

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

Untersuchungen über das Vorkommen von gastrointestinalen Parasiten bei Pferden in Berlin und Brandenburg

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Laura Jürgenschellert
Tierärztin aus Gütersloh**

Berlin 2024

Journal-Nr.: 4444

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg von Samson-Himmelstjerna
2. Gutachterin: PD Dr. Roswitha Merle
3. Gutachter: Prof. Krzysztof Tomczuk

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): horses, strongylus, anoplocephala, cestodes,
diagnostic techniques, elisa, prevalence, berlin, brandenburg

Tag der Promotion: 03.07.2024

Inhalt

Inhalt	I
Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung	1
2. Literatur.....	3
2.1. Die wichtigsten Helminthen des Pferdes.....	3
2.1.1. Große Strongyliden	3
2.1.1.1. Vorkommen.....	3
2.1.1.2. Entwicklungszyklus	4
2.1.1.3. Klinik	4
2.1.2. Kleine Strongyliden	5
2.1.2.1. Vorkommen.....	6
2.1.2.2. Entwicklungszyklus	6
2.1.2.3. Klinik	6
2.1.3. Bandwürmer beim Pferd.....	7
2.1.3.1. Vorkommen.....	7
2.1.3.2. Entwicklungszyklus	7
2.1.3.3. Klinik	8
2.1.4. Spulwürmer und Pfiemenschwänze	8
2.2. Strategien zur Kontrolle von Endoparasiten.....	9
2.2.1. Methoden zum Nachweis von Endoparasiten.....	9
Koproskopische Verfahren.....	9
Serologie	10
Molekulare Methoden	10
2.2.2. Anthelminthika.....	11
Wirkstoffe.....	11
Behandlungsstrategien	11
Anthelminthika-Resistenzen.....	12
Monitoring von Resistenzen.....	13
Vorbeugende Maßnahmen gegen Resistenzentwicklung.....	14

2.2.3.	Risikofaktoren für Helmintheninfektion und Betriebsmanagement.....	15
	Intrinsische Faktoren.....	15
	Extrinsische Faktoren	16
2.3.	Übergeordnete Zielsetzung der eigenen Dissertation	18
3.	Publikationen.....	19
3.1.	Investigations on the occurrence of tapeworm infections in German horse populations with comparison of different antibody detection methods based on saliva and serum samples	19
3.1.1.	Abstract.....	19
	Background.....	19
	Methods	19
	Results	19
	Conclusions.....	20
3.1.2.	Background.....	20
3.1.3.	Methods	23
	Study design and location	23
	Coproscopic analyses	23
	Serum and saliva analyses.....	24
	Data analyses	24
3.1.4.	Results	25
	Study population	25
	Faecal examination	26
	Serum ELISA	27
	Saliva ELISA.....	27
	Comparison between coproscopic, serum and saliva testing.....	29
	Risk factor analysis	31
3.1.5.	Discussion.....	33
3.1.6.	Conclusion	36
3.1.7.	Supplementary information.....	36
	Availability of data and materials	36
	Acknowledgements	36
	Funding.....	36
	Author information.....	36
	Ethics declarations	37
3.1.8.	References.....	37

3.1.9.	Anteilserläuterung der Autoren.....	40
3.2.	Occurrence of strongylid nematode parasites on horse farms in Berlin and Brandenburg, Germany, with high seroprevalence of <i>Strongylus vulgaris</i>	42
3.2.1.	Abstract.....	42
3.2.2.	Introduction	43
3.2.3.	Materials and Methods	47
	Ethics Approval	47
	Study Design and Location.....	47
	Coproscopic Analysis	47
	Strongyle Larval Cultures and DNA-Extraction	48
	Polymerase Chain Reactions	48
	PCR for the Detection of Pan-Nematode-DNA.....	48
	<i>Strongylus vulgaris</i> -Specific Real-Time PCR.....	49
	Real-Time PCR and High-Resolution-Melt PCR Analysis for Species Differentiation of <i>Strongylus edentatus</i> , <i>Strongylus equinus</i> , and <i>Strongylus asini</i>	49
	Pyrosequencing of Isotype 1 β -Tubulin Polymorphisms	50
	<i>Strongylus vulgaris</i> ELISA	51
	Statistical Analyses	51
3.2.4.	Results	52
	Study Population and Collection of Field Samples	52
	Faecal Sample Analyses	53
	Frequency of <i>Strongylus</i> spp. in DNA From Larval Cultures.....	55
	Detection of Nematode DNA Using a PCR Targeting the 28S rRNA Gene	55
	Detection of <i>Strongylus vulgaris</i> DNA by Real-Time PCR	55
	Detection and Identification of <i>Strongylus edentatus</i> by Real-Time PCR and Differentiation Using High-Resolution-Melt Analysis.....	56
	Absence of Benzimidazole Resistance Associated Polymorphisms	60
	Antibodies Against a Recombinant SvSXP <i>Strongylus vulgaris</i> Antigen.....	62
	Correspondence Between PCR and ELISA Data	62
	Risk Factor Analysis for Strongyle Egg Shedding.....	63
	Risk Factor Analysis for Seropositivity for <i>Strongylus vulgaris</i> Recombinant SvSXP Larval Antigen	65
3.2.5.	Discussion.....	66
3.2.6.	Conclusion	70
3.2.7.	Supplementary information.....	70
	Data Availability Statement.....	70

Ethics Statement	70
Author Contributions.....	70
Funding	70
Conflict of Interest	70
Publisher's Note	71
Acknowledgments	71
Supplementary Material	71
3.2.8. References.....	71
3.2.9. Anteilserläuterung der Autoren.....	79
3.2.10. Supplementary Material	80
4. Diskussion.....	85
4.1. Publikationen im Zusammenhang.....	85
4.2. Stichprobengröße und Probensammlung.....	85
4.3. Verbreitung und Nachweismethoden	87
4.4. Beurteilung der Risikofaktoren.....	89
Weide.....	90
Nachweis anderer Parasiten	91
Lebensalter	92
Anthelminthika-Behandlung.....	92
4.5. Schlussfolgerungen und Ausblick	94
5. Zusammenfassung.....	96
Untersuchungen über das Vorkommen von gastrointestinalen Parasiten bei Pferden in Berlin und Brandenburg	96
6. Summary.....	99
Investigations on the occurrence of gastrointestinal parasites in horses in Berlin and Brandenburg.....	99
7. Literaturverzeichnis	101
8. Anhang.....	X
8.1. Geografische Verteilung der Proben	X
Publikationen.....	XI
Publikationen (Peer-reviewed)	XI
Abstracts von Vorträgen oder Posterpräsentationen in Tagungsbänden.....	XI

Danksagung	XII
Finanzierungsquellen	XIII
Interessenskonflikte.....	XIII
Selbstständigkeitserklärung.....	XIV

Abbildungsverzeichnis

Fig1 P1: Fig. 1 Comparison of the serum and saliva scores for the detection of antibodies against <i>Anoplocephala</i> spp.	30
Fig2 P1: Fig. 2 Forest plot showing odds ratios <i>Anoplocephala</i> serum ELISA.....	32
Fig1 P2: Figure 1. Comparison of faecal analyses methods.....	55
Fig2 P2: Figure 2. Amplification plots for the <i>Strongylus vulgaris</i> real-time PCR.....	56
Fig3 P2: Figure 3. Establishment of a high-resolution melt PCR to distinguish <i>Strongylus edentatus</i> , <i>Strongylus equinus</i> , and <i>Strongylus asini</i>	58
Fig4 P2: Figure 4. High-resolution melting curves for DNA from four field samples.....	59
Fig5 P2: Figure 5. Regression analysis of pyrosequencing assays for <i>S. vulgaris</i> isotype 1 β -tubulin for polymorphisms F167Y (A), E198A (B) and F200Y (C).....	61
Fig6 P2: Figure 6. Risk factor analysis for the odds to be positive for strongyle eggs.....	64
Fig7 P2: Figure 7. Risk factor analysis for the odds to be positive for antibodies against the <i>Strongylus vulgaris</i> recombinant SvSXP larval antigen.....	65

Tabellenverzeichnis

Tab1 P1: Table 1 Previous studies on equine tapeworm infections in Germany.....	21
Tab2 P1: Table 2 General data of 484 horses from 48 farms included in the study.....	25
Tab3 P1: Table 3 Prevalence of <i>Anoplocephala</i> spp. using different methods.....	26
Tab4 P1: Table 4 Prevalence in serum- and saliva-based ELISA for all 48 farms.....	27
Tab5 P1: Table 5 Final logistic regression model to identify risk factors explaining positive samples in <i>Anoplocephala</i> serum ELISA.....	32
Tab1 P2: Table 1. Prevalence of <i>Strongylus vulgaris</i> in former studies conducted in Germany.....	44
Tab2 P2: Table 2. General data on the study population (484 horses from 48 farms).....	53
Tab3 P2: Table 3. Percentage of 484 equine faecal samples tested positive using different FEC methods.....	54
Tab4 P2: Table 4. <i>Strongylus vulgaris</i> and <i>Strongylus edentatus</i> positive samples.....	62
Tab5 P2: Table 5. Final logistic regression model to identify risk factors explaining positivity for strongyle type eggs.....	65
Tab6 P2: Table 6. Final logistic regression model to identify risk factors to be positive for antibodies against the <i>Strongylus vulgaris</i> recombinant SvSXP larval antigen.....	66
TabS1 P2: Supplementary Table 1 Primers used for diagnosis of <i>Strongylus</i> spp.....	83

TabS2 P2: Supplementary Table 2 Primers for pyrosequencing assays for <i>Strongylus vulgaris</i> isotype 1 β - tubulin gene.....	84
Tab1 D: Tabelle 1 Regionale Verteilung der Probenentnahmen.....	X

Abkürzungsverzeichnis

A./Aa.	Arteria/Arteriae
AR	Anthelminthika-Resistenz
BZ	Benzimidazol
COI	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit I
EHT	Egg Hatch Test
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EpG	Eier pro Gramm Kot
ERP	Egg Reappearance Period
ESCCAP	European Scientific Counsel Companion Animal Parasites
et al.	et alumni
E/S	exkretorisch/sekretorisch
g	Gramm
ID	Identifikation
IgG	Immunglobulin G
IGS	inter genetic spacer
ITS	internal transcribed spacer
kDA	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
L1	Larven im ersten Entwicklungsstadium
L2	Larven im zweiten Entwicklungsstadium
L3	Larven im dritten Entwicklungsstadium
L4	Larven im vierten Entwicklungsstadium
L5	Larven im fünften Entwicklungsstadium / präadultes Stadium
MDS	Magen-Darm-Strongyliden
mg	Milligramm
min	Minuten

ML	Makrozyklische Lactone
NA	not available (nicht verfügbar)
NC	negative control (Negativkontrolle)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	optische Dichte = Extinktionswerte
ODR	optical density ratio (Verhältnis der optischen Dichte)
PC	positive control (Positivkontrolle)
PCR	Polymerase - Kettenreaktion
PYR	Pyrantel als Vertreter der Tetrahydropyrimidine
SNP	single-nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid- Polymorphismus)
spp.	Species pluralis
WAAVP	World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology

1. Einleitung

Das Vorkommen von gastrointestinalen Helminthen in Pferdebeständen ist weltweit von großer veterinärmedizinischer Bedeutung, hierbei sind insbesondere Cestoden und unter den Nematoden die großen und kleinen Strongylyden, Spulwürmer und Pfiemenschwänze zu nennen. Als Weidetiere sind Pferde zeitlebens einem besonderen Infektionsdruck durch gastrointestinale Parasiten ausgesetzt. Der überwiegende Anteil der Befälle wird dabei von den ubiquitär auftretenden kleinen Strongylyden verursacht. Spulwürmer sind durch ihre hohe Pathogenität besonders in Fohlen und jungen Pferden von veterinärmedizinischer Relevanz. Ein Befall mit Bandwürmern wird mit dem Auftreten von Koliksymptomatik in Verbindung gebracht.

In den früheren Jahren wurden die großen Strongylyden und insbesondere der Pferdepalisadenwurm *Strongylus vulgaris* in den Fokus gesetzt, so erhielt er durch seine erhebliche Pathogenität den Beinamen „horse killer“. Nach Einführung der modernen Anthelminthika verloren die *Strongylus*-Arten aufgrund des regelmäßigen Einsatzes von Breitband-Anthelminthika und des langen Entwicklungszyklus mit einer Präpatenz von sechs bis elf Monaten an Bedeutung und die kleinen Strongylyden traten vermehrt in den Vordergrund. Die Anhäufung von Anthelminthika-resistenten Helminthenpopulationen nimmt jedoch zu, was unter anderem mit dem übermäßigen Gebrauch und einer ungenauen Dosierung der Anthelminthika assoziiert wird. Es hat sich neben dem konventionellen Entwurmungsschema, welches in der Regel eine systematische Wurmbehandlung aller Pferde eines Bestandes vorsieht, die selektive anthelminthische Therapie entwickelt, welche einen evidenzbasierten Ansatz nach erfolgtem Erregernachweis verfolgt. In einigen Ländern wird jedoch ein Wiederauftreten von *S. vulgaris* beobachtet, wobei ein Zusammenhang mit einer reduzierten anthelminthischen Behandlungsintensität von Pferden vermutet wird.

Die heutige Veterinärmedizin steht vor der Herausforderung die Resistenzentwicklung zu adressieren bzw. zu bekämpfen und gleichzeitig die Gesunderhaltung der Tiere zu gewährleisten. In diesem Zusammenhang muss ein effektives und gleichzeitig nachhaltiges und verantwortungsvolles Parasitenmanagement etabliert werden. Eine effektive Wurmbekämpfung bei Pferden profitiert von detaillierten Informationen über das aktuelle regionale Vorkommen von Helminthen. Ziel dieses Projektes war es daher, Erkenntnisse über die aktuelle Verbreitung der großen und kleinen Strongylyden sowie über das Vorkommen von *Anoplocephala* spp. in den regionalen Pferdebeständen in Berlin und Brandenburg zu gewinnen. In diesem Zusammenhang sollte neben der koproskopischen Diagnose von Magen-Darm-Strongylyden vertiefend auf die Speziesdifferenzierung großer Strongylyden und die Detektion von Einzelnukleotid-Polymorphismen, die bei Nematoden mit Benzimidazol-

Einleitung

Resistenzen assoziiert werden, eingegangen werden. Darüber hinaus sollten Nachweismethoden zur Detektion von Infektionen mit kleinen und großen Strongyliden sowie für *Anoplocephala* spp. verglichen und Risikofaktoren für eine Infektion von Pferden mit gastrointestinalen Helminthen untersucht werden.

2. Literatur

2.1. Die wichtigsten Helminthen des Pferdes

2.1.1. Große Strongyliden

Die Strongyliden (Familie Strongylidae) zählen weltweit zu den veterinärmedizinisch relevanten Nematoden in Pferdepopulationen. Sie werden unterteilt in große Strongyliden (Strongylinae) und kleine Strongyliden (Cyathostominae). Die großen Strongyliden zeichnen sich durch eine ausgeprägte speziesspezifische larvale Körperwanderung durch abdominale Organe des Wirtes über mehrere Monate aus. Die wichtigsten Vertreter der großen Strongyliden beim Pferd sind *Strongylus vulgaris*, *Strongylus edentatus* und *Strongylus equinus*, wobei insbesondere *S. vulgaris* mit einer hohen Pathogenität durch Gewebeschädigung und klinischer Symptomatik eine Gefahr darstellt und zu lebensbedrohlichen Komplikationen führen kann.

2.1.1.1. Vorkommen

Die Verbreitung der großen Strongyliden stand aufgrund der hohen Pathogenität insbesondere vor einigen Jahrzehnten im Fokus. In früheren Studien, bei denen post mortem Sektionen durchgeführt wurden, wurden hohe Einzeltierprävalenzen von 79,8 % bis 100 % in Deutschland festgestellt (Cirak et al., 1996; Kiedrowski, 1959). Die Prävalenz von *S. vulgaris* sank, nachdem die makrozyklischen Lactone in den 1980er Jahren verfügbar wurden und die kleinen Strongyliden gelangten durch ihre ausgedehnte Verbreitung in den Vordergrund (Herd, 1990; Love and Duncan, 1991). Ein Wiederauftreten von *S. vulgaris* wurde bereits in Nachbarländern wie Dänemark und Schweden beobachtet. In diesen Ländern gibt es, wie in Deutschland, staatliche Beschränkungen für die Verwendung von Anthelminthika bei Equiden und es wird ein Zusammenhang zwischen dieser Entwicklung und der dadurch reduzierten anthelminthischen Behandlungsintensität von Pferden mit dem wieder verstärkten Auftreten von großen Strongyliden vermutet (Nielsen et al., 2012; Tydén et al., 2019a).

Die Prävalenz von *S. vulgaris* in deutschen Pferdebeständen wurde in Studien, in denen die Methode der Larvenkultur und anschließender morphologischer Speziesbestimmung angewandt wurde, mit 0 % bis 1,1 % auf Einzeltierebene und 0 % bis 4,8 % auf Betriebsebene beschrieben (Beelitz et al., 1996a, b; Hinney et al., 2011a; Kaspar et al., 2016; Schneider et al., 2014). Bei Verwendung einer real-time PCR wurde von einer Prävalenz von 1,9 % auf Tierebene und von 10,9 % auf Betriebsebene berichtet (Kaspar et al., 2016).

Für *S. edentatus* wurden in früheren Studien in Deutschland Einzeltierprävalenzen von 0 % bis 44 % und für *S. equinus* von 0 % bis 10,9 % ermittelt (Beelitz et al., 1996a, b; Cirak et al.,

1996; Kiedrowski, 1959). Bei anderen Equiden wie Esel und Zebra ist *Strongylus asini* ein relevanter Parasit, während Pferde dafür wenig empfänglich sind (Malan et al., 1982).

2.1.1.2. Entwicklungszyklus

Der Entwicklungszyklus von *S. vulgaris* umfasst eine exogene und eine parasitische Phase, welche von einer ausgedehnten parenteralen Larvenwanderung gekennzeichnet ist. Während der externen Phase schlüpfen die Larven aus den Eiern, welche von befallenen Pferden mit dem Kot ausgeschieden werden, und entwickeln sich auf der Weide zur infektiösen Larve im dritten Larvenstadium (L3). Diese Entwicklung benötigt unter den klimatischen Bedingungen Mitteleuropas im Sommer ungefähr zehn bis 14 Tage (McCraw and Slocombe, 1976; Ogbourne, 1972).

Die oral aufgenommenen L3 befreien sich aus ihrer Scheide nach Passage des Magens und durchdringen in den Abschnitten des Ileums, Caecums und des ventralen Colons die Mukosa und Submukosa (Enigk, 1950; McCraw and Slocombe, 1976). In der Darmmukosa häuten sich die L3 zu Larven im vierten Larvenstadium (L4) (Burkhardt, 1983).

Die Larven wandern in bis zu drei Wochen (Duncan and Pirie, 1972) in die Intima der Arteria mesenterica cranialis und der abzweigenden Gefäße hoch bis zur Gekrösewurzel sowie der Aorta, wo sich die L4 zu Präadulten weiterentwickeln. Daraufhin wandern die Präadulten nach drei bis vier Monaten innerhalb des Arterienlumens zurück zum Dünn- und Dickdarm (Duncan and Campbell, 1973), wo sich kleine Knötchen formen, durch deren Ruptur die jungen Adulten in das Darmlumen gelangen (Duncan and Pirie, 1972). Es vergehen noch weitere sechs bis acht Wochen, bis die Adultstadien die Geschlechtsreife erlangen (Duncan and Pirie, 1972). Die Präpatenzzeit von *S. vulgaris* reicht von sechs bis sieben Monaten (Duncan and Pirie, 1972; Round, 1969).

Die Larven von *S. edentatus* gelangen über die Darmvenen zur Leber und zum subperitonealen Bindegewebe (McCraw and Slocombe, 1978; McCraw and Slocombe, 1974). Die Larven von *S. equinus* migrieren während ihrer Entwicklung zur Leber und zum Pankreas (Owen and Slocombe, 1985). Die Adultstadien siedeln sich vorrangig im Darmlumen des Caecums und des ventralen Colons an. Die Präpatenz von *S. edentatus* wird mit 10,5 bis elf Monaten und von *S. equinus* mit 8,5 bis neun Monaten beschrieben (Drudge and Lyons, 1966).

2.1.1.3. Klinik

Die häufigsten klinischen Symptome, die sich bei einer Infektion mit *S. vulgaris* in älteren Studien zeigten, sind Fieber, Abgeschlagenheit, verringerte Futteraufnahme und Kolik (Duncan and Campbell, 1973; Duncan and Pirie, 1975). In jüngeren Studien über *S. vulgaris* wird im Gegensatz zu den traditionellen Berichten vermehrt eine Peritonitis und weniger eine thromboembolische Kolik mit direkten oder indirekten *S. vulgaris*-Nachweisen assoziiert (Hedberg-Alm et al., 2020; Pihl et al., 2018).

Die Migration der *S. vulgaris*-Larven des vierten Entwicklungsstadiums führt zu Ödemen in der Submukosa und Arteritiden (Duncan and Pirie, 1972). Die ausgedehnte parenterale Wanderung der L4 bis hin zur kranialen Gekrösewurzel führt zu Endothelschäden, woraus entzündliche Reaktionen in der Gefäßwand resultieren. Es kommt zur Verdickung der Arterienwände (Duncan and Pirie, 1972), was zu einer Einengung des Gefäßlumens führt, wodurch ein Aneurysma entstehen kann (Bollinger, 1870; Olt, 1932). Es kann zu einer vermehrten Thrombenbildung und dem pathologischen Bild einer Endarteriitis thromboticans verminosa kommen (Burkhardt, 1983). Eine Endarteriitis thromboticans kann zu einer Koliksymptomatik führen, wenn die Entzündung der Gefäße auf das umliegende Gewebe übergreift und eine Druckatrophie die sekretorische und motorische Innervation des Darmes stört oder eine Embolie durch die Abschwemmung von Thrombusteilen zu Darminfarkten führt (Bollinger, 1870; Burkhardt, 1983; Olt, 1932). Eine Infestation mit *S. vulgaris* ist mit dem Vorkommen einer nicht-strangulierenden Infarzierung des Darmes assoziiert, wodurch Koliken verursacht werden können (Nielsen et al., 2016b). Durch die zahlreichen Anastomosen der Darmarterien kann es bei einem Thrombus zu gravierenden Zirkulationsstörungen kommen, wenn große Arterien (A. mesenterica cranialis und A. ileocolica, sowie der Ramus colicus und die Aa. caecales nahe des Ursprungs) verlegt werden (Burkhardt, 1983; Hartmann, 1932). Derartige Darminfarkte können bis zu einer möglichen Ruptur von Darmsegmenten führen (Burkhardt, 1983).

Wie bei *S. vulgaris* sind es bei *S. edentatus* und *S. equinus* die juvenilen Stadien, die durch ihr Migrationsverhalten einen pathogenen Charakter aufweisen. Bei einer Infestation mit *S. edentatus* werden entzündliche und hämorrhagische Reaktionsherde in der Leber und dem subperitonealen Bindegewebe sowie in der Wand von Caecum und Colon beschrieben (McCraw and Slocombe, 1978; McCraw and Slocombe, 1974). Die juvenilen Stadien von *S. equinus* verursachen granulomatöse Entzündungen in Leber, Peritoneum und Omentum. Darüber hinaus wird das Auftreten einer Fibrose in Leber und Pankreas beschrieben (McCraw and Slocombe, 1985).

Pferde sind wenig anfällig für *S. asini*. Es werden Fälle bei Zebras und Eseln beschrieben, bei denen eine umfangreiche Leberpathologie auftreten kann (Malan et al., 1982).

2.1.2. Kleine Strongyliden

Die kleinen Strongyliden weisen aktuell weltweit die höchste Prävalenz unter den Helminthen bei Pferden auf. Die Unterfamilie der Cyathostominae (engl. cyathostomins) zählt derzeit 50 anerkannte Arten, wobei in Feldstudien zumeist Mischinfektionen mit verschiedenen Cyathostominae-Spezies nachgewiesen werden (Lichtenfels et al., 2008).

2.1.2.1. Vorkommen

Es wird weltweit von hohen Prävalenzen der Cyathostominen berichtet, die bis zu 100 % reichen können (Collobert-Laugier et al., 2002; Morariu et al., 2016). Es wird gesagt, dass kleine Strongyliden in allen Teilen der Welt auftreten, wo Equiden gehalten werden. Hohe Prävalenzen von 91,6 % bis 98,7 % wurden auch in Deutschland in Studien mit koproskopischen Nachweismethoden in Pferdebetrieben festgestellt (Fritzen et al., 2010; Hinney et al., 2011a; Wirtherle et al., 2004). Dem gegenüber ermittelten zwei Studien geringere Prävalenzen von 44,6 % (Schneider et al., 2014) und 55,3 % (Kaspar et al., 2016).

2.1.2.2. Entwicklungszyklus

Die adulten Stadien befinden sich im Lumen des Colons und Caecums der Pferde und die Eier werden mit dem Kot des Wirts auf die Weide ausgeschieden. Dort schlüpfen die Larven im ersten Entwicklungsstadium (L1), welche sich ektogen über das zweite Larvenstadium (L2) in das infektiöse dritte Larvenstadium entwickeln. Die Pferde infizieren sich mit kleinen Strongyliden über die perorale Aufnahme der infektiösen L3 hauptsächlich auf der Weide während des Grasens. Nach der Passage durch den Dünndarm dringen die Larven in die Mukosa und Submukosa von Caecum sowie ventralem und dorsalem Colon ein, wo sie sich zur L4 entwickeln (Murphy and Love, 1997). Dort verbleiben sie in einer histotropen Phase von ein bis zwei Monaten, bevor sie als präadulte Stadien (öfter fälschlich als L5 bezeichnet) in das Darmlumen austreten. Der Entwicklungszyklus der kleinen Strongyliden weist im Gegensatz zu dem der großen Strongyliden keine somatische Larvenwanderung innerhalb der abdominalen Organe des Wirtes auf. Es kommen jedoch intramukosale Stadien in Caecum und Colon vor, wobei die L3 durch eine inhibierte Reifung in ein hypobiotisches Stadium übergehen können. Die Präpatenz der kleinen Strongyliden liegt zwischen sechs Wochen und drei Monaten (Love and Duncan, 1992; Reinemeyer et al., 1988; Round, 1969), jedoch können Cyathostominen-Larven zwei Jahre oder länger in der Caecum- oder Dickdarmschleimhaut verbleiben, wenn die Reifung der frühen L3 gestoppt ist (Gibson, 1953; Murphy and Love, 1997).

2.1.2.3. Klinik

Cyathostominen verursachen im Vergleich zu großen Strongyliden grundsätzlich keinen oder lediglich einen weniger stark pathogenen Effekt und werden gegebenenfalls mit dem Auftreten von Symptomen wie Abmagerung und Diarrhoe in Verbindung gebracht. Klinische Symptome treten gehäuft bei jungen Pferden bis zu einem Alter von fünf Jahren auf (Love et al., 1999). Ein synchronisierter Austritt hypobiotischer Larven aus der Schleimhaut kann eine larvale Cyathostominose verursachen, die durch die Schädigung der Darmschleimhaut und eine hochgradige inflammatorische Reaktion zu schweren klinischen Symptomen wie akuter und persistierender Diarrhoe, Gewichtsverlust, Fieber, Koliken und subkutanen Ödemen an den

Gliedmaßen und dem ventralen Abdomen führen kann (Giles et al., 1985; Love et al., 1999; Murphy and Love, 1997). In der Literatur finden sich konträre Hinweise darauf, ob das Vorkommen von kleinen Strongyliden in Pferden als Risikofaktor für die Pathogenese der Kolik assoziiert ist. Es wird sogar diskutiert, dass das Vorhandensein adulter Stadien im Darmlumen möglicherweise mit einem protektiven Faktor gegen die Entwicklung und das Vorkommen von Larven der Cyathostominen in der Mukosa verbunden sein könnte und Kolik kein typisches Symptom bei Infektionen mit kleinen Strongyliden darstellt (Love et al., 1999; Reinemeyer and Nielsen, 2009; Stancampiano et al., 2017).

2.1.3. Bandwürmer beim Pferd

Die am häufigsten vorkommenden Bandwürmer bei Pferden sind *Anoplocephala perfoliata*, *Anoplocephala magna* und *Paranoplocephala mamillana* (Bohórquez et al., 2015) (Eucestoda: Anoplocephalidae), wobei insbesondere ein Befall mit *A. perfoliata* bei einer Bandwurmerkrankung von Pferden nachgewiesen wird.

2.1.3.1. Vorkommen

In Deutschland durchgeführte Studien mit koproskopischer Untersuchungsmethode ermittelten für Bandwürmer in Pferden eine Prävalenz von 2,0 % bis 3,0 % und auf Betriebsebene Werte von 14,3 % bis 35,2 % (Behrens, 2001; Hinney et al., 2011a). Die Bestimmung der Prävalenz von Cestoden bei Pferden hängt jedoch wesentlich von den verwendeten Methoden ab und koproskopische Untersuchungen sind wenig sensitiv. Sektionsstudien ermittelten bei 11,0 % bis 75,0 % der Pferde einen Befall mit *A. perfoliata* (Beelitz and Gothe, 2001; Cirak et al., 1996; Kiedrowski, 1959; Rehbein et al., 2013). *Anoplocephala magna* (12,5 % (Cirak et al., 1996)) und *P. mamillana* (1,0 % bis 12,5 % (Cirak et al., 1996; Rehbein et al., 2013)) wurden in diesen Studien deutlich seltener in Einzeltieren nachgewiesen.

2.1.3.2. Entwicklungszyklus

Infizierte Pferde scheiden die graviden Proglottiden, welche die Bandwurmeier enthalten, über den Kot aus. Auf der Weide werden die Eier und die darin enthaltende Hakenwurmlarve von Moosmilben (Acari: *Oribatida*) aufgenommen, welche als Zwischenwirt fungieren (Denegri, 1993). Der Befall mit Bandwürmern wird bei Pferden durch die orale Aufnahme des Zwischenwirts verursacht, in dem sich die infektiösen Cysticercoide in der Leibeshöhle entwickelt haben (Denegri, 1993). Die Cysticercoide-Larven heften sich im Darm nestartig an der Ileocaecalklappe und der Caecum-Wand an und entwickeln sich zu Adulten. Die Präpatenz von *A. perfoliata* reicht von sechs Wochen bis vier Monaten (Bain and Kelly, 1977).

2.1.3.3. Klinik

Ein Befall mit *A. perfoliata* verläuft bei Pferden, die mit einer geringen Anzahl an Würmern infiziert sind, oft klinisch inapparent. Die Bandwürmer verursachen jedoch pathologische Veränderungen in Form von lokaler Enteritis der Darmschleimhaut an der Anheftungsstelle an der Ileocaecalklappe und der Caecum-Wand. Darüber hinaus weist das enterische Nervensystem von Pferden mit mäßigem oder starkem Bandwurmbefall Schäden an den in der Darmwand liegenden Nerven auf, die zu Störungen der Darmmotilität führen. Bei chronisch infizierten Pferden mit einer hohen Belastung von mehr als 20 Würmern kann dies zu Durchfall, Verdauungsstörungen und Leistungsschwäche, aber auch zu klinischen Anzeichen einer spasmodischen Kolik bis hin zum Ileus führen (Fogarty et al., 1994; Gasser et al., 2005; Nilsson et al., 1995; Pavone et al., 2011; Proudman et al., 1998).

2.1.4. Spulwürmer und Pfriemenschwänze

Die Eier von *Parascaris* spp. weisen durch ihre dicke Schale eine hohe Tenazität auf, was unter anderem dazu führte, dass die equinen Spulwürmer *Parascaris equorum* und *Parascaris univalens* weltweit ubiquitär in Pferdebeständen vorkommen. Jüngere Studien deuten darauf hin, dass entgegen früherer Berichte *P. univalens* eine deutlich höhere Prävalenz aufweist als *P. equorum* (Martin et al., 2018; Nielsen et al., 2014c). Zur Unterscheidung der beiden Spezies ist eine Karyotypisierung zur Chromosomenuntersuchung erforderlich, wobei seit 1989 kein Nachweis einer Infektion mit *P. equorum* durch Karyotypisierung publiziert wurde (Pimpinelli and Goday, 1989; von Samson-Himmelstjerna et al., 2021). Die Spulwürmer besiedeln den Dünndarm und patente Infektionen kommen vor allem bei Fohlen und Jährlingen vor (Clayton and Duncan, 1979; Hautala et al., 2019; Jenkins et al., 2020). Nach oraler Aufnahme der Eier, die eine infektiöse L3 enthalten, schlüpfen die Larven im Gastrointestinaltrakt und verursachen im Verlauf ihrer Entwicklung durch eine hepatotracheale Wanderung Schäden an Leber und Lunge (Brown and Clayton, 1979; Clayton and Duncan, 1978; Nicholls et al., 1978). Eine Infektion mit Askariden kann bei Pferden Atemwegssymptome, schlechtes Wachstum und Kolik verursachen. In manchen Fällen kann eine vollständige Verlegung des Dünndarms oder eine Perforation auftreten (Cribb et al., 2006; Tatz et al., 2012). Um einen Spulwurmbefall von Pferden zu diagnostizieren, kann die Flotation als koproskopische Nachweismethode oder eine transabdominale Ultraschalluntersuchung angewendet werden (Nielsen et al., 2016a).

Eine Infektion mit dem equinen Pfriemenschwanz *Oxyuris equi* erfolgt nach oraler Aufnahme von Eiern, die die infektiösen L3 enthalten. Die weitere Entwicklung der larvalen Stadien erfolgt im ventralen Colon. Die Adulten besiedeln vornehmlich den Bereich des dorsalen Colons, woraufhin gravide weibliche Würmer zur Eiablage zum Perineum des Wirtstiers migrieren

(Enigk, 1949). Die mit den „Eischnüren“ abgesonderte klebrige Flüssigkeit verursacht beim Eintrocknen einen persistierenden analen Juckreiz bei den Wirtstieren. Equine Infektionen mit *Oxyuris equi* sind weltweit verbreitet und werden auch in Europa oft mit schwankenden Prävalenzen gemeldet (Straub, 2020; Wolf et al., 2014). Sie werden in allen Altersgruppen beobachtet, wobei vor allem Fohlen, Jährlinge und junge Adulte von patenten Infektionen betroffen sind (Reinemeyer and Nielsen, 2014; Reinemeyer, 2012).

2.2. Strategien zur Kontrolle von Endoparasiten

2.2.1. Methoden zum Nachweis von Endoparasiten

Koproskopische Verfahren

Der Nachweis einer patenten Infektion mit Nematoden bei Pferden erfolgt häufig durch eine koproskopische Methode. McMaster und Modifikationen dieser Methode sind gängige Flotationsverfahren, welche zum quantitativen Einachweis von gastrointestinalen Nematoden verwendet werden (Cringoli et al., 2004; Nielsen, 2021). Die Bestimmung der Anzahl der Wurmeier pro Gramm Kot (EpG) ist die am häufigsten verwendete Methode zur Diagnose einer Infektion mit adulten Strongyliden aber auch von z.B. Spulwürmern (Kaplan and Nielsen, 2010). Die Eier von kleinen und großen Strongyliden lassen sich anhand ihrer Morphologie nicht voneinander abgrenzen, es ist jedoch eine morphologische Unterscheidung der mittels Larvenkultur zu gewinnenden dritten Larvenstadien anhand der Anzahl der Mitteldarmzellen der L3 möglich (Russel, 1948).

Der koproskopische Nachweis von *Anoplocephala* spp.-Eiern weist aufgrund der sporadischen Ausscheidung und der ungleichmäßigen Verteilung im Kot Einschränkungen hinsichtlich der Sensitivität auf (Abbott and Barrett, 2008; Nilsson et al., 1995; Traversa et al., 2008). Die semi-quantitative kombinierte Sedimentation-Flotation mit konzentrierter Zuckerlösung als Flotationsmedium wird derzeit als Methode zum koproskopischen Nachweis von Cestodeneiern empfohlen (Proudman and Edwards, 1992; Rehbein et al., 2011; Tomczuk et al., 2014). Proudman und Edwards (1992) ermittelten für diese Methode eine Sensitivität von 61 %. Daher sollte bei der Bewertung von koproskopischen Untersuchungsergebnissen die Möglichkeit eines falsch negativen Ergebnisses insbesondere im Hinblick auf einen Bandwurmbefall bedacht werden.

Aufgrund des speziellen Eiablageverhaltens sind die Eier von *O. equi* nur selten koproskopisch nachweisbar, eine Diagnose kann unter dem Mikroskop nach einer Probennahme mit einem transparenten Klebestreifen an der Perianalregion gestellt werden (Reinemeyer and Nielsen, 2014).

Serologie

Es wurde ein diagnostischer Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Detektion von migrierenden *S. vulgaris*-Larven unter Verwendung eines rekombinanten SvSXP Proteins entwickelt (Andersen et al., 2013). Detektierbare *S. vulgaris* Antikörper-Level bleiben bis zu fünf Monate nach anthelminthischer Behandlung erhalten (Nielsen et al., 2015b). Auch die Entwicklung von serologischen Methoden zum Nachweis von Larvenstadien der kleinen Strongyliden wurde beschrieben (Mitchell et al., 2016; Tzelos et al., 2020).

Zum Nachweis einer Infektion mit *Anoplocephala* spp. wurden verschiedene ELISAs entwickelt, die auf einem Koproantigen-Nachweis (Kania and Reinemeyer, 2005; Skotarek et al., 2010) oder auf die Untersuchung von Serum (Hoglund et al., 1995; Proudman and Trees, 1996a, b) oder Speichel (Lightbody et al., 2016) basieren.

Molekulare Methoden

Es kann anhand konventioneller oder real-time PCRs auf eine Infektion mit *S. vulgaris* hin untersucht werden, wofür zunächst Parasiteneier bzw. Larven aus den Kotproben isoliert werden (Bracken et al., 2012; Nielsen et al., 2008). Bereits Campbell et al. (1995) beschrieben, dass eine Differenzierung der großen Strongyliden mittels PCR auf der Grundlage der Variation in den Internal Transcribed Spacer (ITS) 2-Sequenzen erfolgen kann. Zur Differenzierung von 13 häufig vorkommenden Cyathostominae-Spezies und zur gleichzeitigen Unterscheidung von den großen Strongyliden wurde durch Traversa et al. (2007) ein Reverse-Line-Blot-Test entwickelt. Dieser Test verwendet die Intergenic Spacer (IGS) Region als genetischen Marker und wurde durch Cwiklinski et al. (2012) um weitere Spezies ergänzt, indem für 21 verschiedene Cyathostominae-Spezies die Sequenzen der IGS-DNA-Region beschrieben wurden. Das DNA-Metabarcoding ist eine Möglichkeit zur Untersuchung von Nematodenpopulationen und Avramenko et al. (2015) entwickelten mit diesem Konzept einen Assay zur Erforschung des gastrointestinalen „Nemabioms“ von Rindern auf der Grundlage der ITS-2-Sequenz. Zur Charakterisierung von gemischten MDS-Infektionen bei Pferden wurde ein quantitativer ITS-2 DNA Metabarcoding Assay zur Speziesdifferenzierung entwickelt (Poissant et al., 2021). Courtot et al. (2023) untersuchten die Eignung der Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit I (COI) zur Bestimmung der Artzusammensetzung bei equinen Mischinfektionen mit verschiedenen Cyathostominae-Spezies mittels Amplikon-Sequenzierung und stellten fest, dass der Ansatz mit der COI im Vergleich zu der ITS-2-Region größere Einschränkungen aufweist, obwohl für beide Methoden noch Forschungsbedarf besteht.

Zum Nachweis einer Bandwurminfektion wurden durch Drogemüller et al. (2004) ITS-2-Primer für die Detektion von *A. perfoliata* entwickelt. Darauf aufbauend entwickelten Bohórquez et al.

(2015) eine Multiplex-PCR, die *A. perfoliata*, *A. magna* und *P. mamillana* simultan detektieren kann.

2.2.2. Anthelminthika

Wirkstoffe

Aktuell werden die Wirkstoffgruppen der Tetrahydropyrimidine (Pyrantelpamoat (PYR)), makrozyklische Lactone (ML; Ivermectin, Moxidectin) und Benzimidazole (BZ; Fenbendazol) als Breitspektrum-Anthelminthika zur chemotherapeutischen Behandlung einer Nematoden-Infektion für Pferde verwendet. Als weiteres Anthelminthikum gegen Nematoden bei Pferden ist der Wirkstoff Piperazincitrat in Deutschland verkehrsfähig, welches jedoch durch die erforderliche hohe Dosierung oft nur durch eine Nasenschlundsonde appliziert werden kann. Zur Behandlung von Cestoden ist das Pyrazino-Isochinolin-Derivat Praziquantel verfügbar, wobei auch PYR mit einer (doppelten) Dosis von 13,2 mg/kg Körpergewicht eine anticestodale Wirkung aufweist.

