13.9% on farm 9. This species remained at 3.1% after IVM treatment on farm 5, 3.6% on farm 7, and increased to 35.5% post IVM treatment on farm 9. Fenbendazole treatment was successful in only one of three cases: 0.5% *T. vitrinus* remained on farm 5 and 0.3% on B7. However, this species was still susceptible to MOX. The presence of *C. ovina* was no longer detectable in any post-treatment sample. *Trichostrongylus axei* was also detected at low levels on two farms and the presence of this species was reduced after IVM treatment in only one of the two cases. On one farm, low levels of *C. curticei* and *C. fuelleborni* were found before treatment and remained after IVM and FBZ treatment.

An accompanying questionnaire for participating farms provided information on anthelmintic treatment regimens: On sheep farms, macrocyclic lactones (ML) were most commonly used in the following order: MOX (92%), IVM (58%) and doramectin (DOM, 17%). A quarter of the sheep owners also used benzimidazoles (BZ) with FBZ (25%) and albendazole (ABZ, 25%), and the active ingredients LEV and MON (17% each). Macrocyclic lactones starting with IVM (89%), followed by DOM (22%), EPR (11%), and FBZ (11%) were most used by cattle owners as well.

Only two of nine cattle farmers (22%) and one of the twelve sheep farmers (8%) refrained from routine metaphylactic treatment of all animals in a herd. They stated that they only treated the animals when required, i.e., according to indication. The survey also revealed deficiencies in the implementation of the treatment. For example, fecal samples of the animals were sent in for examination in advance of the treatment by only few of the livestock farmers (11% of cattle farmers and 23% of sheep farmers). The dosage of the medication used by means of an animal scale and not after simple estimation of the weight was carried out in only 22% of the cattle farms and 17% of the sheep farms.

Overall, the data of the livestock farmers showed different grades of being prepared for the application of an alternative deworming behavior; based on the survey data, no direct correlation to the AR occurrence could be found here. However, a general interest in the topic seemed to be present in a large part: 67 % of the cattle and 67 % of the sheep farmers wished for more information on deworming management when asked.

Following the questionnaire survey for veterinarians practicing in large animals in Germany, 47 data sets were available for cattle and 39 data sets for sheep. Based on these data, the AH

treatments recommended to be used for the two animal species differed: Bovine veterinarians prescribed ML far more often than of other drug classes. Ivermectin was the most frequently used agent, with 77% of the veterinarians reporting “very frequent” or “frequent” use of IVM. This was followed by using MOX (45%) and EPR (43%). Small ruminant veterinarians prescribed a wider range of agents from all available drug classes. Moxidectin (56%) was mentioned “very frequently” or “frequently”, followed by praziquantel (PZQ, 31%), IVM (28%), and FBZ (21%). Selection of the appropriate AH was also based on species-specific selection criteria: Among farmers who kept cattle, the application method, waiting time, and cost of the AH played the most important role, whereas for sheep farmers, the choice of was based on preliminary coproscopic studies and environmental compatibility. Overall, these differences can possibly be attributed to differences in the perception of the relevance of the AR issue: More than half (63%) of the bovine veterinarians considered this topic to be of little or no relevance on the farms they managed. This assessment is diametrically opposed to that of the small ruminant veterinarians, the majority of which rated the topic as relevant (60%).

The present results update the previous prevalence data of AR in Germany and complement them with data on GIN species involved in the resistance development on sheep and cattle farms. They not only provide clear indications of a deterioration in the AR situation in Germany, but also suggest that decisive measures will be necessary in order to maintain the central goal of healthy livestock despite the AR spread. These extensive measures must reach sheep farms in particular, as the striking development of the resistance situation will otherwise lead to a worsening of the kind already seen outside Europe. The question of economical yet healthy animal husbandry will remain an important future topic.

According to these results, the measures that can be taken include improved detection of AR, such as the combination of EZRT and further sequencing. However, further research efforts are necessary to make this methodology useful for practical application. The approach of further disaggregating GIN species and looking at them within resistance development will result in an improved understanding of the resistance dynamics of individual species at farm level, which can thus be better addressed in treatment and potentially reduce the overall use of AH.

## 9 Literaturverzeichnis

AlGusbi, S. A. M. (2011): Analyse putativer Inhibitoren von Anthelminthika-Resistenz-Mechanismen in gastrointestinalen Nematoden des Rindes., Freie Universitaet Berlin (Germany).

Avramenko, R. W., E. M. Redman, R. Lewis, T. A. Yazwinski, J. D. Wasmuth and J. S. Gilleard (2015): Exploring the Gastrointestinal "Nemabiome": Deep Amplicon Sequencing to Quantify the Species Composition of Parasitic Nematode Communities. PLoS One 10: e0143559. DOI: 10.1371/journal.pone.0143559.

Avramenko, R. W., E. M. Redman, L. Melville, Y. Bartley, J. Wit, C. Queiroz, D. J. Bartley and J. S. Gilleard (2019): Deep amplicon sequencing as a powerful new tool to screen for sequence polymorphisms associated with anthelmintic resistance in parasitic nematode populations. Int J Parasitol 49: 13-26. DOI: 10.1016/j.ijpara.2018.10.005.

Besier, R. B., L. P. Kahn, N. D. Sargison and J. A. Van Wyk (2016): Diagnosis, Treatment and Management of Haemonchus contortus in Small Ruminants. Adv Parasitol 93: 181-238. DOI: 10.1016/bs.apar.2016.02.024.

Bisset, S. A., C. A. Morris, J. C. McEwan and A. Vlassoff (2001):

Breeding sheep in New Zealand that are less reliant on anthelmintics to maintain health and productivity. N Z Vet J 49: 236-246. DOI: 10.1080/00480169.2001.36238.

Borges, F. A., G. D. Almeida, R. P. Heckler, R. T. Lemes, M. K. Onizuka and D. G. Borges (2013):

Anthelmintic resistance impact on tropical beef cattle productivity: effect on weight gain of weaned calves. Tropical animal health and production 45: 723-727.

Borkowski, E. A., E. M. Redman, R. Chant, J. Avula, P. I. Menzies, N. A. Karrow, B. N. Lillie, W. Sears, J. S. Gilleard and A. S. Peregrine (2020): Comparison of ITS-2 rDNA nemabiome sequencing with morphological identification to quantify gastrointestinal nematode community species composition in small ruminant feces. Vet Parasitol 282: 109104. DOI: 10.1016/j.vetpar.2020.109104.

Bousquet-Mélou, A., P. Jacquiet, H. Hoste, J. Clément, J. P. Bergeaud, M. Alvinerie and P. L. Toutain (2011): Licking behaviour induces partial anthelmintic efficacy of ivermectin pour-on formulation in untreated cattle. *Int J Parasitol* 41: 563-569. DOI: 10.1016/j.ijpara.2010.12.007.

Brown, H. D., A. R. Matzuk, I. R. Ilves, L. H. Peterson, S. A. Harris, L. H. Sarett, J. R. Egerton, J. J. Yakstis, W. C. Campbell and A. C. Cuckler (1961): ANTIPARASITIC DRUGS. IV. 2-(4'-THIAZOLYL)-BENZIMIDAZOLE, A NEW ANTHELMINTIC. *Journal of the American Chemical Society* 83: 1764-1765. DOI: 10.1021/ja01468a052.

Brunt, L. M., L. Rast, M. Hernandez-Jover, Y. M. Brockwell and R. G. Woodgate (2019): A producer survey of knowledge and practises on gastrointestinal nematode control within the Australian goat industry. *Vet Parasitol Reg Stud Reports* 18: 100325. DOI: 10.1016/j.vprsr.2019.100325.

Calvete, C. and J. Uriarte (2013): Improving the detection of anthelmintic resistance: evaluation of faecal egg count reduction test procedures suitable for farm routines. *Vet Parasitol* 196: 438-452. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.02.027.

Campbell, W. C. and G. W. Benz (1984): Ivermectin: a review of efficacy and safety. *J Vet Pharmacol Ther* 7: 1-16. DOI: 10.1111/j.1365-2885.1984.tb00872.x.

Carpenter, B., A. Gelman, M. D. Hoffman, D. Lee, B. Goodrich, M. Betancourt, M. Brubaker, J. Guo, P. Li and A. Riddell (2017): Stan: A probabilistic programming language. *Journal of statistical software* 76.

Charlier, J., J. Höglund, E. R. Morgan, P. Geldhof, J. Vercruysse and E. Claerebout (2020a): Biology and Epidemiology of Gastrointestinal Nematodes in Cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 36: 1-15. DOI: 10.1016/j.cvfa.2019.11.001.

Charlier, J., E. Morgan, L. Rinaldi, J. Van Dijk, J. Demeler, J. Höglund, H. Hertzberg, B. V. Ranst, G. Hendrickx and J. Vercruysse (2014): Practices to optimise

gastrointestinal nematode control on sheep, goat and cattle farms in Europe using targeted (selective) treatments. *Veterinary Record* 175: 250-255.

Charlier, J., L. Rinaldi, V. Musella, H. W. Ploeger, C. Chartier, H. R. Vineer, B. Hinney, G. von Samson-Himmelstjerna, B. Băcescu, M. Mickiewicz, T. L. Mateus, M. Martinez-Valladares, S. Quealy, H. Azaizeh, B. Sekovska, H. Akkari, S. Petkevicius, L. Hektoen, J. Höglund, E. R. Morgan, D. J. Bartley and E. Claerebout (2020b): Initial assessment of the economic burden of major parasitic helminth infections to the ruminant livestock industry in Europe. *Prev Vet Med* 182: 105103. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2020.105103.

Coles, G. C. (2002): Cattle nematodes resistant to anthelmintics: why so few cases? *Vet Res* 33: 481-489. DOI: 10.1051/vetres:2002034.

Coles, G. C., C. Bauer, F. H. Borgsteede, S. Geerts, T. R. Klei, M. A. Taylor and P. J. Waller (1992): World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 44: 35-44. DOI: 10.1016/0304-4017(92)90141-u.

Coles, G. C., F. Jackson, W. E. Pomroy, R. K. Prichard, G. von Samson-Himmelstjerna, A. Silvestre, M. A. Taylor and J. Vercruysse (2006): The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol* 136: 167-185. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.11.019.

COMBAR-COST-Action-CA16230 (2021): Faecal egg count reduction test (FECRT) Protocol gastrointestinal Nematodes. [https://www.combar-ca.eu/sites/default/files/CA16230-COMBAR-FECRT-Protocol-sheep-and-goats-online-high\\_res.pdf](https://www.combar-ca.eu/sites/default/files/CA16230-COMBAR-FECRT-Protocol-sheep-and-goats-online-high_res.pdf), 06.03.2023.

Conway, D. P. (1964): Variance in the effectiveness of thiabendazole against *Haemonchus contortus* in sheep. *Am J Vet Res* 25: 844-846.

Coop, R., A. Sykes and K. Angus (1979): The pathogenicity of daily intakes of *Cooperia oncophora* larvae in growing calves. *Veterinary Parasitology* 5: 261-269.

Craig, T. M. (2018): Gastrointestinal Nematodes, Diagnosis and Control. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 34: 185-199. DOI: 10.1016/j.cvfa.2017.10.008.

Cringoli, G., M. P. Maurelli, B. Levecke, A. Bosco, J. Vercruysse, J. Utzinger and L. Rinaldi (2017): The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nat Protoc* 12: 1723-1732. DOI: 10.1038/nprot.2017.067.

Cringoli, G., L. Rinaldi, M. P. Maurelli and J. Utzinger (2010): FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nat Protoc* 5: 503-515. DOI: 10.1038/nprot.2009.235.

Demeler, J. (2005): The physiological site of action and the site of resistance to the macrocyclic lactone anthelmintics in sheep parasitic trichostrongyloid nematodes. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

Demeler, J., U. Küttler, A. El-Abdellati, K. Stafford, A. Rydzik, M. Varady, F. Kenyon, G. Coles, J. Höglund, F. Jackson, J. Vercruysse and G. von Samson-Himmelstjerna (2010a): Standardization of the larval migration inhibition test for the detection of resistance to ivermectin in gastro intestinal nematodes of ruminants. *Vet Parasitol* 174: 58-64. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.08.020.

Demeler, J., U. Küttler and G. von Samson-Himmelstjerna (2010b): Adaptation and evaluation of three different in vitro tests for the detection of resistance to anthelmintics in gastro intestinal nematodes of cattle. *Vet Parasitol* 170: 61-70. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.01.032.

Demeler, J., A. M. Van Zeveren, N. Kleinschmidt, J. Vercruysse, J. Höglund, R. Koopmann, J. Cabaret, E. Claerebout, M. Areskog and G. von Samson-Himmelstjerna (2009): Monitoring the efficacy of ivermectin and albendazole against gastro intestinal nematodes of cattle in Northern Europe. *Vet Parasitol* 160: 109-115. DOI: 10.1016/j.vetpar.2008.10.030.

Deplazes, P., J. Eckert, G. von Samson-Himmelstjerna and H. Zahner (2012):  
Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Georg Thieme Verlag.

Dilks, C. M., S. R. Hahnel, Q. Sheng, L. Long, P. T. McGrath and E. C. Andersen  
(2020): Quantitative benzimidazole resistance and fitness effects of parasitic  
nematode beta-tubulin alleles. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug  
Resistance* 14: 28-36.

Dilks, C. M., E. J. Koury, C. M. Buchanan and E. C. Andersen (2021): Newly  
identified parasitic nematode beta-tubulin alleles confer resistance to benzimidazoles.  
*International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 17: 168-175.

Dorn, H. E. (1997): Untersuchungen zur Resistenz von Magen-Darm-Nematoden des  
Schafes gegen Anthelminthika auf Levamisol-und Mebendazolbasis. Hannover,  
Tierärztliche Hochschule, Diss.

Doyle, S. R., C. J. R. Illingworth, R. Laing, D. J. Bartley, E. Redman, A. Martinelli, N.  
Holroyd, A. A. Morrison, A. Rezansoff, A. Tracey, E. Devaney, M. Berriman, N.  
Sargison, J. A. Cotton and J. S. Gilleard (2019): Population genomic and evolutionary  
modelling analyses reveal a single major QTL for ivermectin drug resistance in the  
pathogenic nematode, *Haemonchus contortus*. *BMC Genomics* 20: 218. DOI:  
10.1186/s12864-019-5592-6.

Drudge, J. H., J. Szanto, Z. N. Wyant and G. Elam (1964): Field studies on parasite  
control in sheep: Comparison of thiabendazole, ruelene and phenothiazine. *Am J Vet  
Res* 25: 1512-1518.

Edmonds, M. D., E. G. Johnson and J. D. Edmonds (2010): Anthelmintic resistance  
of *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* to macrocyclic lactones in cattle from  
the western United States. *Vet Parasitol* 170: 224-229. DOI:  
10.1016/j.vetpar.2010.02.036.

El-Abdellati, A., J. Charlier, P. Geldhof, B. Levecke, J. Demeler, G. von Samson-Himmelstjerna, E. Claerebout and J. Vercruyse (2010): The use of a simplified faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy on Belgian and German cattle farms. *Vet Parasitol* 169: 352-357. DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.01.015.

Escudero, E., C. M. Carceles, M. S. Diaz, J. F. Sutra, P. Galtier and M. Alvinerie (1999): Pharmacokinetics of moxidectin and doramectin in goats. *Res Vet Sci* 67: 177-181. DOI: 10.1053/rvsc.1998.0304.

Falzon, L. C., T. J. O'Neill, P. I. Menzies, A. S. Peregrine, A. Jones-Bitton, J. vanLeeuwen and A. Mederos (2014): A systematic review and meta-analysis of factors associated with anthelmintic resistance in sheep. *Prev Vet Med* 117: 388-402. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2014.07.003.

Gatongi, P. M., J. M. Njoroge, M. E. Scott, S. Ranjan, J. M. Gathuma, W. K. Munyua, H. Cheruiyot and R. K. Prichard (2003): Susceptibility to IVM in a field strain of *Haemonchus contortus* subjected to four treatments in a closed sheep-goat flock in Kenya. *Vet Parasitol* 110: 235-240. DOI: 10.1016/s0304-4017(02)00318-7.

George, M. M., L. Lopez-Soberal, B. E. Storey, S. B. Howell and R. M. Kaplan (2018): Motility in the L3 stage is a poor phenotype for detecting and measuring resistance to avermectin/milbemycin drugs in gastrointestinal nematodes of livestock. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 8: 22-30. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2017.12.002.

Gerhard, A. P., J. Krücken, C. Neveu, C. L. Charvet, A. Harmache and G. von Samson-Himmelstjerna (2021): Pharyngeal Pumping and Tissue-Specific Transgenic P-Glycoprotein Expression Influence Macrocyclic Lactone Susceptibility in *Caenorhabditis elegans*. *Pharmaceuticals (Basel)* 14. DOI: 10.3390/ph14020153.

Geurden, T., C. Chartier, J. Fanke, A. F. di Regalbono, D. Traversa, G. von Samson-Himmelstjerna, J. Demeler, H. B. Vanimiseti, D. J. Bartram and M. J. Denwood (2015): Anthelmintic resistance to ivermectin and moxidectin in gastrointestinal nematodes of cattle in Europe. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 5: 163-171. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2015.08.001.

Geurden, T., E. R. Smith, J. Vercruyssen, T. Yazwinski, T. Settje and M. K. Nielsen (2022): World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP) guideline for the evaluation of the efficacy of anthelmintics in food-producing and companion animals: general guidelines. *Vet Parasitol* 304: 109698. DOI: 10.1016/j.vetpar.2022.109698.

Gibson, S. B., E. Ness-Cohn and E. C. Andersen (2022): Benzimidazoles cause lethality by inhibiting the function of *Caenorhabditis elegans* neuronal beta-tubulin. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 20: 89-96. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2022.10.004.

Gill, J. H., J. M. Redwin, J. A. van Wyk and E. Lacey (1991): Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 21: 771-776. DOI: 10.1016/0020-7519(91)90144-v.

Gilleard, J. S., A. C. Kotze, D. Leathwick, A. J. Nisbet, T. N. McNeilly and B. Besier (2021): A journey through 50 years of research relevant to the control of gastrointestinal nematodes in ruminant livestock and thoughts on future directions. *Int J Parasitol* 51: 1133-1151. DOI: 10.1016/j.ijpara.2021.10.007.

Gokbulut, C., H. S. Yalinkilinc, D. Aksit and V. Veneziano (2014): Comparative pharmacokinetics of levamisole-oxyclozanide combination in sheep and goats following per os administration. *Can J Vet Res* 78: 316-320.

Hamel, D., A. Bosco, L. Rinaldi, G. Cringoli, K. H. Kaulfuß, M. Kellermann, J. Fischer, H. Wang, K. Kley, S. Mayr, R. Rauh, M. Visser, T. Wiefel, B. Fankhauser and S. Rehbein (2017): Eprinomectin pour-on (EPRINEX® Pour-on, Merial): efficacy against gastrointestinal and pulmonary nematodes and pharmacokinetics in sheep. *BMC Vet Res* 13: 148. DOI: 10.1186/s12917-017-1075-7.

Hennessy, D. R., N. C. Sangster, J. W. Steel and G. H. Collins (1993a): Comparative pharmacokinetic behaviour of albendazole in sheep and goats. *Int J Parasitol* 23: 321-325. DOI: 10.1016/0020-7519(93)90006-k.

Hennessey, D. R., N. C. Sangster, J. W. Steel and G. H. Collins (1993b): Comparative pharmacokinetic disposition of closantel in sheep and goats. *J Vet Pharmacol Ther* 16: 254-260. DOI: 10.1111/j.1365-2885.1993.tb00172.x.

Hertzberg, H. and C. Bauer (2000): Anthelmintic resistance in gastrointestinal Strongylidae in sheep and goats: new data on prevalence, epidemiology, preventive measures and alternatives to anthelmintic drugs. *Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift* 113: 122-128.

Hinney, B., S. Wiedermann, W. Kaiser, J. Krücken and A. Joachim (2022): Eprinomectin and Moxidectin Resistance of Trichostrongyloids on a Goat Farm in Austria. *Pathogens* 11. DOI: 10.3390/pathogens11050498.

Hughes, P. L., A. F. Dowling and A. P. Callinan (2007): Resistance to macrocyclic lactone anthelmintics and associated risk factors on sheep farms in the lower North Island of New Zealand. *N Z Vet J* 55: 177-183. DOI: 10.1080/00480169.2007.36764.

Jabbar, A., Z. Iqbal, D. Kerboeuf, G. Muhammad, M. N. Khan and M. Afaq (2006): Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life Sci* 79: 2413-2431. DOI: 10.1016/j.lfs.2006.08.010.

Jack, C., E. Hotchkiss, N. D. Sargison, L. Toma, C. Milne and D. J. Bartley (2017): A quantitative analysis of attitudes and behaviours concerning sustainable parasite control practices from Scottish sheep farmers. *Prev Vet Med* 139: 134-145. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2017.01.018.

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

Kahl, A., G. von Samson-Himmelstjerna, J. Krücken and M. Ganter (2021): Chronic wasting due to liver and rumen flukes in sheep. *Animals* 11: 549.

Kaplan, R. M. (2004): Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 20: 477-481. DOI: 10.1016/j.pt.2004.08.001.

Kaplan, R. M. (2020): Biology, Epidemiology, Diagnosis, and Management of Anthelmintic Resistance in Gastrointestinal Nematodes of Livestock. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 36: 17-30. DOI: 10.1016/j.cvfa.2019.12.001.

Kaplan, R. M., M. J. Denwood, M. K. Nielsen, S. M. Thamsborg, P. R. Torgerson, J. S. Gilleard, R. J. Dobson, J. Vercruyssen and B. Levecke (2023): World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guideline for diagnosing anthelmintic resistance using the faecal egg count reduction test in ruminants, horses and swine. *Vet Parasitol* 318: 109936. DOI: 10.1016/j.vetpar.2023.109936.

Kenyon, F., F. Hutchings, C. Morgan-Davies, J. van Dijk and D. J. Bartley (2017): Worm Control in Livestock: Bringing Science to the Field. *Trends Parasitol* 33: 669-677. DOI: 10.1016/j.pt.2017.05.008.

Khan, S., A. Nisar, J. Yuan, X. Luo, X. Dou, F. Liu, X. Zhao, J. Li, H. Ahmad, S. A. Mehmood and X. Feng (2020): A Whole Genome Re-Sequencing Based GWA Analysis Reveals Candidate Genes Associated with Ivermectin Resistance in *Haemonchus contortus*. *Genes (Basel)* 11. DOI: 10.3390/genes11040367.

Kleinschmidt, N. (2010): Untersuchung zum Vorkommen von Anthelminthikaresistenzen bei erstsömmrigen Rindern in norddeutschen Milchviehbetrieben. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

Kleinschmidt, N., G. von Samson-Himmelstjerna, J. Demeler and R. Koopmann (2007): Untersuchung zum Vorkommen von Anthelminthikaresistenzen in norddeutschen Rinderbeständen. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

Knapp-Lawitzke, F. M.-L. (2016): Untersuchung möglicher Auswirkungen des Klimawandels auf das Vorkommen und die Anthelminthikaresistenzentwicklung von trichostrongyliden Weideparasiten des Rindes. Freie Universität Berlin (Germany).

Kotze, A. C., J. S. Gilleard, S. R. Doyle and R. K. Prichard (2020): Challenges and opportunities for the adoption of molecular diagnostics for anthelmintic resistance. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 14: 264-273. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2020.11.005.

Kotze, A. C., P. W. Hunt, P. Skuce, G. von Samson-Himmelstjerna, R. J. Martin, H. Sager, J. Krücken, J. Hodgkinson, A. Lespine and A. R. Jex (2014): Recent advances in candidate-gene and whole-genome approaches to the discovery of anthelmintic resistance markers and the description of drug/receptor interactions. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 4: 164-184.

Kotze, A. C. and R. K. Prichard (2016): Anthelmintic Resistance in *Haemonchus contortus*: History, Mechanisms and Diagnosis. *Adv Parasitol* 93: 397-428. DOI: 10.1016/bs.apar.2016.02.012.

Krücken, J., K. Fraundorfer, J. C. Mugisha, S. Ramünke, K. C. Sifft, D. Geus, F. Habarugira, J. Ndoli, A. Sendegeya, C. Mukampunga, C. Bayingana, T. Aebischer, J. Demeler, J. B. Gahutu, F. P. Mockenhaupt and G. von Samson-Himmelstjerna (2017): Reduced efficacy of albendazole against *Ascaris lumbricoides* in Rwandan schoolchildren. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 7: 262-271. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2017.06.001.

Lacey, E. (1988): The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol* 18: 885-936. DOI: 10.1016/0020-7519(88)90175-0.

Lacey, E., J. Redwin, J. Gill, V. Demargheriti and P. Waller (1990): A larval development assay for the simultaneous detection of broad spectrum anthelmintic resistance. *Resistance of Parasites to Antiparasitic Drugs.*: 177-184.

Laing, R., S. R. Doyle, J. McIntyre, K. Maitland, A. Morrison, D. J. Bartley, R. Kaplan, U. Chaudhry, N. Sargison, A. Tait, J. A. Cotton, C. Britton and E. Devaney (2022): Transcriptomic analyses implicate neuronal plasticity and chloride homeostasis in ivermectin resistance and response to treatment in a parasitic nematode. *PLoS Pathog* 18: e1010545. DOI: 10.1371/journal.ppat.1010545.

Lamb, J., T. Elliott, M. Chambers and B. Chick (2017): Broad spectrum anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in Northern NSW of Australia. *Vet Parasitol* 241: 48-51. DOI: 10.1016/j.vetpar.2017.05.008.

Lawrence, K. E., A. P. Rhodes, R. Jackson, D. M. Leathwick, C. Heuer, W. E. Pomroy, D. M. West, T. S. Waghorn and J. R. Moffat (2006): Farm management practices associated with macrocyclic lactone resistance on sheep farms in New Zealand. *N Z Vet J* 54: 283-288. DOI: 10.1080/00480169.2006.36712.

Le Jambre, L. F., J. H. Gill, I. J. Lenane and E. Lacey (1995): Characterisation of an avermectin resistant strain of Australian *Haemonchus contortus*. *Int J Parasitol* 25: 691-698. DOI: 10.1016/0020-7519(94)00200-8.

Leathwick, D., B. Hosking, S. Bisset and C. McKay (2009): Managing anthelmintic resistance: is it feasible in New Zealand to delay the emergence of resistance to a new anthelmintic class? *New Zealand Veterinary Journal* 57: 181-192.

Levecke, B., L. Rinaldi, J. Charlier, M. P. Maurelli, M. E. Morgoglione, J. Vercruysse and G. Cringoli (2011): Monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes when faecal egg counts are low: do the analytic sensitivity and the formula matter? *Parasitol Res* 109: 953-957. DOI: 10.1007/s00436-011-2338-z.

Mahoney, A. R., M. M. Safaei, W. M. Wuest and A. L. Furst (2021): The silent pandemic: Emergent antibiotic resistances following the global response to SARS-CoV-2. *iScience* 24: 102304. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102304.

Martin, P. and L. Le Jambre (1979): Larval paralysis as an in vitro assay of levamisole and morantel tartrate resistance in *Ostertagia*. *Veterinary Science Communications* 3: 159-164.

Martin, P. J., N. Anderson and R. G. Jarrett (1989): Detecting benzimidazole resistance with faecal egg count reduction tests and in vitro assays. *Aust Vet J* 66: 236-240. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1989.tb13578.x.

McArthur, M. and C. Reinemeyer (2014): Herding the US cattle industry toward a paradigm shift in parasite control. *Veterinary parasitology* 204: 34-43.

McIntyre, J., K. Hamer, A. A. Morrison, D. J. Bartley, N. Sargison, E. Devaney and R. Laing (2018): Hidden in plain sight - Multiple resistant species within a strongyle community. *Vet Parasitol* 258: 79-87. DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.06.012.