Behandlungsstrategien

Bei dem Entwurmungsmanagement wird häufig zwischen der konventionellen Strategie und dem selektiven Ansatz unterschieden. Bei der konventionellen, strategischen Entwurmung werden in der Regel alle Pferde eines Betriebs bzw. einer Altersgruppe zu bestimmten Zeitpunkten oder in regelmäßigen Abständen anthelminthisch behandelt, wobei meist auch das saisonal höhere Infektionsrisiko während der Weidesaison berücksichtigt wird (Proudman and Matthews, 2000). Im Gegensatz dazu werden bei der selektiven anthelminthischen Therapie adulte Pferde individuell basierend auf einem evidenzbasierten Ansatz nach erfolgtem Wurmeinachweis behandelt. Diese Entwurmungsstrategie wurde in den 2000er Jahren entwickelt, um der beobachteten zunehmenden Verbreitung von Anthelminthika-Resistenzen (AR) entgegenzuwirken, die mit den regelmäßigen anthelminthischen Behandlungen in Verbindung gebracht wurde (Kaplan, 2002; Peregrine et al., 2014). Die selektive Entwurmung basiert auf regelmäßigen Kotuntersuchungen. Sie dient explizit zur Bekämpfung von kleinen Strongyliden und zur Reduzierung der Kontamination der Weiden mit Strongylideneiern. Eine Behandlungsempfehlung orientiert sich an der Zahl der Eier von Magen-Darm-Strongyliden (MDS) pro Gramm Kot. So empfiehlt die Vereinigung European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (ESCCAP, 2019) ab 200 EpG oder bei dem koproskopischen Nachweis anderer Darmparasiten eine anthelminthische Behandlung. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass sich selektive Behandlungsstrategien nicht für juvenile Pferde eignen, da das Immunsystem erst bei Adulten ausreichend gegen Pferdehelminthen anspricht (Reinemeyer and Nielsen, 2017).

Bei der selektiven Behandlung ist außerdem zu berücksichtigen, dass von der Anzahl der Eier pro Gramm Kot nur bedingt auf die tatsächliche Wurmlast an kleinen Strongylyden geschlossen werden kann (Nielsen et al., 2010). Eine morphologische Unterscheidung der MDS-Eier zwischen kleinen und großen Strongylyden ist unter dem Mikroskop nicht möglich. Dies kann dazu führen, dass Pferde mit geringer Eiausscheidung, die jedoch mit pathogenem *S. vulgaris* infiziert sind, aufgrund der EpG-Werte nicht mit Anthelminthika behandelt werden. Es wird von keiner Korrelation zwischen dem Vorhandensein von *S. vulgaris* und der Höhe des EpG-Wertes berichtet (Cain et al., 2018; Tydén et al., 2019a). Ein selektives Behandlungsmanagement basierend auf EpG-Werten weist daher insbesondere im Hinblick auf andere wichtige Parasiten wie Bandwürmer, Spulwürmer und große Strongylyden Limitationen auf und kann ein potenzielles Risiko darstellen, daher sollten weitere spezifische diagnostische Tests durchgeführt werden (Nielsen et al., 2014a). Im Rahmen eines selektiven Entwurmungsmanagements wird daher eine regelmäßige Untersuchung auf eine mögliche Infektion mit *S. vulgaris* bei Pferden durch Larvenkultur und eine gezielte Behandlung empfohlen (ESCCAP, 2019; Nielsen et al., 2016c).

Anthelminthika-Resistenzen

Es wird eine Resistenzentwicklung von Helminthen des Pferdes gegenüber einigen Wirkstoffgruppen beschrieben. Die World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) definiert AR in ihren Guidelines als eine vererbare Veränderung der Empfindlichkeit gegenüber einem Anthelminthikum in einer Population von parasitären Nematoden, so dass eine Dosis, die normalerweise eine $\geq 95\%$ ige Reduktion der adulten Würmer bewirkt, eine $\leq 80\%$ ige Clearance bewirkt (Geary et al., 2012). Im Gegensatz dazu wird die Wirksamkeit eines Anthelminthikums in Dosisfindungsstudien durch die berechnete prozentuale Wirksamkeit von $\geq 90\%$ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe bestimmt (Geurden et al., 2022). Kürzlich wurden die neuen Empfehlungen der WAAVP für die Bewertung von Anthelminthika-Resistenzen veröffentlicht, die tierartspezifisch bei Pferden auf die Cyathostominen und *Parascaris* spp. eingehen (Kaplan et al., 2023). Zum Monitoring von AR in gastrointestinalen Parasiten der Pferde wird der Eizahlreduktionstest (FECRT) aktuell als Standardmethode angewandt und durch die neuen WAAVP-Leitlinien wird eine Standardisierung in der Durchführung ermöglicht. Die neuen Leitlinien empfehlen bei Pferden keinen einheitlichen Schwellenwert zur Beurteilung des FECRT, da Unterschiede hinsichtlich des verwendeten Anthelminthikums und den entsprechenden Parasiten berücksichtigt werden sollten (Kaplan et al., 2023).

Von BZ-Resistenzen in Cyathostominen wird weltweit berichtet und auch Resistenzen gegen die Tetrahydropyrimidine haben sich in den letzten Jahrzehnten weit verbreitet. Auch hinsichtlich der Wirksamkeit von Anthelminthika gegen die eingekapselten Larvenstadien der

kleinen Strongyliden liegen Hinweise auf eine reduzierte larvicidale Wirkung von Fenbendazol im Vergleich zu den älteren Daten vor (Bellaw et al., 2018). Demgegenüber wurden ML-Resistenzen bzw. eine reduzierte Wirksamkeit der ML gegen kleine Strongyliden früher weniger frequent beschrieben (Canever et al., 2013; Relf et al., 2013; Traversa et al., 2009), jedoch melden aktuelle Studien das Auftreten von resistenten Cyathostominae-Populationen gegen sowohl Ivermectin als auch Moxidectin und weisen darauf hin, dass geeignete Maßnahmen zur Überwachung der Wirksamkeit von ML und zur Vermeidung der weiteren Ausbreitung erforderlich sind (Bull et al., 2023; Nielsen et al., 2020).

Boersema et al. (2002) berichteten erstmals von dem Auftreten ML-resistenter *Parascaris* spp.-Populationen. Seither wurden zahlreiche Fälle von Ivermectin-resistenten *Parascaris* spp. veröffentlicht (Peregrine et al., 2014) und inzwischen sind auch Fälle von AR gegenüber BZ und PYR bekannt (Armstrong et al., 2014; Lyons et al., 2008).

Es wurde in den letzten Jahren ein Auftreten von ML-Resistenzen in *O. equi* beobachtet (Sallé et al., 2016; Scháňková et al., 2013; Wolf et al., 2014).

Benzimidazole bewirken einen hemmenden Effekt auf die Polymerisation von α - und β -Tubulindimeren zu Mikrotubuli, wodurch wichtige Zellfunktionen wie die Zellteilung, Zellform, Nährstoffaufnahme und der intrazelluläre Transport gestört werden (Lacey, 1988). Die Entwicklung der BZ-Resistenzen der Nematoden wird auch mit Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in dem β -Tubulin-Gen vom Isotyp 1 assoziiert. Es werden SNPs (TTC zu TAC), die zu einem Austausch in den Codons 167 (F167Y) oder 200 (F200Y) führen, wodurch Tyrosin anstelle von Phenylalanin exprimiert wird, mit BZ-Resistenz in Verbindung gebracht (Kwa et al., 1993; Prichard, 2001). Auch der Ersatz von Glutamat in Codon 198 durch die aliphatischen Aminosäuren Alanin (E198A, GAA zu GCA), Leucin (E198L, TTA), Valin (E198V, GTA) und Isoleucin (E198I, ATA) sowie die positiv geladene Aminosäure Lysin (E198K; AAA) wurden vor allem bei Wiederkäuernematoden mit BZ-Resistenz assoziiert (Dilks et al., 2020; Ghisi et al., 2007; Martínez-Valladares et al., 2020; Mohammedsalih et al., 2021; Redman et al., 2015). Zudem wurde in der kürzlich veröffentlichten Studie von Venkatesan et al. (2023) eine neuartige Mutation in Codon 134 (Q134H mit CAA zu CAT) in dem Isotyp 1 β -Tubulin-Gen von *Ancylostoma caninum* beschrieben, die mit BZ-Resistenz in Verbindung gebracht wird.

Monitoring von Resistenzen

Zum Monitoring von AR in gastrointestinalen Parasiten der Pferde werden phänotypische und genotypische Tests angewandt. Bei dem FECRT als Standardmethode wird die anthelminthische Wirksamkeit über die prozentuale Reduktion der über den Kot ausgeschiedenen Nematoden-Eier bewertet, indem die EpG-Werte vor und nach der Entwurmung ermittelt werden (Kaplan et al., 2023). Eine weitere phänotypische Methode zum

Nachweis von AR in einer Population ist die Bewertung der Egg Reappearance Period (ERP), in der das Zeitintervall zwischen der letzten Behandlung mit einem wirksamen Anthelminthikum und der erneuten Ausscheidung von Parasiten-Eiern bestimmt wird (Nielsen, 2019). Die Interpretation einer verkürzten ERP ist jedoch nicht eindeutig und sollte nicht als alleiniges Indiz für eine beginnende AR gewertet werden (Nielsen, 2022; Nielsen et al., 2014b). Dies wird auch in einer Übersichtsarbeit von Macdonald et al. (2023) adressiert, indem hervorgehoben wird, dass weitere Studien erforderlich sind, um die Ursachen der verkürzten ERP zu ermitteln. Dementsprechend sollten Studien zur ERP auch andere biologische Faktoren im Zusammenhang mit Pferden, Cyathostominae-Arten sowie Umwelt- und regionale Faktoren, einschließlich Jahreszeit, Klima, Temperatur und Niederschlag, berücksichtigen.

Die am häufigsten verwendete *in vitro* Methode zum Nachweis einer BZ-Resistenz von Nematoden ist der Eischlupfhemmtest (engl. Egg Hatch Test, EHT), bei dem Helmintheneier in verschiedenen Konzentrationen eines Anthelminthikums bebrütet werden und die hemmende Wirkung auf das Schlüpfen der Larven aus den Eiern untersucht wird (Coles et al., 2006; von Samson-Himmelstjerna et al., 2009a). Daneben stehen genotypische Nachweismethoden zur Verfügung, die als Allel-spezifische PCR-Tests SNPs detektieren. Die molekulare Analyse von AR-assoziierten genetischen Veränderungen bietet im Gegensatz zu phänotypischen Tests die Möglichkeit, die Entwicklung von AR in einem früheren Stadium zu erkennen (Coles et al., 2006). Lake et al. (2009) entwickelten einen Pyrosequencing Assay, in dem SNPs in den Codons 167 und 200 des β -Tubulin Isotyp 1 Gens detektiert werden können, welche mit dem Auftreten von BZ-AR in kleinen Strongyliden assoziiert werden. Die Pyrosequenzierung ist eine Sequenzierungstechnik für kurze DNA-Fragmente, bei der freigesetzte Pyrophosphate als ein Nebenprodukt der DNA-Synthese erfasst werden. Trotz der Untersuchung dieser Kandidatengene sind die genetischen Grundlagen hinter den Resistenzmechanismen für die meisten Anthelminthika noch unzureichend geklärt. Die Next-Generation-Sequencing-Technik ermöglicht ein besseres Verständnis der Mechanismen, die zur Entwicklung von AR führen. Genom- und Transkriptomanalysen bieten vielversprechende Möglichkeiten zur Charakterisierung zusätzlicher Merkmale und zur Identifizierung von Kandidatengenen (Doyle and Cotton, 2019).

Vorbeugende Maßnahmen gegen Resistenzentwicklung

Als Folge der sich ausbreitenden AR weisen besondere Warnhinweise auf die sachgemäße Anwendung von Anthelminthika hin. Es wird empfohlen die anthelminthische Wirksamkeit zu kontrollieren, indem der Behandlungserfolg zum Beispiel mittels FECRT überprüft wird. Zudem wird darauf hingewiesen, dass eine wiederholte Gabe von Wirkstoffen einer Substanzklasse die Resistenzentwicklung fördern kann und die angewandte Dosis genau nach Körpergewicht berechnet werden sollte, damit eine Unterdosierung vermieden wird (VETIDATA, 2022). Diese

Empfehlung basiert auch auf den Erkenntnissen, dass anthelminthische Behandlungen mit subtherapeutischen Dosen unter Berücksichtigung von weiteren Wirts- und Parasitenparametern, wie der Immunität und dem Weidezugang des Wirts sowie den Überlebensraten der freilebenden Stadien auf der Weide, eine Resistenzentwicklung fördern können, wenn heterozygot-resistente Parasiten überleben (Smith et al., 1999). Neben der Behandlungshäufigkeit und der Altersstruktur der Herde beeinflussen auch externe Faktoren wie Klima und Jahreszeit die Resistenzentwicklung, so dass ein betriebsspezifisches Management entwickelt werden muss, um die Verbreitung von AR zu hemmen (Leathwick et al., 2019). So kann sich in kühl-gemäßigten Klimazonen wie Deutschland eine langsamere Ausbreitung von Resistenzen zeigen, wenn eine Entwurmung in Jahreszeiten mit niedrigeren Entwicklungsraten der ausgeschiedenen Eier zu L3 durchgeführt wird. Dadurch wird vermieden, dass Würmer, die diese Behandlung überlebt haben, zur Kontamination der Weide beitragen (Nielsen et al., 2019).

Anthelminthika für Pferde sind in Deutschland seit den 1970er Jahren verschreibungspflichtig und können nur über den Tierarzt oder die Tierärztin bezogen werden. Auch Länder wie Dänemark, Finnland, die Niederlande, Italien und Schweden haben strengere Vorschriften für den Verkehr von Anthelminthika zur Verwendung bei Equiden festgelegt, wobei zum Teil vorherige diagnostische Schritte vor der Verschreibung von Anthelminthika gesetzlich vorgeschrieben sind (Becher et al., 2018). Es wird in den aktuellen Empfehlungen zu allgemeinen Entwurmungsstrategien empfohlen, die Behandlungsintensität zu reduzieren, um die Entwicklung von Resistenzen zu verringern (ESCCAP, 2019; Kaplan and Nielsen, 2010; Rendle et al., 2019).

2.2.3. Risikofaktoren für Helmintheninfektion und Betriebsmanagement

Im Rahmen des Betriebsmanagements sollten Risikofaktoren berücksichtigt werden, die mit einem Helminthenbefall bei Pferden assoziiert werden oder die Prävalenz der Parasiten in domestizierten Equiden beeinflussen können. Hierbei wird zwischen intrinsischen Faktoren wie Alter, Geschlecht und Rasse des Pferdes und extrinsischen Faktoren wie Haltungsform und klimatischen Bedingungen unterschieden.

Intrinsische Faktoren

Das Alter der Pferde stellt einen wichtigen Risikofaktor für Helmintheninfektionen dar. So werden Spulwurminfektionen vornehmlich bei Fohlen diagnostiziert, da die Immunität noch nicht voll ausgebildet ist (Clayton and Duncan, 1979). Strongyliden werden bei Pferden aller Altersklassen nachgewiesen, treten jedoch gehäuft mit höheren EpG-Werten bei Pferden bis zum fünften Lebensjahr auf (Elghryani et al., 2023; Joó et al., 2022; Kuzmina et al., 2016; Love and Duncan, 1992; Nielsen et al., 2018; Scala et al., 2020). Dies hängt höchstwahrscheinlich

mit der noch nicht abgeschlossenen Entwicklung des Immunsystems in diesem Alter zusammen (Adams et al., 2015).

Das Geschlecht beeinflusst das Infektionsrisiko, weil der Immunstatus eines Tieres von den Sexualhormonen beeinflusst wird, aber auch andere geschlechtsspezifische Faktoren wie das Verhalten können hierbei einen Einfluss spielen (Elghryani et al., 2023; Lamason et al., 2006). So zeigte sich in einer italienischen Studie von Scala et al. (2020) ein Einfluss durch das Geschlecht, da für weibliche Tiere signifikant höhere EpG-Werte ermittelt wurden. In einer deutschen Studie schieden Stuten und Hengste mehr MDS-Eier aus als Wallache (Hinney et al., 2011a) und in einer spanischen Studie wurden bei weiblichen Pferden häufiger Strongyloiden- oder Askariden-Infektionen diagnostiziert als bei männlichen Pferden, wobei nicht zwischen kastrierten und unkastrierten Tieren unterschieden wurde (Francisco et al., 2009).

Auch die Pferderasse hat einen Einfluss auf das Risiko einer Helmintheninfektion, wobei bei Vollblütern (Kornaś et al., 2010) und auch bei anderen Zuchtpferden wie dem Ukrainer und dem Russischen Traber höhere EpG-Werte beobachtet wurden (Kuzmina et al., 2016). Die Gründe für die höhere Zahl der entdeckten MDS-Eier im Vergleich zu nicht reinrassigen Pferden und autochthonen Rassen sind möglicherweise auf eine unterschiedliche Immunität und genetische Mechanismen zurückzuführen, bedürfen jedoch weiterer Untersuchungen, um sie genauer zu bestimmen (Kuzmina et al., 2016). Demgegenüber beobachteten Hinney et al. (2011a) eine höhere Ausscheidungsintensität bei Kaltblütern und Wildpferden im Vergleich zu Vollblütern. Gehlen et al. (2020) untersuchten in einer Fall-Kontroll-Studie die Prävalenz von Helminthen bei Kolikpatienten, wobei kein Zusammenhang zwischen dem Vorkommen bzw. dem Ausmaß einer Helmintheninfektion und dem Auftreten einer Koliksymptomatik gefunden wurde. Es wurde jedoch ein signifikant vermindertes Kolikrisiko bei Ponys im Vergleich zu Warmblütern beobachtet. Außerdem wiesen Pferde, die vor weniger als einer Woche mit Anthelminthika behandelt worden waren, ein höheres Kolikrisiko auf als Pferde, die vor mehr als acht Wochen entwurmt wurden (Gehlen et al., 2020).

Extrinsische Faktoren

Die Form der Tierhaltung beeinflusst das Infektionsrisiko, jedoch sind die beobachteten Unterschiede der Betriebstypen nicht einheitlich. So berichteten Osterman-Lind et al. (1999) von signifikant höheren EpG-Werten bei Pferden aus Gestüten im Vergleich zu anderen Betriebsformen, wie Pensionsställen oder Reitbetrieben. Demgegenüber wurde in einer Studie von Larsen et al. (2002) ein höheres Risiko für einen equinen Endoparasitenbefall in Reitschulen beobachtet. In einer Studie von von Samson-Himmelstjerna et al. (2009b) wurden die Ergebnisse der koproskopischen Untersuchungen zwischen verschiedenen Betriebsformen verglichen und es waren adulte Pferde auf deutschen Reiterhöfen signifikant seltener koproskopisch MDS-positiv als Pferde in Rennpferdställen in Deutschland. In einer

ungarischen Studie wurde beobachtet, dass die EpG-Werte von Pferden, die mit extrem hoher Besatzdichte (>30 Pferde/ha) gehalten wurden, signifikant höher waren im Vergleich zu Pferden, die in niedriger Besatzdichte gehalten wurden (Joó et al., 2022).

Weidehaltung und die Möglichkeit zu Grasen sind Risikofaktoren, da infektiöse Larvenstadien oral aufgenommen werden können. So wiesen in der Studie von Kuzmina (2012) Pferde in reiner Boxenhaltung im Vergleich zu anderen Haltungsformen mit Paddock- oder Weidezugang einen geringeren Strongylidenbefall auf. Ein wichtiger Faktor zur Vorbeugung von Endoparasitenbefall bei Pferden und zur Verringerung des Infektionsdrucks ist die Vermeidung der Kontamination der Umwelt. Durch Weidehygiene kann die orale Aufnahme infektiöser Larven reduziert werden, wenn der Kot mindestens einmal, besser zweimal wöchentlich von der Weide abgesammelt wird (Cain et al., 2019; Corbett et al., 2014; Osterman-Lind et al., 2022). Auch die Stallhygiene stellt einen wichtigen Faktor zur Kontrolle von MDS-Infektionen bei Pferden dar (Hinney et al., 2011b). In der Studie von Fritzen et al. (2010) zeigte sich eine signifikant geringere Prävalenz von *P. equorum* auf Betrieben, die durch tägliche Reinigung und eine jährliche Grundreinigung und Desinfektion der Pferdeboxen eine gute Stallhygiene praktizierten (Fritzen et al., 2010).

Ein Weidewechsel durch Weideumtrieb oder Portionsweiden kann den Lebenszyklus der Helminthen unterbrechen, wenn die infektiösen Larvenstadien mangels Wirts absterben. Allerdings sind die Überlebenszeiten der Larven unter den verschiedenen Klimaeinflüssen zu berücksichtigen, so zeigte sich in einer schwedischen Studie von Osterman-Lind et al. (2022), dass eine einjährige Weidepause die Anzahl der L3 von kleinen und großen Strongyliden reduzierte, jedoch eine Ruhezeit von zwei Jahren für eine parasitenfreie Weide notwendig war. Ein Weidewechsel in Form einer Rotationsweidehaltung kann eine Übertragung von Helminthen über die Weide verringern und zeigte sich in der Studie von Relf et al. (2013) als ein schützender Faktor.

Geilstellen sind Bereiche auf der Weide, die durch Pferdekot verunreinigt sind und eine besonders hohe Larvendichte aufweisen (Herd and Willardson, 1985). Die Entfernung von Geilstellen wurde in den Studien von Fritzen et al. (2010) und Relf et al. (2013) mit einer geringen Strongyliden-Prävalenz assoziiert. Die Wechselbeweidung mit Schafen oder Rindern stellt ebenfalls eine Möglichkeit dar, die Zahl der Strongylidenlarven auf der Weide zu verringern, da die Wiederkäuperparasiten, abgesehen von *Trichostrongylus axei*, nicht auf das Pferd als Wirt ausweichen können und die Wiederkäuer zudem die Geilstellen abweiden (Eysker et al., 1983).

2.3. Übergeordnete Zielsetzung der eigenen Dissertation

Ein verantwortungsvolles und betriebsspezifisches Parasitenmanagement kann im Rahmen einer tierärztlichen Beratung nur mit Kenntnissen über das aktuelle regionale Vorkommen von equinen Helmintheninfektionen und über die Verbreitung von resistenten Parasitenpopulationen entwickelt werden. Das Ziel dieser Dissertation war es daher, basierend auf einer epidemiologischen Untersuchung in Berlin und Brandenburg Erkenntnisse über die aktuelle Verbreitung von Helminthen in den regionalen Pferdebeständen zu gewinnen. Dabei sollten insbesondere die Prävalenz von equinen Bandwurminfektionen und das Vorkommen der großen und kleinen Strongyloiden mit verschiedenen koproskopischen, molekularbiologischen und serologischen Methoden analysiert werden und potenzielle Risikofaktoren für die Infektion der Pferde mit gastrointestinalen Helminthen ermittelt werden. Die Studienergebnisse sollten dazu beitragen, die Auswahl der diagnostischen Verfahren und die anthelminthischen Behandlungsempfehlung für regionalen Pferde zu optimieren.

Eine Veröffentlichung der Studienergebnisse wurde in Form von zwei wissenschaftlichen Publikationen in peer-reviewed Journals angestrebt. Die erste Veröffentlichung sollte vertiefend auf die aktuelle Prävalenz, die gängigen koproskopischen und serologischen Nachweismethoden und die Risikofaktoren von *Anoplocephala* spp.-Infektionen bei Pferden eingehen. Ein zweiter wissenschaftlicher Artikel sollte einen Überblick über die Verbreitung von Nematoden in der Studienpopulation geben und speziell auch auf die Prävalenz von *S. vulgaris* eingehen. In diesem Projekt sollten zusätzlich eine Pyrosequenzierungs-basierte Nachweismethode für *S. vulgaris* zur Bestimmung der Allelfrequenzen in den mit BZ-Resistenz-assoziierten Codons 167, 198 und 200 des β -Tubulin Isotyp 1 Gens und eine real-time PCR mit hochauflösender Schmelzkurvenanalyse zur Speziesdifferenzierung von *S. edentatus*, *S. equinus* und *S. asini* entwickelt und in der zweiten Publikation beschrieben werden.

3. Publikationen

3.1. Investigations on the occurrence of tapeworm infections in German horse populations with comparison of different antibody detection methods based on saliva and serum samples

Jürgenschellert, Laura; Krücken, Jürgen; Austin, Corrine J.; Lightbody, Kirsty L.; Bousquet, Eric; von Samson-Himmelstjerna, Georg

Parasites & Vectors. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04318-5>

3.1.1. Abstract

Background

Effective and sustainable worm control in horses would benefit from detailed information about the current regional occurrence of tapeworms. Different diagnostic methods are currently available to detect *Anoplocephala* spp. infections in horses. However, the format as well as the sensitivity and specificity of the methods vary considerably.

Methods

A coprological, serological and questionnaire study was conducted to investigate the prevalence and risk factors of tapeworm infections on 48 horse farms in the region of Berlin and Brandenburg, Germany. In total, faecal samples of 484 horses were analysed using the double centrifugation/combined sedimentation-flotation and mini-FLOTAC. Serum (n = 481) and saliva (n = 365) samples were analysed by ELISAs to determine antibody levels against *Anoplocephala* spp. 12/13 kDa excretory/secretory (E/S) antigens.

Results

Cestode eggs were detected in 0.6% of faecal samples (farm prevalence 6.3%) without differences between the two methods. In contrast, antibodies against *Anoplocephala* spp. were detected in 16.2% (farm prevalence 52.1%) and in 29.5% (farm prevalence 75.7%) of the serum and saliva samples, respectively. Both ELISA based methods for detection of tapeworms reported a greater number of infected animals requiring treatment than were positively identified by coproscopy. Logistic regression analysis identified permanent pasture access, large pastures and regular pasture changes and high strongyle egg counts as risk factors for positive serum antibody responses to *Anoplocephala* spp. while last treatment with

praziquantel was protective. Other protective factors were the presence of foals and high numbers of horses on the farm. Daily removal of faeces from the pasture and horse age did not have a significant effect.

Conclusions

The findings of the present serological investigation indicate that tapeworm prevalence in Berlin/Brandenburg horse farms is much higher than would be anticipated by using conventional/coproscopic analyses. Moreover, the majority of tapeworm-positive horses had not received a cestocidal drug at their last treatment. Considering the already known low sensitivity of the coproscopic detection, the equine veterinary diagnostics can be enhanced by the use of antibody detection methods such as the saliva-based ELISA.

3.1.2. Background

Horses are particularly prone to infections with ubiquitous gastrointestinal helminth parasites during the grazing period. A major risk factor for *Anoplocephala* spp. is access to pasture [1]. The infestation with tapeworms is caused by the oral uptake of infected oribatid mites (Acari: Oribatida), intermediate hosts carrying the infectious cysticercoid metacestode [2].

Tapeworm species infecting horses as definitive hosts are *Anoplocephala perfoliata*, *Anoplocephala magna* and *Paranoplocephala mamillana* (Eucestoda: Anoplocephalidae) [3]. Here the species are summarised as *Anoplocephala* spp. since *P. mamillana* is considered to be relatively rare and the *Anoplocephala* species are the species of predominant veterinary importance [4]. The prepatency of *A. perfoliata* ranges from one and a half to four months [5]. The detection of cestode prevalence in horses strongly depends on the methods used (Table 1). Post-mortem studies conducted in Germany have previously revealed *A. perfoliata* infection in 11.0% to 75.0% of the examined horses [6,7,8,9]. Studies conducted using faecal examination of horses determined a 2.0% prevalence of tapeworms in Brandenburg, Germany (farm level 14.3%) [10] and of 3.0% (farm level 35.2%) in northern Germany [11]. Infections with *A. perfoliata* can lead to clinical signs of colic and cause pathological alterations to the intestinal mucosa at the attachment site on the ileocaecal junction and the caecal wall, in particular in the case of horses chronically infected with a large number of worms [4, 12,13,14]. An infection with *A. perfoliata* is a significant risk factor for ileal impaction colic. This also applies for the occurrence of spasmodic colic in horses, whereas in this case the risk increases with higher worm burden [4].

Table 1 (Tab1 P1) Previous studies on equine tapeworm infections in Germany.

Region	Year ^a	Study design		Species and prevalence (%)	References
		Method	HL/FL		
Brandenburg	2006	Combined	HL	<i>Anoplocephala</i> spp. (2.0)	Hinney et al. [10]
		sedimentation- flotation, McMaster	FL	<i>Anoplocephala</i> spp. (14.3)	
Lower Saxony	2000, 2001	McMaster (modified)	HL	<i>Anoplocephala</i> spp. (0.2)	Wirtherle [39]
Bavaria	2002, 2003	Post mortem sectio	HL	<i>A. perfoliata</i> (28.5); <i>P.</i> <i>mamillana</i> (1.0)	Rehbein et al. [9]
		Post mortem sectio	HL	<i>A. perfoliata</i> (38.0)	
Bavaria	na	Combined sedimentation- flotation	HL	<i>A. perfoliata</i> (18.0)	Beelitz and Gothe [6]
Northern Germany	1998, 1999	Combined sedimentation- flotation	HL	<i>Anoplocephala</i> spp. (3.0)	Behrens [11]
			FL	<i>Anoplocephala</i> spp. (35.2)	
Lower Saxony	1995	Post mortem sectio	HL	<i>A. perfoliata</i> (75.0); <i>A.</i> <i>magna</i> (12.5); <i>P.</i> <i>mamillana</i> (12.5)	Cirak et al. [8]
Nation-wide	1958	Post mortem sectio	HL	<i>Anoplocephala</i> spp. (11.0)	Kiedrowski [7]

Anoplocephala spp. may include *Anoplocephala perfoliata*, *Anoplocephala magna* and *Paranoplocephala mamillana*

HL horse level, FL farm level

^a Sampling year

Cestode eggs are released when the gravid proglottids are detached from the tapeworm and shed in the faeces. Since the eggs are not evenly distributed in faeces, coproscopical analysis is not reliable and suffers from poor sensitivity [12, 15, 16]. Studies conducted using different faecal analysis methods for the detection of cestode eggs rated the semiquantitative combined sedimentation-flotation with concentrated sugar solution for flotation as the most sensitive coproscopical method [17,18,19]. However, Slocombe [20] reported a sensitivity of 62% and a specificity of 100% using the Cornell-Wisconsin centrifugal flotation technique with 5 g faeces,

and a sensitivity of 100% when testing faecal samples 18 hours after anticestodal treatment. Rehbein et al. [18] compared the different results obtained when combined sedimentation-flotation was performed with varying amounts of faeces and type of flotation medium. A total of 74.8% of the sampled horses tested positive when considering the combined results of all methods, while 72.8% of all the horses were found to be positive when using 15 g faeces and saturated saccharose solution as flotation medium. Proudman & Edwards [17] determined a sensitivity of 61% for this method when compared to determination of total worm counts at necropsy. When evaluating sensitivity, the exclusion of false negative results in animals with less than 20 tapeworms led to an increase in sensitivity to 92%. No or weak correlation between infection intensity and the number of cestode eggs per gram of faeces was observed in some surveys [12, 17, 21]. On the other hand, Kjaer et al. [22] reported a significant correlation (Spearman's rank coefficient of 0.71) and considered the combined sedimentation-flotation using a large amount of sample material (30 g faeces) as a method to detect potentially pathogenic infection intensities (> 20 tapeworms/horse [14]).

The insufficient sensitivity of the coproscopic examinations led to the development of more advanced diagnostic methods. Therefore, serum-based ELISAs [23,24,25] and a coproantigen ELISA [26, 27] were developed. Recently, a saliva-based ELISA detecting *Anoplocephala*-specific antibodies using a non-invasive approach [28] was conceived as an improved diagnostic option. Other investigations focused on the development of PCR assays to detect and discriminate equine tapeworm stages in faeces [3, 29].

Sensitivities and specificities were not published for all of these assays but the sensitivity of the serum-based ELISA of Proudman & Trees [25] was 68% and the specificity was 95% (in helminth-naive horses). The serum-based *Anoplocephala* ELISA described by Lightbody et al. [28] with 85% sensitivity and 78% specificity is a modified version of the ELISA published by Proudman & Trees [23]. For the saliva-based ELISA [28] 83% sensitivity and 85% specificity were reported. Current immunodiagnostic methods for the detection of 12/13 kDa E/S *A. perfoliata* antigens are probably not sufficiently specific to discriminate between the two *Anoplocephala* species [30] whereas little or no cross-reactivity occurs with *P. mamillana* [23, 25].

The study described here aimed to provide an overview about the current prevalence and risk factors of *Anoplocephala* spp. infections in horses in Brandenburg and Berlin, Germany. Further, the saliva tapeworm ELISA was compared to its serum equivalent in terms of sensitivity as well as to the coproscopic diagnosis.

3.1.3. Methods

Study design and location

The study was carried out between May 2017 and January 2018 and included 484 domestic horses of different ages (9 months to 34 years) from 48 horse farms in the federal states Berlin and Brandenburg, Germany. All members on the mailing list of the Berlin-Brandenburg Regional Equestrian Association (LPBB, as of 07.04.2017) were contacted by e-mail. In addition, an advertisement was placed in a regional horse journal and an online ad on the corresponding homepage (www.reiten-zucht.de). This study was made public to other horse owners through social media (<https://de-de.facebook.com>). Each farm responding to the contact mail or advertisements, holding at least four horses and meeting the requirements regarding the last deworming was included in the study. Horses or farms were excluded if the last anthelmintic treatment of the horses with praziquantel or pyrantel pamoate in the cestocidal dosage of 13.2 mg pyrantel/kg body weight was carried out less than four months prior to sampling. Other anthelmintic treatments during this period did not result in exclusion from the study if no anticestodal effect was to be expected. Serum and faecal samples were taken from each horse. Saliva samples were collected from June 2017 to the end of the study using a saliva collection kit (Austin Davis Biologics Ltd., Northamptonshire, UK). Between four and 17 horses were sampled per farm (aiming at 50 farms and 10 horses on each farm). In this study, the authors define strategic deworming management as a regularly performed anthelmintic treatment of all horses on a farm without prior investigation to identify any parasitic infections that indicate treatment. Selective deworming was defined as an anthelmintic treatment of horses after a given diagnosis, most commonly based on faecal egg counting. A questionnaire was filled out with the farm manager or a horse owner at the day of sampling (Additional file 1: Text S1). Questions were asked about parameters of the farm such as number of animals and presence of foals, and about pasture and hygiene management. Further information on the current deworming management as well as horse parameters such as the age were also collected.

Coproscopic analyses

Since it was aimed to collect data about *Anoplocephala* and strongyle nematodes, optimised coproscopic analysis methods for both parasite groups were used. Faecal egg counts (FEC) were determined using mini-FLOTAC and a double centrifugation/combined sedimentation-flotation technique in parallel. Prior to the mini-FLOTAC [31], 5 g faecal samples were processed with the Fill-FLOTAC apparatus as described by Noel et al. [32], with 45 ml of saturated saline solution (specific gravity 1.2 (NaCl)) added. For each sample, two 1-ml flotation chambers of the mini-FLOTAC device were counted corresponding to a multiplication factor of 5 to convert raw counts into eggs per gram (epg) of faeces data. The double

centrifugation/combined sedimentation-flotation technique was performed as described by Rehbein et al. [18] with slight modifications. For each individual faecal sample 15 g of faeces were utilised. After the first centrifugation, the supernatant was decanted, and the pellet was floated using a concentrated sugar solution (specific gravity 1.26).

Serum and saliva analyses

Serum samples from 48 farms were analysed with the Horse Serum Tapeworm ELISA (Austin Davis Biologics Ltd, Northamptonshire, UK) [28]. The cut-off values are set as follows: a serum score of < 2.7 is considered to be a negative result; a serum score between 2.7 and 6.3 corresponds to a borderline but positive result; and a serum score of > 6.3 indicates a moderate/high infection, including clinically relevant tapeworm burdens of more than 20 tapeworms [28]. Up to 9 ml of blood were collected from each horse in sterile polypropylene tubes. On the same day, the blood was centrifuged at $2000\times g$ for 10 min and the serum was aliquoted into sterile tubes. Samples were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and shipped on dry ice between laboratories.

Saliva samples from 37 horse farms were collected and tested using the EquiSal® Tapeworm Saliva Test (Austin Davis Biologics Ltd., Northamptonshire, UK) [28]. The resulting saliva score leads to the diagnosis of low (< -0.09), borderline but positive (0.09–0.6) or moderate/high (> 0.6) tapeworm burden. Following saliva collection, the swabs were placed into the preservative solution provided in the test kit and stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Samples were shipped without cooling within ten days after sampling and placed at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ until testing was carried out. Samples are stable for at least three weeks at room temperature once in the preservative solution (unpublished data). Both *Anoplocephala* assays were performed within three weeks after sampling in the laboratories of Austin Davis Biologics Ltd. (Northamptonshire, UK).

Data analyses

Data were entered into a Microsoft Excel spreadsheet. Correlation analysis and all graphs were created using GraphPad Prism® Version 5.03. All other statistical analyses were performed with R 3.4.4 using RStudio version 1.1.456 for Windows. Confidence intervals for proportions were calculated as Wilson Score intervals with finite population correction in OpenEpi Version 3.01 [33]. A mid-p exact test for differences between proportions was conducted using the `tab2by2.test()` function from the `epitools` package version 0.5-10. A logistic regression analysis was performed to identify variables with potential influence on the odds of a horse in the study population to be positive for antibodies against *Anoplocephala* spp. in the serum-based tapeworm ELISA. The serum-based tapeworm ELISA was chosen here due to the fact that the saliva ELISA was not available in the beginning of the study and thus the dataset was smaller. Logistic regression models were calculated using the `glm()` function in R.

The final logistic regression model for explanatory variables that probably affect the odds of a horse being tested positive in *Anoplocephala* spp. serum ELISA was fitted using stepwise backwards elimination with the drop1() function aiming to minimise the Akaike information criterion (AIC). The data for the variable treatment schedule were arranged in four categories. A distinction was made between selective and strategic deworming and the latter were graded according to annual treatment frequencies in low (1–2 treatments per year), moderate (3 treatments per year) and high (> 4 treatments per year). The variables limited and unlimited pasture access were defined according to whether the horses had hourly access to the pasture or unlimited access all day long during the warmer period of the year. To evaluate the logistic regression model, different pseudo-R2 values were calculated with the PseudoR2() function from the DescTools 0.99.27 package.

3.1.4. Results

Study population

Table 2 provides general data of the study population. The majority of horse owners employed a strategic deworming management with an anthelmintic treatment schedule of 2 to 4 times a year. In this study, 42 horses from five farms received an anthelmintic treatment only irregularly or on suspicion of parasite infection caused by equine gastrointestinal nematodes or cestodes. Among them was only one horse farm that dewormed based on indication due to previous faecal analyses. This also applied to one horse that had recently been placed on a strategically deworming farm. One farm manager stated that deworming was only carried out in cases of suspected endoparasitic disease when the horses were in a reduced general condition. Two farm managers stated that they irregularly sent faecal samples for coproscopic diagnosis. No coproscopic diagnosis was performed on any of the other horse farms. Only 7.2% of the horses had received a treatment containing praziquantel as last anthelmintic therapy. A combination of ivermectin and praziquantel was administered to each of these horses. Praziquantel alone or in combination with moxidectin were not used for any horse in the study population at the last anthelmintic treatment.

Table 2 (Tab2 P1) General data of 484 horses from 48 farms included in the study

Parameter	Value
Age (years; median range)	12.0 (0.8–34.0)
Mares (%)	50.2
Geldings (%)	46.7
Stallions (%)	3.1
Faecal samples (%)	100
Saliva samples (%)	75.4
Serum samples (%)	99.4

Parameter	Value
Last treatment	
Ivermectin + Praziquantel (%)	7.2
Ivermectin (%)	42.4
Moxidectin (%)	4.1
Doramectin (%)	1.4
Fenbendazole (%)	4.3
Pyrantel (%)	38.2
Unknown	2.3
Period between last anthelmintic treatment and sampling (weeks; median range)	14.4 (1.4–100.0)
Horses sampled per farm (number; median, range)	10 (4–17)
Pasture access (%)	96.7
Unlimited (%)	28.9
Limited (%)	67.8
Pasture area/horse (ha) (mean, range)	0.6 (0.1–2.0)
Size/number of horses per farm (mean, range)	40.2 (6–110)
Foals present (%)	39.6
Treatment schedule (annual)	
Selective (%)	8.7
Low number (1–2) of treatments (%)	32.8
Moderate number (3) of treatments (%)	39.6
High number (≥ 4) treatments (%)	18.9

Faecal examination

Altogether, 484 faecal samples were examined coproscopically. The estimated prevalence of *Anoplocephala* spp. is presented in Table 3 for the different methods. Eggs of *Anoplocephala* spp. were found in 3 faecal samples (0.6%, 95% CI 0.2–1.8%). The farm prevalence of detected *Anoplocephala* spp. eggs in faeces was 6.3% (95% CI 2.1–16.8%). All three samples were tested positive with both mini-FLOTAC and combined sedimentation-flotation and originated from different farms.