Melville, L. A., J. Van Dijk, S. Mitchell, G. Innocent and D. J. Bartley (2020): Variation in hatching responses of *Nematodirus battus* eggs to temperature experiences. *Parasit Vectors* 13: 494. DOI: 10.1186/s13071-020-04368-9.

Metzker, M. L. (2010): Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11: 31-46. DOI: 10.1038/nrg2626.

Meyer, M., G. v. Samson-Himmelstjerna, P. Witzmann and D. Winter (2020): Entwurmung bei Pferden—Analyse der tierärztlichen Sichtweise. *Der Praktische Tierarzt* 101.

Moore, H., F. Pandolfi and I. Kyriazakis (2016): Familiarity with and uptake of alternative methods to control sheep gastro-intestinal parasites on farms in England. *Vet Parasitol* 221: 1-8. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.03.002.

Morgan, E. R., L. Cavill, G. E. Curry, R. M. Wood and E. S. Mitchell (2005): Effects of aggregation and sample size on composite faecal egg counts in sheep. *Vet Parasitol* 131: 79-87. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.04.021.

Morgan, E. R., B. C. Hosking, S. Burston, K. M. Carder, A. C. Hyslop, L. J. Pritchard, A. K. Whitmarsh and G. C. Coles (2012): A survey of helminth control practices on sheep farms in Great Britain and Ireland. *Vet J* 192: 390-397. DOI: 10.1016/j.tvjl.2011.08.004.

Moritz, E. I. (2005): Ein Beitrag zum Befall mit Endoparasiten und zum Nachweis von Benzimidazolresistenzen bei Magen-Darm-Strongyliden der Schafe in Niedersachsen. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

Muniz, M. S., K. Halbach, I. C. A. Araruna, R. X. Martins, B. Seiwert, O. Lechtenfeld, T. Reemtsma and D. Farias (2021): Moxidectin toxicity to zebrafish embryos: Bioaccumulation and biomarker responses. *Environmental Pollution* 283: 117096.

O'Shaughnessy, J., B. Earley, J. F. Mee, M. L. Doherty, P. Crosson, D. Barrett, M. Macrelli and T. de Waal (2014): Nematode control in spring-born suckler beef calves using targeted selective anthelmintic treatments. *Vet Parasitol* 205: 150-157. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.07.009.

Perbix, C. (2008): Die Resistenzlage von Magen-Darm-Strongyliden gegenüber Moxidectin in deutschen Schafherden. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

Pfüller, H. (1990): In-vitro-und In-vivo-Untersuchungen zur Anthelminthika-Resistenz bei Nematoden-Infektionen von Schaf und Pferd. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Diss.

Ploeger, H. W. and R. R. Everts (2018): Alarming levels of anthelmintic resistance against gastrointestinal nematodes in sheep in the Netherlands. *Vet Parasitol* 262: 11-15. DOI: 10.1016/j.vetpar.2018.09.007.

Pollott, G. and J. Greeff (2004): Genetic relationships between faecal egg count and production traits in commercial Merino sheep flocks. *Animal Science* 79: 21-32.

Preston, J. M. and E. W. Allonby (1979): The influence of breed on the susceptibility of sheep of *Haemonchus contortus* infection in Kenya. *Res Vet Sci* 26: 134-139.

Prichard, R. K. and T. G. Geary (2019): Perspectives on the utility of moxidectin for the control of parasitic nematodes in the face of developing anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 10: 69-83.

Queiroz, C., M. Levy, R. Avramenko, E. Redman, K. Kearns, L. Swain, H. Silas, F. Uehlinger and J. S. Gilleard (2020): The use of ITS-2 rDNA nemabiome metabarcoding to enhance anthelmintic resistance diagnosis and surveillance of

ovine gastrointestinal nematodes. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 14: 105-117. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2020.09.003.

R Core Team, R. C. (2009): A language and environment for statistical computing. <http://www.R-project.org>, 03.03.2023.

Ramos, F., L. P. Portella, F. S. Rodrigues, C. Z. Reginato, L. Pötter, A. S. Cezar, L. A. Sangioni and F. S. F. Vogel (2016): Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes of beef cattle in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 6: 93-101. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2016.02.002.

Raza, A., J. Lamb, M. Chambers, P. W. Hunt and A. C. Kotze (2016): Larval development assays reveal the presence of sub-populations showing high- and low-level resistance in a monepantel (Zolvix®)-resistant isolate of *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 220: 77-82. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.02.031.

Redman, E., C. Queiroz, D. J. Bartley, M. Levy, R. W. Avramenko and J. S. Gilleard (2019): Validation of ITS-2 rDNA nemabiome sequencing for ovine gastrointestinal nematodes and its application to a large scale survey of UK sheep farms. *Vet Parasitol* 275: 108933. DOI: 10.1016/j.vetpar.2019.108933.

Rendell, D. K. (2010): Anthelmintic resistance in cattle nematodes on 13 south-west Victorian properties. *Aust Vet J* 88: 504-509. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2010.00648.x.

Roeber, F., A. R. Jex and R. B. Gasser (2015): A real-time PCR assay for the diagnosis of gastrointestinal nematode infections of small ruminants. *Methods Mol Biol* 1247: 145-152. DOI: 10.1007/978-1-4939-2004-4\_10.

Roeber, F. and L. Kahn (2014): The specific diagnosis of gastrointestinal nematode infections in livestock: larval culture technique, its limitations and alternative DNA-based approaches. *Vet Parasitol* 205: 619-628. DOI: 10.1016/j.vetpar.2014.08.005.

Rose, H., T. Wang, J. van Dijk and E. R. Morgan (2015): GLOWORM-FL: a simulation model of the effects of climate and climate change on the free-living stages of gastro-intestinal nematode parasites of ruminants. *Ecological Modelling* 297: 232-245.

Rose Vineer, H., E. R. Morgan, H. Hertzberg, D. J. Bartley, A. Bosco, J. Charlier, C. Chartier, E. Claerebout, T. de Waal, G. Hendrickx, B. Hinney, J. Höglund, J. Ježek, M. Kašný, O. M. Keane, M. Martínez-Valladares, T. L. Mateus, J. McIntyre, M. Mickiewicz, A. M. Munoz, C. J. Phythian, H. W. Ploeger, A. V. Rataj, P. J. Skuce, S. Simin, S. Sotiraki, M. Spinu, S. Stuen, S. M. Thamsborg, J. Vadlejch, M. Varady, G. von Samson-Himmelstjerna and L. Rinaldi (2020): Increasing importance of anthelmintic resistance in European livestock: creation and meta-analysis of an open database. *Parasite* 27: 69. DOI: 10.1051/parasite/2020062.

Rose Vineer, H., F. Vande Velde, K. Bull, E. Claerebout and E. R. Morgan (2017): Attitudes towards worm egg counts and targeted selective treatment against equine cyathostomins. *Prev Vet Med* 144: 66-74. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2017.05.002.

Rossanigo, C. E. and L. Gruner (1995): Moisture and temperature requirements in faeces for the development of free-living stages of gastrointestinal nematodes of sheep, cattle and deer. *J Helminthol* 69: 357-362. DOI: 10.1017/s0022149x00014954.

Sangster, N., H. Whitlock, I. Russ, M. Gunawan, D. Griffin and J. Kelly (1979): *Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* resistant to levamisole, morantel tartrate and thiabendazole: occurrence of field strains. *Research in veterinary science* 27: 106-110.

Sangster, N. C. and R. J. Dobson (2002): Anthelmintic resistance. The biology of nematodes, CRC Press: 531-567.

Sargison, N., F. Jackson, D. Bartley, D. Wilson, L. Stenhouse and C. Penny (2007): Observations on the emergence of multiple anthelmintic resistance in sheep flocks in the south-east of Scotland. *Veterinary parasitology* 145: 65-76.

Sargison, N., D. Wilson and P. Scott (2009): Relative inefficacy of pour-on macrocyclic lactone anthelmintic treatments against *Cooperia* species in Highland calves. *Vet Rec* 164: 603-604. DOI: 10.1136/vr.164.19.603.

Scheuerle, M. C., M. Mahling and K. Pfister (2009): Anthelmintic resistance of *Haemonchus contortus* in small ruminants in Switzerland and Southern Germany. *Wien Klin Wochenschr* 121 Suppl 3: 46-49. DOI: 10.1007/s00508-009-1235-2.

Schramm, E. (2020): Vorkommen von gastro-intestinalen Helminthen und Anthelminthika-Wirksamkeit bei Rinderbetrieben in Schleswig-Holstein. Fachhochschule Kiel.

Smith, J. M. and R. K. Prichard (2002): Localization of p-glycoprotein mRNA in the tissues of *Haemonchus contortus* adult worms and its relative abundance in drug-selected and susceptible strains. *J Parasitol* 88: 612-620. DOI: 10.1645/0022-3395(2002)088[0612:Lopgmi]2.0.Co;2.

Sniehotta, F. F., U. Scholz and R. Schwarzer (2005): Bridging the intention-behaviour gap: Planning, self-efficacy, and action control in the adoption and maintenance of physical exercise. *Psychology & health* 20: 143-160.

Southcott, W. and I. Barger (1975): Control of nematode parasites by grazing management—II. Decontamination of sheep and cattle pastures by varying periods of grazing with the alternate host. *International Journal for Parasitology* 5: 45-48.

Suter, R. J., R. B. Besier, N. R. Perkins, I. D. Robertson and H. M. Chapman (2004): Sheep-farm risk factors for ivermectin resistance in *Ostertagia circumcincta* in Western Australia. *Prev Vet Med* 63: 257-269. DOI:10.1016/j.prevetmed.2004.01.005.

Sutherland, I. (1990): Veterinary use of ivermectin. *Acta Leidensia* 59: 211-216.

Sutherland, I. A. and D. M. Leathwick (2011): Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends Parasitol* 27: 176-181. DOI:10.1016/j.pt.2010.11.008.

Tierärzteblatt, D. (2022): Statistik der Tierärzteschaft in der Bundesrepublik Deutschland Bundestierärztekammer BTK: S. 762-772.

Torgerson, P. R., M. Paul and F. I. Lewis (2012): The contribution of simple random sampling to observed variations in faecal egg counts. *Vet Parasitol* 188: 397-401. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.03.043.

van Wyk, J. A. and E. Mayhew (2013): Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: a practical lab guide. *Onderstepoort J Vet Res* 80: 539. DOI: 10.4102/ojvr.v80i1.539.

Vande Velde, F., J. Charlier and E. Claerebout (2018b): Farmer Behavior and Gastrointestinal Nematodes in Ruminant Livestock-Uptake of Sustainable Control Approaches. *Front Vet Sci* 5: 255. DOI: 10.3389/fvets.2018.00255.

Vande Velde, F., J. Charlier, L. Hudders, V. Cauberghe and E. Claerebout (2018a): Beliefs, intentions, and beyond: A qualitative study on the adoption of sustainable gastrointestinal nematode control practices in Flanders' dairy industry. *Prev Vet Med* 153: 15-23. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2018.02.020.

Verschave, S. H., H. Rose, E. R. Morgan, E. Claerebout, J. Vercruyssen and J. Charlier (2016): Modelling *Cooperia oncophora*: Quantification of key parameters in the parasitic phase. *Vet Parasitol* 223: 111-114. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.04.035.

VETIDATA-Datenbank (2023): Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittel Anwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht. <https://vetidata.de/>, 16.03.2023.

Voigt, K., M. Geiger, M. C. Jäger, G. Knubben-Schweizer, C. Strube and Y. Zablotski (2022): Effectiveness of Anthelmintic Treatments in Small Ruminants in Germany. *Animals (Basel)* 12. DOI: 10.3390/ani12121501.

Voigt, K., M. Scheuerle, D. Hamel and K. Pfister (2012): [High perinatal mortality associated with triple anthelmintic resistance in a German sheep flock]. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 40: 107-111.

von Samson-Himmelstjerna, G., G. C. Coles, F. Jackson, C. Bauer, F. Borgsteede, V. Y. Cirak, J. Demeler, A. Donnan, P. Dorny, C. Epe, A. Harder, J. Höglund, R. Kaminsky, D. Kerboeuf, U. Küttler, E. Papadopoulos, J. Posedi, J. Small, M. Várady, J. Vercruysse and N. Wirtherle (2009): Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitol Res* 105: 825-834. DOI: 10.1007/s00436-009-1466-1.

von Samson-Himmelstjerna, G., A. Harder and T. Schnieder (2002): Quantitative analysis of ITS2 sequences in trichostrongyle parasites. *Int J Parasitol* 32: 1529-1535. DOI: 10.1016/s0020-7519(02)00163-7.

Waghorn, T. S., D. M. Leathwick, A. P. Rhodes, R. Jackson, W. E. Pomroy, D. M. West and J. R. Moffat (2006): Prevalence of anthelmintic resistance on 62 beef cattle farms in the North Island of New Zealand. *N Z Vet J* 54: 278-282. DOI: 10.1080/00480169.2006.36711.

Waghorn, T. S., C. M. Miller and D. M. Leathwick (2016): Confirmation of ivermectin resistance in *Ostertagia ostertagi* in cattle in New Zealand. *Vet Parasitol* 229: 139-143. DOI: 10.1016/j.vetpar.2016.10.011.

Wagland, B. M., W. O. Jones, L. Hribar, T. Bendixsen and D. L. Emery (1992): A new simplified assay for larval migration inhibition. *Int J Parasitol* 22: 1183-1185. DOI: 10.1016/0020-7519(92)90040-r.

Wang, C. and R. Furrer (2018): eggCounts: a Bayesian hierarchical toolkit to model faecal egg count reductions. *arXiv preprint arXiv:1804.11224*.

Wang, C., P. R. Torgerson, R. M. Kaplan, M. M. George and R. Furrer (2018):

Modelling anthelmintic resistance by extending eggCounts package to allow individual efficacy. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 8: 386-393. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2018.07.003.

Whittaker, J., S. Carlson, D. Jones and M. Brewer (2017): Molecular mechanisms for anthelmintic resistance in strongyle nematode parasites of veterinary importance. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 40: 105-115.

Williamson, S. M., B. Storey, S. Howell, K. M. Harper, R. M. Kaplan and A. J. Wolstenholme (2011): Candidate anthelmintic resistance-associated gene expression and sequence polymorphisms in a triple-resistant field isolate of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol* 180: 99-105. DOI: 10.1016/j.molbiopara.2011.09.003.

Wood, I. B., N. K. Amaral, K. Bairden, J. L. Duncan, T. Kassai, J. B. Malone, Jr., J. A. Pankavich, R. K. Reinecke, O. Slocombe, S. M. Taylor and et al. (1995): World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Vet Parasitol* 58: 181-213. DOI: 10.1016/0304-4017(95)00806-2.

Workentine, M. L., R. Chen, S. Zhu, S. Gavriiliuc, N. Shaw, J. Rijke, E. M. Redman, R. W. Avramenko, J. Wit, J. Poissant and J. S. Gilleard (2020): A database for ITS2 sequences from nematodes. *BMC Genet* 21: 74. DOI: 10.1186/s12863-020-00880-0.

Zajac, A. M. and J. Garza (2020): Biology, Epidemiology, and Control of Gastrointestinal Nematodes of Small Ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 36: 73-87. DOI: 10.1016/j.cvfa.2019.12.005.

Zhang, X., P. Zhang, V. Perez-Rodriguez, C. L. Souders, 2nd and C. J. Martyniuk (2020): Assessing the toxicity of the benzamide fungicide zoxamide in zebrafish (*Danio rerio*): Towards an adverse outcome pathway for beta-tubulin inhibitors. *Environ Toxicol Pharmacol* 78: 103405. DOI: 10.1016/j.etap.2020.103405.

## 10 Anhang

### Flyer Schafbetriebe



## Schafzucht - Testbetriebe für Studie gesucht

Wir suchen engagierte Schafhalter in Brandenburg für eine Forschungsstudie zum Thema

***„Resistenzen von Magen-Darm Strongyliden gegen gängige Entwurmungsmittel bei Schafen“***

Dazu planen wir ab September 2020 Besuche bei interessierten Betrieben, die

- Schafe mit Weidegang halten
- erst- und zweitsömmrige Jungtiere (10 - 60 Jungtiere) besitzen
- ihre Tiere im September / Oktober für mindestens 8 Wochen nicht entwurmt haben (und keine Entwurmungsboli verwenden)
- eventuell - nicht zwingend - bereits ein Problem mit Wurminfektionen haben

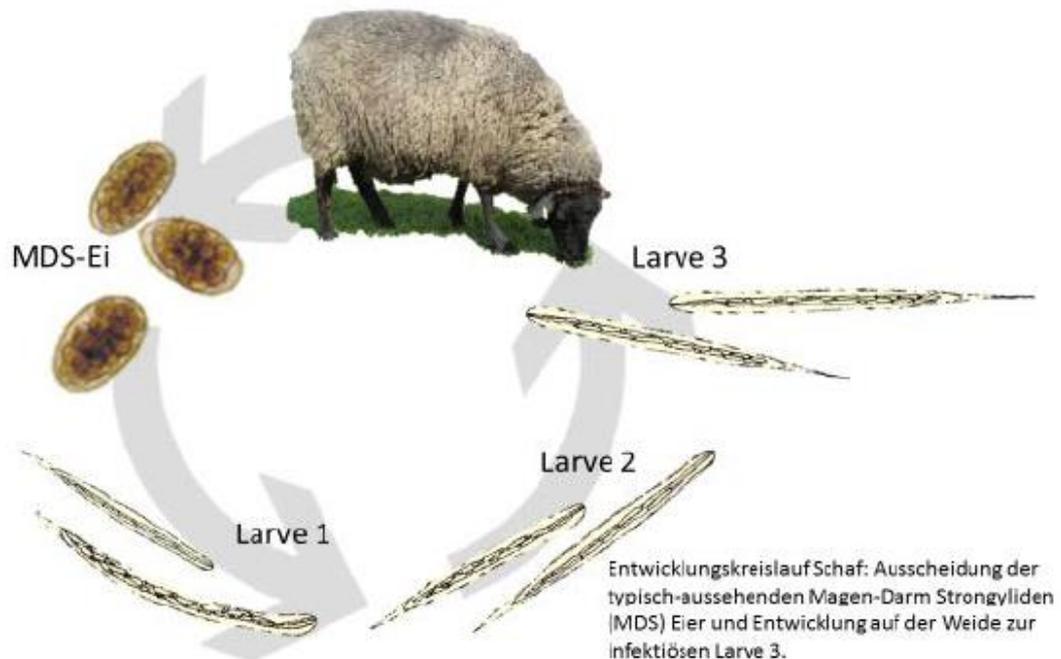
#### **Ihre Vorteile:**

- Wir ermitteln die Resistenzlage in Ihrem Bestand: Zusammensetzung der Würmer, Vorhandensein resistenter Stämme und Stämme mit Resistenz-assoziierten Gensequenzen
- Wir behandeln bis zu 60 Ihrer Jungtiere

Gerne informieren wir Sie unverbindlich, beantworten Ihre Fragen und finden heraus, ob Ihr Betrieb infrage kommt. Wir freuen uns auf Ihren Anruf oder Ihre E-Mail.

**Kontakt: Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, FU Berlin  
Paula Ehnert , Mobil-Tel: 015751111062, Tel: 030 - 838 623 24,  
[paula.ehnert@fu-berlin.de](mailto:paula.ehnert@fu-berlin.de), Robert-von-Ostertag-Str. 7-13, 14163 Berlin**

Bei einer klinischen Infektion eines Jungtieres fallen eine, teils hochgradige, Abmagerung mit Fress- und Bewegungsunlust, sowie durchfallverursachte Kotverschmutzungen am Vließ auf. Dazu finden sich in der klinischen Untersuchung teils blasse Schleimhäute (v.a. bei *Haemonchus*-Infektion) und Ödeme an Kehlgang, Wamme oder Unterbrust.



Resistenzen sind inzwischen für alle Entwurmungsmedikamente aus den Gruppen der Benzimidazole (Fenbendazol), sowie auch für die Makrozyklischen Laktone (Ivermectin, Moxidectin) auch für Europa beschrieben. Wie die Situation in Deutschland genau aussieht, ist nur durch einige, wenige Daten belegt. Ziel der Studie ist es deshalb herauszufinden, welche Spezies in Brandenburg vorkommen und ob es bereits Resistenzen gegen gängige Entwurmungsmittel gibt.

**Kontakt: Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, FU Berlin**  
**Paula Ehnert**, Mobil-Tel: 015751111062, Tel: 030 - 838 623 24,  
[paula.ehnert@fu-berlin.de](mailto:paula.ehnert@fu-berlin.de), Robert-von-Ostertag-Str. 7-13, 14163 Berlin

Zum Ablauf:

- **Tag 1:** Rektale Kotprobennahme der Jungtiere und Ausfüllen eines Fragebogens
- Tag 2: Auswertung der Proben hinsichtlich der Eizahl im Institut
- **Tag 3:** Es erfolgt eine zufällige Einteilung in 3 Versuchsgruppen à 20 Tiere auf Grundlage der Probenergebnisse: Pro Versuchsgruppe wird ein handelsübliches Medikament angewandt, das einen der folgenden Wirkstoffe enthält: Ivermectin, Moxidectin, Fenbendazol
- **Nach 14 Tagen** (+/- 2 Tage) erneute Probennahme bei den bis zu 60 Tieren
- Das gesammelte Kotprobenmaterial wird im Labor auf resistente Wurmstämme und das Vorhandensein von Resistenzassoziierten-Genen untersucht.

**Für Sie wichtig: Innerhalb dieser 14 Tage besuchen wir Ihren Betrieb drei Mal!**

#### **Hintergrund zur Studie:**

Die Nematoden (Rundwürmer) der Familie Trichostrongylidae sind Auslöser des Krankheitsbilds der parasitären Gastroenteritis und verursachen jährlich große wirtschaftliche Verluste bei kommerziellen Schaf- und Rinderhaltern weltweit. Primär betroffen sind Jungtiere, die in den ersten Jahren auf der Weide gehalten werden, da sie eine noch ungenügende Immunität gegen diese Infektion besitzen.

Beim Schaf finden sich häufig Vertreter der Spezies *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp., *Cooperia* spp., *Teladorsagia* spp. und *Nematodirus* spp (spp.: Spezies). Davon ist *Haemonchus* am gefährlichsten für die Lämmer, weil sich das dritte Larvenstadium in der Labmagenschleimhaut festsetzt und eine nicht unerhebliche Menge Blut saugt und verdaut. Bei einer Infektion mit vielen Wurmlarven erleidet das Tier einen hohen, innerlichen Blutverlust.

**Kontakt: Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, FU Berlin**  
**Paula Ehnert**, Mobil-Tel: 015751111062, Tel: 030 - 838 623 24,  
[paula.ehnert@fu-berlin.de](mailto:paula.ehnert@fu-berlin.de), Robert-von-Ostertag-Str. 7-13, 14163 Berlin

## Fragebogen Schafbetriebe

### Umfrage zu Anthelminthika Einsatz bei Schafen in Brandenburg

<u>Betriebsangaben</u>	
1) Betriebsname	_____
2) Betriebsinhaber / Name des Schäfers	_____
3) Anschrift (Str., PLZ, Ort)	_____
4) Kontaktdaten: (Email, Telefon, Fax)	_____
5) Zuständiges Veterinäramt, Name des Hoftierarztes	_____
6) VVO-Nummer	_____
7) Gehaltene Schafrassen	_____
8) Weitere Tiere auf dem Betrieb	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
a. Rinder	_____ Entwurmt? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
b. Ziegen / Neuweltkameliden	_____ Entwurmt? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
c. Sonstige	_____
9) Datum des Betriebsbesuchs	_____

<u>Angaben zur Schafhaltung</u>	
10) Gesamtanzahl Schafe	_____ Schafe
a. Davon Muttertiere	_____ Muttertiere
b. Davon Böcke	_____ Böcke
c. Davon Jungschafe (1-2 J)	_____ Jungschafe
d. Davon Lämmer (< 1 J)	_____ Lämmer
11) Nutzungsrichtung:	<input type="checkbox"/> Wolle <input type="checkbox"/> Fleisch <input type="checkbox"/> Milch <input type="checkbox"/> Hobby
	<input type="checkbox"/> Landschafts- / Deichpflege <input type="checkbox"/> _____
12) Haupt-, Nebenerwerb, Hobbyhaltung?	<input type="checkbox"/> Haupterwerb <input type="checkbox"/> Nebenerwerb <input type="checkbox"/> Hobby
13) Wie viele Zukäufe pro Jahr? Und aus welchen Regionen?	_____ <input type="checkbox"/> aus Brandenburg
	_____ <input type="checkbox"/> Andere:
14) Haltungsform	<input type="checkbox"/> offene Stallhaltung
	<input type="checkbox"/> Wanderschäferei <input type="checkbox"/> Deichschäferei
	<input type="checkbox"/> Koppelschafhaltung <input type="checkbox"/> Hütehaltung
	<input type="checkbox"/> Sonstiges

15) Größe der beweideten Fläche(n)?	_____ km <sup>2</sup> / ha
16) Werden die Schafe aufgestallt?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
17) Zeitpunkt der Aufstallung im Winter? Zeitpunkt des Weideaustriebs im Frühling?	_____ _____
18) Wo stehen ihre Tiere auf der Weide?	<input type="checkbox"/> Freie Fläche <input type="checkbox"/> am Waldrand <input type="checkbox"/> an Gewässern <input type="checkbox"/> Sonstiges _____
19) Welche Weideart wird genutzt?	<input type="checkbox"/> Standweide <input type="checkbox"/> Umtriebsweide <input type="checkbox"/> Portionsweide <input type="checkbox"/> Deichschäferei <input type="checkbox"/> Wanderschäferei <input type="checkbox"/> Sonstiges _____
20) Werden die Schafe zum Nachweiden auf Rinderweiden gehalten?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
21) Wie werden die Schafe auf der Weide getränkt?	<input type="checkbox"/> Tränkebecken <input type="checkbox"/> Trog <input type="checkbox"/> Zugang zu natürlichen Wasserquellen

<u>Entwurmung</u>	
22) Werden Ihre Schafe regelmäßig entwurmt?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
23) Wenn ja, welche Altersgruppen werden wie oft und wann entwurmt?	
a. Lämmer (<1 J.)	_____ Mal pro Jahr, Daten: _____
b. Jungschafe (1-2 J.)	_____ Mal pro Jahr, Daten: _____
c. Adulte (>2 J.)	_____ Mal pro Jahr, Daten: _____
24) Werden bei einem Behandlungstermin alle zusammenlebenden Tiere der jeweiligen Gruppe gleichzeitig entwurmt?	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
25) Welche Präparate oder Wirkstoffe wurden in den letzten Jahren verwendet? Wie oft?	_____
26) Wer entwurmt die Schafe?	<input type="checkbox"/> Tierhalter/ Mitarbeiter <input type="checkbox"/> Tierarzt <input type="checkbox"/> _____
27) Wie wird das Gewicht der Tiere für die Dosierung bestimmt?	<input type="checkbox"/> Tierwaage <input type="checkbox"/> Schätzung <input type="checkbox"/> _____
28) Wann und wie oft wurden in Ihrem Bestand eine Wurminfektion festgestellt (auch Schlachtbefunde)?	_____