Table 3 (Tab3 P1) Prevalence of *Anoplocephala* spp. using different methods

Method	Prevalence (%)	95% confidence interval (%)	n/N
Sedimentation-flotation	0.6	0.2–1.8	3/484
Mini-FLOTAC	0.6	0.2–1.8	3/484
Serum-ELISA	16.2	13.2–19.8	78/481
Saliva-ELISA	29.5	25.1–34.5	108/365

n, number in the category N total number.

In addition, strongyle eggs were observed in 66.7% (95% CI 62.4–70.8%), *Parascaris* spp. in 0.4% (95% CI 0.01–1.5%) and *Oxyuris equi* in 1.2% (95% CI 0.6–2.7%) of the samples. These figures refer to the combined results of both faecal analysis methods. None of the samples was positive for *Strongyloides westeri* or *Habronema muscae*.

Serum ELISA

Of the 481 collected serum samples, 16.2% (95% CI 13.2–19.8%) (Table 3) tested positive in the serum-based tapeworm ELISA and were diagnosed as borderline (9.1%; 95% CI 6.9–12.1%) or moderate/high (7.1%; 95% CI 5.5–9.7%). On the farm level, 52.1% (95% CI 38.3–65.5%) were positive with at least one horse on the farm reporting a borderline serum score with antibodies against *Anoplocephala* spp.

Saliva ELISA

Between June 2017 and January 2018, 365 saliva samples from 37 horse farms were tested with the saliva-based ELISA. Altogether 29.5% (95% CI 25.1–34.5%) of the tested horses were diagnosed positive (Table 3) including samples with borderline (9.6%; 95% CI 7.0–13.0) or moderate/high (20.0%; 95% CI 16.2–24.4) saliva scores. On 75.7% (95% CI 59.9–86.6%) of the farms at least one horse was diagnosed to be positive (both borderline and moderate/high) by the saliva-based tapeworm ELISA. Table 4 provides details of the determined farm prevalence using the two ELISA tests.

Table 4 (Tab4 P1) Prevalence in serum- and saliva-based ELISA for all 48 farms

Farm number	Total no. of horses on farm	<i>N</i>	Prevalence in serum (95% CI) (%)	<i>N</i>	Prevalence in saliva (95% CI) (%)
1	32	10	40.0 (20.9–68.7)	na	na
2	21	10	0 (0.0–27.8)	na	na
3	80	10	0 (0.0–27.8)	na	na
4	38	10	0 (0.0–27.8)	na	na
5	85	10	10.0 (2.9–39.4)	na	na
6 ^a	30	10	50.0 (28.1–71.9)	na	na
7	44	10	10.0 (3.9–38.3)	na	na
8	29	10	0 (0.0–27.8)	na	na
9	50	10	0 (0.0–27.8)	na	na
10	25	10	50.0 (29.2–70.8)	na	na
11	14	12	0 (0.0–24.3)	na	na

Farm number	Total no. of horses on farm	N	Prevalence in serum (95% CI) (%)	N	Prevalence in saliva (95% CI) (%)
12	60	10	0 (0.0–27.8)	10	20.0 (7.5–49.2)
13	30	10	0 (0.0–27.8)	10	0 (0.0–27.8)
14	95	10	0 (0.0–27.8)	10	0 (0.0–27.8)
15	75	12	0 (0.0–24.3)	11	27.3 (11.4–54.9)
16	18	10	0 (0.0–27.8)	10	10.0 (7.9–34.4)
17	44	10	40.0 (19.7–65.9)	10	60.0 (34.1–80.3)
18	22	8	0 (0.0–32.4)	8	25.0 (11.9–54.3)
19	110	10	0 (0.0–27.8)	9	33.3 (13.0–63.6)
20	90	10	30.0 (12.1–59.0)	10	50.0 (25.0–75.0)
21	18	12	25.0 (23.4–51.4)	12	75.0 (55.8–82.1)
22	23	10	10.0 (6.3–36.0)	10	0 (0.0–27.8)
23	90	9	22.2 (7.4–53.6)	9	33.3 (13.4–63.4)
24	35	10	60.0 (35.0–79.5)	10	80.0 (52.3–91.1)
25	11	10	40.0 (34.6–51.0)	10	40.0 (34.6–51.0)
26	22	10	40.0 (34.6–51.0)	10	80.0 (54.5–88.8)
27	85	5	0 (0.0–43.5)	5	20.0 (4.3–61.7)
28 ^a	12	10	60.0 (46.2–68.3)	10	100 (80.2–100.0)
29	35	10	20.0 (8.9–47.8)	8	0 (0.0–32.4)
30	33	11	0 (0.0–25.9)	11	0 (0.0–25.9)
31	12	8	0 (0.0–32.4)	8	25.0 (17.5–48.8)
32	25	5	0 (0.0–43.5)	7	57.1 (29.1–80.2)
33	35	10	10.0 (4.5–37.7)	10	10.0 (4.5–37.7)
34	20	10	0 (0.0–27.8)	10	0 (0.0–27.8)
35	25	16	18.8 (13.7–40.0)	16	31.3 (22.9–47.6)
36	100	15	0 (0.0–27.8)	13	15.4 (5.5–41.1)
37	20	10	0 (0.0–27.8)	10	0 (0.0–27.8)
38	28	12	33.3 (19.2–55.5)	12	50.0 (31.1–69.0)
39	26	10	20.0 (10.2–46.5)	10	20.0 (10.2–46.5)
40 ^a	37	8	100 (67.6–100.0)	8	87.5 (55.2–95.5)

Farm number	Total no. of horses on farm	<i>N</i>	Prevalence in serum (95% CI) (%)	<i>N</i>	Prevalence in saliva (95% CI) (%)
41	15	11	9.1 (1.0–29.3)	11	36.4 (26.7–53.1)
42	15	8	12.5 (8.8–40.5)	8	37.5 (21.9–61.3)
43	35	16	0 (0.0–19.4)	16	6.3 (4.5–24.9)
44	20	9	0 (0.0–29.9)	9	0 (0.0–29.9)
45	40	8	37.5 (16.3–66.8)	8	37.5 (16.3–66.8)
46	29	17	17.6 (12.2–35.0)	17	23.5 (16.1–40.8)
47	6	4	25.0 (16.6–57.9)	4	25.0 (16.6–57.9)
48	85	5	0 (0.0–43.5)	5	0 (0.0–43.5)

^aFarm with a horse tested *Anoplocephala* spp. positive in the faecal analysis

CI confidence interval, *na* not available

Comparison between coproscopic, serum and saliva testing

Altogether, the results of 363 matching samples from the saliva, serum and faecal analysis were obtained. Each of the three horses, which were *Anoplocephala* spp. positive in the faecal analysis, had a moderate/high score in the serum ELISA. From one of these three horses, no saliva sample was collected; the other two had saliva scores indicating a moderate/high tapeworm burden. Considering the prevalence in serum- and saliva-based ELISA on the farms (Table 4), it appears that the horses that were *Anoplocephala* spp. positive in faecal analysis were found on farms with a high prevalence.

Among the 363 matching samples, 106 (29.2%, 95% CI 24.8–34.1) were positive in the saliva-based ELISA and 61 (16.8%, 95% CI 13.3–21.0%) in the serum-based ELISA. This difference was statistically significantly different in the mid-p exact test ($P < 0.0001$). The scores calculated for the paired serum and saliva ELISAs are plotted against each other in Fig. 1. Since data were not normally distributed, Spearman's correlation index was calculated. There was a highly significant correlation of serum and saliva scores ($P < 0.0001$) and the Spearman correlation coefficient of $\rho = 0.602$ indicated a moderate positive correlation [34].

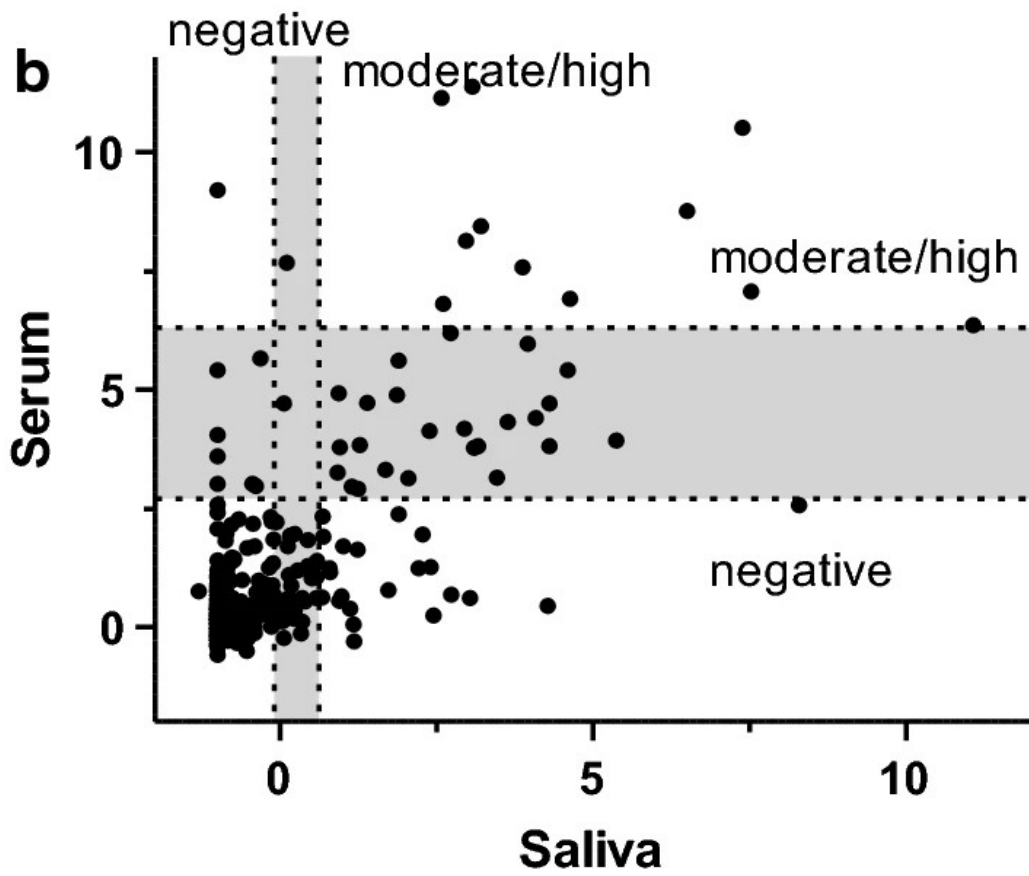
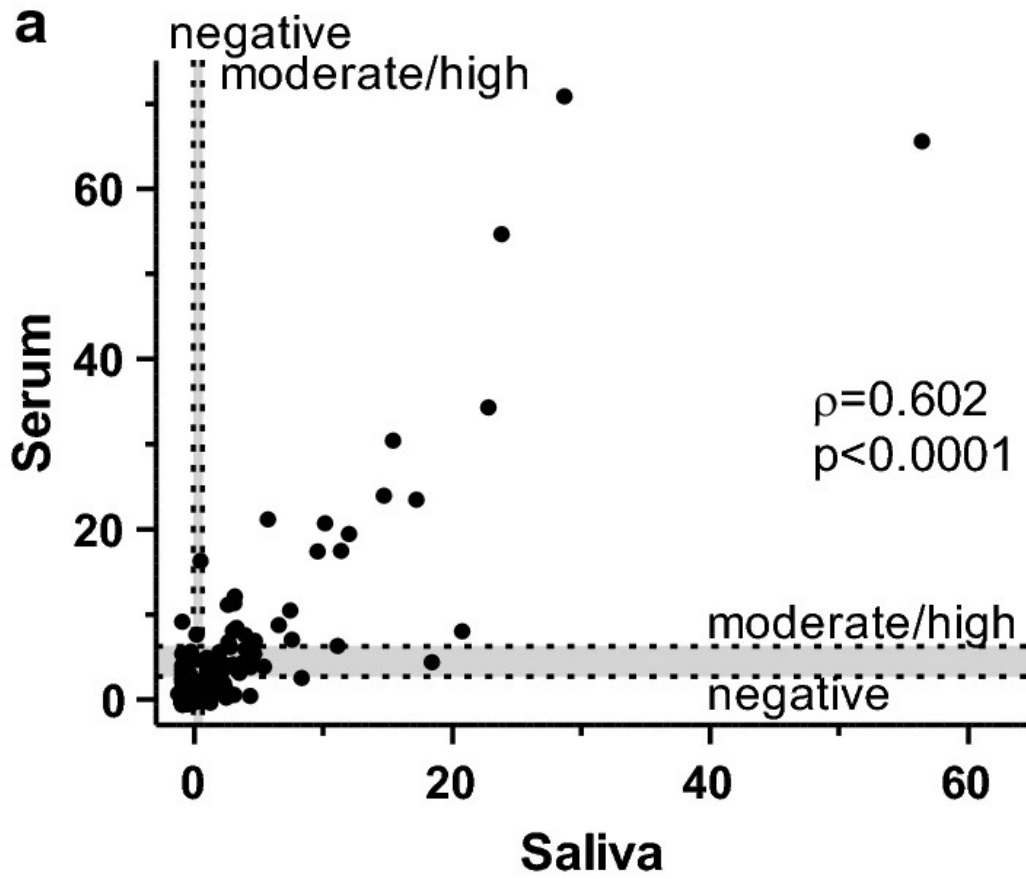


Fig. 1 (Fig1 P1) Comparison of the serum and saliva scores for the detection of antibodies against *Anoplocephala* spp. Serum scores were plotted over saliva scores for 363 horse samples for which both datasets were available. a Complete dataset. b Enlarged view of the lower left area of (a) with 16 data points out of axis limitations. Cut-off values are indicated by spotted horizontal and vertical lines. Serum tapeworm ELISA: cut-off: < 2.7 low; > 6.3 moderate/high. Saliva-based ELISA: Cut-off: < -0.09 low; > 0.62 moderate/high. Positive but borderline score areas are indicated by grey shading

Inter-rater agreement was evaluated using kappa (κ) statistics. There was a significant agreement between both tests ($P < 0.05$) and the unweighted Cohen's κ coefficient to measure the inter-rater agreement of saliva-based and serum-based ELISA for the detection of antibodies directed against *Anoplocephala* spp. resulted in a value of 0.54 (95% CI 0.44–0.63), which indicates a considerable agreement [35]. For 16.7% of the matching samples, saliva and serum assays produced disagreeing results but in the majority of these cases (62.3%) the positive assay reported a borderline score, i.e. above the cut-off for negative samples but below the cut-off for moderate/high tapeworm burdens (Fig. 1).

Risk factor analysis

The odds ratios of different explanatory variables included in the final model are plotted in Fig. 2. More details on the model are provided in Table 5. The variables treatment schedule and period between the last antiparasitic treatment and sampling were eliminated from the final model. Limited pasture access was protective in comparison with permanent pasture access during grazing season. No pasture access was even more protective, but this was not statistically significant presumably since the number of horses in this category was very small and therefore 95% CIs were very wide. Other pasture related variables in the final model were daily pasture cleaning (no significant effect), the size of the pasture per horse and if horses were regularly moved between pastures. The latter two both were highly significantly associated with higher odds to be infected. The use of praziquantel in the last deworming was significantly associated with lower *Anoplocephala* infection risks compared to all other drugs used for treatment including pyrantel in the dosage recommended for treatment against nematodes. The only exception was doramectin, but here again a very wide 95% CI was encountered since only a very small number of horses all from the same farm represented this dataset. Presence of foals on the farm was associated with low odds to detect *Anoplocephala* antibodies. Very small but significant protective effects were associated with the number of horses on the farm. A small protective effect of the age was not significant but was included in the final model since it decreased its AIC. The high pseudo-R² values according to McFadden & Nagelkerke show that the model is a considerable improvement in comparison to the null model.

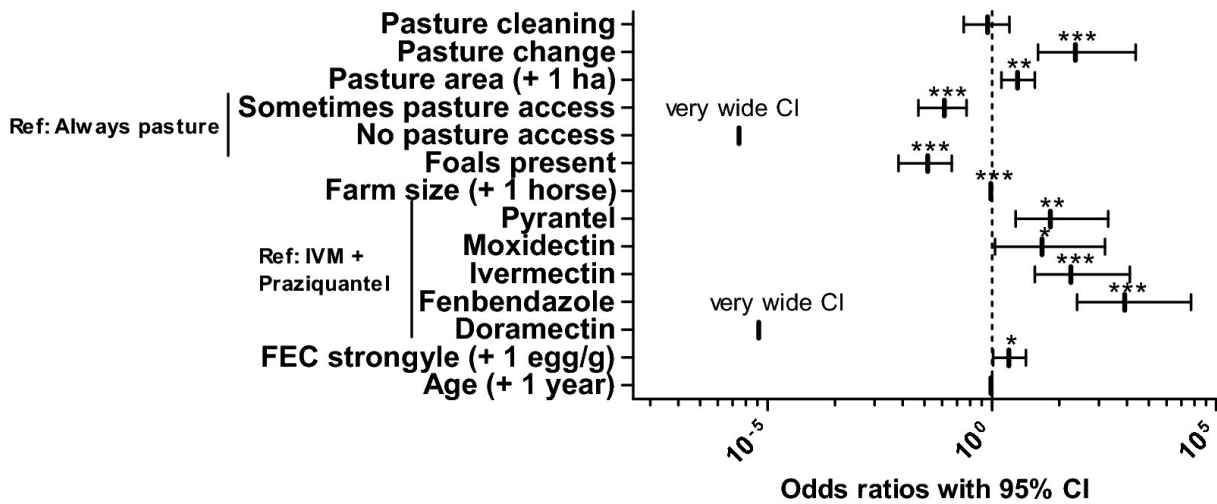


Fig. 2 (Fig2 P1) Forest plot showing odds ratios (with 95% confidence intervals) for the final logistic regression model for explanatory variable potentially influencing the odds to be positive in the *Anoplocephala* serum ELISA. For the bivariate variables pasture cleaning (daily removal of faeces), pasture change (regular change between different pastures) and foals present (at least one foal on farm) the reference level is “no”. For multilevel variables, the reference level is given in the figure. Metric variables included are the pasture area (in ha/horse), number of horses on the farm, faecal egg counts (FEC) of strongyle nematodes, and age of the horse (in years). The variable pasture access was divided in the levels: always pasture, i.e. permanent access to pasture during the grazing season (reference category); sometimes pasture access (hourly access to the pasture during grazing season); and no pasture access (no pasture access at all). For the variable last anthelmintic treatment, the only level including the highly cestocidal drug praziquantel, which was always given in combination with ivermectin (IVM), was chosen as reference. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Table 5 (Tab5 P1) Final logistic regression model to identify risk factors explaining positive samples in *Anoplocephala* serum ELISA

Reference level	Term	Estimate	SE	P-value	Odds ratio	Lower 95% CI	Upper 95% CI
	Pasture cleaning	- 0.219	0.590	0.711	0.804	0.236	2.459
	Pasture change	4.288	1.188	< 0.0001	72.836	10.669	1586.703
	Pasture area (+ 1 ha)	1.317	0.438	0.003	3.732	1.613	9.096

Reference level	Term	Estimate	SE	P-value	Odds ratio	Lower 95% CI	Upper 95% CI
	Sometimes						
Always	pasture	- 2.443	0.627	< 0.0001	0.087	0.023	0.274
pasture	access						
access	No pasture access	- 12.971	1475.0	0.993	2.327×10^{-6}	8.047×10^{-230}	2.976×10^{19}
	Foals present	- 3.305	0.692	< 0.0001	0.037	0.008	0.127
	No. of horses (+ 1 horse)	- 0.053	0.014	< 0.0001	0.948	0.921	0.971
	Pyrantel	2.989	1.108	0.007	19.870	3.363	390.831
	Moxidectin	2.562	1.344	0.057	12.960	1.167	330.938
Ivermectin + Praziquantel	Ivermectin	4.048	1.143	< 0.0001	57.261	9.013	1176.149
	Fenbendazole	6.812	1.420	< 0.0001	908.693	79.217	27177.460
	Doramectin	- 11.975	1726.7	0.994	6.300×10^6	na	3.445×10^{149}
	FEC strongyle (+1 egg/g)	0.862	0.428	0.044	2.369	1.061	5.751
	Age (+ 1 year)	- 0.043	0.024	0.075	0.958	0.913	1.003
	(Intercept)	- 5.600	1.697	0.001	0.004	0.000	0.072

Pseudo- $R_{2McFadden}$: 0.41; Pseudo- $R_{2Nagelkerke}$: 0.54

3.1.5. Discussion

Cestode eggs were identified in only 0.6% of the coproscopical examinations (farm level 6.3%). Compared to other studies conducted in Germany using faecal sampling (Table 1), this is slightly below the expected frequency in the study population. A prevalence of 2.0% (farm level 14.3%) was observed by Hinney et al. [10] and 3.0% (farm level 35.2%) by Behrens [11]. In the present survey, the three *Anoplocephala* spp. positive faecal samples were detected in both mini-FLOTAC and combined sedimentation-flotation. The double centrifugation/combined sedimentation-flotation technique is recommended for the coproscopical detection of *Anoplocephala* spp. eggs being relatively sensitive compared to flotation methods [17, 18]. It is noteworthy that herein, no differences were found between the data obtained by the two faecal analysis methods. However, due to the extremely small number of positive samples, this does not allow to draw any general conclusions, e.g. concerning sensitivity or specificity of the two methods.

In contrast to the coproscopically obtained prevalence, the high seroprevalence observed here is in line with the prevalences as determined in previous surveys at abattoirs in the region of Bavaria, Germany (28.5–38.0%) [6, 9]. Recently, Lightbody et al. [36] used the saliva-based ELISA in a longitudinal study with naturally infected horses from the UK and 15% initially tested positive and this value remained approximately constant in follow up visits after six and 12 months [36].

In a direct comparison of the results of the serum and saliva ELISA, a Spearman correlation coefficient of 0.602 was obtained indicating a moderate positive correlation [34]. During the validation of both tests, a considerably higher Spearman rank correlation of 0.87 was observed [28]. In the present study, the Cohen's kappa coefficient of 0.54 further indicated a considerable agreement [35] between the data obtained using the serum-based and the saliva-based ELISA. The saliva-based ELISA test ranked 29.5% of saliva samples above the treatment threshold, whereas in serum-based ELISA this applied to 16.2% of the horses tested. Since the sensitivities for both tests as specified by Lightbody et al. [28] with 83% for saliva and 85% for serum are comparable, this difference is considerable. Disagreeing results were particularly often identified in weakly positive samples. Low parasite numbers might be an underlying reason for this observation as previously reported by Lightbody et al. [28].

Proudman & Trees [23] have investigated the decrease of IgG(T) in serum of horses after anticestodal treatment. Although the onset of IgG decay is fast after treatment, it takes several weeks to months for the antibody levels to return to a level below the cut-off for infected horses. Wilson et al. [37] determined a serum half-life of IgG(T) of approximately 35 days. The reduction of tapeworm specific IgG(T) was monitored during validation of the saliva-based ELISA [28]. The kinetics of antibody reduction in saliva was tested after deworming in eleven horses. After 6 weeks, the specific-antibody levels were reduced to below the treatment threshold for all horses [28]. The relatively rapid decrease in saliva antibody levels after treatment suggests that the majority of horses that tested positive in the present study were actually or at least recently infected at the sampling time point. Serum and saliva-based ELISAs indicate the potential for diagnostics on individual horse level. The extent to which this could reduce the use of anticestodal treatments on a regular basis should be further investigated.

The logistic regression analysis identified several risk factors that are obvious and easy to understand. For instance, the protective effect of praziquantel in the last anthelmintic treatment is expected, in particular when considering the short half-life of the antibodies against

Anoplocephala spp. [28, 37]. Last treatment with the macrocyclic lactones ivermectin or moxidectin alone or the benzimidazole fenbendazole was associated with a higher chance to be seropositive for *Anoplocephala*. In contrast, treatment with doramectin, which was used only on a few horses from the same farm and which is actually not licensed for use in horses, was associated with a very low odds ratio but a very wide confidence interval. The authors do not recommend or support anthelmintic treatment with drugs that are not registered for horses. Pyrantel is licenced for treatment of *Anoplocephala* infections when used at a (double) dose of 13.2 mg pyrantel per kg body weight. Based on previous findings, partial effects even of 6.6 mg/kg pyrantel on *Anoplocephala* for the 185 horses that had received pyrantel as last anthelmintic drug could have been expected [38]. However, in our analysis the last anthelmintic treatment with pyrantel was not associated with lower odds for *Anoplocephala* infections.

Of course, access to pasture, which also means access to oribatid mites as intermediate hosts, must be considered a risk factor for exposure to *Anoplocephala*. Interestingly, in this context pasture hygiene in terms of pasture cleaning had no significant effect and surprisingly changing pastures over the season and a large pasture area per horse came out as risk factors instead of being protective as one could expect since low host densities should also result in low parasite prevalence. Most likely, these variables represent confounders that do not directly but indirectly affect the odds to be positive for anti-*Anoplocephala* antibodies. One possible explanation could be that large pastures and pasture rotation lead to more vegetation on the grassland. This might be beneficial for the oribatid mite populations. Therefore, it could lead to a higher proportion of grass in the total feed of horses that is potentially contaminated with mites. In contrast, many animals staying all over the year on the same pasture could lead to sparse vegetation and supplementation of feed with larger amounts of hay. Thus, large pasture areas might essentially have the same effect as unlimited access to pasture. However, many other factors can be considered, including soil and vegetation type.

Furthermore, the logistic regression showed that odds to be positive for antibodies against *Anoplocephala* were significantly increased with increasing epg for strongyle nematodes. Despite the various differences in the life-cycles of these parasite groups, both are transmitted by grazing and access to grass and low pasture hygiene might influence both in the same direction.

Other variables that showed a significant correlation with the odds to be seropositive for *Anoplocephala* were the presence of foals on the farm and the number of horses per farm. Both effects were highly significant but the effect of the number of horses was only very small (odds ratio 0.95). The effect of presence of foals was considerably larger (odds ratio 0.04).

Both effects are difficult to explain, but might be due to different farm management practices. The age of the foals cannot explain the effect since the study population included only one foal.

3.1.6. Conclusion

In this study, only a few horses were found positive for *Anoplocephala* spp. by faecal analysis. The saliva-based ELISA, as a non-invasive method, detected significantly more horses with a tapeworm antibody titre than with the serum ELISA. The most important protective factor concerning *Anoplocephala* infection was treatment with praziquantel while pasture access was the most prominent risk factor.

3.1.7. Supplementary information

Availability of data and materials

The datasets used and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgements

The authors greatly acknowledge the technical support by T. Bartmann and K. Seidl in coproscopic analyses as well as P. Renshaw and S. Trevallion in saliva testing. Sincere thanks to the horse owners and colleagues who helped in collecting and preparing samples.

Funding

Open access funding provided by Projekt DEAL. This work was funded by Virbac, Carros, France, Austin Davis Biologics Ltd, Northamptonshire, UK and Freie Universität Berlin, Berlin, Germany.

Author information

Authors and Affiliations

Institute for Parasitology and Tropical Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Robert-von-Ostertag-Str. 7-13, Berlin, 14163, Germany

Laura Jürgenschellert, Jürgen Krücken & Georg von Samson-Himmelstjerna

Austin Davis Biologics Ltd, Unit 1 Denfield Lodge, Lower Street, Great Addington, Northants, NN14 4BL, UK

Corrine J. Austin & Kirsty L. Lightbody

Virbac, 13e rue LID BP 27, Carros cedex, 06511, France

Eric Bousquet

Contributions

GvSH, JK, LJ, EB and CJA contributed to study concept design. LJ collected all samples. GvSH led the coproscopic analyses and LJ carried out the mini-FLOTAC. CJA and KLL led the laboratory work on serum and saliva ELISAs. LJ and JK analysed the data and drafted the first version of the manuscript. All authors contributed to finalisation of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Corresponding author

Correspondence to Georg von Samson-Himmelstjerna.

Ethics declarations

Ethics approval and consent to participate

All experimental procedures were approved by local authorities (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, LAGeSo, approval number Reg 0059/17).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

CJA and KLL report an affiliation to Austin Davis Biologics, a commercial company with a financial interest in the discussed content. Austin Davis Biologics supported the study by providing the saliva collection kits and performing both serum and saliva ELISAs. EB reports an affiliation to the pharmaceutical company Virbac, Carros, France, which is sponsoring clinical trials. GvSH, JK and LJ declare that they have no competing interests.

3.1.8. References

1. Kornaś S, Cabaret J, Skalska M, Nowosad B. Horse infection with intestinal helminths in relation to age, sex, access to grass and farm system. *Vet Parasitol.* 2010;174:285-91.
2. Denegri GM. Review of oribatid mites as intermediate hosts of tapeworms of the Anoplocephalidae. *Exp Appl Acarol.* 1993;17:567-80.
3. Bohórquez GA, Luzón M, Martín-Hernández R, Meana A. New multiplex PCR method for the simultaneous diagnosis of the three known species of equine tapeworm. *Vet Parasitol.* 2015;207:56-63.
4. Proudman CJ, French NP, Trees AJ. Tapeworm infection is a significant risk factor for spasmodic colic and ileal impaction colic in the horse. *Equine Vet J.* 1998;30:194-9.

5. Bain SA, Kelly JD. Prevalence and pathogenicity of *Anoplocephala perfoliata* in a horse population in South Auckland. N Z Vet J. 1977;25:27-8.
6. Beelitz P, Gothe R. Bandwurmbefall bei Schlachtpferden in Oberbayern: Befallshäufigkeit und -stärke sowie Korrelation zwischen Befall mit Adultwürmern und Einachweis im Enddarmkot. Pferdeheilkunde. 2001;17:423–8.
7. Kiedrowski C. Helminthologische Untersuchungen an Pferden vor und nach der Schlachtung. PhD thesis, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany; 1959.
8. Cirak V, Hermosila C, Bauer C. Study on the gastrointestinal parasite fauna of ponies in northern Germany. Appl Parasitol. 1996;37:239-44.
9. Rehbein S, Visser M, Winter R. Prevalence, intensity and seasonality of gastrointestinal parasites in abattoir horses in Germany. Parasitol Res. 2013;112:407-13.
10. Hinney B, Wirtherle NC, Kyule M, Mieth N, Zessin K-H, Clausen P-H. Prevalence of helminths in horses in the state of Brandenburg, Germany. Parasitol Res. 2011;108:1083.
11. Behrens T. Bandwürmer (Anoplocephaliden) beim Pferd: Prävalenz in Norddeutschland sowie Eignung eines serologischen Nachweisverfahrens (ELISA) zur Diagnostik. PhD thesis, University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany; 2001.
12. Nilsson O, Ljungstrom BL, Høglund J, Lundquist H, Uggla A. *Anoplocephala perfoliata* in horses in Sweden: prevalence, infection levels and intestinal lesions. Acta Vet Scand. 1995;36:319-28.
13. Gasser RB, Williamson RM, Beveridge I. *Anoplocephala perfoliata* of horses--significant scope for further research, improved diagnosis and control. Parasitology. 2005;131:1-13.
14. Fogarty U, del Piero F, Purnell RE, Mosurski KR. Incidence of *Anoplocephala perfoliata* in horses examined at an Irish abattoir. Vet Rec. 1994;134:515-8.
15. Abbott JB, Barrett EJ. The problem of diagnosing tapeworm infections in horses. Equine Vet J. 2008;40:5-6.
16. Traversa D, Fichi G, Campigli M, Rondolotti A, Iorio R, Proudman CJ, et al. A comparison of coprological, serological and molecular methods for the diagnosis of horse infection with *Anoplocephala perfoliata* (Cestoda, Cyclophyllidea). Vet Parasitol. 2008;152:271-7.
17. Proudman CJ, Edwards GB. Validation of a centrifugation/flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis. Vet Rec. 1992;131:71-2.
18. Rehbein S, Lindner T, Visser M, Winter R. Evaluation of a double centrifugation technique for the detection of *Anoplocephala* eggs in horse faeces. J Helminthol. 2011;85:409-14.
19. Tomczuk K, Kostro K, Szczepaniak KO, Grzybek M, Studzińska M, Demkowska-Kutrzepa M, et al. Comparison of the sensitivity of coprological methods in detecting *Anoplocephala perfoliata* invasions. Parasitol Res. 2014;113:2401-6.
20. Slocombe JOD. A modified critical test for the efficacy of pyrantel pamoate for *Anoplocephala perfoliata* in equids. Can J Vet Res. 2004;68:112–117.

21. Williamson RM, Beveridge I, Gasser RB. Coprological methods for the diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection of the horse. Aust Vet J. 1998;76:618-21.
22. Kjaer LN, Lungholt MM, Nielsen MK, Olsen SN, Maddox-Hyttel C. Interpretation of serum antibody response to *Anoplocephala perfoliata* in relation to parasite burden and faecal egg count. Equine Vet J. 2007;39:529-33.
23. Proudman CJ, Trees AJ. Correlation of antigen specific IgG and IgG(T) responses with *Anoplocephala perfoliata* infection intensity in the horse. Parasite Immunol. 1996;18:499-506.
24. Hoglund J, Ljungstrom BL, Nilsson O, Ugglå A. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Anoplocephala perfoliata* in horse sera. Vet Parasitol. 1995;59:97-106.
25. Proudman CJ, Trees AJ. Use of excretory/secretory antigens for the serodiagnosis of *Anoplocephala perfoliata* cestodosis. Vet Parasitol. 1996;61:239-47.
26. Kania SA, Reinemeyer CR. *Anoplocephala perfoliata* coproantigen detection: a preliminary study. Vet Parasitol. 2005;127:115-9.
27. Skotarek SL, Colwell DD, Goater CP. Evaluation of diagnostic techniques for *Anoplocephala perfoliata* in horses from Alberta, Canada. Vet Parasitol. 2010;172:249-55.
28. Lightbody KL, Davis PJ, Austin CJ. Validation of a novel saliva-based ELISA test for diagnosing tapeworm burden in horses. Vet Clin Pathol. 2016;45:335-46.
29. Drogemüller M, Beelitz P, Pfister K, Schnieder T, von Samson-Himmelstjerna G. Amplification of ribosomal DNA of Anoplocephalidae: *Anoplocephala perfoliata* diagnosis by PCR as a possible alternative to coprological methods. Vet Parasitol. 2004;124:205-15.
30. Bohorquez A, Meana A, Luzon M. Differential diagnosis of equine cestodosis based on E/S and somatic *Anoplocephala perfoliata* and *Anoplocephala magna* antigens. Vet Parasitol. 2012;190:87-94.
31. Barda BD, Rinaldi L, Ianniello D, Zepherine H, Salvo F, Sadutshang T, et al. Mini-FLOTAC, an innovative direct diagnostic technique for intestinal parasitic infections: experience from the field. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7:e2344.
32. Noel ML, Scare JA, Bellaw JL, Nielsen MK. Accuracy and precision of mini-FLOTAC and McMaster techniques for determining equine strongyle egg counts. J Equine Vet Sci. 2017;48:182-7.e1.
33. Dean AG, Sullivan KM, Soe MM. OpenEpi: Open source epidemiologic statistics for public health. 2013. <https://www.openpi.com>. Accessed 11 May 2020.
34. Bühl A, Zöfel P. SPSS 11: Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. München: Pearson Studium; 2002.
35. Hedderich J, Sachs L. Angewandte Statistik. Methodensammlung mit R. 14th ed. Berlin-Heidelberg-New York: Springer; 2012.

36. Lightbody KL, Matthews JB, Kemp-Symonds JG, Lambert PA, Austin CJ. Use of a saliva-based diagnostic test to identify tapeworm infection in horses in the UK. *Equine Vet J.* 2018;50:213-9.
37. Wilson WD, Mihalyi JE, Hussey S, Lunn DP. Passive transfer of maternal immunoglobulin isotype antibodies against tetanus and influenza and their effect on the response of foals to vaccination. *Equine Vet J.* 2001;33:644-50.
38. Lyons ET, Drudge JH, Tolliver SC, Swerczek TW, Collins SS. Determination of the efficacy of pyrantel pamoate at the therapeutic dose rate against the tapeworm *Anoplocephala perfoliata* in equids using a modification of the critical test method. *Vet Parasitol.* 1989;31:13-18.
39. Wirtherle NC. Untersuchungen zur Verbreitung von Anthelminthikaresistenzen bei Pferden in Niedersachsen. PhD thesis, University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany; 2003.

3.1.9. Anteilserläuterung der Autoren

Name	Bezeichnung Autor	Erläuterung Anteil Leistung
Jürgenschellert, Laura	Erstautorin	Mitwirkung bei Konzipierung der Studie Sammlung der equinen Kot-, Speichel- und Serumproben Durchführung der Kotprobenuntersuchung mittels mini-FLOTAC Sammlung/Auswertung der Daten, Mitwirkung Durchführung stat. Analysen Erstellung des Manuskripts
Krücken, Jürgen	Co Autor	Mitwirkung bei Konzipierung der Studie Mitwirkung Durchführung stat. Analysen und Auswertung der Daten Mitwirkung Erstellung Manuskript
Austin, Corrine J.	Co Autorin	Mitwirkung bei Konzipierung der Studie Leitung der Laborarbeiten für die Serum- und Speichel-ELISAs Mitwirkung Erstellung Manuskript
Lightbody, Kirsty L.	Co Autorin	Mitwirkung Durchführung der Laborarbeiten für die Serum- und Speichel-ELISAs Mitwirkung Erstellung Manuskript
Bousquet, Eric	Co Autor	Mitwirkung bei Konzipierung der Studie

Publikationen

von Samson-
Himmelstjerna, Georg

Co Autor

Mitwirkung Erstellung Manuskript
Projektleitung und Mitwirkung bei Konzipierung
der Studie
Leitung der koproskopischen Analysen
Mitwirkung Erstellung Manuskript

3.2. Occurrence of strongylid nematode parasites on horse farms in Berlin and Brandenburg, Germany, with high seroprevalence of *Strongylus vulgaris*

Jürgenschellert, Laura; Krücken, Jürgen; Bousquet, Eric; Bartz, Jürgen; Heyer, Nina; Nielsen, Martin K.; von Samson-Himmelstjerna, Georg

Frontiers in Veterinary Science, Section Parasitology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY, <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.892920>

3.2.1. Abstract

The infection of horses with strongylid nematodes is highly prevalent, with multi-species infections being the rule. *Strongylus* spp. and in particular *Strongylus vulgaris* are amongst the most pathogenic strongyle equine parasites. Presumably due to regular strategic anthelmintic treatments in combination with long prepatencies, prevalence of these worms was severely reduced in past decades. In this study, 484 horses from 48 farms in Berlin/Brandenburg, Germany were sampled between May 2017 and January 2018. Mini-FLOTAC and combined sedimentation/flotation were used to analyse faecal samples and larval cultures were carried out from individual strongyle infected horses for molecular testing for *Strongylus* spp. infection. Additionally, for *Strongylus vulgaris*, antibodies against a recombinant larval antigen were quantified in an ELISA. Strongyle type eggs were detected in 66.7% of the individual faecal samples. Nematode DNA was amplifiable from 311 samples and *S. vulgaris* and *Strongylus edentatus* were detected in four (1.3%) and 10 (6.3%) of these, respectively, the latter using a novel high-resolution-melt PCR targeting *S. edentatus*, *Strongylus equinus*, and *Strongylus asini*. On the farm level, prevalence for *Strongylus* spp. by PCR was 12.5%. Applying a conservative cut-off (sensitivity 0.43, specificity 0.96), 21.2% of all serum samples were positive for antibodies against *S. vulgaris* larvae (83.3% prevalence on farm level). Newly developed pyrosequencing assays to analyse putatively benzimidazole resistance associated polymorphisms in codons 167, 198, and 200 of the isotype 1 β -tubulin gene of *S. vulgaris* did not detect such polymorphisms in the four positive samples. Low age and increasing access to pasture were risk factors for egg shedding and seropositivity for *S. vulgaris*. Time since last treatment increased whereas use of moxidectin and ivermectin for the last treatment decreased the risk for strongyle egg shedding. Noteworthy, horses under selective treatment had significantly higher odds to be seropositive for anti-*S. vulgaris* antibodies than horses treated four times per year (odds ratio 4.4). The serological findings suggest that exposure to *S. vulgaris* is considerably higher than expected from direct diagnostic approaches. One

potential explanation is the contamination of the environment by a few infected horses, leading to the infection of many horses with larvae that never reach maturity due to regular anthelmintic treatments.

3.2.2. Introduction

The most common and pathogenic nematode parasites in horses originate from the family Strongylidae and the subfamilies Cyathostominae and Strongylinae, respectively. They differ particularly concerning size and shape of the buccal capsule (1). The Cyathostominae (cyathostomins or small strongyles) show the highest prevalence among all helminths of horses. They do not perform tissue migration during their development in the host although they have intramucosal stages that might also become hypobiotic (2–8). In contrast, the most important members of the Strongylinae (large strongyles), which belong to the genus *Strongylus*, show complex species-specific tissue migrations through different abdominal organs over several months. During these migrations, they can cause severe tissue damage, clinical signs, and can lead to life threatening complications (9, 10).