<p>29) Haben Sie zur Behandlung von Magen-Darm Strongyloiden eines der folgenden Medikamente angewandt?</p> <p>a. Ivermectin (Alfamectin®, Qualimec®)</p> <p>b. Moxidectin (Cydectin®)</p> <p>c. Fenbendazol (Panacur®, Fenbandat®)</p> <p>d. Levamisol (Concurat®, Ripercol Drench®)</p> <p>e. Monepantel (Zolvix®)</p> <p>f. Andere</p> <p>30) Wird der Erfolg der Behandlung durch Kotprobenuntersuchungen kontrolliert?</p>	<p><input type="checkbox"/> ja _____ <input type="checkbox"/> nein, weil _____</p> <p><input type="checkbox"/> ja _____ <input type="checkbox"/> nein, weil _____</p> <p><input type="checkbox"/> ja _____ <input type="checkbox"/> nein, weil _____</p> <p><input type="checkbox"/> ja _____ <input type="checkbox"/> nein, weil _____</p> <p><input type="checkbox"/> ja _____ <input type="checkbox"/> nein, weil _____</p> <p>_____</p> <p><input type="checkbox"/> ja    <input type="checkbox"/> nein</p>
---	---

<p><u>Erkrankungen</u></p> <p>31) Hauptprobleme in Ihrem Bestand?</p> <p>32) Gründe für Verluste?</p> <p>33) Durchfallerkrankungen</p> <p>a. Lämmer (&lt; 1 J.)</p> <p>b. Jungschafe (1-2 J.)</p> <p>c. Adulte (&gt; 2 J.)</p> <p>34) Lämmerverluste durch Durchfall:</p> <p>35) Isolierung kranker Tiere ?</p> <p>36) Anämie?</p> <p>37) Wodurch festgestellt?</p>	<p><input type="checkbox"/> Klauen   <input type="checkbox"/> Euter   <input type="checkbox"/> Haut/Wollschäden</p> <p><input type="checkbox"/> Trächtigkeitstoxikosen   <input type="checkbox"/> Aborte</p> <p><input type="checkbox"/> _____</p> <p>_____</p> <p><input type="checkbox"/> Ja   <input type="checkbox"/> Eher ja   <input type="checkbox"/> Eher nein   <input type="checkbox"/> Nein</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p><input type="checkbox"/> ja    <input type="checkbox"/> nein</p> <p><input type="checkbox"/> ja    <input type="checkbox"/> nein</p> <p><input type="checkbox"/> ja    <input type="checkbox"/> nein</p> <p><input type="checkbox"/> Blutbild   <input type="checkbox"/> Visuell   <input type="checkbox"/> _____</p>
---	--

Zusatz - Umfrage zu Anthelminthika Einsatz bei Schafen in Brandenburg

<u>Persönliche Einschätzung zur Entwurmung</u>	
1) Wer plant die Wurmkontrolle?	<input type="checkbox"/> Tierhalter <input type="checkbox"/> Tierarzt <input type="checkbox"/> Tiergesundheitsdienst <input type="checkbox"/> _____
2) Sprechen Sie Entwurmungen mit Ihrem Tierarzt oder dem Tiergesundheitsdienst ab?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Nein
3) Fühlen Sie sich hinsichtlich der Entwurmungsstrategien ausreichend gut von Ihrem Tierarzt / dem Tiergesundheitsdienst beraten?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein
4) Wie sicher sind Sie sich bei Entscheidungen rund um die Entwurmung Ihrer Schafe?	<input type="checkbox"/> Sicher <input type="checkbox"/> Eher sicher <input type="checkbox"/> Eher unsicher <input type="checkbox"/> Unsicher
5) Fühlen Sie sich gut zum Thema Entwurmung informiert?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein
6) Würden Sie sich mehr Informationen zum Thema Entwurmung wünschen?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein
7) Halten Sie regelmäßige Kotkontrollen auf Ihrem Betrieb für sinnvoll?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein
<u>Nachtrag Schafhaltung, Zukäufe</u>	
8) Selektieren Sie zugekaufte Tiere von der Herde?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein
9) Entwurmen Sie zugekaufte Tiere bevor Sie Zugang zur Weide erhalten?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein
<u>Entwurmungsmanagement</u>	
10) Halten Sie es für sinnvoll alle Tiere einer Herde zu entwurmen?	<input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein
11) Führen Sie nach einer Entwurmung einen Weidewechsel durch?	<input type="checkbox"/> Immer <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein
12) Für wie wichtig halten Sie das Weidemanagement bei der Wurmkontrolle?	<input type="checkbox"/> Wichtig <input type="checkbox"/> Eher wichtig <input type="checkbox"/> Eher unwichtig <input type="checkbox"/> Unwichtig
13) Alternativen zu Entwurmungsmitteln – Welche sind Ihnen bekannt?	<input type="checkbox"/> Futtermittel (Tannine, Pilze) <input type="checkbox"/> Zuchtprogramme
14) Haben Sie bereits Erfahrungen mit einem der oben genannten Alternativen gemacht? Wenn ja, womit?	<input type="checkbox"/> Weidemanagement <input type="checkbox"/> Sonstige: _____ <input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Ja, und zwar _____

## Auswertung Fragebogen der Schafbetriebe

Frage	Anzahl Antworten der Betriebe 1-12
9) Weitere Tiere auf dem Betrieb	Ja: 2, Nein: 10
a. Rinder	1
b. Ziegen/Neuweltkameliden	1
c. Sonstige	0
10) Gesamtanzahl Schafe	48 - 3500 (Ø 813)
a. Muttertiere	27 - 1600 (Ø 408)
b. Böcke	2 - 20 (Ø 10)
c. Zutreter 1-2 J	16 - 800 (Ø 87)
d. Lämmer <1 J	10 - 800 (Ø 122)
11) Nutzungsrichtung Wolle (W), Fleisch (F), Milch (M), Hobby (H), Landschaftspflege (LP)	W: 6, F: 11, M: 1, H: 1, LP: 7
12) Haupt (HE)-, Nebenerwerb (NE), Hobbyhaltung (H)?	HE: 5, NE: 6, H: 1
13) Zukäufe pro Jahr und Regionen	0 - 50 (Ø 7), genannte Regionen: BB, SH, NRW, MV, TH, NI
14) Haltungsform offene Stallhaltung (OS), Wanderschäfferei (WS), Deichschäfferei (DS), Koppelschafhaltung (KS), Hütehaltung (HH), Sonstige (S)	WS: 2, KS: 4, OS: 0, DS: 0, HH: 0, KH+HH: 3, KH+WS: 3
15) Größe der beweideten Fläche(n) in ha	1 - 270 (Ø 79), k.A.: 3
16) Werden die Schafe aufgestallt?	Ja: 7, Nein: 5
17) Zeitraum Aufstallung und Weideaustriebs im Frühling	2-5 Monate, Zeiträume innerhalb Dezember bis Mai
18) Ort der Weide: Freie Fläche (FF), Waldrand (WA), Gewässer (GE)	FF: 12, WA: 8, GE: 8
19) Welche Weideart wird genutzt? Standweide (SW), Umtriebsweide (UW), Portionsweide (PW), Deichschäfferei (DS), Wanderschäfferei (WS), Sonstiges (S)	UW: 2, PW: 2, WS: 1, PW+WS: 1, UW+WS: 2, PW+SW+UW: 3
20) Nachweiden auf Rinderweiden	Ja: 1, Nein: 11
21) Tränkung der Schafe: Tränkebecken (TB), Trog (TR), nat. Wasserquellen (NW)	TR oder TB: 11, NW: 1, TR,TB+NW: 4
22) Werden Ihre Schafe regelmäßig entwurmt?	Ja: 11, N: 1 (nach Bedarf)
23) Welche Altersgruppen werden wie oft und wann entwurmt?	
a. Lämmer (< 1 J.)	1-2 x/J: 6, 3-4 x/J: 2, jede 6 Wochen: 1, keine regelm. Entw.: 3
b. Jungschafe (1-2 J.)	1-2 x/J: 5, 3-4 x/J: 2, keine regelm. Entwurmung: 5
c. Adulte (> 2 J.)	1-2 x/J: 6, 2-5 x/J: 1, keine regelm. Entwurmung: 5
24) Gleichzeitige Entwurmung aller Tiere?	Ja: 9, Nein: 3
26) Wer entwurmt? Tierhalter (TH), Tierarzt (TA)	TH: 12
27) Gewichtsbestimmung zur Dosierung? Tierwaage (TW), Schätzung (SC)	TW: 2, SC: 10

28) Wann und wie oft Wurminfektion festgestellt? Schlachtbefunde (SB), Bandwurmfinnen (BW)	SB: 3, BW: 7, Ödem: 1, k.A.: 1
29) Haben Sie zur Behandlung von Magen-Darm-Strongyliden eines der folgenden Medikamente angewandt?	
a. Ivermectin	7
b. Moxidectin	11
c. Fenbendazol	3
d. Levamisol	2
e. Monepantel	2
f. Andere: Doramectin	2
f. Andere: Albendazol	3
f. Andere: Praziquantel	3
30) Kontrolle durch Kotprobenuntersuchungen?	Ja: 4, Nein: 8
31) Hauptprobleme im Bestand?	Klauen: 4, Selen: 1, Chlamydien: 1, Augeninf.: 1, Wolle: 1, Aborte: 1, k.A.: 3
32) Gründe für Verluste?	Verlammung: 2, Rückenlieger: 1, Selen: 1, Clostridiose: 1, Mangelernährung: 1
33) Durchfallerkrankungen	Ja: 8, Nein: 4
34) Lämmerverluste durch Durchfall	Nein: 12
35) Isolierung kranker Tiere?	Ja: 7, Nein: 4, k.A.: 1
36) Anämie?	Ja: 7, Nein: 4, k.A.: 1
37) Wodurch festgestellt? Blutbild (BB), Visuell (VI)	V: 6, BB: 1
<b>Zusatz</b>	
1) Wer plant die Wurmkontrolle?	TH: 12
2) Absprache mit TA / Tiergesundheitsdienst?	Ja: 8, Nein: 4
3) Fühlen Sie sich ausreichend beraten?	Ja.: 10, Nein: 1, Eher Nein: 1
4) Wie sicher sind Sie sich bei Entscheidungen rund um die Entwurmung Ihrer Schafe?	Sicher: 11, Eher Unsicher: 1
5) Fühlen Sie sich gut zum Thema Entwurmung informiert?	Ja: 12
6) Würden Sie sich mehr Informationen zum Thema wünschen?	Ja: 8, Nein: 4
7) Halten Sie regelmäßige Kotkontrollen auf Ihrem Betrieb für sinnvoll?	Ja: 9, Nein: 3
8) Separieren Sie zugekaufte Tiere von der Herde?	Ja: 10, Nein: 2
9) Entwurmen Sie zugekaufte Tiere bevor sie Zugang zur Weide erhalten?	Ja: 8, Nein: 4
10) Halten Sie es für sinnvoll alle Tiere einer Herde zu entwurmen?	Ja: 7, Nein: 5
11) Führen Sie nach der Entwurmung einen Weidewechsel durch?	Ja: 8, Nein: 4
12) Für wie wichtig halten Sie das Weidemanagement zur Wurmkontrolle?	Wichtig: 10, Eher Wichtig: 1, Unwichtig: 2
13) Alternativen zu Entwurmungsmitteln - Welche sind Ihnen bekannt? Futtermittel (FU),	FM: 9, ZU: 3, WM: 6

Zuchtprogramme (ZU), Weidemanagement (WM), Sonstige (S)	
14) Haben Sie bereits Erfahrungen mit einem der oben genannten Alternativen gemacht?	Ja: 3, Nein: 9

## Flyer Rinderbetriebe



Bundesamt für  
Verbraucherschutz und  
Lebensmittelsicherheit



### **Rinderbetriebe mit Freilandhaltung - Testbetriebe für Studie gesucht**

Wir suchen engagierte Landwirte und Landwirtinnen in Brandenburg für eine Forschungsstudie zum Thema

#### ***„Resistenzen von Magen-Darm-Strongyliden gegen Entwurmungsmittel bei Rindern“***

Dazu planen wir in der Weidesaison 2021 Besuche bei interessierten Betrieben, die

- Rinder im Alter bis zu 24 Monate mit Weidegang halten
- ihre Tiere vorher mindestens 6 Wochen nicht entwurmt haben (und keine Entwurmungsboli verwenden)
- eventuell - nicht zwingend - bereits ein Problem mit Wurminfektionen haben

#### **Ihre Vorteile:**

- Wir ermitteln die Resistenzlage in Ihrem Bestand und analysieren die Zusammensetzung der Wurmspezies

Kontaktdaten: Paula Ehnert, [paula.ehnert@fu-berlin.de](mailto:paula.ehnert@fu-berlin.de), Mobil: 01575 1111 062,  
Büro: 030 - 838 623 24

- Wir behandeln bis zu 40 Ihrer Tiere

**Zum Ablauf:**

- **Tag 1:** Rektale Kotprobennahme der Einzeltiere, Ausfüllen eines Fragebogens und Einteilung in 2 Gruppen à 20 Tiere zur Behandlung mit einem handelsüblichen Medikament, mit den Wirkstoffen Ivermectin/Eprinomectin und Fenbendazol
- → unter 20 Tiere: Nur ein Medikament kommt zum Einsatz
- → die Behandlung erfolgt gemäß Vorgaben des jeweilig zugehörigen Verbands und der Vermarktungskriterien
- **Nach 14 Tagen** (+/- 2 Tage) erneute Probennahme bei den bis zu 40 Tieren
- Im Institut: Untersuchung der Proben zur Aussage des Wurmstatus des Einzeltiers und nach 14 Tagen des Resistenzstatus des Betriebs

**Für Sie wichtig: Im Abstand von 14 Tagen besuchen wir Ihren Betrieb zwei Mal!**

Gerne informieren wir Sie unverbindlich, beantworten Ihre Fragen und finden heraus, ob Ihr Betrieb infrage kommt. Bei unklarem Wurmstatus in Ihrem Betrieb analysieren wir ebenfalls eingeschickte Sammelproben, um eine Bestandsdiagnose stellen zu können, dafür bitte entsprechend in Kontakt treten. Wir freuen uns auf Ihren Anruf oder Ihre E-Mail.