Previous studies revealed high prevalence of strongyles on German horse farms with 91.6% by Wirtherle et al. (11) in Lower Saxony, 98.7% by Fritzen et al. (12) in North Rhine-Westphalia and 98.4% by Hinney et al. (13) in Brandenburg on the farm level. A modified McMaster method was used in all these studies. Additional coproscopic techniques (combined sedimentation/flotation technique, perianal tape test, sedimentation, and Baermann-Wetzel method) were only performed in the latter study. Kaspar et al. (14) reported a prevalence of 55.3% on the individual horse level in a study testing horses from 91 stables across Germany using a modified McMaster method and combined sedimentation/flotation. In another study using the modified McMaster method, 44.6% of the equines from 192 horse farms across Germany were found to shed strongyle eggs (15). To date, cyathostomins are considered to contribute to the vast majority of the egg shedding, since the prevalence of large strongyles was found to have dropped to very low levels following the introduction of anthelmintics with efficacy against migratory stages of these parasites in the early 1980's (16, 17). Table 1 shows the prevalence of *Strongylus vulgaris* as determined in earlier studies conducted in Germany. Using larval culture and subsequent morphological differentiation of the third stage larvae (L3), prevalences of 0.1–1.3% were observed (13–15, 18, 23).

Table 1. (Tab1 P2) Prevalence of *Strongylus vulgaris* in former studies conducted in Germany.

Region	Year ^a	Study design		Prevalence %	Reference	
		Method	HL/FL ^b			
Nationwide	2013/2014	qPCR	HL	1.9	Kaspar et al. (14)	
			FL	10.9		
		Faecal culture, larval identification	HL	1.1		
			FL	4.8		
Nationwide	2012/2013	Faecal culture, larval identification		HL	0.1	Schneider et al. (15)
Southern Germany	2011/2012	Faecal culture, larval identification		HL	1.1	Greite (18)
				FL	5.9	
Brandenburg	2006	Faecal culture, larval identification		FL	0.8	Hinney et al. (13)
North Rhine-Westphalia	2003/2004	Faecal culture, larval identification		FL	1.3	Fritzen et al. (12)
Upper Bavaria	1993/1994	Faecal culture, larval identification		HL	0	Beelitz et al. (19)
	1994/1995			HL	0	Beelitz et al. (20)
Lower Saxony	1995	Post mortem sectio		HL	100	Cirak et al. (21)
Nationwide	1958	Post mortem sectio		HL	79.8	Kiedrowski (22)

^aSampling year.^bHL: horse level; FL: farm level.

The prepatent period of *S. vulgaris* ranges from six to seven months (24). After oral ingestion of the infective third larval stage (L3), which develops on pasture, L3 undergoes exsheathment and penetrates the mucosa of the caecum and colon (25). The life cycle of *S. vulgaris* comprises an extensive parenteral larval migration. The L3 moult in the mucosa of the large intestine to L4 and starting 2 weeks post-infection begin to migrate through the intestinal arteries and the cranial mesenteric artery. They migrate both on and in the intima of the blood vessels. After about 3 months, another moult to the preadult stage occurs, and another 4–6 weeks later the worms move back with the blood stream towards the intestine (26). The most frequent clinical signs of infection with *S. vulgaris* are fever, lethargy, weight loss, and colic (26–28). The extensive parenteral migration of the larvae in the cranial mesenteric artery and its branches causes endothelial damage, resulting in inflammatory reactions. The endothelial damages lead to the development of thrombi from which emboli result, which end up in the small and large intestinal wall leading to haemorrhagic infarctions. Thickening of the arterial walls occurs (24), leading to impaired blood flow and sometimes severe damage of the arterial wall due to passive dilatation which has been reported to also result in sponge-like so-called “verminous aneurysms” (29–34). In more recent reports clinical infections with *S. vulgaris* have been associated with the appearance of non-strangulating intestinal infarction, leading to peritonitis and mild to severe colic (27, 35).

The larvae of *Strongylus edentatus* migrate to the liver through the intestinal veins. An infection is rarely reported to be associated with clinical signs (36, 37). Like *S. edentatus*, the larvae of *Strongylus equinus* also migrate through the liver, but they also pass through the pancreas and cause inflammation in both organs (38). *Strongylus asini* is described to occur in zebras and donkeys. It is reported to cause an extensive liver pathology. Horses are much less susceptible to *S. asini* than other equine species (39).

The prepatency of the cyathostomins ranges from 1.5 to 3 months (40–42). However, cyathostomin larvae can remain encysted in the caecal or colonic mucosa for 2 years or even longer when the maturation of the early L3 is arrested (7, 43, 44). Cyathostomin infections are associated with the occurrence of milder symptoms such as weight loss. However, synchronised egress of hypobiotic larvae from the mucosa can cause larval cyathostominosis that may lead to severe clinical signs such as weight loss, protein-losing diarrhoea and colic, and even death (43, 45, 46).

Detection of an equine infection with nematodes is often carried out using a coproscopic method. However, it is not possible to reliably distinguish the eggs of Cyathostominae and Strongylinae based on their morphology. Instead a larval culture is required for this purpose,

since the L3 can be distinguished microscopically between the two and also to the species level concerning *Strongylus* spp. using details such as the number of mid gut cells (47).

A real-time PCR (48), conventional PCR, and other PCR-based methods (48–51) have been described to identify patent infections with *S. vulgaris* using eggs or larval stages. It was reported that significantly higher numbers of horses were tested *S. vulgaris* positive by real-time PCR and conventional PCR than by morphological examination of L3 from larval cultures (14, 52). Serological detection of infections with cyathostomin species (53) or *S. vulgaris* (54) have been described to be possible using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs).

Currently, three broad-spectrum anthelmintic classes are commercially available by prescription for nematode control in horses in Germany: Tetrahydropyrimidines (pyrantel pamoate), macrocyclic lactones (MLs, ivermectin, moxidectin), and benzimidazoles (BZs, fenbendazole). They have been used for decades to treat and control equine nematode infections. Encysted, hypobiotic cyathostomin larvae are known to be rather insensitive to currently available anthelmintics but can be affected by treatment with moxidectin (with moderate efficacy) (16) as well as a five-day treatment with fenbendazole, the latter provided the present cyathostomin population has not developed BZ resistance (55, 56).

Anthelmintic resistance (AR) in equine nematodes is widespread (4, 57–59). Concerning strongyles it is primarily the BZ drug class against which cyathostomin populations have developed resistance, but also resistance to pyrantel is prevalent (57, 60–66). Molecular analysis of AR associated genetic changes, for example concerning the respective drug target, promises to allow the detection of AR development at earlier stages than phenotypic tests allow (67). Benzimidazoles inhibit the polymerization of α - and β -tubulin dimers into microtubules (68, 69). Disruption of microtubule polymerisation is supposed to affect the energy metabolism and inhibit the fumarate reductase and the glucose uptake in some nematode species, which leads to the death of the worms (70). Benzimidazole resistance in strongyle nematodes is particularly associated with single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the isotype 1 β tubulin gene. Exchanges in codons 167, 198, or 200 have been described to be associated with BZ resistance (71–78). It has been recorded that the SNP at codon 167 was predominantly associated with BZ resistance in cyathostomins (79).

The increasing emergence of AR of cyathostomins worldwide is a substantial concern in terms of recommendations of appropriate parasite control schemes (80). A surveillance-based approach using faecal egg count analysis (FEC) before anthelmintic treatment has been introduced in several European countries such as Denmark, Sweden, Finland, the

Netherlands, and Italy (81). A prescription-only sale of anthelmintic drugs for horses has been implemented with the aim to reduce the risk of AR development. However, no association between presence of *S. vulgaris* and the magnitude of the FEC has been found (82, 83). A reappearance of *S. vulgaris* has been reported in Denmark and Sweden upon the introduction of prescription-only policies (82, 84).

The aim of this article is to provide: (i) an overview about the distribution of nematodes in horses in Berlin and Brandenburg, Germany and (ii) an insight into the occurrence of large strongyles with a focus on *S. vulgaris*. Additional aims were to describe (iii) a real-time PCR with subsequent high-resolution melt (HRM) analysis for species differentiation of large strongyles other than *S. vulgaris* and (iv) to develop pyrosequencing assays for *S. vulgaris* to determine allele frequencies in the BZ resistance associated codons 167, 198, and 200 of the β -tubulin isotype 1 gene.

3.2.3. Materials and Methods

Ethics Approval

All experimental procedures were conducted in accordance with European (EU directive 2010/63/EU) and German (“Tierschutzgesetz”) laws and were approved by local authorities (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, registration no.: Reg 0059/17).

Study Design and Location

Serum, saliva, and faecal samples were collected between May 2017 and January 2018, and all samples were obtained from naturally infected horses. In this study, strategic deworming management was defined as a periodically repeated anthelmintic treatment applied to all or the majority of horses on a farm carried out without prior testing to identify parasitic infections. Selective deworming was defined as an anthelmintic treatment on individual horses according to a predetermined diagnosis, most commonly based on FEC. Each farm was asked to respond to a questionnaire with questions about the current parasite control management as well as pasture and hygiene management (Supplementary Questionnaire 1) (85). Data regarding eggs of Anoplocephalidae and antibodies against equine tapeworms in serum and/or saliva in the same sample set have been published previously (85).

Coproscopic Analysis

Mini-FLOTAC (University of Naples Federico II, FLOTAC® Group, Naples, Italy) counting chambers (86, 87) were used to determine FEC by processing a 5 g faecal sample with the Fill-FLOTAC device (University of Naples Federico II, FLOTAC® Group, Naples, Italy), as previously described by Noel et al. (88), with 45ml of saturated saline solution (specific gravity

1.2) being added. In addition, a double centrifugation/combination sedimentation flotation method was used according to the technique published by Rehbein et al. (89). Per faecal sample, 15 g faeces were used. After the first centrifugation step, the pellet was floated using a concentrated sucrose solution (specific gravity 1.26). Material from the surface of the solution was transferred with a horizontal wire loop to a glass slide. Eggs were counted and the egg shedding intensity was categorised as follows: 0: no eggs found; 1: 1–10 eggs per slide; 2: 11–40 eggs per slide; 3: ≥ 41 eggs per slide.

Strongyle Larval Cultures and DNA-Extraction

Strongyle larval cultures and DNA-extraction were carried out with samples that were coproscopically positive for strongyle type eggs. If possible, ~200 g (at least 50 g) of unrefrigerated fresh faecal sample material per individual animal were used for cultivation of larvae. The faecal samples were loosened manually and placed in glass jars (500 g capacity with plastic screw cap). Sawdust was added to the low viscosity samples. The plastic screw cap of the jars was placed lightly on the glass container. The samples were placed into an incubator cabinet at 25°C and a relative humidity of about 80% for 10–14 days. For harvesting of L3, jars were completely filled with tap water, a Petri dish was placed on its top and both were rapidly inverted. After incubation at room temperature for 12–16 h larvae were harvested from the water in the petri dish surrounding the glass jar.

The extraction of genomic DNA from all L3 collected for individual horses was performed using the NucleoSpin® Soil Kit (Macherey-Nagel) with buffer SL1 according to the manufacturer's instructions. DNA was eluted with 30 μ l elution buffer. Deviating from the protocol, the SpeedMill P12 from Analytik Jena AG (Jena, Germany) was used to homogenise the samples.

Polymerase Chain Reactions

PCR for the Detection of Pan-Nematode-DNA

Presence of amplifiable nematode DNA from strongyle L3 was verified using a pan-nematode PCR targeting the 28S rRNA gene as described by Demeler et al. (90). PCR reactions contained 250 nM of each primer, 200 μ M dNTPs, 0.02 U/ μ l Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo) and 2.0 μ l template DNA in 20 μ l 1 \times Phusion HF buffer. As positive control, plasmid DNA (80 copies) containing the corresponding 28S rRNA fragment from *Teladorsagia circumcincta* cloned in pCR®2.1-TOPO was used. After an initial denaturation at 98°C for 30 s, 40 cycles of 98°C for 10 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 30 s were performed. A final extension was carried out at 72°C for 5 min. If no PCR product could be detected when 2 μ l of the product were analysed on 1.5% agarose gels stained with GrGreen (Labgene, Châtel-

Saint-Denis, Switzerland), possibly due to the presence of PCR inhibitors, the template DNA was diluted 1:5 with DEPC-treated water and the PCR was repeated.

***Strongylus vulgaris*-Specific Real-Time PCR**

The DNA samples positive in the pan-nematode PCR were further analysed using an *S. vulgaris* specific real-time PCR targeting a partial ITS-2 region initially described by Nielsen et al. (48) as modified by Gehlen et al. (91). As positive control, plasmid DNA containing the ITS-2 amplicon from *S. vulgaris* in the vector pSC-B-amp/kan (Aglient Technologies, Waldbronn, Germany) was used. In each run, three different dilutions of the positive control (500, 50, and 5 copies) were analysed in parallel with the field samples. PCR reactions contained 250 nM of each primer (Supplementary Table 1) in 20 µl 1× GoTaq® qPCR Master Mix and 1 µl template DNA. After an initial denaturation at 95°C for 2min, 50 cycles consisting of denaturation at 95°C for 15 s, annealing at 61°C for 30 s and elongation at 72°C for 30 s were conducted. The subsequent melting curve analysis consisted of a rise in temperature from 68°C–95°C in 0.5°C increments for 5 s with fluorescence monitoring in each step. All samples positive for *S. vulgaris* according to amplification and melting curves were also analysed by gel electrophoresis on 2.0% agarose gels to control the size of the PCR products. Finally, PCR products were purified using the DNA Clean & Concentrator®-5 purification kit (Zymo Research, Freiburg, Germany) and sent to LGC Genomics (Berlin, Germany) for Sanger sequencing. The determined DNA sequences were compared to the NCBI database using Blastn (92).

Real-Time PCR and High-Resolution-Melt PCR Analysis for Species Differentiation of *Strongylus edentatus*, *Strongylus equinus*, and *Strongylus asini*

In order to identify samples positive for the three other members of the genus *Strongylus*, a single PCR suitable for amplifying partial *S. edentatus*, *S. equinus*, and *S. asini* ITS-2 fragments from *Equus* spp. derived samples was developed as a real-time PCR followed by a high-resolution-melt PCR analysis. Under the optimised PCR conditions, the primer pair that was used did not amplify *S. vulgaris* DNA from a plasmid containing the *S. vulgaris* ITS-2 region as insert. Plasmids for *S. equinus* and *S. asini* to be used as positive controls were ordered from Shanghai ShineGene Molecular Bio-Technologies, Inc. and contained the ITS-2 according to the GenBank accession number X77808.1 for *S. equinus* and X99345.1 for *S. asini*. For the controls of *S. vulgaris* and *S. edentatus*, the amplified ITS-2 sequence was inserted in the cloning vector pSC-B-amp/kan. In each PCR run, positive controls containing plasmid DNA corresponding to the amplicons from *S. edentatus*, *S. equinus*, and *S. asini* as templates (in duplicate with 500 copies per reaction) were run, in parallel to be used as references for melting curves. PCR reactions contained 500 nM of each primer (Supplementary Table 1) in 20 µl 1× GoTaq® qPCR Master Mix and 1 µl template DNA. The

PCR scheme consisted of an initial denaturation at 94°C for 2min followed by 50 cycles of denaturation at 94°C for 10 s, annealing at 63°C for 30 s and elongation at 72°C for 30 s. Fluorescence was measured throughout the elongation phase. Subsequently, an HRM analysis was performed by raising the temperature from 65–98°C in 0.1°C increments with each step lasting for 10 s each and fluorescence read at each step. Melting curves of PCR products were assigned to a large strongyle species using the Precision Melt Analysis Software 1.3 (Bio-Rad). All positive samples were validated by Sanger sequencing of the PCR product as described above.

Pyrosequencing of Isotype 1 β -Tubulin Polymorphisms

A partial *S. vulgaris* isotype-1 β -tubulin gene sequence was obtained using primers obtained from isotype-1 β -tubulin gene fragments in the *S. vulgaris* genome database (WormBase ParaSite PRJEB531) (93, 94). One pyrosequencing assay for the analysis of the BZ resistance associated amino acid exchange F167Y and a second for E198A and F200Y of the isotype-1 β -tubulin gene was designed based on the *S. vulgaris* isotype β -tubulin isotype 1 sequences using the Pyromark Assay Design Software version 2.0 (Qiagen, Hilden).

Plasmid DNAs containing the PCR amplicons with the susceptible genotypes were obtained by PCR using DNA of adult *S. vulgaris* specimens stored in the parasite archive of the Institute for Parasitology and Tropical Veterinary Medicine at –80°C. Plasmids with inserts encoding the resistance-associated genotypes were synthesised by General Biosystems, Inc. (Morrisville, USA). Target sequences were amplified using a PCR covering codon 167 and another covering codons 198/200, both using a biotinylated reverse primer (Supplementary Table 2). PCRs contained 200 μ M dNTPs, 250 nM of each primer, 0.02 U/ μ l Phusion Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase and 2 μ l template DNA in 50 μ l 1 \times HF buffer. As template DNA, either defined mixtures of plasmid DNA with different genotypes at codon positions 167, 198, or 200 were used or DNA extracted from the L3 pool collected from individual horses. Amplification was initiated by denaturation at 98°C for 1min followed by 50 cycles of 98°C for 15 s, 62°C for 30 s, and 72°C for 20 s. Finally, reactions were incubated at 72°C for 5min. PCR products were analysed on 2% agarose gels. Then, pyrosequencing was conducted using the Qiagen PyroMark® Q24 System according to the manufacturer's instructions. The only deviation from the protocol was to use a larger volume (40 μ l) of PCR product to be immobilised on Streptavidin-Agarose beads (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany).

Initially, pyrosequencing assays were evaluated using defined mixtures of genotypes associated with susceptibility and resistance by mixing plasmid DNAs in the ratios 0/100%, 10/90%, 20/80%, ..., 90/10%, 100/0%. Pyrograms were analysed using the Pyromark Q24 2.0.8 software.

Strongylus vulgaris ELISA

Frozen serum samples were sent to the M.H. Gluck Equine Research Centre, Department of Veterinary Science, University of Kentucky, Lexington, KY, USA and tested with an indirect ELISA using a recombinant SvSXP (rSvSXP) protein expressed by migrating *S. vulgaris* larvae as antigen (54).

Based on the optical density of positive and negative controls and sample wells on the same plate, an optical density ratio (ODR) was calculated according to the formula:

$$\text{ODR}[\%]=\frac{[\text{OD}(\text{Sample})-\text{OD}(\text{NC})]}{[\text{OD}(\text{PC})-\text{OD}(\text{NC})]}*100$$

(OD: optical density, NC: negative control, PC: positive control).

The cut-off value of an ODR of 13.5% (sensitivity 65.5% and specificity 82.1%) as established by Andersen et al. (54) was not applied to evaluate the results of the rSvSXP ELISA in the present study. Instead, a more conservative approach was chosen to evaluate the results: Cut-off values of ODR of 25% (sensitivity 0.50, specificity 0.86) and 30% (sensitivity 0.43, specificity 0.96) were used to identify potentially positive samples.

Statistical Analyses

Data were entered into Microsoft Excel spreadsheets. Pearson correlation analyses and all graphs were created using GraphPad Prism® version 5.03. All other statistical analyses were performed with R 3.4.4 in RStudio version 1.1.456 for Windows. For percentage of positive animals, 95% CIs were calculated as Wilson score intervals using the binom.wilson function in the prevalence 0.5–10.1 package.

To estimate the inter-rater agreement to compare the faecal analysis methods the Cohen's kappa coefficients were calculated using the cohen.kappa() function in R.

For the evaluation of pyrosequencing-based analysis of putatively BZ resistance associated polymorphisms in the isotype-1 β -tubulin gene of *S. vulgaris*, observed codon frequencies were plotted against calculated input frequencies. Linear regression plots with 95% confidence bands were calculated and plotted.

For identification of risk factors for strongyle egg shedding status and for being detected positive for *S. vulgaris* by serology, logistic regression models were calculated using the glm() function in R. Initially, all explanatory variables that were considered to likely affect the odds of a horse to be positive for strongyle eggs or antibodies against *S. vulgaris* were included.

Backward elimination of variables was performed using the `drop1()` function eliminating always the variable that resulted in the strongest decrease in the Akaike Information Criterion (AIC). Odds ratios and 95% CIs were obtained from parameter estimates and errors by calculating the exponential value of the results and calculating the 95% CIs using the profiling approach as implemented in the `confint()` function of the MASS package version 7.3–54. A set of pseudo R² values was calculated for the final logistic regression model using the `PseudoR2` function from the DescTools 0.99.27 package.

3.2.4. Results

Study Population and Collection of Field Samples

Faeces and serum samples were collected from 484 domestic horses from 48 yards. The study was planned to include horses that had not received anthelmintic treatment for at least 6 weeks. However, a shorter period of time elapsed between the last deworming and sampling was subsequently reported for 13 horses. For one horse, no conclusive information was available regarding the last deworming. Table 2 shows a modified version of Table 2 from Jürgenschellert et al. (85) containing general data of the study population relevant for the data presented here. The median time between the last anthelmintic treatment and sampling was 14.4 weeks. Access to pasture was available for 96.7% of the horses (with at least seasonal access). Most of the farms followed a strategic deworming approach, therefore 91.3% of the sampled equines had received anthelmintics on a regular basis.

Table 2. (Tab2 P2) General data on the study population (484 horses from 48 farms).

Parameter	Value
Age of the sampled horses [years; median (range)]	12.0 (0.8–34.0)
Mares (%)	50.2
Geldings (%)	46.7
Stallions (%)	3.1
Faecal samples (%)	100
Serum samples (%)	99.4
Last treatment	
Ivermectin + Praziquantel (%)	7.2
Ivermectin (%)	42.4
Moxidectin (%)	4.1
Doramectin (%)	1.4
Fenbendazole (%)	4.3
Pyrantel (%)	38.2
n.a. ^a	2.3
Period between last anthelmintic treatment and sampling [weeks; median (range)]	14.4 (1.4–100.0)
Horses sampled per farm [number; median (range)]	10 (4–17)
Pasture access (%)	96.7
unlimited (%)	28.9
limited (%)	67.8
Pasture area/horse (ha) (median, range)	0.5 (0.1–2.0)
Total number of horses kept on farm [median (range)]	30 (6–110)
Foals present (%)	39.6
Total number of foals kept on farm [median (range)]	0 (0–10)
Treatment schedule (annual)	
Selective (%)	8.7
Dewormed 1–2.5 times/year (< 3 times) (%)	32.8
Dewormed 3–3.5 times/year (<4 times) (%)	39.6
Dewormed 4 times/year (%)	18.9

^aNot available.

Faecal Sample Analyses

Strongyle eggs were found in 66.7% (95% CI 62.4–70.8%) of the samples. The FEC of the strongyle type egg positive faecal samples ranged from 5–2,935 epg. An epg > 200 was recorded in 136 samples (28.1%; 95% CI 24.3–32.3%). Eggs of *Oxyuris equi*, *Anoplocephala*

spp. and *Parascaris* spp. were identified in 1.2% (95% CI 0.6–2.7%), 0.6% (95% CI 0.2–1.8%) and 0.4% (95% CI 0.1–1.5%) of the faecal samples, respectively. The results of the two coproscopic methods employed in parallel are shown in Table 3. Strongyle eggs were detected in 64.3% (95% CI 59.9–68.4%) of the faecal samples with the Mini-FLOTAC and in 57.4% (95% CI 53.0–61.8%) with the combined sedimentation-flotation method.

Table 3. (Tab3 P2) Percentage of 484 equine faecal samples tested positive using different FEC methods.

Method	Strongyle egg [%] (95% CI ^a)	<i>Anoplocephala</i> spp. [%] (95% CI ^a)	<i>Oxyuris equi</i> [%] (95% CI ^a)	<i>Parascaris</i> spp. [%] (95% CI ^a)
Sedimentation / flotation	57.4 (53.0-61.8)	0.6 (0.2–1.8)	0.8 (0.3–2.1)	0 (0.0–0.6)
Mini-FLOTAC	64.3 (59.9-68.4)	0.6 (0.2–1.8)	1.2 (0.6–2.7)	0.4 (0.1–1.5)
Both	66.7 (62.4–70.8)	0.6 (0.2–1.8)	1.2 (0.6–2.7)	0.4 (0.1–1.5)
coproscopic methods				
Farm level	97.9 (89.1–99.6)	6.3 (2.1–16.8)	12.5 (5.9–24.7)	2.1 (0.4–10.9)

^aCI, confidence interval.

The faecal samples of 161 horses did not show strongyle type eggs in any of the coproscopic analyses. In total, 266 samples were positive using both methods, while 45 were only positive using Mini-FLOTAC, and 12 samples were only positive using sedimentation/flotation. To estimate inter-rater agreement from these data, the Cohen's kappa coefficient was calculated to be $\kappa = 0.75$ (95% CI 0.69–0.81). In Figure 1, the quantitative results of the two faecal analyses methods are plotted against each other. Despite strong overlap of FECs obtained by Mini-FLOTAC between the different semi-quantitative categories obtained by sedimentation/flotation, the Spearman's rank correlation coefficient indicated a significantly higher FEC in higher classes of the sedimentation/flotation method ($\rho = 0.8714$; $p < 0.0001$).

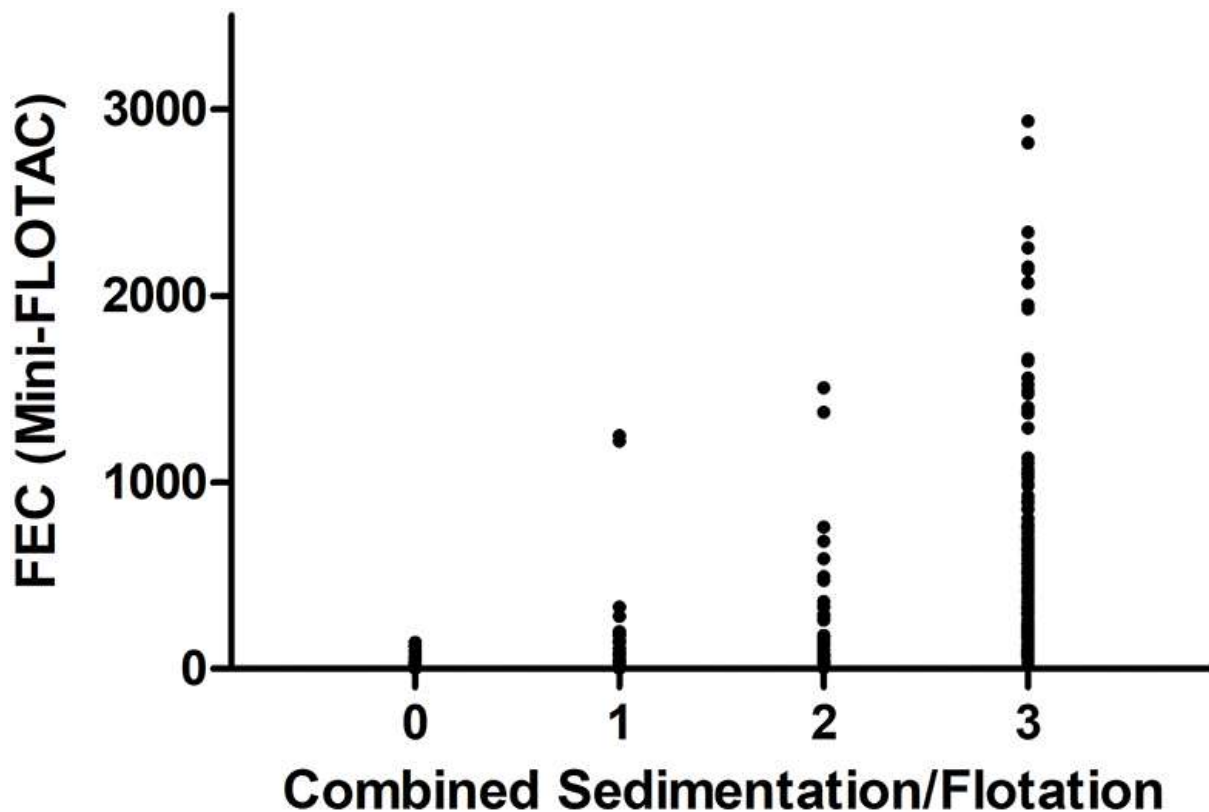


Figure 1. (Fig1 P2) Comparison of faecal analyses methods, referring to counting results of strongyle type eggs of 484 faecal samples. Results of the combined sedimentation/flotation methods are plotted as classes (0: no eggs found; 1: 1–10 eggs per slide; 2: 11–40 eggs per slide; 3: \geq 41 eggs per slide) vs. eggs per gram faeces (epg) as determined using Mini-FLOTAC.

Larval cultures and subsequent DNA extractions from purified L3 were carried out for 323 individual faecal samples that were tested positive for strongyle type eggs with Mini-FLOTAC or the combined sedimentation-flotation method.

Frequency of *Strongylus* spp. in DNA From Larval Cultures

Detection of Nematode DNA Using a PCR Targeting the 28S rRNA Gene

The 28S rRNA pan-nematode PCR was performed on all 323 samples that showed a strongyle type egg. The PCR result indicated the presence of amplifiable nematode DNA in 259 samples. The PCR was repeated on 64 samples with 1:5 diluted templates. Out of these runs, 12 samples remained negative, while a PCR product was obtained for an additional 52 samples. In total, the 28S PCR was able to detect nematode DNA in 311 samples. Only these samples were further investigated using PCR targeting *S. vulgaris* and *S. edentatus/equinus*, respectively.

Detection of *Strongylus vulgaris* DNA by Real-Time PCR

The PCR specific for *S. vulgaris* was positive for four samples (1.3% of the horses for which nematode DNA was amplifiable; 95% CI 5–3.3%) (Figure 2). Positive samples were confirmed by sequencing purified PCR products followed by comparison with GenBank entries. After removing low quality sequence regions at the beginning and the end of the chromatograms, Blastn searches against GenBank revealed 99–100% identity to the GenBank entries KT2506171.1 and KT250621.1. On the farm level, 3 out of 48 farms (6.3%, 95% CI 2.1–16.8%) were positive for *S. vulgaris*.

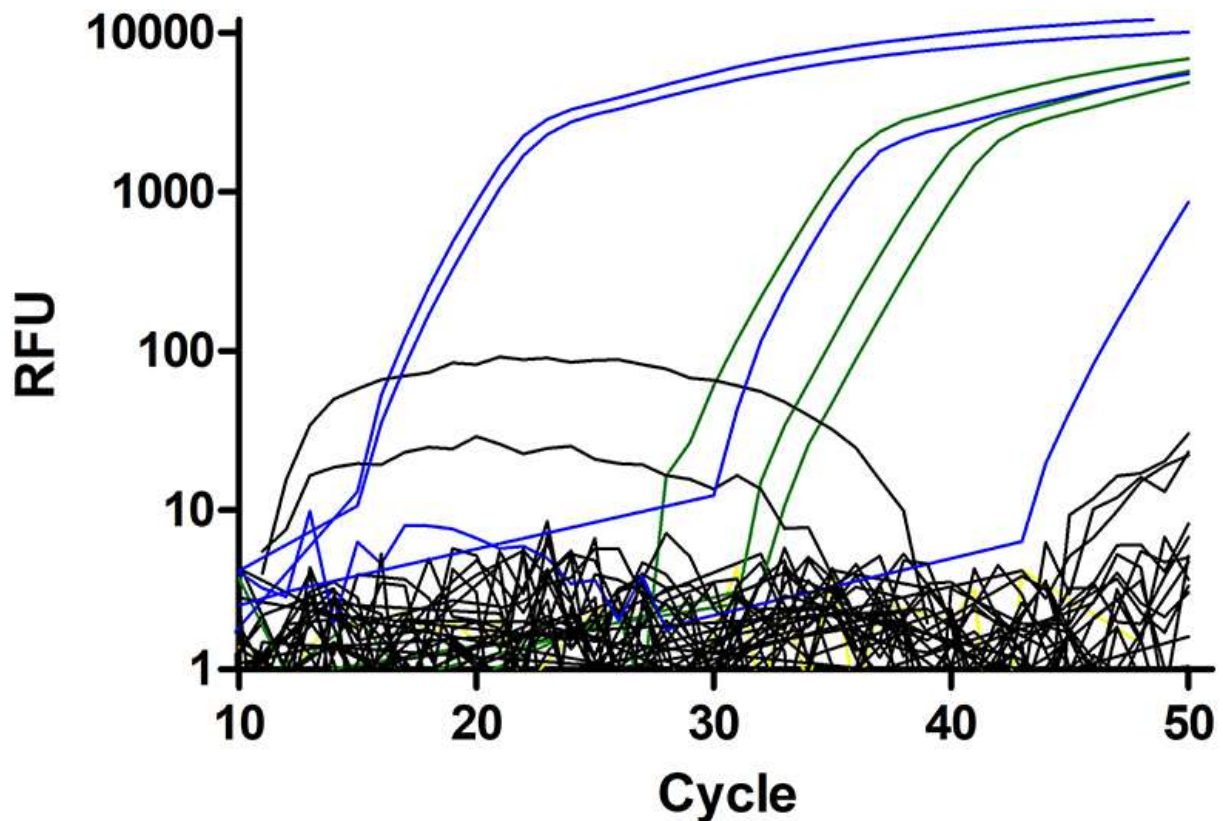


Figure 2. (Fig2 P2) Amplification plots for the *Strongylus vulgaris* real-time PCR. Plasmid DNAs with 500, 50, and 5 copies were used as positive control (green). The single negative control is shown in yellow but mostly hidden by the black curves. Field samples considered to be negative are shown in black and samples scored as positive are in blue. All positive samples, including the one with a very high Cq value were repeatedly tested positive and identity of all PCR products was confirmed by Sanger sequencing.

Detection and Identification of *Strongylus edentatus* by Real-Time PCR and Differentiation Using High-Resolution-Melt Analysis

This diagnostic PCR was newly established and evaluated using templates containing the amplicon as insert in plasmids. Primers were designed to amplify the three *Strongylus* species *S. edentatus*, *S. equinus*, and *S. asini* but not *S. vulgaris*. The representative amplification plots depicted in Figure 3A using 10,000 to 5 copies of the plasmid DNA as template show that

there was no cross-reactivity with *S. vulgaris* ITS-2 as template. To estimate efficacies, Cq values (y-axis) were plotted against log₁₀ transformed copy numbers on the x-axis (Figure 3B). Linear regressions were calculated and tested for differences in slopes in GraphPad. Slopes were -3.273 (efficacy = 111.2%), -3.079 (efficacy = 102.6%) and -3.181 (efficacy = 106.2%) and there was no significant difference in slopes ($p = 0.760$). The raw melting curves and their first derivative are shown in Figures 3C,D. These suggest some degree of differentiation but there was also considerable overlap of the curves. However, normalisation of the curves between 73.1 and 79.9°C resulted in three clearly differentiated clusters of melting curves (Figure 3E) that could also be visualised as different clusters in a difference plot by subtracting the relative fluorescence units (RFUs) of the mean for *S. edentatus* from all individual samples (Figure 3F). In combination with the *S. vulgaris* specific real-time PCR (48), a clear diagnosis of all four large strongyle species is possible combining these two assays. Melting curves for field samples positive for *S. edentatus* are shown in Figure 4.

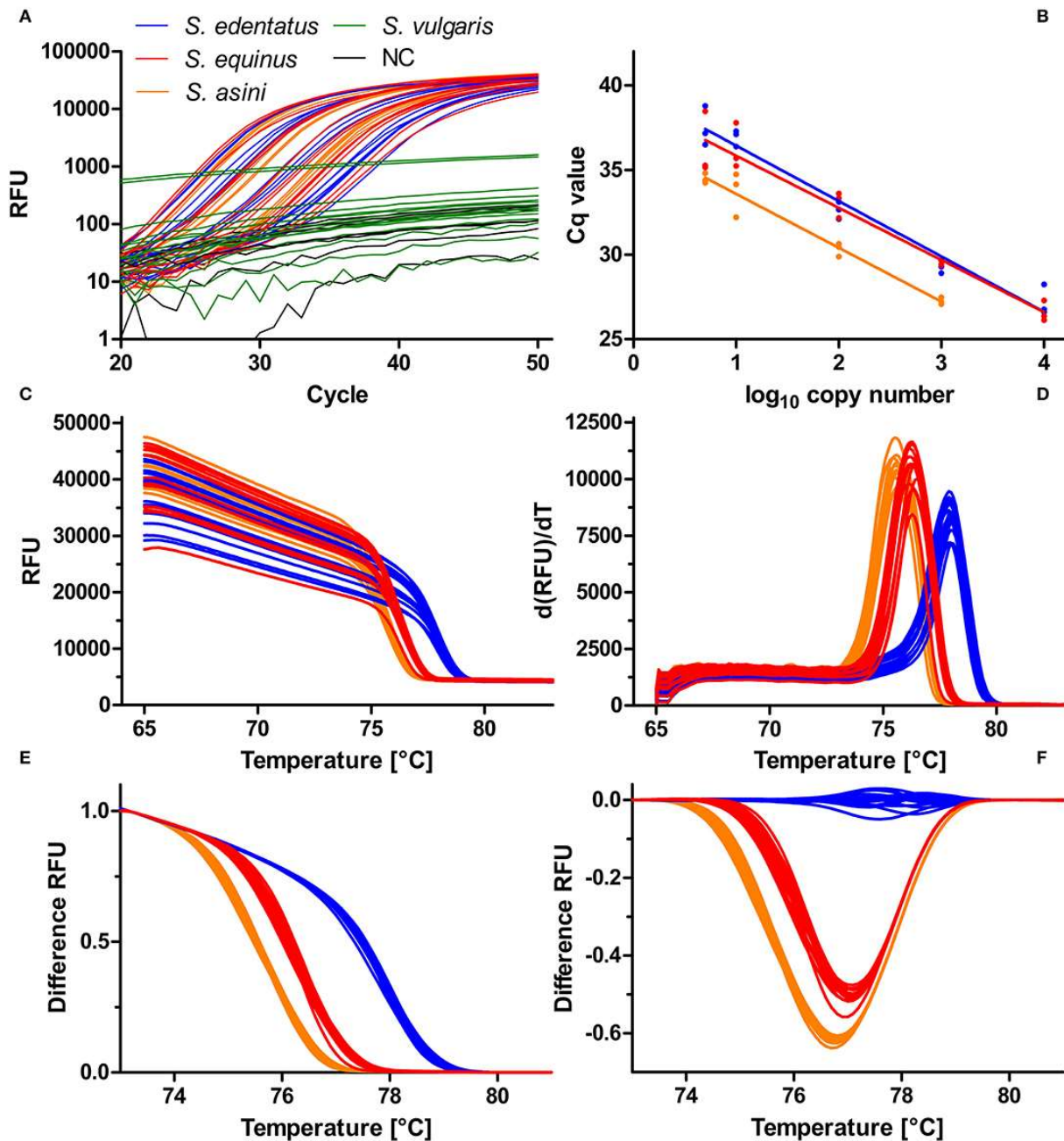


Figure 3. (Fig3 P2) Establishment of a high-resolution melt PCR to distinguish *Strongylus edentatus*, *Strongylus equinus*, and *Strongylus asini*. PCR. The amplification plots show that presence of 10,000–5 copies (*S. edentatus*, *S. equinus*) or 1,000–5 copies (*S. asini*) ITS-2 plasmid resulted exponential amplification while there was no exponential increase of relative fluorescence units (RFU) in the presence of 10,000 to 5 copies of *S. vulgaris* ITS-2 DNA or in the absence of any template (NC). **(A)**. Using the data from **(A)**, the quantification cycles (Cq) were plotted against the \log_{10} transformed copy numbers and linear regressions were calculated **(B)**. There were no significant differences between slopes ($p = 0.760$). Raw melting curves **(C)** and their first derivative $d(\text{RFU})/dT$ **(D)** were recorded between 65°C and 98°C. Normalisation of the melting curves between 73.1 and 79.9°C resulted in clear separation of

the melting curves (E), which was also visible in the difference plot (F), in which the mean normalised fluorescence for *S. edentatus* was subtracted from all individual plots.