**Kontaktdaten:**

**Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin, FU Berlin**

Robert-von-Ostertag-Str. 7-13, 14163 Berlin

Paula Ehnert: [paula.ehnert@fu-berlin.de](mailto:paula.ehnert@fu-berlin.de),

Mobil-Tel: 01575 1111 062, Büro-Tel: 030 - 838 623 24

*Kontaktdaten: Paula Ehnert, [paula.ehnert@fu-berlin.de](mailto:paula.ehnert@fu-berlin.de), Mobil: 01575 1111 062,  
Büro: 030 - 838 623 24*

### Hintergrund zur Studie:

Die Nematoden (Rundwürmer) der Familie *Trichostrongylidae* sind Auslöser der parasitären Gastroenteritis bei Kälbern und verursachen jährlich große wirtschaftliche Verluste bei Rinderhaltern weltweit. Primär betroffen sind Jungtiere, die in den ersten Jahren auf der Weide gehalten werden, da sie eine noch ungenügende Immunität gegen die Infektion mit Magen-Darm-Strongyliden besitzen.

Beim Rind finden sich häufig Vertreter der Spezies *Ostertagia* spp., *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp. und *Nematodirus* spp (spp.: Spezies). Die Fähigkeit sich in einem hypobiotischen Zustand zu versetzen und so im Wirt zu überwintern macht einige der Vertreter besonders gefährlich, da die aktiven Larven im darauffolgenden Frühjahr gesammelt die Weiden kontaminieren und immun-naive Jungtiere stark infizieren können.

Kälber zeigen, teils hochgradigen, wässrigen Durchfall, stagnierendes Wachstum und eine geminderte Leistungsfähigkeit, die auch nach der Genesung des Tiers weiter bestehen bleiben kann. So kommt der Erkrankung ebenfalls eine hohe wirtschaftliche Bedeutung zu.

Zum Einsatz bei der Entwurmung kommen meist Entwurmungsmedikamente aus den Gruppen der Benzimidazole (Fenbendazol, Oxfendazol, Albendazol), sowie der Makrozyklischen Laktone (Ivermectin, Eprinomectin, Doramectin). Wie die Resistenzlage in Deutschland genau aussieht, ist nur durch einige, wenige Daten belegt. Die Studie liefert daher einen wichtigen Beitrag um herauszufinden, welche Spezies in Brandenburg vorkommen und wie weit Resistenzen gegen eingesetzte Entwurmungsmittel verbreitet sind.

## Fragebogen der Rinderbetriebe

### Umfrage zu Anthelminthika Einsatz - Rinder in Nordostdeutschland

<u>Betriebsangaben</u>	
1) Betriebsname	_____
2) Betriebsinhaber / Name des Mitarbeiters	_____
3) Anschrift (Str., PLZ, Ort)	_____
4) Kontaktdaten: (Email, Telefon, Fax)	_____
5) Zuständiges Veterinäramt, Name des Hoftierarztes	_____
6) VVVO-Nummer	_____
7) Gehaltene Rinderrassen	_____
8) Weitere Tiere auf dem Betrieb	<input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
a. Schafe	_____ Entwurmt? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
b. Ziegen / Neuweltkameliden	_____ Entwurmt? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein
c. Sonstige	_____
9) Datum des Betriebsbesuchs	_____

<u>Angaben zur Rinderhaltung</u>	
1) Gesamtanzahl Rinder	_____ Gesamt
a. Davon Adulte (>24 Monate)	_____ Adulte
b. Davon Bullen	_____ Bullen
c. Davon Färsen (1-2 J)	_____ Färsen
d. Davon Kälber/Jungrinder (< 1 J)	_____ Kälber/Jungrinder
2) Nutzungsrichtung:	<input type="checkbox"/> Fleischmast <input type="checkbox"/> Milch <input type="checkbox"/> Mutterkuh
	<input type="checkbox"/> Hobby <input type="checkbox"/> _____
3) Haupt-, Nebenerwerb, Hobbyhaltung?	<input type="checkbox"/> Haupterwerb <input type="checkbox"/> Nebenerwerb <input type="checkbox"/> Hobby
4) Wie viele Zukäufe pro Jahr? Und aus welchen Regionen?	_____ <input type="checkbox"/> aus Brandenburg
	_____ <input type="checkbox"/> Andere: _____
5) Weidehaltung:	<input type="checkbox"/> ganzjährig
	<input type="checkbox"/> saisonal, Zeitraum Weidezugang: _____
6) Größe der beweideten Fläche(n)?	_____ km <sup>2</sup> / ha

<p>7) Wo stehen ihre Tiere auf der Weide?</p>	<p><input type="checkbox"/> Freie Fläche <input type="checkbox"/> am Waldrand <input type="checkbox"/> an Gewässern  <input type="checkbox"/> Sonstiges _____</p>
<p>8) Welche Weideart wird genutzt?</p>	<p><input type="checkbox"/> Standweide <input type="checkbox"/> Umtriebsweide  <input type="checkbox"/> Portionsweide <input type="checkbox"/> Sonstiges _____</p>
<p>9) Wie werden die Tiere auf der Weide getränkt?</p>	<p><input type="checkbox"/> Tränkebecken <input type="checkbox"/> Trog <input type="checkbox"/> Weidepumpe  <input type="checkbox"/> Zugang zu natürlichen Wasserquellen</p>

<p><u>Entwurmung</u></p>	
<p>10) Werden die Tiere regelmäßig entwurmt?</p>	<p><input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein</p>
<p>11) Wenn ja, welche Altersgruppen werden wie oft und wann entwurmt?</p> <p>a. Kälber/Jungrinder (&lt;1 J.)</p> <p>b. Färsen (1-2 J.)</p> <p>c. Adulte (&gt;2 J.)</p>	<p>_____ Mal pro Jahr, Daten: _____          _____ Mal pro Jahr, Daten: _____          _____ Mal pro Jahr, Daten: _____</p>
<p>12) Werden bei einem Behandlungstermin alle zusammenlebenden Tiere der jeweiligen Gruppe gleichzeitig entwurmt?</p>	<p><input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein</p>
<p>13) Welche Präparate oder Wirkstoffe wurden in den letzten Jahren verwendet? Wie oft?</p>	<p>_____</p>
<p>14) Wer entwurmt die Tiere?</p>	<p><input type="checkbox"/> Tierhalter/ Mitarbeiter <input type="checkbox"/> Tierarzt <input type="checkbox"/> _____</p>
<p>15) Wie wird das Gewicht der Tiere für die Dosierung bestimmt?</p>	<p><input type="checkbox"/> Tierwaage <input type="checkbox"/> Schätzung <input type="checkbox"/> _____</p>
<p>16) Wann und wie oft wurden in Ihrem Bestand eine Wurminfektion festgestellt (auch Schlachtbefunde)?</p>	<p>_____</p>

<p>17) Haben Sie zur Behandlung von Magen-Darm Strongyliden eines der folgenden Medikamente angewandt?</p> <p>a. Ivermectin (Alfamectin<sup>®</sup>, Qualimec<sup>®</sup>)</p> <p>b. Eprinomectin (Elivec<sup>®</sup>, Neoprini<sup>®</sup>)</p> <p>c. Doramectin (Dectomax<sup>®</sup>)</p> <p>d. Moxidectin (Cydectin<sup>®</sup>)</p> <p>e. Fenbendazol (Panacur<sup>®</sup>, Fenbandat<sup>®</sup>)</p> <p>f. Albendazol (Valbazen<sup>®</sup>)</p> <p>g. Oxfendazol (Oxfenil, Systemex Intervall Bolus forte)</p> <p>h. Levamisol (Concurat<sup>®</sup>, Ripercol Drench<sup>®</sup>)</p> <p>i. (Zolvix<sup>®</sup>)</p> <p>j. Andere</p> <p>18) Bevorzugte Applikation:</p> <p>19) Wird der Erfolg der Behandlung durch Kotprobenuntersuchungen kontrolliert?</p>	<p><input type="checkbox"/> ja _____ <input type="checkbox"/> nein, weil _____</p> <p><input type="checkbox"/> ja _____ <input type="checkbox"/> nein, weil _____</p> <p><input type="checkbox"/> ja _____ <input type="checkbox"/> nein, weil _____</p> <p><input type="checkbox"/> ja _____ <input type="checkbox"/> nein, weil _____</p> <p><input type="checkbox"/> ja _____ <input type="checkbox"/> nein, weil _____</p> <p><input type="checkbox"/> ja _____ <input type="checkbox"/> nein, weil _____</p> <p><input type="checkbox"/> ja _____ <input type="checkbox"/> nein, weil _____</p> <p><input type="checkbox"/> ja _____ <input type="checkbox"/> nein, weil _____</p> <p><input type="checkbox"/> ja _____</p> <p><input type="checkbox"/> Oral    <input type="checkbox"/> Subkutan</p> <p><input type="checkbox"/> Pour-on    <input type="checkbox"/> Bolus    <input type="checkbox"/> Sonstiges _____</p> <p><input type="checkbox"/> ja _____ <input type="checkbox"/> nein</p>
---	---

<u>Erkrankungen</u>	
<p>20) Hauptprobleme in Ihrem Bestand?</p> <p>21) Gründe für Verluste?</p> <p>22) Durchfallerkrankungen</p> <p>23) Verluste durch Durchfallerkrankungen?</p> <p>24) Vermehrt Kümmerer im Betrieb ?</p>	<p><input type="checkbox"/> Klauen    <input type="checkbox"/> Euter    <input type="checkbox"/> Haut/Wollschäden</p> <p><input type="checkbox"/> Trächtigkeitstoxikosen    <input type="checkbox"/> Aborte</p> <p><input type="checkbox"/> _____</p> <p>_____</p> <p><input type="checkbox"/> Ja    <input type="checkbox"/> Nein</p> <p><input type="checkbox"/> Ja    <input type="checkbox"/> Nein</p> <p><input type="checkbox"/> Ja    <input type="checkbox"/> Nein</p>

Zusatz - Umfrage zu Anthelminthika Einsatz bei Rindern in Brandenburg

<p><u>Persönliche Einschätzung zur Entwurmung</u></p> <p>1) Wer plant die Wurmkontrolle?</p> <p>2) Sprechen Sie Entwurmungen mit Ihrem Tierarzt oder dem Tiergesundheitsdienst ab?</p> <p>3) Fühlen Sie sich hinsichtlich der Entwurmungsstrategien ausreichend gut von Ihrem Tierarzt / dem Tiergesundheitsdienst beraten?</p> <p>4) Wie sicher sind Sie sich bei Entscheidungen rund um die Entwurmung Ihrer Rinder?</p> <p>5) Fühlen Sie sich gut zum Thema Entwurmung informiert?</p> <p>6) Würden Sie sich mehr Informationen zum Thema Entwurmung wünschen?</p> <p>7) Halten Sie regelmäßige Kotkontrollen auf Ihrem Betrieb für sinnvoll?</p>	<p><input type="checkbox"/> Tierhalter <input type="checkbox"/> Tierarzt <input type="checkbox"/> Tiergesundheitsdienst</p> <p><input type="checkbox"/> Ja, mit dem Tierarzt <input type="checkbox"/> Ja, mit dem Tiergesundheitsdienst</p> <p><input type="checkbox"/> Nein</p> <p><input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein</p> <p><input type="checkbox"/> Sicher <input type="checkbox"/> Eher sicher <input type="checkbox"/> Eher unsicher <input type="checkbox"/> Unsicher</p> <p><input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein</p> <p><input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein</p> <p><input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein</p>
<p><u>Rinderhaltung, Zukäufe</u></p> <p>8) Separieren Sie zugekaufte Tiere von der Herde?</p> <p>9) Entwurmen Sie zugekaufte Tiere bevor Sie Zugang zur Weide erhalten?</p>	<p><input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein</p> <p><input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein</p>
<p><u>Entwurmungsmanagement</u></p> <p>10) Halten Sie es für sinnvoll alle Tiere einer Herde zu entwurmen?</p> <p>11) Führen Sie nach einer Entwurmung einen Weidewechsel durch?</p> <p>12) Für wie wichtig halten Sie das Weidemanagement bei der Wurmkontrolle?</p> <p>13) Alternativen zu Entwurmungsmitteln – Welche sind Ihnen bekannt?</p> <p>14) Haben Sie bereits Erfahrungen mit einem der oben genannten Alternativen gemacht? Wenn ja, womit?</p>	<p><input type="checkbox"/> Ja <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein</p> <p><input type="checkbox"/> Immer <input type="checkbox"/> Eher ja <input type="checkbox"/> Eher nein <input type="checkbox"/> Nein</p> <p><input type="checkbox"/> Wichtig <input type="checkbox"/> Eher wichtig <input type="checkbox"/> Eher unwichtig <input type="checkbox"/> Unwichtig</p> <p><input type="checkbox"/> Futtermittel (Tannine, Pilze) <input type="checkbox"/> Zuchtprogramme</p> <p><input type="checkbox"/> Weidemanagement <input type="checkbox"/> Sonstige: _____</p> <p><input type="checkbox"/> Nein <input type="checkbox"/> Ja, und zwar _____</p>

## Auswertung Fragebogen der Rinderbetriebe

Allgemein	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8	B9
7) Gehaltene Rinderrassen	Uckermärker, Holstein Frisian	Angus Mix	Schwarz bunt, Milchfleckvieh	Uckermärker, Fleckvieh	Uckermärker, Aquitaine Blonde	HF-Mix	Angus	FV, Wasserbüffel	Charolais
8) Weitere Tiere auf dem Betrieb	J	N	N	N	N	N	N	J	N
a. Schafe	400								
b. Ziegen/Neuweltkameliden	12 Z								
c. Sonstige								70 Pferde	
10) Gesamtanzahl Rinder	203	390	1000	1250	52	591	k.A.	3521	450
a. Davon Adulte	98	50	450	350	24	124		1980	320
b. Davon Bullen	3	110	2	18	1	3		64	22
c. Davon Färsen (1-2 J)	10	182	insg. 550	400	14	107		232	100
d. Davon Kälber/Jungrinder (< 1J)	92	48	insg. 550	450	13	110		1200	100
11) Nutzungsrichtung: Fleisch (F), Milch (M), Mutterkuh (MK), Hobby (H)	MK	F	M	MK	F, MK	M	MK	MK	F, MK
12) Haupt (HE)-, Nebenerwerb (NE), Hobbyhaltung (H)?	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE	HE
13) Zukäufe pro Jahr und Regionen	-	150 BB	1 BB	1 BB	1 BB	-	-	20 MV	1-2, DE
14) Weidehaltung: ganzjährig (GJ), saisonal, Zeitraum (S)	GJ	GJ	GJ	S (04-12)	GJ	GJ	GJ	S (04-12)	GJ
15) Größe der beweideten Fläche(n) in ha	120	230	60	400	40	7	30	1800	60
16) Ort der Weide: Freie Fläche (FF), Waldrand (WA), Gewässer (GE)	FF	FF, GE	FF	FF	FF	WA, GE	GE	FF, WA, GE	FF
17) Welche Weideart wird genutzt? Standweide (SW), Umtriebsweide (UW), Portionsweide (PW), Sonstiges (S)	UW	SW	UW	UW	PW	PW	SW	UW	SW
18) Tränkung der Rinder: Tränkebecken (TB), Trog (TR), Weidepumpe (WP), nat. Wasserquellen (NW)	WP	TB	WP	TB	TB	TB	WP, NW	TR, WP	TR
<b>Entwurmung</b>									
19) Werden Ihre Rinder regelmäßig entwurmt?	J	J	N	J	N	J	J	N	J
20) Welche Altersgruppen werden wie oft und wann entwurmt?									
a. Kälber/Jungrinder (< 1 J.)	0x/J	1x/J		1x/J	N	2x/J	1/J		N
b. Färsen (1-2 J.)	1x/J	1x/J		1x/J	1x/J	N	1/J		N
c. Adulte (> 2 J.)	1x/J	-		2x/J	1x/J	1x/J	1/J		2/J
21) Gleichzeitige Entwurmung aller Tiere?	J	J	N	J	J	J	J	J	J
22) Welche Präparate oder Wirkstoffe? Wie oft?	IVM	IVM, FBZ	k.A.	IVM	IVM	IVM, EPR	IVM	CLO, IVM, OXC	IVM
23) Wer entwurmt? Tierhalter (TH), Tierarzt (TA)	TH	TA	TA	TH	TA	TH	TA	TH, TA	TH
24) Gewichtsbestimmung zur Dosierung? Tierwaage (TW), Schätzung (S)	S	TW	TW	S	S	S	S	S	S
25) Wann und wie oft Wurminfektion festgestellt? Schlachtbefunde (SB), Bandwurmfinnen (BW)	N	2-3x/J	N	N	N	N	N	1-2/J	N
26) Haben Sie zur Behandlung von Magen-Darm-Strongyloiden eines der folgenden Medikamente angewandt?									
a. Ivermectin	J	J	N	J	J	J	J	J	J
b. Eprinomectin	n.a.	n.a.	N	n.a.	n.a.	J	n.a.	n.a.	n.a.
c. Doramectin	n.a.	n.a.	N	J	n.a.	n.a.	n.a.	J	n.a.

d. Moxidectin	n.a.	n.a.	N	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Nicht zugelassen	n.a.
e. Fenbendazol	n.a.	J	N	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
f. Albendazol	n.a.	n.a.	N	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
g. Oxfendazol	n.a.	n.a.	N	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
h. Levamisol	n.a.	n.a.	N	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
i. Andere	n.a.	n.a.	N	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
27) Bevorzugte Applikation: Oral (O), Subkutan (SK), Pour-on (PO), Bolus (B)	PO	PO	TA	PO	PO	PO	PO	PO	PO
28) Kontrolle durch Kotprobenuntersuchungen?	N	N	N	N	N	N	N	N	J - Leberegel
<b>Erkrankungen</b>									
29) Hauptprobleme im Bestand? Klauen (K), Euter (E), Haut (H), Trächtigkeitstoxikosen (TT), Aborte (A), Sonstiges (S)	K, S, Lahmheiten	k.A.	K, E	N	N	Clostridiose	K,E	K	Kryptosporidien
30) Gründe für Verluste?	Nabel, Gelenkentz.	k.A.	k.A.	N	N	Cl.	k.A.	Strahlenpilz, Kachexie	Kryptosporidien
31) Durchfallerkrankungen	J	N	J, Kryptosporidien	N	N	J, ParaTB Verdacht	J	N	J
32) Verluste durch Durchfallerkrankungen	N	N	J	N	N	J	J	N	J
33) Vermehrt Kümmerer im Betrieb?	J	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Zusatz</b>									
1) Wer plant die Wurmkontrolle?	TH, TA	TA	k.A.	TH	TA	TH, TA	TH	TH, TA	TH
2) Absprache mit TA / Tiergesundheitsdienst?	J	J	J	J	J	J	J	J	N
3) Fühlen Sie sich ausreichend beraten?	EJ	J	J	J	N	J	J	J	J
4) Wie sicher sind Sie sich bei Entscheidungen rund um die Entwurmung Ihrer Rinder?	ES	S	S	S	S	S	EU	ES	S
5) Fühlen Sie sich gut zum Thema Entwurmung informiert?	EJ	J	J	EJ	J	J	EN	EJ	J
6) Würden Sie sich mehr Informationen zum Thema wünschen?	J	EJ	J	N	N	EJ	EJ	EJ	N
7) Halten Sie regelmäßige Kotkontrollen auf Ihrem Betrieb für sinnvoll?	EJ	J	J	EJ	N	J	EJ	J	J
8) Separieren Sie zugekaufte Tiere von der Herde?	k.A.	N	J	N	N	k.A.	J	J	N
9) Entwurmen Sie zugekaufte Tiere bevor sie Zugang zur Weide erhalten?	k.A.	J	N	J	N	J	EN	J	J
10) Halten Sie es für sinnvoll alle Tiere einer Herde zu entwurmen?	J	J	N	J	J	J	J	J	J
11) Führen Sie nach der Entwurmung einen Weidewechsel durch?	EN	EN	N	N	N	EN	n.a.	EJ	N
12) Für wie wichtig halten Sie das Weidemanagement zur Wurmkontrolle?	EW	EW	W	EW	EU	W	W	W	W
13) Alternativen zu Entwurmungsmitteln - Welche sind Ihnen bekannt? Futtermittel (FU), Zuchtprogramme (ZU), Weidemanagement (WM), Sonstige (S)	N	N	FU, WM	N	N	N	N	WM	WM
14) Haben Sie bereits Erfahrungen mit einem der oben genannten Alternativen gemacht?	N	N	N	N	N	N	N	N	J, WM + Weidehygiene

## Umfrage großtierpraktizierender Tierärzte

### Umfrage großtierpraktizierender Tierärzte

- 1) **Bitte geben Sie das Bundesland / die Bundesländer Ihres Einzugsgebiets an:**  
Mehrfachnennung möglich  
Baden-Württemberg  
Bayern  
Berlin  
Brandenburg  
Bremen  
Hamburg  
Hessen  
Mecklenburg-Vorpommern  
Niedersachsen  
Nordrhein-Westfalen  
Rheinland-Pfalz  
Saarland  
Sachsen  
Sachsen-Anhalt  
Schleswig-Holstein  
Thüringen
  
- 2) **Bitte geben Sie Ihr Geschlecht an:**  
A) Männlich  
B) Weiblich  
C) Divers
  
- 3) **Bitte geben Sie Ihre Alter an:**  
A) \_\_\_\_\_
  
- 4) **Bitte geben Sie die Jahre Ihrer Berufserfahrung nach abgeschlossenem Studium an:**  
A) Bis zu 5 Jahre  
B) > 5 Jahre  
C) > 10 Jahre  
D) > 20 Jahre  
E) > 30 Jahre
  
- 5) **Bitte nennen Sie Ihre höchste veterinärmedizinische Qualifikation:**  
Mehrfachnennungen möglich  
A) Approbierte/r Tierarzt/Tierärztin  
B) Fachtierarzt f. kleine Wiederkäuer  
C) Fachtierarzt f. Rinder  
D) Fachtierarzt f. Reproduktionsmedizin  
E) Diplomate of the European College of Bovine Health Management (ECBHM)  
F) Diplomate of the European College of Small Ruminant Health Management (ECSRHM)  
G) Sonstiges, und zwar:
  
- 6) **In welcher tiermedizinischen Einrichtung sind Sie tätig?**  
A) Fahrpraxis Gemischtpraxis  
B) Fahrpraxis Großtierpraxis

- C) Rinderklinik
- D) Klinik für kleine Wiederkäuer
- E) Tiergesundheitsdienst
- F) Sonstiges, und zwar:

**7) In welchem Umfang betreuen Sie Schaf- und Rinderbetriebe:**

Mehrfachnennungen möglich

- A) > 50 % Rinder
- B) 10 – 50 % Rinder
- C) < 10 % Rinder
- D) > 50 % Schaf
- E) 10 – 50 % Schaf
- F) < 10 % Schaf
- G) Ziegen
- H) Neuweltkameliden

**8) Sie gaben an Rinderbetriebe zu betreuen:**

**Wie groß ist der Anteil biologisch akkreditierter Rinderbetriebe, die Sie betreuen?**

- A) < 10 %
- B) 10 - 50 %
- C) > 50 %
- D) Es werden keine Rinderbetriebe betreut.

**9) Wie groß ist der Anteil der Rinderbetriebe mit extensiver Weidehaltung (min. 150 Tagen Weidezugang)?**

- A) > 50 %
- B) 10 - 50 %
- C) < 10 %
- D) Es werden keine Rinderbetriebe betreut.

ENTWURMUNG RIND

**10) Welche Anthelminthika-Wirkstoffe zur Bekämpfung von Magen-Darm Parasiten verschreiben Sie nach Häufigkeit auf Rinderbetrieben?**

**Bitte nehmen Sie eine Abstufung vor:** Sehr häufig - Häufig – Gelegentlich – Selten - Nie

- Ivermectin
- Eprinomectin
- Doramectin
- Moxidectin
- Fenbendazol
- Albendazol
- Oxfendazol
- Levamisol
- Closantel
- Triclabendazol
- Oxyclozanid
- Sonstiges, und zwar:

**11) Welche Kriterien spielen bei der Wahl des geeigneten Anthelminthikums auf Rinderbetrieben die größte Rolle?**

Bitte nennen Sie die drei wichtigsten

- A) koproscopische Untersuchungen
- B) Kosten
- C) Applikationsform
- D) Einzuhaltende Wartezeiten
- E) Zusätzliche Wirksamkeit gegen Ektoparasiten
- F) Zusätzliche Wirksamkeit gegen Leberegel
- G) Wunsch des Tierhalters
- H) Ihre Empfehlung
- I) Zuverlässige Wirksamkeit
- I) Umweltverträglichkeit
- J) Festgestellte Resistenz
- K) Sonstiges, und zwar:

**12) Welche Applikationsform wird auf Rinderbetrieben bevorzugt?**

Mehrfachnennungen möglich

- A) Pour-on
- B) Oral
- C) Subkutan
- D) Bolus
- E) Sonstiges, und zwar:

ENTWURMUNG SCHAF

**13) Sie gaben an Schafbetriebe zu betreuen: Wie groß ist der Anteil biologisch akkreditierter Schafbetriebe?**

- A) < 10 %
- B) 10 - 50 %
- C) > 50 %
- D) Es werden keine Schafbetriebe betreut.

**14) Welche Anthelminthika-Wirkstoffe zur Bekämpfung von Magen-Darm Parasiten verschreiben Sie nach Häufigkeit auf Schafbetrieben? Bitte nehmen Sie eine Abstufung vor/ Reihenfolge mit Zahlen vergeben: Häufig - Nie**

- Ivermectin
- Eprinomectin
- Doramectin
- Moxidectin
- Fenbendazol
- Albendazol
- Oxfendazol
- Triclabendazol
- Levamisol
- Monepantel
- Closantel
- Praziquantel
- Triclabendazol + Moxidectin Kombinationspräparat
- Closantel + Mebendazol Kombinationspräparat
- Sonstiges, und zwar:

**15) Welche Kriterien spielen bei der Wahl des geeigneten Anthelminthikums auf Schafbetrieben die größte Rolle?**

Bitte nennen Sie die drei wichtigsten

- A) koproskopische Untersuchungen
- B) Kosten
- C) Applikationsform
- D) Einzuhaltende Wartezeiten
- E) Zusätzliche Wirksamkeit gegen Ektoparasiten
- F) Zusätzliche Wirksamkeit gegen Leberegel
- G) Wunsch des Tierhalters
- H) Ihre Empfehlung
- I) Umweltverträglichkeit
- J) Zuverlässige Wirksamkeit
- K) Festgestellte Resistenz
- L) Sonstiges, und zwar:

**16) Welche Applikationsform wird auf Schafbetrieben bevorzugt?**

Mehrfachnennungen möglich

- A) Pour-on
- B) Oral
- C) Subkutan
- D) Bolus
- E) Sonstiges:

**17) Führen Sie die Entwurmung der von Ihnen betreuten Herden selbst durch?**

- A) Ja, immer
- B) Ja, meistens
- C) Teils ja, teils nein
- D) Meist nein
- E) Nein

**18) Auf welchen Kriterien basiert die Entscheidung eine Entwurmung durchzuführen?**

- A) Festgelegter Zeitpunkt (z.B. 2x im Jahr)
- B) Einzeltier-Symptomatik
- C) Bestandsproblematik (> 3 Tiere)
- D) Koproskopisches Untersuchungsergebnis
- E) Sonstiges, und zwar:

**19) Halten Sie es für sinnvoll die gesamte Herde zusammen zu entwurmen?**

- A) Ja
- B) Nein

**20) Halten Sie es für sinnvoll alle Tiere einer Altersgruppe zu entwurmen?**

- A) Ja
- B) Nein

**21) Existiert ein Wirkstoff/ Präparat bei dem Sie den Verdacht hatten, oder durch koproskopische Untersuchung 14 Tage nach der Behandlung sogar nachweisen konnten, dass es nicht vollständig gegen Magen-Darm Strongyliden Infektionen gewirkt hat?**

Falls ja, nennen Sie bitte folgende Punkte:

- 1) Das Präparat / den Wirkstoff,
- 2) Die Tierart

- 3) Die Zeitspanne zwischen Anwendung und Auftreten der vermuteten mangelnden Wirksamkeit
- 4) Indikation der Behandlung
- 5) Zieltierart des Medikaments
- 6) Dosierung des Wirkstoffs
- 7) Applikationsweg und erläutern kurz.