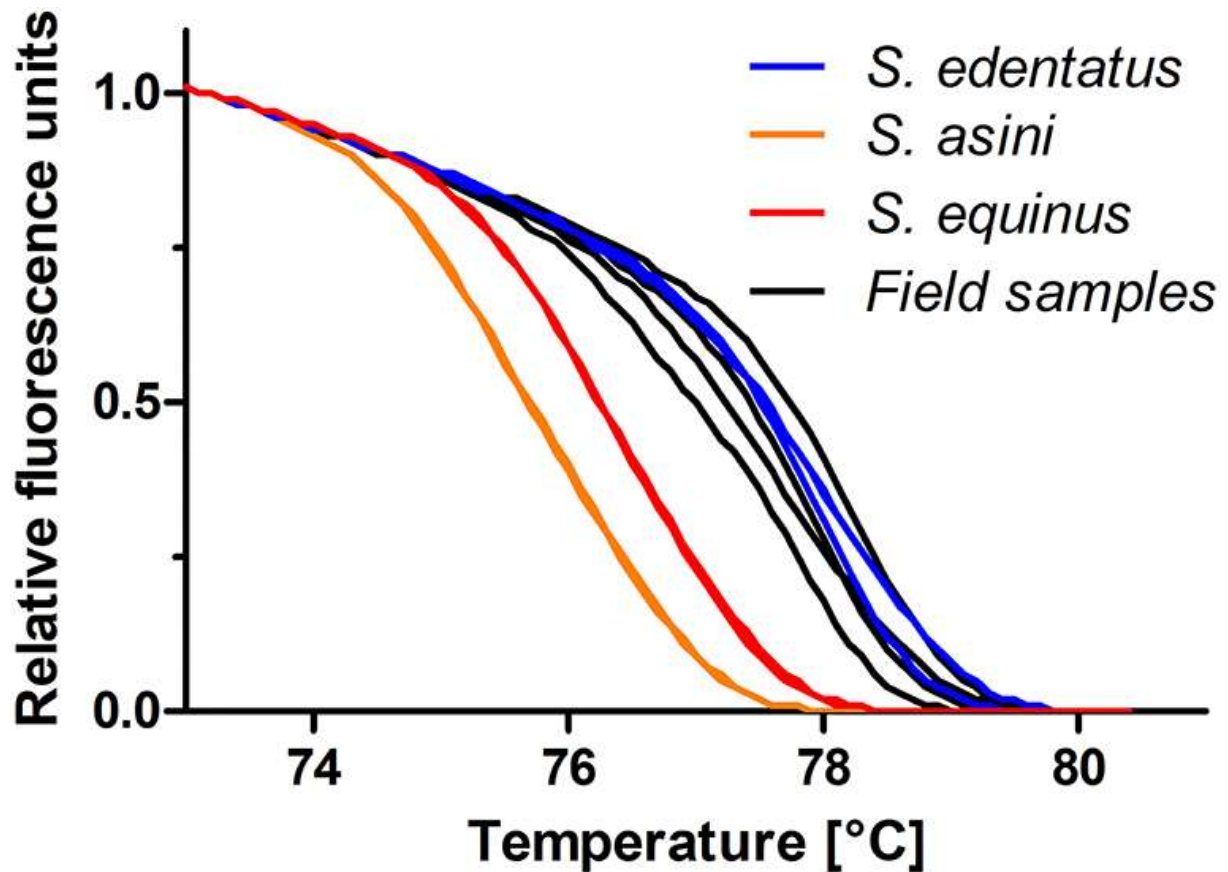


Figure 4. (Fig4 P2) High-resolution melting curves for DNA from four field samples compared to standards containing 500 copies of the ITS-2 of *S. edentatus*, *S. equinus*, and *S. asini*. All positive samples were assigned to *S. edentatus*, which was confirmed by Sanger sequencing of the PCR products.

The results of the real-time PCRs with subsequent HRM analyses indicated that *S. edentatus* was present in 10 equine samples, i.e., 3.2% of the samples with amplifiable nematode DNA, 95% CI 1.8–5.8%). All positive samples were confirmed using Sanger sequencing of PCR products. After removing chromatogram regions with low sequence quality at the beginning and end of sequencing data, all sequences were more than 99% identical to *S. edentatus* such as KP693438.1 or X77807.1.

These 10 individual horses originated from four of the participating farms revealing a prevalence on the farm level of 8.3% (95% CI 3.3–19.6%). There was no amplification of the rRNA gene of *S. equinus* detected from field samples. One of the horses was positive for both, *S. vulgaris* and *S. edentatus*, resulting in a 3.5% frequency of *Strongylus* spp. (95% CI 2.0–

6.2%) among the 311 horses for which the 18S nematode PCR was successful. On the farm level, 6 out of 48 positive farms resulted in a prevalence of 12.5% (95% CI 5.9–24.7%).

Absence of Benzimidazole Resistance Associated Polymorphisms

The newly designed pyrosequencing assays for the polymorphisms F167Y, E198A, and F200Y of the isotype 1 β -tubulin gene were first evaluated using artificial mixtures of plasmids containing either the wild-type or the variant associated with BZ resistance. Figure 5 shows that for all three assays an excellent agreement between the percentage of resistance associated allele spiked into the template and the measured frequency was obtained. The coefficients of determination were all between 0.986 and 0.990. At an allele frequency of 0% for the resistance associated alleles, means plus 2 SD were calculated to be 5.1, 2.6, and 5.3% for codons 167, 198, and 200, respectively. Thus, a technical background, a conservative cut-off of 10% was therefore chosen to avoid claiming of detection of resistance allele due to technical background in field samples.

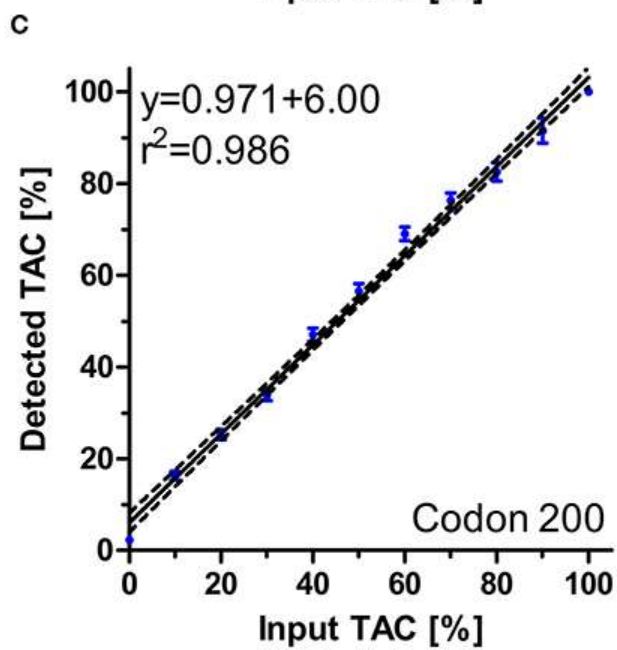
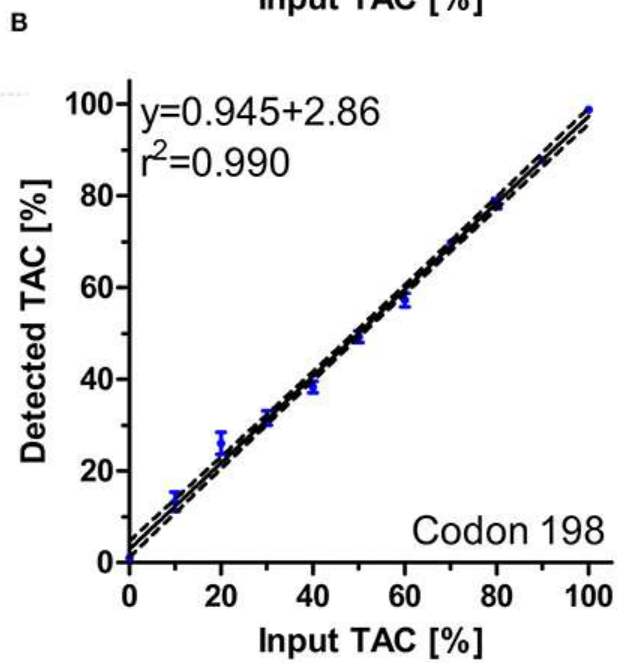
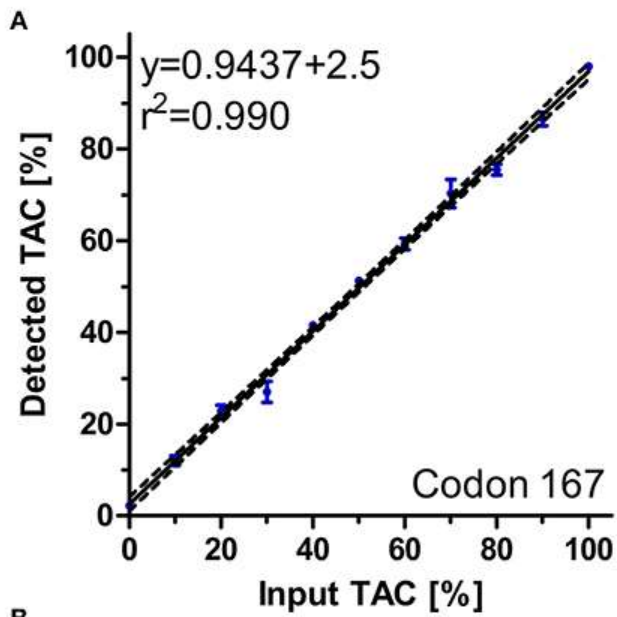


Figure 5. (Fig5 P2) Regression analysis of pyrosequencing assays for *S. vulgaris* isotype 1 β -tubulin for polymorphisms F167Y (**A**), E198A (**B**) and F200Y (**C**). Artificial mixtures of plasmids were prepared and analysed using pyrosequencing. For each mixture, four to six replicates were used and included in the analyses. Regression plots with 95% confidence bands as calculated by Pearson regression are shown. Raw data are shown as circles (dots) \pm SEM. All three assays were applied to the four samples that were *S. vulgaris* positive in the real-time PCR. For codons 167 and 198, all pyrosequencing runs revealed frequencies below 5% that were considered technical background. For codon 200, the observed frequency increased to 10–14% but signal intensity was in general very low. All PCR products obtained with these PCRs were also analysed by Sanger sequencing. The obtained sequences completely corresponded to the expected *S. vulgaris* sequence suggesting that the β -tubulin PCRs used to generate the templates for pyrosequencing did not cross-react with the corresponding genes of other Strongylidae present in the field samples. Regarding codon 198, no peaks corresponding to the BZ resistance associated isotype 1 β -tubulin alleles were found.

Antibodies Against a Recombinant SvSXP Strongylus vulgaris Antigen

Results for anti-*S. vulgaris* IgG were obtained for 481 horses, since it was not possible to collect a blood sample from three horses. The ODRs ranged between -5.3 and 114.4% (median 10.1 , mean 17.8 ± 22.52). The original cut-off proposed by Andersen et al. (54) was 13.47% ODR, classifying 39.9% of the samples as positive. Since this was an unexpectedly high value and the reported specificity for this cut-off was only 82.1% (54), two other cut-offs were used to identify samples that were considered positive. If the ODR cut-off was set to 30% , 21.2% (95% CI 17.9 – 25.1%) of the field samples would be considered serologically positive. Under these assumptions, the seroprevalence on farm level would be 83.3% (95% CI 70.4 – 91.3). According to Andersen et al. (54), a cut-off value of 30% corresponds to a sensitivity of 43% and a specificity of 96% . Lowering the cut-off value to 25% ODR, then even 24.3% (95% CI 20.7 – 28.4) of the samples would be considered serologically positive. The seroprevalence at farm level would be even 91.7% (95% CI 80.5 – 96.7). At this cut-off value of 25% ODR, a sensitivity of 50% and a specificity of 86% were calculated by Andersen et al. (54).

Correspondence Between PCR and ELISA Data

The ODR values for the rSvSXP ELISA (54) of the horses tested positive for *S. vulgaris* in the qPCR ranged from 16.9 to 35.6% (Table 4). Focusing on the three farms where *S. vulgaris* was detected by real-time PCR, the seroprevalences at farm level were 10% (95% CI 1.79 – 40.42), 12.5% (95% CI 2.24 – 47.09), and 70% (95% CI 39.68 – 89.22) – independently of the cut-off value used.

Table 4. (Tab4 P2) *Strongylus vulgaris* and *Strongylus edentatus* positive samples.

Farm ID/ Horse ID	<i>S. edentatus</i> (PCR)	<i>S. vulgaris</i> (PCR)	<i>S. vulgaris</i> serum (ODR)	FEC (epg) ^a	Combined sedimentation- flotation ^b
01.04	Positive	Negative	1.40	205	3
01.06	Positive	Negative	14.66	15	1
02.02	Positive	Negative	12.93	20	0
02.10	Positive	Negative	6.11	0	1
03.01	Positive	Negative	18.13	20	0
03.04	Positive	Negative	21.31	35	1
03.05	Positive	Negative	82.82	25	0
03.07	Positive	Negative	35.15	25	1
06.08	Positive	Negative	24.40	1,490	3
06.10	Positive	Positive	16.88	1,370	3
14.05	Negative	Positive	33.47	685	3
18.05	Negative	Positive	35.62	425	3
18.07	Negative	Positive	16.93	5	0

^aFEC, faecal egg counts; epg, eggs per gram faeces.

^bNumber of strongyle type eggs per complete microscope slide: 1: 1–10 eggs per microscope slide; 2: 11–40 eggs per microscope slide; 3: ≥ 41 eggs per microscope slide.

Table 4 provides details of the FEC of the horses that were tested positive for *S. edentatus* or *S. vulgaris* by real-time PCR. One horse (ID 06.10) tested positive for both large strongyle species that were identified in this study. In the faecal analysis for these horses, strongyle type eggs were found in at least one but not always both of the methods in each case. In the majority of *Strongylus* spp. cases (8/13), the epg value as determined by Mini-FLOTAC was below 200.

Risk Factor Analysis for Strongyle Egg Shedding

To identify risk factors that increased the odds of an individual horse in the study population to be positive for strongyle eggs, a logistic regression analysis was performed. A positive finding in this context refers to an identification of at least one strongyle type egg in Mini-FLOTAC and/or in combined sedimentation/flotation. In Figure 6, the odds ratios of different explanatory variables are plotted together with their 95% CIs as forest plots. The variables anthelmintic treatment schedule, total number of horses, the presence of foals on a farm, the pasture area for each horse, whether the horses were periodically standing on different sections of the pasture and whether manure piles were regularly removed from pastures were eliminated from the final model during model optimisation. Further details on the model are given in Table 5. The variable “pasture access”, “limited access” and “no access” to pasture were protective when compared to “continuous access” during grazing season ($p < 0.01$). A positive serological *Anoplocephala* spp. ELISA as reported recently for this sample set (85) was in tendency also associated with higher odds to shed strongyle type eggs, but it was not significant. An increased time period between the last anthelmintic treatment and sampling time was also associated with higher odds ($p < 0.01$), i.e., a 1.046 fold increase in odds per week. Regarding the anthelmintic that was used for the last deworming, the use of fenbendazole was associated with higher odds to be positive compared to any other anthelmintic used for the last treatment

but the differences were only significant for moxidectin ($p < 0.001$) and ivermectin ($p < 0.05$). The age was significantly associated with lower odds of detecting strongyle eggs in the faeces. With each additional year of age, the odds to be positive for strongyle eggs decreased 0.961 fold ($p < 0.01$). The pseudo-R2 according to McFadden (0.16) and Nagelkerke (0.27) can be considered acceptable and show that the model is an improvement over the null model.

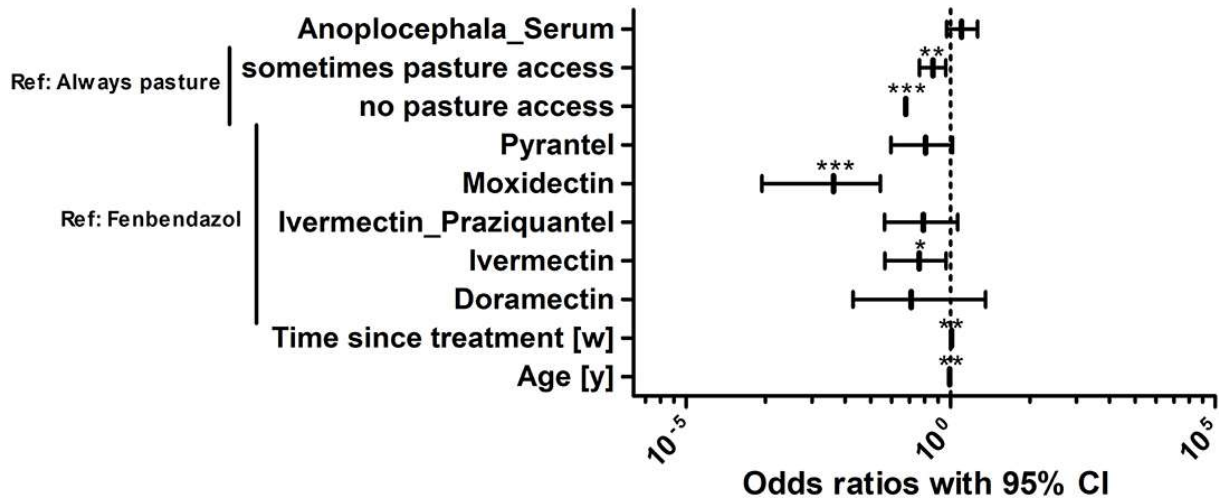


Figure 6. (Fig6 P2) Risk factor analysis for the odds of horses in the study population to be positive for strongyle eggs. Risk factors for the odds to be positive or negative for strongyle eggs were determined using logistic regression analysis. Anoplocephala_Serum, positive in the *Anoplocephala* serum ELISA; Drugs refer to the drug used for the last treatment; Time since treatment represents the time since the last anthelmintic treatment in weeks [w]. The age refers to the age of the animals in years [y]. The age of horses was rounded into whole years. For foals and yearlings, the age was converted from months to years by dividing the month measurement by the conversion ratio 12. ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

Table 5. (Tab5 P2) Final logistic regression model to identify risk factors explaining positivity for strongyle type eggs.

Reference level	Term	Estimate	SE	p-Value	Odds ratio	95% CI
	<i>Anoplocephala</i> -serum positive	0.483	0.338	0.15362	1.620	0.853 - 3.240
Always pasture access	Sometimes pasture access	-0.762	0.291	0.00884	0.467	0.258 - 0.812
	No pasture access	-1.950	0.501	9.87e-05	0.142	0.052 - 0.374
Fenbendazole	Pyrantel	-1.089	0.663	0.10056	0.337	0.075 - 1.095
	Moxidectin	-5.104	1.225	3.08e-05	0.006	0.0003 - 0.047
	Ivermectin-Praziquantel	-1.179	0.790	0.13568	0.307	0.057 - 1.355
	Ivermectin	-1.366	0.660	0.03858	0.255	0.057 - 0.823
	Doramectin	-1.716		0.20725	0.180	0.014 - 4.577
	Time since treatment [weeks]	0.045	0.016	0.00482	1.046	1.016 - 1.082
	Age [years]	-0.040	0.015	0.00773	0.961	0.933 - 0.989
	(Intercept)	2.446	0.761	0.00131	11.543	2.874 - 60.738

pseudo $R^2_{McFadden}$: 0.16.

pseudo $R^2_{Nagelkerke}$: 0.27.

Risk Factor Analysis for Seropositivity for *Strongylus vulgaris* Recombinant SvSXP Larval Antigen

For identification of risk factors for *S. vulgaris* seropositivity, the same variables were initially considered as for the analysis of the risk to shed strongyle eggs. Animals were considered to be positive for this analysis based on the more conservative 30% ODR cut-off. After backward elimination, the optimised model included only the variables “pasture access”, “annual treatment schedule” and “age” (Figure 7, Table 6).

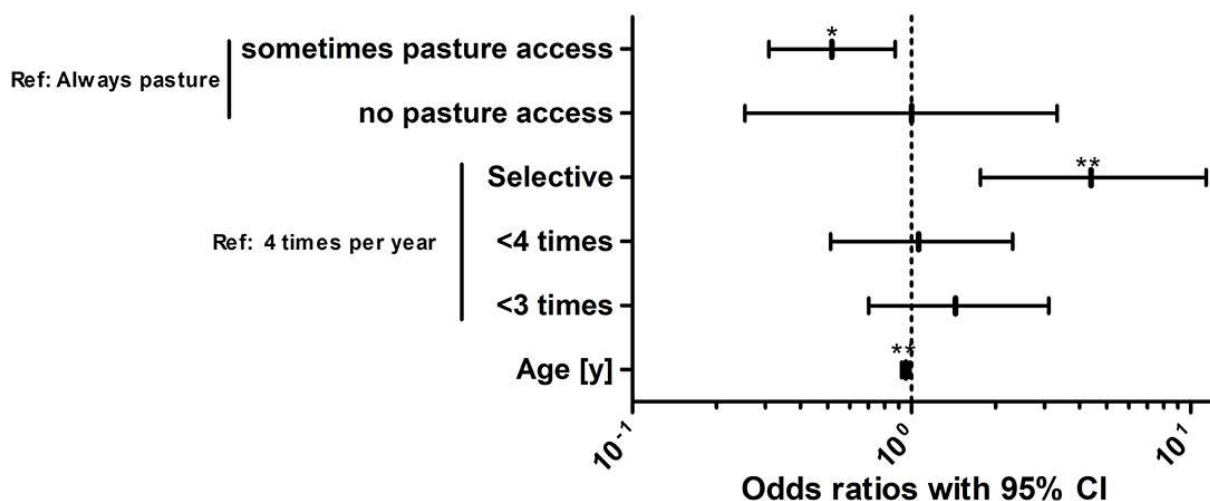


Figure 7. (Fig7 P2) Risk factor analysis for the odds of horses in the study population to be positive for antibodies against the *Strongylus vulgaris* recombinant SvSXP larval antigen. Risk factors for the odds to be seropositive or negative for antibodies against *S. vulgaris* using logistic regression analysis. The treatment scheme refers to whether horses were selectively dewormed

based on previous diagnosis (selective) or regularly dewormed 1–2.5 times (<3 times), 3–3.5 times (<4 times), or 4 times per year on average. The age of the horses was rounded into whole years [y]. For foals and yearlings, the age was converted from months to years by dividing the month measurement by the conversion ratio 12. **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$.

Table 6. (Tab6 P2) Final logistic regression model to identify risk factors to be positive for antibodies against the *Strongylus vulgaris* recombinant SvSXP larval antigen.

Reference level	Term	Estimate	SE	p-Value	Odds ratio	95% CI
Always pasture access	Sometimes pasture access	-0.658	0.265	-2.483	0.518	0.308 – 0.874
	No pasture access	0.0006	0.642	0.999	1.001	0.253 – 3.316
4 treatments per year	< 4 times	0.057	0.380	0.881	1.059	0.512 – 2.297
	< 3 times	0.363	0.376	0.334	1.438	0.702 – 3.102
	Selective	1.480	0.472	0.002	4.395	1.764 – 11.327
	Age [years]	-0.048	0.018	0.006	0.953	0.920 – 0.986
	(Intercept)	-0.595	0.476	0.211	0.551	0.212 – 1.381

*pseudo R*²_{McFadden}: 0.07.

*pseudo R*²_{Nagelkerke}: 0.11.

Regarding pasture access, limited access to pasture was protective compared to the reference of unlimited access to the pasture. Surprisingly, horses without pasture access were not significantly protected but this can be explained by the small number of only 16 horses (3.3%) in this group leading to wide 95% CIs. The odds to be positive for antibodies against *S. vulgaris* decreased gradually with increasing numbers of average annual anthelmintic treatments. However, only the difference between four annual treatments and a selective treatment scheme was significant with horses under selective treatment having an about 4.4-fold higher odds than horses that are treated four times per year. Finally, older horses had a lower risk to be positive for *S. vulgaris* specific antibodies with the odds to be positive decreasing by 0.95-fold per life year.

3.2.5. Discussion

In the present study, prevalence of strongyle eggs on the individual horse as well as on the farm level were within the range observed in other studies from Europe before. High individual horse prevalences ranging up to 100% have been reported (13, 95, 96), although two studies conducted in Germany found lower prevalence on individual level: prevalences of 44.6% (15) and 55.3% (14) were determined. Concerning the true strongyle infection prevalence, the individual horse coproscopic prevalences, herein 66.7%, must always be considered against the background that only patent infections can be detected using coproscopy. Moreover, some patent infections will most likely remain undetected due to variation in egg shedding between droppings (97). More importantly, encysted larvae have been shown to represent the major part of the total cyathostomin burdens (95).

The results of the *S. vulgaris* real-time PCR, in which 0.83% of the samples were positive, are consistent with findings of previous studies that also reported a prevalence of <2% (horse level) using larval culture (14, 15) and PCR (14). The PCR HRM assay to detect *S. edentatus* and *S. equinus* identified the presence of *S. edentatus* in 10 horse samples, whereas no amplification of *S. asini* and *S. equinus* was observed. This is in line with the reported prevalences of large strongyles in other publications, since *S. vulgaris* and *S. edentatus* were reported to occur more frequently in horses than *S. equinus* (21, 98). Individual horse prevalences of 0–44% for *S. edentatus* and 0–10.9% for *S. equinus* have been reported in previous studies conducted in Germany (19–22). For technical and convenience reasons, primers were designed in a way to be also able to also amplify *S. asini*, since the complete group of *Strongylus* species would be of relevance in possible subsequent studies. Infection of horses with *S. asini* has to the knowledge of the authors not been reported from naturally infected horses and the only reported experimental infection of a single horse led to lower pathology caused by migrating larvae than in a zebra and a donkey infected in parallel (39). Clear evidence whether *S. asini* can lead to patent infection in horses is missing.

Table 4 provides details of the FEC of the horses that were tested *S. edentatus*- and/or *S. vulgaris*-positive with real-time PCRs. It is noticeable that all positive horse samples were collected between May and July 2017. No horse was tested positive for large strongyles that had been sampled in the later period (between August 2017 and January 2018). This can be explained by the life cycle of *S. vulgaris* with larvae undergoing migration over winter and sexually mature adults start shedding eggs in spring (99, 100). Later in the year, the practise of regular anthelmintic treatment during the grazing period could eliminate the adult *S. vulgaris* leading to absence of patent infections despite presence of the parasite on the farm. The majority of the study population received anthelmintic treatment at regular intervals (Table 2). For the four samples that were tested positive for *S. vulgaris*, no polymorphisms associated with BZ resistance detected in other strongyle nematodes were found herein neither using pyro- nor Sanger sequencing in the *S. vulgaris*-specific amplicons. The newly developed pyrosequencing assays can be potentially used in future epidemiological surveys to determine whether BZ resistance associated genetic changes will evolve in large strongyles similarly as it has been documented in several ruminant helminth species.

Since FECs are in most cases dominated by eggs of cyathostomins and cannot be discriminated from eggs of large strongyles in a FECRT, BZ resistance of large strongyles would not be recognised against the background of widespread BZ resistance in cyathostomins. Molecular approaches to detect large strongyles in post-treatment samples such as the real-time PCRs used here and assays to directly quantify molecular AR markers such as the novel

pyrosequencing assay for *S. vulgaris* promise to help to perform AR monitoring for these highly pathogenic equine parasites.

The number of horses that were tested *S. vulgaris* positive in the ELISA was much higher than with the PCR. According to Andersen, et al. (54), there is a statistical correlation between a higher anti-rSvSXP titre and the number of migrating larvae in the mesenteric arteries. The rSvSXP-ELISA was introduced as an improved method to detect early stages of *S. vulgaris* during prepatency of an infection. The horses tested positive for *S. vulgaris* by real-time PCR had at least an ODR of 16.9% in the ELISA. Thus, all of these horses had ODRs above the original cut-off ODR of 13.5% with a sensitivity of 0.66 and a specificity of 0.82 (54).

The cut-off values for the rSvSXP-ELISA applied in the present study were 25 and 30%, which is a more conservative approach decreasing the number of false positives but also increasing the number of false negatives. High *S. vulgaris* seroprevalences were also reported in other studies (91, 101), but are unexpected in light of surveys employing direct pathogen detection methods (14, 15). The high number of serologically positive horses compared to the four horses tested *S. vulgaris* positive by real-time PCR may partly be due to the fact that early stages in the prepatency of the infection can be detected only with the ELISA. Moreover, antibody levels only decrease to background after 5 months post infection (102). Therefore, seropositivity is probably due to frequent exposure with infective larvae that start migration while patency only develops in a few horses since the developmental cycle is disrupted by anthelmintic treatment in most of the exposed animals. However, the small number of horses in which adult *S. vulgaris* develop and produce eggs is obviously sufficient to contaminate the pasture leading to high seroprevalence in the respective horse population. Another important issue that needs to be taken into consideration is a potential cross-reactivity of rSvSXP with the orthologous protein from other *Strongylus* species such as *S. edentatus* and the cyathostomins, which appear to be phylogenetically closely related but have not been characterised for most cyathostomin species (54).

The multivariate risk factor analysis (logistic regression) revealed that the odds to shed strongyle nematode eggs were significantly increased with a longer period between the last anthelmintic treatment and sampling. This is expectable since chances to be reinfected increase over time. In addition, the analysis indicated that the odds of shedding strongyle type eggs increases with an *Anoplocephala* spp. positive serological ELISA but this effect was not significant. This variable probably does not directly influence the odds and represents a confounder since both parasite groups share transmission via grazing. Therefore, it is also reasonable that limited/no access to pasture was protective, because it means lower exposure to infectious larval stages. Age as protective factor is consistent with the perception of young horses showing a higher incidence of

patent strongyle infections due to age-dependent immunity developing through continuous exposure (103, 104). With ivermectin and particularly strong with moxidectin, the anthelmintic used for the last treatment had a protective effect compared to the reference fenbendazole. Treatments with ivermectin plus praziquantel, pyrantel, and doramectin treatments were also protective but the effects were not significant. For ivermectin and ivermectin plus praziquantel the odds ratios were similar but the effect for the latter was not significant, possibly since only a very small number of horses was treated with the combination. Doramectin was used only for a few horses from a single farm and it must be clearly stated that doramectin is not licenced as a dewormer of horses and that the ruminant product was used. Resistance to BZs and pyrantel is well-known to occur in many European countries (61, 63, 105) including Germany (64) at high prevalence. This might lead to treatment failures (faecal egg count reduction below 90–95%) (57) or to shorter egg reappearance periods (106). Resistance to ivermectin and particularly moxidectin in cyathostomins have only rarely been reported on a global scale but so far not in Germany.

The logistic regression analysis of the data on *S. vulgaris* seroprevalence identified only a few variables that had significant effects on the odds to be positive, i.e., “pasture access”, “treatment scheme” and the age of the horses. Regarding “pasture access”, only “sometimes pasture access” was significantly protective in comparison to “always pasture access” while “no pasture access” was surprisingly not protective. The odds ratio was close to 1 but the 95% CI was also very wide which is due to the fact that only 16 horses (3.3%) were assigned to this category. Increasing age was again slightly protective, which can be explained by immunity slowly developing over time. In contrast to the analysis on the odds to be positive for shedding strongyle eggs, the treatment scheme had a significant effect on the odds to be positive for antibodies against the *S. vulgaris* larval antigen. There was a clear tendency that higher treatment frequencies were associated with lower odds to have antibodies against rSvSXP. However, only the difference between four treatments per year and selective treatment was significant. Using morphological analysis of L3 from larval cultures, Nielsen et al. (84) have previously reported that selective deworming strategies resulted in roughly doubled prevalences of *S. vulgaris* on the individual animal and farm level in Denmark. It is also remarkable that in contrast to the analysis of data on positivity of faecal samples, the drug used for the last treatment was excluded from the final regression model for seropositivity for the larval *S. vulgaris* antigen since it led to an increased AIC. This substantiates the idea that the odds to be positive for antibodies against *S. vulgaris* are more dependent on the contamination of the pasture (and thus the treatment history of the farm) and not on the treatment history of the individual horse since for immune reactions and seropositivity the exposure is relevant and not the risk to develop a patent infection. Out of the 42 horses for which the owners reported “selective treatment”, 41 were from only 4 farms on

which all horses were assigned to the “selective treatment” group. This confirms that the “selective treatment” scheme was highly clustered on the farm level.

3.2.6. Conclusion

PCR assays identified *S. vulgaris* and *S. edentatus* at only low frequencies, which is in contrast to the high *S. vulgaris* seroprevalence observed herein. The cause for the very high prevalence of antibodies against rSvSXP remains unclear and should be further examined to exclude any confounders such as cross reactivity. The fact that an important risk factor for being positive for antibodies against a larval *S. vulgaris* antigen was a selective treatment scheme based on prior diagnosis, emphasises the risk of such treatment schemes, if they do not include regular analysis of eggs or larvae or antibodies for the presence of *Strongylus* spp. on a farm.

3.2.7. Supplementary information

Data Availability Statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Ethics Statement

The animal study was reviewed and approved by Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin, registration no: Reg 0059/17. Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

Author Contributions

LJ, JK, EB, JB, MN, and GS-H: study concept and design. LJ: sample collection and Mini-FLOTAC and PCR analyses. NH: involved in establishment of the *Strongylus* spp. HRM PCR. GS-H funding acquisition and project management. LJ and JK: data analyses and drafting the first version of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the final manuscript version.

Funding

This work was funded by Virbac in a research collaboration with Freie Universität Berlin (contract number 2014000271).

Conflict of Interest

JB is employed by Virbac Tierarzneimittel GMBH and EB by Virbac France. GS-H declares that he has repeatedly acted as consultant for veterinary pharmaceutical and diagnostic companies and has previous and ongoing research collaborations with various companies.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Acknowledgments

The authors want to thank the horse owners for their kind cooperation. We particularly thank Tanja Bartmann and Katharina Seidl for technical support and performing the sedimentation/flotation analyses and Holli Gravatte for running the ELISAs. We acknowledge support by the Open Access Publication Initiative of Freie Universität Berlin.

Supplementary Material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.892920/full#supplementary-material>

3.2.8. References

1. Lichtenfels JR, Kharchenko VA, Dvojnjos GM. Illustrated identification keys to strongylid parasites (strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). *Vet Parasitol.* (2008) 156:4–161. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.04.026
2. Corning S. Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasit Vectors.* (2009) 2:S1. doi: 10.1186/1756-3305-2-S2-S1
3. Matthews J. An update on cyathostomins: anthelmintic resistance and worm control. *Equine Vet Educ.* (2008) 20:552–60. doi: 10.2746/095777308X363912
4. Kaplan RM. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Vet Res.* (2002) 33:491–507. doi: 10.1051/vetres:2002035
5. Kuzmina TA. Strongylids (nematoda: strongylidae) of domestic horses in Ukraine: modern state of Fauna and structure of the parasite community. *Parazitologiya.* (2012) 46:127–38.
6. Chapman MR, French DD, Taylor HW, Klei TR. One season of pasture exposure fails to induce a protective resistance to cyathostomes but increases numbers of hypobiotic third-stage larvae. *J Parasitol.* (2002) 88:678–83. doi: 10.1645/0022-3395(2002)088[0678:OSOPEF]2.0.CO;2

7. Eysker M, Boersema J, Kooyman F. Seasonally inhibited development of cyathostomine nematodes in shetland ponies in the Netherlands. *Vet Parasitol.* (1990) 36:259–64. doi: 10.1016/0304-4017(90)90037-C
8. Eysker M, Mirck MH. The distribution of inhibited early third stage cyathostominae larvae in the large intestine of the horse. *Z Parasitenkd.* (1986) 72:815–20. doi: 10.1007/BF00925101
9. Andersen UV, Howe DK, Olsen SN, Nielsen MK. Recent advances in diagnosing pathogenic equine gastrointestinal helminths: the challenge of prepatent detection. *Vet Parasitol.* (2013) 192:1–9. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.11.003
10. Pfister K, van Doorn D. New perspectives in equine intestinal parasitic disease: insights in monitoring helminth infections. *Vet Clin North Am Equine Pract.* (2018) 34:141–53. doi: 10.1016/j.cveq.2017.11.009
11. Wirtherle N, Schnieder T, von Samson-Himmelstjerna G. Prevalence of benzimidazole resistance on horse farms in Germany. *Vet Rec.* (2004) 154:39–41. doi: 10.1136/vr.154.2.39
12. Fritzen B, Rohn K, Schnieder T, von Samson-Himmelstjerna G. Endoparasite control management on horse farms—lessons from worm prevalence and questionnaire data. *Equine Vet J.* (2010) 42:79–83. doi: 10.2746/042516409X471485
13. Hinney B, Wirtherle NC, Kyule M, Miethe N, Zessin KH, Clausen PH. Prevalence of helminths in horses in the state of Brandenburg, Germany. *Parasitol Res.* (2011) 108:1083–91. doi: 10.1007/s00436-011-2362-z
14. Kaspar A, Pfister K, Nielsen MK, Silaghi C, Fink H, Scheuerle MC. Detection of *Strongylus vulgaris* in equine faecal samples by real-time PCR and larval culture – method comparison and occurrence assessment. *BMC Vet Res.* (2016) 13:19. doi: 10.1186/s12917-016-0918-y
15. Schneider S, Pfister K, Becher AM, Scheuerle MC. Strongyle infections and parasitic control strategies in German horses — a risk assessment. *BMC Vet Res.* (2014) 10:262. doi: 10.1186/s12917-014-0262-z
16. Monahan CM, Chapman MR, Taylor HW, French DD, Klei TR. Comparison of moxidectin oral gel and ivermectin oral paste against a spectrum of internal parasites of ponies with special attention to encysted cyathostome larvae. *Vet Parasitol.* (1996) 63:225–35. doi: 10.1016/0304-4017(95)00910-8
17. Klei TR, Turk MA, McClure JR, Holmes RA, Dennis VA, Chapman MR. Effects of repeated *Strongylus vulgaris* inoculations and concurrent ivermectin treatments on mesenteric arterial lesions in pony foals. *Am J Vet Res.* (1990) 51:654–60.
18. Greite L. Untersuchungen Zur Verbreitung Von *Strongylus vulgaris* Im Rahmen der selektiven Entwurmung Bei Pferden in Süddeutschland. Dissertation Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany (2013).
19. Beelitz P, Göbel E, Gothe R. Artenspektrum und Befallshäufigkeit von Mutterstuten aus Zuchtbetrieben mit und ohne Anthelmintika-Prophylaxe in Oberbayern. *Tierarztl Praxis.* (1996) 24:48–54. doi: 10.1515/9783486787122.48

20. Beelitz P, Göbel E, Gothe R. Endoparasiten von Eseln und Pferden bei gemeinsamer Haltung in Oberbayern: Artenspektrum und Befallshäufigkeit. *Tierarztl Praxis.* (1996) 24:471–5.
21. Cirak V, Hermosila C, Bauer C. Study on the gastrointestinal parasite fauna of ponies in northern Germany. *Appl Parasitol.* (1996) 37:239–44.
22. Kiedrowski C. Helminthologische Untersuchungen an Pferden vor und nach der Schlachtung. Dissertation Freie Universität Berlin, Berlin, Germany (1959).
23. Fritzen BM. Untersuchungen Zum Vorkommen Von Anthelminthika-Resistenz in Nordrhein-Westfälischen Pferdebeständen. Dissertation Institute for Parasitology, University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany DVG-Service (2005).
24. Duncan J, Pirie H. The life cycle of *Strongylus vulgaris* in the horse. *Res Vet Sci.* (1972) 13:374–85. doi: 10.1016/S0034-5288(18)34017-7
25. Enigk K. Development of *Strongylus vulgaris* in the host. *Z Tropenmed Parasitol.* (1950) 2:287–306.
26. Duncan J, Campbell J. Further Observations on the maintenance of a monospecific infection of *Strongylus vulgaris* in the horse. *Vet Rec.* (1973) 92:533. doi: 10.1136/vr.92.20.533-a
27. Pihl TH, Nielsen MK, Olsen SN, Leifsson PS, Jacobsen S. Nonstrangulating intestinal infarctions associated with *Strongylus vulgaris*: clinical presentation and treatment outcomes of 30 horses (2008-2016). *Equine Vet J.* (2018) 50:474–80. doi: 10.1111/evj.12779
28. Duncan J, Pirie H. The pathogenesis of single experimental infections with *Strongylus vulgaris* in foals. *Res Vet Sci.* (1975) 18:82–93. doi: 10.1016/S0034-5288(18)33635-X
29. Bollinger O. Die Kolik der Pferde und das Wurmaneurysma der Eingeweidearterien. *Münchener Sitzungsberichte Königliche Bayerischen Akademie der Wissenschaften Mathematisch-naturwissenschaftliche Abteilung.* (1870).
30. Olt A. Das Aneurysma Verminosum des Pferdes und seine unbekanntenen Beziehungen zur Kolik. *Dtsch Tierarztl Wschr.* (1932) 40:326–32.
31. van Andel AC, Gruys E, Kroneman J, Veerkamp J. Amyloid in the horse: a report of nine cases. *Equine Vet J.* (1988) 20:277–85. doi: 10.1111/j.2042-3306.1988.tb01524.x
32. Greatorrex JC. Diagnosis and treatment of “verminous aneurysm” formation in the horse. *Vet Rec.* (1977) 101:184–7. doi: 10.1136/vr.101.10.184
33. Drudge JH, Lyons ET. Large strongyles. recent advances. *Vet Clin North Am Equine Pract.* (1986) 2:263–80. doi: 10.1016/S0749-0739(17)30716-2
34. Pauli B, Althaus S, Von Tschärner C. [Arterial repair after mechanical injury by migrating fourth-stage larvae of *Strongylus vulgaris* in the horse (a light and electron microscopic study) (Author's Transl)]. *Beitr Pathol.* (1975) 155:357–78. doi: 10.1016/S0005-8165(75)80101-6
35. Nielsen MK, Jacobsen S, Olsen SN, Bousquet E, Pihl T. Nonstrangulating intestinal infarction associated with *Strongylus vulgaris* in referred Danish equine cases. *Equine Vet J.* (2016) 48:376–9. doi: 10.1111/evj.12422