EMPFEHLUNG & DIAGNOSTIK

22) Beraten Sie Ihre Kunden hinsichtlich der Entwurmung?

- A) Ja
- B) Nein

23) Haben Sie den Eindruck, dass Ihre Empfehlung hinsichtlich der Entwurmung von den Betrieben umgesetzt wird?

- A) Ja
- B) Vorwiegend Ja
- C) Unsicher
- D) Vorwiegend Nein
- E) Nein

24) Nutzen Sie parasitologische Untersuchungen als Diagnostikum zur Entscheidung ob eine Entwurmung gegen Nematoden durchgeführt werden soll?

- Ja, ich empfehle dieses Vorgehen
- Ja, bei Wunsch des Besitzers
- Nein, ich halte es für nicht notwendig
- Nein, in der Regel wünschen die Besitzer dies nicht
- Sonstiges, und zwar:

25) Nutzen Sie parasitologische Untersuchungen zur Kontrolle der erfolgreichen Entwurmung?

- A) Ja, immer
- B) Ja, meistens
- C) Teils ja, teils nein
- D) Meist nein
- E) Nein

26) Empfehlen Sie einen Weidewechsel nach der Entwurmung?

- A) Ja
- B) Nein
- C) Sonstiges, und zwar:

27) Empfehlen Sie einen jährlichen Wirkstoffwechsel?

- A) Ja
- B) Nein
- C) Sonstiges, und zwar:

28) Empfehlen Sie eine Quarantäne zugekaufter Tiere?

- A) Ja
- B) Nein
- C) Sonstiges, und zwar:

**29) Wie groß schätzen Sie ist der Einfluss Ihrer Empfehlung für die Entwurmungsentscheidungen (Frequenz, Entwurmungszeitpunkt, Auswahl der zu behandelnden Tiere, Wirkstoffwahl) auf Seiten des Tierhalters?**

- A) Ich schätze > 75 % der Betriebe setzen meine Empfehlungen um.
- B) Ich schätze 50 – 75 % der Betriebe setzen meine Empfehlungen um.
- C) Ich schätze 25 – 50 % der Betriebe setzen meine Empfehlung um.
- D) Ich schätze < 25 % der Betriebe setzen meine Empfehlung um.
- E) Kommentar:

**30) Welche Relevanz besitzt das Thema Anthelminthika-Resistenz auf den von Ihnen betreuten Rinderbetrieben?**

- A) Sehr relevant
- B) Eher relevant
- C) Teils relevant, teils nicht relevant
- D) Eher nicht relevant
- E) Nicht relevant
- F) Keine Rinderbetriebe werden betreut.

**31) Welche Relevanz besitzt das Thema Anthelminthika-Resistenz auf den von Ihnen betreuten Schafbetrieben?**

- A) Sehr relevant
- B) Eher relevant
- C) Teils relevant, teils nicht relevant
- D) Eher nicht relevant
- E) Nicht relevant
- F) Keine Schafbetriebe werden betreut.

**32) Wie schätzen Sie Ihren eigenen Informationsgrad zum Thema Entwurmung und Anthelminthika-Resistenz ein?**

- A) Ich fühle mich ausreichend informiert
- B) Ich fühle mich nicht ausreichend informiert.
- C) Sonstiges, und zwar:

**33) Welches ist Ihre Hauptinformationsquelle hinsichtlich Entwurmung und Resistenzproblematik?**

- A) Lehrbuch
- B) Fortbildung
- C) Paper, eigene Recherche
- D) Internetquellen (Rinder- und Schafforen, Wormx.info, Thünen-Institut,...)
- E) Sonstiges, und zwar:

**34) Würden Sie sich mehr Informationen zu dem Thema Entwurmung wünschen?**

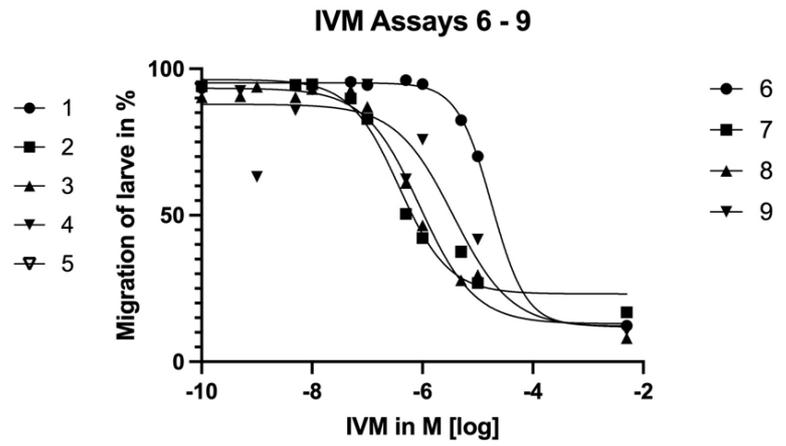
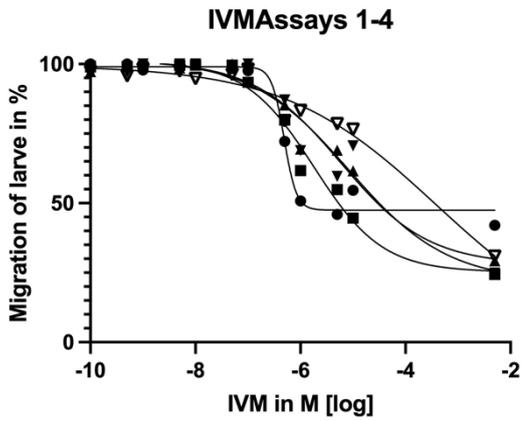
- A) Ja
- B) Nein
- C) Sonstiges, und zwar:

**35) Sonstige Anmerkungen:**

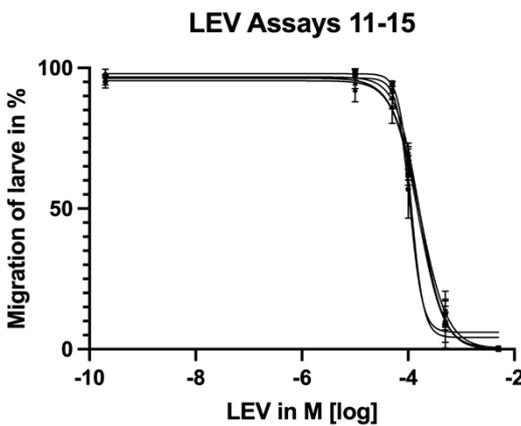
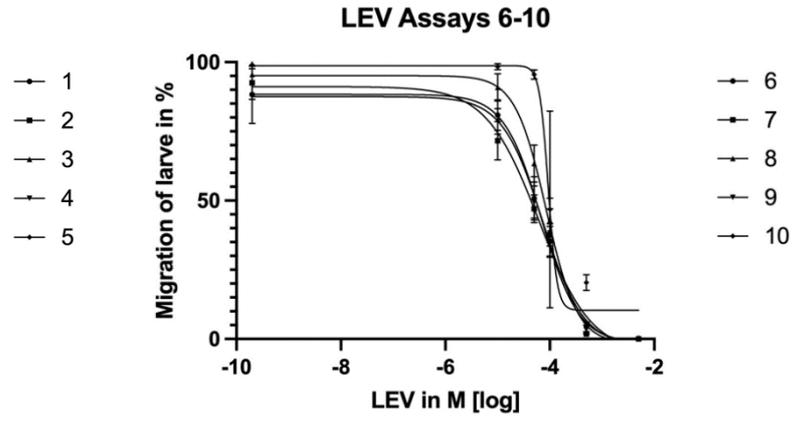
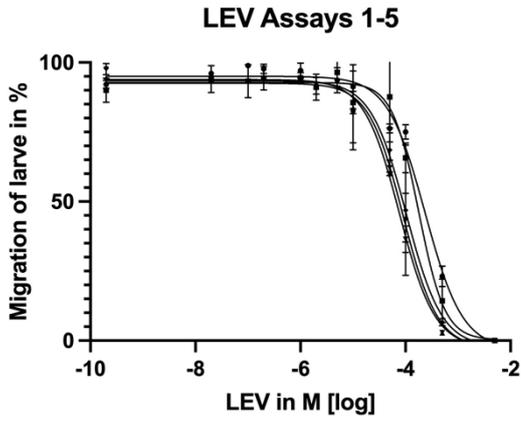
(Freies Feld) \_\_\_\_\_

Vielen Dank für Ihre Teilnahme!

**LMHT IVM Konzentrations-Wirkstoffkurven *H. contortus* McM**



**LMHT LEV Konzentrations-Wirkstoffkurven *H. contortus* McM**



## 11 Publikationsverzeichnis

### 11.1 Vorträge

Ehnert, P., Krücken, J., Helm, C., Ramünke, S., Kahl, A., Bartmann, T., Neubert, A., Weiher, W., Köper, L., Steuber, S., von Samson-Himmelstjerna, G. (2021). **Anthelminthika-Resistenz und Magen-Darm-Strongyliden Prävalenz auf Schafbetrieben in Nordostdeutschland**, DVG-Tagung "Parasitologie und parasitäre Krankheiten", 29.06.2021

Ehnert, P., Krücken, J., Helm, C., Ramünke, S., Bartmann, T., Neubert, A., Weiher, W., Daher, R., Terhalle, W., Klabunde-Negatsch, A., Steuber, S., von Samson-Himmelstjerna, G. (2022). **Anthelminthika-Resistenzen bei Magen-Darm-Strongyliden auf Schaf- und Rinderbetrieben in Nordostdeutschland**, DVG-Tagung "Parasitologie und parasitäre Krankheiten", 25.05.2022

### 11.2 Poster

Ehnert, P., Krücken, J., Helm, C., Ramünke, S., Köper, L., Weiher, W., Steuber, S., von Samson-Himmelstjerna, G. (2020). **Current anthelmintic drug efficacy ingastrointestinal parasitic nematodes of sheep and cattle in Brandenburg, Germany**, Joint Combar Meeting – Anthelmintic Resistance in Ruminants: From Research to recommodations, Online meeting, 10.12.2020

Ehnert, P., Krücken, J., Helm, C., Ramünke, S., Bartmann, T., Neubert, A., Weiher, W., Lydia Köper, Steuber, S., von Samson-Himmelstjerna, G. (2021). **Trichostrongyle prevalence and anthelmintic resistance in sheep farms in north-eastern Germany**, WAAVP 28th. International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 19.07.2021

Ehnert, P., Krücken, J., Helm, C., Kahl, A., Ramünke, S., Bartmann, T., Neubert, A., Weiher, W., Daher, R., Terhalle, W., Klabunde-Negatsch, A., Steuber, S., von Samson-Himmelstjerna, G. (2022). **Prevalence of anthelmintic resistance in strongyle nematode populations on sheep and cattle farms in north-eastern Germany**, Final Combar Conference – Combatting anthelmintic resistance in ruminants: Options for the future, 07.03.2022

### 11.3 Publikationen

Krücken, J., P. Ehnert, S. Fiedler, F. Horn, C. S. Helm, S. Ramünke, T. Bartmann, A. Kahl, A. Neubert, W. Weiher, R. Daher, W. Terhalle, A. Klabunde-Negatsch, S. Steuber and G. von Samson-Himmelstjerna (2024): **Faecal egg count reduction tests and nemabiome analysis reveal high frequency of multi-resistant parasites on sheep farms in north-east Germany involving multiple strongyle parasite species**. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 25: 100547. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2024.100547.

## 12 Danksagung

Danke an Herrn Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna, an Herrn PD Dr. Jürgen Krücken und Frau Dr. Christina Helm für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas, die immer konstruktive Kritik und hilfreichen Ratschläge, sowie an die Kooperationspartner des Bundesamts für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit Herrn Dr. Stephan Steuber, Frau Dr. Alexandra Klabunde-Negatsch, Herrn Dr. Werner Terhalle, Herrn Dr. Stefan Fiedler, Frau Dr. Wiebke Weiher, Frau Dr. Ann Neubert und Frau Ricarda Daher. Sie alle haben mir mit unerschöpflicher Geduld und Kompetenz stets betreuend zur Seite gestanden. Darüber hinaus danke ich für die Möglichkeit, experimentelle Forschung innerhalb der wissenschaftlichen Fragestellung kennen gelernt zu haben, die mein Interesse der Parasitologie und der Resistenzforschung förderte.

Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn Dr. Terhalle für die statistische Analyse der bundesweiten Umfrage großtierpraktizierender Tierärzte in Deutschland und Herrn Dr. Stefan Fiedler für die Sequenzierung und biostatistische Analyse der *Deep amplicon* Sequenzierungsdaten.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei allen engagierten Rinder- und Schafhaltern in Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern und Sachsen-Anhalt, die an der Studie teilnahmen. Die Anfertigung wäre ohne ihre Teilnahmebereitschaft nicht möglich gewesen.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Heiko Scholz für die Vermittlung von Rinderbetrieben, von interessierten Journalen und für die anregende Kommunikation während des Projekts.

Danke auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Parasitologie: Alexandra Kahl, Marc Borchert, Marta Muniz, Khawla Elati, Grace Klaas, Jennifer Schmidt, Jacqueline Hellinga, Irina Diekmann, Hannah Fischer, Louise Le Bel und Murat Ozben.

Ohne sie alle wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

### **13 Finanzierungsquellen – Funding Sources**

Das Forschungsvorhaben wurde innerhalb des Kooperationsprojekts durch das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit finanziell unterstützt.

### **14 Interessenkonflikte – Conflict of Interest**

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

## 15 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

*Berlin, den 19.06.2024*

*Paula Ehnert*

---

Ort und Datum

Unterschrift