36. McCraw B, Slocombe J. *Strongylus edentatus*: development and lesions from ten weeks postinfection to patency. *Can J Comp Med.* (1978) 42:340.
37. McCraw B, Slocombe J. Early development of and pathology associated with *Strongylus edentatus*. *Can J Comp Med.* (1974) 38:124.
38. McCraw BM, Slocombe JO. *Strongylus equinus*: development and pathological effects in the equine host. *Can J Comp Med.* (1985) 49:372–83.
39. Malan FS, De Vos V, Reinecke RK, Pletcher JM. Studies on *Strongylus asini*. I Experimental infestation of equines Onderstepoort J Vet Res. (1982) 49:151–4.
40. Round M. The prepatent period of some horse nematodes determined by experimental infection. *J Helminthol.* (1969) 43:185–92. doi: 10.1017/S0022149X00004016
41. Love S, Duncan J. The development of naturally acquired cyathostome infection in ponies. *Vet Parasitol.* (1992) 44:127–42. doi: 10.1016/0304-4017(92)90151-X
42. Reinemeyer C, Herd R, Gabel A. Distribution of adult and larval cyathostomes in helminth-l foals after primary infection. *Equine Vet J.* (1988) 20:296–7. doi: 10.1111/j.2042-3306.1988.tb01528.x
43. Murphy D, Love S. The pathogenic effects of experimental cyathostome infections in ponies. *Vet Parasitol.* (1997) 70:99–110. doi: 10.1016/S0304-4017(96)01153-3
44. Gibson T. The effect of repeated anthelmintic treatment with phenothiazine on the faecal egg counts of housed horses, with some observations on the life cycle of *Trichonema* Spp. in the horse. *J Helminthol.* (1953) 27:29–40. doi: 10.1017/S0022149X00023488
45. Love S, Murphy D, Mellor D. Pathogenicity of cyathostome infection. *Vet Parasitol.* (1999) 85:113–22. doi: 10.1016/S0304-4017(99)00092-8
46. Giles C, Urquhart K, Longstaffe J. Larval cyathostomiasis (immature trichonema-induced enteropathy): a report of 15 clinical cases. *Equine Vet J.* (1985) 17:196–201. doi: 10.1111/j.2042-3306.1985.tb02469.x
47. Russel A. The development of helminthiasis in thoroughbred foals. *J Comp Pathol Ther.* (1948) 58:107–27. doi: 10.1016/S0368-1742(48)80009-3
48. Nielsen MK, Peterson DS, Monrad J, Thamsborg SM, Olsen SN, Kaplan RM. Detection and semi-quantification of *Strongylus vulgaris* DNA in equine faeces by real-time quantitative PCR. *Int J Parasitol.* (2008) 38:443–53. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.07.014
49. Campbell AJ, Gasser RB, Chilton NB. Differences in a ribosomal DNA sequence of *Strongylus* species allows identification of single eggs. *Int J Parasitol.* (1995) 25:359–65. doi: 10.1016/0020-7519(94)00116-6
50. Gasser RB, Stevenson LA, Chilton NB, Nansen P, Bucknell DG, Beveridge I. Species Markers for equine strongyles detected in intergenic rDNA by PCR-RFLP. *Mol Cel Probes.* (1996) 10:371–8. doi: 10.1006/mcpr.1996.0050

51. Hung G-C, Gasser R, Beveridge I, Chilton N. Species-specific amplification by PCR of ribosomal DNA from some equine strongyles. *Parasitology*. (1999) 119:69–80. doi: 10.1017/S0031182099004497
52. Bracken MK, Wohlk CB, Petersen SL, Nielsen MK. Evaluation of conventional PCR for detection of *Strongylus vulgaris* on horse farms. *Vet Parasitol*. (2012) 184:387–91. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.08.015
53. Tzelos T, Geyer KK, Mitchell MC, McWilliam HE, Kharchenko VO, Burgess ST, et al. Characterisation of serum IgG (T) responses to potential diagnostic antigens for equine cyathostomiasis. *Int J Parasitol*. (2020) 50:289–98. doi: 10.1016/j.ijpara.2020.01.004
54. Andersen UV, Howe DK, Dangoudoubiyam S, Toft N, Reinemeyer CR, Lyons ET, et al. SvSXP: A *Strongylus vulgaris* antigen with potential for prepatent diagnosis. *Parasit Vectors*. (2013) 6:84. doi: 10.1186/1756-3305-6-84
55. Reinemeyer CR, Prado JC, Nielsen MK. Comparison of the larvicidal efficacies of moxidectin or a five-day regimen of fenbendazole in horses harboring cyathostomin populations resistant to the adulticidal dosage of fenbendazole. *Vet Parasitol*. (2015) 214:100–7. doi: 10.1016/j.vetpar.2015.10.003
56. Duncan JL, Bairden K, Abbott EM. Elimination of mucosal cyathostome larvae by five daily treatments with fenbendazole. *Vet Rec*. (1998) 142:268–71. doi: 10.1136/vr.142.11.268
57. Matthews JB. Anthelmintic resistance in equine nematodes. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. (2014) 4:310–5. doi: 10.1016/j.ijpddr.2014.10.003
58. Nielsen MK, Reinemeyer CR, Donecker JM, Leathwick DM, Marchiondo AA, Kaplan RM. Anthelmintic resistance in equine parasites—current evidence and knowledge gaps. *Vet Parasitol*. (2014) 204:55–63. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.11.030
59. von Samson-Himmelstjerna G. Anthelmintic resistance in equine parasites - detection, potential clinical relevance and implications for control. *Vet Parasitol*. (2012) 185:2–8. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.10.010
60. Kaplan RM, Klei TR, Lyons ET, Lester G, Courtney CH, French DD, et al. Prevalence of anthelmintic resistant cyathostomes on horse farms. *J Am Vet Med Assoc*. (2004) 225:903–10. doi: 10.2460/javma.2004.225.903
61. Traversa D, Castagna G, von Samson-Himmelstjerna G, Meloni S, Bartolini R, Geurden T, et al. Efficacy of major anthelmintics against horse cyathostomins in France. *Vet Parasitol*. (2012) 188:294–300. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.03.048
62. Saes IL, Vera JHS, Fachioli DF, Yamada PH, Dellaqua JVT, Saes RL, et al. Time required by different anthelmintics to reach expected efficacy levels in horses infected by strongyles. *Vet Parasitol*. (2016) 229:90–2. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.10.002
63. Lind EO, Kuzmina T, Ugglå A, Waller P, Höglund J, A. field study on the effect of some anthelmintics on cyathostomins of horses in Sweden. *Vet Res Commun*. (2007) 31:53–65. doi: 10.1007/s11259-006-3402-5

64. Traversa D, von Samson-Himmelstjerna G, Demeler J, Milillo P, Schurmann S, Barnes H, et al. Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. *Parasit Vectors*. (2009) 2(Suppl. 2):S2. doi: 10.1186/1756-3305-2-S2-S2
65. Vera JHS, Fachiolli DF, Ramires LM, de Lima Saes I, Yamada PH, Gonçalves JA, et al. Efficacy of ivermectin, moxidectin and febendazole in equine in Brazil. *Vet Parasitol Reg Stud Reports*. (2020) 20:100374. doi: 10.1016/j.vprsr.2020.100374
66. Nielsen MK, Branam MA, Wiedenheft AM, Digianantonio R, Scare JA, Bellaw JL, et al. Anthelmintic efficacy against equine strongyles in the United States. *Vet Parasitol*. (2018) 259:53–60. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.07.003
67. Coles GC, Jackson F, Pomroy WE, Prichard RK, von Samson-Himmelstjerna G, Silvestre A, et al. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol*. (2006) 136:167–85. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.11.019
68. Sangster NC, Prichard RK, Lacey E. Tubulin and benzimidazole-resistance in *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). *J Parasitol*. (1985) 71:645–51. doi: 10.2307/3281438
69. Gokbulut C, McKellar QA. Anthelmintic drugs used in equine species. *Vet Parasitol*. (2018) 261:27–52. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.08.002
70. Lacey E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol*. (1988) 18:885–936. doi: 10.1016/0020-7519(88)90175-0
71. Prichard R. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends Parasitol*. (2001) 17:445–53. doi: 10.1016/S1471-4922(01)01983-3
72. Kwa MSG, Veenstra JG, Roos MH. Molecular characterisation of β -tubulin genes present in benzimidazole-resistant populations of *Haemonchus contortus*. *Mol Biochem Parasitol*. (1993) 60:133–43. doi: 10.1016/0166-6851(93)90036-W
73. Ghisi M, Kaminsky R, Mäser P. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Vet Parasitol*. (2007) 144:313–20. doi: 10.1016/j.vetpar.2006.10.003
74. Mohammedsalih KM, Krücken J, Bashar A, Juma FR, Abdalmalaik AAH, Khalafalla A, et al. Susceptible trichostrongyloid species mask presence of benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* in cattle. *Parasit Vectors*. (2021) 14:101. doi: 10.1186/s13071-021-04593-w
75. Martínez-Valladares M, Valderas-García E, Gandasegui J, Skuce P, Morrison A, Castilla Gómez de Agüero V, et al. Teladorsagia circumcincta beta tubulin: the presence of the E198I polymorphism on its own is associated with benzimidazole resistance. *Parasit Vectors*. (2020) 13:453. doi: 10.1186/s13071-020-04320-x
76. Dilks CM, Hahnel SR, Sheng Q, Long L, McGrath PT, Andersen EC. Quantitative benzimidazole resistance and fitness effects of parasitic nematode beta-tubulin alleles. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. (2020) 14:28–36. doi: 10.1016/j.ijpddr.2020.08.003

77. Redman E, Whitelaw F, Tait A, Burgess C, Bartley Y, Skuce PJ, et al. The emergence of resistance to the benzimidazole anthelmintics in parasitic nematodes of livestock is characterised by multiple independent hard and soft selective sweeps. *PLoS Negl Trop Dis.* (2015) 9:e0003494. doi: 10.1371/journal.pntd.0003494
78. Dilks CM, Koury EJ, Buchanan CM, Andersen EC. Newly identified parasitic nematode beta-tubulin alleles confer resistance to benzimidazoles. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* (2021) 17:168–75. doi: 10.1016/j.ijpddr.2021.09.006
79. Blackhall WJ, Kuzmina T, von Samson-Himmelstjerna G. B-Tubulin genotypes in six species of cyathostomins from anthelmintic-naive Przewalski and benzimidazole-resistant brood horses in Ukraine. *Parasitol Res.* (2011) 109:1199–203. doi: 10.1007/s00436-011-2426-0
80. Peregrine AS, Molento MB, Kaplan RM, Nielsen MK. Anthelmintic resistance in important parasites of horses: does it really matter? *Vet Parasitol.* (2014) 201:1–8. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.01.004
81. Becher A, Van Doorn D, Pfister K, Kaplan R, Reist M, Nielsen M. Equine parasite control and the role of national legislation—a multinational questionnaire survey. *Vet Parasitol.* (2018) 259:6–12. doi: 10.1016/j.vetpar.2018.07.001
82. Tydén E, Enemark HL, Franko MA, Höglund J, Osterman-Lind E. Prevalence of *Strongylus vulgaris* in horses after ten years of prescription usage of anthelmintics in Sweden. *Vet Parasitol X.* (2019) 2:100013. doi: 10.1016/j.vpoa.2019.100013
83. Cain JL, Jarisch K, Macaluso KR, Luedtke BE. Correlation between fecal egg count, presence of *Strongylus vulgaris*, and body score of feral horses on Fort Polk, Louisiana. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* (2018) 13:14–7. doi: 10.1016/j.vprsr.2018.03.002
84. Nielsen MK, Vidyashankar AN, Olsen SN, Monrad J, Thamsborg SM. *Strongylus vulgaris* associated with usage of selective therapy on Danish horse farms—is it reemerging? *Vet Parasitol.* (2012) 189:260–6. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.04.039
85. Jürgenschellert L, Krücken J, Austin CJ, Lightbody KL, Bousquet E, von Samson-Himmelstjerna G. Investigations on the occurrence of tapeworm infections in German horse populations with comparison of different antibody detection methods based on saliva and serum samples. *Parasit Vectors.* (2020) 13:1–10. doi: 10.1186/s13071-020-04318-5
86. Barda BD, Rinaldi L, Ianniello D, Zepherine H, Salvo F, Sadutshang T, et al. Mini-Flotac, an innovative direct diagnostic technique for intestinal parasitic infections: experience from the field. *PLoS Negl Trop Dis.* (2013) 7:e2344. doi: 10.1371/journal.pntd.0002344
87. Cringoli G, Maurelli MP, Levecke B, Bosco A, Vercruyssen J, Utzinger J, et al. The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nat Protoc.* (2017) 12:1723–32. doi: 10.1038/nprot.2017.067
88. Noel ML, Scare JA, Bellaw JL, Nielsen MK. Accuracy and precision of Mini-FLOTAC and McMaster techniques for determining equine strongyle egg counts. *J Equine Vet Sci.* (2017) 48:182–7.e1. doi: 10.1016/j.jevs.2016.09.006

89. Rehbein S, Lindner T, Visser M, Winter R. Evaluation of a double centrifugation technique for the detection of *Anoplocephala* eggs in horse faeces. *J Helminthol.* (2011) 85:409–14. doi: 10.1017/S0022149X10000751
90. Demeler J, Ramünke S, Wolken S, Ianiello D, Rinaldi L, Gahutu JB, et al. Discrimination of gastrointestinal nematode eggs from crude fecal egg preparations by inhibitor-resistant conventional and real-time PCR. *PLoS ONE.* (2013) 8:e61285. doi: 10.1371/journal.pone.0061285
91. Gehlen H, Wulke N, Ertelt A, Nielsen MK, Morelli S, Traversa D, et al. Comparative analysis of intestinal helminth infections in colic and non-colic control equine patients. *Animals.* (2020) 10:1916. doi: 10.3390/ani10101916
92. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* (1990) 215:403–10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
93. Howe KL, Bolt BJ, Shafie M, Kersey P, Berriman M. Wormbase parasite – a comprehensive resource for helminth genomics. *Mol Biochem Parasitol.* (2017) 215:2–10. doi: 10.1016/j.molbiopara.2016.11.005
94. Consortium IHG. Comparative genomics of the major parasitic worms. *Nat Genet.* (2019) 51:163–74. doi: 10.1038/s41588-018-0262-1
95. Collobert-Laugier C, Hoste H, Sevin C, Dorchies P. Prevalence, abundance and site distribution of equine small strongyles in Normandy, France. *Vet Parasitol.* (2002) 110:77–83. doi: 10.1016/S0304-4017(02)00328-X
96. Morariu S, Mederle N, Badea C, Dărăbuș G, Ferrari N, Genchi C. The prevalence, abundance and distribution of cyathostomins (small strongyles) in horses from western Romania. *Vet Parasitol.* (2016) 223:205–9. doi: 10.1016/j.vetpar.2016.04.021
97. Denwood MJ, Love S, Innocent GT, Matthews L, McKendrick IJ, Hillary N, et al. Quantifying the sources of variability in equine faecal egg counts: implications for improving the utility of the method. *Vet Parasitol.* (2012) 188:120–6. doi: 10.1016/j.vetpar.2012.03.005
98. Slocombe JO, McCraw BM. Gastrointestinal nematodes in horses in Ontario. *Can Vet J.* (1973) 14:101–5.
99. McCraw B, Slocombe J. *Strongylus vulgaris* in the horse: a review. *Can Vet J.* (1976) 17:150.
100. Ogbourne CP. Variations in the fecundity of strongylid worms of the horse. *Parasitology.* (1971) 63:289–98. doi: 10.1017/S0031182000079609
101. Hedberg-Alm Y, Penell J, Riihimäki M, Osterman-Lind E, Nielsen MK, Tydén E. Parasite occurrence and parasite management in Swedish horses presenting with gastrointestinal disease—a case–control study. *Animals.* (2020) 10:638. doi: 10.3390/ani10040638
102. Nielsen MK, Vidyashankar AN, Bellaw J, Gravatte HS, Cao X, Rubinson EF, et al. Serum *Strongylus vulgaris*-specific antibody responses to anthelmintic treatment in naturally infected horses. *Parasitol Res.* (2015) 114:445–51. doi: 10.1007/s00436-014-4201-5

Publikationen

103. Klei TR, Chapman MR. Immunity in equine cyathostome infections. *Vet Parasitol.* (1999) 85:123–36. doi: 10.1016/S0304-4017(99)00093-X
104. Kornaś S, Cabaret J, Skalska M, Nowosad B. Horse infection with intestinal helminths in relation to age, sex, access to grass and farm system. *Vet Parasitol.* (2010) 174:285–91. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.09.007
105. Lester HE, Spanton J, Stratford CH, Bartley DJ, Morgan ER, Hodgkinson JE, et al. Anthelmintic efficacy against cyathostomins in horses in southern England. *Vet Parasitol.* (2013) 197:189–96. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.06.009
106. Sangster N. Managing parasiticide resistance. *Vet Parasitol.* (2001) 98:89–109. doi: 10.1016/S0304-4017(01)00425-3

3.2.9. Anteilserläuterung der Autoren

Name	Bezeichnung Autor	Erläuterung Anteil Leistung
Jürgenschellert, Laura	Erstautorin	Mitwirkung bei Konzipierung der Studie Sammlung der equinen Kot-, Speichel- und Serumproben Durchführung der PCR-Analysen und der Kotprobenuntersuchung mittels mini-FLOTAC Sammlung/Auswertung der Daten, Mitwirkung Durchführung stat. Analysen Erstellung des Manuskripts
Krücken, Jürgen	Co Autor	Mitwirkung bei Konzipierung der Studie Mitwirkung Durchführung stat. Analysen und Auswertung der Daten Mitwirkung Erstellung Manuskript
Bousquet, Eric	Co Autor	Mitwirkung bei Konzipierung der Studie Mitwirkung Erstellung Manuskript
Bartz, Jürgen	Co Autor	Mitwirkung bei Konzipierung der Studie Mitwirkung Erstellung Manuskript
Heyer, Nina	Co Autorin	Mitwirkung bei Etablierung der <i>Strongylus</i> spp. HRM PCR, Mitwirkung Erstellung Manuskript
Nielsen, Martin K.	Co Autor	Mitwirkung bei Konzipierung der Studie Leitung Laborarbeiten für Serum-ELISA Mitwirkung Erstellung Manuskript

3.2.10. Supplementary Material

Supplementary Material

Article

Occurrence of strongylid nematode parasites on horse farms in Berlin and Brandenburg, Germany with high seroprevalence of *Strongylus vulgaris*

Questionnaire S1. Questionnaire to obtain information regarding treatment history and management on the horse farms.

I. Horse keeping

1. Farm type:

- Riding stable (less than 2 foals, more than 15 horses)
- Small farm (less than 2 foals, less than 15 horses)
- Stud farm (more than 2 foals)

2. Total number of horses:.....

3. Age of horses: Quantity

Foals (under 1 year):.....

Yearlings (1-3 years):.....

Adults (over 3 years):.....

4. Horse accomodation:

- Open stable
- Box
- Group Box
- other

II. Pasture management

1. Do the horses have access to the pasture? yes no

How often?

- year around

only in summer

full day

a few hours

2. How many hectares of pasture are used per horse?.....

3. Are pastures regularly changed? yes no

If yes, at what intervals?.....

After anthelmintic treatment? yes no

4. Do you feed fresh (chopped) grass? yes no

III. Hygiene – Stable and pasture

1. How often do you clean the stables?.....

2. Do you disinfect your stable annually? yes no

3. If yes, what disinfectant is used?.....

4. Is cleaning or disinfection carried out after deworming?

yes no

5. Do you collect faeces from the pastures? yes no

How often?.....

6. Do you use hay racks? yes no

IV. Anthelmintic management

1. Are horses dewormed at regular intervals? yes no

Do all horses receive anthelmintic treatment at the same time? yes no

Date of the last anthelmintic treatment:.....

Which drug was used?

foals:.....

yearlings:.....

adults:.....

breeding mares:.....

2. How often is anthelmintic treatment given?.....

3. Do you change the drug classes regularly?

yes no

How often?.....

4. Are new horses dewormed before arrival at the farm? yes no

5. Do you follow an evidence-based selective deworming approach based on faecal egg counting?

yes no

Which faecal egg count is the limit above which the horses are treated?

Publikationen

6. Do you monitor the success of the anthelmintic treatment using faecal samples?

yes no

7. Please describe the anthelmintic management:

.....

Many thanks

Jürgenschellert, L., Krücken, J., Austin, C.J., Lightbody, K.L., Bousquet, E., von Samson-Himmelstjerna, G., 2020. Investigations on the occurrence of tapeworm infections in German horse populations with comparison of different antibody detection methods based on saliva and serum samples. *Parasites & Vectors* 13, 1-10.

Supplementary Table 1 | (TabS1 P2) Primers used for diagnosis of *Strongylus* spp.

Sequence (5' - 3')	Name	Target species
TATACATTAAATAGTGTCCCCATTCTAG	<i>S_vulgaris_for</i> (modified based on Nielsen (2008))	<i>Strongylus vulgaris</i>
GCAAATATCATTAGATTTGATTCTTCCG	<i>S_vulgaris_rev</i> (Nielsen (2008))	<i>Strongylus vulgaris</i>
AATCCCCATTCTAGAAAAGAAT	S.eden:equi.asin. HRM.for	<i>Strongylus edentatus</i> , <i>Strongylus equinus</i> , <i>Strongylus asni</i>
ATAAGTCGGTAAACAATTTAGC	S.eden:equi.asin. HRM.for	<i>Strongylus edentatus</i> , <i>Strongylus equinus</i> , <i>Strongylus asni</i>

Supplementary Table 2 | (TabS2 P2) Primers for pyrosequencing assays for *Strongylus vulgaris* isotype 1 β - tubulin gene

Sequence (5' to 3')	Name
CGGGTATGGGAACTCTCCTTA	Sv_betaT_Iso1_167_F1
CGTGTTCCATTCCCAAGAACT	Sv_betaT_Iso1_167_R1
Biotin-CGTGTTCCATTCCCAAGAACT	Sv_bT_Iso1_167_P_R1
TGATAGAATCATGTCTTCGT	SvbTIso1_167S
TTTTTCTAGGTTTCCGACACTGT	Sv_betaT_Iso1_198_200_F1
AAGGTACGGAAGCAAATATCATAC	Sv_betaT_Iso1_198_200_R1
Biotin- AAGGTACGGAAGCAAATATCATAC	Sv_bT_Iso1_198_200_P_R1
GCTAGTTGAAAATACAGATG	SvbTIso1_198_200S
TTGATTGCTAAAATCCGAGAAGAG	Sv_betaT_Iso2_167_F1
CATAGAGTCCAAGCGTGCATTA	Sv_betaT_Iso2_167_R1
CCCTTTGTAATCGGATATTGCA	Sv_betaT_Iso2_198_200_F1
AAAGTTCGGAAGCAGATGTCGTA	Sv_betaT_Iso2_198_200_R1

4. Diskussion

4.1. Publikationen im Zusammenhang

In beiden hier vorgelegten Publikationen wird das Vorkommen von Helminthen in der regionalen Pferdepopulation in Berlin und Brandenburg mit verschiedenen direkten und indirekten Nachweismethoden untersucht und Risikofaktoren für eine Infektion mit gastrointestinalen Parasiten bei Pferden mittels logistischer Regressionsanalyse ermittelt.

Die Publikation „Investigations on the occurrence of tapeworm infections in German horse populations with comparison of different antibody detection methods based on saliva and serum samples“ (Jürgenschellert et al., 2020) fasst die Studienergebnisse mit Fokus auf das Vorkommen von Cestoden in den regionalen Pferdebeständen zusammen. Die Ergebnisse der serum- und speichelbasierten ELISAs zum Nachweis von *Anoplocephala* spp.-spezifischen Antikörpern deuten darauf hin, dass die Prävalenz von equinen Bandwurminfektionen deutlich höher ist, als es die koproskopische Untersuchung mittels mini-FLOTAC oder kombinierter Sedimentation-Flotation suggeriert.

In der zweiten Publikation mit dem Titel „Occurrence of strongylid nematode parasites on horse farms in Berlin and Brandenburg, Germany, with high seroprevalence of *Strongylus vulgaris*“ (Jürgenschellert et al., 2022) werden die Prävalenzen von Nematoden in Pferdebeständen in Berlin und Brandenburg diskutiert. Es wurde eine hohe Seroprävalenz für anti-*S. vulgaris* Antikörper beobachtet und in der Risikofaktoranalyse zeigte sich ein selektives Entwurmungsmanagement in diesem Zusammenhang als gefährdender Faktor.

4.2. Stichprobengröße und Probensammlung

Die biometrische Planung für die veröffentlichten Studienergebnisse sah eine Fall-Kontroll-Studie vor, in der Pferde mit selektiver Entwurmung mit einer Kontrollgruppe mit strategischem Entwurmungsschema verglichen werden sollten. Für die Berechnung des Stichprobenumfangs wurde als primäre Zielgröße die serologischen Ergebnisse des *S. vulgaris*-ELISA (Andersen et al., 2013) gewählt und die Hauptfragestellung war die Prävalenz der verschiedenen *Strongylus*-Arten. Die Berechnung des Stichprobenumfangs weist insofern Einschränkungen auf, als sich während der Probensammlung herausstellte, dass nicht genügend Pferde mit einer selektiven Behandlungsstrategie in die Stichprobe aufgenommen werden konnten, da die Mehrheit der beprobten Betriebe ein strategisches Entwurmungsschema verfolgte. Somit befinden sich in der Studienpopulation letztlich nur 8,7 % Pferde, die nach einer selektiven Strategie anthelminthisch behandelt wurden.

Eine weitere Limitation dieser Studie liegt in der Auswahl und Anzahl der beprobten Pferde pro Betrieb. Es wurde eine Randomisierung auf Betriebsebene geplant, jedoch sollten die Pferde auf individueller Ebene untersucht werden. Bei der statistischen Planung wurden die in früheren Studien ermittelten Prävalenzen von *S. vulgaris* auf Betriebs- und Einzeltierebene berücksichtigt. Es wurde daher eine Beprobung von zehn Pferden pro Betrieb angestrebt. Letztendlich wurden jedoch vier bis 17 Pferde pro Betrieb beprobt, da einige Betriebe nicht genügend Pferde hielten. Zudem wurden im Sinne des „Refinements“ vorrangig Pferde beprobt, die sich gut handeln ließen, wodurch die Auswahl der Tiere nicht zufällig war und zudem die Altersgruppen in der Studienpopulation unterschiedlich stark vertreten waren.

Die Betriebe wurden zwischen Mai 2017 und Januar 2018 zur Probensammlung für diese Studie besucht. Es wird von einem gehäuften Auftreten von nachgewiesenen *A. perfoliata*-Infektionen während der Herbst- und Wintermonate berichtet (Rehbein et al., 2013), wobei sich der Einfluss der Saisonalität in der Studie Engell-Sørensen et al. (2018) als vernachlässigbar zeigte. Die Weidesaison stellt für die orale Aufnahme des Zwischenwirts und für eine Infektion mit Bandwürmern einen gefährdenden Faktor dar (Kornaś et al., 2010). Ein saisonaler Einfluss auf den Lebenszyklus von *A. perfoliata* wirkt sich auf das diagnostische Potenzial in der Koproskopie aus, das von der Menge der Bandwürmer mit graviden Proglottiden abhängt.

Das Auftreten von Infektionen mit Strongyliden zeigt bei Pferden in einigen Publikationen keine Korrelation mit bestimmten Jahreszeiten (Rehbein et al., 2013; Steuer et al., 2022; Traversa et al., 2010), wobei in anderen Studien berichtet wird, dass die Frequenz der Ausscheidung von Strongylideneiern sich saisonal unterscheidet. So beobachteten Elghryani et al. (2023), Hautala et al. (2019) und Relf et al. (2013) eine reduzierte Ausscheidung im Frühling im Vergleich zum Winter. Saeed et al. (2010), Lester et al. (2018) und Wood et al. (2013) beobachteten eine höhere Eiausscheidung im Frühling und Sommer, während Tydén et al. (2019b) in den Sommer- und Herbstmonaten höhere EpG-Werte ermittelten. Bei diesen Betrachtungen sollten jedoch auch stets weitere beeinflussende Faktoren wie das Klima, Alter, Geschlecht und das Weidemanagement berücksichtigt werden. Steuer et al. (2022) fanden keine statistischen Unterschiede bei den Ergebnissen des *S. vulgaris*-ELISA in Bezug auf die Jahreszeiten.

Der saisonale Einfluss kann auf die Inzidenz von Parasitenerkrankungen je nach Nachweismethode und Zeitpunkt der Probenahme hinsichtlich der Einzeltier- und Betriebsprävalenz eine Verzerrung der Daten darstellen, da dieser Faktor nicht direkt in der statistischen Auswertung dieser Studie berücksichtigt wurde.

4.3. Verbreitung und Nachweismethoden

In dieser Studie wurde durch koproskopische Methoden die Prävalenz der Ausscheidung von MDS-Eiern ermittelt und konnte bei 66,7 % der Pferde aus der Studienpopulation nachgewiesen werden. Die ermittelte hohe Prävalenz ist vergleichbar mit anderen Studienergebnissen aus Deutschland. Boelow et al. (2023) analysierten die Daten aus den Untersuchungen von 1067 Pferdekotproben aus Deutschland, wobei auch 172 Kotproben aus der hier vorliegenden Studie verwendet wurden und die weiteren Proben zur Diagnostik eingesandt wurden. In der Studienpopulation wurde eine Prävalenz von 46 % für die Ausscheidung von MDS-Eiern beobachtet. Drei andere Studien ermittelten vergleichbare Prävalenzen von 41,8 % (Gehlen et al., 2020), 44,6 % (Schneider et al., 2014) und 55,3 % (Kaspar et al., 2016). In einer weiteren deutschen Studie von Raue et al. (2017) wurden die Daten von diagnostischen Proben über den Zeitraum von 2003 bis 2012 retrospektiv ausgewertet und es wurden in 30,1 % der 3475 Pferdekotproben MDS-Eier nachgewiesen. Demgegenüber wurden in anderen, früher durchgeführten Studien aus Deutschland mit koproskopischen Nachweismethoden sehr hohe Prävalenzen von 91,6 % bis 98,7 % beobachtet (Fritzen et al., 2010; Hinney et al., 2011a; Wirtherle et al., 2004).

Zum direkten Nachweis von *S. vulgaris* in der Studienpopulation wurde nach der Larvenkultur eine DNA-Isolation und eine *S. vulgaris* real-time PCR (Nielsen et al., 2008) durchgeführt. Das Ergebnis deutet auf eine Eiausscheidung von *S. vulgaris* bei 0,83 % der Pferde hin (Jürgenschellert et al., 2022). Diese niedrige Prävalenz wird auch in aktuellen Studien aus dem europäischen Raum berichtet, so wurden in der Schweiz bei einer Gruppe von Tragpferden bei 1,5 % der Pferde *S. vulgaris* mittels Larvenkultur nachgewiesen (Spieler and Schnyder, 2022).

Bei dem indirekten Nachweis mittels *S. vulgaris*-spezifischem ELISA (Andersen et al., 2013) wurden in der vorliegenden Studie unter Verwendung eines sehr konservativen Cut-off-Werts mit einer Sensitivität von 43 % und einer Spezifität von 96 % insgesamt 21,2 % der Serumproben positiv auf Antikörper gegen *S. vulgaris*-Larven eingestuft und eine Prävalenz von 83,3 % auf Betriebsebene ermittelt. Mit dem von Andersen et al. (2013) für Pferde ab einem Lebensalter von sieben Monaten empfohlenen Cut-off-Wert von 13,47 % ODR werden 39,9 % der Serumproben als positiv eingestuft. Bei der Bewertung der Ergebnisse dieser indirekten Nachweismethode sollten die Befunde früherer Studien berücksichtigt werden, wonach es mehrere Monate dauern kann, bis die Antikörperkonzentration nach einer wirksamen Anthelminthika-Behandlung deutlich abnimmt (Nielsen et al., 2015a; Nielsen et al., 2015b). Daher weisen Immunreaktionen und Seropositivität beim indirekten Nachweis durch den *S. vulgaris*-spezifischen ELISA auf eine Exposition und nicht notwendigerweise auf eine bestehende oder gar patente Infektion hin. Die ermittelten Prävalenzen sind vergleichbar mit

der Studie von Gehlen et al. (2020), wo in 1,1 % der Kotproben DNA von *S. vulgaris* mittels real-time PCR detektiert wurde und eine hohe Seroprävalenz von 32,3 % unter Anwendung des Cut-off-Werts von 13,47 % beobachtet wurde. In der Studie von Gehlen et al. (2020) wurden, wie auch in der schwedischen Studie von Hedberg-Alm et al. (2020), Pferde mit und ohne Erkrankungen des Magen-Darm-Trakts in einer Fall-Kontroll-Studie verglichen. So wurde in Schweden eine insgesamt hohe Seroprävalenz von 61,5 % beobachtet und bei 5,2 % der Pferde aus der Studienpopulation war das Ergebnis der *S. vulgaris* PCR positiv.

Die Ergebnisse der real-time PCR mit Schmelzkurvenanalyse zeigten den Nachweis von *S. edentatus* DNA in zehn Pferdekotproben und bei einem Pferd aus dieser Studienpopulation deuteten die Ergebnisse der real-time PCR sowohl auf eine Eiausscheidung von *S. vulgaris* als auch von *S. edentatus* hin. Dies lässt sich durch den langen Lebenszyklus der beiden großen Strongylyden erklären. Wenn Bedingungen vorliegen, die die Entwicklung eines der beiden Parasiten ermöglichen, ist eine Koinfektion dieser beiden Erreger möglich. Dies wurde auch bei einer Studie von Nielsen et al. (2010) beobachtet.

In der hier beschriebenen Studie konnten in 0,6 % der Kotproben Cestodeneier mikroskopisch identifiziert werden. Durch zwei *Anoplocephala* spp.-ELISAs (Lightbody et al., 2016) wurde serologisch eine Prävalenz von 16,2 % auf Einzeltierebene und von 52,1 % auf Betriebsebene ermittelt. Der speichelbasierte ELISA ergab eine Prävalenz von 29,5 % auf Einzeltierebene und von 75,7 % auf Betriebsebene. Das koproskopische Ergebnis liegt auch im Vergleich zu neueren Studien im unteren Bereich der zu erwartenden Werte. In anderen Studien wurden ebenfalls geringe Prävalenzen mittels koproskopischer Methoden beobachtet, wobei bei 2,7 % der Pferde in einer deutschen Studie (Boelow et al., 2023) und bei 2,59 % der Pferde in einer irischen Studie (Elghryani et al., 2023) eine patente Infektion mit Bandwürmern nachgewiesen wurde. Es zeigten sich in einer Studie aus Schweden (Hedberg-Alm et al., 2020) 15,7 % der Pferde in der Kotprobenuntersuchung mittels Flotationstechnik positiv auf *A. perfoliata*. Eine Studie aus Island (Hreinsdóttir et al., 2019) ergab mit 64,4 % eine hohe Prävalenz von *A. perfoliata* bei postmortalen Untersuchungen, während sich die McMaster-Methode im Vergleich mit 7,4 % koproskopischem Nachweis als wenig sensitiv erwies. Gehlen et al. (2020) ermittelten in einer Studienpopulation aus Deutschland eine *A. perfoliata* Seroprävalenz von 10,7 %. Bandwurmeier konnten in dieser Studie in 0,8 % der Kotproben nachgewiesen werden, was sich mit den in der vorliegenden Studie ermittelten Werten annähernd deckt.

In dieser Studie wurden in 0,4 % der Kotproben Eier von *Parascaris* spp. identifiziert. Da während der Probensammlung vorrangig adulte Pferde beprobt wurden, ist eine Bewertung dieses Ergebnisses nicht aussagekräftig. Das Alter ist ein wichtiger Einflussfaktor hinsichtlich

der *Parascaris* spp. Prävalenz (Clayton and Duncan, 1979; Hautala et al., 2019; Jenkins et al., 2020) und die besonders gefährdeten jungen Altersgruppen sind in der Studienpopulation unterrepräsentiert.

Es wurden in 1,2 % der Kotproben Eier von *O. equi* detektiert. Die tatsächliche Verbreitung in der Studienpopulation kann jedoch deutlich höher liegen, denn die für Pfiemenschwänze empfohlene Nachweismethode des Klebestreifen-Abklatschpräparats (ESCCAP, 2019) wurde in dieser Studie nicht durchgeführt. In dieser Studie wurden die für den Nachweis von *O. equi* weniger sensitiven Methoden mini-FLOTAC und kombinierte Sedimentation-Flotation zur koproskopischen Untersuchung verwendet. Somit kann es zu einer Unterschätzung der *O. equi*-Prävalenz aufgrund des Eiablagemusters in der Perianalregion kommen.

Die Kotproben wurden in dieser Studie mittels mini-FLOTAC und der semi-quantitativen kombinierten Sedimentation-Flotation koproskopisch untersucht. Für den koproskopischen Nachweis einer Bandwurminfektion wird die kombinierte Sedimentation-Flotation empfohlen (Rehbein et al., 2011). In dieser Studie wurden keine Unterschiede in der Sensitivität der beiden Methoden festgestellt, ein Vergleich ist jedoch aufgrund der geringen Anzahl positiver koproskopischer Nachweise von Cestodeneiern nicht aussagekräftig. In Bezug auf Strongylideneier erwies sich die mini-FLOTAC-Methode mit 64,3 % erfolgtem Nachweis von MDS-Eiern in den Kotproben der Studienpopulation als sensitiver als die kombinierte Sedimentation-Flotation mit 57,4 %, ebenso wurde der Befund einer Infektion mit *Parascaris* spp. und von *O. equi* mittels mini-FLOTAC häufiger erhoben. Boelow et al. (2022) verglichen verschiedene koproskopische Methoden und fanden keinen signifikanten Unterschied in der Nachweisrate von *Anoplocephala* spp. zwischen kombinierter Sedimentation-Flotation und mini-FLOTAC, was die Ergebnisse der vorliegenden Studie ebenfalls aufzeigen. In Bezug auf MDS- und *Parascaris* spp.-Eier erwies sich jedoch die kombinierte Sedimentation-Flotation als die sensitivere Methode für den qualitativen Nachweis, wobei die quantitativen Befunderhebungen mittels mini-FLOTAC im Vergleich zu den kombinierten Ergebnissen für den Nachweis von MDS-Eiern sämtlicher Einzelmethoden eine starke Übereinstimmung aufwiesen.

4.4. Beurteilung der Risikofaktoren

Es wurden zur Auswertung der erhobenen Daten logistische Regressionsanalysen durchgeführt. Dabei sollten Variablen identifiziert werden, die einen potenziellen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit haben, dass ein Pferd aus der Studienpopulation einen positiven parasitologischen Nachweis mittels *Anoplocephala* Serum ELISA (Lightbody et al., 2016), *S. vulgaris* ELISA (Andersen et al., 2013) oder koproskopischer Diagnostik erzielt. Hinsichtlich

der Koproskopie wurden mögliche Risikofaktoren für den Nachweis von Eiern des MDS-Typs und somit für einen positiven EpG-Wert durch Kotprobenuntersuchungen mittels mini-FLOTAC und/oder kombinierter Sedimentation-Flotation ermittelt.

Es wurden in den drei Analysen Risikofaktoren erfasst, die einen potenziell schützenden oder gefährdenden Effekt haben. Die Ergebnisse der logistischen Regressionsmodelle sind in den Abbildungen in Form von Forest-Plots graphisch dargestellt (siehe Abbildung 2 und Tabelle 5 in Abschnitt 3.1.4. und Abbildung 6 und 7 und Tabelle 5 und 6 in Abschnitt 3.2.4.). Es wurden unterschiedliche Variablen in die Analysen mit einbezogen und Odds Ratios für den Nachweis von unterschiedlichen Erregern berechnet, welches bei einem direkten Vergleich der Risikofaktoren berücksichtigt werden sollte.

Weide

In allen drei Analysen, in denen Risikofaktoren für den serologischen Antikörpernachweis von *Anoplocephala* spp. und *S. vulgaris* sowie für einen positiven koproskopischen Nachweis von MDS-Eiern ermittelt wurden, stellte der saisonal zeitlich nicht limitierte, uneingeschränkte Weidezugang einen gefährdenden Faktor dar. Dies ist naheliegend, da die interne, parasitische Phase der untersuchten Nematoden und Cestoden durch die orale Aufnahme von infektiösen Larven bzw. mit Cysticercoid-Larven infizierten Moosmilben beginnt. Ein restriktiver Weidezugang stellt in allen drei Modellen einen schützenden Faktor im Vergleich zur Referenzkategorie dar, die einen kontinuierlichen Weidezugang während der Weidesaison vorgibt. Dies lässt sich damit begründen, dass eine Übertragung über kontaminiertes Weidegras ermöglicht wird. Der berechnete Einfluss der Variable für den limitierten Weidezugang ist in allen drei Analysen im Vergleich zu unbeschränktem Weidezugang statistisch signifikant. Dies war für die Kategorie ohne Weidezugang nicht in allen Analysen signifikant, was damit erklärt werden kann, dass der Anteil der Pferde in der Studienpopulation, die keinen Weidezugang hatten, mit 16 Pferden und somit 3,3 % sehr gering war. Kein Weidezugang zeigte nur in der Analyse der Risikofaktoren für MDS-Eier im Kot einen hoch signifikant schützenden Effekt und bei den serologischen Nachweismethoden mittels ELISA waren die Ergebnisse der Odds Ratios statistisch nicht signifikant, wobei bei dem *S. vulgaris*-ELISA kein Effekt erkennbar war. Eine höhere Prävalenz von *Anoplocephala* spp. aufgrund von Weidezugang deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen von Kornaś et al. (2010), in denen eine positive Korrelation zwischen *Anoplocephala*-Eiern im Pferdekot und Weidegang festgestellt wurde. Dieser Zusammenhang zwischen Weidezugang und equinen Bandwurminfektionen wurde auch in anderen weltweit durchgeführten Studien beobachtet (Getachew et al., 2012; Ihler et al., 1995; Skotarek, 2008; Trotz-Williams et al., 2008). Es zeigte sich in einer Studie aus den USA ein Zusammenhang zwischen stetigem Weidezugang von Pferden und der Ausscheidung von MDS-Eiern sowie der Höhe des EpG-Werts. Bei Pferden, die im letzten Monat vor Kotprobenentnahme täglich Weidezugang hatten, war die

Wahrscheinlichkeit für einen positiven Nachweis von MDS-Eiern signifikant höher als bei Pferden, die im letzten Jahr keinen Weidezugang hatten (Nielsen et al., 2018). So wurde auch in anderen Studien gezeigt, dass der Weidezugang und eine längere Dauer des Weidegangs Risikofaktoren für die Ausscheidung von MDS-Eiern sind (Relf et al., 2013; Tydén et al., 2019b).

Weitere Variablen im Zusammenhang mit Weideflächen sind Weidehygiene, Weidewechsel und Weidefläche in Hektar. Diese wurden jedoch aufgrund der statistischen Berechnung nur in das finale Modell für die Regressionsanalyse des *Anoplocephala*-ELISA mit eingeschlossen, da durch das schrittweise Minimieren des Akaike Informationskriteriums (AIC) nicht relevante Variablen in den einzelnen Modellen ausgeschlossen wurden. Weidehygiene bedeutet in diesem Zusammenhang, dass der Pferdekot regelmäßig von der Weide entfernt wird. Diese Variable zeigte einen schützenden Effekt, der jedoch statistisch nicht signifikant war. Es wurde auch in anderen Studien gezeigt, dass ein regelmäßiges Absammeln von Pferdekot zweimal pro Woche die Zahl der infektiösen Larven von Magen-Darm-Strongyliden auf der Weide reduziert (Corbett et al., 2014; Osterman-Lind et al., 2022).

Die Variablen Weidefläche in Hektar und Weidewechsel werden auf Grundlage der logistischen Regressionsanalyse mit einem gefährdenden Einfluss assoziiert. Es wurde jedoch ein vorbeugender Effekt angenommen, da Weiderotation der Gruppen in der Studie von Relf et al. (2013) als schützender Faktor identifiziert wurde und eine hohe Besatzdichte in der Studie von Rendle et al. (2019) das Risiko von Parasitenbefall erhöhte. Auch in einer ungarischen Studie wiesen die Pferde, die mit extrem hoher Besatzdichte mit mehr als 30 Pferden pro Hektar gehalten wurden, signifikant höhere EpG-Werte auf als Pferde, die mit niedriger oder mittlerer Besatzdichte gehalten wurden (Joó et al., 2022). Auch in einer dänischen Studie von Larsen et al. (2002) wurde eine höhere Endoparasitenbelastung bei Durchführung eines Weiderotationsverfahren beobachtet. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Pferde möglicherweise durch ein nicht korrekt durchgeführtes Weiderotationsverfahren während der Weidesaison auf kontaminierte Weiden zurückkehrten und die erhöhte Grundfläche eine bessere Vegetation und somit die orale Aufnahme von frischem Gras im Verhältnis zu Heu fördert.

Nachweis anderer Parasiten

In der logistischen Regressionsanalyse zeigte sich für den serologischen Antikörperrnachweis von *Anoplocephala* spp. ein positiver koproskopischer Befund mit detektierten MDS-Eiern im Kot als ein gefährdender Faktor, gleiches deutet sich umgekehrt in der Risikofaktoranalyse für einen positiven MDS-EpG-Wert an, wobei das Ergebnis in diesem Fall nicht statistisch signifikant war. Die MDS und *Anoplocephala* spp. unterscheiden sich in den Lebenszyklen, jedoch gelangen diese Endoparasiten durch eine orale Aufnahme der infektiösen Larven bzw.

der infizierten Moosmilbe in den equinen Wirt. Diese Variablen wirken folglich nicht unmittelbar aufeinander ein, sondern stehen vielmehr als Indikator für die Qualität des Betriebsmanagements und der Weidehygiene.

Lebensalter

Das Alter der Pferde in Jahren ist eine Variable, die in allen drei Regressionsmodellen mit einem leicht schützenden Einfluss assoziiert wurde, jedoch war das Ergebnis für den *Anoplocephala*-ELISA nicht signifikant. In einer aktuellen Studie aus Schweden wurde kein Zusammenhang zwischen dem Alter der Pferde und einem positiven koproskopischen Bandwurmnachweis festgestellt (Hedberg-Alm et al., 2020).

In der Analyse für die koproskopische Diagnostik war hinsichtlich der MDS-Eiausscheidung ein signifikant schützender Effekt mit zunehmendem Lebensalter erkennbar. Es finden sich in der Literatur Aussagen zu der Korrelation zwischen der Anzahl an Strongylideneiern im Kot und dem Alter der Pferde: Bei jungen Pferden ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass MDS-Eier im Kot nachgewiesen werden, und es wird von höheren EpG-Werten in Kotproben von jungen Pferden bis fünf Jahren berichtet (Elghryani et al., 2023; Joó et al., 2022; Larsen et al., 2002; Love and Duncan, 1992; Nielsen et al., 2018; Relf et al., 2013; von Samson-Himmelstjerna et al., 2009b). Dies kann durch eine altersbedingte, erworbene Immunität durch Exposition begründet werden (Klei and Chapman, 1999; Kornaś et al., 2010). Dem gegenüber wurde in anderen Studien kein Zusammenhang zwischen dem Alter der Pferde und einer Infektion mit MDS beobachtet (Mezgebu et al., 2013; Saeed et al., 2010). In der hier vorliegenden Studie wurden wenige junge Tiere beprobt und der Mittelwert für das Alter der beprobten Pferde lag bei zwölf Lebensjahren, daher können nur begrenzt Aussagen bezüglich eines erhöhten Risikos für die Ausscheidung von MDS-Eiern bei Fohlen oder Jährlingen getroffen werden.

Ein zunehmendes Lebensalter erwies sich in der Analyse für den *S. vulgaris* ELISA ebenfalls als signifikant schützender Faktor. Tydén et al. (2019a) stellten keinen Zusammenhang zwischen der Prävalenz von *S. vulgaris* und dem Alter der Pferde fest. Dem gegenüber waren in der Studie von Kuzmina et al. (2016) Fohlen und ältere Pferde ab 16 Lebensjahren signifikant weniger mit großen Strongyliden infiziert. Dies deckt sich annähernd mit den Ergebnissen dieser Studie, da ein hohes Alter einen schützenden Effekt für einen *S. vulgaris*-seropositiven Befund darstellte.

Anthelminthika-Behandlung

Die Variable der selektiven Entwurmung zeigte sich mit einem Odds Ratio von 4,4 in der Regressionsanalyse für die Ergebnisse des SvSXP-Antikörper-ELISA als ein signifikant gefährdender Faktor in der Studienpopulation im Vergleich zu der Referenzkategorie der strategischen Behandlung mit Anthelminthika durchschnittlich viermal pro Jahr. Ein selektives

Entwurmungsschema wurde in dieser Studie als eine evidenzbasierte anthelminthische Behandlung einzelner Pferde definiert, nachdem eine parasitologische, meist koproskopische Untersuchung mit Diagnosestellung durchgeführt wurde. In dieser Studie gaben die Tierhalter von 8,7 % der beprobten Pferde an, ein selektives Entwurmungsmanagement zu praktizieren. Das Parasitenmanagement in diesen Betrieben schloss präventive Hygienemaßnahmen ein, die nach tierärztlicher Beratung festgelegt wurden. Die konkrete Durchführung des selektiven Entwurmungsmanagements unterschied sich zwischen den beprobten Betrieben. So schickten zwei Betriebe im Rahmen der Überwachung ein- oder zweimal im Jahr Sammelkotproben zur Diagnostik ein, wobei diese Proben nicht direkt entnommen, sondern nach ein paar Stunden vom Boden aufgesammelt wurden. Ein Pferd in der Studienpopulation befand sich als einziges Pferd zwischen konventionell entwurmten Pferden in einem Pensionsstall, und bei diesem Pferd war seit über einem Jahr keine Kotprobe mehr im Hinblick auf die quantitative Bewertung der MDS-Eiausscheidung untersucht worden. Die Anzahl der Untersuchungszeitpunkte für die Kotprobenuntersuchung mittels gängiger Flotationsmethode variierte zwischen den selektiv entwurmenden Betrieben und wurde laut Aussage der Tierhalter selten genau nach epidemiologischen Faktoren und der erwarteten Wirkungsdauer des zuletzt eingesetzten Anthelminthikums evaluiert. Darüber hinaus wurden in keinem dieser Betriebe spezifische Untersuchungen auf das Vorhandensein von *S. vulgaris* oder *Anoplocephala* spp. in der Herde vorgenommen oder eine Kontrolle des Behandlungserfolgs durch FECRT durchgeführt. Die zum Teil wenig definierten und uneinheitlichen Ansätze eines selektiven Behandlungsmanagements zwischen den Betrieben müssen daher bei der Bewertung der erhobenen Studienergebnisse berücksichtigt werden.

Eine selektive Entwurmung mit Berücksichtigung der EpG-Werte kann die Kontamination der Umwelt verringern, indem Pferde mit hoher Eiausscheidung gezielt mit Anthelminthika behandelt werden, während gleichzeitig ein Teil der Helminthenpopulation in unbehandelten Pferden nicht dem Selektionsdruck für AR ausgesetzt wird (Lester and Matthews, 2014). Bei der Bewertung des EpG-Werts ist jedoch zu berücksichtigen, dass dieser nicht linear mit der tatsächlichen Infektionsrate mit Helminthen korreliert (Nielsen et al., 2010). Außerdem haben Tydén et al. (2019a) keine Korrelation zwischen der Prävalenz von *S. vulgaris* und der Höhe des EpG-Wertes nachgewiesen, so dass Tiere mit niedrigem EpG trotzdem mit dem pathogensten Parasiten infiziert sein können. Vielmehr wurde ein erhöhtes Risiko für das Vorkommen von *S. vulgaris* in Betrieben festgestellt, bei denen ausschließlich aufgrund der Kotprobenuntersuchungen eine anthelminthische Behandlung erfolgte, was sich mit dem hier ermittelten Risikofaktor deckt. Demnach können Pferde, die wenige MDS-Eier im Kot unterhalb des Schwellenwertes für eine Behandlung aufweisen, zu einer weiteren Ausbreitung von *S. vulgaris* im Betrieb beitragen.

In der Risikofaktoranalyse zum *Anoplocephala*-ELISA erwies sich PYR als zuletzt verwendetes Entwurmungsmittel nicht als protektiver Faktor. Zur anticestodalen Behandlung wird eine therapeutische Dosis von 13,2 mg/kg PYR empfohlen, in der Studienpopulation wurde jedoch, wenn dieser Wirkstoff zuletzt als Entwurmungsmittel verabreicht wurde, jeweils die einfache, nematizide Dosis von 6,6 mg pro kg Körpergewicht angewendet. Vor diesem Hintergrund ließe sich eine partielle Wirksamkeit annehmen, was sich jedoch nicht in der Risikofaktoranalyse widerspiegelt. In der Risikofaktoranalyse zeigt sich, dass die reduzierte Wirkung von PYR im Vergleich zu der Referenzkategorie mit Praziquantel einen gefährdenden Faktor darstellt.

Die logistische Regressionsanalyse zur Ermittlung von potenziellen Risikofaktoren für MDS-Eier im Kot ergab einen signifikant schützenden Effekt durch die letzte anthelminthische Behandlung mit Ivermectin und insbesondere mit Moxidectin im Vergleich zu der Referenzkategorie Fenbendazol. Zudem bildet die Anzahl der Wochen zwischen der Beprobung und der letzten anthelminthischen Behandlung der Pferde in der Studienpopulation einen signifikant gefährdenden Faktor für MDS-Eier im Kot. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Studien, in denen niedrigere EPG-Werte bei Pferden festgestellt wurden, die mit Anthelminthika behandelt worden waren, wobei ML die höchste Wirksamkeit zeigten (Nielsen et al., 2018; Osterman-Lind et al., 1999; Scala et al., 2020). Ebenso zeigte sich in der Risikofaktoranalyse einer deutschen Studie von Boelow et al. (2023), dass die letzte anthelminthische Behandlung mit Moxidectin zu signifikant niedrigeren EpG-Werten führte als die Entwurmung mit anderen Wirkstoffen. Aktuelle Studien melden jedoch das Auftreten von ML-resistenten Cyathostominae-Populationen und weisen auf die Notwendigkeit geeigneter Maßnahmen zur Überwachung der Wirksamkeit von ML und zur Kontrolle der weiteren Ausbreitung hin (Bull et al., 2023; Nielsen et al., 2020).

In einer ungarischen Studie wiesen Pferde, die im Rahmen des anthelminthischen Behandlungsmanagements mindestens einmal jährlich mit BZ behandelt wurden, höhere EpG-Werte auf als die anderen Tiere aus der Studienpopulation, bei denen BZ nicht regelmäßig appliziert wurden (Joó et al., 2022). Anthelminthikaresistenzen der Cyathostominae gegenüber BZ sind in Europa und weltweit verbreitet (Peregrine et al., 2014), wohingegen eine reduzierte ERP, die jedoch nicht als alleiniges Indiz einer beginnenden AR gewertet werden sollte, nach anthelminthischer Behandlung mit Moxidectin und Ivermectin vergleichsweise weniger häufig berichtet wurde (Nielsen, 2022).

4.5. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die gängigen koproskopischen Untersuchungsmethoden sind zum Nachweis einer equinen Bandwurminfektion wenig sensitiv und in dieser Studie wurde nur bei wenigen Pferden eine patente Infektion detektiert, während die serologischen Untersuchungen eine wesentlich

höhere Prävalenz von *Anoplocephala* spp. bei Pferden sowie in Pferdebeständen in Berlin und Brandenburg aufzeigten. Ebenso wurde mittels PCR nur in vereinzelten Fällen DNA von *S. vulgaris* und *S. edentatus* nachgewiesen, wohingegen die ermittelte Seroprävalenz für anti-*S. vulgaris* Antikörper in der Studienpopulation sehr hoch war. Die Ursache für die weite Verbreitung von Antikörpern gegen rSvSXP in der Studienpopulation sollte jedoch weiter untersucht werden, um mögliche Störfaktoren wie Interferenz und Kreuzreaktivität auszuschließen. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass die tierärztliche Diagnostik bei Pferden neben den häufig durchgeführten Flotationstechniken zum mikroskopischen Nachweis der Eier durch den Einsatz von Antikörpernachweisverfahren verfeinert werden kann, um die Exposition bzw. das Vorkommen von *Anoplocephala* spp. und *S. vulgaris* in der Herde zu untersuchen. Dies spiegelt sich auch in der Risikofaktoranalyse wider, in der sich ein selektives Behandlungsschema, welches oft mit einer reduzierten anthelminthischen Behandlungshäufigkeit einhergeht, als Risikofaktor für Antikörper gegen das *S. vulgaris*-Antigen gezeigt hat. Daher wird empfohlen, bei einem selektiven Entwurmungsmanagement spezifisch und unter Verwendung sensitiver Verfahren auch auf das Vorhandensein von *S. vulgaris* in einem Pferdebestand zu testen.

Neben der Überwachung durch diagnostische Maßnahmen und der anthelminthischen Behandlung können insbesondere präventive Managementmaßnahmen dazu beitragen, den Endoparasitendruck bei Pferden zu reduzieren. In dieser Studie zeigte sich die Dauer des Weidezugangs der Pferde als ein gefährdender Faktor für einen direkten oder indirekten Nachweis einer Infektion mit *Anoplocephala* spp., kleinen Strongyliden und *S. vulgaris*. Da die orale Aufnahme infektiöser Parasitenstadien durch ein geeignetes Weidemanagement reduziert werden kann, stellt die Weidehygiene neben der tierärztlichen Beratung über Parasitenbekämpfungsstrategien einen entscheidenden Faktor dar. Zudem zeigte sich in den Risikofaktoranalysen, dass insbesondere junge Pferde bei der Entwicklung von geeigneten Parasitenbekämpfungsprogrammen berücksichtigt werden sollten.

5. Zusammenfassung

Untersuchungen über das Vorkommen von gastrointestinalen Parasiten bei Pferden in Berlin und Brandenburg

Infektionen mit gastrointestinalen Parasiten beim Pferd zeigen weltweit eine hohe Prävalenz und insbesondere parasitierende Helminthen mit hoher Pathogenität für den Wirt, wie *Strongylus* spp. und speziell *Strongylus vulgaris*, sind von veterinärmedizinischer Bedeutung. Ein gezieltes Betriebsmanagement mit effektiven Strategien zur Kontrolle von Endoparasiten sowie ein verantwortungsbewusstes und wirksames anthelminthisches Behandlungsmanagement, welches aufgrund der Verbreitung von Resistenzen gegen Anthelminthika heute eine Herausforderung darstellt, erfordern genaue Kenntnisse über das regionale Vorkommen von Helminthen und potenzielle Risikofaktoren. Das Ziel dieser Studie war es daher, die Prävalenz von gastrointestinalen Parasiten, mit Fokus auf kleine und große Strongyliden sowie auf Bandwürmer, in den regionalen Pferdebeständen unter Verwendung verschiedener direkter und indirekter Nachweismethoden zu beschreiben und anhand der gewonnenen Daten Risikofaktoren zu identifizieren, die mit equinen Helmintheninfektionen assoziiert werden.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Proben von 48 pferdehaltenden Betrieben in Berlin und Brandenburg gesammelt. In dem Zeitraum von Mai 2017 bis Januar 2018 wurden Kot-, Blut- und Speichelproben von 484 Pferden entnommen.

Die Kotproben individueller Pferde wurden zum Nachweis einer patenten Infektion mit Nematoden oder Cestoden mittels quantitativem mini-FLOTAC und der semi-quantitativen kombinierten Sedimentation-Flotation untersucht. Bei koproskopisch positivem Nachweis von Eiern der Magen-Darm-Strongyliden (MDS) wurde eine Larvenkultur auf Einzeltierebene und eine DNA-Isolation durchgeführt. Anschließend wurden PCRs zum Nachweis von Pan-Nematoden-DNA und eine *S. vulgaris*-spezifische real-time PCR durchgeführt. Zudem wurde eine real-time PCR mit hochauflösender Schmelzkurvenanalyse zur Speziesdifferenzierung von *Strongylus edentatus*, *Strongylus equinus* und *Strongylus asini* in diesem Projekt entwickelt. Die *S. vulgaris*-positiven Proben wurden in einem eigens konzipierten Pyrosequencing Assay auf Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in den Codons 167, 198 und 200 des β -Tubulin-Gens vom Isotyp 1 untersucht, die mit dem Auftreten von Benzimidazol-Resistenzen in Nematoden assoziiert werden. Zum Nachweis *Anoplocephala* spp.-spezifischer Antikörper wurden serum- und speichelbasierte ELISAs durchgeführt. Außerdem wurde das Blutserum mittels ELISA auf *S. vulgaris*-spezifische Antikörper untersucht.

Koproskopisch wurde in 66,7 % der Proben Eier vom MDS-Typ nachgewiesen. Weiterhin wurden Eier von *Oxyuris equi*, *Anoplocephala* spp. und *Parascaris* spp. in 1,2 %, 0,6 % und 0,4 % der Kotproben identifiziert. In den Proben von vier Pferden konnte mittels real-time PCR DNA von *S. vulgaris* detektiert werden. Diese Proben zeigten weder bei der Pyrosequenzierung noch bei der Sanger Sequenzierung SNPs auf, die bei Nematoden mit Benzimidazol-Resistenzen in Verbindung gebracht werden. Die Ergebnisse der real-time PCR mit Schmelzkurvenanalyse zeigen den Nachweis von *S. edentatus* DNA in zehn Pferdeproben.

Ein positiver Nachweis von Antikörpern gegen *Anoplocephala* spp. erfolgte bei 16,2 % der Serumproben, woraus sich eine Betriebsprävalenz von 52,1 % ergibt, und in 29,5 % der Speichelproben, was einer Betriebsprävalenz von 75,7 % entspricht. Unter Verwendung eines konservativen Cut-off-Werts mit einer Sensitivität von 43 % und Spezifität von 96 % zeigten sich insgesamt 21,2 % der Serumproben positiv für Antikörper gegen *S. vulgaris* Larven, was einer Prävalenz von 83,3 % auf Betriebsebene entspricht.

Logistische Regressionsanalysen wurden erstellt, um Risikofaktoren für den positiven Antikörpernachweis im serumbasierten *Anoplocephala* spp.-ELISA und dem *S. vulgaris*-ELISA sowie für die Ausscheidung von MDS-Eiern zu bestimmen. In allen Analysen zeigte sich insbesondere ein limitierter Weidezugang als ein schützender Faktor. Große Weideflächen, regelmäßige Weidewechsel und eine hohe Anzahl MDS-Eier pro Gramm Kot wurden als Risikofaktoren für eine positive Serum-Antikörperreaktion auf *Anoplocephala* spp. identifiziert, während das gleichzeitige Vorhandensein von Fohlen und eine hohe Anzahl von Pferden im Betrieb sowie die letzte Behandlung mit Praziquantel schützend wirkten. Ein großer zeitlicher Abstand zu der letzten anthelminthischen Behandlung erhöhte das Risiko der Ausscheidung von MDS-Eiern, während die Verwendung von Moxidectin und Ivermectin bei der letzten Behandlung sowie ein höheres Alter der Pferde das Risiko der Eiausscheidung verringerte. Das Alter erwies sich auch als protektiver Faktor für einen *S. vulgaris*-seropositiven Befund, wohingegen ein selektives Behandlungsschema als Risikofaktor eingestuft wurde.

Die Ergebnisse zum Nachweis von gastrointestinalen Helminthen bei Pferden unterscheiden sich in dieser Studie in Abhängigkeit von der verwendeten Nachweismethode, wobei die Ergebnisse der ELISAs deutlich höhere Prävalenzen von *Anoplocephala* spp. und *S. vulgaris* nahelegen als bei dem direkten Nachweis mittels koproskopischer Methoden oder PCR. Auch durch die Einstufung der selektiven Entwurmung als Risikofaktor für *S. vulgaris*-Antikörper zeigt sich, dass eine evidenzbasierte anthelminthische Behandlungsstrategie von der Anwendung zusätzlicher Nachweismethoden profitieren kann. Es empfiehlt sich daher, die parasitologische Untersuchung mittels gängiger Flotationsmethoden durch spezifische Tests auf das Vorhandensein von *S. vulgaris* oder *Anoplocephala* spp. in der Herde zu ergänzen.

Zusammenfassung

Doch neben dem Monitoring durch diagnostische Maßnahmen und der anthelminthischen Behandlung können insbesondere präventive Managementmaßnahmen, wie ein angepasstes Weidemanagement, zur Reduzierung des Endoparasitendrucks bei Pferden beitragen.

6. Summary

Investigations on the occurrence of gastrointestinal parasites in horses in Berlin and Brandenburg

Infections with gastrointestinal parasites of horses show a high prevalence worldwide and especially parasitic helminths that are highly pathogenic, such as *Strongylus* spp. and in particular *Strongylus vulgaris*, are of veterinary importance. Farm management with effective endoparasite control strategies as well as sustainable and effective anthelmintic management, which is currently challenging due to the spread of anthelmintic resistance, require detailed knowledge of the regional occurrence of helminths and potential risk factors. The aim of this study was therefore to describe the prevalence of gastrointestinal parasites in regional equine populations, focusing on small and large strongyles and tapeworms. The intent was to utilize different direct and indirect detection methods and to identify risk factors associated with equine helminth infections based on the data obtained.

For this project samples were collected from 48 farms in the German federal states Berlin and Brandenburg. Faeces, blood and saliva samples were collected from 484 horses between May 2017 and January 2018.

The faecal samples from individual horses were tested for patent infections with nematodes or cestodes using the quantitative mini-FLOTAC and semiquantitative combined sedimentation-flotation techniques. Larval culture on individual level and DNA isolation were performed for samples that showed strongyle type eggs in the coproscopic analysis. Subsequently, PCRs to detect pan-nematode DNA and *S. vulgaris*-specific real-time PCR were performed. Additionally, a real-time PCR with subsequent high-resolution melt curve analysis for species differentiation of *Strongylus edentatus*, *Strongylus equinus* and *Strongylus asini* was established in this project. *Strongylus vulgaris*-positive samples were analysed in a customized pyrosequencing assay for single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in codons 167, 198 and 200 of the isotype 1 β -tubulin gene, which have been associated with the occurrence of benzimidazole resistance in strongyle nematodes. Serum- and saliva-based ELISAs were performed to detect *Anoplocephala* spp.-specific antibodies. Furthermore, serum was tested for *S. vulgaris*-specific antibodies with an ELISA.

Strongyle type eggs were found in 66.7% of the faecal samples. Eggs of *Oxyuris equi*, *Anoplocephala* spp. and *Parascaris* spp. were identified in 1.2%, 0.6% and 0.4% of the faecal samples, respectively. DNA of *S. vulgaris* was detected in the samples of four horses with real-time PCR. These samples did not show SNPs associated with benzimidazole resistance in nematodes by either pyrosequencing or Sanger sequencing. The high-resolution-melt PCR

Summary

analysis detected DNA of *S. edentatus* in ten horse samples. Antibodies against *Anoplocephala* spp. were detected in 16.2% of serum samples, corresponding to a farm prevalence of 52.1%, and in 29.5% of saliva samples, resulting in a farm prevalence of 75.7%. Applying a conservative cut-off value with a sensitivity of 43% and specificity of 96%, a total of 21.2% of the serum samples appeared positive for antibodies against *S. vulgaris* larvae, corresponding to a farm prevalence of 83.3%.

Logistic regression analyses were performed to determine risk factors for positive antibody detection in the serum-based *Anoplocephala* spp.- and *S. vulgaris*-ELISA as well as for a positive strongyle faecal egg count (FEC). Limited pasture access was found to be a protective factor in all analyses. Large pastures, pasture rotation and a positive strongyle FEC were identified as risk factors for a positive serum antibody response to *Anoplocephala* spp., while the simultaneous presence of foals and a high number of horses on the farm as well as the last anthelmintic treatment with praziquantel were protective. A long period of time since the last anthelmintic treatment increased the risk of a positive FEC, whereas the use of moxidectin and ivermectin for the last deworming and an older age of the horse decreased the risk. Age also appeared to be a protective factor for a *S. vulgaris*-seropositive finding, whereas a selective treatment schedule was classified as a risk factor.

Results for the presence of gastrointestinal helminths in horses in this study differed depending on the detection method used, with ELISA results indicating a higher prevalence of *Anoplocephala* spp. and *S. vulgaris* than the results from coproscopic methods or PCR. Classification of selective deworming as a risk factor for *S. vulgaris* antibodies also demonstrates that an evidence-based anthelmintic treatment strategy can benefit from the use of additional detection methods. Therefore, it is recommended to add specific tests for the presence of *S. vulgaris* or *Anoplocephala* spp. to parasitological examinations with routine flotation techniques. However, in addition to the monitoring with diagnostic methods and anthelmintic treatment, particularly preventive management practices, such as an adequate pasture management, can help reduce endoparasite burden in horses.

7. Literaturverzeichnis

- Abbott, J.B., Barrett, E.J., 2008. The problem of diagnosing tapeworm infections in horses. *Equine veterinary journal* 40, 5-6.
- Adams, A.A., Betancourt, A., Barker, V.D., Siard, M.H., Elzinga, S., Bellow, J.L., Amodie, D.M., Nielsen, M.K., 2015. Comparison of the Immunologic Response to Anthelmintic Treatment in Old Versus Middle-Aged Horses. *Journal of Equine Veterinary Science* 35, 873-881.e873.
- Andersen, U.V., Howe, D.K., Dangoudoubiyam, S., Toft, N., Reinemeyer, C.R., Lyons, E.T., Olsen, S.N., Monrad, J., Nejsum, P., Nielsen, M.K., 2013. SvSXP: a *Strongylus vulgaris* antigen with potential for prepatent diagnosis. *Parasit Vectors* 6, 84.
- Armstrong, S., Woodgate, R., Gough, S., Heller, J., Sangster, N., Hughes, K., 2014. The efficacy of ivermectin, pyrantel and fenbendazole against *Parascaris equorum* infection in foals on farms in Australia. *Veterinary Parasitology* 205, 575-580.
- Avramenko, R.W., Redman, E.M., Lewis, R., Yazwinski, T.A., Wasmuth, J.D., Gilleard, J.S., 2015. Exploring the Gastrointestinal "Nemabiome": Deep Amplicon Sequencing to Quantify the Species Composition of Parasitic Nematode Communities. *PloS one* 10, e0143559.
- Bain, S.A., Kelly, J.D., 1977. Prevalence and pathogenicity of *Anoplocephala perfoliata* in a horse population in South Auckland. *New Zealand veterinary journal* 25, 27-28.
- Becher, A., Van Doorn, D., Pfister, K., Kaplan, R., Reist, M., Nielsen, M., 2018. Equine parasite control and the role of national legislation—A multinational questionnaire survey. *Veterinary parasitology* 259, 6-12.
- Beelitz, P., Göbel, E., Gothe, R., 1996a. Artenspektrum und Befallshäufigkeit von Mutterstuten aus Zuchtbetrieben mit und ohne Anthelmintika-Prophylaxe in Oberbayern. *Tierärztl Praxis* 24, 48-54.
- Beelitz, P., Göbel, E., Gothe, R., 1996b. Endoparasiten von Eseln und Pferden bei gemeinsamer Haltung in Oberbayern: Artenspektrum und Befallshäufigkeit. *Tierärztliche Praxis* 24, 471-475.
- Beelitz, P., Gothe, R., 2001. Bandwurmbefall bei Schlachtpferden in Oberbayern: Befallshäufigkeit und -stärke sowie Korrelation zwischen Befall mit Adultwürmern und Einachweis im Enddarmkot. *Pferdeheilkunde* 17, 423-428.
- Behrens, T., 2001. Bandwürmer (Anoplocephaliden) beim Pferd: Prävalenz in Norddeutschland sowie Eignung eines serologischen Nachweisverfahrens (ELISA) zur Diagnostik. *Vet. med. Diss. Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.*
- Bellow, J.L., Krebs, K., Reinemeyer, C.R., Norris, J.K., Scare, J.A., Pagano, S., Nielsen, M.K., 2018. Anthelmintic therapy of equine cyathostomin nematodes – larvicidal efficacy, egg reappearance period, and drug resistance. *International Journal for Parasitology* 48, 97-105.
- Boelow, H., Krücken, J., Thomas, E., Mirams, G., von Samson-Himmelstjerna, G., 2022. Comparison of FECPAK(G2), a modified Mini-FLOTAC technique and combined sedimentation and flotation for the coproscopic examination of helminth eggs in horses. *Parasit Vectors* 15, 166.
- Boelow, H., Krücken, J., von Samson-Himmelstjerna, G., 2023. Epidemiological study on factors influencing the occurrence of helminth eggs in horses in Germany based on sent-in diagnostic samples. *Parasitol Res* 122, 749-767.
- Boersema, J., Eysker, M., Nas, J. 2002. Apparent resistance of *Parascaris equorum* to macrocyclic lactones (British Medical Journal Publishing Group).
- Bohórquez, G.A., Luzón, M., Martín-Hernández, R., Meana, A., 2015. New multiplex PCR method for the simultaneous diagnosis of the three known species of equine tapeworm. *Veterinary Parasitology* 207, 56-63.

- Bollinger, O., 1870. Die kolik der Pferde und das Wurmaneurysma der Eingeweidearterien. Münchener Sitzungsberichte Königl. Bayerischen Akademie der Wissenschaften. Mathematisch-naturwissenschaftliche Abteilung 1, 539–544.
- Bracken, M.K., Wohlk, C.B., Petersen, S.L., Nielsen, M.K., 2012. Evaluation of conventional PCR for detection of *Strongylus vulgaris* on horse farms. *Vet Parasitol* 184, 387-391.
- Brown, P., Clayton, H.M., 1979. Hepatic pathology of experimental *Parascaris equorum* infection in worm-free foals. *Journal of comparative pathology* 89, 115-123.
- Bull, K.E., Allen, K.J., Hodgkinson, J.E., Peachey, L.E., 2023. The first report of macrocyclic lactone resistant cyathostomins in the UK. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance* 21, 125-130.
- Burkhardt, E., 1983. Zur pathologie des *Strongylus (Delafondia) vulgaris*-Befalls beim Pferd-eine Übersicht. *Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift*.
- Cain, J.L., Foulk, D., Jedrzejewski, E., Stofanek, H., Nielsen, M.K., 2019. The importance of anthelmintic efficacy monitoring: results of an outreach effort. *Parasitology research* 118, 2877-2883.
- Cain, J.L., Jarisch, K., Macaluso, K.R., Luedtke, B.E., 2018. Correlation between fecal egg count, presence of *Strongylus vulgaris*, and body score of feral horses on Fort Polk, Louisiana. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 13, 14-17.
- Campbell, A.J., Gasser, R.B., Chilton, N.B., 1995. Differences in a ribosomal DNA sequence of *Strongylus* species allows identification of single eggs. *International Journal for Parasitology* 25, 359-365.
- Canever, R.J., Braga, P.R.C., Boeckh, A., Grycajuck, M., Bier, D., Molento, M.B., 2013. Lack of Cyathostomin sp. reduction after anthelmintic treatment in horses in Brazil. *Veterinary Parasitology* 194, 35-39.
- Cirak, V., Hermosila, C., Bauer, C., 1996. Study on the gastrointestinal parasite fauna of ponies in northern Germany. *Applied Parasitology* 37, 239-244.
- Clayton, H.M., Duncan, J.L., 1978. Clinical signs associated with *Parascaris equorum* infection in worm-free pony foals and yearlings. *Veterinary Parasitology* 4, 69-78.
- Clayton, H.M., Duncan, J.L., 1979. The development of immunity to *Parascaris equorum* infection in the foal. *Research in Veterinary Science* 26, 383-384.
- Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Silvestre, A., Taylor, M.A., Vercruysse, J., 2006. The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 136, 167-185.
- Collobert-Laugier, C., Hoste, H., Sevin, C., Dorchies, P., 2002. Prevalence, abundance and site distribution of equine small strongyles in Normandy, France. *Veterinary Parasitology* 110, 77-83.
- Corbett, C.J., Love, S., Moore, A., Burden, F.A., Matthews, J.B., Denwood, M.J., 2014. The effectiveness of faecal removal methods of pasture management to control the cyathostomin burden of donkeys. *Parasit Vectors* 7, 48.
- Courtot, É., Boisseau, M., Dhone-Pollet, S., Serreau, D., Gesbert, A., Reigner, F., Basiaga, M., Kuzmina, T., Lluch, J., Annonay, G., Kuchly, C., Diekmann, I., Krücken, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Mach, N., Sallé, G., 2023. Comparison of two molecular barcodes for the study of equine strongylid communities with amplicon sequencing. *PeerJ* 11, e15124.
- Cribb, N.C., Cote, N.M., Bouré, L.P., Peregrine, A.S., 2006. Acute small intestinal obstruction associated with *Parascaris equorum* infection in young horses: 25 cases (1985-2004). *New Zealand veterinary journal* 54, 338-343.
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Veneziano, V., Capelli, G., Scala, A., 2004. The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Vet Parasitol* 123, 121-131.
- Cwiklinski, K., Kooyman, F.N., Van Doorn, D.C., Matthews, J.B., Hodgkinson, J.E., 2012. New insights into sequence variation in the IGS region of 21 cyathostomin species and the implication for molecular identification. *Parasitology* 139, 1063-1073.

- Denegri, G.M., 1993. Review of oribatid mites as intermediate hosts of tapeworms of the Anoplocephalidae. *Experimental & Applied Acarology* 17, 567-580.
- Dilks, C.M., Hahnel, S.R., Sheng, Q., Long, L., McGrath, P.T., Andersen, E.C., 2020. Quantitative benzimidazole resistance and fitness effects of parasitic nematode beta-tubulin alleles. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance* 14, 28-36.
- Doyle, S.R., Cotton, J.A., 2019. Genome-wide Approaches to Investigate Anthelmintic Resistance. *Trends Parasitol* 35, 289-301.
- Drogemuller, M., Beelitz, P., Pfister, K., Schnieder, T., Samson-Himmelstjerna, G.v., 2004. Amplification of ribosomal DNA of Anoplocephalidae: *Anoplocephala perfoliata* diagnosis by PCR as a possible alternative to coprological methods. *Veterinary Parasitology* 124, 205-215.
- Drudge, J.H., Lyons, E.T., 1966. Control of internal parasites of the horse. *J Am Vet Med Assoc* 148, 378-383.
- Duncan, J., Campbell, J., 1973. Further observations on the maintenance of a monospecific infection of *Strongylus vulgaris* in the horse. *Veterinary Record* 92, 533-533.
- Duncan, J., Pirie, H., 1972. Life cycle of *Strongylus vulgaris* in the horse. *Research in veterinary science*.
- Duncan, J., Pirie, H., 1975. The pathogenesis of single experimental infections with *Strongylus vulgaris* in foals. *Research in veterinary science* 18, 82-93.
- Elghryani, N., McOwan, T., Mincher, C., Duggan, V., de Waal, T., 2023. Estimating the Prevalence and Factors Affecting the Shedding of Helminth Eggs in Irish Equine Populations. *Animals : an open access journal from MDPI* 13.
- Engell-Sørensen, K., Pall, A., Damgaard, C., Holmstrup, M., 2018. Seasonal variation in the prevalence of equine tapeworms using coprological diagnosis during a seven-year period in Denmark. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports* 12, 22-25.
- Enigk, K., 1949. Zur biologie und bekämpfung von *oxyuris equi*. *Z. Tropenmed. Parasitol* 1, 259-272.
- Enigk, K., 1950. Development of *Strongylus vulgaris* in the host. *Zeitschrift fur Tropenmedizin und Parasitologie* 2, 287-306.
- ESCCAP, 2019. Empfehlungen zur Behandlung und Kontrolle gastrointestinaler Parasiten bei Pferden und anderen Equiden. Deutsche Adaption der ESCCAP-Empfehlung Nr. 8 https://www.esccap.org/uploads/docs/7yd2oo9c_22022PferdeEmpfehlung8.pdf.
- Eysker, M., Jansen, J., Wemmenhove, R., Mirck, M., 1983. Alternate grazing of horses and sheep as control for gastro-intestinal helminthiasis in horses. *Veterinary Parasitology* 13, 273-280.
- Fogarty, U., del Piero, F., Purnell, R.E., Mosurski, K.R., 1994. Incidence of *Anoplocephala perfoliata* in horses examined at an Irish abattoir. *The Veterinary record* 134, 515-518.
- Francisco, I., Arias, M., Cortiñas, F., Francisco, R., Mochales, E., Dacal, V., Suárez, J., Uriarte, J., Morrondo, P., Sánchez-Andrade, R., 2009. Intrinsic factors influencing the infection by helminth parasites in horses under an oceanic climate area (NW Spain). *Journal of Parasitology Research* 2009.
- Fritzen, B., Rohn, K., Schnieder, T., von Samson-Himmelstjerna, G., 2010. Endoparasite control management on horse farms—lessons from worm prevalence and questionnaire data. *Equine Veterinary Journal* 42, 79-83.
- Gasser, R.B., Williamson, R.M., Beveridge, I., 2005. *Anoplocephala perfoliata* of horses--significant scope for further research, improved diagnosis and control. *Parasitology* 131, 1-13.
- Geary, T.G., Hosking, B.C., Skuce, P.J., von Samson-Himmelstjerna, G., Maeder, S., Holdsworth, P., Pomroy, W., Vercruyse, J. 2012. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) Guideline: Anthelmintic combination products targeting nematode infections of ruminants and horses (Elsevier).
- Gehlen, H., Wulke, N., Ertelt, A., Nielsen, M.K., Morelli, S., Traversa, D., Merle, R., Wilson, D., Samson-Himmelstjerna, G.v., 2020. Comparative Analysis of Intestinal Helminth Infections in Colic and Non-Colic Control Equine Patients. *Animals* 10, 1916.

- Getachew, A.M., Innocent, G., Proudman, C.J., Trawford, A., Feseha, G., Reid, S.W., Faith, B., Love, S., 2012. Equine cestodosis: a sero-epidemiological study of *Anoplocephala perfoliata* infection in Ethiopia. *Vet Res Commun* 36, 93-98.
- Geurden, T., Smith, E.R., Vercruyssen, J., Yazwinski, T., Settje, T., Nielsen, M.K., 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. *Veterinary Parasitology* 304, 109698.
- Ghisi, M., Kaminsky, R., Mäser, P., 2007. Phenotyping and genotyping of *Haemonchus contortus* isolates reveals a new putative candidate mutation for benzimidazole resistance in nematodes. *Veterinary Parasitology* 144, 313-320.
- Gibson, T., 1953. The effect of repeated anthelmintic treatment with phenothiazine on the faecal egg counts of housed horses, with some observations on the life cycle of *Trichonema* spp. in the horse. *Journal of helminthology* 27, 29-40.
- Giles, C., Urquhart, K., Longstaffe, J., 1985. Larval cyathostomiasis (immature trichonema-induced enteropathy): A report of 15 clinical cases. *Equine veterinary journal* 17, 196-201.
- Hartmann, H., 1932. Zur Pathogenese der embolisch-thrombotischen Kolik des Pferdes unter besonderer Berücksichtigung der Anastomosverhältnisse der Dickdarmarterien. Tierärztliche Hochschule zu Berlin.
- Hautala, K., Näreaho, A., Kauppinen, O., Nielsen, M.K., Sukura, A., Rajala-Schultz, P.J., 2019. Risk factors for equine intestinal parasite infections and reduced efficacy of pyrantel embonate against *Parascaris* sp. *Veterinary Parasitology* 273, 52-59.
- Hedberg-Alm, Y., Penell, J., Riihimäki, M., Osterman-Lind, E., Nielsen, M.K., Tydén, E., 2020. Parasite Occurrence and Parasite Management in Swedish Horses Presenting with Gastrointestinal Disease—A Case–Control Study. *Animals* 10, 638.
- Herd, R., 1990. The changing world of worms: the rise of the cyathostomes and the decline of *Strongylus vulgaris*. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 12, 732-736.
- Herd, R.P., Willardson, K.L., 1985. Seasonal distribution of infective strongyle larvae on horse pastures. *Equine Vet J* 17, 235-237.
- Hinney, B., Wirtherle, N.C., Kyule, M., Miethe, N., Zessin, K.-H., Clausen, P.-H., 2011a. Prevalence of helminths in horses in the state of Brandenburg, Germany. *Parasitology Research* 108, 1083.
- Hinney, B., Wirtherle, N.C., Kyule, M., Miethe, N., Zessin, K.H., Clausen, P.H., 2011b. A questionnaire survey on helminth control on horse farms in Brandenburg, Germany and the assessment of risks caused by different kinds of management. *Parasitol Res* 109, 1625-1635.
- Hoglund, J., Ljungstrom, B.L., Nilsson, O., Ugglå, A., 1995. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Anoplocephala perfoliata* in horse sera. *Vet Parasitol* 59, 97-106.
- Hreinsdóttir, I., Hreinsdóttir, A., Eydal, M., Tysnes, K.R., Robertson, L.J., 2019. *Anoplocephala perfoliata* infection in horses in iceland: investigation of associations between intensity of infection and lesions. *Journal of Parasitology* 105, 379-386.
- Ihler, C.F., Rootwelt, V., Heyeraas, A., Dolvik, N.J., 1995. The prevalence and epidemiology of *Anoplocephala perfoliata* infection in Norway. *Vet Res Commun* 19, 487-494.
- Jenkins, E., Backwell, A.L., Bellaw, J., Colpitts, J., Liboiron, A., McRuer, D., Medill, S., Parker, S., Shury, T., Smith, M., Tschirter, C., Wagner, B., Poissant, J., McLoughlin, P., 2020. Not playing by the rules: Unusual patterns in the epidemiology of parasites in a natural population of feral horses (*Equus caballus*) on Sable Island, Canada. *International journal for parasitology. Parasites and wildlife* 11, 183-190.
- Joó, K., Trúzsi, R.L., Kálmán, C.Z., Ács, V., Jakab, S., Bába, A., Nielsen, M.K., 2022. Evaluation of risk factors affecting strongylid egg shedding on Hungarian horse farms. *Veterinary parasitology, regional studies and reports* 27, 100663.
- Jürgenschellert, L., Krücken, J., Austin, C.J., Lightbody, K.L., Bousquet, E., von Samson-Himmelstjerna, G., 2020. Investigations on the occurrence of tapeworm infections in

- German horse populations with comparison of different antibody detection methods based on saliva and serum samples. *Parasites & Vectors* 13, 1-10.
- Jürgenschellert, L., Krücken, J., Bousquet, E., Bartz, J., Heyer, N., Nielsen, M.K., von Samson-Himmelstjerna, G., 2022. Occurrence of Strongylid Nematode Parasites on Horse Farms in Berlin and Brandenburg, Germany, With High Seroprevalence of *Strongylus vulgaris* Infection. *Frontiers in Veterinary Science* 9.
- Kania, S.A., Reinemeyer, C.R., 2005. *Anoplocephala perfoliata* coproantigen detection: a preliminary study. *Vet Parasitol* 127, 115-119.
- Kaplan, R., Nielsen, M., 2010. An evidence-based approach to equine parasite control: It ain't the 60s anymore. *Equine Veterinary Education* 22, 306-316.
- Kaplan, R.M., 2002. Anthelmintic resistance in nematodes of horses. *Veterinary research* 33, 491-507.
- Kaplan, R.M., Denwood, M.J., Nielsen, M.K., Thamsborg, S.M., Torgerson, P.R., Gilleard, J.S., Dobson, R.J., Vercruyse, J., Levecke, B., 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.
- Kaspar, A., Pfister, K., Nielsen, M.K., Silaghi, C., Fink, H., Scheuerle, M.C., 2016. Detection of *Strongylus vulgaris* in equine faecal samples by real-time PCR and larval culture – method comparison and occurrence assessment. *BMC Veterinary Research* 13, 19.
- Kiedrowski, C., 1959. Helminthologische Untersuchungen an Pferden vor und nach der Schlachtung. Dissertation. Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland.
- Klei, T.R., Chapman, M.R., 1999. Immunity in equine cyathostome infections. *Veterinary Parasitology* 85, 123-136.
- Kornaś, S., Cabaret, J., Skalska, M., Nowosad, B., 2010. Horse infection with intestinal helminths in relation to age, sex, access to grass and farm system. *Vet Parasitol* 174, 285-291.
- Kuzmina, T.A., 2012. Contamination of the environment by strongylid (Nematoda: Strongylidae) infective larvae at horse farms of various types in Ukraine. *Parasitol Res* 110, 1665-1674.
- Kuzmina, T.A., Dzeverin, I., Kharchenko, V.A., 2016. Strongylids in domestic horses: Influence of horse age, breed and deworming programs on the strongyle parasite community. *Vet Parasitol* 227, 56-63.
- Kwa, M.S.G., Veenstra, J.G., Roos, M.H., 1993. Molecular characterisation of β -tubulin genes present in benzimidazole-resistant populations of *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 60, 133-143.
- Lacey, E., 1988. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International journal for parasitology* 18, 885-936.
- Lake, S.L., Matthews, J.B., Kaplan, R.M., Hodgkinson, J.E., 2009. Determination of genomic DNA sequences for beta-tubulin isotype 1 from multiple species of cyathostomin and detection of resistance alleles in third-stage larvae from horses with naturally acquired infections. In: *Parasites & vectors*, pp. 1-12.
- Lamason, R., Zhao, P., Rawat, R., Davis, A., Hall, J.C., Chae, J.J., Agarwal, R., Cohen, P., Rosen, A., Hoffman, E.P., Nagaraju, K., 2006. Sexual dimorphism in immune response genes as a function of puberty. *BMC immunology* 7, 2.
- Larsen, M.M., Lendal, S., Chriél, M., Olsen, S.N., Bjørn, H., 2002. Risk factors for high endoparasitic burden and the efficiency of a single anthelmintic treatment of Danish horses. *Acta Vet Scand* 43, 99-106.
- Leathwick, D.M., Sauermann, C.W., Nielsen, M.K., 2019. Managing anthelmintic resistance in cyathostomin parasites: Investigating the benefits of refugia-based strategies. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance* 10, 118-124.
- Lester, H.E., Matthews, J.B., 2014. Faecal worm egg count analysis for targeting anthelmintic treatment in horses: points to consider. *Equine Vet J* 46, 139-145.

- Lester, H.E., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Matthews, J.B., 2018. Analysis of Strongyle Egg Shedding Consistency in Horses and Factors That Affect It. *Journal of Equine Veterinary Science* 60, 113-119.e111.
- Lichtenfels, J.R., Kharchenko, V.A., Dvojnjos, G.M., 2008. Illustrated identification keys to strongylid parasites (Strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). *Vet Parasitol* 156, 4-161.
- Lightbody, K.L., Davis, P.J., Austin, C.J., 2016. Validation of a novel saliva-based ELISA test for diagnosing tapeworm burden in horses. *Veterinary clinical pathology* 45, 335-346.
- Love, S., Duncan, J. 1991. Could the worms have turned? (Wiley Online Library).
- Love, S., Duncan, J., 1992. The development of naturally acquired cyathostome infection in ponies. *Veterinary Parasitology* 44, 127-142.
- Love, S., Murphy, D., Mellor, D., 1999. Pathogenicity of cyathostome infection. *Veterinary parasitology* 85, 113-122.
- Lyons, E., Tolliver, S., Ionita, M., Collins, S., 2008. Evaluation of parasiticidal activity of fenbendazole, ivermectin, oxibendazole, and pyrantel pamoate in horse foals with emphasis on ascarids (*Parascaris equorum*) in field studies on five farms in Central Kentucky in 2007. *Parasitology research* 103, 287-291.
- Macdonald, S.L., Abbas, G., Ghafar, A., Gauci, C.G., Bauquier, J., El-Hage, C., Tennent-Brown, B., Wilkes, E.J.A., Beasley, A., Jacobson, C., Cudmore, L., Carrigan, P., Hurley, J., Beveridge, I., Hughes, K.J., Nielsen, M.K., Jabbar, A., 2023. Egg reappearance periods of anthelmintics against equine cyathostomins: The state of play revisited. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 21, 28-39.
- Malan, F.S., De Vos, V., Reinecke, R.K., Pletcher, J.M., 1982. Studies on *Strongylus asini*. I. Experimental infestation of equines. *The Onderstepoort journal of veterinary research* 49, 151-154.
- Martin, F., Höglund, J., Bergström, T.F., Karlsson Lindsjö, O., Tydén, E., 2018. Resistance to pyrantel embonate and efficacy of fenbendazole in *Parascaris univalens* on Swedish stud farms. *Veterinary Parasitology* 264, 69-73.
- Martínez-Valladares, M., Valderas-García, E., Gandasegui, J., Skuce, P., Morrison, A., Castilla Gómez de Agüero, V., Cambra-Pellejà, M., Balaña-Fouce, R., Rojo-Vázquez, F.A., 2020. Teladorsagia circumcincta beta tubulin: the presence of the E198L polymorphism on its own is associated with benzimidazole resistance. *Parasit Vectors* 13, 453.
- McCraw, B.M., Slocombe, J.O., 1976. *Strongylus vulgaris* in the horse: a review. *The Canadian Veterinary Journal* 17, 150-157.
- McCraw, B.M., Slocombe, J.O., 1978. *Strongylus edentatus*: development and lesions from ten weeks postinfection to patency. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 42, 340-356.
- McCraw, B.M., Slocombe, J.O., 1985. *Strongylus equinus*: development and pathological effects in the equine host. *Can J Comp Med* 49, 372-383.
- McCraw, B.M., Slocombe, J.O.D., 1974. Early Development of and Pathology Associated with *Strongylus edentatus*. *Canadian Journal of Comparative Medicine* 38, 124-138.
- Mezgebu, T., Tafess, K., Tamiru, F., 2013. Prevalence of gastrointestinal parasites of horses and donkeys in and around Gondar Town, Ethiopia. *Open Journal of Veterinary Medicine* 3, 267.
- Mitchell, M.C., Tzelos, T., Handel, I.A.N., McWilliam, H.E.G., Hodgkinson, J.E., Nisbet, A.J., Kharchenko, V.O., Burgess, S.T.G., Matthews, J.B., 2016. Development of a recombinant protein-based ELISA for diagnosis of larval cyathostomin infection. *Parasitology* 143, 1055-1066.
- Mohammedsalih, K.M., Krücken, J., Bashar, A., Juma, F.R., Abdalmalaik, A.A.H., Khalafalla, A., Abakar, A., Coles, G., von Samson-Himmelstjerna, G., 2021. Susceptible trichostrongyloid species mask presence of benzimidazole-resistant *Haemonchus contortus* in cattle. *Parasit Vectors* 14, 101.
- Morariu, S., Mederle, N., Badea, C., Dărăbuș, G., Ferrari, N., Genchi, C., 2016. The prevalence, abundance and distribution of cyathostomins (small strongyles) in horses from Western Romania. *Vet Parasitol* 223, 205-209.

- Murphy, D., Love, S., 1997. The pathogenic effects of experimental cyathostome infections in ponies. *Veterinary parasitology* 70, 99-110.
- Nicholls, J.M., Clayton, H.M., Pirie, H., Duncan, J., 1978. A pathological study of the lungs of foals infected experimentally with *Parascaris equorum*. *Journal of comparative pathology* 88, 261-274.
- Nielsen, M.K., 2021. What makes a good fecal egg count technique? *Vet Parasitol* 296, 109509.
- Nielsen, M.K., 2022. Anthelmintic resistance in equine nematodes: Current status and emerging trends. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance* 20, 76-88.
- Nielsen, M.K., Banahan, M., Kaplan, R.M., 2020. Importation of macrocyclic lactone resistant cyathostomins on a US thoroughbred farm. *International journal for parasitology. Drugs and drug resistance* 14, 99-104.
- Nielsen, M.K., Baptiste, K.E., Tolliver, S.C., Collins, S.S., Lyons, E.T., 2010. Analysis of multiyear studies in horses in Kentucky to ascertain whether counts of eggs and larvae per gram of feces are reliable indicators of numbers of strongyles and ascarids present. *Vet Parasitol* 174, 77-84.
- Nielsen, M.K., Branagan, M.A., Wiedenheft, A.M., Digianantonio, R., Scare, J.A., Bellaw, J.L., Garber, L.P., Koprak, C.A., Phillippi-Taylor, A.M., Traub-Dargatzis, J.L., 2018. Risk factors associated with strongylid egg count prevalence and abundance in the United States equine population. *Veterinary Parasitology* 257, 58-68.
- Nielsen, M.K., Donoghue, E.M., Stephens, M.L., Stowe, C.J., Donecker, J.M., Fenger, C.K., 2016a. An ultrasonographic scoring method for transabdominal monitoring of ascarid burdens in foals. *Equine Vet J* 48, 380-386.
- Nielsen, M.K., Jacobsen, S., Olsen, S.N., Bousquet, E., Pihl, T., 2016b. Nonstrangulating intestinal infarction associated with *Strongylus vulgaris* in referred Danish equine cases. *Equine Vet J* 48, 376-379.
- Nielsen, M.K., Mittel, L., Grice, A., Erskine, M., Graves, E., Vaala, W., Tully, R.C., French, D.D., Bowman, R., Kaplan, R.M., 2019. AAEP Parasite Control Guidelines. American Association of Equine Practitioners, Lexington <https://aaep.org/document/internal-parasite-control-guidelines>.
- Nielsen, M.K., Peterson, D.S., Monrad, J., Thamsborg, S.M., Olsen, S.N., Kaplan, R.M., 2008. Detection and semi-quantification of *Strongylus vulgaris* DNA in equine faeces by real-time quantitative PCR. *Int J Parasitol* 38, 443-453.
- Nielsen, M.K., Pfister, K., von Samson-Himmelstjerna, G., 2014a. Selective therapy in equine parasite control—application and limitations. *Vet Parasitol* 202, 95-103.
- Nielsen, M.K., Reinemeyer, C.R., Donecker, J.M., Leathwick, D.M., Marchiondo, A.A., Kaplan, R.M., 2014b. Anthelmintic resistance in equine parasites—Current evidence and knowledge gaps. *Veterinary Parasitology* 204, 55-63.
- Nielsen, M.K., Sauermann, C.W., Leathwick, D.M., 2019. The effect of climate, season, and treatment intensity on anthelmintic resistance in cyathostomins: A modelling exercise. *Veterinary Parasitology* 269, 7-12.
- Nielsen, M.K., Scare, J., Gravatte, H.S., Bellaw, J.L., Prado, J.C., Reinemeyer, C.R., 2015a. Changes in serum *Strongylus vulgaris*-specific antibody concentrations in response to anthelmintic treatment of experimentally infected foals. *Frontiers in Veterinary Science* 2, 17.
- Nielsen, M.K., Vidyashankar, A.N., Bellaw, J., Gravatte, H.S., Cao, X., Rubinson, E.F., Reinemeyer, C.R., 2015b. Serum *Strongylus vulgaris*-specific antibody responses to anthelmintic treatment in naturally infected horses. *Parasitology Research* 114, 445-451.
- Nielsen, M.K., Vidyashankar, A.N., Olsen, S.N., Monrad, J., Thamsborg, S.M., 2012. *Strongylus vulgaris* associated with usage of selective therapy on Danish horse farms—is it reemerging? *Vet Parasitol* 189, 260-266.
- Nielsen, M.K., von Samson-Himmelstjerna, G., Pfister, K., Reinemeyer, C.R., Molento, M.B., Peregrine, A.S., Hodgkinson, J.E., Jacobsen, S., Kaplan, R.M., Matthews, J.B., 2016c.

- The appropriate antiparasitic treatment: Coping with emerging threats from old adversaries. *Equine Vet J* 48, 374-375.
- Nielsen, M.K., Wang, J., Davis, R., Bellow, J.L., Lyons, E.T., Lear, T.L., Goday, C., 2014c. *Parascaris univalens*--a victim of large-scale misidentification? *Parasitol Res* 113, 4485-4490.
- Nilsson, O., Ljungstrom, B.L., Hoglund, J., Lundquist, H., Uggla, A., 1995. *Anoplocephala perfoliata* in horses in Sweden: prevalence, infection levels and intestinal lesions. *Acta veterinaria Scandinavica* 36, 319-328.
- Ogbourne, C., 1972. Observations on the free-living stages of strongylid nematodes of the horse. *Parasitology* 64, 461-477.
- Olt, A., 1932. Das Aneurysma verminosum des Pferdes und seine unbekanntenen Beziehungen zur Kolik. *Dtsch. Tierarztl. Wschr* 40, 326-332.
- Osterman-Lind, E., Hedberg Alm, Y., Hassler, H., Wilderoth, H., Thorolfson, H., Tydén, E., 2022. Evaluation of Strategies to Reduce Equine Strongyle Infective Larvae on Pasture and Study of Larval Migration and Overwintering in a Nordic Climate. *Animals : an open access journal from MDPI* 12.
- Osterman-Lind, E., Hoglund, J., Ljungstrom, B.L., Nilsson, O., Uggla, A., 1999. A field survey on the distribution of strongyle infections of horses in Sweden and factors affecting faecal egg counts. *Equine Vet J* 31, 68-72.
- Owen, J., Slocombe, D., 1985. Pathogenesis of helminths in equines. *Veterinary Parasitology* 18, 139-153.
- Pavone, S., Veronesi, F., Genchi, C., Fioretti, D.P., Brianti, E., Mandara, M.T., 2011. Pathological changes caused by *Anoplocephala perfoliata* in the mucosa/submucosa and in the enteric nervous system of equine ileocecal junction. *Vet Parasitol* 176, 43-52.
- Peregrine, A.S., Molento, M.B., Kaplan, R.M., Nielsen, M.K., 2014. Anthelmintic resistance in important parasites of horses: Does it really matter? *Veterinary Parasitology* 201, 1-8.
- Pihl, T.H., Nielsen, M.K., Olsen, S.N., Leifsson, P.S., Jacobsen, S., 2018. Nonstrangulating intestinal infarctions associated with *Strongylus vulgaris*: Clinical presentation and treatment outcomes of 30 horses (2008-2016). *Equine Vet J* 50, 474-480.
- Pimpinelli, S., Goday, C., 1989. Unusual kinechores and chromatin diminution in *Parascaris*. *Trends in genetics* 5, 310-315.
- Poissant, J., Gavriiluc, S., Bellow, J., Redman, E.M., Avramenko, R.W., Robinson, D., Workentine, M.L., Shury, T.K., Jenkins, E.J., McLoughlin, P.D., Nielsen, M.K., Gilleard, J.S., 2021. A repeatable and quantitative DNA metabarcoding assay to characterize mixed strongyle infections in horses. *Int J Parasitol* 51, 183-192.
- Prichard, R., 2001. Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics. *Trends in Parasitology* 17, 445-453.
- Proudman, C., Matthews, J., 2000. Control of intestinal parasites in horses. *In Practice* 22, 90-97.
- Proudman, C.J., Edwards, G.B., 1992. Validation of a centrifugation/flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis. *The Veterinary record* 131, 71-72.
- Proudman, C.J., French, N.P., Trees, A.J., 1998. Tapeworm infection is a significant risk factor for spasmodic colic and ileal impaction colic in the horse. *Equine veterinary journal* 30, 194-199.
- Proudman, C.J., Trees, A.J., 1996a. Correlation of antigen specific IgG and IgG(T) responses with *Anoplocephala perfoliata* infection intensity in the horse. *Parasite Immunol* 18, 499-506.
- Proudman, C.J., Trees, A.J., 1996b. Use of excretory/secretory antigens for the serodiagnosis of *Anoplocephala perfoliata* cestodiasis. *Vet Parasitol* 61, 239-247.
- Raue, K., Heuer, L., Böhm, C., Wolken, S., Epe, C., Strube, C., 2017. 10-year parasitological examination results (2003 to 2012) of faecal samples from horses, ruminants, pigs, dogs, cats, rabbits and hedgehogs. *Parasitol Res* 116, 3315-3330.
- Redman, E., Whitelaw, F., Tait, A., Burgess, C., Bartley, Y., Skuce, P.J., Jackson, F., Gilleard, J.S., 2015. The emergence of resistance to the benzimidazole anthelmintics in parasitic

- nematodes of livestock is characterised by multiple independent hard and soft selective sweeps. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0003494.
- Rehbein, S., Lindner, T., Visser, M., Winter, R., 2011. Evaluation of a double centrifugation technique for the detection of *Anoplocephala* eggs in horse faeces. *Journal of helminthology* 85, 409-414.
- Rehbein, S., Visser, M., Winter, R., 2013. Prevalence, intensity and seasonality of gastrointestinal parasites in abattoir horses in Germany. *Parasitol Res* 112, 407-413.
- Reinemeyer, C., Herd, R., Gabel, A., 1988. Distribution of adult and larval cyathostomes in helminth-naive foals after primary infection. *Equine veterinary journal* 20, 296-297.
- Reinemeyer, C., Nielsen, M., 2014. Review of the biology and control of *Oxyuris equi*. *Equine Veterinary Education* 26, 584-591.
- Reinemeyer, C., Nielsen, M., 2017. Control of helminth parasites in juvenile horses. *Equine veterinary education* 29, 225-232.
- Reinemeyer, C.R., 2012. Anthelmintic resistance in non-strongylid parasites of horses. *Veterinary Parasitology* 185, 9-15.
- Reinemeyer, C.R., Nielsen, M.K., 2009. Parasitism and Colic. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 25, 233-245.
- Relf, V.E., Morgan, E.R., Hodgkinson, J.E., Matthews, J.B., 2013. Helminth egg excretion with regard to age, gender and management practices on UK Thoroughbred studs. *Parasitology* 140, 641-652.
- Rendle, D., Austin, C., Bowen, M., Cameron, I., Furtado, T., Hodgkinson, J., McGorum, B., Matthews, J., 2019. Equine de-worming: a consensus on current best practice. *UK-Vet Equine* 3, 1-14.
- Round, M.C., 1969. The prepatent period of some horse nematodes determined by experimental infection. *Journal of helminthology* 43, 185-192.
- Russel, A., 1948. The development of helminthiasis in thoroughbred foals. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 58, 107-127.
- Saeed, K., Qadir, Z., Ashraf, K., Ahmad, N., 2010. Role of intrinsic and extrinsic epidemiological factors on strongylosis in horses. *J Anim Plant Sci* 20, 277-280.
- Sallé, G., Cortet, J., Koch, C., Gascogne, T., Reigner, F., Cabaret, J., 2016. Ivermectin failure in the control of *Oxyuris equi* in a herd of ponies in France. *Vet Parasitol* 229, 73-75.
- Scala, A., Tamponi, C., Sanna, G., Predieri, G., Dessi, G., Sedda, G., Buono, F., Cappai, M.G., Veneziano, V., Varcasia, A., 2020. Gastrointestinal Strongyles Egg Excretion in Relation to Age, Gender, and Management of Horses in Italy. *Animals : an open access journal from MDPI* 10.
- Scháňková, Š., Maršálek, M., Wagnerová, P., Lukešová, D., Starostová, L., Jankovská, I., Čadková, Z., Kudrnáčová, M., Brožová, A., Truněčková, J., 2013. Treatment failure of ivermectin for *Oxyuris equi* in naturally infected ponies in Czech Republic. *Helminthologia* 50, 232-234.
- Schneider, S., Pfister, K., Becher, A.M., Scheuerle, M.C., 2014. Strongyle infections and parasitic control strategies in German horses — a risk assessment. *BMC Veterinary Research* 10, 262.
- Skotarek, S.L., 2008. Epidemiology and diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* in horses from Southern Alberta, Canada. Lethbridge, Alta.: University of Lethbridge, Faculty of Arts and Science, 2008,
- Skotarek, S.L., Colwell, D.D., Goater, C.P., 2010. Evaluation of diagnostic techniques for *Anoplocephala perfoliata* in horses from Alberta, Canada. *Vet Parasitol* 172, 249-255.
- Smith, G., Grenfell, B.T., Isham, V., Cornell, S., 1999. Anthelmintic resistance revisited: underdosing, chemoprophylactic strategies, and mating probabilities. *International Journal for Parasitology* 29, 77-91.
- Spieler, N., Schnyder, M., 2022. Helminths and their management in Swiss Army horses: differences between riding horses and pack horses evidence the need of improvement. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* 164, 385-399.
- Stancampiano, L., Usai, F., Marigo, A., Rinnovati, R., 2017. Are small strongyles (Cyathostominae) involved in horse colic occurrence? *Veterinary Parasitology* 247, 33-36.

- Steuer, A.E., Anderson, H.P., Shepherd, T., Clark, M., Scare, J.A., Gravatte, H.S., Nielsen, M.K., 2022. Parasite dynamics in untreated horses through one calendar year. *Parasit Vectors* 15, 50.
- Straub, L.M., 2020. Eine vergleichende Studie über das Vorkommen von *Oxyuris equi* und anderer Endoparasiten beim Pferd. Diplomarbeit. Veterinärmedizinischen Universität Wien, Wien, Österreich.
- Tatz, A., Segev, G., Steinman, A., Berlin, D., Milgram, J., Kelmer, G., 2012. Surgical treatment for acute small intestinal obstruction caused by *Parascaris equorum* infection in 15 horses (2002–2011). *Equine Veterinary Journal* 44, 111-114.
- Tomczuk, K., Kostro, K., Szczepaniak, K.O., Grzybek, M., Studzińska, M., Demkowska-Kutrzepa, M., Roczeń-Karczmarz, M., 2014. Comparison of the sensitivity of coprological methods in detecting *Anoplocephala perfoliata* invasions. *Parasitology Research* 113, 2401-2406.
- Traversa, D., Fichi, G., Campigli, M., Rondolotti, A., Iorio, R., Proudman, C.J., Pellegrini, D., Perrucci, S., 2008. A comparison of coprological, serological and molecular methods for the diagnosis of horse infection with *Anoplocephala perfoliata* (Cestoda, Cyclophyllidea). *Vet Parasitol* 152, 271-277.
- Traversa, D., Iorio, R., Klei, T.R., Kharchenko, V.A., Gawor, J., Otranto, D., Sparagano, O.A., 2007. New method for simultaneous species-specific identification of equine strongyles (nematoda, strongylida) by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol* 45, 2937-2942.
- Traversa, D., Milillo, P., Barnes, H., von Samson-Himmelstjerna, G., Schurmann, S., Demeler, J., Otranto, D., Lia, R.P., Perrucci, S., Frangipane di Regalbono, A., Beraldo, P., Amodie, D., Rohn, K., Cobb, R., Boeckh, A., 2010. Distribution and species-specific occurrence of cyathostomins (Nematoda, Strongylida) in naturally infected horses from Italy, United Kingdom and Germany. *Veterinary Parasitology* 168, 84-92.
- Traversa, D., von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Milillo, P., Schurmann, S., Barnes, H., Otranto, D., Perrucci, S., di Regalbono, A.F., Beraldo, P., Boeckh, A., Cobb, R., 2009. Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. *Parasit Vectors* 2 Suppl 2, S2.
- Trotz-Williams, L., Physick-Sheard, P., McFarlane, H., Pearl, D.L., Martin, S.W., Peregrine, A.S., 2008. Occurrence of *Anoplocephala perfoliata* infection in horses in Ontario, Canada and associations with colic and management practices. *Vet Parasitol* 153, 73-84.
- Tydén, E., Enemark, H.L., Franko, M.A., Höglund, J., Osterman-Lind, E., 2019a. Prevalence of *Strongylus vulgaris* in horses after ten years of prescription usage of anthelmintics in Sweden. *Veterinary Parasitology: X* 2, 100013.
- Tydén, E., Jansson, A., Ringmark, S., 2019b. Parasites in Horses Kept in A 2.5 Year-Round Grazing System in Nordic Conditions without Supplementary Feeding. *Animals : an open access journal from MDPI* 9.
- Tzelos, T., Geyer, K.K., Mitchell, M.C., McWilliam, H.E., Kharchenko, V.O., Burgess, S.T., Matthews, J.B., 2020. Characterisation of serum IgG (T) responses to potential diagnostic antigens for equine cyathostomiasis. *International Journal for Parasitology*.
- Venkatesan, A., Jimenez Castro, P.D., Morosetti, A., Horvath, H., Chen, R., Redman, E., Dunn, K., Collins, J.B., Fraser, J.S., Andersen, E.C., Kaplan, R.M., Gilleard, J.S., 2023. Molecular evidence of widespread benzimidazole drug resistance in *Ancylostoma caninum* from domestic dogs throughout the USA and discovery of a novel β -tubulin benzimidazole resistance mutation. *PLoS pathogens* 19, e1011146.
- VETIDATA 2022. Veterinärmedizinischer Informationsdienst für Arzneimittelanwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht (zitiert vom 21.10.2022) <www.vetidata.de>.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Coles, G.C., Jackson, F., Bauer, C., Borgsteede, F., Cirak, V.Y., Demeler, J., Donnan, A., Dorny, P., Epe, C., Harder, A., Högglund, J., Kaminsky, R., Kerboeuf, D., Kuttler, U., Papadopoulos, E., Posedi, J., Small, J., Varady, M., Vercruyssen, J., Wirtherle, N., 2009a. Standardization of the egg hatch test for the detection of benzimidazole resistance in parasitic nematodes. *Parasitol Res* 105, 825-834.

- von Samson-Himmelstjerna, G., Janssen, I.J.I., Ramünke, S., Goday, C., Borges, F.A., Koudela, B., Niedźwiedź, A., Tomczuk, K., Studzińska, M.B., Kornas, S., Krücken, J., 2021. Very low intraspecific sequence variation in selected nuclear and mitochondrial *Parascaris univalens* genes. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 95, 105035.
- von Samson-Himmelstjerna, G., Traversa, D., Demeler, J., Rohn, K., Milillo, P., Schurmann, S., Lia, R., Perrucci, S., di Regalbono, A.F., Beraldo, P., Barnes, H., Cobb, R., Boeckh, A., 2009b. Effects of worm control practices examined by a combined faecal egg count and questionnaire survey on horse farms in Germany, Italy and the UK. *Parasit Vectors* 2 Suppl 2, S3.
- Wirtherle, N., Schnieder, T., von Samson-Himmelstjerna, G., 2004. Prevalence of benzimidazole resistance on horse farms in Germany. *Veterinary Record* 154, 39-41.
- Wolf, D., Hermosilla, C., Taubert, A., 2014. *Oxyuris equi*: lack of efficacy in treatment with macrocyclic lactones. *Vet Parasitol* 201, 163-168.
- Wood, E.L., Matthews, J., Stephenson, S., Slotte, M., Nussey, D., 2013. Variation in fecal egg counts in horses managed for conservation purposes: individual egg shedding consistency, age effects and seasonal variation. *Parasitology* 140, 115-128.

8. Anhang

8.1. Geografische Verteilung der Proben

Es wurden im Rahmen der Prävalenzstudie 48 Pferdehöfe in Berlin und Brandenburg angefahren. Es wurden alle in der Mailingliste des Landesverbandes Pferdesport Berlin-Brandenburg e. V. (Stand: 07.04.2017) aufgeführten Mitglieder per E-Mail angefragt. Zusätzlich wurde eine Zeitungsanzeige in dem regionalen Fachmagazin REITEN und ZUCHT IN BERLIN UND BRANDENBURG-ANHALT (Ausgabe September 2017) sowie eine Online-Kleinanzeige auf der dazugehörigen Homepage (www.reiten-zucht.de) geschaltet. Diese Studie wurde weiteren Pferdehaltern durch soziale Medien (hauptsächlich über <https://de-de.facebook.com>) bekannt gemacht.

In Tabelle 1 wird die regionale Verteilung der Probensammlung dargestellt. Das Havelland und Teltow-Fläming sind in dieser Studie überproportional vertreten. Es wurden keine pferdehaltenden Betriebe in den Kreisen Elbe-Elster, Märkisch-Oderland, Oderspreewald-Lausitz, Oder-Spree und Prignitz sowie den kreisfreien Städten Brandenburg an der Havel, Frankfurt (Oder) und Potsdam beprobt.

Tabelle 1 (Tab1 D) Regionale Verteilung der Probenentnahmen

Kreis/kreisfreie Stadt	Gesamtanzahl an Probenentnahmen	
	Einzeltierebene	Betriebsebene
Berlin	35	3
Barnim	39	4
Dahme-Spreewald	30	3
Elbe-Elster	0	0
Havelland	134	13
Märkisch-Oderland	0	0
Oberhavel	28	3
Oderspreewald-Lausitz	0	0
Oder-Spree	0	0
Ostprignitz-Ruppin	36	4
Potsdam-Mittelmark	42	4
Prignitz	0	0
Spree-Neiße	22	2
Teltow-Fläming	85	9
Uckermark	21	2
Brandenburg an der Havel	0	0
Cottbus	12	1
Frankfurt (Oder)	0	0
Potsdam	0	0

Publikationen

Publikationen (Peer-reviewed)

Jürgenschellert, L., Krücken, J., Austin, C.J., Lightbody, K.L., Bousquet, E., von Samson-Himmelstjerna, G., 2020. Investigations on the occurrence of tapeworm infections in German horse populations with comparison of different antibody detection methods based on saliva and serum samples. *Parasites & Vectors* 13, 1-10.
<https://doi.org/10.1186/s13071-020-04318-5>

Jürgenschellert, L., Krücken, J., Bousquet, E., Bartz, J., Heyer, N., Nielsen, M.K., von Samson-Himmelstjerna, G., 2022. Occurrence of Strongylid Nematode Parasites on Horse Farms in Berlin and Brandenburg, Germany, With High Seroprevalence of *Strongylus vulgaris* Infection. *Frontiers in Veterinary Science* 9.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2022.892920>

Abstracts von Vorträgen oder Posterpräsentationen in Tagungsbänden

Jürgenschellert, L., Krücken, J., Heyer, N., Bousquet, E., von Samson-Himmelstjerna, G., 2017. Speziesdifferenzierung großer Strongyliden aus Pferdekotproben mittels real-time PCR und anschließender Schmelzkurvenanalyse. Tagung der DVG-Fachgruppe „Parasitologie und parasitäre Krankheiten“, Hannover, Deutschland, 12. bis 14. Juni 2017, Verlag der DVG-Service GmbH, ISBN 978-3-86345-372-5, Seite 141

Jürgenschellert, L., Krücken, J., Austin, C.J., Nielsen, M.K., Bousquet, E., von Samson-Himmelstjerna, G., 2018. Koproskopische, serologische und molekulare Untersuchungen zum Vorkommen von *Strongylus* spp. und *Anoplocephala* spp. in Pferdebeständen in Berlin und Brandenburg. Tagung der DVG-Fachgruppe „Parasitologie und parasitäre Krankheiten“, Gießen, Deutschland, 02. bis 04. Juli 2018, Verlag der DVG-Service GmbH, ISBN 978-3-86345-420-3, Seite 83

Jürgenschellert, L., Krücken, J., Bousquet, E., Austin, C.J., von Samson-Himmelstjerna, G., 2018. Investigations on the occurrence of *Anoplocephala* spp. in horse populations in Berlin and Brandenburg. 11. Doktorandensymposium & DRS Präsentationsseminar „Biomedical Sciences“ des Fachbereichs Veterinärmedizin der FU Berlin, Berlin, Deutschland, 21. September 2018, Mensch und Buch Verlag, ISBN 978-3-86387-929-7, Seite 15

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Dissertation begleitet und unterstützt haben:

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. von Samson-Himmelstjerna für die Überlassung des Themas und die stets hilfreiche und konstruktive Unterstützung bei der Durchführung des Projektes. Mein besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. Krücken für die wertvollen Hilfen bei der Studienplanung und die engagierte Betreuung während der Projektarbeit und des Verfassens dieser Dissertation. Zudem möchte ich mich bei ihm für seinen wesentlichen Beitrag zur statistischen Auswertung der erhobenen Daten bedanken.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeiter:innen aus dem Institut für Parasitologie und Tropenveterinärmedizin der Freien Universität Berlin. Herzlichen Dank an alle Doktorandinnen und Doktoranden, die meine Zeit in dem Institut nicht nur fachlich, sondern auch menschlich bereichert haben. Eine großartige Unterstützung erhielt ich von den technischen Mitarbeiterinnen, denen ein großer Dank gebührt. Frau Bartmann und Frau Seidl danke ich für die Durchführung der kombinierten Sedimentation-Flotation und für die Einweisung in die koproskopischen Verfahren. Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Ramünke für die Unterweisung in die PCR, die Pyrosequenzierung und weiterer Labormethoden. Ich möchte mich bei Frau Hoffmann-Köhler für ihre Unterstützung bei der Probenahme bedanken.

Ich danke Frau Dr. Austin für die Untersuchung der Serum- und Speichelproben, sowie für ihre Hilfestellung bei der Interpretation der Testergebnisse. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Nielsen für die Testung der Serumproben in seinem Labor und für seine fachkundigen Beiträge zu diesem Thema bedanken. Der Firma Virbac, insbesondere Herrn Dr. Jürgen Bartz und Herrn Dr. Eric Bousquet, möchte ich für die Mitwirkung an diesem Projekt im Rahmen der Forschungs Kooperation danken.

Insbesondere den Pferdebesitzer:innen, die an der Studie teilgenommen haben, möchte ich für ihre unverzichtbare Mithilfe danken. Den Pferden auf den beprobten Höfen gebührt meine tiefe Wertschätzung und Dankbarkeit.

Schließlich gebührt ein herzlicher Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der gesamten Zeit motiviert und unterstützt haben.

Finanzierungsquellen

Diese Arbeit wurde von Virbac im Rahmen einer Forschungs Kooperation mit der Freien Universität Berlin finanziert (Vertragsnummer 2014000271).

Zur Durchführung des Forschungsvorhabens wurde von der Freien Universität Berlin ein Promotionsstipendium für den Zeitraum vom 01.09.2016 bis 30.11.2018 gewährt.

Interessenskonflikte

Im Rahmen dieser Arbeit bestehen keine Interessenskonflikte durch Zuwendungen Dritter.

Selbstständigkeitserklärung

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

Berlin, den 03.07.2024

Laura Jürgenschellert